



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

KAMMILA MARTINS NICOLAU COSTA

**MICELAS CONTENDO CURCUMINA DISPERSAS EM SISTEMAS HÍBRIDOS
PARA TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**CAMPINA GRANDE
2019**

KAMMILA MARTINS NICOLAU COSTA

**MICELAS CONTENDO CURCUMINA DISPERSAS EM SISTEMAS HÍBRIDOS
PARA TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Farmácia

Orientador: Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior.

**CAMPINA GRANDE
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C837m Costa, Kammila Martins Nicolau.
Micelas contendo curcumina dispersas em sistemas híbridos para tratamento da candidíase vulvovaginal [manuscrito] / Kammila Martins Nicolau Costa. - 2019.
38 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Candida albicans. 2. Candidíase vulvovaginal. 3. Sistemas Dispersos Nanoestruturados. 4. Terapias alternativas. I. Título
21. ed. CDD 615.1

KAMMILA MARTINS NICOLAU COSTA

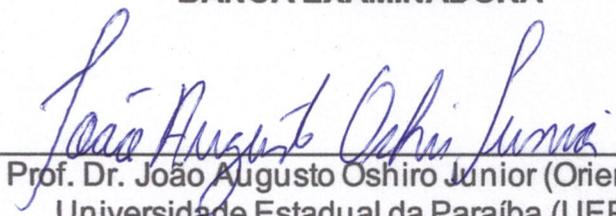
MICELAS CONTENDO CURCUMINA DISPERSAS EM SISTEMAS HÍBRIDOS PARA
TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento do Curso de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

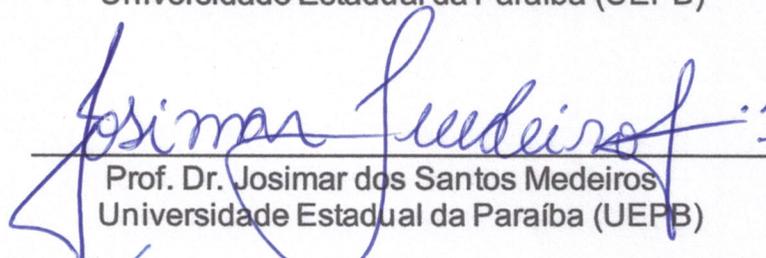
Área de concentração: Farmácia

Aprovada em: 04/12/2019.

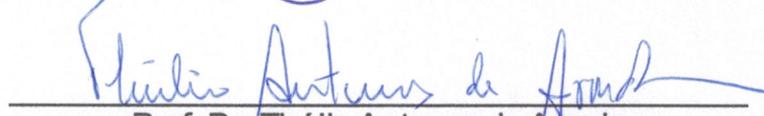
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Josimar dos Santos Medeiros
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Thúlio Antunes de Arruda
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por se fazer presente por meio de minha fé em todos os momentos de minha existência.

Aos meus pais Anabel e Josenildo e meu irmão Rennê, por me apoiarem em cada e toda decisão que tomei, por me doarem forças quando tudo parecia impossível e por me proporcionar esperança em cada dia compartilhado. Tudo isso foi por vocês.

Agradeço ao meu namorado Weber, pelas palavras de suporte e pela garantia de que tudo ia dar certo. Aos meus amigos de infância que sempre acreditaram que eu poderia realizar meus sonhos e comemoraram cada vitória junto comigo.

Serei eternamente grata aos meus amigos de curso Jamilly, Vinicius, Geórgia, Dennyse, Paloma, Joilly, Ivana, Beatriz, Karoline, Natália, Angélica, aqueles que conviveram comigo por cinco longos anos e que tornaram meus dias mais leves e com certeza mais felizes. Obrigada por estarem comigo em cada aula, prova e trabalho. Obrigada por não medirem esforços para me ajudar.

Gostaria de expressar minha gratidão ao Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) por me acolher desde meu primeiro ano de curso, me proporcionando uma grande carga de aprendizado que levarei para a minha vida, além de me apresentar pessoas maravilhosas que tive a honra de conviver.

Ao meu orientador João Augusto Oshiro Junior, meu muito obrigada por esta oportunidade, obrigada por me aceitar como aluna, por todo o aprendizado, apoio, amizade e paciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela contribuição financeira por meio do programa PIBIC/CNPq-UEPB.

Obrigada a todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste sonho.

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é um processo infeccioso que atinge o trato geniturinário inferior feminino e atinge aproximadamente 75% das mulheres no mundo. No tratamento de escolha emprega-se anfotericina B e azólicos. Contudo, esses medicamentos apresentam prolongado tempo de tratamento, hepatotoxicidade e resistência medicamentosa. A terapia fotodinâmica é baseada no princípio de que um fotossensibilizador (FS) liga-se à célula alvo e é ativado por uma luz com comprimento de onda específico, formando espécies reativas de oxigênio que são lesivas às células e bactérias. A curcumina (CUR) vem sendo utilizada como FS, além de possuir atividades anti-fúngica e anti-bacteriana. Porém, sua característica hidrofóbica afeta sua capacidade farmacocinética e farmacodinâmica. As micelas são excelentes sistemas para incorporação da CUR; entretanto, apresentam-se fluidas, ocasionando dispersão rápida quando administradas na vagina. Logo, a dispersão em sistemas híbridos pode contornar essa desvantagem. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de micelas dispersas em matrizes híbridas para futura administração vaginal da CUR no tratamento da CVV. A caracterização físico-química desses materiais foi realizada por técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), determinação da curva de calibração e perfil da curva de liberação. Os resultados de DLS e MEV revelaram que as micelas com ou sem CUR têm tamanho de 35nm. Os resultados de eficiência de encapsulação demonstram que para as micelas contendo 0,1, 0,5, 1 e 3% foram de $96,2 \pm 3,5$, $86,4 \pm 5,7$, $62,9 \pm 2,2$ e $20,2 \pm 0,7\%$, respectivamente. Contudo, quando disperso no sistema híbrido foi observado 100%, confirmado pelo DRX. Os resultados de liberação mostram que a CUR pura atingiu 100% de liberação em torno de 15 minutos. O material híbrido com CUR e material híbrido com micela e CUR apresentaram outro perfil, a liberação ocorre de forma controlada e prolongada, liberando após 10 dias cerca de 70% da CUR. Esses resultados demonstram o potencial do sistema em ser um tratamento multidosado baseado em uma única aplicação, o que sugere maior taxa de adesão e menor índice de desistência pelo usuário, além de proporcionar a formulação de diversas formas farmacêuticas como óvulos e anéis vaginais, se adaptando às necessidades do paciente.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Inovação Tecnológica. Sistemas Dispersos Nanoestruturados.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (CVV) is an infectious process that affects the female lower genitourinary tract and affects approximately 75% of women worldwide. The treatment of choice employs amphotericin B and azoles. However, these drugs have prolonged treatment time, hepatotoxicity and drug resistance. Photodynamic therapy is based on the principle that a photosensitizer (FS) binds to the target cell and is activated by light of a specific wavelength, forming reactive oxygen species that are harmful to cells and bacteria. Curcumin (CUR) has been used as FS, besides having antifungal and antibacterial activities, but its hydrophobic characteristic affects its pharmacokinetic and pharmacodynamic capacity. Micelles are excellent systems for incorporating CUR; however, they are fluid, causing rapid dispersion when administered to the vagina. Thus, dispersion in hybrid systems can overcome this disadvantage. Thus, the objective of this work was the development and characterization of dispersed micelles in hybrid matrices for future vaginal administration of CUR in the treatment of CVV. The physicochemical characterization of these materials was performed by dynamics light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), determination of calibration curve and release curve profile. DLS and SEM results revealed that micelles with or without CUR are 35nm in size. The encapsulation efficiency results show that for micelles containing 0.1, 0.5, 1 and 3% were 96.2 ± 3.5 , 86.4 ± 5.7 , 62.9 ± 2.2 and $20.2 \pm 0.7\%$, respectively. However when dispersed in the hybrid system was observed 100%, confirmed by XRD. The release results show that pure CUR reached 100% release within 15 minutes. The hybrid material with CUR and hybrid material with micelle and CUR presented another profile, the release occurs in a controlled and prolonged way, releasing after 10 days about 70% of the CUR. These results demonstrate the potential of the system to be a multi-dose treatment based on a single application, which suggests higher adhesion rate and lower dropout by the user, as well as providing the formulation of various pharmaceutical forms such as ova and vaginal rings adapting to the patient's needs.

Keywords: *Candida albicans*. Technologic Innovation. Nanostructured Dispersed Systems.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Gráfico de distribuição de partículas obtido utilizando a técnica de DLS para a medição da faixa de tamanho das micelas contendo CUR em diferentes concentrações..... | 21 |
| Figura 2 - Fotomicroscopia das micelas, (a) micela sem CUR e (b) micela com CUR, aumento 100.000x..... | 21 |
| Figura 3 - Curva analítica da CUR em tampão acetato de pH 4,0 | 22 |
| Figura 4 - Gráfico de resíduos..... | 23 |
| Figura 5 - Material híbrido do tipo ureasil-poliéter (U-PEO 500) pura (a) com CUR (b) e com micela CUR proporção de 3% (c) | 24 |
| Figura 6 - Padrões de DRX das amostras: (a) material híbrido puro, (b) material híbrido + CUR, (c) material híbrido + micela pura, (d) material híbrido + micela + CUR, (e) CUR pura, (f) micela pura e (g) CUR + micela | 25 |
| Figura 7 - Liberação da CUR presente em um material híbrido do tipo ureasil-poliéter em função do tempo..... | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| ATCC | Cepas de referência da American Type Culture Collection |
| BEC | Células do Epitélio Bucal |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CMC | Concentração Micelar Crítica |
| CUR | Curcumina |
| CUR/CTAB | Solução Curcumina/Brometo de Cetil-trimetilamônio (cetrimida) |
| CUR/SAL | Solução estoque de Curcumina com Solução Salina |
| CVV | Candidíase Vulvovaginal |
| CVVR | Candidíase Vulvovaginal Recorrente |
| d.nm | Diâmetro Hidrodinâmico Médio |
| DLS | Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DRX | Difração de Raios X |
| EE% | Eficiência de Encapsulação |
| FS | Fotossensibilizador |
| HCl 2M | Ácido Clorídrico |
| IsoTrEOS | 3-Isocianatopropiltrietoxisilano |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MEV-FEG | Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução |
| NPs | Nanopartículas |
| PEO | Poliéter |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PIT | Tempo de Pré-irradiação |
| R | Coeficiente de Correlação |
| TFD | Terapia Fotodinâmica |
| U-PEO | Ureasil-Poliéter |

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 11 |
| 2.1 | <i>Candidíase Vulvovaginal (CVV)</i> | 11 |
| 2.2 | <i>Terapias Alternativas</i> | 12 |
| 2.3 | <i>Sistemas Dispersos Nanoestruturados</i> | 14 |
| 3 | METODOLOGIA..... | 16 |
| 3.1 | <i>Preparação das micelas poliméricas</i> | 16 |
| 3.2 | <i>Caracterização físico-química das micelas sem e com CUR</i> | 16 |
| 3.3 | <i>Preparação dos materiais híbridos ureasil-poliéter</i> | 17 |
| 3.4 | <i>Difração de raio X (DRX)</i> | 18 |
| 3.5 | <i>Ensaio de liberação in vitro</i> | 18 |
| 4 | RESULTADOS..... | 19 |
| 4.1 | <i>Preparação das micelas poliméricas com e sem CUR</i> | 19 |
| 4.2 | <i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm) das micelas com e sem CUR</i> | 19 |
| 4.3 | <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> | 20 |
| 4.4 | <i>Curva analítica e eficiências de encapsulação (EE)</i> | 21 |
| 4.5 | <i>Obtenção dos sistemas híbridos do tipo ureasil-poliéter</i> | 22 |
| 4.6 | <i>Difração de raios X</i> | 23 |
| 4.7 | <i>Ensaio de liberação in vitro</i> | 25 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 27 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 29 |
| | REFERÊNCIAS..... | 30 |

1 INTRODUÇÃO

Segundo Furtado *et al.* (2018), a Candidíase Vulvovaginal (CVV) é conceituada como uma infecção da vulva e da vagina, com ocorrências de prurido vulvar intenso, leucorreia, dispareunia, disúria, edema e eritema vulvovaginal, sendo prurido o sintoma mais importante quando a CVV é comparada a vulvovaginites de outra etiologia.

A CVV atinge aproximadamente 75% das mulheres no mundo ao menos uma vez durante a vida, sendo que 50% tem um quadro de recidiva no prazo de um ano. As leveduras do gênero *Candida*, principalmente a espécie *Candida albicans* é considerada o principal fungo causador da CVV (cerca de 85%) (GERALD *et al.*, 2017; SARDI *et al.*, 2013).

C. albicans possui morfologia extremamente versátil (esférica, ovóide ou alongada, de aspecto liso ou rugoso), seu crescimento é favorecido a temperaturas entre 20 e 38 °C e em pH de 2,5 até 7,5, podendo estar presente no meio vaginal sem causar qualquer dano. Porém quando em associação a fatores predisponentes é capaz de invadir tecidos a infecção (GLORY *et al.*, 2017; HIRAKAWA *et al.*, 2015; WILLEMS *et al.*, 2018).

O tratamento de escolha para a CVV emprega o uso de diversos antifúngicos, dentre eles os fármacos anfotericina B, nistatina e azólicos que representa a classe com maior número de substâncias ativas, tais como fluconazol, cetoconazol, butaconazol, itraconazol e miconazol, comumente utilizados sob a forma de suspensão, aplicada topicamente sobre a lesão ou ainda sob a forma de comprimidos e pomadas (COSTA *et al.*, 2018).

Contudo, esses fármacos apresentam prolongado tempo de tratamento, hepatotoxicidade e interações medicamentosas, que podem agravar a situação. Além disso, estudos demonstraram que a organização dos micro-organismos em biofilme promove diminuição considerável na susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, dificultando a ação das drogas e aumentando a resistência aos diferentes fármacos citados (DAVIES, 2003).

Nesse contexto, as pesquisas inovadoras estão direcionadas na concepção de desenvolver tratamentos alternativos, dentre eles o uso da Terapia fotodinâmica (TFD) (CAMPOS *et al.*, 2015; CIEPLIK *et al.*, 2014; SANTEZI *et al.*, 2018).

A TFD é baseada no princípio de que um fotossensibilizador liga-se à célula alvo e é ativado por uma luz com comprimento de onda específico. Nesta reação, ocorre a formação de oxigênio singleto e radicais livres, que são extremamente tóxicos para células e bactérias, podendo levar à morte celular ou destruição dos tecidos por necrose ou apoptose, sem causar danos ao hospedeiro. A terapia fotodinâmica, além de eliminar bactérias, tem ação também sobre fungos, vírus e protozoários (KIKUCHI *et al.*, 2015; MAISCH, 2007).

A curcumina (CUR), corante natural derivado da *Curcuma longa*, apresenta atividade antifúngica e antibacteriana e vem sendo estudada como agente fotossensibilizador na TFD. Além disso, autores têm proposto que a curcumina auxilia a imunomodulação da resposta inflamatória do hospedeiro, podendo atuar tanto na resposta celular quanto humoral do mesmo, auxiliando o processo cicatricial (ALMEIDA *et al.*, 2007; JAGETIA *et al.*, 2007; KAMINAGA *et al.*, 2003).

Contudo, a CUR é um composto considerado hidrofóbico e pode sofrer rápida degradação na presença de luz e em meio aquoso. Devido aos efeitos tóxicos apresentados pelos solventes orgânicos, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO), pesquisas têm sido desenvolvidas para encontrar a melhor forma de diluição da CUR em solução aquosa, com solubilidade e estabilidade aceitáveis (SHAIKH *et al.*, 2009; TONNESEN *et al.*, 2002).

Assim, uma variedade de sistemas nanoestruturados para liberação controlada têm sido desenvolvidos para melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e eficácia terapêutica da CUR (LIU *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017; YALLAPU *et al.*, 2012; SARI *et al.*, 2015).

Dentre os sistemas nanoestruturados, as micelas são partículas de tamanho coloidal (10–100 nm), compostas por um polímero de característica anfifílica. Quando tais polímeros são incorporados em água, a partir de uma certa concentração, chamada de concentração micelar crítica (CMC), passam a se agregar em esferas, onde todas as extremidades hidrofílicas se voltam para fora criando um ambiente hidrofóbico no interior que interage com substâncias ativas, como a curcumina, por ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas possibilitando sua encapsulação, melhorando solubilidade (CABRAL; KATAOKA, 2014; TALELLI *et al.*, 2015).

Em virtude das vantagens mencionadas, as micelas são excelentes sistemas para incorporação e liberação controlada da CUR. Entretanto, as micelas apresentam-

se muito fluidas, com caráter líquido, podendo ocasionar uma dispersão rápida quando administradas na vagina. Logo, a dispersão em materiais híbridos do tipo ureasil-poliéster pode ser uma atraente ferramenta para contornar essa limitação.

Estes materiais híbridos combinam sinergicamente as características físico-químicas dos seus componentes, permitindo propriedades únicas, tornando esta classe de materiais excelente para o desenvolvimento de novos sistemas multifuncionais com amplas aplicações. A fase orgânica fornece propriedades físicas ou químicas específicas (ópticas, elétricas, reatividade), enquanto que a fase inorgânica aumenta a resistência mecânica, a estabilidade térmica e permite modular o índice de refração. Além disso, as propriedades reológicas favorecem o processamento do material final com a possibilidade de variar formatos e tamanhos (OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2015; OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2016 a).

Tais sistemas são interessantes em virtude da facilidade de preparação, pela possibilidade de otimização do tempo de contato da formulação final com a mucosa vaginal (OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2015).

Portanto, tendo como base o panorama exposto, sugere-se que micelas contendo CUR dispersas em sistemas híbridos do tipo ureasil-poliéster associados a terapia fotodinâmica possam oferecer uma promissora e inédita ferramenta nanobiotecnológica visando o tratamento da CVV.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Candidíase vulvovaginal (CVV)

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica comum causada por espécies de *Candida*, predominantemente *C. albicans*. Relatos históricos estimam que aproximadamente 70% de todas as mulheres terão pelo menos um episódio de CVV durante seus anos reprodutivos. A marca patológica da doença é uma condição inflamatória aguda da vulva e da mucosa vaginal, induzida e acompanhada de crescimento excessivo de organismos *Candida* que normalmente existe como um comensal vaginal quieto (YANO *et al.*, 2019).

C. albicans é o patógeno humano fúngico mais comum causando doenças que variam de mucosa superficial a infecções sistêmicas que ameaçam a vida. Esse patógeno oportunista faz parte da micoflora humana comensal que coloniza de forma assintomática muitas áreas do corpo humano, onde sua proliferação é controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro. No entanto, sob condições de supressão imunológica ou qualquer perturbação no ambiente hospedeiro, pode passar rapidamente para um patógeno, causando uma variedade de infecções (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

Segundo YANO *et al.* (2019), acredita-se que o início da maioria dos casos de CVV esteja associado a uma ampla gama de fatores predisponentes ou eventos desencadeantes, incluindo o uso de antibióticos, níveis aumentados de estrogênio (por exemplo, contraceptivos orais com altas taxas de estrogênio, terapias de reposição hormonal, gravidez), diabetes mellitus não controlado, atividades sexuais e roupas justas. Além disso, estima-se que 8 a 10% das mulheres são suscetíveis à CVV recorrente (CVVR), com 4 ou mais episódios por ano. Múltiplas infecções recorrentes geralmente são idiopáticas, sem levar em consideração a variedade de fatores de risco em potencial. Diferentemente da maioria dos CVVs episódicos ou esporádicos, os casos de CVVR requerem regimes de manutenção com o uso prolongado de antifúngicos por vários meses para evitar a recorrência.

Os sintomas cardinais incluem prurido vulvovaginal, irritação, dor, dispareunia e corrimento vaginal. Os sinais clínicos são melhor exemplificados por eritema vulvar, edema, escoriação e formação de fissuras, juntamente com eritema introital e vaginal. Uma secreção branca irregular e não-odorífera é sugestiva de CVV, mas é

extremamente inespecífica. O diagnóstico nunca deve se basear apenas nos achados clínicos, dada a falta de especificidade. A CVVR, em virtude das recorrentes e numerosas recorrências agudas ou cronicidade, tem um efeito profundo na qualidade de vida das mulheres afetadas com sintomas sistêmicos adicionais, incluindo depressão e ansiedade (SOBEL, 2016).

Existem várias classes de compostos que compõem o arsenal usado para tratar infecções por *Candida*. Os polienos, azóis, equinocandinas, análogos de nucleosídeos e alilaminas são usados com eficácia variável, dependendo do tipo e local da infecção e da sensibilidade das espécies de *Candida*. O antifúngico mais comumente prescrito usado para a maioria das infecções por *C. albicans* é o fluconazol, um membro da classe azol de antifúngicos. Os azóis inibem a 14- α -esterol desmetilase, codificada pelo gene ERG11, que é uma enzima envolvida na biossíntese da membrana específica do fungo esterol ergosterol. Além disso, muitos estudos documentaram a capacidade da *Candida* em desenvolver resistência de alto nível aos antifúngicos azólicos (WHALEY, *et al.*, 2017).

Estudos epidemiológicos revelam que quase todas as mulheres diagnosticadas com *C. albicans* resistentes ao fluconazol haviam experimentado considerável exposição prévia a este mecanismo. A confirmação do diagnóstico requer testes de sensibilidade laboratorial *in vitro* com determinação do teste de concentração inibitória mínima prontamente disponível. Uma vez confirmada, a resistência cruzada a outros azóis orais deve ser determinada, pois são necessárias alternativas de tratamento ao fluconazol. Se o cetoconazol e o itraconazol forem ativos, ou seja, sem resistência cruzada, um desses agentes sistêmicos orais poderá substituir o fluconazol. No caso de resistência cruzada ao azol, existem opções limitadas para terapia de manutenção. Nesse contexto, a indução e a terapia a longo prazo podem ser consideradas utilizando nistatina vaginal ou ácido bórico, com poucos dados publicados de eficácia (SOBEL, 2016).

2.2 Terapias alternativas

Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de microorganismos patogênicos é a Terapia Fotodinâmica (TFD). Essa técnica vem sendo desenvolvida para o tratamento de lesões cancerosas e aplicada com sucesso na oncologia com a promoção de danos irreversíveis às células neoplásicas. Recentemente, estudos têm

demonstrado o potencial da TFD na inativação microbiana, incluindo alguns tipos de vírus, bactérias e fungos (COLETTI, 2013).

A terapia fotodinâmica é uma modalidade que combina o uso de luz, oxigênio molecular (O₂) e fotossensibilizador (FS) para causar morte às células-alvo. É baseada no acúmulo específico de um agente fotossensibilizante em um tecido específico que, posteriormente, é ativado por luz de comprimento de onda que coincida com o espectro de absorção do FS, gerando oxigênio singlete e outras espécies reativas tóxicas a partir do oxigênio molecular, responsáveis pela injúria das células-alvo (SUZUKI, 2015).

As doses de luz e o tempo de pré-irradiação normalmente necessários para eliminação do microrganismo não provocam efeito térmico significativo nos tecidos saudáveis, o que também facilita a técnica, além de que as fontes de luz podem ser de baixo custo (luz-não coerente) e fácil acesso (SUZUKI, 2015).

Muitos autores se concentraram em procurar um FS que não causasse efeitos colaterais indesejáveis nas células saudáveis do hospedeiro e, para esse fim, os produtos naturais são um dos mais pesquisados. A curcumina (CUR) é um corante amarelo-laranja extraído da raiz da *Curcuma longa* L. e é comumente usado como tempero na culinária asiática tradicional. Estudos etnofarmacológicos demonstram que a CUR tem propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antifúngicas, antibacterianas e anticarcinogênicas (SANITA *et al.*, 2017).

Por séculos a CUR foi utilizada na medicina tradicional indiana, conhecida como *Ayurveda*, para tratar diversas enfermidades, como anorexia, reumatismo, doença de pele, dores no corpo, vermes intestinais, diarreia, desordens hepáticas, dispepsia, febre intermitente, tosse, coriza, inflamação, sinusite, amenorreia e constipação, bem como para várias condições respiratórias (MASSIMINO, 2016). Algumas das propriedades podem ser aprimoradas após a ativação da luz. Além disso, a fototoxicidade de CUR foi demonstrada contra sistemas bacterianos e *C. albicans* (SANITA *et al.*, 2017).

Apesar desses efeitos terapêuticos, o uso clínico da CUR é limitado devido à insolubilidade na água (hidrofobicidade), baixa estabilidade (hidrolítica, proteolítica e fotodegradação) e baixa biodisponibilidade. Portanto, os sistemas de administração de medicamentos foram investigados para superar essas desvantagens (SAKIMA *et al.*, 2018). Estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de curcumina

sugerem que a curcumina tem metabolismo rápido, o que tem sido apontado como a causa da baixa biodisponibilidade na circulação sistêmica (CODEVILLA *et al.*, 2015).

2.3 Sistemas Dispersos Nanoestruturados

No campo emergente da nanotecnologia farmacêutica, as nanopartículas prometem superar os desafios relacionados às respostas terapêuticas insatisfatórias dos chamados medicamentos antigos e aos principais problemas de desempenho relacionados à formulação dos compostos químicos introduzidos recentemente. Entre as diferentes formas de nanopartículas, micelas poliméricas têm recebido crescente atenção científica (MOVASSAGHIAN *et al.*, 2015).

Essa classe de carreadores de substâncias ativas oferece um conjunto claro de vantagens, incluindo a faixa de tamanho nanométrico (geralmente <100 nm) e a distribuição estreita de tamanhos. Outras características definidoras da micela polimérica incluem sua alta estabilidade estrutural estática e dinâmica, essencial para sua aplicação *in vivo*, sua capacidade de incorporar grandes quantidades de fármaco hidrofóbico em sua estrutura, mantendo sua solubilidade em água, proporcionando melhor biodisponibilidade para medicamentos pouco solúveis em água (MOVASSAGHIAN *et al.*, 2015).

A estrutura interna das micelas consiste em um núcleo central contendo os blocos hidrofóbicos cercados por uma concha feita dos blocos hidrofílicos inchados pela água. O tamanho típico das micelas de copolímero em bloco é de 30 a 60 nm. Esse tamanho medido por espalhamento dinâmico de luz inclui a espessura do invólucro hidrofílico inchado pela água; o tamanho do núcleo hidrofóbico é muito menor (CHEVALIER; BOLZINGER, 2019). Entretanto, como desvantagem, as micelas apresentam-se muito fluidas, podendo ocasionar uma dispersão mais rápida que o esperado quando administradas por via vaginal, logo, sua dispersão em um material mais estável para o meio mostra-se necessária.

Híbridos do tipo orgânico-inorgânico (chamados de ureasil-poliéter, com a sigla U-PEO) foram recentemente considerados como matrizes de suporte para a incorporação e liberação de moléculas bioativas. A reticulação das cadeias PEO permite a formação de uma rede insolúvel em água, evitando a erosão imprevisível do volume. Diferentes moléculas com usos médicos, como diclofenaco de sódio, dexametasona, pramoxina, sulfadiazina de prata e cisplatina, foram incorporadas com sucesso nos híbridos U-PEO e liberadas de maneira controlada. O perfil de

administração de medicamentos de tais materiais híbridos pode ser adaptado usando diferentes parâmetros, como o peso molecular e a natureza do poliéter utilizado (TRUFFAULT *et al.*, 2016).

Recentemente, foram estudados esses materiais ureasil-poliéter de diferentes pesos moleculares, com o objetivo de avaliar esses materiais como sistemas de administração de fármacos. Os resultados mostraram que a natureza química e o peso molecular dos precursores afetam as propriedades finais das matrizes. Além disso, esses fatores podem permitir a incorporação de quantidades maiores de fármacos e alterar seu perfil de liberação. O processo de liberação do fármaco utilizando essas matrizes ocorre por mecanismos de intumescimento seguidos de difusão após o contato com o meio receptor (OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2016).

Esses materiais são nanocompostos nos quais ocorre a interpenetração das duas fases em escala nanométrica. Quando as fases têm dimensões nanométricas (1 a 500 nm), exibem uma área de superfície alta, promovendo melhor dispersão na matriz polimérica. Esse fenômeno melhora as características físicas do compósito que dependem da homogeneidade do material (OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2016).

Para esse fim, os híbridos orgânico-inorgânicos são materiais úteis, uma vez que porções orgânicas e inorgânicas interagem covalentemente como blocos de construção em escala nanométrica, combinando as vantagens dos óxidos inorgânicos convencionais (estabilidade térmica, mecânica e estrutural) e polímeros orgânicos (funcionalidade específica e alta flexibilidade) (PALACIO *et al.*, 2018).

Estas características manifestam-se de forma interessante para o desenvolvimento de hidrogéis capazes de incorporar e liberar de forma controlada micelas contendo CUR, apresentando a vantagem de permitir a manipulação de diversas fórmulas farmacêuticas, de acordo com um material molde, como por exemplo óvulos ou anéis vaginais, visando o tratamento da CVV.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparação das micelas poliméricas

A metodologia utilizada para obtenção das micelas poliméricas foi baseada na técnica de evaporação de solvente ou “filme polimérico”, com adaptações. Primeiramente pesou-se 1,0 g Pluronic® F-127 (P127) e transferiu-se para um balão de fundo redondo de 50 ml. Esta quantidade foi solubilizada em 25 ml do solvente clorofórmio que foi evaporado com o auxílio de um rotaevaporador Ika® RV 8 por 10 min a 45 °C. A formulação do filme polimérico, reidratou-se com exatos 30 ml de água purificada e levou-se para o agitador magnético SL-92 SOLAB por 30 min com agitação de 700 rpm. A quantidade de 1,0 g do copolímero em 30 ml de água é baseada em sua concentração micelar crítica ($2,8 \times 10^{-6}$ M) (KABANOV *et al.*, 2003).

Na etapa de formação do filme polimérico foram adicionadas diferentes porcentagens (0,1, 0,5, 1 e 3%) da CUR em relação à massa do polímero, com o intuito de avaliar a concentração máxima de fármaco solubilizado nas micelas.

Após a incorporação da CUR nas micelas, a formulação foi levada ao homogeneizador ultrassônico UNIQUE® com o objetivo da obtenção das micelas em escala nanométrica.

3.2 Caracterização físico-química das micelas sem e com CUR

3.2.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (*d.nm*)

As análises dos tamanhos das partículas foram realizadas após o desenvolvimento das micelas, utilizando a técnica do espalhamento de luz do raio hidrodinâmico ou *dynamic light scattering* (DLS) das partículas em suspensão utilizando o equipamento Nanotracs (Nanotracs Wave Model MN401). As medidas foram realizadas em triplicata com temperatura de 25°C e as amostras foram diluídas na proporção 1:30 (v/v) em água destilada.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a confirmação do diâmetro médio das micelas, a técnica utilizada foi a microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento JEOL JSM-7500F. Posteriormente, uma gota do material foi disposta sobre suporte metálico e seco em temperatura ambiente por três dias em dessecador. O suporte foi então revestido com material condutor (carbono) e as fotomicrografias foram obtidas.

3.2.3 Curva analítica

A curva analítica foi determinada por meio do UV-Vis Espectrophotometer SHIMADZU UV-1900 utilizando o comprimento de onda de 426 nm. O meio empregado para a realização desta etapa foi composto de tampão acetato pH 4,0 (80%) como meio simulador do ambiente vaginal acrescido de tween 80 (15%) e etanol absoluto (5%) para garantir a condição Sink.

A partir de uma solução estoque, composta pelo meio acrescido e CUR na concentração de 100 µg/ml, foram preparadas diluições nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4, 6, e 10 µg/ml. As análises foram feitas em sextuplicata, com analistas diferentes, em dias alternados e analisadas no programa Excel.

3.2.4 Eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulamento das micelas contendo CUR foi realizada após estas serem centrifugadas a 5000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi retirado e quantificado UV-vis e a eficiência de encapsulamento (EE) foi determinada utilizando a equação da reta determinada a partir da curva analítica.

3.3 Preparação dos materiais híbridos ureasil-poliéter

Os precursores foram obtidos a partir da reação de um alcoóxido modificado 3-isocianatopropiltrietoxissilano (IsoTrEOS) e polímeros modificados (NH₂-POE-NH₂) com massas moleculares de 500 g/mol⁻¹. A mistura alcoóxido e polímero modificado foram mantidos sob refluxo em Etanol absoluto à temperatura de 80°C por 24 horas. Posteriormente, o solvente de síntese foi eliminado por aquecimento e pressão reduzida (OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2014).

Em seguida, as reações de hidrólise e condensação foram promovidas pela adição controlada de 0,750 g do precursor, 50µl de água purificada, 500µl de etanol e 100µl de um agente catalisador de caráter ácido (HCl 2M) e agitação de 700 rpm em agitador magnético por 1 min, levando à formação de um gel.

As micelas contendo as proporções citadas no item 2.1 foram incorporadas nesta etapa de hidrólise e condensação. Posteriormente, o material híbrido permaneceu em dessecador para secagem em temperatura ambiente (± 30 °C) por 72 h.

3.4 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas foram obtidos com o difratômetro de raios X modelo XRD 6000 (Shimadzu®), com varredura angular $5^\circ < 2\theta < 35^\circ$, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ - 2θ , utilizando radiação de Cu ($K\alpha_1$) com varredura no passo de 0,02 (2θ), com intervalo de 0,6 segundo para cada amostra.

3.5 Ensaio de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado utilizando três grupos: i) material híbrido com micela e CUR, ii) material híbrido com CUR e iii) CUR pura. Estes foram imersos separadamente em uma solução receptora composta por tampão acetato pH 4,0 acrescida de 15% de tween 80 e 5% de etanol absoluto e adicionado que estava contido em um béquer contendo 750 mL do mesmo, sob agitação em agitador

magnético SL-92 SOLAB de 100 rpm a 37 °C. Todo o sistema estava protegido da luz. Decorridos os intervalos de tempo pré-determinados (15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas) uma alíquota de 3,0 ml da solução era coletada e analisada no espectrofotômetro UV-vis, na faixa de comprimento de onda de 426 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

4 RESULTADOS

4.1 Preparação das micelas poliméricas com e sem CUR

As micelas com e sem CUR foram preparadas pelo método do filme polimérico que permite a incorporação de altas concentrações de retenção de substâncias ativas hidrofóbicas. Após essa etapa, o material foi hidratado e levado ao homogeneizador ultrassônico, método de alta energia que possibilita a obtenção de partículas de tamanho manométrico.

Conforme descrito na metodologia, diferentes porcentagens de CUR em relação a massa do polímero foram utilizadas. Visualmente, foi possível determinar que, quando a concentração de CUR está acima de 1%, este não se encontra totalmente disperso ou solubilizado nas micelas, observado por meio da formação de precipitados ou turvação da solução coloidal.

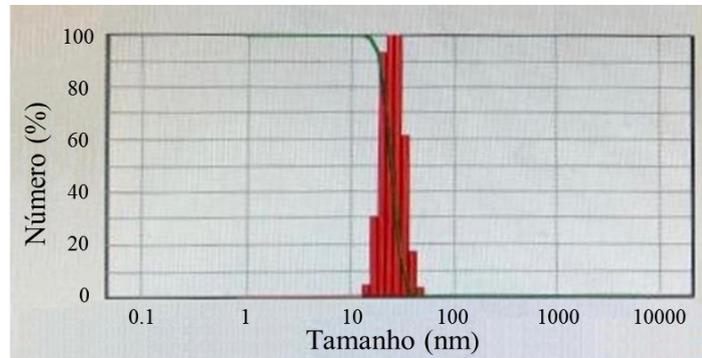
4.2 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm) das micelas com e sem CUR.

Powers *et al.* (2006) revisaram os diferentes métodos de caracterização de nanosistemas em solução e propuseram o espalhamento de luz dinâmico (DLS) como técnica adequada para analisar o tamanho de partícula, sendo utilizado desde 1975 como um método simples para avaliar a estabilidade (MURDOCK *et al.*, 2008).

Na figura 1 pode-se observar o gráfico de distribuição da micela com CUR.

Os resultados revelaram que a micela com CUR apresentou valores médios de tamanho entre 20 e 60 \pm 3,50 nm e com grande parte das partículas em 35 nm, o que entra em acordo com trabalhos realizado por Song *et al.* (2011), no qual sua equipe obteve resultados de DLS que mostraram que todas as micelas carregadas com curcumina eram pequenas (cerca de 30 nm) com uma distribuição de tamanho estreita, confirmando a eficiência do método utilizado para a obtenção das micelas puras e carregadas com CUR.

Figura 1 - Gráfico de distribuição de partículas obtido utilizando a técnica de DLS para a medição da faixa de tamanho das micelas contendo CUR em diferentes concentrações

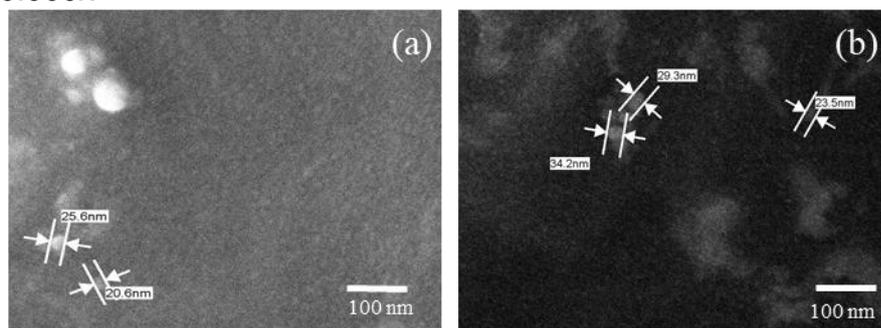


Fonte: Próprio autor, 2019

4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV é uma técnica utilizada para analisar o tamanho das partículas e morfologia das micelas. Assim, a figura 2 revela as fotomicroscopias da micela com e sem CUR.

Figura 2 - Fotomicroscopia das micelas, (a) micela sem CUR e (b) micela com CUR, aumento 100.000x



Fonte: Próprio autor, 2019

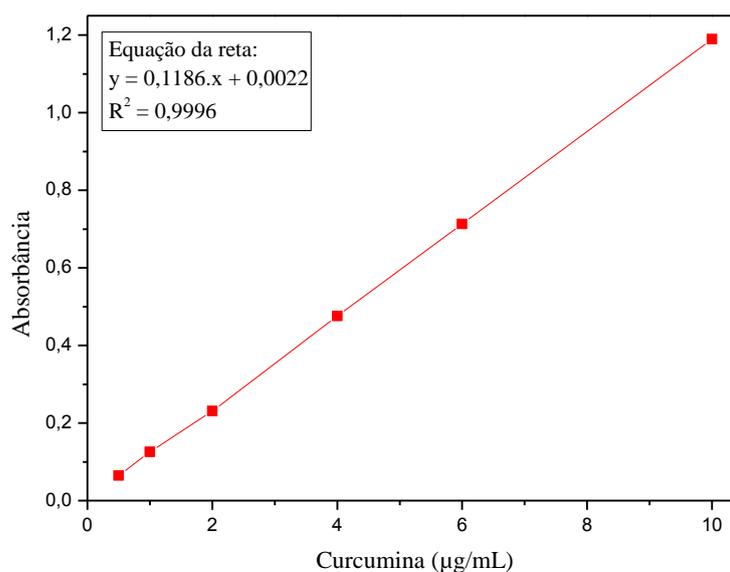
Os resultados de MEV revelam que a adição da CUR não ocasionou alteração drástica no tamanho e na morfologia da micela sem CUR. Os resultados demonstram micelas esféricas com tamanhos nanométricos entre 20 e 34 nm, resultados que

corroboram com os tamanhos encontrados no gráfico de distribuição de partículas do DLS (Figura 1).

4.4 Curva analítica e Eficiência de Encapsulação (EE)

A linearidade do método para quantificação da eficiência de encapsulação e liberação da CUR por espectroscopia na região do UV na faixa de absorvância de 426 nm foi determinada através da construção da curva analítica, utilizando uma faixa de concentração da CUR entre 0,5 e 10 µg/ml (Figura 3).

Figura 3 - Curva analítica da CUR em tampão acetato de pH 4,0



Fonte: Próprio autor, 2019

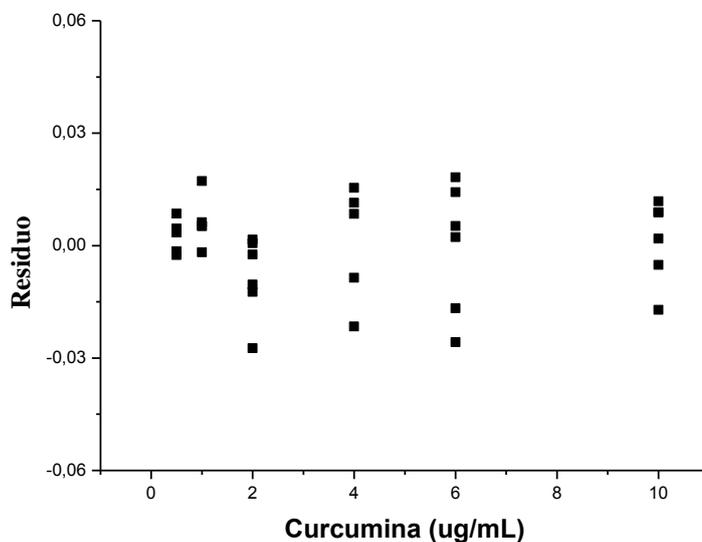
A equação da reta gerada foi de $y = 0,1186x + 0,0022$ e o coeficiente de correlação (R) foi de 0,9996, sendo esta linear e adequada para a quantificação das concentrações desconhecidas de CUR.

Os dados da curva analítica foram submetidos à análise de variância (falta de ajuste e significância da regressão) utilizando o teste F de Snedecor para avaliação do ajuste do modelo. Os resultados revelaram que neste modelo não houve falta de

ajuste (Falta de ajuste obtida = 1,17 < Ft = 2,68) e apresentou significância da regressão (~ 9500 vezes), validando o modelo dado pela equação da reta.

O gráfico de resíduos (Figura 4) possibilitou verificar o comportamento das variâncias dos dados na curva analítica em relação ao aumento da concentração, sendo este homocedásticos. Ademais, o Limite de detecção e o limite de quantificação foi determinado utilizando os parâmetros da curva analítica, sendo 0,010 e 0,032, respectivamente.

Figura 4 - Gráfico de resíduos



Fonte: Próprio autor, 2019

Sendo assim, as micelas com diferentes concentrações foram analisadas após o processo de centrifugação e filtração. Os resultados revelaram que a EE para as micelas contendo 0,1, 0,5, 1 e 3% foram de $96,2 \pm 3,5$, $86,4 \pm 5,7$, $62,9 \pm 2,2$ e $20,2 \pm 0,7\%$, respectivamente. Resultados que estão de acordo com a análise visual, onde após 0,5% de CUR a solução coloidal apresentava-se com aglomerados/precipitados ou turva.

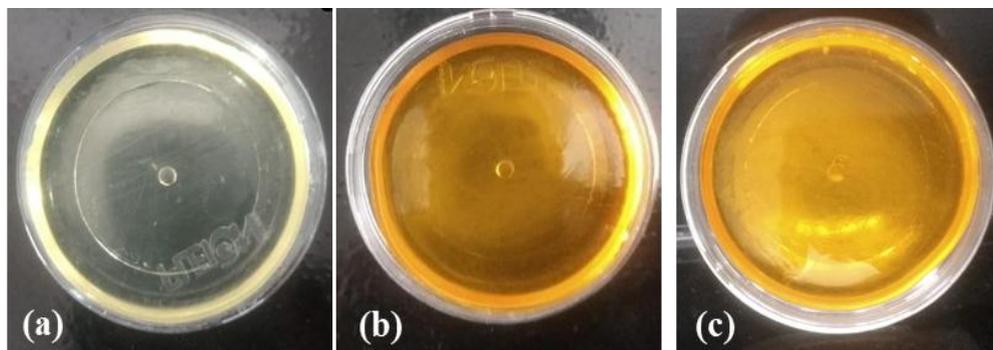
No resultado apresentado por Gong *et al.* (2013), a EE da CUR incorporada na micela foi de 98,40% utilizando proporções semelhantes, assim como o tamanho da partícula apresentada que foi de 26,9 nm.

4.5 Obtenção das membranas híbridas do tipo ureasil- poliéter

Os filmes compostos pelo material híbrido são formados pelo processo sol-gel, que envolve reações de hidrólise e condensação. A velocidade dessas reações (tempo de formação do filme) é controlada pela variação da proporção precursor/catalisador (OSHIRO JUNIOR *et al.*, 2014).

No resultado final, após a secagem, o material deve mostrar-se homogêneo e apresentar flexibilidade, por este motivo sua obtenção deve ser realizada de forma metódica, uma vez que fatores como a pressão e a temperatura do ambiente podem interferir, resultando em rachaduras, fissuras e materiais quebradiços. A figura 5 apresenta as características visuais dos materiais híbridos desenvolvidos contendo as micelas com e sem CUR.

Figura 5 - Material híbrido do tipo ureasil-poliéter (U-PEO 500) pura (a) com CUR (b) e com micela CUR proporção de 3% (c)



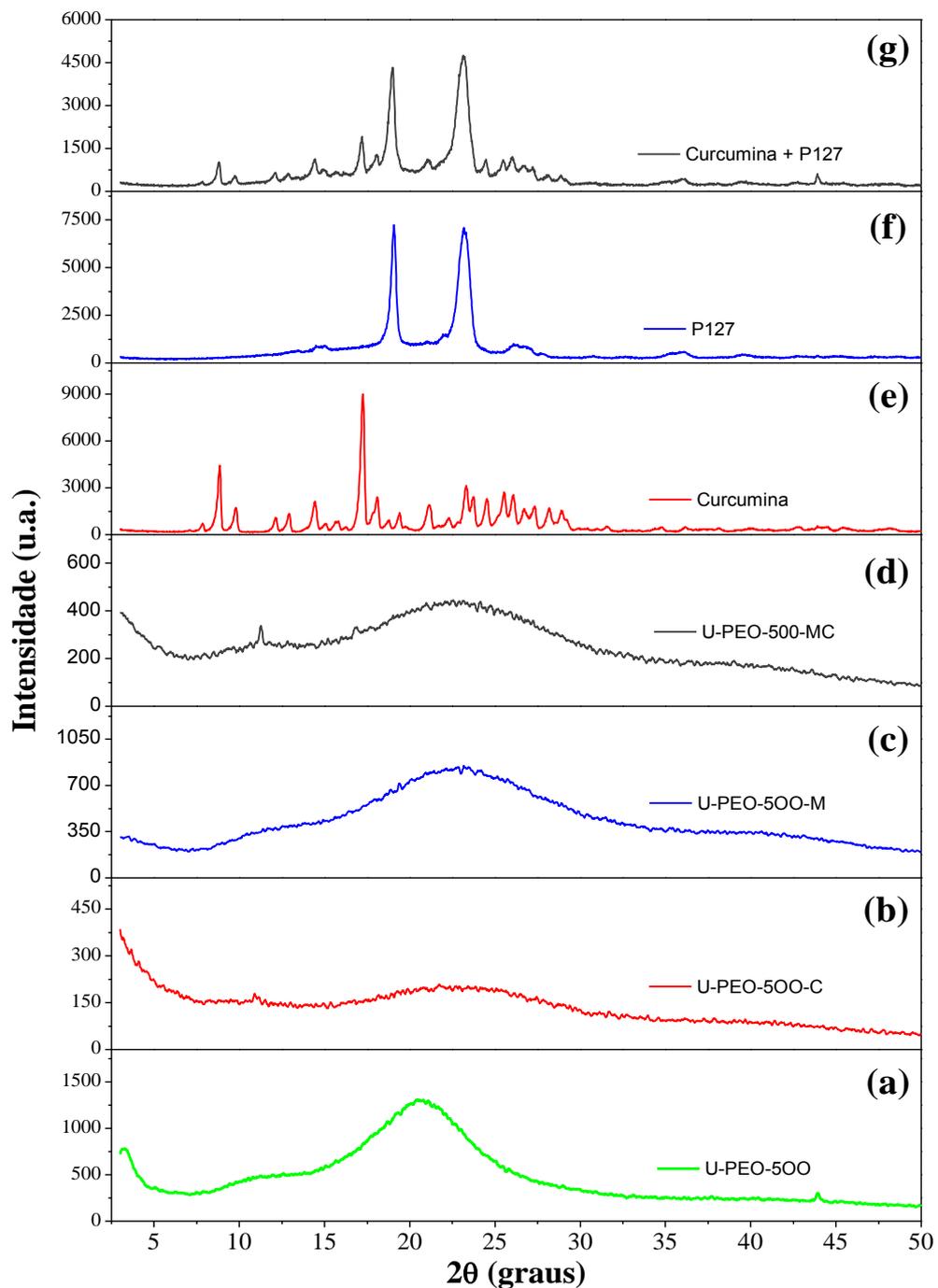
Fonte: Próprio autor, 2019

Os resultados visuais revelam que a presença do fármaco e da micela em diferentes concentrações na membrana não alterou as propriedades mecânicas e organolépticas do material. Além disso, é possível observar que, quando incorporada no material híbrido, a micela contendo 3% de CUR apresenta-se visualmente homogênea, sem presença de aglomerados ou precipitados. O material híbrido devido aos diferentes grupamentos (OH, C-O-C e N-H), é capaz de auxiliar na solubilização de diferentes moléculas (hidrofílicas, hidrofóbicas e metais).

4.6 Difração de raio x (DRX)

A Figura 6 apresenta os padrões de DRX das amostras sendo elas, o material híbrido puro, material híbrido contendo CUR pura, material híbrido contendo micela pura, material híbrido contendo micela com CUR, CUR pura, micela pura e micela contendo CUR.

Figura 6 - Padrões de DRX das amostras: (a) material híbrido puro, (b) material híbrido + CUR, (c) material híbrido + micela pura, (d) material híbrido + micela + CUR, (e) CUR pura, (f) micela pura e (g) CUR + micela



Fonte: Próprio autor, 2019

Nos resultados da análise de DRX da CUR pura, pode-se observar a sua forma cristalina com picos característicos, onde sua maior visibilidade foi na faixa de 16° . Sun *et al* (2013), citam em sua pesquisa que a CUR pura existe em um estado cristalino, exibindo um número de reflexões características entre 10 e $30^\circ 2\theta$.

O pluronic apresentou dois pontos característicos na faixa de 19° e 23° , permanecendo inalterados mesmo após a incorporação da CUR na micela, assim como ocorre em outros trabalhos, como na pesquisa realizada por Sahu *et al* (2011), onde os resultados foram similares aos apresentados neste estudo (NAIKOO *et al.*, 2015).

Os padrões de raios-X dos materiais sintetizados a partir do material híbrido, CUR e micela (P127) demonstram um padrão amorfo e o desaparecimento dos picos da CUR e do pluronic, sugerindo dispersão de ambos no material, corroborando com as características visuais descrita no item 3.5.

4.7 Ensaio de liberação *in vitro*

Para que ocorra a liberação do fármaco em sistemas matriciais ou monólitos, processos físicos e químicos estão envolvidos, como a difusão do fármaco pela matriz, intumescimento, erosão do sistema polimérico e por fim uma combinação desses mecanismos (SAHU *et al.*, 2011).

A ocorrência de um ou de outro mecanismo será dependente da natureza química e estrutural do material. Para ser considerado adequado, o material precisa ser capaz de controlar e manter a liberação do fármaco em níveis adequados dentro da faixa terapêutica para o tecido-alvo, independentemente do mecanismo (SAHU *et al.*, 2011).

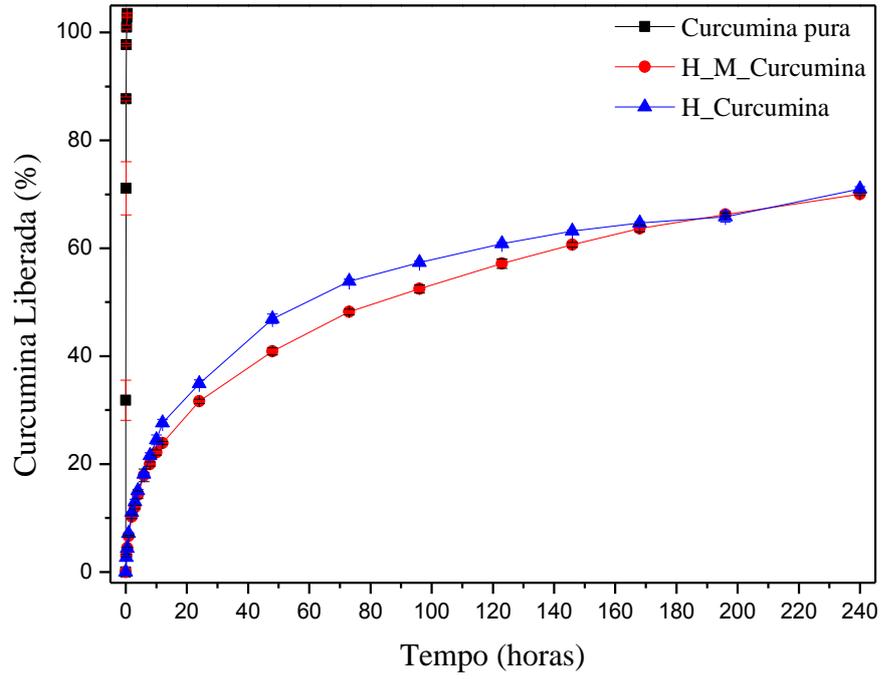
A figura 7 apresenta o perfil de liberação da CUR pura (preto), material híbrido com CUR (azul) e material híbrido com micela e CUR (vermelho).

Podemos observar que a CUR atingiu 100% de liberação em torno de 15 minutos. O material híbrido com CUR e material híbrido com micela e CUR

apresentaram outro perfil, a liberação ocorre de forma controlada e prolongada, liberando após 10 dias cerca de 70% da CUR, demonstrando que esse sistema desenvolvido pode ser utilizado em tratamento prologando, reduzindo as flutuações plasmáticas dos níveis da CUR o que diminui os efeitos colaterais e aumenta a adesão do paciente ao tratamento.

Na literatura vários sistemas nanoestruturados tem sido utilizados para melhorar o perfil de liberação da CUR, como a pesquisa realizada por Anitha *et al* (2011), utilizando nanopartículas (NPs) como novo sistema de liberação e neste eles citam que o padrão de liberação do fármaco mostrou uma liberação de rajada nas primeiras 3 horas, seguida por uma liberação controlada de CUR durante um período de uma semana e cerca de 70% do fármaco foi liberado durante esse tempo. A CUR que é adsorvida na superfície das NPs e o fármaco aprisionado próximo à superfície pode ser a razão para a liberação inicial da explosão. Já que a taxa de dissolução do polímero próximo à superfície é alta, a quantidade de droga liberada também será alta. Já para Sahu *et al* (2011), que utilizaram as micelas poliméricas como fonte de um novo sistema de liberação, foi visto que uma liberação relativamente rápida ocorreu no primeiro estágio, seguida de uma liberação sustentada e lenta durante um período prolongado de até 10 dias. Durante as primeiras 4 h houve 5% de liberação das micelas de Pluronic F127. Depois disso, a liberação foi lenta e sustentada e, finalmente, às 240 h, 63% da droga foi liberada das micelas de Pluronic F127.

Figura 7 - Liberação da CUR presente em um material híbrido do tipo ureasil-poliéter em função do tempo



Fonte: Próprio autor, 2019

5 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica capaz de solubilizar uma alta concentração de CUR, além de apresentar um perfil de liberação controlado e prolongado, liberando cerca de 70% do fármaco em 10 dias. Este fármaco possui atividade antimicrobiana contra o gênero *Candida* como demonstrado nos trabalhos abaixo.

Pacheco *et al.* (2015), utilizaram o extrato da CUR para verificar ações antimicrobianas do fármaco perante cepas de espécies de *Candida* e ele determinou que as amostras contendo 10^4 como concentração de células fúngicas foram inoculadas em meio ágar nutriente suplementado com os compostos curcuminoides nas concentrações de 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm e 125 ppm (Figura 2). Levando-se em consideração a placa controle, os resultados mostram que o crescimento de *C. parapsilosis* foi inibido de maneira dose dependente a partir da concentração de 500 ppm do extrato etanólico obtido a partir tanto de rizoma quanto de folha, caracterizando este valor como concentração inibitória mínima (CIM).

Já no estudo realizado por Freitas (2015), a cepa utilizada para a comprovação da atividade da CUR foi a de *Candida albicans* resistente a fluconazol e ele demonstrou que após 24 h de exposição à CUR, alterações significativas no potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foram observadas na estirpe de *C. albicans* resistente ao fluconazol, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que este composto pode afetar a função respiratória mitocondrial, causando um colapso no $\Delta\psi_m$, fazendo com que a Rh 123 não se acumule nas mitocôndrias, efeito dose-dependente. As células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol tratadas com curcumina apresentou um aumento de $10,03 \pm 1,59$ % (CIM), $21,99 \pm 2,50$ % (2x CIM) e $36,53 \pm 5,17$ % (4x CIM), quando comparadas ao grupo controle ($3,44 \pm 1,03$ %) ($p < 0,05$).

Para Martins *et al* (2009), a falta de compostos antifúngicos com efeitos colaterais reduzidos destaca a importância de se estudar produtos naturais para esse fim. A curcumina inibiu dramaticamente a adesão de espécies de *Candida* isoladas de pacientes com AIDS a BEC, demonstrando que a curcumina é um promissor composto líder que merece uma investigação mais aprofundada sobre seu uso terapêutico em pacientes imunocomprometidos.

Os resultados do trabalho elaborado por Gomes *et al.* (2012), mostram que este composto foi capaz de inibir o crescimento de todas as leveduras de uma maneira dependente da dose. Esta inibição é mais evidente para o isolado 88, onde 50 µm de curcumina foi capaz de impedir o crescimento da cepa de *C. albicans*.

Além disso, a CUR pode ser utilizada na atividade fotodinâmica onde os seus efeitos são potencializados por meio da produção de espécies reativas de oxigênio, como pode ser visto nos trabalhos a seguir.

Coletti (2013), mostrou que seu trabalho avaliou o efeito fotodinâmico mediado pela ação fotossensibilizadora da curcumina, sobre cepas de referência (ATCC) e isolados clínicos com resistência a fluconazol das espécies *C. albicans* e *C. glabrata*, em meio homogêneo constituído de CUR/SAL e em meio micro-heterogêneo (micelar ou pseudo-fase) constituído de CUR/CTAB. Foi observado que o uso do CUR/SAL nas condições avaliadas na terapia fotodinâmica não foi capaz de inviabilizar completamente as cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol, o que não ocorreu com as cepas sensíveis, nas quais foi observada a sua completa inativação. No entanto, quando foi utilizada a CUR/CTAB, verificou-se um efeito antifúngico mais pronunciado sobre as cepas resistentes a fluconazol, tanto para *C. glabrata* como para *C. albicans*.

Dovigo *et al.* (2011) observaram que, em comparação com o grupo de controle, uma diminuição estatisticamente significativa na atividade metabólica foi observada para todas as concentrações de curcumina testadas. Uma relação direta entre a concentração de curcumina e viabilidade de biofilme foi observada. Ou seja, à medida que a concentração aumentou, a viabilidade do metabolismo diminuiu. O efeito do tempo de pré-irradiação (PIT) na eficácia da terapia fotodinâmica foi perceptível, como maiores percentuais de redução foram obtidos quando os biofilmes foram incubados por 20 min antes da irradiação. Em um outro trabalho também realizado por esta equipe eles demonstram que o uso de CUR em associação com a luz foi capaz de promover um efeito antifúngico significativo contra a forma planctônica das leveduras. Ao utilizar 40 µM de CUR, a atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foi reduzida em 85%, 85% e 73%, respectivamente, a 18 J / cm². A terapia fotodinâmica mediada por CUR também diminuiu a biomassa do biofilme de todas as espécies avaliadas. (DOVIGO *et al.*, 2011).

6 CONCLUSÃO

Essa pesquisa possibilitou concluir que a síntese das micelas contendo a CUR foi realizada de maneira adequada, visto que o resultado do DLS e MEV, corroborando com o resultado da eficiência de encapsulação demonstraram a incorporação da CUR não alterou as propriedades de tamanho hidrodinâmico das micelas. Assim como a dispersão das micelas contendo CUR no material ureasil-poliéter, uma vez que os resultados de DRX revelam que a CUR se mantém solúvel. Os resultados de liberação *in vitro* demonstram que essa combinação é capaz de ser um sistema de liberação prolongado, no qual após 10 dias cerca de 70% da CUR foi liberado. Esses resultados demonstram o potencial do sistema em ser um tratamento multidosado baseado em uma única aplicação, o que sugere maior taxa de adesão e menor índice de desistência pelo usuário, além de proporcionar a formulação de diversas formas farmacêuticas como óvulos e anéis vaginais, se adaptando às necessidades do paciente.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. M. de; THEODORO, L. H.; BOSCO, A. F.; NAGATA, H.; OSHIIWA, M.; GARCIA, V. G. Influence of Photodynamic Therapy on the Development of Ligature-Induced Periodontitis in Rats. **Jornal of Periondotology**, 78(3), 566–575, 2007.

ANITHA, A.; DEEPAGAN, V. G.; DIVYA R., V., V.; MENON, D.; NAIR, S., V.; JAYAKUMAR, R. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 84(3):1158-1164, 2011.

CABRAL, H.; KATAOKA, K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. **J Control Release**, 190:465-76, 2014.

CAMPOS, C.; QUISHIDA, C.; CARMELLO, J. C.; GARCIA, E.; MIMA, D. O.; BAGNATO, V. S.; Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine ®. **Lasers Med Sci**, 30:685–694, 2015.

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M. A. Micelles and Nanoemulsions. **Nanocosmetics**, pp.47-72, 2019.

CIEPLIK, F.; TABENSKI, L.; BUCHALLA, W.; MAISCH, T.; AI-AHMAD, A. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. **Frontiers in Microbiology**, 5: 405, 2014.

CODEVILLA, C. F.; BARIN, J. S.; DA SILVA, C. de B.; DA SILVA, T. M.; DE MENEZES, C. R. Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão. **Ciência e Natura**, 37(5):152 – 163, 2015.

COLETTI, Tatiana Maria Starck Fogaça de Aguiar, **EFEITO FOTODINÂMICO DA CURCUMINA EM MICELAS DE CETRIMIDA SOBRE CEPAS DE CANDIDA SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES A FLUCONAZOL**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Julio Mesquita Filho, 2013.

COSTA, M.; FATIMA, de O.; FERNANDES, L.; RODRIGUES, R. Candidíase vulvovaginal: aspectos clínicos, tratamentos orais com azólicos e suscetibilidade *in vitro*. **Revista de Patologia Tropical**, 32(2): 145-162, 2018.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat. Rev. Drug Discov**, 2(2):114-122, 2003.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; CARMELLO, J. C.; MACHADO, A. L.; BRUNETTI, I. L.; BAGNATO, V. S. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in Surgery and Medicine**, 43(9):927-34, 2011 a.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, A. P. D.; BRUNETTI, I. L.; COSTA, C. A. de S.; JACOMASSI, D. P.; KURACHI, C. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, 87(4):895-903, 2011 b.

FREITAS, Daniel Domingues. **Avaliação in vitro da curcumina frente às cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

FURTADO, H. L. A.; MOTTA, B. L. A.; MENDES, T. L.; DA SILVA, T. O.; DOS SANTOS, J. R. A. Fatores predisponentes na prevalência da candidíase vulvovaginal. **Revista de Investigação Biomédica**, 10(2): 48-63, 2018.

GERALD S.; SWAMINATHAN, K. R.; DEVI, M.; SWATHI, C.; THOMAS, B. M.; Prevalence of vulvovaginal candidiasis in the women of the reproductive age, in rural India. **International Journal of Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 1(2): 37-39, 2017.

GLORY, A.; TRIPLET, C.; OOSTENDE, V.; GEITMANN, A.; BACHEWICH, C. Depletion of the mitotic kinase Cdc5p in *Candida albicans* results in the formation of elongated buds that switch to the hyphal fate over time in a Ume6p and Hgc1p-dependent manner. **Fungal Genet Biol**, 107:51-66, 2017.

GOMES, A. S. G.; CURVELO, J. A. R.; SOARES, R. M. A.; PEREIRA, A. F. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. **Medical Mycology**, Volume 50, Issue 1, January 2012, Pages 26–32

GONG, C.; WU, Q.; WANG, Y.; ZHANG, D.; LUO, F.; ZHAO, X.; QIAN, Z. A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. **Biomaterials**, 34(27):6377-87, 2013.

HIRAKAWA, M. P.; MARTINEZ, D. A.; SAKTHIKUMAR, S.; ANDERSON, M. Z.; BERLIN, A.; GUJJA, S. Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. **Genome Res**, 25(3):413-25, 2015.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, B. B. “Spicing Up” of the Immune System by Curcumin. **Journal of Clinical Immunology**, 27(1):19-35, 2007.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; MILLER, D. W. Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood –brain barrier. **Adv Drug Deliv Rev**, 55(1):151-64, 2003.

KAMINAGA, Y.; NAGATSU, A.; AKIYAMA, T.; SUGIMITO, N.; YAMAZAKI, T.; MAITANI, T. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **FEBS Letters**, 555(2):311-6, 2003.

KIKUCHI, T.; MOGI, M.; OKABE, I.; OKADA, K; GOTO, H. Adjunctive Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Nonsurgical Periodontal Treatment: A Review of Literature. **International Journal of Molecular Sciences**, 16(10): 24111–24126, 2015.

LIU, Y.; LIU, D.; ZHU, L.; GAN, Q.; LE, X. Temperature-dependent structure stability and *in vitro* release of chitosan-coated curcumin liposome. **FRIN**, 74:97-105, 2015.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, 22(2):83-91, 2007.

MARTINS, C. V. B.; SILVA, D. L.; NERES, A. T. M.; MAGALHAES, T. F. F.; WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V.; SABINO, A. A.; FATIMA, A.; RESENDE, M. A. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Volume 63, Issue 2, Pages 337–339, 2009.

MASSIMINO, Livia Contini. **Nanopartículas de curcumina: Obtenção e caracterização**, 2016. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2016.

MOVASSAGHIAN, S.; MERKEL, O. M.; TORCHILIN, V. P. Applications of polymer micelles for imaging and drug delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(5), 691–707, 2015.

MURDOCK, R. C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A. M.; SCHLAGER, J. J.; HUSSAIN, S. M. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to *In Vitro* Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. **Toxicological Sciences**, Volume 101, Issue 2, Pages 239–253, 2008.

NAIKOO, G. A.; THOMAS, M.; ANIS, G. M.; SHEIKH, M. U. D.; BANO M.; HASSAN, I. U.; KHAN, F. Hierarchically macroporous silver monoliths using Pluronic F127: Facile synthesis, characterization and its application as an efficient biomaterial for pathogens. **Journal of Saudi Chemical Society**, 20(2):237-244, 2015.

OSHIRO JUNIOR, J. A.; ABUÇAFY, M. P.; MANAIA, E. B.; DA SILVA, B. L.; CHIARI-ANDREO, B. G.; CHIAVACCI, L. A. Drug delivery systems obtained from silica based organic-inorganic hybrids. **Polymers (Basel)**, 8(4): 91, 2016 a.

OSHIRO JUNIOR, J. A.; CARVALHO, F. C.; SOARES, C. P.; CHORILLI, M.; CHIAVACCI, L. A. Development of cutaneous bioadhesive ureasil-polyether hybrid films. **Int. J. Polym. Sci.**, 1-7, 2015.

OSHIRO JUNIOR, J. A.; MORTARI, G. R.; DE FREITAS, R. M.; MARCANTONIO-JUNIOR, E.; LOPES, L.; SPOLIDORIO, L. C.; CHIAVACCI, L. A. Assessment of biocompatibility of ureasil-polyether hybrid membranes for future use in implantodontology. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 65(13):647-652, 2016 b.

OSHIRO JUNIOR, J. A.; SHIOTA, L. M.; CHIAVACCI, L. A.; Development of organic-inorganic polymeric film formers for controlled drug release and wound care. **Matéria (Rio J.)** Rio de Janeiro, vol.19 no.1, p. 24-32, Mar. 2014.

PACHECO, D.R.; SOARES, D. E. D.; NETO, C. M. L.; SILVA, G. A.; PRADO R. S. Avaliação da atividade antifúngica de *Curcuma longa* sobre *Candida parapsilosis*. **Rev Patol Trop** Vol. 44 (3): 258-270. jul.-set. 2015.

PALACIO, G.; PULCINELLI, S. H.; MAHIOU, R.; BOYER, D.; CHADEYRON, G.; SANTILLI, C. V. Coupling photoluminescence and ionic conduction properties using the different coordination sites of ureasil-polyether hybrid materials. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 10(43):37364-37373, 2018.

SAHU, A.; KASOJU, N.; GOSWAMI, P.; BORA, U. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications. **JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS**, 25(6):619-39, 2011.

SAKIMA, V. T.; BARBUGLI, P. A.; CERRI, P. S.; CHORILLI, M.; CARMELLO, J. C.; PAVARINA, A. C.; MIMA, E. G. de O. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. **Molecules**, 23(8), 2018.

SAMPAIO, C.; MORIWAKI, C.; CLAUDIA, A.; SATO, F.; LUCIANO, M.; MEDINA, A. Curcumin – β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **FOOD Chem.**, 153: 361-370, 2014.

SANITA, P. V.; PAVARINA, A. C.; DOVIGO, L. N.; RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; MIMA, E. G. de O. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. **Lasers in Medical Science**, 33(4):709-717, 2017.

SANTANA, D. P. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 12(2):229-233, 2013.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Therapy Curcumin mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections —A review. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, 21:409-415, 2018.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES, G. M. J. S. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, 62(Pt 1):10-24, 2013.

SARI, T. P.; MANN, B.; KUMAR, R.; SINGH, R. R. B.; SHARMA, R.; BHARDWAJ, M. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocoll**, 43:540-546, 2015.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D. D.; BENIWAL, V.; SINGH, D.; KUMAR, M. N. V. R. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 37(3-4):223-30, 2009.

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 214(1):15-21, 2016.

SONG, L.; SHEN, Y.; HOU, J.; LEI, L.; GUO, S.; QIAN, C. Polymeric micelles for parenteral delivery of curcumin: Preparation, characterization and *in vitro* evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 390(1):25-32, 2011.

SUN, X.-Z.; WILLIAMS, G. R.; HOU, X.-X.; ZHU, L.-M. Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, 94(1):147-53, 2013.

SUZUKI, Isabella Luiz. **Viabilização da curcumina natural nanoencapsulada para inativação fotodinâmica**, 2015. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) – Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2015.

TALELLI, M.; BARZ, M.; RIJCKEN, C. J. F.; KIESSLING, F.; HENNINK, W. E.; LAMMERS, T. Core-crosslinked polymeric micelles: Principles, preparation, biomedical applications and clinical translation. **Nano Today**, 10(1):93-117, 2015.

TONNESEN, H. H.; MASSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, 244(1-2):127-35, 2002.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, 74(4), 2016.

TRUFFAULT, L.; RODRIGUES, D. F.; SALGADO, H. R. N.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. Loaded Ce-Ag organic-inorganic hybrids and their antibacterial activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 147:151-160, 2016.

WANG, F. Pharmacokinetic studies and anticancer activity of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers. **Acta Pharm.**, 67(3):357-371, 2017.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. **Front. Microbiol**, 7:2173, 2017.

WILLEMS, H. M.; KOS, K.; JABRA-RIZK, M. A.; KROM, B. P. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. **Pathogens and disease**, 74(5). ftw039, 2018.

YALLAPU, M. M.; OTHMAN, S. F.; CURTIS, E. T.; BAUER, N. A.; CHAUHAN, N.; KUMAR, D. Curcumin-loaded magnetic nanoparticles for breast cancer therapeutics and imaging applications. **Int J Nanomedicine**, 7:1761-79, 2012.

YANO, J.; SOBEL, J.D.; NYIRJESY, P. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. **BMC Women's Health**, 19(1):48, 2019