



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



JEFFERSSON KRISHAN TRIGO GUTIERREZ

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS FOTODINÂMICOS DE CURCUMINA
ENCAPSULADA EM NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



JEFFERSSON KRISHAN TRIGO GUTIERREZ

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS FOTODINÂMICOS DE CURCUMINA
ENCAPSULADA EM NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS**

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

2016

Trigo-Gutierrez, Jeffersson Krishan

Síntese, caracterização e efeitos fotodinâmicos da curcumina encapsulada em nanopartículas poliméricas / Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

92 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Fotoquimioterapia 2. Fungos .3. Bactérias 4. Nanopartículas
I. Título

JEFFERSSON KRISHAN TRIGO GUTIERREZ

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS FOTODINÂMICOS DA CURCUMINA
ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

Comissão Julgadora

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Prótese

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

2º Examinador: Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo

3º Examinador: Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira

Araraquara, 24/06/2016

JEFFERSSON KRISHAN TRIGO GUTIERREZ

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

FILIAÇÃO: Angel Elias Trigo Velasco

Maria Concepción Gutierrez Hanco

2003 a 2008: Curso de Graduação pela Facultad de Odontologia Universidad Mayor de San Andrés (Bolívia)

2014 a 2016: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico o presente trabalho a Deus por abençoar-me sempre, iluminar minha vida.

Aos meus pais Angel e Maria, por todo sacrifício que eles fizeram para dar-me o melhor sempre, por me educar e ensinar como viver a vida, mais que todo por todo o amor que me deram. São sem dúvida para mim um exemplo de luta, sacrifício e amor.

Aos meus irmãos Beremiz e Hans, meus melhores amigos e cúmplices, sempre me apoiando e animando para continuar nesta luta de todos os dias que é a vida. Daria minha vida por eles e eles o fariam por mim.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima, um verdadeiro exemplo de pesquisador, professor e pessoa. Agradeço toda paciência e toda a ajuda que me deu durante este tempo.

A Paula Barbugli, quem desenvolveu a nanoformulação e com muita paciência me ensinou como fazer a nanoformulação

A minha melhor amiga Kássia de Carvalho Dias por todos os momentos bons e não tão bons vividos juntos ficarão para sempre no meu coração. Ela é uma das pessoas maravilhosas que nosso senhor Deus pus no meu caminho quando vim para o Brasil; Kassinha você merece todo o melhor do mundo e eu sempre estarei com você para ajudá-la como você me ajudou.

A Geisiane Helena Gomes Bueno, nosso relacionamento começou como pós-graduando e técnica de laboratório, agora graças a Deus ela virou uma das minhas melhores amigas, Geisi obrigado por toda sua ajuda, porém agradeço mais a sua amizade e a paciência que você teve comigo.

Agradecimentos

Ao Brasil, esta terra abençoada por Deus habitada por pessoas maravilhosas de bom coração que me acolheram como se fosse mais um brasileiro.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, uma das melhores faculdades de Odontologia do mundo, foi uma verdadeira honra ser parte desta escola.

Ao programa de pós-graduação em Reabilitação Oral, em especial à Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, por me dar a oportunidade de realizar o mestrado aqui no Brasil.

A todos os professores do departamento de Materiais odontológicos e Prótese, foi um prazer aprender de vocês.

A todos os amigos e companheiros de laboratório e da vida: Fernanda Alves, Bruna Novelli, Livia Jacovassi, Beatriz Panariello, Camila de Foggi, Gabriela Alonso.

Às alunas de Iniciação Científica: Ana Laura, Maria Isabella, Gabriela, Bruna, obrigado pela parceria.

Aos amigos hispanofalantes: Maria Isabel, Midian, Elkin, Natalie, obrigado por me dar a oportunidade de conhecê-los.

A Jéssica Bernegossi pela amizade, e parceria.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio econômico para o desenvolvimento desta pesquisa (FAPESP)2013/ 23165-5

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Universal 446401/ 2014-5

Ao Instituto de Química de Araraquara pelo uso do Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Campo

À Faculdade de Farmácia da UNESP pelo uso do Nanoziser.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado.

“Deus dá as batalhas mais difíceis aos seus melhores soldados”

Papa Francisco

Trigo - Gutierrez JK. Síntese, caracterização e efeitos fotodinâmicos da curcumina encapsulada em nanopartículas poliméricas (Dissertação de Mestrado). Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016

Resumo

O objetivo deste estudo foi formular e avaliar os efeitos fotodinâmicos da curcumina (CUR) encapsulada em nanopartículas poliméricas (NP) em culturas plactônicas de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e em biofilme misto formado por essas três espécies. NP de CUR aniônicas e catiônicas foram sintetizadas utilizando-se polímero poli-ácido láctico (PLA) e sulfato de dextran (DEX). Para caracterização dessa solução, foram determinadas as propriedades físicoquímicas (tamanho, polidispersão e potencial zeta) e realizados testes de eficiência de encapsulamento, espectro de absorção, fotoestabilidade (fotodegradação da CUR) e atividade fotodinâmica (fotodegração de reagente e *scavenger* de oxigênio singlete). Em seguida, os efeitos da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) mediada pela CUR-NP contra culturas planctônicas e biofilme misto cultivado in vitro por 48 horas, foram avaliados por meio de quantificação de colônias (UFC/mL). Cada avaliação foi realizada em triplicata em três ocasiões distintas e comparada com CUR livre. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial ($\alpha=0,05$). Após a síntese as CUR-NP apresentaram propriedades nanométricas farmacotécnicas adequadas, com valores médios de tamanho, polidispersão e potencial zeta 237,9; 0,08 e -35,2 mV; 239; 0,20 e +32 mV respectivamente para as CUR-NP aniônica e catiônica. Foi observada uma eficiência de encapsulamento de 67 e 64,6 % para as CUR-NP aniônicas e catiônicas. Os sinais de máxima absorção de luz para as CUR-NP e CUR foram próximos da faixa UV-visível, também foi observada a degradação das formulações em diferentes períodos de iluminação. A liberação de CUR das NP aniônicas e catiônicas foi de 96% após 48 horas de estudo. Também foi observada maior atividade fotodinâmica após 5 minutos de irradiação tanto para as CUR-NP quanto para a CUR livre. aPDT mediada por CUR livre demonstrou melhor eficácia antimicrobiana contra os três micro-organismos tanto em culturas planctônicas quanto em biofilme misto de três espécies comparada com a CUR-NP aniônica mediadora de aPDT uma vez que a CUR livre erradicou os três micro-organismos em cultura planctônica ($p < 0,001$) e promoveu diminuição da viabilidade do biofilme misto, observou-se maior efetividade sobre *C. albicans* ($p \leq 0,026$). Enquanto a CUR-NP aniônica associada a luz azul promoveu a diminuição da viabilidade dos três micro-organismos em cultura planctônicas tendo maior efeito sobre *S. mutans* ($p < 0,001$), além disso, não foi observada diminuição da viabilidade do

biofilme misto($p \geq 0,129$). A CUR-NP catiônica apresentou efeito antimicrobiano mesmo na ausência de luz em culturas planctônicas dos três micro-organismos ($p < 0,001$) e biofilme misto, sendo a bactéria *S. mutans* o mais suscetível à formulação ($p < 0,001$). A formulação sintetizada foi solúvel em água e homogênea e a eficácia fotodinâmica antimicrobiana em culturas planctônicas foi inferior comparada com a CUR livre.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. Fungo. Bactérias. Nanopartículas.

Trigo - Gutierrez JK. Synthesis, characterization and photodynamic effects of curcumin encapsulated in polymeric nanoparticles (Dissertação de Mestrado). Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016

Abstract

The aim of this study was to formulate and evaluate the photodynamic effect of curcumin (CUR) encapsulated in polymeric nanoparticles (NP) on planktonic cultures of *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and on multispecies biofilm formed by these microorganisms. Anionic and cationic CUR-NP were synthesized using poly-lactic acid (PLA), and dextran sulfate (DEX). To characterize this solution, the physicochemical properties (size, polydispersity and zeta potential) were determined and tests of encapsulation efficiency, absorption spectrum, photostability (photodegradation of CUR) and photodynamic activity (photobleaching of singlet oxygen reagent and scavenger) were also performed. Next, antimicrobial effects of CUR-NP-mediated Photodynamic Therapy (PDT) against planktonic cultures and mixed biofilms grown in vitro for 48 hours were assessed by quantification of colonies (CFU/mL). Each evaluation were carried out in triplicate on three separate occasions and compared to free CUR. Data were submitted to descriptive and inferential statistical analysis ($\alpha = 0.05$). After synthesis CUR-NP had appropriate pharmacotechnical nanometric properties, mean values of size, polydispersity, and zeta potential were 237.9; 0.08 and -35.2 mV; 239; 0.20 and +32 mV, respectively for anionic and cationic CUR-NP. Encapsulation efficiency of 67 and 64.6% for anionic and cationic CUR-NP were observed. Peaks absorption for CUR-NP and CUR were close to UV-visible range, was also observed degradation of the formulations at different times of lighting. The release of CUR from anionic and cationic NP was 96% after 48 hours of study. It was also observed greater photodynamic activity after 5 minutes of irradiation for both CUR-NP and for the free CUR. Free CUR mediated aPDT demonstrated better antimicrobial effects against the three microorganisms both planktonic cultures as for mixed biofilms of three species compared with aPDT mediated by anionic CUR-NP, because aPDT mediated by free CUR eradicated the three microorganisms in the planktonic culture ($p < 0.001$) and promoted decrease in viability of the mixed biofilm, there was more effective on *C. albicans* ($p \leq 0.026$). While anionic CUR-NP associated with blue light promoted reduction of viability of the three planktonic microorganisms in culture with better effect on *S. mutans* ($p < 0.001$) Moreover, there was no

decrease in viability of mixed biofilm by anionic CUR-NP ($p \geq 0.129$). Cationic CUR-NP showed antimicrobial effect even in light absence of against planktonic cultures of the three micro-organisms ($p < 0.001$), and mixed biofilm, bacteria *S. mutans* was the most susceptible to formulation ($p < 0.001$). The synthesized formulation improved solubility in water and stability CUR-NP were homogeneous and showed antimicrobial photodynamic efficacy was superior in planktonic cultures was lower compared to the free CUR.

Keywords: Photochemotherapy. Yeast. Bacteria. Nanoparticles.

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1- Valores médios de Tamanho, Polidispersão e potencial zeta ($\pm$ desvio padrão) das formulações de CUR-NP, NP aniônica, CUR-NP e NP catiônica (n=9 cada). Letras iguais não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$). Letras diferentes apresentaram diferença significativa ($p<0,027$).

Tabela 2: Valores médios de absorbância do DFBB obtidos para as amostras de CUR, CUR-NP aniônica e catiônica nos diferentes tempos de iluminação para determinação da atividade fotodinâmica ($\pm$ desvio padrão).

Figura 1. Curva de crescimento *Candida albicans*.

Figura 2. Curva de crescimento *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

Figura 3. Curva de crescimento *Streptococcus mutans*.

Figura 4. MEV-FEG demonstraram forma esférica das formulações: A: CUR-NP aniônica (magnificação de 100.000x), B: CUR-NP aniônica (magnificação de 10.000x).

Figura 5: Espectro de absorção das formulações: CUR-NP aniônica, CUR-NP catiônica e CUR livre (n=3 para cada formulação).

Figura 6. Fotodegradação da CUR após diferentes períodos de iluminação com luz LED azul (n=3 para cada FS). **(A)** CUR-NP aniônica **(B)** CUR-NP catiônica **(C)** CUR livre.

Figura 7. Liberação de CUR das NP aniônica e catiônica.

Figura 8. Valores médios em $\log_{10}$ de culturas planctônicas de (A) *C. albicans*, (B) SARM e (C) *S. mutans* para cada grupo tratado. Barras de erro: desvio padrão. Letras iguais não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$). Letras diferentes apresentaram diferença significativa ($p<0,048$).

Figura 9. Valores médios em $\log_{10}$ para cada micro-organismo do biofilme misto submetidos aos tratamentos avaliados. Barras de erro: desvio padrão. (A) biofilme misto tratado com CUR livre. (B) biofilme misto tratado CUR-NP aniônica. (C) biofilme misto tratado com CUR-NP catiônica. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$). Letras diferentes demonstram que houve diferença estatística significativa ($p<0,036$).

Figura 10. Imagens de microscopia de fluorescência dos FS utilizados em culturas planctônicas de *C. albicans* (A, B e C), *S. mutans* (D, E e F) e SARM (G, H e I). A, D e G: CUR-NP aniônica; B, E e H: CUR-NP catiônica; e C, F e I: CUR livre. Magnificação 50X.

Lista de símbolos e abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Graus Célsius
μ	Micro
μL	microlitro
aPDT	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm ²	Centímetro quadrado
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio
CUR	Curcumina
DEX	Dextran
DFBF	Difenil iso benzo furano
DMSO	Dimetilsulfóxido
h	Horas
J	Joules
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio dihidratado
LED	Luz emitida por Diodo
M	Molar
mg	miligramas
mL	mililitros
mW	MiliWattios
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio monohidratado

NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanôômetro
NP	Nanopartícula
PI	Índice de Polidispersão
PLA	poli (ácido láctico)
Rpm	Rotações por minuto
UI	Unidades Internacionais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3	PROPOSIÇÃO.....	41
4	MATERIAL E MÉTODO.....	42
	4.1 Materiais.....	42
	4.2 Métodos.....	44
5	RESULTADO	53
6	DISCUSSÃO.....	71
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades de micro-organismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica e embebidos em uma matriz polimérica extracelular²⁹. Sua formação se inicia com a aderência de micro-organismos livres, em suspensão, 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” (regulação gênica que influencia várias funções, como a virulência)⁵³. Na etapa seguinte, conhecida como maturação, o biofilme já se apresenta 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 hospedeiro⁵⁸. 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^{13,18}.

A candidose bucal é a infecção fúngica mais comum que acomete os humanos e cujo principal fator etiológico são os fungos do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente em pacientes diabéticos com diagnóstico de estomatite protética¹⁰⁸ e de maior virulência¹² que vive como comensal em diversas regiões do organismo na maioria dos indivíduos saudáveis. No entanto, sob determinadas condições, esse micro-organismo se transforma em um patógeno oportunista, podendo colonizar mucosas, invadir tecidos e causar infecções. *C. albicans* tem a capacidade de se desenvolver em uma variedade de formas morfológicas, que variam desde células leveduriformes (blastóporos) comensais até células filamentosas, denominadas pseudohifas (septadas) ou hifas (não septadas)¹¹⁰. Este polimorfismo celular representa uma transição para a patogenicidade das células de *C. albicans*, pois, uma vez caracterizadas na forma filamentar, as barreiras epiteliais protetoras do hospedeiro podem ser superadas, favorecendo o aparecimento das infecções¹¹⁰. Os fatores de risco para candidose bucal incluem pacientes portadores de próteses dentárias¹¹⁹ uso prolongado de antibióticos, de medicamentos imunossupressores e também condições

sistêmicas como diabetes, deficiências nutricionais e câncer^{95,106,107}. Além disso, a candidose bucal é considerada uma indicadora do desenvolvimento de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), por afetar cerca de 90% dessa população⁸⁹. Em alguns casos, a infecção bucal pode se estender para o trato gastrointestinal ou para corrente sanguínea, desencadeando fungemia. Acima de 90% dos casos dessa infecção sistêmica são atribuídos às espécies de *Candida*, e o número de mortes como resultado da fungemia varia de 40% a quase 80% em pacientes imunossuprimidos^{28,31}.

Apesar das espécies fúngicas de *Candida* serem consideradas os principais patógenos no desenvolvimento da candidose bucal, as bactérias da microbiota contribuem para a colonização e proliferação das espécies fúngicas na cavidade bucal¹¹². Bactérias e fungos, convivem em harmonia uns com os outros na forma de biofilme misto na cavidade bucal¹²³, tendo em vista que os micro-organismos apresentam a capacidade de se aglutinar e interagir, o que resulta numa melhor adesão e em diversas interações benéficas para a maioria das espécies envolvidas. Os colonizadores primários da cavidade bucal correspondem às espécies de *Streptococcus*⁸, que facilitam a colonização de outras espécies secundárias como *Streptococcus mutans* que é o principal agente etiológico da cárie dentária e apresenta reconhecidos fatores de virulência, como capacidade de produzir elevada quantidade de ácidos orgânicos (acidogenicidade) a partir de carboidratos metabolizados, capacidade de sobreviver em baixos pH (aciduricidade) e sintetizar glucano extracelular a partir de sacarose,⁶⁶ que é fundamental para as etapas iniciais de aderência e colonização na superfície dentária para formação do biofilme⁶⁷. Além das lesões de cáries, *S. mutans* tem sido associado a doenças sistêmicas como endocardite infecciosa aguda⁶⁷. Também tem sido reportada elevada prevalência de *S. mutans* na superfície de próteses dentárias^{6,103}, incluindo pacientes com estomatite protética^{6,9,63}, demonstrando a presença de bactérias no biofilme formado em próteses. No entanto, pouco é conhecido sobre a interação desses micro-organismos. Num estudo in vitro de biofilmes polimicrobianos, foi verificado que *S. mutans* aumenta a formação do biofilme de *Candida* spp.^{93,40,79}

Além da maior resistência dos micro-organismos na forma de biofilmes, o uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos⁵⁴ (antibióticos e antifúngicos) tem propiciado o desenvolvimento de cepas resistentes^{17,110} que atualmente tornou-se um problema de saúde pública mundial²². Nesse contexto, a bactéria *Staphylococcus aureus* é considerada um dos patógenos humanos de maior patogenicidade e apesar de não serem colonizadores da cavidade

bucal, foram correlacionados com as condições tais como parotidite supurativa, queilite angular, estomatite protética e infecções dento-alveolares agudas⁶², e algumas cepas desse micro-organismo, devido a alterações em sua parede celular, desenvolveram resistência a vários agentes antibacterianos, sendo denominadas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM)⁴⁸. O SARM tem sido frequentemente identificado entre isolados clínicos de *S. aureus* em indivíduos idosos ou imunossuprimidos^{17,55}, resultando no aparecimento de severas infecções sistêmicas, nesses pacientes. Considerado uma das principais causas de infecção hospitalar, o SARM tem sido apontado como um problema mundial de saúde pública²⁴. Aproximadamente 52% das infecções hospitalares em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) são causadas por esse micro-organismo⁸⁸. Cepas de SARM têm sido isoladas da cavidade bucal de pacientes¹¹⁵, incluindo usuários de prótese^{55,104}, aumentando o risco de infecção desses pacientes. A pneumonia aspirativa tem sido considerada uma das mais preocupantes infecções causadas por *S. aureus*¹²², tendo em vista a elevada taxa de morbidade e mortalidade, especialmente em idosos dependentes de antibióticos¹¹⁴.

Além de *C. albicans* e SARM estarem entre os principais patógenos que acometem a corrente sanguínea de pacientes hospitalizados, a capacidade que esses micro-organismos apresentam de formar uma aliança mútua promove um sinergismo positivo para as espécies^{112,14}, podendo ser encontrados em associação como organismos co-infectantes^{1,6}. A incidência de infecções fúngicas de corrente sanguínea em hospitais foi avaliada por Klotz et al., eles encontraram uma taxa acima de 20% de co-culturas de *S. aureus* e *Candida* spp.⁶⁰. Com o intuito de se avaliar a interação física entre esses dois micro-organismos durante a formação de um biofilme misto, Peters et al. verificaram aderência preferencial de *S. aureus* à forma invasiva filamentosa de *C. albicans*, numa elevada taxa de associação de 56% (30 vezes mais que a associação à forma de blastóporo)⁹⁴. A viabilidade desse biofilme misto foi verificada por microscopia confocal até 40 horas após o crescimento, com ausência de relação de antagonismo entre as espécies, e os autores identificaram 27 proteínas produzidas em maior abundância, como aquelas importantes para o crescimento e metabolismo e implicadas com estresse microbiano e maior virulência de ambas espécies⁹⁴.

Devido às deficiências apresentadas pelos tratamentos atualmente disponíveis, alternativas antimicrobianas têm sido pesquisadas. Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos é a Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT)^{61,117}, 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 singleto e radicais livres que promovem dano e morte celular. Existem dois tipos de reações principais que ocorrem: na reação tipo 1, a transferência direta de elétrons de um FS excitado para um substrato ocorre pela geração de diferentes tipos de radicais, como radical hidroxil e/ou peróxido de hidrogênio. Na reação tipo 2, o FS excitado pode reagir com oxigênio e produzir oxigênio singleto, altamente reativo. Todos esses produtos formados geram uma sequência de eventos oxidativos, os quais resultam na inativação de espécies microbianas e parecem não promover danos aos tecidos e às células do hospedeiro^{61,34,117}. Historicamente, a associação de substâncias químicas e luz foi relatada no final do século XIX por Oscar Raab, e hoje a PDT tem sido utilizada no tratamento de câncer como um método de inativação de células neoplásicas⁶¹. Já a PDT antimicrobiana (aPDT) encontra-se ainda em fase experimental com poucos estudos clínicos. No entanto, vários estudos *in vitro* demonstraram a eficácia da PDT na inativação de diversos micro-organismos, incluindo *S. mutans*^{131,128,78,71,121,109,113,92,73,65}, SARM^{111,46,32,75,11,69} e *C. albicans*^{75, 15,16,33,24,37,27,41,26,74,44,35}.

Apesar desses resultados, alguns FS, como hematoporfirinas e corantes fenotiazínicos têm demonstrado baixa efetividade em promover inativação microbiana *in vivo* tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos.

No entanto, para se alcançar resultados clínicos satisfatórios, além de elevadas concentrações de FS, são necessários longos tempos de pré-irradiação (incubação do micro-organismos com o FS) e de iluminação. Portanto, mais estudos são necessários para se adequar esses parâmetros da aPDT, com o intuito de tornar essa terapia mais viável clinicamente, com tempos de incubação e irradiação menores.

A maioria dos estudos *in vitro* avaliaram a eficácia da aPDT em biofilmes mono-espécies. Entretanto, a investigação dos efeitos fotodinâmicos em biofilmes mistos pode esclarecer determinados aspectos que podem direcionar a aplicação clínica da aPDT. Além disso, o sinergismo entre os micro-organismos em biofilmes multiespécies pode aumentar sua resistência às terapias antimicrobianas, incluindo a aPDT. Por essa razão, e pela escassez de estudos que avaliem o efeito da PDT em biofilmes misto, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas que avaliem FSs mais efetivos contra esses biofilmes.

Neste contexto, a pesquisa de novos FS com elevada efetividade, com características físico-químicas adequadas à fotoinativação microbiana, ainda é um importante desafio. Assim, diversos outros 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, inclusive de biofilmes de *C. albicans*^{38,36,2} e culturas plactônicas de SARM¹⁰². A CUR é um composto de baixo peso molecular isolado dos tubérculos da *Curcuma Longa L.* e um dos componentes presentes no açafrão. Tem sido demonstrado que, isoladamente, a CUR já apresenta efeito antifúngico contra *C. albicans*⁷⁷, e estudos recentes verificaram que esse efeito é potencializado quando a CUR é utilizada como FS associada à luz^{38,36,2}. No entanto, a CUR não é hidrossolúvel, apresenta biodisponibilidade limitada e instabilidade (alta susceptibilidade à degradação fotolítica e hidrolítica)⁵². Adicionalmente, para veiculação da CUR tem sido utilizado solventes orgânicos, como dimetilsufóxido (DMSO)^{38,36,2,99}, que apresentam toxicidade celular. Por isso, é importante a investigação de novos sistemas de veiculação, como micelas poliméricas, ciclodextrinas, lipossomos, nanopartículas e nanoemulsões⁴³, com o intuito de aumentar a solubilidade e diminuir a degradação de FSs hidrofóbicos⁴³.

Nanopartículas poliméricas são sistemas de liberação de fármacos muito estáveis e biocompatíveis, que incluem nanoesferas e nanocapsulas¹²⁶. 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 simples¹²⁶. A maioria dos estudos que avaliam sistemas de liberação de fármacos são voltados para o tratamento de câncer^{87,127,72,118}, e alguns desses sistemas já foram caracterizados para CUR, mas a ação fotodinâmica antimicrobiana foi avaliada somente em culturas planctônicas de bactérias^{49,51,52}. Poucos estudos 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 em biofilmes. No entanto, os efeitos fotodinâmicos da CUR em nanoformulações contra biofilmes mistos ainda não são conhecidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Biofilme

A composição da matriz polimérica do biofilme foi estudada por Al-Fattani et al³⁹. (2006). Esses autores reportaram que células do biofilme são fenotipicamente distintas às células planctônicas ou em suspensão. Em particular, as células do biofilme são significativamente menos susceptíveis a agentes antimicrobianos. A matriz extracelular do biofilme forma um ambiente tridimensional, semelhante a gel, altamente hidratado e carregada localmente no qual os micro-organismos são em grande parte imobilizados. Microcolônias às vezes descrito como “pilhas” ou “torres” são separadas por canais de água que fornecem um mecanismo para a circulação de nutrientes dentro do biofilme. Polímeros da matriz de biofilmes bacterianas são principalmente exopolissacarídeos, e muitos estão carregados negativamente, devido à presença de grupos carboxil, sulfato ou fosfato. Pequenas quantidades de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos também podem estar presentes. Esses autores demonstraram maior resistência de *C. albicans* em biofilme, uma vez que observaram uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol cinco vezes maior em biofilme do que em culturas planctônicas do mesmo fungo. Nesse mesmo estudo, foi verificada maior resistência a terapias medicamentosas de fluconazol e anfotericina B em biofilmes mistos de *C. albicans* e *Streptococcus epidermidis*, pois esses autores observaram uma CIM 30 vezes maior de fluconazol e anfotericina B nesse biofilme misto.

aPDT

A eficácia da aPDT in vivo foi reportada por Mima et al⁸⁰. (2010) esses autores testaram diferentes concentrações de um derivado da porfirina (400, 500 ou 1000 mg/L) com tempo de pré irradiação de 20 minutos associadas a 305 J/cm² utilizando dois diferentes comprimentos de onda de luzes LED (455 ou 630 nm) em lesões de candidose bucal em línguas de camundongos imunossuprimidos. Os autores verificaram após a aPDT a redução na viabilidade de *C. albicans* de 1,04, 1,39 e 1,41; 1,05, 1,59 e 1,40 1,40 log₁₀ associadas às concentrações 400, 500 ou 1000 mg/L e luz azul ou vermelha respectivamente, comparados com o grupo controle. Adicionalmente, verificaram que as lesões apenas tratadas com PS em diferentes concentrações ou apenas com luz não apresentaram efeito antimicrobiano. Apesar de ter tido resultados favoráveis na pesquisa deles esses autores não extrapolam os resultados para aplicação clínica humana de tratamento da candidose bucal.

Costa et al²⁵. (2012) avaliaram a aPDT utilizando 400 $\mu\text{M/L}$ de eritrosina e 16,2 J/cm^2 luz de LED em lesões de candidose bucal de camundongos. O tempo de pré irradiação utilizado por esses autores foi 1 minuto e a iluminação de 3 minutos. Observaram redução de apenas 0,73 $\log_{10}$ na viabilidade de *C. albicans* do grupo aPDT em relação com o grupo controle não tratado. Na avaliação de lesões macroscópicas no dorso da língua dos animais observaram que o grupo submetido a aPDT tinha diminuído o tamanho das lesões. No estudo de microscopia observaram abundante presença de levedura e hifas adjacentes ao epitélio lingual dos animais tratados com aPDT. Paralelamente avaliaram in vitro a capacidade de adesão do fungo às células do epitélio bucal após o microorganismo ser submetido a aPDT, esses autores observaram 35% de redução da capacidade do fungo de se aderir a células epiteliais bucais, demonstrando assim que a aPDT pode ser considerado um método para tratamento de lesões de candidose bucal se danificar o epitélio adjacente.

Junqueira et al⁵⁷. (2012) avaliaram a eficácia da Ftalocianina de zinco em formulação nanoestruturada catiônica como FS contra biofilmes simples de isolados clínicos de *Candida* spp., *Trichosporum mucoides* e *Kodamaea ohmeri* de pacientes com HIV. Eles utilizaram tempo de pré-irradiação de 5 minutos associada a uma dose de luz de 26,3 J/cm^2 . Esses autores acharam uma diminuição de quase 1 $\log_{10}$ em cada uma das espécies avaliadas. Nesse estudo os autores sugerem o uso de FS catiônico pois a carga do FS é um fator importante na determinação da sua ação fotodinâmica eficaz, e as células expostas ao FS (Bactérias gram-negativas e fungos) são resistentes a ftalocianinas aniônicos e neutros.

Ribeiro et al¹⁰¹. (2013) avaliaram a eficácia da aPDT mediada pela Cloro-Alumínio-Ftalocianina (Cl-Al-Fc) em nanoemulsões catiônicas e aniônicas, comparadas com a Cl-Al-Fc diluída em solvente orgânico na inativação de culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Amostras do micro-organismo foram colocadas em contato com o FS em nanoformulação ou na forma livre em concentração final de 31,8 μM ; essas suspensões foram mantidas no escuro durante 30 min (pré irradiação). Após esse período a Cl-Al-Fc foi removida e depois adicionou-se PBS, as culturas foram então transferidas para placas de cultura de 24 poços e iluminada com uma dose de luz de 50 ou 100 J/cm^2 . Os resultados obtidos por esses autores demonstraram maior efetividade do FS catiônico, uma vez que a PDT mediado pelo FS com carga superficial catiônica diminui a viabilidade da cultura planctônica do micro-organismo estudado em 1,5 e 3,1 $\log_{10}$ relacionado a doses de luz de 50 e 100 J/cm^2 respectivamente, enquanto a formulação aniônica associada à luz promoveu redução de 0,5 $\log_{10}$ com ambas doses de luz (50 e 100

J/cm²). Nesse estudo foi observado também a erradicação do micro-organismo quando tratado com Cl-Al-Fc livre associada a 100 J/cm². Quando essa formulação foi testada em biofilme de *C. albicans*, esses autores observaram que o FS em nanoformulação catiônica associado à luz promoveu redução de 70% no metabolismo do biofilme, enquanto a forma livre do FS mediando a aPDT promoveu uma redução de 26% e 34% com doses de luz de 50 e 100 J/cm², respectivamente. Foi observado aumento no metabolismo do micro-organismo no biofilme de 21% quando usada a nanoformulação aniônica associada a 50 J/cm² de dose de luz e uma diminuição de 5% quando utilizada a dose de 100 J/cm².

Em outro estudo, esses autores (Ribeiro et al¹⁰⁰., 2015) testaram as nanoformulações aniônica e catiônicas da Cl-Al-Fc mediando a aPDT comparando-as com a forma livre do FS em culturas planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (SASM) e SARM. A concentração determinada para esses testes foi a mesma do estudo prévio (31,8 µM) apenas variando as doses de luz utilizadas (15, 25 e 50 J/cm²). Esses autores observaram que a aPDT mediada pela nanoformulação de Cl-Al-Fc catiônica promoveu uma diminuição de SASM de 5 e 6 log₁₀ com dose de luz de 15, 25 J/cm², respectivamente, enquanto a aPDT mediada pela nanoformulação aniônica promoveu diminuição de 2 e 4 log₁₀ associada a 15, 25 J/cm² no SASM. Os resultados dos testes sobre o SARM mostraram erradicação da bactéria quando foi utilizado o FS livre ou na forma de nanoemulsão catiônica associada a 50 J/cm². Quando foram utilizadas as doses de 15 e 25 J/cm² esses pesquisadores observaram a diminuição média de 5 log₁₀ para FS livre e forma de nanoemulsão catiônica, enquanto que a nanoformulação aniônica promoveu apenas a diminuição de 1 log₁₀ associada a 50 J/cm². A combinação de densidades de energia de luz de 25 e 50 J/cm² com FS em nanoemulsão catiônica diminuiu o metabolismo biofilme de SASM em 58 e 80%, respectivamente. Já a formulação aniônica e a forma livre do FS associadas a 50 J/cm² de dose de luz promoveram diminuição do metabolismo da bactéria em 42 e 43%, respectivamente. A aPDT mediada pela formulação catiônica em biofilmes de SARM promoveu a diminuição do metabolismo do micro-organismo em 76,5% e 73,5% com doses de luz de 25 e 50 J/cm², respectivamente. A forma livre do FS promoveu diminuição do metabolismo da bactéria em 55% associada à dose de luz maior (50 J/cm²), enquanto o FS em nanoformulação aniônica não demonstrou efetividade antimicrobiana, mesmo associada à altas doses de luz. Em conclusão desses autores, a carga superficial do FS em nanoformulação é muito importante na fotoinativação microbiana.

Quishida et al⁹⁶. (2015) avaliaram os efeitos da aPDT mediada pelo Photoditazine® (PDZ) na inativação de biofilme multiespécies formado por *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. Esses autores utilizaram PDZ em concentrações de 100, 150, 175, 200, e 250 mg/L e uma dose de luz de 37,5 J/cm² de luz vermelha. Observou-se que a aPDT promoveu uma redução significativa das três espécies avaliadas em comparação com o controle, quando 175 e 200 mg/L de PDZ foi associado com a luz de LED. A maior redução na viabilidade das células foi detectada no grupo que utilizou a concentração de 200 mg/L de PDZ em associação com a luz: *C. albicans* (1,21 log₁₀), *C. glabrata* (1,19 log₁₀), e *S. mutans* (2,39 log₁₀). Utilizando o ensaio metabólico XTT, os autores observaram a diminuição de metabolismo das espécies integrantes do biofilme multiespécies. Um último teste utilizado para se verificar a efetividade da aPDT mediada pelo PDZ foi o ensaio de biomassa total (cristal violeta), onde os autores desse trabalho não encontraram diferença significativa entre os grupos tratados. Esses autores consideram a aPDT mediada pelo PDZ uma alternativa na inativação microbiana.

CUR

Com o intuito de determinar a CIM de CUR sobre *Candida* spp. *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Aspergillus* spp., Martins et al⁷⁷. (2009) testaram diferentes concentrações de CUR sobre essas espécies de fungos. A efetividade de inibir crescimento dos micro-organismos da CUR em concentrações de 0,5 – 256 mg/L foi comparada com o antimicótico convencional Fluconazol 0,06-64 mg/L. Os valores de CIM corresponderam a concentrações mais baixas que não permitiram a detecção visual de crescimento fúngico. As suspensões de cada micro-organismo foram incubadas com diferentes concentrações de CUR ou Fluconazol durante 1h. Os valores de CIM achados nessa pesquisa foram 64 mg/L de CUR para *C. albicans*, sendo esse micro-organismo o mais suscetível à CUR pois as outras espécies de *Candida* apresentaram valores de CIM ≥ 256 mg/L. A CUR foi 32 vezes mais eficaz que o fluconazol para inibir o crescimento de *P. brasiliensis* e *S. schenckii*. Esses autores também demonstraram a capacidade da CUR de inibir a adesão das leveduras e fungos filamentosos aos tecidos orais.

Dovigo et al³⁸. (2011) observaram que a capacidade da CUR de absorver luz foi diminuindo progressivamente à medida que o tempo de iluminação foi aumentando, indicando foto-branqueamento induzido. Após uma dose de luz de 0,4 J/cm², cerca de 70% da CUR havia sido fotodegradada. Esses autores verificaram a erradicação de culturas planctônicas de *C.*

albicans utilizando 20 μM de CUR associada a uma dose de luz de 37,5 J/cm^2 . Foi verificada a diminuição de 87,22% na viabilidade de biofilmes de *C. albicans* utilizando 40 μM de CUR e uma dose de luz de 5,28 J/cm^2 de dose de luz. Nessa mesma pesquisa os autores avaliaram o efeito da PDT mediada pela CUR em culturas de macrófagos utilizando concentrações de 0,5; 1; 5; 10 e 20 μM , foi verificada diminuição da atividade metabólica das células em 7,13%, 17,22%, 82,51%, 73,26% e 86,39% respectivamente. Esses autores sugeriram que, embora haja toxicidade celular nas células de defesa, essa toxicidade é maior para a levedura do que para a célula de defesa.

Dovigo et al³⁶. (2011) utilizaram concentrações de 5, 10 e 20 μM de CUR como fotossensibilizador contra culturas planctônicas de isolados clínicos de *C. albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, com tempo de pré iluminação de 20 min e uma dose de luz correspondente a 5,28; 18, 25,5 e 37,5 J/cm^2 . Esses autores observaram erradicação do micro-organismo *C. albicans* utilizando 20 μM de CUR associada às diferentes doses de luz, e diminuição de até 4,57 $\log_{10}$ na viabilidade de *C. glabrata* utilizando 20 μM de CUR e uma dose de luz de 37,5 J/cm^2 . Além disso, foi demonstrada a erradicação de cultura planctônica de *C. tropicalis* utilizando a concentração de 20 μM associada a 37,5 J/cm^2 de luz azul. Esses autores também testaram concentrações de 30 e 40 μM em biofilmes dessas espécies de *Candida*, e observaram diminuição da atividade metabólica por meio do ensaio colorimétrico XTT de cerca de 80% em biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* com 40 μM de CUR associada a 5,28 e 18 J/cm^2 . Para biofilme de *C. tropicalis* foi observada uma diminuição do metabolismo de 73% em relação ao controle, utilizando 40 μM e uma dose de luz de 18 J/cm^2 . Esses autores utilizaram baixas concentrações de CUR na fotoinativação de isolados clínicos de *Candida* spp.

A CIM da CUR contra *S. mutans* foi determinada por Song et al¹¹⁶. (2012) que, por meio de análise de densidade óptica, eles determinaram uma CIM de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esses autores também determinaram em 8 ng/mL como concentração capaz de reduzir a adesão da bactéria a superfícies de vidro e na superfície das raízes de dentes naturais extraídos.

Ribeiro et al⁹⁹. (2012) avaliaram o efeito da CUR como FS em culturas de SARM e *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (SASM). Para isso, alíquotas de 100 μL de suspensões de cada micro-organismo em concentração de 10^6 foram transferidas a poços de placas de cultura, nas quais foram adicionadas 5, 10 e 20 μM de solução de CUR. Essas placas foram mantidas no escuro durante 20 min, e depois as placas foram iluminadas com dose de

luz de 37,5 J/cm². Amostras adicionais receberam CUR sem luz. Um outro grupo recebeu apenas luz para avaliar um possível efeito tóxico da luz. Um último grupo serviu de controle e não recebeu nem CUR nem luz. Esses autores observaram que a aPDT promoveu erradicação da bactéria utilizando 20 µM de CUR e 37,5 J/cm², sendo que concentrações de 5 e 10 µM de CUR associadas a 37,5 J/cm² diminuíram o crescimento bacteriano em 6,7 e 8,3 log₁₀ em relação aos seus respectivos controles para o SARM, enquanto que as três concentrações de FS associadas a doses de luz de 18, 25,5 e 37,5 J/cm² foram necessárias para eliminar o micro-organismo. Nesse estudo também foi verificada a toxicidade da aPDT em fibroblastos *in vitro*. Foi demonstrada uma viabilidade de 68,1, 75,1 e 80% dos macrófagos quando expostos a 5, 10 e 20 µM de CUR associada à luz LED. Esses autores demonstraram a capacidade de fotoinativação associada a CUR de micro-organismo resistente às terapias convencionais.

A atividade antibacteriana da CUR sobre *S. aureus*, SARM, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foi estudada por Gunes et al⁴⁷. (2013). Eles trabalharam em culturas planctônicas desses micro-organismos em concentração de 10⁵; soluções de CUR em concentrações de 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg, 31,3 µg, 15,7 µg, 7,9 µg, 4 µg, 2 µg e 1 µg foram adicionadas nos tubos. Os tubos foram incubados a 37°C durante 24 h. Após a incubação, as atividades antibacterianas de CUR nos tubos foram detectados por uma falta de turbidez, que indicaram a inibição do crescimento bacteriano. A concentração no tubo com a diluição mais elevada que mostrou nenhuma turvação foi definido como a CIM. A CIM de CUR para as diferentes estirpes microbianas utilizadas nesse estudo foi dentre 129 µg/mL e 293 µg/mL. Resultados semelhantes de CIM foram obtidos nesse estudo para *S. aureus* e SARM (219 µg/mL para *S. aureus* e 217 µg/mL para SARM). CIM de 293 µg/mL foi observada contra *E. faecalis*. A CUR demonstrou eficácia antimicrobiana contra *B. subtilis* em uma concentração de 125 µg/mL. Esses autores demonstraram que a CUR inibiu *P. aeruginosa* cultivadas em 175 µg/mL de concentração. O valor de CIM para *E. coli* foi de 163 µg/mL. Esse estudo detectou um valor de CIM de 216 µg/mL contra *K. pneumoniae*. Esses autores detectaram efeitos antibacterianos de CUR contra estirpes de bactérias não resistentes a medicamentos.

Paschoal et al⁹⁰. (2013) avaliaram a eficácia da aPDT mediada pela CUR livre em culturas planctônicas de *S. mutans*. Para isso, em 500 µL de suspensão de micro-organismos, foram adicionados 500 µL de solução de CUR em concentrações de 4.000, 8.000 e 16.000 µM, resultando em concentrações finais de 2.000, 4.000 e 8.000 µM. As placas foram então levadas

no escuro durante 1 min e, após esse período de tempo, as placas com as suspensões foram iluminadas com doses de luz de 24, 48 e 72 J/cm² de luz LED azul (grupos C+L+). Poços contendo suspensões de micro-organismos foram tratadas apenas com CUR sem exposição à luz (C+L-), um terceiro grupo recebeu apenas luz sem CUR (C-L+) e os poços de controle foram constituídos apenas por culturas de *S. mutans*, não receberam nem CUR nem luz (C-L-). A eficácia da aPDT mediada pela CUR em culturas planctônicas de *S. mutans* foi avaliada por meio do número total de unidade formadora de colônias (UFC/mL). Foi observada redução significativa da viabilidade de *S. mutans* com a associação de CUR 4.000 µM e 48 e 72 J/cm², promovendo redução de 60,66% e 71,07% da viabilidade bacteriana, respectivamente.

A eficácia de diferentes tempos de pré-irradiação da CUR em culturas de *C. albicans*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis* foi estudado por Andrade et al². (2013). Para isso, alíquotas de 100 µL de suspensões padronizadas de cada micro-organismo em concentração 10⁶ foram transferidas a placas de cultura de 96 poços, nas quais foram adicionadas 100 µL de CUR em concentrações finais de 5, 10 e 20 µM. Após, as diferentes placas de cultura foram incubadas no escuro por períodos de 1, 5, 10 e 20 min. As amostras foram então irradiadas durante 4 min, correspondentes a 5,28 J/cm². Amostras adicionais foram tratadas apenas com CUR, para se avaliar um possível efeito tóxico da luz um grupo recebeu apenas luz, e um quarto grupo serviu de controle sem receber nem luz nem CUR. Esses autores observaram a erradicação dos micro-organismos após a aPDT utilizando concentrações de 20 µM associada a tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 20 min. O tempo de 1 min de pré-irradiação associado a 20 µM de CUR utilizados para aPDT demonstrou erradicação de *C. dubliniensis* e inativação microbiana de 89,5% de *C. albicans* e *C. glabrata*. Esses autores observaram a diminuição 95% na viabilidade de biofilmes simples de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* associados a 40 µM de CUR com tempo de pré-irradiação de 20 min. Foi observada a incorporação de CUR a cada micro-organismo mediante o uso de microscopia confocal, com maior incorporação de CUR quando o maior o tempo de pré-irradiação foi utilizado. Em conclusão, maiores tempos de pré-irradiação e maiores concentrações de CUR resultam em melhor fotossensibilização do micro-organismo.

A atividade antibacteriana da CUR tem sido estudada nos últimos tempos. Prévios estudos demonstraram CIM de 4-16 g/L contra *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. A CUR também exibe atividade antibacteriana contra cepas resistentes a terapias convencionais como SARM, para o qual foi

demonstrada uma CIM de 125-250 µg/mL. Além das propriedades antibacterianas da CUR, ela apresenta atividade sinérgica contra isolados clínicos de *S. aureus* combinada com outros medicamentos como cefixina, cefotaxima, vancomicina e tetraciclina. Também foi comprovada a capacidade da CUR de inibir a formação de biofilmes mediante a inibição de 31 genes *quorum sensing* e regulação de produção de fatores de virulência. Também foi verificada a atividade antifúngica da CUR em diferentes cepas. O possível mecanismo da atividade antifúngica pode ser explicado pela diminuição de Delta desaturase, que promove uma redução na produção de ergosterol do fungo. Devido a essa diminuição de produção de ergosterol, os precursores biosintéticos desse lipídeo acumulam-se no micro-organismo, levando a morte celular via geração de espécies reativas de oxigênio. Um outro possível efeito da CUR sobre as células fúngicas pode ser explicado devido à redução da secreção de proteinase e alteração da membrana associada à produção de atividade ATPase. No entanto essa atividade antimicrobiana da CUR foi realizado em experimento *in vitro*, não havendo relatos clínicos do uso da CUR (Zorofchian et al¹³³. 2014).

Mun et al⁸⁵. (2014) investigaram a atividade antimicrobiana de CUR associada a detergente X-100 para inibir o crescimento de SARM. Foi verificado por esses autores a potencialização do efeito antimicrobiano da CUR quando combinada com o detergente, eles observaram uma redução de 63% na viabilidade do micro-organismo. No entanto, os autores também observaram que a atividade antimicrobiana da CUR foi afetada pela presença de um rolo vinculativo de ATP. Esses autores demonstraram a união da CUR à camada de peptideoglicano das bactérias gram-positivas, podendo interromper a integridade da parede bacteriana, assim eles sugerem a combinação de detergentes ou inibidores de ATPase para o tratamento de infecções causadas por SARM.

Tyagi et al¹²⁴. (2015) estudaram a lise da membrana celular induzida pela CUR em suspensões padronizadas de *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*. Essas suspensões foram incubadas com soluções de CUR em concentrações de 25, 50 e 100 µM durante 120 min. Após esse tempo, 5 µL dessas suspensões foram gotejadas em lâminas de microscopia e levadas a observação de microscopia confocal em modo fluorescência. Esses autores observaram a fluorescência de *S. aureus* e *E. coli*, demonstrando que esses micro-organismos haviam incorporado o FS nas diferentes concentrações de CUR. Além disso, nesse estudo os autores observaram a alteração da morfologia dos micro-organismos, confirmando assim lise da membrana celular e morte celular induzida pela CUR.

CTAB

Salton et al¹⁰⁵. (1951) avaliaram por microscopia eletrônica a toxicidade de CTAB em concentrações entre 45 e 900 µg/mL contra culturas planctônicas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Observaram morte de 99% de *S. aureus* e *E. faecalis* após o contato de 30 min com solução de CTAB a 90 µg/mL. Ao passo que CTAB a 900 µg/mL em contato com *E. coli* durante 30 min foram necessários para eliminar completamente o micro-organismo. Esses autores observaram que as membranas celulares dos três micro-organismos apresentavam-se danificadas nas diferentes concentrações de CTAB ocasionando a autólise das bactérias.

Caracterização de Nanopartículas

Gaumet et al⁴⁷. (2007) resumiram as características das nanopartículas com o intuito de destacar as principais características de nanoformulações. No referente à determinação do tamanho, esses autores mencionaram que um dos métodos comumente usados é a dispersão da luz ou *Light scattering* (LS), o qual é utilizado para a determinação do tamanho e Polidispersão (homogeneidade) das nanopartículas. Neste modelo de determinação, as nanopartículas são incididas com uma luz em ângulo de 90°, o cálculo baseia-se no princípio de esfera equivalente, em que cada partícula é vista como uma esfera, assim a presença de agregados irá aumentar o tamanho das partículas. 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 nos resultados. A polidispersão é um parâmetro que também deve ser cuidadosamente avaliado, pois o cálculo da Polidispersão pode variar por causa de fatores como tamanho da partícula, índice de refração do solvente, ângulo de medição e a variância de distribuição. O índice de Polidispersão pode ser considerado “bom” (homogêneo) quando, em uma escala de 0-1, o índice achado for menor que 0,1. Por outro lado, Microscopia Eletrônica de Varredura pode ser utilizada para a determinação de tamanho, forma e outros aspectos gerais. Contudo, essas análises podem-se apresentar homogêneas ou heterogêneas, dependendo do preparo da amostra. Outra técnica como Microscopia de Força Atômica pode ser usada para analisar a superfície das nanopartículas.

Kumari et al⁶⁵. (2010) resumiram as principais características e principais polímeros usados na formulação de nanopartículas poliméricas para sistemas de liberação de medicamentos. Na revisão, foi mostrado que são quatro os principais polímeros usados para a síntese de

nanopartículas: poli-ácido lático (co- glicólico) PLGA, poli-ácido lático (PLA), Policaprolactona (PCL) e quitosana. Esses polímeros são usados para o encapsulamento de diferentes medicamentos com diferentes alvos e aplicações para malária, câncer, diabetes, etc. e também substâncias geradoras de oxigênio singlete. O fármaco pode-se associar à nanopartículas de duas formas: a primeira é a incorporação do fármaco dentro da nanopartícula, a segunda é pela adsorção do fármaco na superfície externa da nanopartícula. A principal diferença entre PLGA e PLA é o produto gerado quando eles são metabolizados. O PLA metaboliza-se em unidades de ácido lático, o qual serve como intermediário do metabolismo dos carboidratos; enquanto o PLGA metaboliza-se em unidades de ácido lático e ácido glicólico. Esses autores fazem referência aos principais métodos de síntese e encapsulamento de medicamentos em nanopartículas poliméricas, dentre eles os mais usados são: emulsificação-difusão, evaporação do solvente-emulsão, deposição interfacial e nanoprecipitação. O método de nanoprecipitação consiste em dissolver o polímero em acetona sobre agitação magnética, a fase aquosa é adicionada gota a gota na fase orgânica e o solvente é evaporado.

Nanoformulações de CUR

Mukerjee et al⁸⁴. (2009) sintetizaram CUR-NP utilizando PLGA como polímero por meio da técnica de evaporação do solvente sólido em óleo-água. Resumidamente, 30 mg de PLGA foram dissolvidos em clorofórmio, e a CUR livre foi adicionada à solução de PLGA/clorofórmio. Nesta emulsão primária foi adicionada uma solução de 2% de álcool poli vinílico (PVA) e etanol. A emulsão final foi centrifugada a 15000 xg durante 15 min. Desse procedimento obtiveram CUR-NP com tamanho médio de 45 nm determinado por dispersão dinâmica da luz, e uma elevada eficiência de encapsulamento foi determinada (90,88%). Esses autores observaram uma liberação bifásica, com uma liberação inicial brusca seguida de uma liberação mais lenta controlada por difusão. Enquanto que 13% da CUR tinha sido liberada após uma 1h, 65% de CUR foi liberado em 10 dias de análise. Essas CUR-NP foram utilizadas contra células de câncer de próstata in vitro, a viabilidade dessas células foi determinada por meio do ensaio colorimétrico MTT. As CUR-NP demonstraram maior eficácia na diminuição da viabilidade celular, uma vez que foram necessárias doses de 20-22,5 μ M enquanto que a CUR livre conseguiu diminuição da viabilidade com 32-34 μ M. Por conseguinte, esses autores concluíram que nanoesferas de PLGA são capazes de liberar CUR ao longo de um período

prolongado para atingir no alvo uma entrega sustentada de CUR, tornando-o um candidato potencial para a terapia do câncer.

Yallapu et al¹²⁹. (2010) sintetizaram CUR-NP pelo método de nanoprecipitação utilizando 90 mg de PLGA dissolvido em 10 mL de acetona. Nessa solução foi adicionada 10 mg de CUR dissolvida em 500 μ L de acetona, e agitou-se a solução durante 5 min. Nessa solução adicionou-se a fase aquosa composta por álcool poli-vinílico (PVA) de diferentes concentrações que variaram dentre 0,25-1% w/v e poli (L-lisina), ao longo de um período de 10 min numa placa de agitação magnética operada a 800 rpm. A suspensão foi deixada em agitação durante 24 horas para evaporação do solvente. As propriedades nanométricas da suspensão foram analisadas mediante método de dispersão de luz. Foi observado diminuição de tamanho com o aumento de concentração de PVA utilizado uma vez que obtiveram CUR-NP com tamanhos dentre 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%. Foi observado potencial zeta entre +0,06 e -0,06 para as seis formulações preparadas. A eficiência de encapsulamento observada por foi entre 49,56 e 89,53%. Utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram observadas nanopartículas de 45,18 nm e forma esférica. Esses autores observaram uma liberação entre 64,37 e 98,92% durante 25 dias, por meio da técnica de diálise. As formulações foram testadas contra células cancerosas, esses autores observaram que CUR-NP demonstrou maior capacidade de inibir a proliferação das células cancerosas comparadas com a CUR livre, uma vez que a CUR-NP demonstrou capacidade de inibição utilizando concentrações entre 13,9 e 9,1 μ M, comparada com valores superiores de 15,2 μ M da CUR livre.

Chen et al²⁰. (2010) sintetizaram nanofibras utilizando CUR e PLA utilizando o método de *electrospinning*. Para isso, 9% de PLA foi dissolvido em clorofórmio e acetona durante 5 horas e adicionada CUR em proporção de 1,3 e 5%. Essas soluções foram colocadas em seringas com capilaridade de 0,7 mm que foram levadas ao instrumento *electrospinning* de 16 kV a uma taxa de 0,5 mL/h, sendo depositadas em recipientes especiais. Desse procedimento, resultaram nanofibras com tamanho dentre 971 e 756 nm determinadas por microscopia eletrônica de varredura. Essas nanofibras de CUR e PLA demonstraram atividade anticoagulante, sugerindo-se uma possível aplicação contra doenças cardíacas.

Anitha et al³. (2011) prepararam CUR-NP utilizando solução de 1% de quitosana em ácido acético e 0,1% de sulfato de dextrana. Essas soluções foram misturadas em agitador durante 15

min, as NP foram separadas por meio de centrifugação a 20.000 rpm durante 20 min, as NP foram lavadas duas vezes com água destilada e resuspendidas em PBS. Solução de CUR em etanol foi adicionada sobre agitação à solução de quitosana com sulfato de dextrana. Esse procedimento resultou em formação de CUR-NP dentre 130 e 300 nm de tamanho determinado por método de dispersão de luz. As imagens de MEV mostraram CUR-NP esféricas com tamanho de 220 nm. O potencial zeta registrado para essa nanoformulação foi de -30 mV. Esses autores verificaram uma eficiência de retenção de 74%, a liberação *in vitro* foi feita pela técnica de dispersão direta com uma liberação de 70% após uma semana. Essas CUR-NP demonstraram toxicidade contra células cancerígenas, uma vez que a viabilidade celular observada variou entre 57,9% e 59,5% após 48h de contato de CUR-NP com essas células cancerígenas.

Basniwal et al¹⁰. (2011) empregaram 100 mg de CUR dissolvida em 20 mL de diclorometano. Essa solução foi então gotejada em uma proporção de 0,2 mL/min em 50 mL de água em ebulição sob condições de ultrassom com uma potência de 100 W e uma frequência de 30 kHz e mantida nessas condições durante 10 min. Desse procedimento resultaram CUR-NP com 30 nm de tamanho (determinadas por dispersão de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão). Essas CUR-NP foram comparadas com a CUR livre e utilizadas para determinar a CIM sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium notatum* e *Aspergillus niger*. Para isso foram preparadas suspensões dos micro-organismos incubadas com CUR-NP ou CUR livre em diferentes concentrações durante 24 a 37°C. A CIM de CUR-NP encontrada para *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, e *P. aeruginosa* foi de 100, 75, 250, e 200 µg/mL, respectivamente, comparada com 150, 100, 300, e 250 µg/mL para a CUR livre. Já para *A. niger* 350 µg/mL de CUR-NP e 400 µg/mL de CUR livre foram determinadas como CIM. Um achado importante dessa pesquisa foi que esses autores não observaram eficácia antibiótica contra *P. notatum* nem com CUR-NP nem CUR livre. Esses autores observaram por meio de microscopia eletrônica de transmissão como a CUR-NP é incorporada dentro de *S. aureus*: o processo inicia-se quando a CUR-NP ancora-se na parede celular do micro-organismo, seguida da ruptura da camada de peptidoglicano e penetração dentro da bactéria.

O método de emulsão-difusão-evaporação modificado foi utilizado por Ghosh et al⁴⁴. (2012) CUR em acetato de etila foi adicionada em solução de PLGA em acetato de etila, a fase aquosa contendo brometo de didodecil dimetilamônio foi então adicionada, e a emulsão resultante foi agitada a temperatura ambiente durante 3 horas antes da homogeneização a 15.000 rpm durante

5 min. Foram formadas CUR-NP de 15 nm determinado por microscopia de força atômica. Esses autores observaram produção significativa de espécies reativas de oxigênio singlete (responsáveis pelo estresse oxidativo das células) em mitocôndrias de fígado de rato, demonstrando a efeito antioxidante da CUR. As CUR-NP administradas por via oral resultaram na diminuição de células cancerígenas em câncer hepático induzido em ratos.

Hegge et al⁵². (2012) sintetizaram CUR com ciclodextrinas poliméricas supersaturadas utilizando polietileno-glicol e Cavasol® W7. A formulação em concentração de 10 μ M de CUR associada à luz a 29 J/cm² contra culturas livres de *Escherichia coli* a mesma concentração de PS associada a 4,8 J/cm² foi testada contra culturas plactônicas de *Enterococcus faecalis*, utilizando 30 e 10 min de pré-irradiação respectivamente. Após os tratamentos observaram 0,01% de sobrevivência de *E. coli*. Já culturas plactônicas de *E. faecalis* apresentaram redução significativa e até completa inativação quando as formulações foram combinadas à luz a 4,8 J/cm². O estudo deles demonstra que a supersaturação de PS pode ser um meio para aumentar o efeito fotodinâmico, sem usar intensificadores de permeação, solventes orgânicos não desejadas, ou a introdução de carga catiônica, são estratégias atualmente utilizados para aumentar o efeito fotodinâmico em relação a bactérias Gram negativas. O conceito de supersaturação deve ser considerado na formulação de PS altamente lipofílicos, tais como a curcumina, em combinação com outras estratégias para aumentar a especificidade do tratamento e efeito de aPDT.

Cherreddy et al²¹. (2013) sintetizaram CUR-NP usando PLGA como polímero. As NP foram preparadas pela técnica de emulsão e evaporação do solvente, e foi usado álcool polivinílico (PVA) como estabilizante. 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 libertação da CUR das NP foi feita por estudo de membrana de diálise, com 40,5 $\pm$ 4,5% da CUR libertada dentro das primeiras 24 h. O estudo de citotoxicidade das CUR-NP, CUR, PLGA e PLGA-NP em células de queratinócitos foi medido por ensaios de metabolismo celular e de *High-density Lipoprotein* (HDL), em concentrações de 30 a 100 μ g dessas formulações. Não houve diferença estatística citotóxica na atividade metabólica dos queratinócitos. O estudo de cicatrização de feridas em camundongos mostrou uma cura acelerada de feridas tratadas com CUR-NP-PLGA em comparação com os outros grupos

PLGA, CUR e NP de PLGA. Esses autores demonstraram que CUR-NP de PLGA foi capaz de controlar e manter a liberação de CUR e ácido láctico, diminuindo a resposta inflamatória, acelerando a re-epitelização e formação de tecido de granulação, além de acelerar significativamente a cicatrização da ferida quando aplicada topicamente.

Khalil et al⁵⁹. (2013) sintetizaram CUR-NP de PLGA com e sem PEG por meio da técnica de evaporação do solvente-emulsão. CUR e PLGA (5 e 50 mg, respectivamente) foram dissolvidos em uma mistura de acetato de etila (1,5mL) e cloreto de metila (0,5mL) com ou sem PEG (10 mg) a temperatura ambiente. Essa fase orgânica foi misturada em 10 mL da solução aquosa composta por PVA (0,5% w/v) e emulsionado por sonicação durante 5 min. Logo depois o solvente orgânico foi eliminado por evaporação sob vácuo. Deste processo resultaram CUR-NP com tamanho de 161,93 nm, polidispersão de 0,042 e 77,07% de eficiência de encapsulamento. As nanopartículas 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 feito 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 h e de apenas 37% em onze dias. As CUR-NP foram administradas por via oral em ratos e foi observado o aumento de biodisponibilidade em 15,6 e 55,4 vezes das CUR-NP de PLGA e PLGA-PEG, respectivamente, em relação à forma livre da CUR. Esses autores recomendaram a mistura desses dois compostos (PLGA e PEG) para formulação de CUR-NP para administração por via oral.

Arunraj et al⁵. (2014) verificaram que o encapsulamento de CUR não interferiu com as propriedades inatas da CUR. Foram sintetizadas nanoesferas de CUR utilizando o método de moagem úmida e evaporação do solvente. Para isso, foram dissolvidos 10 mg de CUR em 5 mL de etanol. 1mL dessa solução foi adicionada sobre gotejamento em 50 mL de água deionizada, sob agitação constante de 800 rpm. Essa solução foi levada a sonicator a uma potência 130 W e frequência de 20 KHz. Foram obtidas nanoesferas entre 50-80 nm e -31mV de potencial zeta. Esses autores demonstraram alta biocompatibilidade sanguínea e ausência de interferência dessas nanoesferas na coagulação. A avaliação das propriedades antimicrobianas dessas nanoesferas foi comparada com a CUR em DMSO. Por meio de contagem de colônias, estes autores demonstraram uma maior efetividade das nanosfereas de CUR em relação à CUR livre em concentração de 2 mg/mL, após uma incubação de 24 horas em soluções individuais

de *Escherichia coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Dentre esses três micro-organismos, esses autores observaram a erradicação do fungo em relação às placas não tratadas. Além disso essas nanoesferas de CUR evitaram a colonização de micro-organismos em modelo de pele de porco.

Ye et al¹³⁰. (2014) desenvolveram um tipo de nanopartículas de CUR modificadas com óxido de ítrio (Y_2O_3), óxido de itérbio (Yb_2O_3 , 99,99%), óxido de érbio (Er_2O_3 , 99,99%) e fluoreto de sódio (NaF, 98%) dissolvidas em ácido nítrico. O efeito antimicrobiano da CUR desenrola-se principalmente por efeito de fototoxicidade através da produção de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) após irradiação a <450 nm para inativar micro-organismos e tumores. Comprimentos de onda ≤ 450 nm tem penetração mais fraca do que a luz vermelha e infravermelha (NIR), que conduz a ação fraca em lesões profundas in vivo. Utilizando estas fluorescentes puderam modificar a absorbância da formulação, de espectro visível para o NIR (980 nm). Os resultados mostraram que o tamanho médio das nanopartículas foi 179,5 nm. O potencial zeta foi -33,7 mV. As imagens SEM das nanopartículas de conversão de CUR (UCNPs-CUR) exibiram uma forma oval. Presença de oxigênio foi detectada após 30 min de irradiação a 980 nm utilizando Nitrosodimetilalanilina (RNO) com imidazol como *scavenger*. UCNPs-CUR apresentou efeitos inibitórios sobre o crescimento de SARM na dependência da ativação das UCNPs-CUR de 30 minutos de irradiação a 980 nm. Vazamento citoplasmática de SARM foi medida pelo aumento na absorbância do sobrenadante bacteriano a 260 nm em comparação com controles não tratados. Estes autores sugeriram que as UCNPs-CUR sob irradiação destruíram a membrana celular de SARM. Eles testaram essas UCNPs-CUR em pneumonia causada por SARM em camundongos. Foi observado que a amoxicilina teve pouca melhoria na quantidade de bactérias e expressão de citocinas nos pulmões dos animais, sugerindo resistência aos antibióticos da bactéria. UCNPs-CUR com a irradiação com luz próxima a vermelho diminui de forma significativa a viabilidade do SARM nos pulmões dos camundongos tratados.

Hazzah et al⁵⁰. (2015) prepararam nanopartículas sólidas de lipídeo (NSL) contendo CUR pelo método de homogeneização quente utilizando Gelucire 50/13 e poloxamer 407 como agentes estabilizantes, e Gelucire 39/01 como o lipídeo de teste a uma concentração de 5%. Foram obtidas NSL com tamanho entre 184 e 950 nm e polidispersão de 0,441 e 1,00. As NSL apresentaram potencial zeta entre -17 e -15 mV. A eficiência de encapsulamento foi de 78 a 98%, determinada por centrifugação das amostras a uma velocidade de 22000 g, durante 1 hora

a 4°C. O estudo de liberação utilizando o método de diálise demonstrou uma liberação entre 41,5 e 53%. Esses autores verificaram a capacidade adesiva das NSL de CUR à mucosa oral de frango, facilitando assim a aplicabilidade clínica dessa nanoformulação. Além disso, nesse estudo foi verificada a CIM das NSL de CUR 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.

Ramalingam et al⁹⁸. (2015) sintetizaram nanofibras de CUR por *electrospun* utilizando poli(2-hidroxiethyl metacrilato) [p(HEMA)] como polímero. Foi utilizado um aparato de *electrospinnig* para diluição do polímero em etanol, na qual foi adicionada CUR. Foram obtidas nanofibras com diâmetro entre 20 e 110 nm. Mediante o uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV) esses autores evidenciaram uma adequada distribuição de CUR nas nanofibras. Foi verificada uma liberação de CUR de 72% após 240 horas. A análise de viabilidade celular em células de Chang do fígado expostas a essas nanofibras de CUR demonstrou viabilidade de 65 e 72 % em 120 e 72 horas, respectivamente. O efeito antimicrobiano desta formulação foi testada em micro-organismos resistentes a antibiótico como SARM, e não resistentes como *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia*. Foi observado um halo de inibição de 17 mm para SARM e *S. aureus* e de 18 mm para *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia*.

Udompornmongkol e Chiang¹²⁵ (2015) sintetizaram nanopartículas de CUR e goma arábica (GA) dissolvida em acetona, como fase orgânica, que foi misturada em quitosana (CS) (fase aquosa). Ambas fases foram emulsionadas em homogeneizador a 15.000 rpm durante 10 min. Foram obtidas nanopartículas de $136,3 \pm 3,9$ nm, com Índice de Polidispersão (PDI) $0,362 \pm 0,022$, o potencial zeta foi de +50 mV. A análise com microscopia eletrônica de transmissão mostrou CUR-NP esféricas, com partículas de dimensões 60-200 nm. A eficiência de encapsulamento foi de $95,02 \pm 0,03\%$. Nesse estudo, espectroscopia infravermelha foi feita para caracterizar formação de CUR-NP. O espectro de CUR apresentou uma banda de absorção a 1602 cm^{-1} . Os espectros de CUR-NP e NP de controle foram semelhantes. No entanto, picos em 1646 e 1542 cm^{-1} apresentaram valores ligeiramente mais baixos, típicos de CS e GA, respectivamente. Além disso, o pico a 1610 cm^{-1} de GA desapareceu. Para a liberação de CUR das NPs in vitro, foi feito uso de membrana de diálise, em que observou-se 76% de taxa de liberação após 8h. Essas CUR-NP foram testadas contra células de carcinoma colo-retal humano. Essas células cancerígenas foram expostas a CUR-NP, CUR em DMSO, ou NP. Depois de 24 horas as células expostas a NP apresentaram 80 % de viabilidade celular, no

entanto a viabilidade das células expostas a CUR-NP e CUR em DMSO reduziu significativamente. Absorção celular foi avaliada utilizando linhagens celulares HCT116 e HT29. Com base em microscopia de fluorescência, a CUR por ser auto-fluorescente emitiu uma fluorescência verde, enquanto que os controles CUR-negativos foram escuros (sem fluorescência aparente detectada). Houve uma fluorescência verde-clara em células tratadas com NP-CUR, uma fluorescência fraca foi detectada nas células tratadas com CUR em DMSO. Portanto, foi considerado que as células cancerígenas do cólon tiveram uma maior absorção de CUR das NP. Em conclusão desses autores, a CUR foi encapsulada em nanopartículas pelo método difusão de solvente-emulsão com boas propriedades físico-químicas e uma alta eficiência de encapsulamento. Segundo os autores, este foi o primeiro estudo, a conhecimento deles, a usar GA e CS como transportadores para encapsular CUR por meio de nanopartículas de liberação controlada. Além disso, CUR-NP apresentou melhores atividades anti-câncer colo-retal contra linhagens de células HCT116 e HT29, uma vez que as CUR-NP foram mais facilmente captadas e induziram mais rapidamente a apoptose celular, sugerindo que elas podem ser benéficas em terapia de câncer.

A pesar que a eficácia antimicrobiana da CUR associada a luz já foi verificada em estudos prévios o uso de solventes orgânicos para sua veiculação ainda representa um problema, por isso que diferentes pesquisas tentaram o encapsulamento da CUR em sistemas nanoestruturados, contudo a maioria dos trabalhos reportados avaliam a eficácia de essas formulações de CUR contra câncer, poucos são os trabalhos feitos para a inativação microbiana, além disso os efeitos da aPDT mediada por nanoformulações de CUR contra biofilmes mistos ainda são escassos.

3 PROPOSIÇÃO

Com base nessas informações, o objetivo geral deste estudo foi sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade fotodinâmica antimicrobiana da CUR encapsulada em nanopartículas poliméricas (CUR-NP). Em todos estudos, a avaliação da CUR-NP foi comparada à curcumina livre (CUR). Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1- Sintetizar e caracterizar CUR em nanopartículas poliméricas (CUR-NP) mediante o método de nanoprecipitação;
- 2- Avaliar o efeito da aPDT em culturas planctônicas de *C. albicans*, *S. mutans* e SARM
- 3- Avaliar in vitro o efeito da aPDT mediada pela CUR e CUR-NP em biofilme misto de *S. mutans*, SARM e *C. albicans*.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Materiais

Curcumina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA $\geq 65\%$ de pureza) C1386;

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

Água destilada;

Dextrana (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 00268;

Água mili-Q;

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

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

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

Cloreto de Sódio (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);

Cubeta de 4,5 mL (Cartel, SP, Brasil);

Mitis Salivaris Agar (Difco, Laboratories, Detroit, MI, USA);

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

Bacitracina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA);

Meio de cultura Mannitol Salt Agar (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);

Sabouraud Dextrose Agar com 5 mg/mL de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD, USA);

Meio de cultura Trytic Soy Broth (TSB - Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, USA);

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

Meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI, HiMedia Laboratories, Mumbai India) 1% de glicose;

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

American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) SARM (ATCC 33591);

American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) *S. mutans* (UA159 ATCC 700610);

American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) *C. albicans* (ATCC 90028);

Microtubos tipo Eppendorfs Graduado (Axygen, Curitiba, PR, Brasil); 83

Placas de 24 poços de fundo plano e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);

Placas de 96 poços de fundo plano e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);

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);

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

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

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

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

Agitador de tubos Modelo: AP 56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);

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

Câmara de fluxo laminar vertical, Modelo: PA 115. No. 12898 (Pachane Ind. e Com. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);

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

Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: 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 – MA 0324 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);

Estufa de CO₂ 5% Modelo: L212 (Laboven, Qingdao, China);

Freezer -80°C (Thermo Scientific, USA);

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

Microscópio de fluorescência Modelo: BX51 (Olympus, Tóquio, Japão);

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

Aparelho Sputter Coater (SCD 050 BAL-TEC);
 CTAB (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)H9151;
 Zetasier Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK);
 DFBB (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 105481;
 TWEEN 20 (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
 Lâmina (Precision Glass Line);
 Lamínula Lâmina (Precision Glass Line);
 DMSO (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).

4.2 Métodos

Fotossensibilizador e Fonte de Luz

Curcumina (CUR) (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxi-fenil) -1,6-heptadieno-3, 5-diona) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e água destilada estéril na concentração de 1200 µM. A concentração de DMSO a 10% foi selecionada com base em estudos prévios que demonstraram ausência de toxicidade contra *Candida albicans*³⁸.

Um aparelho LED, composto de oito LEDs (LXHL-PR09, Luxeon1 III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA) de aproximadamente 455 nm (azul) e com intensidade de iluminação média de 36 mW/cm², desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos - USP, foi utilizado para ativação do FS. Para o cálculo da dose de luz (fluência), foi utilizada a fórmula:

Dose de luz (J/cm²) = Intensidade de luz (W/cm²) x tempo de iluminação (segundos).

Síntese e caracterização da CUR em nanopartícula polimérica

Fotossensibilizador e Encapsulamento em Nanopartículas

A síntese de CUR em nanopartículas poliméricas foi feita pelo método de nanoprecipitação, para isso, uma solução estoque de CUR em concentração de 0,4% foi preparada em acetona. Para o encapsulamento da CUR em nanopartículas (NP), uma fase aquosa contendo sulfato de dextrana 1% (DEX) foi adicionada sobre gotejamento a uma fase orgânica contendo o polímero poli-ácido láctico (PLA) (0,5%) em acetona e o FS, dito procedimento foi realizado em temperatura ambiente (22-25°C) e rotação magnética lenta (90-100 rpm), após esse procedimento a solução foi deixada sobre agitação magnética na mesma velocidade mencionada antes (90- 100 rpm) durante 10 minutos. Nanopartículas sem CUR foram sintetizadas pelo mesmo método como controle. A solução de nanopartículas (CUR-NP)

foi deixada por 24 horas em temperatura ambiente para evaporação do solvente e estabilização do sistema. Esse procedimento resultou em NP aniônicas.

Para a síntese de CUR-NP e NP catiônicas o mesmo procedimento foi realizado, com a diferença que depois da evaporação do solvente foi adicionada uma solução de CTAB a 2% com NaCl 1,76% preparado em água ultra-pura estéril. A solução final de NP catiônicas resultou numa proporção final de CTAB de 0,1¹²⁴ a 0,2% e NaCl de 0,08 a 0,09%.

Caracterização das NP-CUR e NP

Após o encapsulamento das CUR em NP, as amostras foram caracterizadaa pelas suas propriedades nanométricas, como tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (PI, que avalia a homogeneidade da formulação) e potencial zeta (para determinação da carga de superfície). Para isso foi utilizado o aparelho Zetasizer Nano ZS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sob responsabilidade do Prof. Marlus Chorilli. As leituras foram realizadas a 25°C. *Dynamic light scattering* (DLS) é um método rápido para a determinação do tamanho médio, e o PI de uma amostra. Este método está baseado a partir da interação da luz, com as partículas geralmente a uma observação ângulo de 90°. O modelo de cálculo baseia-se no princípio de esfera equivalente, em que cada partícula é visto como uma esfera⁴⁷ DLS analisa a distribuição de velocidades de movimento das partículas através da medição dinâmicos flutuações de intensidade de espalhamento de luz causado pelo movimento Browniano das partículas.⁴⁶ As leituras foram feitas nos dias 0; 7; 15; 35 e 40 após a síntese das CUR-NP e NP.

Análise da morfologia das nanopartículas

Soluções de NP-CUR e NP aniônicas e catiônicas forma preparadas em água ultra- pura estéril (1:50) as mesmas que foram gotejadas sobre *stub* condutores e secadas no aparelho Sputter Coater. A morfologia das partículas foi analisada em microscopia eletrônica de varredura com emissão de Campo (MEV-FEG) do Instituto de Química UNESP- Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.

Eficiência de Encapsulamento (EE)

Para a eficiência de encapsulamento (EE) 5mL as amostras de CUR-NP aniônica e catiônica a 52 µM foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, e a porção sedimentada (nanopartículas) foi resuspendida em água ultra-pura (5mL), cuja absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-visível. A eficiência de encapsulamento foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$FS_{\text{livre}} = (FS_{\text{total}} - FS_{\text{resuspendido}}) / FS_{\text{total}} \times 100.$$

$$\% = FS_{\text{total}} - FS_{\text{livre}}$$

Espectro de Absorção e Estudo da Fotoestabilidade dos FSs

A absorbância de amostras de CUR e CUR-NP em concentração de 130 μM foi determinada em espectrofotômetro UV/VIS entre 200-1100 nm. Essa concentração foi determinada após uma leitura inicial da formulação em concentração de 260 μM , foi verificado que naquela concentração inicial não era detectada um sinal máximo de absorbância, motivo pelo que foi feita a diluição na metade da concentração. A fotoestabilidade da CUR-NP foi comparada com a da CUR em DMSO (10%) e água destilada estéril. A fotodegradação foi monitorada pelo registro do espectro de absorção entre os comprimentos de onda de 200 a 700 nm das amostras após iluminação. CUR e CUR-NP, num volume de 10 mL cada, foram expostas à diferentes intervalos de iluminação ($\cong 455$ nm) de um dispositivo de diodos emissores de luz (LED) de 36 mW/cm^2 . A absorção das amostras é determinada antes (0 min) e após cada período de irradiação (5, 10, 15, e 20 minutos, 10,8; 21,6; 32,4 e 43,2 J/cm^2 respectivamente). Amostras "branco" ("blank") corresponderam às soluções de NP para se anular a hipótese de absorção da solução de excipientes (PLA e DEX).

Liberção de CUR das NP

O teste de liberação foi realizado seguindo a metodologia de Krausz et al¹³² com algumas modificações. Amostras de NP de CUR aniônica e catiônica foram diluídas em PBS numa concentração de 2 mg/mL e incubadas a 37°C numa velocidade de 100 rpm. Em intervalos de 2 horas, amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min para separar as nanopartículas da solução, e então as NP foram diluídas em acetona para solubilizar a CUR não liberada, cuja absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-visível. O total de CUR liberada foi calculada dividindo-se a absorbância lida em cada intervalo de tempo pela absorbância da CUR encapsulada estimada como máxima determinadas no estudo de Eficiência de Encapsulamento.

Atividade Fotodinâmica

A atividade fotodinâmica da CUR e CUR-NP foi avaliada pela taxa constante de fotodegradação de 1,3-difenilisobenzofurano (DFBF). DFBF reage irreversivelmente com $^1\text{O}_2$, sofrendo fotodegradação caracterizada por 1,4-cicloadição que foi detectada como diminuição na intensidade das bandas de absorção de DFBF. Em um volume de 10 mL de PBS pH 7,2 contendo 0,001% de TWEEN 20, foram adicionados 5 μM CUR ou CUR-NP e 185 μM de DFBF numa cubeta selada e irradiada pelo LED por diferentes períodos de tempo, como

descrito acima. A absorção da solução foi mensurada em espectrofotômetro antes e após a irradiação para se determinar a constante de decomposição de DFBB. Amostras "branco" ("blank") corresponderam à solução de NP diluída em PBS⁷⁰.

Avaliação in vitro dos efeitos da aPDT em culturas planctônicas de *C. albicans*, SARM e *S. mutans*

Micro-organismos, Condições de Cultivo e Desenvolvimento de Culturas Planctônicas

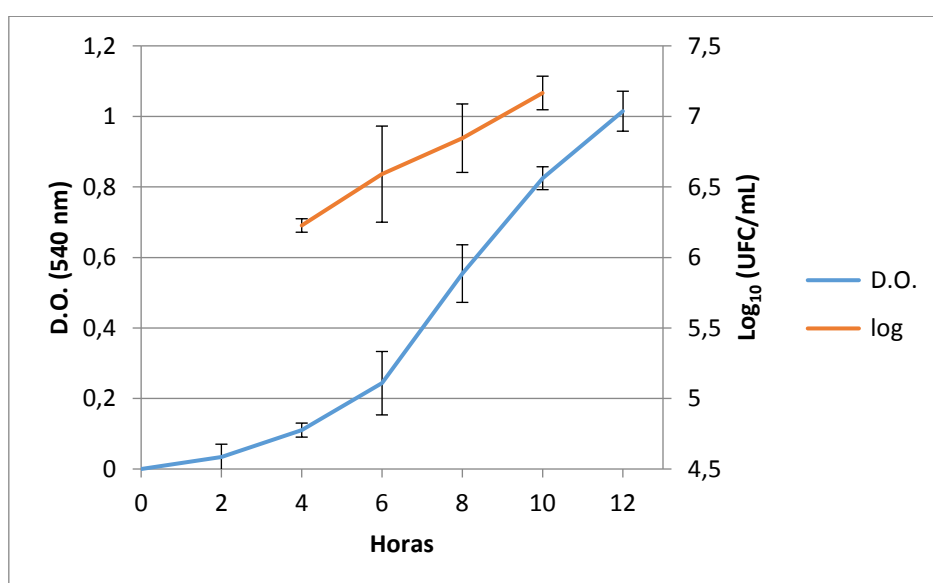
Cepas padrão de SARM (ATCC 33591), *S. mutans* (UA159 ATCC 700610) e *C. albicans* (ATCC 90028) foram utilizadas para avaliação antimicrobiana. Previamente aos experimentos, as cepas foram descongeladas e semeadas individualmente por meio da técnica de esgotamento em quadrante em um dos seguintes meios de cultura sólidos: Mannitol Salt Agar (MSA, Difco, Detroit, Michigan, USA) para SARM, Sabouraud Dextrose Agar com 5 mg/mL de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD, USA) para *C. albicans*, os quais foram incubados a 37°C em estufa aeróbia por 48 horas, e Mitis Salivaris Agar (Difco, Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com 15% de sacarose e 0,2 UI/mL de bacitracina (MSB) para *S. mutans*, incubado em estufa de CO₂ 5 % a 37°C durante o mesmo período de tempo.

Em seguida, com uma alça descartável estéril, 07 colônias de SARM da placa de MSA foram inoculadas em um tubo com 10 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB). Em outro tubo com 10 mL de Yeast Nitrogen Base (YNB) foram inoculadas 05 colônias de *C. albicans*, e num terceiro tubo contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com 1% de glicose foram inoculadas 10 colônias de *S. mutans*. Os tubos foram incubados *overnight* (16-18 horas) em estufa aeróbia (*C. albicans* e SARM) ou de CO₂ 5% (*S. mutans*) a 37°C, e assim foi formado o pré-inóculo.

Após esse período, uma alíquota de 10 µL de cada suspensão foi pipetada sobre uma lâmina que foi recoberta por uma lamínula para observação em microscópio para avaliar a pureza da cultura e possibilidade de contaminação (variações morfológicas nas culturas). Na ausência de contaminação, os pré-inóculos foram diluídos em duas razões (1:10 e 1:20) para realização do inóculo. Sendo assim, para diluir na razão de 1:20, 500 µL do pré-inóculo foram pipetados em um tubo com 9,5 mL de meio líquido para cada micro-organismo (os mesmos utilizados para formação do pré-inóculo). Na diluição na razão de 1:10, 1000 µL do pré-inóculo foram pipetados em um tubo de 9,0 mL dos mesmos meios líquidos. Alíquotas de 2 mL das diluições foram transferidas para cubetas, que foram levadas ao espectrofotômetro, onde foi lida

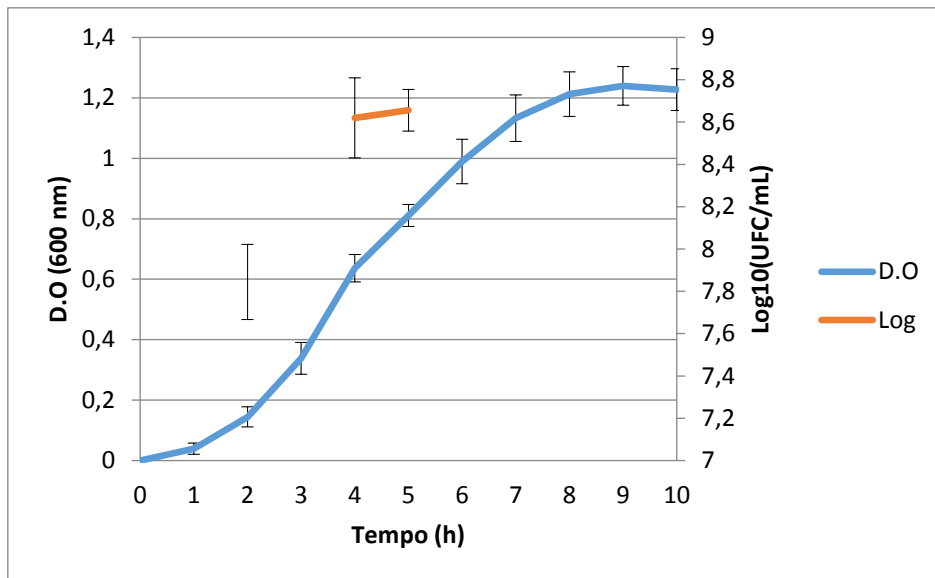
a densidade óptica (DO) das diluições (a primeira leitura é denominada de DO_0 , e os comprimentos de onda utilizados foram de 540 nm para o fungo e 600 nm para as bactérias). Os tubos foram então incubados em estufa aeróbia a 37°C (SARM e *C. albicans*) e em estufa de CO₂ 5% a 37°C (*S. mutans*) para o crescimento dos micro-organismos até a fase *mid-log* das curvas de crescimento (metade da fase logarítma), previamente estabelecidas, conforme ilustrado nas Figuras 1, 2, 3, respectivamente para *C. albicans* e SARM e *S. mutans*. Passadas 4 horas de incubação, a DO de SARM e *S. mutans* foram novamente lidas (600 nm, DO_1) e o valor obtido foi subtraído da DO_0 ($\Delta DO = DO_1 - DO_0$). O mesmo foi feito para o fungo, porém a DO_1 é lida (540 nm) após 8 horas de incubação (fase *mid-log*). À partir das ΔDO , foi escolhida uma das diluições, tanto de SARM, quanto de *S. mutans* e *C. albicans*, para ser utilizada nas culturas planctônicas. Nesse ponto de crescimento, o valor médio de ΔDO do SARM foi 0,636 que correspondeu a um valor médio de $4,47 \times 10^8$ UFC/mL, conforme previamente estabelecido. Já para *C. albicans*, o valor médio de ΔDO foi 0,550, o que correspondente a um valor médio de $7,94 \times 10^6$ UFC/mL. Para *S. mutans*, o valor médio de ΔDO foi 0,684, correspondente a $2,94 \times 10^8$ UFC/mL. Essas suspensões foram padronizadas para serem utilizadas nos testes planctônicos e para formação de biofilme, de forma que para *C. albicans* a concentração da suspensão foi padronizada entre 1×10^6 e 1×10^7 UFC/mL, e para SARM e *S. mutans* a concentração foi padronizada entre 1×10^7 e 1×10^8 UFC/mL.

Figura 1- Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC 90028.



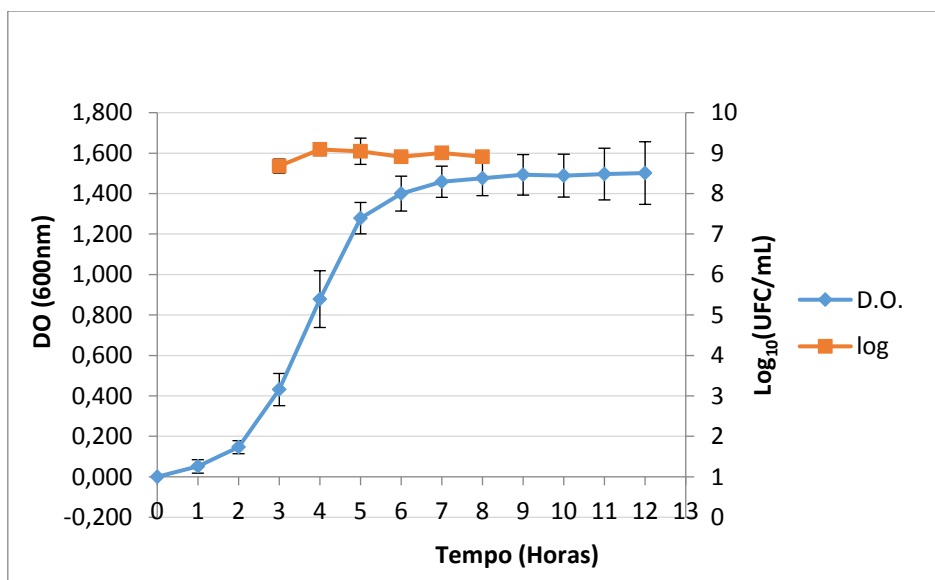
Fonte: Laboratório de microbiologia aplicada 4º andar. Faculdade de Odontologia de Araraquara

Figura 2- Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (ATCC 33591).



Fonte: Laboratório de microbiologia aplicada 4º andar. Faculdade de Odontologia de Araraquara

Figura 3- Curva de crescimento de *Streptococcus mutans* (UA 159 ATCC 700610).



Fonte: Laboratório de microbiologia aplicada 4º andar. Faculdade de Odontologia de Araraquara

Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em culturas planctônicas

Alíquotas 100 µL de cada suspensão padronizada foram transferidas para orifícios de placas de cultura de 96 poços de fundo plano, nos quais foram adicionados 100 µL de FS (CUR livre em DMSO ou NP-CUR aniônica ou catiônica) em concentração de 260 µM, resultando em uma concentração final de 130 µM. As placas foram mantidas no escuro durante 40 min (tempo de pré-irradiação), tempo que foi determinado em estudos piloto (dados não apresentados). Depois desse tempo as placas foram iluminadas com luz LED durante 20 min correspondentes a uma dose de luz de 43,2 J/cm² (grupos C+L+). Com o intuito de avaliar efeito tóxico do FS, amostras de culturas microbianas foram incubadas com cada FS (CUR livre em DMSO ou CUR-NP aniônica ou catiônica) e mantidas no escuro durante 60 minutos, correspondentes ao tempo de pré-irradiação e iluminação (grupos C+L-). A toxicidade das NP sem CUR aniônica ou catiônica foi avaliada mediante a incubação das suspensões microbianas com as NP e mantidas no escuro durante 60 min (grupos N). Também foi avaliado o efeito da luz sobre as culturas microbianas, para isso 100 µL de PBS foi agregado a cada suspensão e incubada durante 40 min e depois iluminadas durante 20 min (43,2 J/cm²) (Grupo C-L+). Já o grupo controle não recebeu nem FS nem luz (C-L-).

Desenvolvimento de biofilme misto de três espécies.

Previamente à formação dos biofilmes, os inóculos de SARM e *S. mutans*, que atingem valores médios por volta de 10⁸ UFC/mL, foram diluídos 10 vezes para serem utilizados para formação do biofilme. Alíquotas de 50 µL das suspensões na fase *mid-log* de cada micro-organismo nas concentrações mencionadas previamente foram transferidas para orifícios de placas de cultura de 96 poços de fundo plano, que foram incubadas em estufa de crescimento de 5% de CO₂ a 37°C durante 90 minutos, que correspondem à fase de adesão do biofilme. Após esse tempo, os poços das placas foram lavados duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS, água destilada 100 mL, 0,4% de NaCL, 0,012% de KH₂PO₄, 0,010% de KCl, 0,072% de Na₂HPO₄) estéril. Em seguida, BHI caldo suplementado 1% de glicose foi adicionado como meio de cultura, então a placa foi levada a estufa de crescimento de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, um volume de 75 µL do meio foi retirado dos orifícios das placas e o mesmo volume de meio de cultura novo foi adicionado, e as placas foram levadas à estufa de crescimento de 5% de CO₂ a 37°C durante 24h a mais, totalizando um tempo de formação do biofilme de 48h.

Terapia Fotodinâmica (aPDT) em biofilme misto de três espécies

Após o desenvolvimento do biofilme, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado de cada orifício utilizando-se uma micropipeta e as amostras foram lavadas duas vezes com PBS estéril. Aliquotas de 150 μL de CUR livre na concentração de 1200 μM concentração determinada em estudos piloto como efetiva para a fotoinativação deste biofilme misto(dados não mostrados) ou 150 μL na concentração de 260 μM de CUR-NP aniônica ou catiônica (concentração máxima encapsulada) foram adicionadas em cada orifício sobre os biofilmes, que foram então incubados por 40 minutos (tempo de pré-irradiação). Em seguida, o biofilme foi iluminado em dose de 43,2 J/cm^2 , correspondente a 20 minutos (Grupo C+L+). Para se verificar um possível efeito tóxico do FS, amostras adicionais de biofilmes foram expostas somente ao FS (CUR ou CUR-NP aniônica ou catiônica) como descrito acima, porém na ausência de luz (grupos C+L-) durante 60 minutos, referentes aos tempos de pré-irradiação e iluminação, no escuro. As NP sem CUR foram incubadas com os biofilmes para se avaliar um possível efeito tóxico das NP (grupo N). Um outro grupo, biofilmes foram incubados com PBS pelo mesmo tempo de incubação expostos somente à irradiação do LED como descrito acima porém na ausência do FS (grupo C-L+). Já o grupo controle consistiu de biofilmes não expostos nem ao FS nem à luz (C-L-, biofilmes mantidos com PBS pelos mesmos tempos de incubação de 40 minutos e de irradiação de 20 minutos).

Após os tratamentos, as culturas planctônicas e os biofilmes foram analisados pelo seguinte método:

Contagem do número de colônias viáveis: Após o tratamento de cada um dos grupos, no caso das culturas planctônicas, alíquotas de 100 μL de cada suspensão foram transferidas para um tubo com 900 μL de PBS, os quais foram agitados por 1 minuto. No caso dos biofilmes, as amostras de cada biofilme foram individualmente desprendidas do fundo placa por meio de raspagem com ponteira estéril de pipeta durante 1 minuto. Em seguida essa suspensão do biofilme foi transferida para tubo com 900 μL com PBS. Posteriormente, o tubo foi agitado em agitador de bancada e 100 μL dessa solução foi transferida a um outro tubo contendo 900 μL de PBS realizando-se assim diluições seriadas decimas foram feitas quatro diluições (1×10^4) para fungo e seis diluições (1×10^6) para bactérias, e alíquotas de 25 μL de cada uma dessas diluições foram semeadas em duplicata em placas de SDA, MSA e MNA para *C. albicans*, *S. mutans* e SARM, respectivamente, que foram incubadas a 37°C por 48h (para *S. mutans* a incubação foi feita em estufa de CO₂ 5%). Após esse período, as colônias foram contadas e os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foram calculados utilizando a fórmula:

UFC/mL= média de N° de colônias em duplicata x D/ 0,025 mL

D= Diluição em que as colônias foram contadas

Microscopia de Fluorescência

Alíquotas de 500 µL de cada solução planctônica foram transferidas a uma placa de cultura de 24 poços de fundo plano, e alíquotas de 500 µL de FS (CUR livre ou NP-CUR aniônica ou catiônica) foram adicionados a cada poço resultando numa concentração de 130 µM e mantidas no escuro durante 40 min. Depois desse tempo, um volume de 500 µL da suspensão foi substituída por 500 µL de PBS. As placas foram observadas em microscópio de fluorescência utilizando a faixa de 400- 550 nm.

Análise estatística.

Os experimentos foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes. Os dados das propriedades nanométricas das formulações foram não normais e heteroscedásticos por isso foram analisados pelo teste Friedman. Os dados de UFC/mL foram convertidos a logaritmo e submetidos a testes de normalidade e homogeneidade de variâncias. Dados das culturas planctônicas determinandos como normais e homocedásticos foram analisados por ANOVA e post-hoc de Tukey. Dados normais e heterocedásticos foram analisados por ANOVA com correção de Welch e post-hoc de Games-Howell. Os dados de biofilmes foram analisados mediante MANOVA. Em todos os casos o nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

Síntese e caracterização das nanopartículas

A síntese das CUR-NP foi feito pelo método de nanoprecipitação. As NP obtidas apresentaram concentração final foi de 260 μ M, porque concentrações maiores de CUR resultaram em agregação da CUR. As propriedades nanométricas dessas formulações (tamanho, polidispersão e potencial zeta) avaliadas por dispersão de luz DLS estão apresentadas na Tabela 1. Essas propriedades das CUR-NP aniônicas e catiônicas e das NP aniônicas e catiônicas foram avaliadas até 40 dias. A formulações demonstraram estabilidade do ponto de vista farmacotécnico, uma vez que essas propriedades das formulações foram mantidas até 35 dias após sua síntese.

Tabela 1- Valores médios de tamanho, polidispersão e potencial zeta ($\pm$ desvio padrão) das formulações de CUR-NP, NP aniônica, CUR-NP e NP catiônica (n=9 cada). Dados analisados mediante o teste de Friedman (continua).

Letras iguais demostram que não houve diferença estatística significativa. ($p > 0,05$)

Letras diferentes demostram que houve diferença estatística significativa. ($p < 0,027$)

Formulação	Dias	Tamanho médio (nm)	PI (média)	Potencial Zeta (mV) (média)
NP Aniônica	0	203,6 ($\pm$ 19,1)a	0,10 ($\pm$ 0,01)a	-32.7 ($\pm$ 0,96)a
	7	266,9 ($\pm$ 23,7)b	0,21 ($\pm$ 0,09)ab	-25.8 ($\pm$ 1,76)b
	15	284,3 ($\pm$ 8,2)b	0,25 ($\pm$ 0,02)b	-17.8 ($\pm$ 2,24)c
	35	289,4 ($\pm$ 43,9)b	0,29 ($\pm$ 0,04)bc	-12.8 ($\pm$ 5,44)cd
	40	399,5 ($\pm$ 17,7)c	0,31 ($\pm$ 0,02)bc	-4.9 ($\pm$ 0,96)e
CUR-NP Aniônica	0	237,9 ($\pm$ 34,2)a	0,08 ($\pm$ 0,08)a	-35.2 ($\pm$ 6,52)a
	7	259,1 ($\pm$ 27,9)ab	0,22 ($\pm$ 0,02)b	-25.4 ($\pm$ 2,95)b
	15	270,2 ($\pm$ 64,2)ab	0,16 ($\pm$ 0,1)ab	-16.3 ($\pm$ 2,64)c
	35	273,3 ($\pm$ 48,7)ab	0,27 ($\pm$ 0,04)b	-13.9 ($\pm$ 5,17)cd
	40	326,1 ($\pm$ 61,4)b	0,28 ($\pm$ 0,07)b	-4.29 ($\pm$ 3,32)e

Tabela 1- Valores médios de tamanho, polidispersão e potencial zeta ($\pm$ desvio padrão) das formulações de CUR-NP, NP aniônica, CUR-NP e NP catiônica (n=9 cada). Dados analisados mediante o teste de Friedman (conclusão).

Letras iguais demostram que não houve diferença estatística significativa. ($p > 0,05$)

Letras diferentes demostram que houve diferença estatística significativa. ($p < 0,05$)

NP Catiônica	0	205,3 ($\pm$ 27,1)a	0,20 ($\pm$ 0,03)a	+30 ($\pm$ 1,36)a
	7	248,8 ($\pm$ 27,8)b	0,24 ($\pm$ 0,03)a	+29.3 ($\pm$ 251)a
	15	297,6 ($\pm$ 9,2)ce	0,32 ($\pm$ 0,01)b	+23.3 ($\pm$ 3,9)b
	35	263,3 ($\pm$ 13,3)bd	0,25 ($\pm$ 0,04)a	+14.3 ($\pm$ 1,48)c
	40	290,3 ($\pm$ 25,9)e	0,30 ($\pm$ 0,08)d	+5.5 ($\pm$ 1,62)d
CUR-NP Catiônica	0	239 ($\pm$ 47,6)a	0,20 ($\pm$ 0,07)a	+32 ($\pm$ 1,45)a
	7	305,6 ($\pm$ 22,8)b	0,27 ($\pm$ 0,04)a	+28.8 ($\pm$ 5,75)b
	15	256,6 ($\pm$ 34,1)a	0,29 ($\pm$ 0,08)a	+24.7 ($\pm$ 1,89)bc
	35	266,9 ($\pm$ 13,5)a	0,25 ($\pm$ 0,04)a	+13.8 ($\pm$ 0,53)d
	40	279,9 ($\pm$ 42,7)ab	0,25 ($\pm$ 0,08)a	+6.9 ($\pm$ 3,23)e

Fonte: Elaboração do Autor

Na análise estatística das NP aniônicas foi verificada diferença significativa de tamanho ($p < 0,001$) das NP no dia 0 em relação às outras leituras 7,15,35 e 40 dias, diferença que também foi observada nas comparações do dia 40 em relação aos demais dias (0,7,15 e 35) ($p < 0,001$). Não foi verificada diferença estatística de tamanho entre a leitura do dia 7 com relação aos dias 15 e 35 ($p \geq 0,297$). Também não foi observada diferença estatística de tamanho entre as leituras do dia 15 em relação aos dias 7 e 35 ($p \geq 0,297$).

Na análise do PI das NP aniônicas foi verificada diferença estatística da leitura do dia 0 em relação às leituras dos dias 15,35 e 40 ($p < 0,001$), enquanto não houve diferença significativa

do dia 0 com o dia 7 ($p=0,062$). As comparações múltiplas do dia 7 em relação aos outros dias (0,15, 35 e 40) não demonstraram diferença significativa ($p \geq 0,062$). A leitura do dia 15 demonstrou diferença significativa quando comparada com os dias 35 e 40 ($p<0,001$). Na leitura do dia 35 não foi verificada diferença com as leituras dos dias 7 e 40 ($p \geq 0,188$).

As comparações múltiplas de potencial zeta para as NP aniônicas não foi verificada diferença significativa entre as leituras dos dias 15 e 35 ($p \geq 0,074$), ao passo que as leituras do dia 0 foi diferente às leituras dos dias 7,15,35 e 40 ($p<0,001$), similar valor de p foi observado nas comparações da leitura do dia 7 em relação aos dias 15,35 e 40 ($p<0,001$) e do dia 15 com o dia 40 ($p<0,001$), a comparação entre o dia 35 e 40 apresentou diferença estatística de ($p=0,027$).

No tamanho das CUR-NP aniônicas foi verificado diferença significativa do dia 0 em relação com o dia 40 ($p=0,018$), enquanto não foi observada diferença estatística na leitura do dia 0 em relação às leituras dos dias 7, 15 e 35 ($p \geq 0,216$). A leitura do dia 7 não apresentou diferença significativa em relação às outras leituras (0,15,35 e 40 dias) ($p \geq 0,075$) fato que também foi verificado nas leituras do dia 15 e 35 quando comparadas com os outros dias ($p \geq 0,363$) e ($p \geq 0,216$) respectivamente.

O PI das CUR-NP apresentou diferença significativa entre a leitura do dia 0 em relação aos dias 7,35 e 40 ($p<0,001$), enquanto não foi verificada diferença estatística do dia 0 respeito da leitura do dia 15 ($p=0,463$). Também não foi verificada diferença entre a leitura do dia 7 em relação às leituras dos dias 15, 35 e 40 ($p \geq 0,069$). A leitura do dia 15 foi estatisticamente diferente às demais leituras ($p \geq 0,052$), além disso não foi verificada diferença estatística na leitura do dia 35 em relação com os dias 7, 15 e 40 ($p \geq 0,052$).

Na análise estatística do potencial zeta das CUR-NP não foi verificada diferença significativa entre as leituras do dia 15 em relação com o dia 35 ($p=0,349$). Os demais valores das leituras foram diferentes entre si ($p<0,001$).

No tamanho das NP catiônicas foi verificada diferença significativa do dia 0 com os dias 7,15,35 e 40 ($p<0,001$), também foi verificada diferença do dia 7 em relação aos dias 15 e 40 ($p \leq 0,004$) enquanto não foi verificada diferença do dia 7 com o dia 35 ($p=0,730$). A leitura do dia 15 foi diferente estatisticamente às leituras dos dias 7 e 35 ($p<0,001$), ao passo que a leitura do dia 15 não apresentou diferença significativa com o dia 40 ($p=0,927$). A leitura do tamanho do dia 35 não apresentou diferença estatística com os dias 7 e 40 ($p \geq 0,073$).

A análise estatística de PI das NP catiônicas demonstrou que houve diferença significativa do dia 0 com os dias 15 e 40 ($p < 0,001$) e não foi verificada diferença entre as leituras do dia 0 com as leituras dos dias 7 e 35 ($p \geq 0,064$). A leitura do dia 7 foi diferente estatisticamente com as leituras dos dias 15 e 40 ($p \leq 0,003$) enquanto não foi observada diferença da leitura do dia 7 com as leituras dos dias 0 e 35 ($p \geq 0,075$). A leitura do dia 15 apresentou diferença significativa com as leituras dos dias 0,7,35 e 40 ($p \leq 0,005$). O valor de PI do dia 35 apresentou diferença significativa em relação aos dias 15 e 40 ($p \leq 0,023$).

Os valores de potencial zeta das NP catiônicas demonstraram que houve diferença significativa do dia 0 comparado com os dias 15,35 e 40 ($p \leq 0,005$) porém não houve diferença estatística do dia 0 com o dia 7 ($p = 0,931$). A leitura do dia 7 apresentou diferença significativa com os dias 15,35 e 40 ($p \leq 0,013$) ao passo que o valor de potencial zeta do dia 15 foi diferente aos outros valores (0,7,35 e 40 dias) ($p \leq 0,013$) fato que também foi observado nas leituras dos dias 35 e 40 que apresentaram diferença significativa com os outros dias ($p < 0,001$).

O tamanho das CUR-NP catiônicas foi diferente no dia 0 comparado com o dia 7 ($p = 0,019$), e não apresentou diferença significativa com os dias 15,35 e 40 ($p \geq 0,345$). A leitura do dia 7 foi estatisticamente diferente às leituras dos dias 0,15 e 35 ($p \leq 0,021$) e não apresentou diferença com a leitura do dia 40 ($p = 0,528$). O tamanho das CUR-NP do dia 15 não apresentou diferença significativa com os dias 0,35 e 40 ($p \geq 0,705$) similar à leitura do dia 35 a que não apresentou diferença estatística com os dias 0,15 e 40 ($p \geq 0,554$).

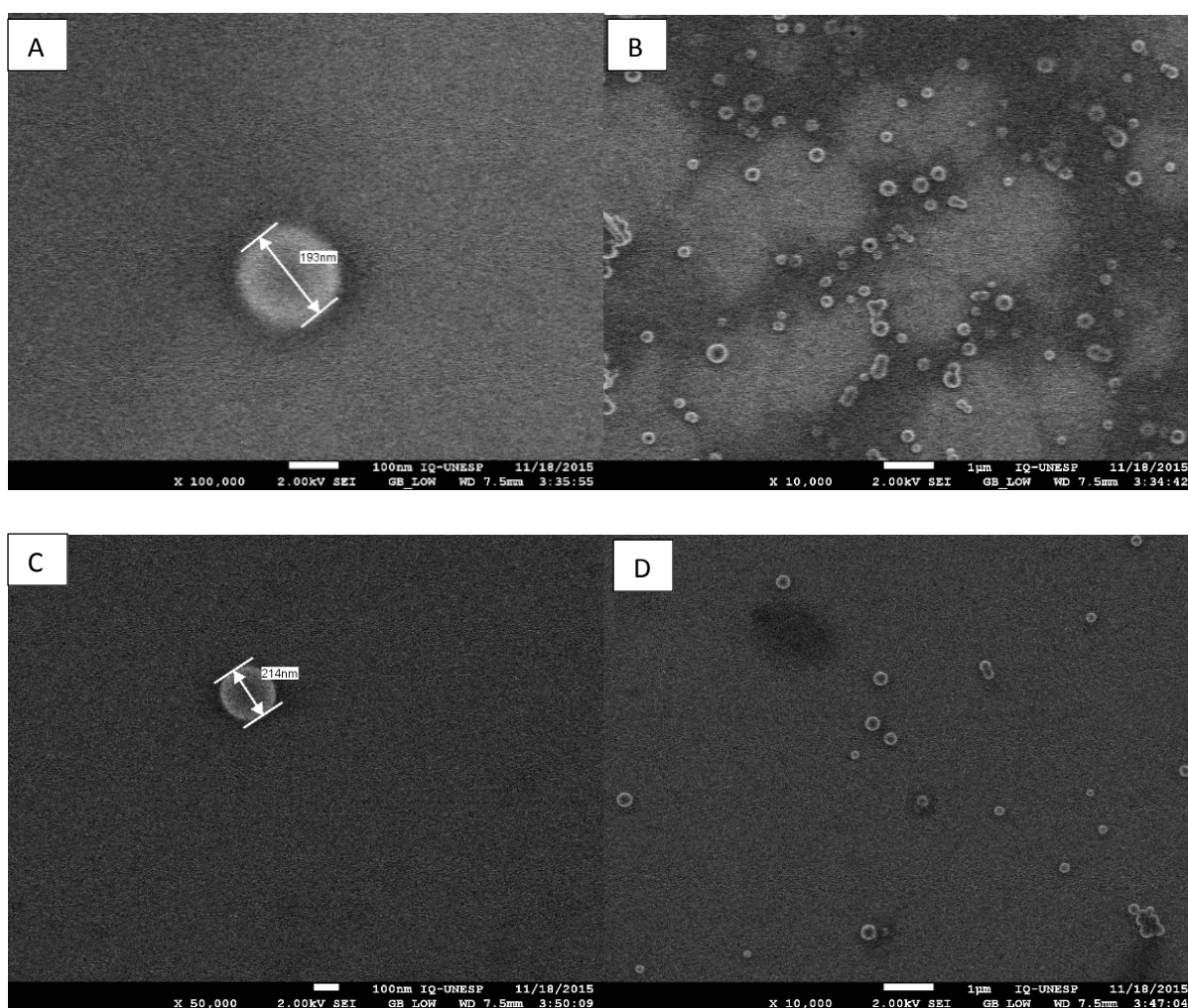
Os valores de PI das CUR-NP catiônicas não apresentaram diferença estatística entre si para todos os dias de leituras.

Na análise estatística de potencial zeta das CUR-NP catiônicas foi verificada diferença significativa do dia 0 com os dias 15,35 e 40 ($p < 0,001$) enquanto não foi observada diferença estatística do dia 0 em relação ao dia 7 ($p = 0,616$). O dia 7 apresentou-se estatisticamente diferente dos dias 35 e 40 ($p < 0,001$), ao passo que o dia 7 não foi detectada diferença significativa com os dias 0 e 15 ($p \geq 0,319$). Os valores do dia 15 foram estatisticamente significativos em relação com os dias 0,35 e 40 ($p < 0,001$). As leituras dos dias 35 e 40 foram estatisticamente diferentes com os demais dias ($p < 0,001$).

Análise da morfologia das nanopartículas

As imagens feitas em MEV-FEG mostraram nanopartículas esféricas com tamanhos de 193 e 214 nm de CUR-NP aniônica e catiônica respectivamente, as imagens das formulações no MEV-FEG foram analisadas após 30 dias da síntese. (Figura 4).

Figura 4- MEV-FEG demonstraram forma esférica das formulações: A: CUR-NP aniônica (magnificação de 100.000x), B: CUR-NP aniônica (magnificação de 10.000x), C e D: CUR-NP catiônica



Fonte: Autoria própria

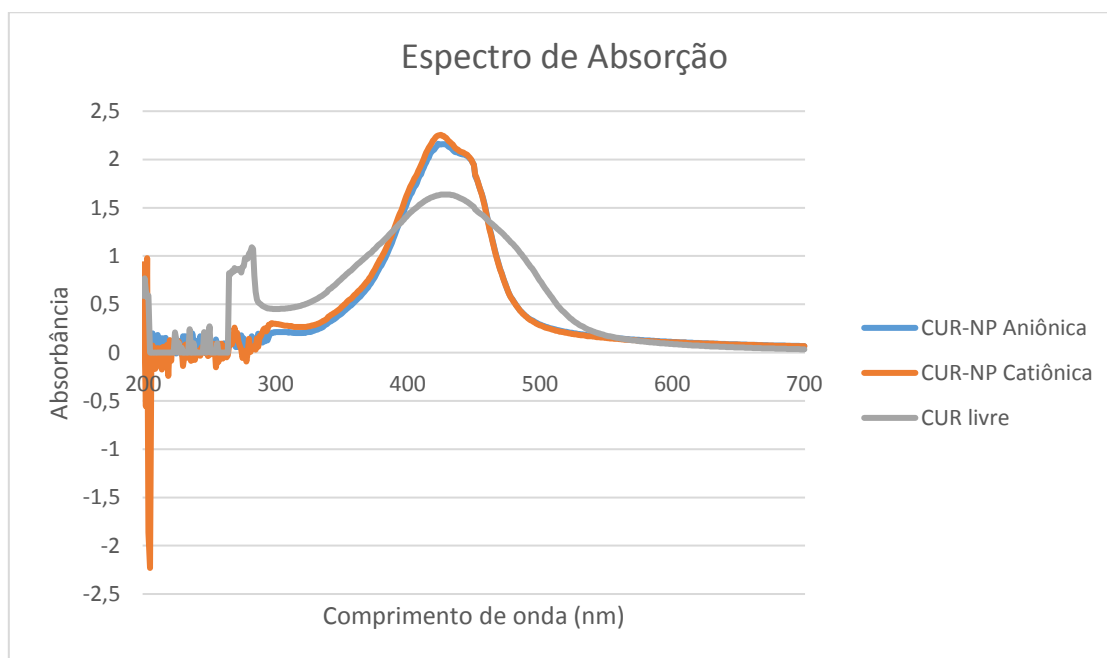
Eficiência de Encapsulamento

A EE foi determinada por centrifugação das CUR-NP aniônica e catiônica ($n=3$ para cada formulação). Foram observados valores médios de $67\%(\pm 2,65)$ e $64,67\%(\pm 2,08)$ para as formulações de CUR-NP aniônica e catiônica, respectivamente.

Espectro de absorção e Estudo de Fotoestabilidade dos FSs

No estudo de absorção de luz da CUR-NP aniônica, catiônica e CUR livre, observou-se que os sinais de absorbância máximos para as formulações e CUR livre foram próximos na faixa de espectro UV-visível, sendo que a CUR-NP aniônica apresentou máxima absorbância em 425 nm, para a CUR-NP catiônica o valor observado foi 426nm e a CUR livre em 429 nm. Apesar dos valores de comprimento de onda serem parecidos, a absorbância das formulações de CUR-NP foi maior do que a CUR livre sendo os valores 2,272; 2,256 e 1,645 para CUR-NP aniônica, catiônica e CUR livre respectivamente. Os valores de espectro de absorção encontram-se na Figura 5.

Figura 5- Espectro de absorção das formulações: CUR-NP Aniônica, CUR-NP Catiônica e CUR livre (n=3 para cada formulação).



Fonte: Elaboração do autor

No estudo de fotoestabilidade foi possível verificar redução do sinal máximo de absorção máximo das formulações proporcional ao tempo de iluminação. A fotoestabilidade das CUR-NP aniônica, encontram-se na Figura 6A. Foi possível evidenciar uma degradação de 60,48% nos primeiros 5 minutos, correspondentes a uma dose de luz de 10,85J/cm² e uma máxima degradação da formulação de 88,95% com 43,2 J/cm² correspondentes a 20 minutos de iluminação. A Figura 6B apresenta a fotoestabilidade da CUR-NP catiônica, onde foi

possível verificar uma degradação do FS catiônico similar à formulação aniônica, pois a maior degradação com a luz foi evidenciada uma degradação de 42,19% nos primeiros 5 minutos de iluminação, e após uma dose de luz de $43,2 \text{ J/cm}^2$ correspondentes a um tempo de iluminação de 20 min o FS tinha degradado em 71,67%. A CUR livre apresentou uma degradação de 20,26% em 5 minutos e 75,06% após uma iluminação de $43,2 \text{ J/cm}^2$ correspondentes a 20 min Figura 6C.

Figura 6- Fotodegradação da CUR após diferentes períodos de iluminação com luz LED azul (n=3 para cada FS). **(A)** CUR-NP Aniônica **(B)** CUR-NP Catiônica **(C)** CUR livre. (continua)

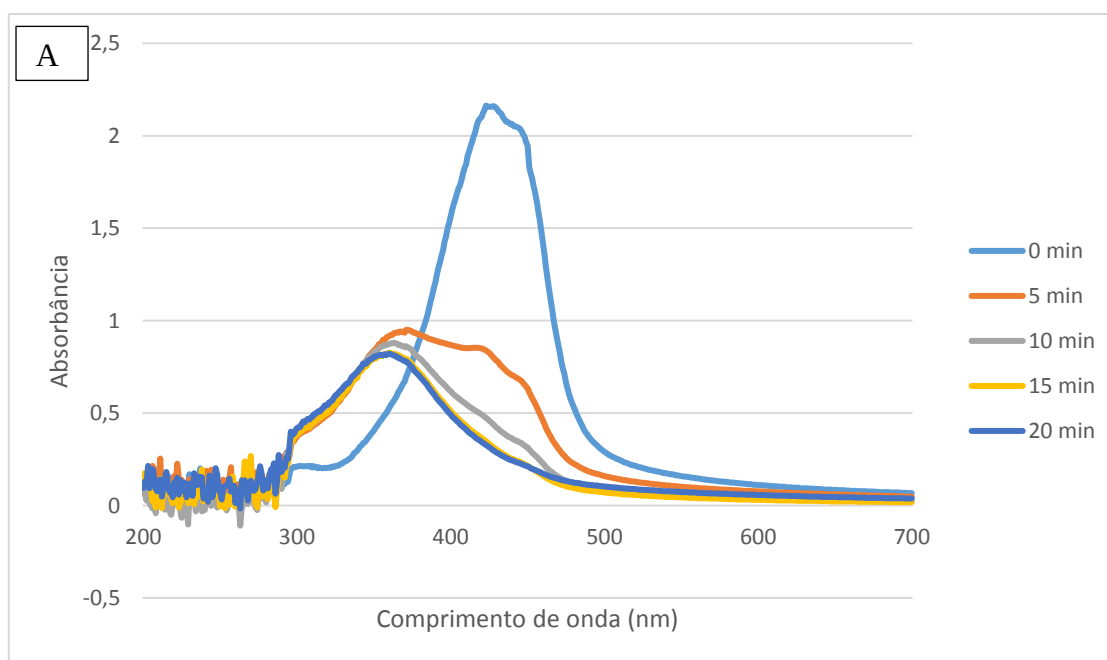
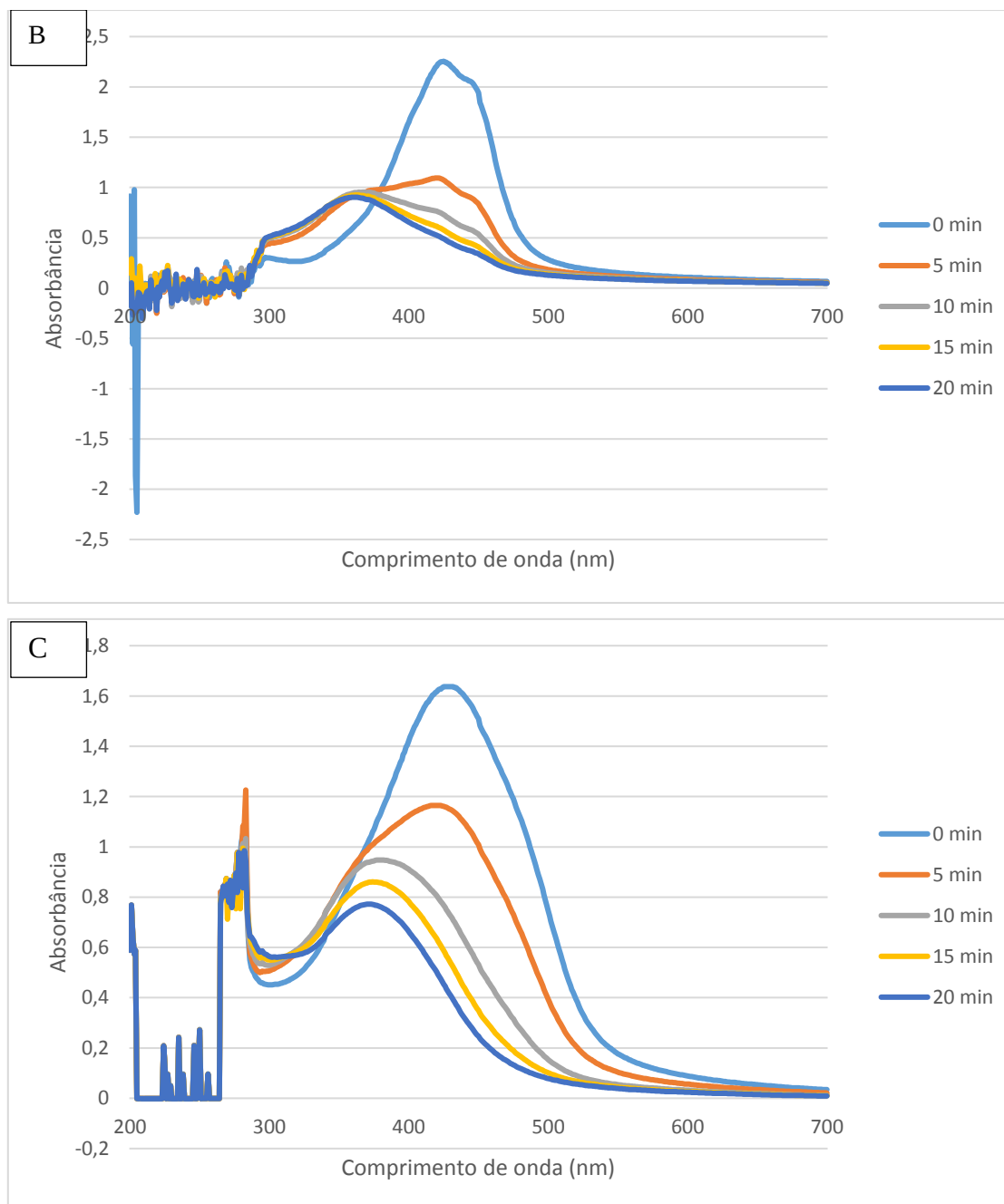


Figura 6- Fotodegradação da CUR após diferentes períodos de iluminação com luz LED azul (n=3 para cada FS). **(A)** CUR-NP Aniônica **(B)** CUR-NP Catiônica **(C)** CUR livre. (Conclusão)



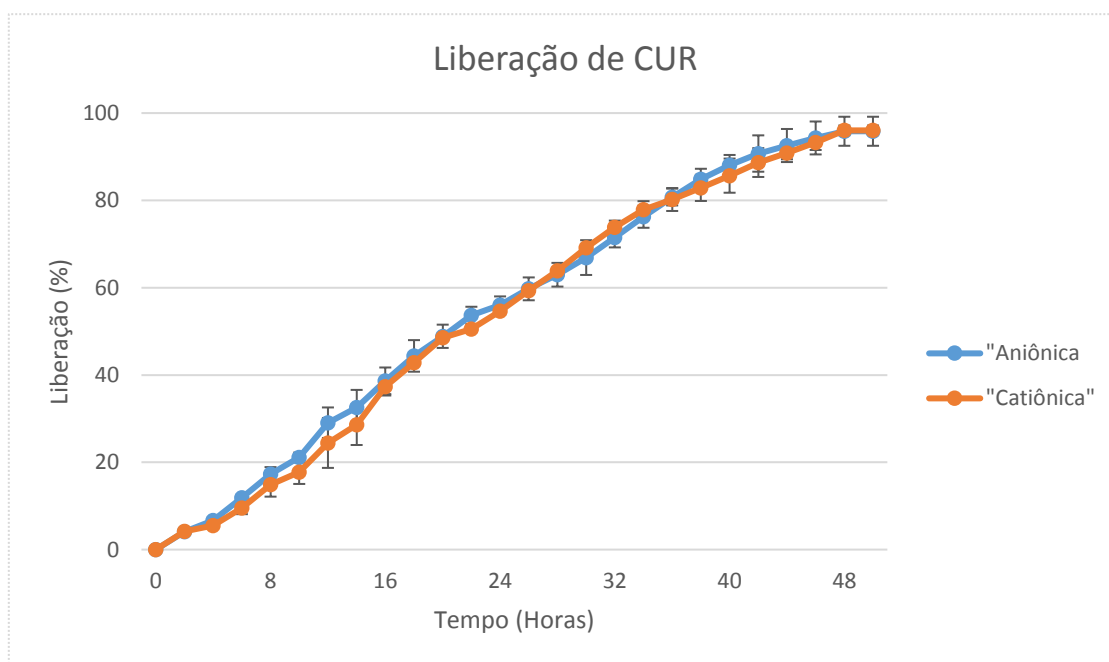
Fonte: Elaboração do autor

Liberação

Na curva de liberação da CUR foi possível evidenciar uma liberação lenta e progressiva. Após um tempo de 12 horas foi observada uma liberação de 29,1% e 24,4% de CUR das NP

aniônica e catiônica respectivamente. Foi possível observar uma liberação incompleta de CUR, pois após 48h 96% de CUR havia sido liberada tanto para a formulação aniônica quanto para a formulação catiônica (Figura 7).

Figura 7- Liberação de CUR das NP Aniônica e Catiônica.



Fonte: Elaboração do autor

Atividade fotodinâmica

A banda de absorvância detectada para o DFBBF foi de 421 nm. Como pode ser verificado na Tabela 2, o DFBBF apresentou uma drástica redução na sua absorvância logo após 5 minutos de irradiação, e pequena redução na absorvância nos tempos de iluminação seguintes para todas as amostras avaliadas. Esse resultado demonstra que a produção de oxigênio singlete foi maior nos primeiros 5 minutos de iluminação, semelhante em todas as amostras testadas.

Tabela 2- Valores de absorvância do DFBB obtidos para as amostras de CUR, CUR-NP aniônica e catiônica nos diferentes tempos de iluminação para determinação da atividade fotodinâmica ($\pm$ desvio padrão) (n=3). (continua)

Formulação	Tempo de iluminação (min)	Comprimento de onda do DFBB (nm)	Absorvância
CUR livre	0		2,031($\pm$ 0,028)
	5		0,287($\pm$ 0,028)
	10	421	0,236($\pm$ 0,029)
	15		0,215($\pm$ 0,028)
	20		0,202($\pm$ 0,028)
CUR-NP Aniônica	0		1,790($\pm$ 0,290)
	5		0,399($\pm$ 0,158)
	10	421	0,224($\pm$ 0,091)
	15		0,158($\pm$ 0,072)
	20		0,128($\pm$ 0,067)

Tabela 2- Valores de absorvância do DFBF obtidos para as amostras de CUR, CUR-NP aniônica e catiônica nos diferentes tempos de iluminação para determinação da atividade fotodinâmica ($\pm$ desvio padrão) (n=3). (conclusão)

CUR-NP Catiônica	0	421	2,742 ($\pm 0,011$)
	5		0,434($\pm 0,026$)
	10	421	0,178($\pm 0,005$)
	15		0,126($\pm 0,006$)
	20		0,106($\pm 0,008$)

Fonte: Elaboração do Autor

Eficácia antimicrobiana do FS

Culturas planctônicas

Os resultados obtidos nas culturas planctônicas de *C. albicans* mostraram eficácia da aPDT associada à CUR livre, tendo em vista a ausência de crescimento de colônias fúngicas após o tratamento para todas as amostras. O grupo C+L- tratado com CUR livre demonstrou diferença significativa ($p < 0,001$) em relação aos grupos C-L-, C+L+ com CUR-NP aniônica, N aniônica e C-L+, com redução do crescimento fúngico de 2,44 $\log_{10}$ em relação ao grupo controle (C-L-). O grupo C+L+ de CUR-NP aniônica mostrou diferença significativa ($p < 0,001$) em relação aos grupos C+L- (CUR-NP), N (aniônicas), C+L- de CUR livre, no entanto, o grupo C+L+ de CUR-NP aniônica promoveu diminuição de apenas 0,78 $\log_{10}$ em relação ao controle não tratado (C-L-). Os grupos tratados com as formulações catiônicas inibiram completamente o crescimento do fungo, inclusive na ausência de luz, e essa erradicação fúngica foi observada também nas NP catiônicas (grupo N). Os grupos C-L-, C-L+, C+L- de CUR-NP aniônica e N aniônica apresentaram crescimento microbiano, e nenhuma diferença significativa foi detectada entre si ($p \geq 0,607$) (Figura 8A). A CUR-NP mediadora da aPDT foi menos efetiva na inativação

do fungo em relação à CUR livre associada ou não à luz LED azul. Não é possível afirmar que houve fotoinativação do micro-organismo tratado com a formulação catiônica, uma vez que a NP demonstrou atividade antimicrobiana.

No teste feito em culturas planctônicas de SARM, o grupo C+L+ de CUR livre não houve crescimento do micro-organismo. Diferente ao resultado observado na *C. albicans* o grupo C+L- não apresentou efeito antimicrobiano, uma vez que neste grupo foi observado crescimento bacteriano similar aos grupos C-L-, C-L+, C+L- de CUR-NP e N aniônica ($p \geq 0,261$). O grupo C+L+ de CUR-NP aniônica demonstrou diferença significativa ($p < 0,001$) em relação aos outros grupos, promovendo uma diminuição de $6,47 \log_{10}$ em relação ao grupo controle não tratado. O grupo N aniônico apresentou diferença ($p = 0,048$) em relação ao grupo controle, no entanto a diminuição verificada foi menor que $1 \log_{10}$ ($0,28 \log_{10}$). Os grupos tratados com formulações catiônicas erradicaram o crescimento bacteriano, esse resultado foi observado para os grupos C+L+, C+L- e N (catiônicos). (Figura 8B). Foi verificada maior efetividade da aPDT mediada por CUR livre comparada com a CUR-NP aniônica, uma vez que o micro-organismo foi erradicado quando tratado com CUR livre e luz, ao passo que a CUR-NP aniônica associada à luz diminui a viabilidade da bactéria. As CUR-NP e NP catiônicas apresentaram efeito antimicrobiano mesmo na ausência da luz, motivo pelo qual não pode-se afirmar que houve fotoinativação microbiana.

Como observado nos testes dos outros micro-organismos (*C. albicans* e SARM) a aPDT mediada pela CUR livre erradicou o crescimento de *S. mutans*. O grupo C+L- de CUR livre apresentou diferença ($p < 0,010$) em comparação aos outros grupos, este grupo apresentou redução de $0,75 \log_{10}$ em relação ao grupo controle. O grupo C+L+ de CUR-NP aniônica apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) em relação aos grupos C-L-, C-L+, C+L- de CUR-NP e N aniônicas, que apresentaram crescimento bacteriano e não diferiram entre si ($p \geq 0,969$). A aPDT mediada pela CUR-NP aniônica (C+L+) promoveu uma diminuição de $6,54 \log_{10}$ em relação ao grupo (C-L-). Como observado nos testes feitos em *C. albicans* e SARM, as formulações catiônicas erradicaram o crescimento de *S. mutans* (Figura 8C). Similar aos outros micro-organismos a CUR livre foi mais efetiva que a CUR-NP aniônica na fotoinativação do micro-organismo. Enquanto as formulações catiônicas apresentaram atividade antimicrobiana.

Figura 8- Valores médios em Log_{10} (UFC/ mL) em Culturas planctônicas. (A) *C. albicans*, (B) SARM e (C) *S. mutans* para cada grupo tratado. Barras de erro: desvio padrão. Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell. (continua)

Letras iguais não apresentaram diferença significativa. ($p > 0,05$)

Letras diferentes apresentaram diferença significativa. ($p \leq 0,048$)

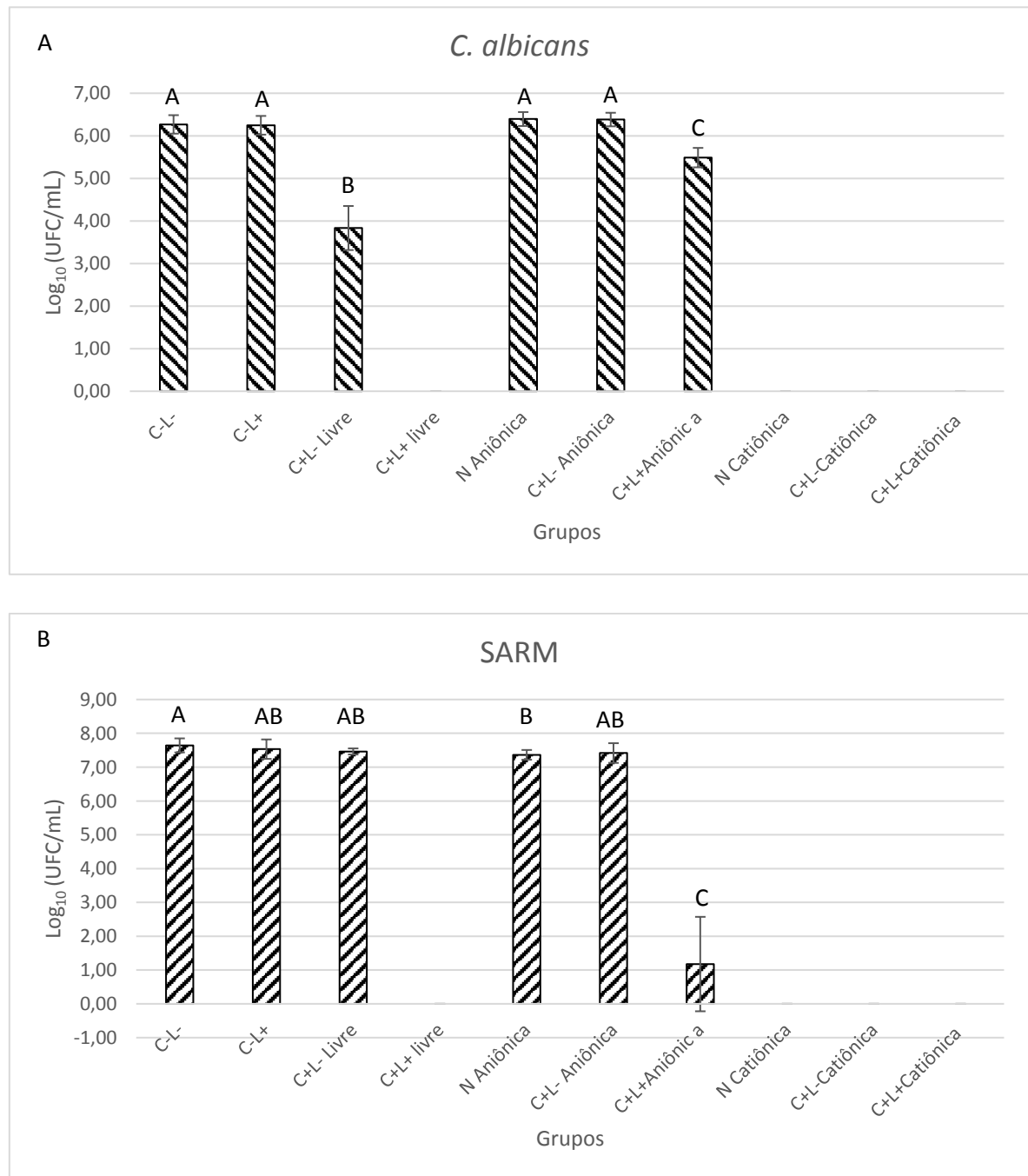
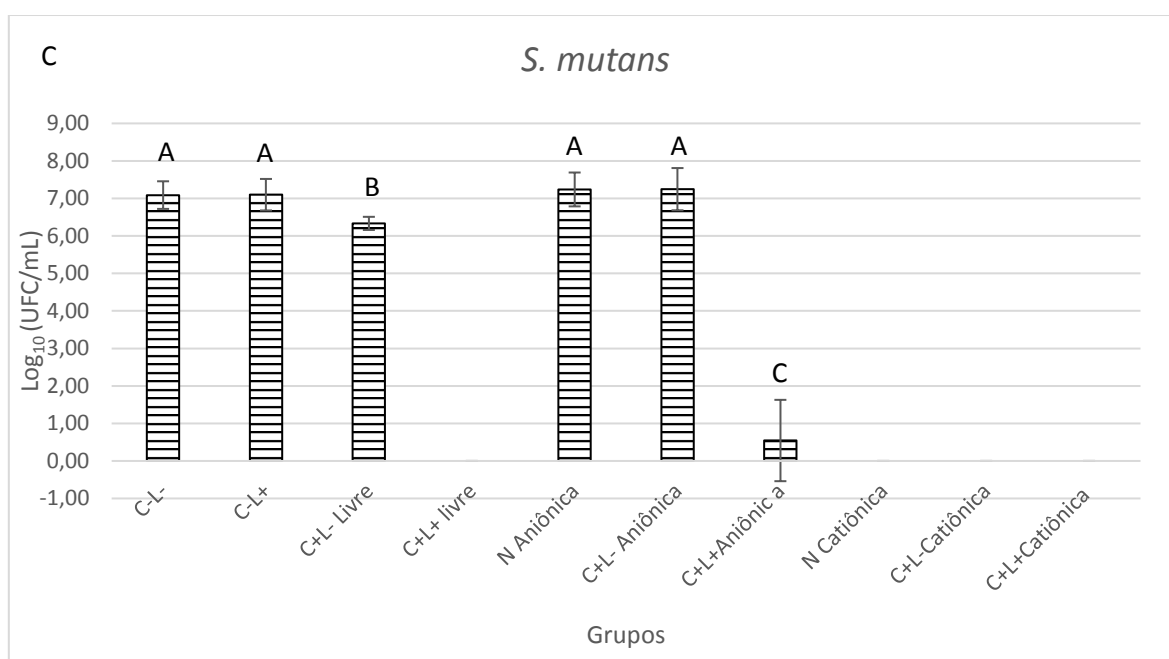


Figura 8- Valores médios em Log_{10} (UFC/ mL) em Culturas planctônicas. (A) *C. albicans*, (B) SARM e (C) *S. mutans* para cada grupo tratado. Barras de erro: desvio padrão. Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell.(conclusão).

Letras iguais não apresentaram diferença significativa. ($p > 0,05$)

Letras diferentes apresentaram diferença significativa. ($p \leq 0,048$)



Fonte: Elaboração do autor

aPDT contra Biofilmes misto

Os resultados obtidos no biofilme misto mostraram que aPDT mediada pela CUR livre diminuiu significativamente a viabilidade das três espécies em biofilme misto (Figura 9A). No caso de *S. mutans*, a aPDT produziu redução significativa ($p < 0,001$) comparada com os outros grupos que não mostraram diferença entre si ($p \geq 0,840$). Diferença significativa também foi observada no grupo C+L+ para SARM ($p \leq 0,004$), enquanto que os outros grupos apresentaram crescimento microbiano e não apresentaram diferença entre si ($p \geq 0,274$). A viabilidade de *C. albicans* também foi diminuída depois da aPDT mediada pela CUR livre, foi observada uma diferença significativa ($p \leq 0,026$) em relação aos grupos C-L-, C-L+ e C+L-, os quais não se diferenciaram entre si ($p \geq 0,668$). Comparada com o grupo C-L- a redução para os três micro-organismos foi de 0,90, 1,05 e 2,41 log_{10} para SARM, *S. mutans* e *C. albicans* (Figura 9A).

Assim, verificou-se que, no biofilme misto, *C. albicans* foi a espécie mais susceptível à aPDT, seguida por *S. mutans* e SARM.

Quando a formulação aniônica foi aplicada em contato com o biofilme observou-se a falta de efetividade da aPDT para os três micro-organismos em relação aos seus respectivos controles (C-L-). Para SARM e *S. mutans* não foi observada diferença significativa entre os grupos C-L-, C-L+, C+L-, N e C+L+ ($p \geq 0,579$ e $p \geq 0,548$, respectivamente). No entanto, no caso do fungo *C. albicans*, diferença significativa foi observada para os grupos N e C+L+ CUR-NP aniônica ($p=0,032$), contudo, os grupos N e C+L+ não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos C-L-, C-L+ e C+L- ($p \geq 0,129$ e $p \geq 0,405$, respectivamente) (Figura 9B).

Como observado nas culturas planctônicas as formulações catiônicas promoveram redução da viabilidade dos três micro-organismos do biofilme misto (Figura 9C). Para *C. albicans* os grupos C+L+, C+L- e N mostraram diferença ($p < 0,001$) em relação aos grupos C-L- e C-L+ que não apresentaram diferença entre si ($p=0,967$). Os grupos C+L+ e C+L- foram semelhantes na análise estatística ($p=0,998$). As formulações promoveram diminuição de 2,26, 2,32 e 1,26 $\log_{10}$ dos grupos C+L+, C+L- e N em relação ao grupo C-L-. No caso do SARM o grupo C+L+ apresentou diferença significativa em relação aos grupos C-L-, C-L+ e N ($p \leq 0,002$) e apresentou-se similar ao grupo C+L- ($p=0,088$). Na análise estatística o grupo C+L- apresentou diferença significativa em relação aos grupos C-L-, C-L+ e N ($p \leq 0,036$). Enquanto o grupo N mostrou diferença em relação aos outros grupos avaliados ($p \leq 0,036$). Finalmente os grupos C-L- e C-L+ não apresentaram diferença estatística significativa ($p=0,947$). As formulações catiônicas diminuíram a viabilidade do SARM em 1,28, 2,52 e 4,21 $\log_{10}$ para os grupos N, C+L- e C+L+ respectivamente.

Para *S. mutans*, o grupo C+L+ apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) em relação aos grupos C-L- e C-L+, e não apresentou diferença com os grupos C+L- e N ($p \geq 0,899$). No grupo C+L- observou-se diferença com os grupos C-L- e C-L+ ($p < 0,001$), mas não apresentou diferença com os grupos C+L+ e N ($p \geq 0,899$). Os grupos C-L- e C-L+ não apresentaram diferença entre si ($p \geq 0,998$). A diminuição da viabilidade do micro-organismo em relação ao grupo controle não tratado foi 4,44, 4,50 e 5,05 $\log_{10}$ para os grupos N, C+L+ e C+L- respectivamente.

A CUR livre demonstrou efetividade na fotoinativação das espécies do biofilme misto comparada com a CUR-NP aniônica que não promoveu fotoinativação microbiana, sendo o fungo *C. albicans* quem apresentou maior diminuição de viabilidade no biofilme misto tratado com CUR livre associada à luz azul. Similar aos resultados observados nas culturas planctônicas as formulações catiônicas apresentaram atividade antimicrobiana, motivo pelo qual não pode-se afirmar que houve fotoinativação das espécies do biofilme. Além disso o micro-organismo mais suscetível às formulações catiônicas foi a bactéria *S. mutans*.

Figura 9- Valores médios em Log_{10} (UFC/ mL) para cada micro-organismo do biofilme misto tratado. Barras de erro: desvio padrão. (A) biofilme misto tratado com CUR livre. (B) biofilme misto tratado CUR-NP aniônica. (C) biofilme misto tratado com CUR-NP catiônica. Dados Analisados por MANOVA, pós teste de Tukey/Games-Howell (continua).

Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística significativa. ($p > 0,05$)

Letras diferentes demonstram que houve diferença estatística significativa. ($p \leq 0,036$)

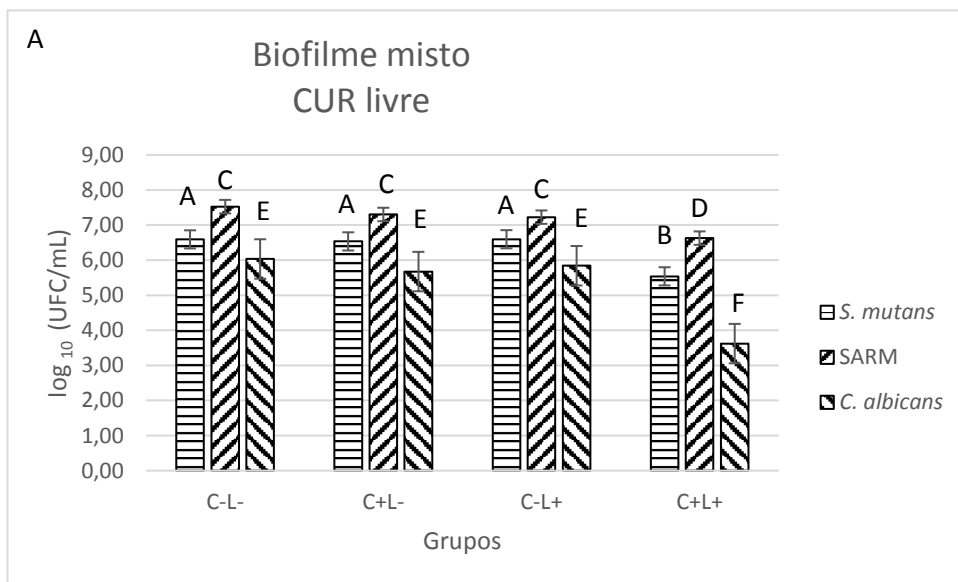
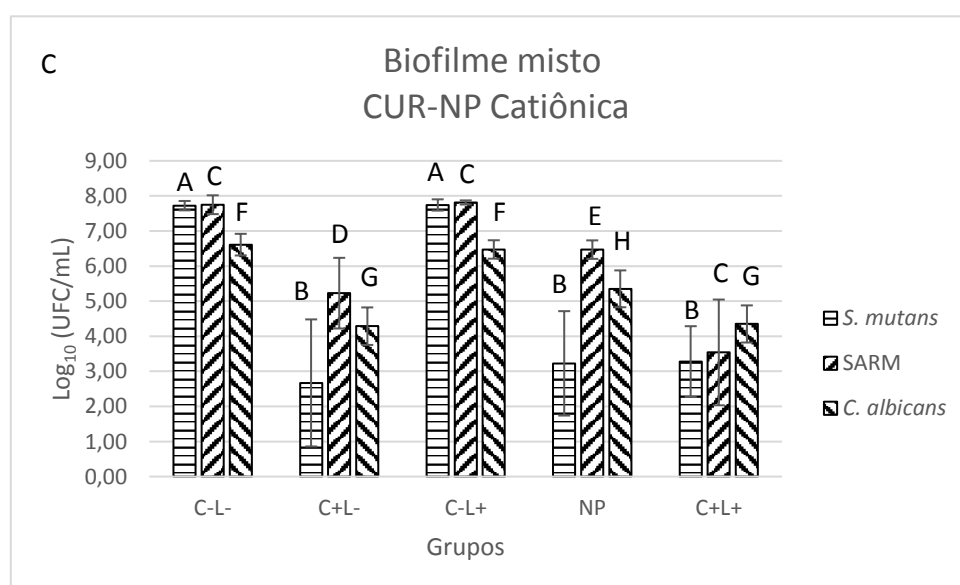
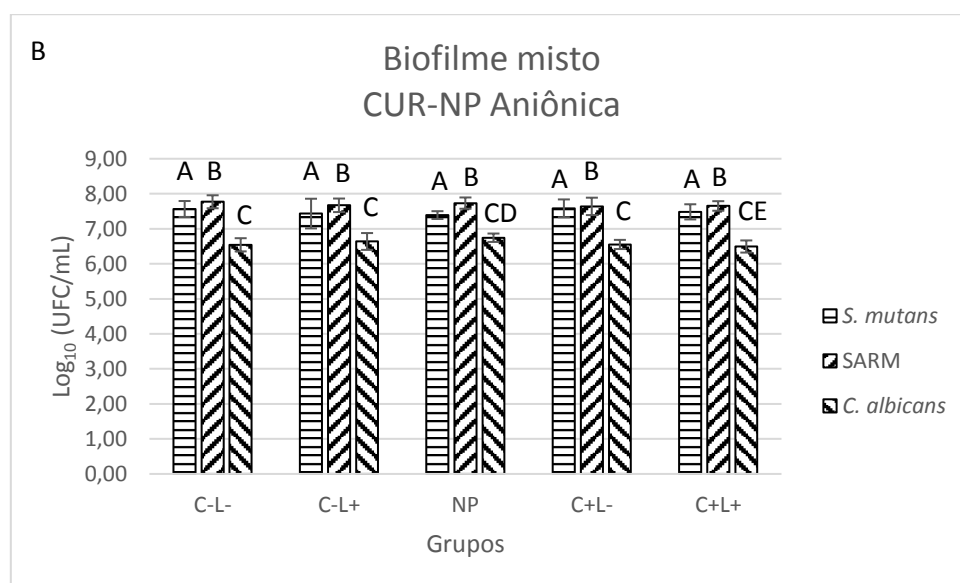


Figura 9- Valores médios em Log_{10} (UFC/ mL) para cada micro-organismo do biofilme misto tratado. Barras de erro: desvio padrão. (A) biofilme misto tratado com CUR livre. (B) biofilme misto tratado CUR-NP aniônica. (C) biofilme misto tratado com CUR-NP catiônica. Dados Analisados por MANOVA, pós teste de Tukey/Games-Howell (conclusão).

Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística significativa. ($p > 0,05$)

Letras diferentes demonstram que houve diferença estatística significativa. ($p \leq 0,036$)

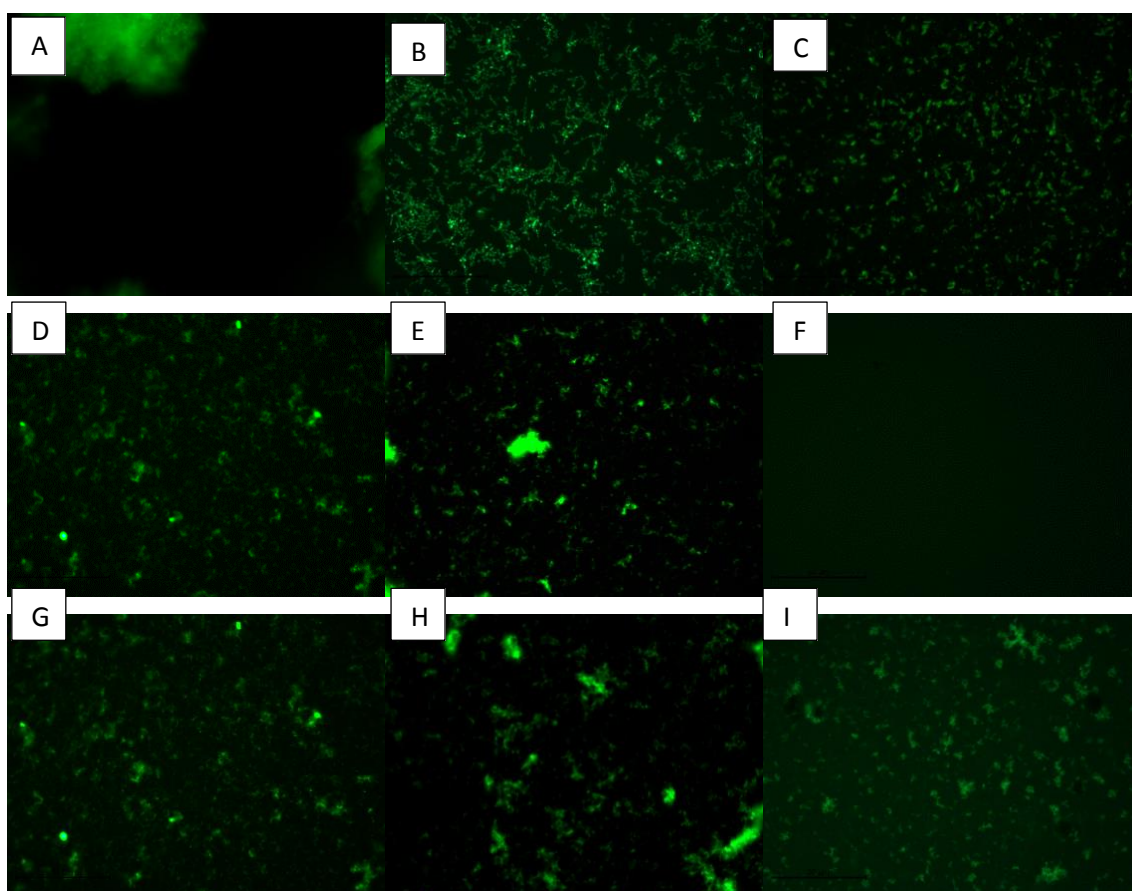


Fonte: elaboração do autor

Microscopia de Fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência mostraram que a CUR livre e a CUR-NP catiônica foram incorporadas por *C. albicans*, fato não observado com a CUR-NP aniônica (Figura 10A). As formulações de CUR-NP aniônica e catiônica foram incorporadas por *S. mutans*, enquanto a CUR livre não foi incorporada por essa bactéria (Figura 10B). As imagens para SARM mostram incorporação das formulações tanto CUR-NP aniônica e catiônica quanto CUR livre (Figura 10C).

Figura 10- Imagens de microscopia de fluorescência dos FS utilizados em culturas planctônicas de *C. albicans* (A, B e C), *S. mutans* (D, E e F) e SARM (G, H e I). A, D e G: CUR-NP aniônica; B, E e H: CUR-NP catiônica; e C, F e I: CUR livre. Magnificação 50X.



Fonte: Autoria própria

6 DISCUSSÃO

A CUR apresenta propriedades antimicrobianas na sua composição, e nos últimos tempos tem sido utilizada como FS apresentando maior eficácia na inativação microbiana quando associada com luz azul. Apesar de apresentar esse sinergismo, a CUR como FS apresenta algumas desvantagens, como ser insolubilidade em água, instabilidade e biodisponibilidade limitada, motivos que dificultam a sua aplicação. Nesta pesquisa foram encapsuladas CUR-NP aniônicas e catiônicas estáveis desde o ponto de vista farmacotécnico. As CUR-NP apresentaram maior absorvância de luz em relação à CUR. A fotogredação das formulações foram foi semelhante à CUR. A liberação de CUR das NP foi incompleta em média de 96% para ambas formulações. As CUR-NP aniônicas apresentaram atividade fotodinâmica contra culturas planctônicas de *C. albicans*, SARM e *S. mutans*, enquanto as CUR-NP catiônica e as NP de controle catiônicas apresentaram efeito antimicrobiano contra as culturas dos micro-organismos (*C. albicans*, SARM e *S. mutans*) mesmo na ausência de luz. Quando as formulações foram utilizadas contra biofilme misto composto por essas três espécies as CUR-NP aniônicas não apresentaram atividade fotodinâmica, ao passo que as CUR-NP e NP demonstraram atividade antimicrobiana mesmo sem luz.

Nesta pesquisa as CUR-NP foram sintetizadas pelo método de nanoprecipitação⁶⁵, as quais apresentaram estabilidade de até 35 dias. Essa estabilidade pode ser explicada pelo fato das NP apresentarem elevado potencial zeta (em módulo), pois valores de potencial zeta distantes de zero produzem repulsão entre as NP, evitando assim a agregação das NP⁵⁰. O valor de polidispersão das NP foi considerado como homogêneo, pois valores abaixo de 0,1 são associados com alta homogeneidade⁴². As propriedades físico-químicas das NP estão relacionadas ao polímero e ao método utilizados para a sua síntese. Chereddy et al.²¹ sintetizaram nanopartículas de CUR utilizando ácido poli (lático-co-glicólico) pela técnica de evaporação de óleo/água emulsão-solvente, e obtiveram NP com tamanho médio de 176 nm, índice de Polidispersão de 0,105 e potencial zeta de -23,2 mV. Yallapu et al.¹²³ obtiveram CUR-NP pela técnica de nanoprecipitação utilizando PLGA como polímero, eles verificaram tamanhos entre 76,2 e 560,4 nm, polidispersão de 0,19-0,41 e potencial zeta de +0,06 e -0,06 mV. O método de síntese por emulsão-evaporação foi utilizado por Ghosh et al.⁴⁴, que obtiveram CUR-NP com PLGA, cujo tamanho foi avaliado mediante o uso de Microscopia de Força Atômica e foi observado um diâmetro de 15 nm. Khalil et al.⁵⁹ sintetizaram NP carregadas com CUR pelo método de evaporação do solvente simples emulsão, com PLGA

como polímero, e observaram tamanho de 161,93 nm com Polidispersão de 0,042. Chen et al.²⁰ prepararam nanofibras *electrospinnig* utilizando CUR e PLA, e a análise por MEV demonstrou nanofibras com tamanho de entre 971 e 756 nm. PLA e PLGA são polímeros aprovados pela FDA por serem biodegradáveis e devido a sua biocompatibilidade. A principal diferença entre eles é o tipo de substância produzida pelo metabolismo no corpo; enquanto PLA é metabolizado em monômeros de ácido lático, o PLGA produz monômeros de ácido lático e ácido glicólico⁶⁵.

As absorbâncias máximas das CUR-NP aniônica e catiônica foram 2,272 em um comprimento de onda de 425 nm e 2,256 (426 nm), respectivamente, enquanto a absorbância da CUR livre foi 1,645 (429 nm). Esses resultados são similares aos reportados em estudos prévios que demonstram que a CUR absorve luz azul em comprimento de onda de entre 400-470 nm^{7,38}. A fotodegradação da CUR foi realizada utilizando luz azul em comprimento de onda de 450 nm. A CUR-NP aniônica mostrou redução da banda de absorbância de 60,48% depois de 5 min de irradiação correspondentes a 10,85 J/cm², na CUR-NP foi observado uma redução da banda de absorbância de 42,19% com uma fluência de 10,85 J/cm², enquanto a CUR livre mostrou decrescimento de 20,26% depois da mesma dose de luz. Esse resultado obtido foi similar ao estudo feito por Hegge et al.⁵¹ que demonstrou fotodegradação de 50% de CUR com uma dose de luz de 9,4 J/cm². No entanto, Dovigo et al.³⁸ observaram degradação de CUR de 70% depois de uma baixa dose de luz (0,4 J/cm²). Essa diferença poderia ser explicada pelas diferentes concentrações de CUR utilizadas uma vez que a concentração de CUR utilizada nesta pesquisa foi maior aquela usada por Dovigo et al³⁸.

Nesta pesquisa, a percentagem de EE foi de 67% para a CUR-NP aniônica e 64,67% para a CUR-NP catiônica. Estudos prévios mostram valores de EE mais elevados, que variam de 78,95% a 97% (Cherreddy et al²¹, Udompornmongkol et al¹²⁵, Hazzah et al⁵⁰, Mukerjee⁸⁵). As diferenças nos valores obtidos nesta pesquisa em relação às outras poderiam ser explicadas pela velocidade e tempo de centrifugação. Nesta pesquisa a centrifugação utilizada foi de 6,000 rpm durante 10 minutos. Por outro lado, Hazzah et al.⁵⁰ usaram uma velocidade de 15,000 rpm durante 1 hora e Mukerjee e Vishwanatha⁸⁴ usaram 15,000 g por 15 minutos para determinar EE. Outros estudos determinaram EE por diferentes métodos como, *High performance Liquid Chromatography* (HPLC), atingindo valores de 89%⁵⁰, 77,07%⁸⁴.

A avaliação de liberação de CUR das NP mostrou uma liberação gradual de 96% depois de 48 horas, resultado que está de acordo com outros estudos prévios. Cherreddy et al²¹.

utilizaram o método diálise para demonstrar uma liberação de CUR de 40,5% e 75,7% depois de 24h e oito dias, respectivamente. Khalil et al⁵⁹. demonstraram liberação de CUR de 21% depois de 24 h e 56,9% depois de 9 dias. Sugere-se que essas diferenças possam ser atribuídas ao tipo de polímero e técnicas de síntese, aliás da metodologia escolhida para avaliar a liberação da CUR da formulação.

Espécies reativas como o oxigênio singlete $^1\text{O}_2$ são liberadas após a iluminação da CUR. Nesta pesquisa foi demonstrada que a produção de $^1\text{O}_2$ foi similar entre CUR-NP (aniônica ou catiônica) e CUR livre utilizando DFBF como *scavenger* de $^1\text{O}_2$. A solução contendo CUR-NP (aniônica ou catiônica) e CUR livre na presença do DFBF demonstrou redução gradual na banda de absorbância do DFBF. Após os primeiros 5 min de iluminação o DFBF mostrou diminuição da banda de absorbância de 89,5 %, sugerindo-se assim elevada produção de $^1\text{O}_2$ depois da iluminação. Este resultado corrobora a informação reportada por Ye et al.¹³⁰ que observaram elevada produção de $^1\text{O}_2$ após 30 minutos de irradiação ($0,5 \text{ W/cm}^2$), no entanto naquele estudo foi utilizada luz vermelha para a *upconversion* de nanopartículas conjugadas com CUR. Em outro estudo foi sugerido que as espécies reativas de oxigênio (ROS) como $^1\text{O}_2$ não são necessárias para a fotoinativação microbiana¹²⁹. Baltazar et al.⁷ sugeriram que as espécies reativas de nitrogênio (RNS) podem ser responsáveis pela fotoinativação microbiana de *Trichophyton rubrum*. Dovigo et al³⁶. também sugeriram que a fotoinativação não pode ser necessariamente relacionada à produção de $^1\text{O}_2$, pois eles utilizaram azida de sódio (NaN_3) um supressor de $^1\text{O}_2$ e verificaram a fotoinativação de *C. albicans*. Esse autor sugere que outras ROS podem ser relacionadas à fotoinativação do fungo.

Observou-se uma erradicação de *S. mutans*, *C. albicans* e SARM quando as culturas planctônicas desses micro-organismos foram tratadas com CUR livre associada a luz LED azul com 40 min de pré-irradiação e uma dose de luz de $43,2 \text{ J/cm}^2$. A dose de luz utilizada nesta pesquisa foi similar à utilizada por Paschoal et al⁹⁰. que utilizaram 42 J/cm^2 com $0,023 \text{ mg/mL}$ de CUR como FS, e observaram uma redução de $5,37 \log_{10}$ em culturas planctônicas de *S. mutans*. Um outro estudo mostrou que 15 mg/mL de CUR como FS e uma dose de luz de $5,7 \text{ J/cm}^2$ foram suficientes para inativar culturas de *S. mutans*⁴. Em relação à fotoinativação de culturas planctônicas de *C. albicans*, um estudo prévio mostrou completa inibição do fungo utilizando $0,73 \text{ mg/mL}$ de CUR e uma dose de luz de $5,28 \text{ J/cm}^2$ (Dovigo et al³⁸). Com relação à aPDT utilizando CUR como FS contra SARM em culturas planctônicas, Ribeiro et al⁷⁵.

mostraram redução de 9,8 log₁₀, utilizando 0,73 mg/mL de CUR livre e uma dose de luz de 37,5 J/cm².

Neste estudo foi utilizada CUR livre em uma concentração de 130 µM correspondente a 4,79 mg/mL para ser testada nas culturas planctônicas, em função da concentração máxima obtida pelo encapsulamento da CUR em NP de 260 µM, cujo valor foi reduzido pela metade quando adicionado ao mesmo volume da suspensão microbiana. Uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) menor de 0,72 mg/mL contra *C. albicans* foi encontrada por Martins et al⁷⁷. Isto poderia explicar a redução de 2,44 log₁₀ de *C. albicans* no grupo C+L- de CUR livre, resultado que não foi observado para *S. mutans* e SARM. Valores de CIM de 0,128 mg/mL¹¹⁶ e 4,26 mg/mL⁵⁶ de CUR foram reportados contra *S. mutans*, e valores de 125-250 mg/mL¹³³ e 217 mg/mL⁴⁷ foram reportados para SARM.

Poucos estudos demonstram fotoinativação de biofilmes mistos. Os resultados obtidos nesta pesquisa utilizando CUR livre estão de acordo com outros estudos que mostram a inativação de biofilmes multiespécies composto por *S. mutans* e *Lactobacillus acidophilus* após aPDT utilizando CUR como FS. Concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/mL resultaram em reduções microbianas de 97,5, 95 e 99% respectivamente⁴. Quishida et al⁹⁷. utilizaram concentrações de 3,6 e 4,4 mg/mL de CUR associada a uma fluência de 37,5 J/cm² para diminuir a viabilidade de biofilme multiespécies formado por *C. albicans*, *Candida glabrata* e *S. mutans*. Nesta pesquisa, concentrações maiores de CUR foram utilizadas para inibir a viabilidade do biofilme misto, similar ao estudo realizado por Quishida et al⁹⁶. eles observaram reduções de 1,21, 1,19 e 2,39 log₁₀ em biofilme multiespécies formado por *C. albicans*, *Candida glabrata* e *S. mutans*, respectivamente, utilizando 20 mg/mL de Photodithazine como FS. Em outro estudo com biofilmes multiespécies de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* foi demonstrada uma inibição de 1,00, 1,47 e 1,25 log₁₀, respectivamente, para cada uma dessas espécies utilizando 0,1 mg/mL de azul de metileno como FS⁹². Outros estudos também utilizaram a aPDT contra biofilmes monoespécies. Dovigo et al³⁸. demonstraram uma redução de 87,22% do metabolismo de biofilme de *C. albicans* depois do uso de CUR em concentração de 1,4 mg/mL associado 20 minutos de pré- irradiação e uma dose de luz de 5,28 J/cm².

A formulação de CUR-NP aniônica demonstrou eficácia antimicrobiana fotodinâmica em culturas planctônicas, uma vez que efeito microbicida foi observado apenas quando as CUR-

NP foram associadas à luz LED. Não foi observado efeito antimicrobiano nas amostras tratadas apenas com CUR-NP aniônica sem luz e NP aniônica sem CUR. No entanto, os resultados dessa fotoinativação demonstraram que não houve erradicação dos três micro-organismos avaliados (*S. mutans*, *C. albicans* e SARM), como observado com a CUR livre. Quando a formulação aniônica foi aplicada em biofilme misto composto dessas três espécies de micro-organismos, não foi verificada inativação fotodinâmica, uma vez que as três espécies do biofilme apresentaram crescimento similar em relação ao grupo controle. Esse resultado poderia ser explicado pela carga superficial da nanoformulação (aniônica), porque alguns estudos reportaram que os FS catiônicos apresentaram melhor eficácia antimicrobiana comparada com os FS aniônicos^{57,100,101}. Os exopolissacarídeos ligados ao DNA extracelular concedem à matriz do biofilme carga aniônica³⁹, gerando repulsão com os FS aniônicos, motivo pelo qual a ação dos FS aniônicos é limitada com os micro-organismos do biofilme.

Os resultados microbiológicos utilizando as nanopartículas catiônicas, com e sem CUR, mostraram efeito microbicida, uma vez que foi possível verificar erradicação das culturas planctônicas de *S. mutans*, *C. albicans* e SARM. Quando essas espécies foram cultivadas em biofilme misto foi observada redução dos três micro-organismos, tanto para CUR-NP quanto para NP mesmo na ausência de luz. Dentre esses três micro-organismos, foi possível verificar maior efeito antimicrobiano no *S. mutans* provavelmente devido à apetência do micro-organismo pelo açúcar (DEX) presente na formulação. Portanto, a redução do crescimento microbiano observado nas amostras tratadas com CUR-NP catiônica na presença ou ausência de luz pode ser atribuída ao efeito microbicida da nanoformulação catiônica. Esse efeito microbicida pode ser atribuído à incorporação de CTAB utilizado como surfactante, pois estudos prévios demonstraram a autólise de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* em presença de CTAB¹⁰⁵.

Efeito antimicrobiano de nanoformulações de CUR em culturas planctônicas de *S. aureus* foi observado por Basniwal et al.¹⁰, que sintetizaram nanopartículas de CUR por meio da técnica de moagem úmida. Esses autores observaram uma CIM de 0,1 mg/mL comparada com a CUR em DMSO, cujo valor foi de 0,15 mg/mL. Em uma outra pesquisa foi demonstrada uma CIM de 30 mg/mL contra culturas planctônicas de SARM utilizando nanopartículas de conversão de luz infravermelha¹³⁰. Nanopartículas contendo CUR produziram redução de 97% na viabilidade de culturas planctônicas de SARM após uma incubação de 4 horas com o micro-organismo⁶³. Hazzah et al.⁵⁰, sintetizaram CUR-NP sólidas de lipídeo e verificaram valores de

CIM de 0,1857; 0,09375; 0,75; 3; 1,5 e 0,1875 mg/ml contra culturas de *S. aureus*, *S. mutans*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *L. acidophilus* e *C. albicans* respectivamente. Arunraj et al.⁵ observaram inibição de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* após incubação por 24 horas utilizando 1 mg/mL de nanoesferas de CUR. Em um outro estudo utilizando nanofibras de CUR utilizando *electrospun* e poli(2- hidroxietil metacrilato) como polímero foi observado um halo de inibição de 17 mm para SARM e *S. aureus*, 18 mm para *E. coli* e *Klebsiella pneumonia* resistentes ou não antibióticos de espectro estendido β lactamase nas placas de cultura desses micro-organismos, após incubação *overnight* das nanofibras de CUR com os micro-organismos⁹⁸. Poucos estudos avaliam a eficácia da aPDT mediada por CUR em nanoformulações. Baltazar et al.⁷ observaram completa inativação de cultura planctônica de *Trichophyton rubrum* tratada com nanopartículas de CUR em concentração de 0,01 mg/ml utilizando 10 min de pré- irradiação e uma dose de luz de 10 J/cm². O crescimento do fungo foi inibido por 7 dias após o tratamento. Hegge et al.⁵² sintetizaram CUR-NP combinando CUR com ciclodextrinas poliméricas e verificaram que a sobrevivência de culturas planctônicas de *Escherichia coli* foi de até 0,01% quando as formulações com 0,036 mg/mL de CUR foram associadas à luz a 29 J/cm². Já culturas planctônicas de *E. faecalis* apresentaram redução significativa e até completa inativação quando as formulações foram combinadas à luz a 4,8 J/cm². Posteriormente⁵¹, esses mesmos autores solubilizaram CUR em polietileno-glicol, pluronic e hidroxipropil- γ -CD e, quando associada à luz, observaram redução menor que 1 log₁₀ em biofilmes de *S. epidermidis*. Outro FS em nanoformulações tem sido avaliada em aPDT. Ribeiro et al.¹⁰¹ observaram eliminação de culturas planctônicas de *S. aureus* após de uma dose de luz de 25 J/cm² utilizando como FS cloro-alumínio Ftalocianina catiônica (Cl-Al-FC), encapsulada em nanoemulsão. Esses autores¹⁰⁰, em um outro estudo, verificaram redução de 70% do metabolismo de biofilme de *C. albicans* utilizando aPDT mediada pela Cl-Al-FC em nanoemulsão.

CUR é autofluorescente e emite fluorescência verde¹²⁵. Nesta pesquisa, na microscopia de fluorescência verificou-se que *C. albicans* mostrou fluorescência com CUR livre e CUR-NP catiônica, porém não com CUR-NP aniônica, possivelmente pela semelhança de carga negativa entre a nanopartícula e a parede celular fúngica. Andrade et al.² observaram incorporação de CUR em *C. albicans* após incubações de 5 e 20 min utilizando microscopia confocal a laser. Na presente investigação, *S. mutans* não incorporou CUR livre apesar disso a CUR livre promoveu fotoinativação da bactéria, sugere-se que essa fotoinativação foi promovida pela

geração de ROS a partir do FS ao redor do micro-organismo, por outro lado as formulações de CUR-NP aniônica e catiônica foram incorporadas pelo micro-organismo.. Enquanto, SARM mostrou fluorescência tanto com as CUR-NP (aniônica e catiônica) como com a CUR livre. Estes resultados são similares ao estudo feito por Tyagi et al¹²⁴., que observaram a incorporação de CUR livre em *S. aureus*. O mecanismo de incorporação da CUR em nanopartículas dentro da bactéria é a fixação do FS na parede bacteriana, seguida do rompimento da camada de peptidoglicano e finalmente a penetração do FS dentro do micro-organismo^{10,85}.

Pela primeira vez foi feito o encapsulamento de CUR em NP poliméricas utilizando PLA como polímero e dextrana em água ultra-pura estéril como fase aquosa associadas com o método de nanoprecipitação. Nesta pesquisa alguns testes de caracterização das CUR-NP e NP foram realizados por métodos indiretos. No entanto são necessários métodos realizar esses testes através de estudos diretos e de maior precisão como HPLC.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa foi possível concluir:

1. CUR encapsulada em NP aniônicas e catiônicas apresentaram propriedades fotofísicas estáveis.
2. Nas culturas plactônicas a CUR livre apresentou resultados superiores em relação à CUR-NP aniônica, ao passo que a CUR-NP catiônica demonstrou inativação microbiana.
3. aPDT mediada pela CUR livre diminui a viabilidade dos micro-organismos componentes do biofilme; a CUR-NP aniônica não apresentou atividade fotodinâmica no biofilme misto, ao passo que as CUR-NP e NP catiônicas demonstraram ação antimicrobiana mesmo na ausência de luz.

REFERÊNCIAS *

1. Abe S, Ishihara K, Okuda K. Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care. *Arch Gerontol Geriatr*. 2001; 32(1): 45-55.
2. Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, Pavarina AC. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol*. 2012; 58(2): 200-10.
3. Anitha A, Deepagan VG, Rani VVD, Menon D, Nair SV, Jayakumar R, Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym*. 2011; 84 (3): 1158–64
4. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg*. 2012; 30(7): 393-9.
5. Arunraj TR, Rejinold NS, Mangalattilham S, Saroj S, Biswas R, Jayakumar R. Synthesis, characterization and biological activities of Curcumin nanospheres. *J Biomed Nanotechnol*. 2014; 10(2):238–50.
6. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 1(10): E27-39.
7. Baltazar LM, Krausz AE, Souza ACO, Adler BL, Landriscina A, Musaev T, et al. *Trichophyton rubrum* is inhibited by free and nanoparticle encapsulated Curcumin by induction of nitrosative stress after photodynamic activation. *PLoS ONE*. 2015; 10(3): e0120179.
8. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci*. 2004; 1(9): 1267-77.

* 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>

9. Barnabé W, de Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. J Oral Rehabil 2004; 31(5): 453–9.
10. Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. J Agric Food Chem. 2011; 59(6): 2056-61.
11. Biel MA, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Wedell E, Loebel N, et al. Reduction of endotracheal tube Biofilms using antimicrobial photodynamic therapy. Lasers Surg Med. 2011; 43(7): 586-90.
12. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9(7): 327-35.
13. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, Monk BC. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. Microbiology. 2007; 153(Pt 10): 3211-7.
14. Carlson E. Effect of strain of *Staphylococcus aureus* on synergism with *Candida albicans* resulting in mouse mortality and morbidity. Infect Immun. 1983; 42(1): 285-92.
15. 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.
16. 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.
17. Chadwick PR. Revised UK guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals. Int J Antimicrob Agents. 1999; 11(2):89-91.
18. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of *candida* biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001; 80(3): 903-8.
19. Chen CP, Chen CT, Tsai T. Chitosan nanoparticles for antimicrobial photodynamic inactivation: characterization and in vitro investigation. Photochem Photobiol. 2012; 88(3): 570-6.

20. Chen Y, Lin J, Fei Y, Wang H, Gao W. Preparation and characterization of electrospinning PLA/Curcumin composite membranes. *Fibers Polym.* 2010; 11(8): 1128-31
21. Chereddy KK, Coco R, Memvanga PB, Ucakar B, des Rieux A, Vandermeulen G, et al. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *J Control Release.* 2013; 171(2):208-15.
22. Ciorba V, Odone A, Veronesi L, Pasquarella C, Signorelli C. Antibiotic resistance as a major public health concern: epidemiology and economic impact. *Annali di igiene: medicina preventiva e di comunita.* 2015; 27(3):562-79.
23. Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, Mylonakis E. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol.* 2010 Mar; 5(3): 321-32.
24. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2003; 36(1):53-9.
25. Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 114(1): 67-74.
26. Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame M Jr, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(11):1299-305.
27. 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.
28. 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.
29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318-22.

30. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(6):2329-35.
31. 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.
32. Donnelly RF, Cassidy CM, Loughlin RG, Brown A, Tunney MM, Jenkins MG, et al. Delivery of Methylene Blue and meso-tetra (N-methyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate from cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogels: a potential means of photodynamic therapy of infected wounds. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 96(3): 223-31.
33. 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 muco adhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B*. 2007; 86(1): 59-69.
34. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163(1): 1-12.
35. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine(®). *Biofouling*. 2013; 29(9):1057-67.
36. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9): 927-34.
37. 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.
38. 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.
39. Fattani MA, Douglas LJ, Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 999–1008.

40. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82:1968-81.
41. 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*. 2013; 29 (3): 949-55.
42. 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
43. Ghalandarlaki N, Alizadeh AM, Ashkani-Esfahani S. Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy review article. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: ID 394264
44. 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
45. Gonzales FP, Felgenträger A, Bäuml 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.
46. Grinholc M, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski KP. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J Photochem Photobiol B*. 2008; 90(1): 57-63.
47. Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE. Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health* 2016; 32(2) :246-50.
48. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labishinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J. Antimicrob Chemoter*. 1998; 42(2):199-209.

49. 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.
50. 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.
51. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin--effect of selected nanocarrier: studies on curcumin and curcuminoides XLVII. Eur J Pharm Sci. 2012;47(1):65-74.
52. Hegge AB, Nielsen TT, Larsen KL, Bruzell E, Tønnesen HH. Impact of curcumin supersaturation in antibacterial photodynamic therapy--effect of cyclodextrintype and amount: studies on curcumin and curcuminoides XLV. J Pharm Sci. 2012; 101(4):1524-37.
53. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. J Dent Res. 2009; 88(11): 982-90.
54. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. Lancet. 2015; 387(10014): 176-87.
55. Honma K, Tawara Y, Okuda K. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human saliva and on denture surfaces. Bull Tokyo Dent Coll. 1994; 35(4):217-20.
56. Hu P, Huang P, Chen MW. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. Arch Oral Biol. 2013; 58(10): 1343–8.
57. Junqueira JC, Jorge AOC, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Costa ACBP, et al. Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis(phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). Lasers Med Sci. 2012; 27(6): 1205-12
58. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. J Dent Res. 2010; 89(3): 205-18.

59. 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.
60. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 59(4): 401–6.
61. 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.
62. Koukos G, Sakellari D, Arsenakis M, Tsalikis L, Slini T, Konstantinidis A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(9):1410-5.
63. 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.
64. Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(10): 788-90.
65. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Review biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 75(1):1–18
66. Lee YH, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit. *Int J Oral Sci.* 2012; 4(4): 196-201.
67. Lemos JA, Quivey RG Jr, Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology.* 2013; 159(3): 436-45.
68. Leung V, Dufour D, Lévesque CM. Death and survival in *Streptococcus mutans*: differing outcomes of a quorum-sensing signaling peptide. *Front Microbiol.* 2015; 23(6): 1176.
69. Li X, Guo H, Tian Q, Zheng G, Hu Y, Fu Y, Tan H. Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on antibiotic-resistant staphylococcal biofilm: an in vitro study. *J Surg Res.* 2013; 184(2): 1013-21.
70. Lima AM, Pizzol CD, Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB, Andrade GP, Ribeiro AO, et al. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. *J Photochem Photobiol B.* 2013; 125:146-54.

71. Lima JP, Sampaio de Melo MA, Borges FM, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre Dos Santos M, et al. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci.* 2009; 117(5): 568-74.
72. 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.
73. Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(7): 588-96.
74. 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.
75. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wöhrle D, Dimitrov R, Popova E, Dimitrov S. 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.
76. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Borisova E., Avramov L, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15: 4829–35.
77. Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV, Sabino AA, de Fátima A, de Resende MA. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(2):337-9.
78. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(1): 190-2.
79. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): e1003616
80. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. 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.
81. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(12):827-33.

82. 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.
83. 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.
84. Mukerjee A, Vishwanatha JK. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Res.* 2009; 29 (10): 3867-75
85. Mun SH, Kim SB, Kong R, Choi JC, Kim YC, Shin DW, et al. Curcumin reverse Methicillin esistance in *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* 2014; 19(11): 18283-95.
86. Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci.* 2008; 101(2): 239-53.
87. 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.
88. National Nosocomial Infections Surveillance System report: data summary from January 1990-May 1999. *Am J Infect Control.* 1999; 27(6):520-32.
89. Palmer GD, Robinson PG, Challacombe SJ, Birnbaum W, Croser D, Erridge PL, et al. An etiological factors for oral manifestations of HIV. *Oral Dis.* 1996; 2(3): 193-7.
90. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10(3): 313–19
91. Pereira CA, Costa AC, Carreira CM, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(3): 859-64.
92. Pereira CA, Romeiro RL, Costa ACBP, Machado AKS, Junqueira JC, Jorge AOC. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(3): 341–8.

93. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. Arch Oral Biol. 2008; 53(8): 755-64.
94. Peters BM, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms. Immunol Med Microbiol 2010; 59: 493-503.
95. Pinke KH, Freitas P, Viera NA, Honório HM, Porto VC, Lara VS. Decreased production of proinflammatory cytokines by monocytes from individuals presenting *Candida*-associated denture stomatitis. Cytokine. 2016; 77:145-51.
96. Quishida CCC, Carmello JC, Mima EGO, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. Lasers Med Sci 2015; 30(2): 685-94
97. Quishida CCC, Mima EGO, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. Lasers Med Sci 2015; 31(5):997-1009.
98. Ramalingan N, Natarajan TS, Rajiv S. Preparation and characterization of electrospun curcumin loaded poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanofiber—A biomaterial formultidrug resistant organisms. J Biomed Mater Res. 2015; 103(1): 16–24.
99. Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, Costa CA. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. Lasers Med Sci. 2013; 28(2):391-8.
100. Ribeiro APD, Andrade MC, Bagnato VS, Vergani CE, Primo FL, Tedesco AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. Lasers Med Sci. 2015; 30(2): 549-59
101. Ribeiro APD, Andrade MC, da Silva JF, 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. 2012; 89: 111.
102. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. Photodynamic disinfection of complete dentures. Lasers Med Sci. 2012; 27(1):161-8.

103. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Palomari Spolidorio DM, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. *J Dent*. 2009; 37(9): 666-72.
104. Rossi T, Peltonen R, Laine J, Eerola E, Vuopio-Varkila J, Kotilainen P. Eradication of the long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients wearing dentures: a follow-up of 10 patients. *J Hosp Infect*. 1996; 34(4): 311-20.
105. Salton MRJ, Horne RW, Cosslett VE. Electron Microscopy of Bacteria treated with Cetyltrimethylammonium Bromide. *J gen Microbial*. 1951; 5: 405-7
106. Samaranayake LP, Macfarlane TW. Oral candidosis. London: Wright; 1990. 265 p.
107. Samaranayake LP. Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol*. 1986; 15(2): 61-5.
108. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, Vergani CE. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 111(6): 726-33.
109. Schneider M, Kirfel G, Berthold M, Frentzen M, Krause F, Braun A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(3): 615-20.
110. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuit rygoverning fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75(2):213-67
111. Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(1): 299-305.
112. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2009; 299(1): 1-8.
113. Silva TC, Pereira AF, Exterkate RA, Bagnato VS, Buzalaf MA, Machado MA, et al. Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model. *J Dent*. 2012; 40(1): 41-7.

114. Simor AE, Phillips E, McGeer A, Konvalinka A, Loeb M, Devlin HR, Kiss A. Randomized controlled trial of chlorhexidine gluconate for washing, intranasal mupirocin, and rifampin and doxycycline versus no treatment for the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. Clin Infect Dis. 2007; 44 (2):178-85.
115. Smith AJ, Brewer A, Kirkpatrick P, Jackson MS, Young J, Watson S, Thakker B. Staphylococcal species in the oral cavity from patients in a regional burns unit. J Hosp Infect. 2003; 55(3): 184-9.
116. Song J, Choi B, Jin E.-J, Yoon Y, Choi K.-H. Curcumin suppresses *Streptococcus mutans* adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix proteins. Eur J Clin Microbiol Infec Dis. 2012; 31(6): 1347-52.
117. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. Periodontol 2000. 2011; 55(1): 143-66.
118. Sun M, Su X, Ding B, He X, Liu X, Yu A, et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. Nanomedicine (Lond). 2012; 7(7):1085-100.
119. Susewind S, Lang R, Hahnel S. Biofilm formation and *Candida albicans* morphology on the surface of denture base materials. Mycoses. 2015; 58(12): 719-29.
120. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 93(2):155-60.
121. Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LK, Saxena D, Duarte S, Zanin IC. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. Caries Res. 2012; 46(6): 549-54.
122. Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, Kerr CK, Dominguez BL, Loesche WJ. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. J Am Geriatr Soc. 2001; 49(5):557-63.
123. Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009; 52(6): 467-75.
124. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of Curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. PLoS ONE 2015; 10(3): 0121313.

125. Udornpornmongkol P and Chiang BH, Curcumin-loaded polymeric nanoparticles for enhanced anti-colorectal cancer applications. *J Biomater Appl.* 2015;30 (5):1–10.
126. Vrignaud S, Benoit JP, Saulnier P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials.* 2011; 32(33): 8593-604.
127. 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.
128. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(4): 680-4.
129. 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.
130. Ye Y, Li Y, Fang F. Upconversion nanoparticles conjugated with curcumin as a photosensitizer to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in lung under near infrared light. *Int J Nanomedicine.* 2013; 9: 5157-65.
131. Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(2): 324-30.
132. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001; 144(2):274-8.
133. Zorofchian SM, Kadir HA. Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zand K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of Curcumin. *BioMed Res Int.* 2014; 2014: ID186864.
134. 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(928): 982-92

Não autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho até junho de 2018

(Direitos de publicação reservados ao autor).

Araraquara, 24 de junho de 2016.

JEFFERSSON KRISHAN TRIGO GUTIERREZ