



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA CAMPUS I - CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE  
FARMÁCIA CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**CAMILA MAIARA OLIVEIRA FERREIRA**

**CARREADORES LIPIDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO BIXINA PARA  
USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA *CANDIDA ALBICANS***

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2024**

CAMILA MAIARA OLIVEIRA FERREIRA

**CARREADORES LIPIDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO BIXINA PARA  
TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA *Candida albicans***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao departamento 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-PB**

**2024**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão 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.

F383c

Ferreira, Camila Maiara Oliveira.

Carreadores lipídicos nanoestruturados desenvolvidos por método de baixa energia contendo bixina para uso em terapia fotodinâmica contra *Candida albicans* [manuscrito] / Camila Maiara Oliveira Ferreira. - 2024. 38 f. : il. color. Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas".

1. Candidíase. 2. Fotossensibilizador. 3. Resistência microbiana. I. Título

21. ed. CDD 615

CAMILA MAIARA OLIVEIRA FERREIRA

CARREADORES LIPIDICOS NANOESTRUTURADOS DESENVOLVIDOS POR  
MÉTODO DE BAIXA ENERGIA CONTENDO BIXINA PARA USO EM TERAPIA  
FOTODINÂMICA CONTRA CANDIDA ALBICANS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Coordenação do Curso de Farmácia da  
Universidade Estadual da Paraíba, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
bacharel em Farmácia

Aprovada em: 21/11/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Mariana Rillo Sato** (\*\*\*.514.248-\*\*), em **05/12/2024 09:44:05** com chave **9ca906feb30611efb6782618257239a1**.
- **João Augusto Oshiro Junior** (\*\*\*.616.238-\*\*), em **04/12/2024 23:16:46** com chave **fa8d4c7eb2ae11efa2fd2618257239a1**.
- **Alessandra Teixeira** (\*\*\*.515.174-\*\*), em **05/12/2024 09:12:15** com chave **2ab81980b30211ef80931a7cc27eb1f9**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade,  
faça a leitura do QrCode ao lado ou acesse  
[https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar\\_documento/](https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/) e informe os  
dados a seguir. **Tipo de Documento:** Folha de Aprovação do Projeto  
Final



**Data da Emissão:** 19/12/2024 **Código de Autenticação:** 4dd3ce

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, expresso minha imensa gratidão a Deus, cuja força, presença e amor me guiaram em cada etapa desta jornada.

Aos meus pais, Rosália e Valtencil, pelo amor, dedicação e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida; ao meu irmão Cainã, que me inspira com sua força, dedicação e inteligência; e à minha querida avó Zeza, fonte de carinho e bondade inesgotável.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Oshiro e a mestrandia Sara do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, pela orientação, paciência, colaboração, incentivo constante e contribuições valiosas durante todo este trabalho. E a todos os membros do grupo de pesquisa “I-nano”, que, com suas contribuições e espírito colaborativo, tornaram esta experiência ainda mais enriquecedora.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Candidíase é uma infecção oportunista causada principalmente pelo fungo da *Candida albicans*, seu tratamento envolve o uso de antifúngicos que enfrentam resistência microbiana, toxicidade e alto custo de alguns fármacos. Tendo em vista que a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma opção alternativa de tratamento que gera espécies reativas de oxigênio (EROs) para lesar microorganismos, torna-se uma opção viável para o tratamento da candidíase. A aPDT necessita de fotossensibilizadores, desse modo, a bixina (BIX), um carotenóide que possui absorvidade de luz no intervalo de 300-500 nm, pode ser empregada como fotossensibilizador (FS) na aPDT. Em contrapartida, a BIX não é solúvel em meio fisiológico, sendo necessário incorporá-la em carreadores lipídios nanoestruturados (CLN). Assim, objetivou-se desenvolver um CLN por baixa energia contendo BIX (CLN-BIX) para uso na aPDT contra *C. albicans*. Os carreadores foram preparados por inversão de fases por temperatura, caracterizados pelas técnicas de eficiência de encapsulação (EE%) por espectrofotometria UV-vis ( $\lambda=364$  nm), espalhamento de luz dinâmico (DLS), termogravimetria(TG) e atividade antifúngica por concentração inibitória mínima (CIM) e contagem de colônia (CC). O CLN-BIX apresentou-se como mistura homogênea de cor amarela. A EE% demonstrou um resultado satisfatório a partir da encapsulação de 8,15 mg de BIX por grama de fase lipídica de CLN. O DLS do CLN-BIX resultou em diâmetro hidrodinâmico médio de 239,15 nm, encontrado na faixa muito próxima da ideal de nanopartículas para entrega de fármacos, obtive índice de polidispersão (IPD) de 1,64 e potencial zeta (PZ) de -12,70 mV, sugerindo estabilidade estérica entre partículas por estarem próximos a  $\pm 30$  mV. Na TG, a BIX demonstrou boa estabilidade térmica e o CLN-BIX apresentou perda de 90,45% de massa próximo a 100°C, em razão de sua grande composição de água. Em relação a CIM, a BIX, sem luz e com luz, apresentou CIM de 125 e 62,53  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, enquanto o CLN-BIX sem luz e com luz apresentaram CIM de 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. CIM com valores de 50 a 500  $\mu\text{g/mL}$  indicam excelente atividade antimicrobiana. Na CC, o grupo sem luz apresentou redução de 1 log (90%) para a BIX, mas não houve redução para CLN-BIX. Na presença de luz houve redução de 2 logs (99%) e 1 log (90%), respectivamente, mostrando uma redução estatística significativa. Conclui-se que foi possível produzir o CLN-BIX com tamanho e propriedades físico-químicas satisfatórias. Foi demonstrada excelente atividade antifúngica por CIM, mesmo a BIX tendo melhor atividade que o CLN-BIX sua incorporação é imprescindível para a solubilidade da BIX em meio fisiológico.

**Palavras-chaves:** candidíase; fotossensibilizador; resistência microbiana.

## ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic infection caused mainly by the fungus *Candida albicans*. Its treatment involves the use of antifungals that face microbial resistance, toxicity and the high cost of some drugs. Considering that antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is an alternative treatment option that generates reactive oxygen species (ROS) to damage microorganisms, it becomes a viable option for the treatment of candidiasis. aPDT requires photosensitizers, thus, bixin (BIX), a carotenoid with light absorptivity in the range of 300-500 nm, can be used as a photosensitizer in aPDT. On the other hand, BIX is not soluble in physiological media, being necessary to incorporate it into nanostructured lipid carriers (NLC). Thus, the aim of this study was to develop a low-energy NLC containing BIX (NLC-BIX) for use in aPDT against *C. albicans*. The carriers were prepared by temperature-induced phase inversion and characterized by encapsulation efficiency (EE%) using UV-vis spectrophotometry ( $\lambda = 364$  nm), dynamic light scattering (DLS), thermogravimetry (TG), and antifungal activity by minimum inhibitory concentration (MIC) and colony count (CC). NLCBIX appeared as a homogeneous yellow mixture. The EE% demonstrated a satisfactory result from the encapsulation of 8.15 mg of BIX per gram of NLC lipid phase. The DLS of CLN-BIX resulted in an average hydrodynamic diameter of 239.15 nm, found in the range very close to the ideal of nanoparticles for drug delivery, obtaining a polydispersity index (IPD) of 1.64 and zeta potential (PZ) of -12.70 mV, suggesting steric stability between particles as they are close to  $\pm 30$  mV. In the TG, BIX demonstrated good thermal stability and CLN-BIX presented a loss of 90.45% of mass close to 100°C, due to its large water composition. Regarding the MIC, BIX, without light and with light, presented MIC of 125 and 62.53  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, while CLN-BIX without light and with light presented MIC of 250 and 125  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. MIC values of 50 to 500  $\mu\text{g/mL}$  indicate excellent antimicrobial activity. In CC, the group without light showed a reduction of 1 log (90%) for BIX, but there was no reduction for CLN-BIX. In the presence of light, there was a reduction of 2 logs (99%) and 1 log (90%), respectively, showing a statistically significant reduction. It was concluded that it was possible to produce CLN-BIX with satisfactory size and physicochemical properties. Excellent antifungal activity was demonstrated by MIC, even though BIX has better activity than CLNBIX; its incorporation is essential for the solubility of BIX in physiological medium.

**Keywords:** candidiasis; photosensitizer; microbial resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Distribuição das soluções e controles nas microplacas.....	27
<b>Figura 2.</b> Características macroscópicas do CLN (a) e CLN-BIX (b).....	28
<b>Figura 3.</b> Curvas termogravimétricas da BIX, CLN, CLN-BIX e excipientes.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).....	28
<b>Tabela 2.</b> Resultado da eficiência de encapsulação (EE%) do CLN-BIX.....	30
<b>Tabela 3.</b> Curvas termogravimétricas da BIX, CLN, CLN-BIX e excipientes.....	31
<b>Tabela 4.</b> Avaliação da atividade antifúngica por concentração inibitória mínima (CIM) e contagem de colônia (CC).....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
BIX	Bixina
CC	Contagem de colônias
CIM	Concentração inibitória mínima
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
CLN-BIX	Carreador lipídico nanoestruturado contendo bixina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizadores
NPL	Nanopartículas lipídicas
NPLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
OR	Óleo de Rícino
PLU	Pluronic® F127
STE	Estearato de polioxietileno 40
TGACC	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
nm	Nanômetro °C Graus celsius
µg/mL	Microgramas por mililitros
mg	Miligramas
mL/min	Mililitros por minuto
°C	Graus celsius
°C/min	Graus celsius por minuto
UFC/ml	Unidades formadoras de colônia por ml
mV	Milivolt
ζ	Potencial Zeta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Candidíase.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Epidemiologia .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Tratamento.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Terapia Fotodinâmica .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5</b>	<b>Fotossensibilizadores.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5.1</b>	<b><i>Corantes naturais.....</i></b>	<b>17</b>
<b>2.5.1.2</b>	<b><i>Bixina .....</i></b>	<b>17</b>
<b>2.5.1.3</b>	<b><i>Potencial antimicrobiano do extrato de urucum .....</i></b>	<b>18</b>
<b>2.6</b>	<b>Nanopartículas lipídicas .....</b>	<b>18</b>
<b>2.6.1</b>	<b><i>Nanopartículas lipídicas sólidas.....</i></b>	<b>18</b>
<b>2.6.2</b>	<b><i>Carreador lipídico nanoestruturado.....</i></b>	<b>19</b>
<b>2.7</b>	<b>Métodos de produção de CLN.....</b>	<b>20</b>
<b>2.7.1</b>	<b><i>Inversão de fases por temperatura .....</i></b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.1</b>	<b><i>Matérias Prima.....</i></b>	<b>23</b>
<b>4.1.2</b>	<b><i>Equipamentos.....</i></b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2.1</b>	<b><i>Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....</i></b>	<b>24</b>
<b>4.2.3</b>	<b><i>Caracterização físico-química .....</i></b>	<b>25</b>
<b>4.2.3.1</b>	<b><i>Eficiência de encapsulação.....</i></b>	<b>25</b>
<b>4.2.3.2</b>	<b><i>Diâmetro hidrodinâmico médio (DMN), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) .....</i></b>	<b>25</b>
<b>4.2.3.3</b>	<b><i>Termogravimetria (TG) .....</i></b>	<b>25</b>

4.2.4	<i>Tratamento da cepa</i> .....	25
4.2.5	<i>Tratamento contra culturas planctônicas</i> .....	26
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
5.1	<b>Carreador lipídico nanoestruturado por baixa energia</b> .....	27
5.2	<b>Caracterização físico-química dos CLN</b> .....	28
5.2.1	<i>Diâmetro hidrodinâmico médio (DMN), índice de polidispersão (IPD) e Potencial Zeta (PZ)</i> .....	28
5.2.2	<i>Eficiência de Encapsulação (EE%)</i> .....	29
5.3	<b>Análise Térmica</b> .....	30
5.3.1	<i>Análise Termogravimétrica (TG)</i> .....	30
5.4	<b>Análise da Atividade Antifúngica</b> .....	32
5.4.1	<i>Concentração inibitória mínima (CIM) e contagem de colônias (CC)</i> .....	32
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida* é o gênero de uma das principais leveduras que vivem em comensalismo na microbiota humana. Esse gênero possui entre 150 e 200 espécies, sendo a *Candida albicans* a mais comum na infecção de humanos. Em indivíduos imunocomprometidos, esses fungos são capazes de causar infecções crônicas e disseminadas chamada de candidíase, que pode afetar várias partes do corpo, como a vagina, chamada de candidíase vaginal, a boca e gargante, chamada de oral, as áreas úmidas e dobras da pele, chamada de cutânea e várias outras regiões do corpo (trato gastrointestinal, garganta, pulmões, esófago e etc.) (FROTA, 2018; ANDRADE NETO, 2019; NINS, 2023).

O tratamento da candidíase envolve o uso de azólicos, equinocandinas e poliênicos. No contexto do tratamento brasileiro utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS), a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais oferta o Fluconazol, o Itraconazol e a Anfotericina B (ANDRADE NETO, 2019). Diante do contexto atual de aumento de espécies com resistência intrínseca a compostos azólicos, formação de biofilmes, toxicidade (como a anfotericina B) e uso indiscriminado desses fármacos, existe a necessidade de terapias alternativas contra a *Candida*. (ANDRADE NETO, 2019; TAKATA, 2019).

A terapia fotodinâmica (TFD) se mostra atualmente como uma terapia alternativa de grande eficiência. Essa técnica consiste em expor tecidos ou células alvo a agentes fotossensibilizadores com irradiação luminosa. Isso promove a excitação dessas moléculas fotossensíveis que reagem gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que são citotóxicas e geram lesões no microrganismo ou tecido alvo (RAMIREZ et al., 2023). Atualmente a TFD está incorporada no SUS como uma alternativa de tratamento para os pacientes com o câncer de pele do tipo basocelular superficial e nodular, que é o tipo de câncer mais frequente no Brasil (GOV, 2024).

A bixina (BIX) é um apocarotenóide predominantemente encontrado nas cascas das sementes de *Bixa orellana L.*, popularmente conhecido como urucum. Os carotenoides são pigmentos naturais conhecidos pela ação antioxidante, promovida pela inserção de um oxigênio nas posições das duplas ligações. Além de possuírem ação quelante através da capacidade de dissipar energia do oxigênio reativo na forma de calor, o levando ao seu estado fundamental (CRUZ, 2021; LOPES, 2019; TAKATA, 2019).

Tendo em vista a baixa solubilidade da BIX em meio fisiológico a incorporação em sistemas de entrega se torna interessante. Visto que as nanopartículas lipídicas (NPLs) são

sistemas de carreamento de insumo farmacêutico lipofílicos com vantagens de possuir liberação controlada, serem biocompatíveis e biodegradáveis, além de fornecerem proteção para compostos lábeis incorporados contra a degradação química, os tornam sistemas menos tóxicos (LEITE, 2019; SANTOS, 2020).

As NPLs são divididas em nanopartículas lipídicas sólidas (NPLSs) e em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), que são um sistema de segunda geração, visto que foram desenvolvidos posteriormente. Os CLNs possuem a partir de um lipídio líquido em sua composição, o que o torna menos organizado. Além dessa qualidade, também ocorre favorecimento da encapsulação de compostos, maior tempo de retenção de fármacos, aumento da estabilidade e liberação controlada (SANTOS, 2020).

Em relação as NPLSs, são formadas a partir de lipídios que são sólidos a temperatura ambiente e corporal, sendo estabilizadas por tensoativos. Esses lipídios possuem ponto de fusão acima de 40 °C e formam um núcleo sólido revestido por moléculas de tensoativos que promovem uma estrutura cristalina altamente organizada, devido a isso o espaço para incorporação dos princípios ativos fica limitado (SANTOS, 2020).

Os métodos de preparo de CLN podem ser por alta energia e por baixa energia. A desvantagem do primeiro se baseia na possível degradação do medicamento em razão da alta pressão e temperatura, o custo elevado do equipamento de homogeneização de alta pressão também é uma inconveniência. A técnica de inversão de fases por temperatura é um método de baixo consumo energético que não usa solventes e pode se adequar para uso industrial (SANTOS, 2023).

O CLN produzido pelo método de baixa energia é um sistema capaz de carrear a bixina com a finalidade de uso na TFD contra *C. albicans* como uma alternativa aos problemas dos tratamentos tradicionais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Candidíase

A *C. albicans* é uma levedura que vive em comensalismo com os humanos imuno competentes. Esse fungo faz parte da microbiota das mucosas, como vaginal, trato gastrointestinal, sistema urogenital, pele, e mucosa do trato respiratório. Esse microrganismo ocupa a 4ª posição de causas de infecções hospitalares do Brasil (FROTA, 2018), gerando despesas hospitalares e sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos e críticos. Quando ocorre algum desequilíbrio hormonal, citopatológico e/ou imune a candidíase é manifestada, mais comumente no esôfago, boca e vagina, podendo se manifestar de forma superficial ou sistêmica (FROTA, 2018; NINS, 2023).

O gênero *Candida* apresenta cerca de 150 a 200 espécies, porém a *C. albicans* é a mais comum na infecção humana. Ela é uma levedura formada por uma célula ovalada ou esférica com variação de tamanho entre 2 a 10 micrômetros, são eucarióticas e podem se reproduzir assexuadamente, por conídios, e sexuadamente. De acordo com o local onde vivem podem se adaptar a ausência ou presença de oxigênio. Filamento e brotamento são formas que podem ser apresentados, assim como a formação de estruturas filamentosas, as hifas (longas, tubulares e ramificáveis) e pseudo-hifas (estrutura semelhante as hifas unidas como cadeias celulares), que dificultam a fagocitose do hospedeiro (NINS, 2023).

Além do dimorfismo, também tem a capacidade de formar biofilmes, o que confere mais virulência ao fungo e resistência aos compostos azólicos, medicamentos frequentemente usados na terapia convencional (FROTA, 2018). A parede celular desse microorganismo é formada principalmente por uma membrana plasmática fosfolipídica com vários esteróis com predomínio do ergosterol, e quitina que confere rigidez e resistência. Sua nutrição é por absorção de fontes de carbono do ambiente (NINS, 2023).

A sua patogenicidade se deve em grande parte a síntese de enzimas hidrolíticas que tem a capacidade de gerar danos teciduais por meio das proteinases, fosfolipases e hemolisina. A formação de biofilme em dispositivos médicos ou nos tecidos do hospedeiro também é um fator de virulência significativo, em que o arranjo da comunidade microbiana imóvel se encontra incorporado em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares sintetizada pelas próprias leveduras (FROTA, 2018; NETO 2019, NINS, 2023).

A patogenicidade da *C. albicans* contribui para a variedade de manifestações clínicas, que podem variar de indivíduos assintomáticos até uma infecção localizada de mucosas ou uma doença disseminada com potencial fatal (CAETANO et al., 2021). As manifestações dessa doença podem ocorrer por meio de lesões brandas, agudas ou crônicas, superficial ou profunda e possuir aspecto clínico amplamente variável, afetando com muita frequência a genital feminina com dores, vermelhidão, ardência e prurido. Na candidíase oral as manifestações clínicas são caracterizadas por placas brancas, lesão vermelha e dolorida no dorso da língua assim como a hiperplasia também na comissura labial. (DOS SANTOS et al., 2023).

## 2.2 Epidemiologia

Os principais afetados pelas infecções disseminadas ou crônicas da *C. albicans* com auto índice de mortalidade e morbidade são os pacientes críticos e imunocomprometidos, principalmente os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), os que estão passando por terapias anticancerígenas e os transplantados. A candidíase vaginal é considerada a causa mais comum de infecção fúngica grave, como também causa frequente de infecções hospitalares. A candidemia é uma infecção fúngica de muita importância para os pacientes hospitalares, levando ao aumento nos gastos hospitalares (FROTA, 2018; NINS, 2023).

## 2.3 Tratamento

Atualmente são usadas três classes de antifúngicos contra a candidíase, os azólicos, as equinocandinas e os poliênicos que totalizam 8 drogas aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration). O fluconazol ainda é amplamente prescrito, porém mediante a diretriz da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) as equinocandinas são potencialmente a terapia de primeira linha (ANDRADE NETO, 2019).

Em relação ao contexto nacional de saúde pública, a última relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME 2022) dispõe apenas de Anfotericina B, Nistatina, Nitrato de miconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol e Flucitosina como medicamentos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas. A limitação de antifúngicos na RENAME

2022 restringe o acesso a terapias de alta eficácia, como as equinocandinas, dificultando o manejo clínico de casos graves ou resistentes.

## **2.4 Terapia Fotodinâmica**

Na TFD ocorre a exposição de tecidos alvos ou células a corantes fotossensibilizantes com subsequente irradiação luminosa. É um processo que promove a excitação de moléculas fotossensíveis gerando EROs, que são citotóxicos, e desse modo, promovem a destruição celular e tecidual. A literatura mostra ações terapêuticas relacionadas ao crescimento celular indesejado ou anormal, como nas neoplasias, mas também em abordagens antimicrobianas para o controle de infecções, que é denominada terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) (RAMIREZ et al., 2023).

A aPDT é vantajosa pois existe uma preocupação crescente em relação ao surgimento de superbactérias e uso excessivo de antibióticos. Desse modo, infecções apresentam a possibilidade de intervenção pela aPDT, como um coadjuvante terapêutico promissor em diferentes cenários. Porém existem limitações para aplicação dessa técnica, como as propriedades físico-químicas dos fotossensibilizadores (FSs), como hidrossolubilidade, dificuldade de passagem intracelular, instabilidade em meio intracelular e, assim, a baixa biodisponibilidade. Então, com a finalidade de contornar esses impasses, existe a promissora possibilidade do encapsulamento de FSs por NPLs (RAMIREZ et al., 2023).

## **2.5 Fotossensibilizadores**

São moléculas que submetidas a uma fonte luminosa são capazes de absorver energia e transferir elétrons ou hidrogênio para moléculas vizinhas levando a produção de radicais livres (radical hidroxila, ânion superóxidos e peróxido de hidrogênio). O FS excitado também pode transferir a energia para o oxigênio molecular e gerar um oxigênio singlete (uma ERO gerada indiretamente pela transferência de energia dos estados tripleto do FS) (VICENTE et al., 2023). Os dois caminhos podem gerar oxidação de diversos compostos celulares resultando na morte celular (DE AQUINO JUNIOR, 2023).

As características ideais de um FS incluem: baixa toxicidade na ausência de luz, alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável, fotoestabilidade, solubilidade em meio fisiológico, baixa agregação principalmente em soluções aquosas e biológicas, quimicamente puro com rotas sintéticas curtas e alto rendimento, farmacocinética favorável com curto tempo de eliminação do corpo (LOPES, 2019).

### **2.5.1 Corantes naturais**

Muito empregados na indústria alimentícia e de bebidas para melhorar a aparência desses produtos, eles também possuem propriedades benéficas para a saúde em razão de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Normalmente extraídos de folhas, sementes e frutos de plantas, formam a base de medicamentos tradicionais da medicina, foram muito utilizados pelas civilizações da Índia e China antiga, sendo até hoje relevantes para a medicina tradicional (LOPES, 2019).

Os corantes são classificados em três grupos, os compostos heterocíclicos (como as clorofilas), compostos de estruturas isoprenóides (como os carotenóides, encontrados em plantas e animais) e os compostos heterocíclicos com oxigênio (como os flavonóides, exclusivos de vegetais). Os mais utilizados são o carmim, a curcumina, a betaína, a clorofila e o urucum. Essas substâncias são extraídas por processos como precipitações e dissoluções (LOPES, 2019).

#### **2.5.1.2 Bixina**

A BIX é um carotenóide presente predominantemente na superfície das sementes da *Bixa orellan L.* (metabólito secundário correspondente a 80% do pigmento encontrado em suas sementes), popularmente conhecida como urucum, uma planta nativa do Brasil. Ele é muito utilizado como condimento e corante de alimentos, e, também na indústria têxtil, farmacêutica, cosmética e de alimentos. Sua coloração varia do amarelo ao vermelho (CRUZ 2021; TAKATA, 2019).

Os carotenóides são pigmentos encontrados na natureza e possuem ação antioxidante relacionada a inserção de um oxigênio nas posições das duplas ligações. São reguladores do

sistema imune por ação quelante por meio da dissipação da energia do oxigênio reativo em forma de calor, o que o leve ao seu estado fundamental, característica necessária no combate de doenças relacionadas aos radicais livres, como mutações genéticas, envelhecimento precoce e doenças degenerativas (CRUZ, 2021; TAKATA, 2019).

#### *2.5.1.3 Potencial antimicrobiano do extrato de urucum*

A *Bixa orellana* é uma espécie vegetal brasileira que possui frutos chamados popularmente de urucum, atualmente esses frutos são alvos de estudos que comprovam várias atividades antioxidantes e antibacterianas, o que o torna viável para uso em aplicações médicas. Os estudos mostram o potencial antimicrobiano do extrato de urucum tanto contra bactérias, principalmente contra a *Staphylococcus aureus*, como suas muitas vantagens como FS na aPDT odontológica (JAO et al., 2023).

## **2.6 Nanopartículas lipídicas**

As NPLs são um sistema de carreamento de insumo farmacêutico lipofílico, desenvolvido nos anos 90. São dispersões aquosas com variação de tamanho de 50 a 1000 nm e possuem vantagens relacionadas a liberação controlada por serem biocompatíveis e biodegradáveis, o que fornece proteção contra a degradação química dos compostos lábeis incorporados, tornando um sistema menos tóxico. Existem dois tipos de NPLs, as NPLSs e os CLNs (NUNES, 2021; SANTOS, 2020).

### *2.6.1 Nanopartículas lipídicas sólidas*

As NPLSs foram desenvolvidas primeiro, sendo consideradas de primeira geração. São formadas por lipídios sólidos a temperatura ambiente e corporal e são estabilizadas por tensoativos. Esses lipídios possuem ponto de fusão acima de 40° C, o que forma um núcleo sólido e revestido por moléculas de tensoativos, resultando em uma estrutura cristalina altamente organizada. Essa estrutura é formada com tamanha perfeição que resulta em limitação

de espaço para incorporar princípios ativos, reduzindo sua libertação, aumento do crescimento de partículas e do processo de gelificação (NUNES, 2021; SANTOS, 2020).

Tendo em vista que as dispersões de nanopartículas sólido-lipídico melhoram a biodisponibilidade de diversos medicamentos de uso parenteral, oral, ocular, cutânea e aplicações cosméticas, têm sido amplamente empregadas por seus extensos benefícios tanto na melhora da administração como por serem seguros e eficazes. São substitutas para os sistemas coloidais convencionais, como, emulsões, lipossomas e micro nanopartículas poliméricas, pois possuem estabilidade por causa de sua matriz lipídica nuclear que pode ser composta por monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, esteróides, ceras e ácidos graxos. Porém com a finalidade de contornar suas limitações citadas no parágrafo acima, posteriormente foram desenvolvidos os CLNs (NUNES, 2021).

### ***2.6.2 Carreador lipídico nanoestruturado***

Os CLN possuem uma matriz lipídica composta por lipídios sólidos e líquidos, que são os óleos. Os lipídios mais usados são os triglicerídeos, esteróis, ceras, glicídios parciais e ácidos graxos. A associação de lipídios sólidos e líquidos forma uma matriz menos organizada e mais imperfeita, que é estabilizada por surfactantes e podem acomodar maior quantidade do insumo farmacêutico ativo e proporcionar mais flexibilidade para modular a liberação (SANTOS, 2020).

Outras vantagens dos CLNs são ausência de toxicidade, proteção contra a degradação química de substâncias lábeis, fácil esterilização, aumento de estabilidade de fármacos, boa biocompatibilidade e transposição para larga escala, além disso aumentam a estabilidade de compostos sensíveis a oxidação, hidrólise e luz. Ademais, eles são produzidos por componentes biodegradáveis e biocompatíveis, e, também não precisam de solventes orgânicos para sua produção (NUNES, 2021; SANTOS, 2020).

Em relação a solubilidade dos medicamentos, ela é melhorada em lipídios líquidos, que estão presentes nos CLNs, mas não estão presentes nas NPLSs, proporcionando maior quantidade de incorporação. Visto que os lipídios líquidos produzem uma matriz porosa que aumenta a eficiência na carga medicamentosa.

## 2.7 Métodos de produção de CLN

Para produzir CLNs existem dois tipos de métodos, os de baixa energia e os de alta energia. Os métodos de alta energia necessitam de grande quantidade de energia, um dos mais utilizados é a homogeneização por alta pressão, que é vantajoso por não necessitar da adição de solventes para sua preparação. É uma técnica consistente e eficaz para produção em larga escala. É um método que forma partículas altamente estáveis, porém pode resultar na possível degradação do medicamento em razão da alta temperatura e pressão. Outra desvantagem seria o alto custo do equipamento (DOS SANTOS, 2023).

Em relação aos métodos de baixa energia, são evidenciados pelas técnicas de microemulsão, emulsão dupla e emulsificação por inversão de fases. Possuem vantagens de não precisar de solventes, nem equipamentos de alto valor, além de não consumirem grande quantidade de energia para atingir a redução do tamanho das partículas, visto que podem levar a formação espontânea de partículas nanométricas, descartando assim o risco da possível degradação do medicamento pela alta pressão (DA SILVA, 2022; DOS SANTOS, 2023).

### 2.7.1 *Inversão de fases por temperatura*

O método de inversão de fases por temperatura não faz uso de energia extrema gerada por equipamentos mecânicos, mas usa o potencial químico dos componentes da formulação. Esse método usualmente usa agitação suave para formar as nanoemulsões e depende das propriedades físico-químicas intrínsecas dos surfactantes, co-surfactantes e dos demais componentes da formulação. (IACOVSKI, 2019).

Além das vantagens supracitadas, não usa solvente orgânico e forma a emulsão alterando os parâmetros, como temperatura e composição, que afetam o equilíbrio hidrófilolipófilo (EHL) da formulação. Nesse método, o processo de emulsificação produz uma transição de fases que mantém a composição do sistema constante, mas altera sua temperatura.

Por essa razão não é indicado para incorporar fármacos termolábeis (IACOVSKI, 2019).

Esse tipo de produção depende da energia química liberada por uma transição de fases, geralmente, desencadeada pela capacidade dos tensoativos não iônicos de modificar suas afinidades pela água e lipídios em razão da temperatura. Desse modo, o óleo, a água e os tensoativos não iônicos são homogeneizados na temperatura de inversão de fases, formando

assim, uma emulsão estável. Em sequência, esse nanosistema necessita de um rápido resfriamento, para formar gotículas e recristalizar o lipídio sólido. Sendo esse um método que pode ser adequado para a expansão industrial (DOS SANTOS, 2023).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados pelo método de baixa energia como sistema carreador da bixina para uso na terapia fotodinâmica contra *Candida albicans*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Preparar e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo bixina por baixa energia pelo método de inversão de fases por temperatura; b) Verificar a eficiência de encapsulação da bixina;
- c) Realizar análise térmica pela técnica termogravimétrica;
- d) Avaliar potencial zeta, índice de polidispersão e tamanhos por meio do espelhamento de luz dinâmico;
- e) Avaliar atividade antifúngica do carreador pelo método de concentração inibitória mínima e contagem de colônias.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As metodologias foram desenvolvidas entre abril e novembro de 2024 nos Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (LABDEM I) e Laboratório de Ensaio Microbiológicos (LABDEM II) na Universidade Estadual da Paraíba.

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 *Matérias Prima*

- Água destilada;
- Estearato de polioxietileno 40 (SIGMA-ALDRICH, SP, Brasil);
- Óleo de rícino (Mapric, Ipiranga, SP, Brasil);
- Triglicérides do ácido cáprico/caprílico (Lote: 1M0917J – Via Farma, São Paulo, SP, Brasil);
- Pluronic® F127 (Lote: SLBS1853V – SDAM, SIGMA-ALDRICH, SP, Brasil);
- Bixina
- Acetato de etila (Lote: 20533 – Cinética, Itapevi, São Paulo, Brasil);
- PBS (Lote: 1315622 - OXOID, Hampshire, England);
- Dimetilsulfóxido (Lote: 111696 – Dinâmica, Indaiatuba, São Paulo, Brasil);
- Caldo Sabouraud Dextrose (Lote: 091217505 – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná);
- Agar Sabouraud Dextrose (Lote: MC180497 – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná);
- Cepa de *C. albicans* 10231

#### 4.1.2 *Equipamentos*

- Destilador de água Pilsen SP5L – SPLABOR (Número de série: 03616/116 – Vila Formosa, Prudente, Brasil);
- Balança semi-analítica AW220 – Shimadzu (Número de série: B129171113 – Quioto, Honshu, Japão);

- Agitador magnético com aquecimento D0320-230V – Labnet (Número de série: ALB20210910- 07/10 – Coreia)
- Centrífuga DT - 4500 -110 V – Daiko (Número de série: N/S20181806 –)
- Espectrofotômetro – Shimadzu (Número de série: A109547 – Quioto, Japão);
- Banho ultrassônico LS-8DA-2/X – Embrasol (Número de série: LU0001526 – Itanhaém, São Paulo, Brasil);
- Estufa 502/3A – Fanem (Número de série: NAF - 64590 – Guarulhos, São Paulo, Brasil);
- Cabine de Fluxo Laminar FUV 12 – Veco (Número de série: PL16642 – Campinas, São Paulo, Brasil);
- Litesizer DLS 500, Antoon Paar, São Paulo, Brasil.
- Termobalança ShimadzuTM – TGA-50 (Número de série: C305651 – Barueri, SP, Brasil);

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A técnica utilizada para a formulação foi inversão de fases por temperatura através do método de baixa energia, foi utilizado 91,6% de água destilada e 3,5% de Pluronic® F127 para compor a fase aquosa e 0,9% de óleo de rícino, 2% de triglicérides do ácido cáprico/caprílico e 2% de estearato de polioxietileno 40 para compor a fase oleosa.

As fases foram pesadas em dois béqueres separados e em sequência foram levadas aos agitadores magnéticos com aquecimento por 10 minutos em uma faixa de temperatura entre 60° e 70° C, com agitação em 1500 rpm. Em sequência, após esse processo a fase aquosa foi vertida na fase lipídica também sob agitação máxima por mais 30 minutos. Por fim, o becker com a pré-emulsão passou por um banho de gelo com agitação manual por 5 minutos.

Para produção do CLN-BIX a BIX foi incorporada na fase lipídica na concentração de 1% em relação a essa mesma fase. Em sequência os passos dos processos foram seguidos normalmente como citado acima.

### 4.2.3 Caracterização físico-química

#### 4.2.3.1 Eficiência de encapsulação

O método utilizado para obtenção dos resultados foi por espectrofotometria UV-vis. Desse modo, o CLN-BIX foi centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos. Após esse processo o sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro UV-vis no comprimento de onda de 364 nm. Para encontrar o valor foi utilizada a equação 1:

$$\%EE = (M1/MT) \times 100$$

Em que:

EE: eficiência de encapsulação

M1: absorvância da BIX encapsulado no CLN

MT: absorvância teórica da BIX usada no CLN

#### 4.2.3.2 Diâmetro hidrodinâmico médio (DMN), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ)

A determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm) e do índice de polidispersão (IPD) do CLN-BIX foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS). O potencial zeta ( $\zeta$ ) (PZ) das nanopartículas foi avaliado por espalhamento eletroforético de luz (ELS) utilizando o mesmo equipamento, Litesizer DLS 500, Antoon Paar, São Paulo, Brasil. As medições foram efetuadas em réplicas, a uma temperatura de 25 °C. As amostras foram diluídas em água ultrapurificada (1:100), mantidas em frascos selados, vertidas para uma cubeta e colocadas na célula electroforética com um ângulo de dispersão de 90°.

#### 4.2.3.3 Termogravimetria (TG)

A técnica de análise térmica de TG foi utilizada com a finalidade de analisar a estabilidade térmica do sistema por meio da termobalança ShimadzuTM (TGA-50). Foram utilizados cadinhos de platina para analisar 10 mg da amostra que foram aquecidas em um intervalo de 40 a 900 °C com taxa de 10 °C/min sob fluxo de nitrogênio de 100 mL/min. Para

padronizar a calibração do equipamento utilizou-se o oxalato de cálcio monoidratado, para a calibração da massa.

#### **4.2.4 Tratamento da cepa**

Para a análise da avaliação *in vitro* foi utilizada a linhagem de referência de *C. albicans* (ATCC 10231) obtida da American Type Culture Collection (ATCC). O meio de cultura utilizado foi o caldo de levedura com base de nitrogênio suplementado com D - (+) - glicose 100 mM que manteve a *C. albicans*. Para o subcultivo da levedura foram utilizadas placas de ágar Sabouraud Dextrose incubadas a 37°C por 48h.

O inóculo do microorganismo foi preparado a partir da Escala de McFarland em que a suspensão é padronizada em 530 nm por meio do uso de um espectrofotômetro com a finalidade de se obter uma concentração equivalente a  $5 \times 10^6$  UFC/mL.

#### **4.2.5 Tratamento contra culturas planctônicas**

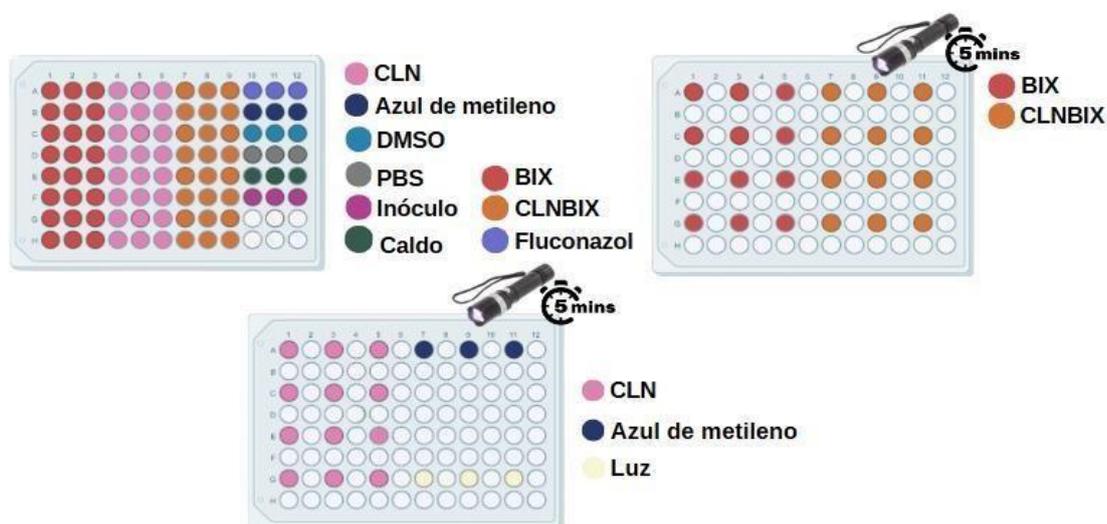
O tratamento das culturas planctônicas foi realizado pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por meio do método de microdiluição em caldo (conforme a norma M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)) e pela técnica de contagem de colônias.

O ensaio foi realizado em uma microplaca de 96 poços de fundo chato com adição de 100 µL de caldo Sabouraud-Dextrose, 5 µL de suspensão de *C. albicans*, 100 µL de solução de BIX, CLN, CLN-BIX ou controle positivo, composto por fluconazol, azul de metileno, dimetilsulfóxido 20% (DMSO), ou controle negativo composto por solução salina tamponada com fosfato (PBS), aplicação de luz no caldo com o inóculo, caldo e inóculo, e, por fim, o controle do caldo, composto apenas pelo caldo.

Dando prosseguimento, foram realizadas triplicatas e diluições seriadas de 250-1,953124 µg/mL para as soluções de BIX, CLN e CLN-BIX. Os controles também foram realizados em triplicata. Para realizar a aplicação de luz, as soluções foram separadas em grupo com e sem aplicação de luz, com pré-incubação de 30 minutos em temperatura ambiente para a posterior aplicação de luz por meio do uso da LED branca (Feniz™, LD01, 113 J. cm<sup>-2</sup>) por

5 minutos, como pode ser observado na figura 1. Por fim, a microplaca foi incubada na estufa bacteriológica a 35-37 °C por 24-48 horas.

**Figura 1.** Distribuição das soluções e controles nas microplacas.



CLN, carreador lipídico nanoestruturado; BIX, solução de bixina; CLN-BIX, carreador lipídico nanoestruturado contendo bixina; DMS, dimetilsulfóxido; PBS, solução salina tamponada com fosfato. Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Para revelar as placas, definir a CIM e selecionar as diluições para a contagem de colônias, foi utilizada a resazurina a 0,01% (Sigma Aldrich®). Em relação a contagem de colônias (CC), as diluições de conteúdo azul/roxo das microplacas foram semeadas em placas de Petri com ágar Sabouraud-Dextrose, em sequência foi realizada a incubação das placas por 24 horas a 35-37°C na estufa bacteriológica.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Carreador lipídico nanoestruturado por baixa energia

As características macroscópicas do CLN e CLN-BIX podem ser observadas na figura 2.

**Figura 2.** Características macroscópicas do CLN (a) e CLN-BIX (b).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Macroscopicamente o CLN apresentou-se como uma solução de aspecto leitoso e coloração esbranquiçada, já o CLN-BIX apresentou-se como uma solução também de aspecto leitoso, porém com coloração amarelada, devido à cor da BIX, que varia de amarelo a vermelhoalaranjado (GOMES, 2019). As características macroscópicas do CLN e CLN-BIX podem ser observadas na figura 2.

### 5.2 Caracterização físico-química dos CLN

#### 5.2.1 *Diâmetro hidrodinâmico médio (DMN), índice de polidispersão (IPD) e Potencial Zeta (PZ)*

Os parâmetros de DMN e IPD foram realizados pela técnica de DLS e o PZ pela técnica de espalhamento de luz eletroforética. Os valores obtidos pela medição desses parâmetros estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).

Parâmetros avaliados	CLN-BIX
Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	239,153
Índice de polidispersão	1,646495
Potencial zeta (mV)	-12,7021

Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Esses são critérios essenciais pois têm relação direta com o início da perda de estabilidade dos sistemas. Em relação ao DMN e ao IPD, possuem sua importância focada no desenvolvimento de formulações nanoestruturadas, pois estão relacionados com os efeitos biológicos e capacidades de internacionalização celular e biodistribuição. Já o PZ é geralmente utilizado para prever o período de estabilidade eletrostática das formulações (GASPARI, 2018; NUNES, 2021; SANTOS, 2020).

O valor referente ao DMN do CLN-BIX apresentou-se em 239,153 estando dentro da escala nanométrica (1-1000 nm) e próximo do carreador produzido por um tipo de método de baixa energia por Dos Santos (2023), que obteve o valor de DMN de 247,7 nm. Tendo em vista a pesquisa de Subramaniam (2020), é ideal que o tamanho de partículas usadas na administração de medicamentos em células biológicas seja entre 50 e 200 nm, sendo o valor obtido muito próximo do ideal.

Em relação ao IPD, valores abaixo de 0,35 são considerados ótimos, pois indicam maior homogeneidade das partículas (GASPARI, 2019; NUNES 2021). No entanto, o CLN-BIX apresentou um valor de 1,646495, desse modo Araujo (2019) justifica que menores valores de IPD são encontrados em métodos que fornecem maior quantidade de energia, de modo que aumenta a entropia e possibilita maior dispersão dos componentes, justificando assim o alto valor de IPD obtido.

O PZ do CLN-BIX foi de -12,7, valor um pouco inferior ao dos CLNs com encapsulação de outro fotossensibilizador produzido por Santos (2020) e Nunes (2021), pois os mesmos apresentaram  $-17,8 \pm 0,54$  a  $-19,90 \pm 0,5$  e  $-17,70 \pm 0,54$  a  $-19,90 \pm 0,50$  mV, porém todos permaneceram na faixa que varia de valores acima de +30 mV ou abaixo de -30 mV considerada como uma boa estabilização eletrostática por gerar repulsão entre as partículas e evitar sua aglomeração (DOS SANTOS, 2015).

### **5.2.2 Eficiência de Encapsulação (EE%)**

A EE% foi medida através da análise do sobrenadante por espectrofotometria UV- vis.

Seu resultado está expresso na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultado da eficiência de encapsulação (EE%) do CLN-BIX.

Formulação	EE%
CLN-BIX	81,5%

Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

A técnica utilizada se baseia na separação do encapsulado e do não encapsulado, por meio da força centrífuga. Desse modo, na parte de cima do sobrenadante se concentra a fração encapsulada, e a parte não encapsulada se deposita na região inferior. (GONÇALVES, 2018).

Por meio dos resultados da EE% foi possível avaliar a quantidade de BIX encapsulada pelo CLN. O valor obtido foi de 81,50%, que corresponde a 8,15 mg de BIX por grama de fase lipídica de CLN, como pode ser observado na Tabela 2, valor superior ao CLN produzido com os mesmos excipientes e utilizando alta energia por outros autores (SANTOS et al., 2022) que apresentou EE% de  $75,57\% \pm 0,58$ . Desse modo o CLN-BIX apresentou uma EE% considerada alta (SANTOS, 2020; SALES et al., 2024), desse modo evita agregação pois grande parte da BIX está incorporada no CLN (NUNES, 2021).

Portanto, os resultados obtidos são em razão das vantagens dos CLN, pois a formação dos cristais imperfeitos na rede cristalina da matriz lipídica sólida quando ocorre a mistura de lipídeos líquidos permite a formação de um espaço que é suficiente para a acomodação de moléculas do ativo, que conduz para melhorar a capacidade de eficiência de encapsulação, e desse modo reduz o tempo de expulsão do ativo (SANTOS, 2020).

A alta solubilidade do ativo no lipídio fundido é um pré-requisito para a alta capacidade de encapsulação. Ademais, estudos realizados em 2011 mostraram que a capacidade de incorporação depende também de propriedades físico-químicas do fármaco, além da composição da matriz lipídica do estado cristalino (SANTOS, 2020).

## 5.3 Análise Térmica

### 5.3.1 Análise Termogravimétrica (TG)

Os resultados dos valores obtidos pela TG podem ser observados na Tabela 3. A figura 3 representa as curvas termogravimétricas obtidas e suas comparações entre BIX, CLN, CLNBIX e os excipientes.

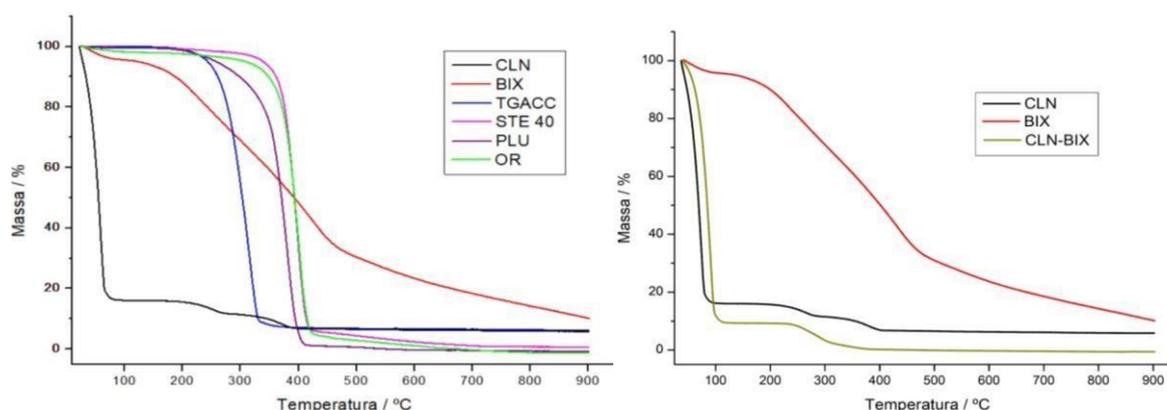
**Tabela 3.** Resultados obtidos da análise termogravimétrica dos constituintes do CLN-BIX.

Amostra	Temperatura (°C)	Perda de massa
BIX	262.93–450.13	63,08%
OR	387.41–421.59	90,46%
PLU	359.15–406.05	97,51%
STE	384.05–419.86	91,63%
CLN-BIX	58.15-91.55	90,45%
CLN	58.18-84.81	83,25%
TGACC	284.74–326.49	97,04%

BIX, bixina; OR, óleo de rícino; PLU, pluronic F124; STE, stearato de polioxiétileno 40; CLNBIX, carreador lipídico nanoestruturado contendo bixina; CLN, carreador lipídico nanoestruturado; TGACC, triglicerídeos do ácido cáprico caprílico. Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Desse modo os eventos analisados na Tabela 3 podem ser observados na figura 3.

**Figura 3.** Curvas termogravimétricas da BIX, CLN, CLN-BIX e excipientes.



BIX, bixina; OR, óleo de rícino; PLU, pluronic F124; STE, stearato de polioxiétileno 40; CLNBIX, carreador lipídico nanoestruturado contendo bixina; CLN, carreador lipídico nanoestruturado; TGACC, triglicerídeos do ácido cáprico caprílico. Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

A TG se baseia na medição da mudança de massa em função da temperatura que pode ser causada por eventos como: decomposição, oxidação e perda de compostos voláteis que constituem a amostra analisada. São eventos medidos em condições de atmosfera e temperatura específicas e assim analisam a estabilidade das amostras (Y ARAÚJO, 2022).

A Tabela 3 apresenta os eventos de perda quase total das massas do CLN (58.18-84.81° C, com perda de 83,25% de massa) e CLN-BIX (58.15-91.55° C, com perda de 90,45% de massa) antes dos 100° C, que se deve a composição desses carreadores, formada em sua maior parte por água. A BIX se mostra como o componente mais estável dentre os excipientes, pois apresenta-se com a menor perda de massa (262.93–450.13° C, com perda de 63,08% de massa) dentre os demais. Os excipientes do CLN possuem curvas semelhantes, porém a curva do TGACC destoa dos outros excipientes perdendo mais massa antes dos 400 °C (284.74–326.49° C, com perda de 97,04% de massa).

Através da figura 3 pode-se observar que a BIX tem boa estabilidade térmica pela pouca variação de massa em uma grande variação de temperatura. Comparando o CLN e o CLN-BIX, ambos apresentam desenho de curva muito semelhante, porém o CLN perde mais de 70% de sua massa antes dos 100 °C, já o CLN-BIX aproximadamente 80% de massa aos 100 °C.

## 5.4 Análise da Atividade Antifúngica

### 5.4.1 concentração inibitória mínima (CIM) e contagem de colônias (CC)

E, por fim, a avaliação da atividade antifúngica por CIM e CC, em que os controles se mostraram coerentes e os métodos apresentaram valores satisfatórios da atividade antifúngica da BIX e do CLN-BIX com e sem a presença de luz, como pode ser observada na Tabela 4.

**Tabela 4.** Avaliação da atividade antifúngica por concentração inibitória mínima (CIM) e contagem de colônia (CC).

Sistemas	Condição	CIM (µg/mL)	CC (%)
<b>BIX</b>	sem luz	125	90
	com luz	62,53	99
<b>CLN-BIX</b>	sem luz	250	0

---

com luz	125	90
---------	-----	----

---

Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

A BIX, sem luz e com luz, apresentou CIM de 125 e 62,53  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, enquanto o CLN-BIX sem luz e com luz apresentaram CIM de 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. De acordo com Sartoratto et al. (2004), conforme citado por Bezerra (2022), para compostos naturais, CIM com valores de 50 a 500  $\mu\text{g/mL}$  indicam excelente atividade antimicrobiana, já valores acima de 600 a 1500  $\mu\text{g/mL}$  indicam atividade moderada e fraca, respectivamente. Assim, a BIX e o CLN-BIX tanto com luz, como sem luz, mostraram excelente atividade antimicrobiana, porém, vale ressaltar que a presença de luz em ambos obteve melhor resultado, evidenciando o potencial da aPDT.

Na CC, o grupo sem luz apresentou redução de 1 log (90%) para a BIX, mas não houve redução para CLN-BIX. Na presença de luz houve redução de 2 logs (99%) e 1 log (90%), respectivamente, mostrando uma redução estatística significativa.

O melhor resultado de atividade antifúngica por CIM e CC da BIX foi na presença de luz, assim como o CLN-BIX, já, o mesmo, não apresentou atividade antifúngica sem luz por CC, o que pode indicar uma atividade fungistática na CIM, pois a *Candida* voltou a se multiplicar por CC.

Os resultados também mostraram que a BIX possui maior atividade antifúngica quando não está encapsulada, o que pode sugerir uma vantajosa utilização direta em algumas aplicações que são necessárias ações rápidas, como no tratamento de infecções superficiais ou tópicas.

Ademais, a encapsulação da BIX é crucial para solubilizá-la, sendo esta, a principal problemática abordada no presente estudo. A encapsulação além de aumentar a estabilidade, já que é um composto fotossensível, também protege a BIX da degradação.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível produzir o CLN-BIX com tamanho e propriedades físicoquímicas satisfatórias. Foi demonstrada adequada atividade antifúngica, além de seu aumento com uso da luz, comprovando o potencial terapêutico da aPDT. Embora a BIX tenha demonstrado maior eficácia em comparação ao CLN-BIX, a encapsulação é imprescindível para melhorar a solubilidade da BIX em meio fisiológico. Perspectivas futuras incluem a utilização desse sistema em testes com cepas de diferentes tipos de *Candida*, incluindo cepas resistentes, além de sua aplicação em formas farmacêuticas específicas para o local de infecção, como óvulos vaginais, filmes bucais e pomadas.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE NETO, João Batista de. Avaliação in vitro do sinergismo da cetamina com derivados azólicos em micro-organismos na forma planctônica e em isolados formadores de biofilme. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/44162>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- BEZERRA, Brenda Maria Silva. Sistemas híbridos ureasil-poliéter para co-administração de curcumina e miconazol contra *Candida albicans*. Uepb.edu.br, 2022. Disponível em: <<https://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/28893>>. Acesso em: 10 set. 2024.
- DA SILVA, Victor Carlos Mello. Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo alumínioftalocianina para terapia fotodinâmica contra melanoma: desenvolvimento, caracterização e teste de eficácia in vitro. 2022. Disponível em: <[http://www.realp.unb.br/jspui/bitstream/10482/44245/1/2022\\_VictorCarlosMellodaSilva.pdf](http://www.realp.unb.br/jspui/bitstream/10482/44245/1/2022_VictorCarlosMellodaSilva.pdf)>. Acesso em: 27 nov. 2024.
- DE AQUINO JUNIOR, Antonio Eduardo et al. Fotossensibilizadores. Simplificando a terapia fotodinâmica para profissionais de saúde, 2023. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/directbitstream/20971ed1-58c7-4359-82741209c86fe847/3172908.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2024.
- CAETANO, Gabriela Maria et al. Atividade antifúngica do alho (*allium sativum*) sobre *Candida albicans*. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, n. 1, p. 112-126, 2021. Disponível em: <<https://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/731>>. Acesso em: 14 set 2024.
- CRUZ, Jaqueline Silva. Avaliação da atividade antifúngica do óleo vegetal de *Bixa orellana* L.(Urucum) puro e veiculado em pomada endodérmica em cepas de *Trichophyton rubrum*. 2022. Disponível em: <<https://dspace.uniceplac.edu.br/handle/123456789/1569>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- DOS SANTOS, Anna Kassya Neris et al., 2023 *et al.* **MANIFESTAÇÕES ORAIS FÚNGICAS CAUSADAS POR *CÂNDIDA ALBICANS***. TCC - Odontologia. Disponível em: <<https://repositoriodigital.univag.com.br/index.php/odonto/article/view/1891>>. Acesso em: 23 ago. 2024.
- DOS SANTOS, Giselly Almeida. Permeação cutânea do voriconazol a partir de nanossistemas lipídicos. 2015. Disponível em: <<https://bdm.unb.br/handle/10483/13713>>. Acesso em 18 set. 2024.
- DOS SANTOS, Vinícios Freitas. Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados para potencial tratamento da leishmaniose cutânea. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/56303>>. Acesso em: 28 abr. 2024.

FROTA, Heloisa Freire. Atividade fungicida do peptídeo antimicrobiano, Lys-A1, e sinergismo com cetoconazol contra *Candida albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750. 2018. Disponível em: < <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/72987>>. Acesso em: 19 abr. 2024.

GASPARI, Alexandre Rodrigues. Avaliação biológica de nanocarreadores de doxorrubicina em células de câncer de bexiga. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17137/tde08012019142441/en.php>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

GOMES, Aralí da Costa. Extração e microencapsulação de bixina por liofilização. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Disponível em: < <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/34635/1/DISSERTA%20Aral%20da%20Costa%20Gomes.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2024.

GONÇALVES, Miriam Mendes. Produção e caracterização de nanopartículas derivadas de poliácridatos contendo tamoxifeno e nitroprussiato de sódio, com possível aplicabilidade no tratamento do câncer. 2018. Disponível em: < <https://bdm.unb.br/handle/10483/20938>>. Acesso em: 27 out. 2024.

Governo do Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos. Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2022 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.conass.org.br/wpcontent/uploads/2022/01/RENAME-2022.pdf>. Acesso em: 12 out. 2024.

Governo do Brasil. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde CONITEC – **Terapia fotodinâmica é incorporada no SUS**. Disponível em: < <https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2023/setembro/terapia-fotodinamicaeincorporada-no-sus>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

IACOVSKI, Roniele Balvedi et al. Desenvolvimento de nanoemulsão de carvacrol com atividade antimicrobiana. 2019. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/234517>>. Acesso em: 30 set. 2024.

JAO, Ying; DING, Shinn-Jyh ; CHEN, Chun-Cheng. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of oral infections: A systematic review. **Journal of Dental Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1453–1466, 2023. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1991790223002076>>. Acesso em: 28 nov. 2024.

LEITE, Aliana Monteiro. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo fração oleosa da Bixa orellana L. como alternativa terapêutica no tratamento da leishmaniose cutânea.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/35743>>. Acesso em: 02 jun. 2024.

LOPES, Thais de Assis. Fotocatálise e suas aplicações em reações de ciclização oxidativa e terapia fotônicas. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/11789>>. Acesso em: 02 jun. 2024.

NINS, Catarina Diniz. Principais mecanismos de resistência de *Candida albicans* e de espécies de candidas não albicans: uma revisão bibliográfica. 2023. Disponível em: <<https://monografias.ufop.br/handle/35400000/5837>>. Acesso em: 06 jun. 2024.

NUNES, Desenvolvimento de Ftalocianina encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados. **Uepb.edu.br**, 2021. Disponível em: <<https://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/24431?mode=full>>. Acesso em: 17 jul. 2024.

RAMIREZ, Iago et al. Associação entre Terapia Fotodinâmica antimicrobiana e Nanotecnologia: Revisão Sistemática e Meta-análise. **Archives of health Investigation**, v. 12, n. 1, p. 33-48, 2023. Disponível em: <<https://archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/5816>>. Acesso em: 06 jun. 2024.

TAKATA, Gustavo Muneo. **Desenvolvimento e avaliação de nova preparação de anfotericina B e/ou cetoconazol em dispersão de bixina, pululana e trealose .** 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <[https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/09/1290784/gustavo\\_muneo\\_takata\\_me\\_corrigida.pdf](https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/09/1290784/gustavo_muneo_takata_me_corrigida.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2024.

VICENTE, Maria Luiza Ferreira et al. Nanopartículas de fuligem isoladas agindo como uma fonte eficiente de oxigênio singlete. Livro de Resumos, 2023. Disponível: <[https://repositorio.usp.br/directbitstream/2f4fcc8b-c4b7-451f-9c1fe503acdc34ad/PROD034451\\_3134746.pdf](https://repositorio.usp.br/directbitstream/2f4fcc8b-c4b7-451f-9c1fe503acdc34ad/PROD034451_3134746.pdf)>. Acesso em: 27 nov. 2024.

SALES, Santos; DE, Lôbo; LAVINYA, Maria; et al. Ensaio de pré-formulação e desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado visando a terapia antileishmaniose. Revista Brasileira Multidisciplinar, v. 27, n. 1Supl, p. 93–110, 2024. Disponível em: <<https://www.revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/2160>>. Acesso em: 4 set. 2024.

SANTOS, Karen Loraine Macena et al. Potencial fotodinâmico da ftalocianina de zinco hexadecafluoro em carreadores lipídicos nanoestruturados: caracterização físico-química, administração de fármacos e efeito antimicrobiano contra *Candida albicans* . Lasers Med Sci

37, 3183–3191 (2022). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-022-03594-0>>. Acesso em: 06 jun. 2024.

SANTOS, Karen Loraine Macena. Carreadores lipídicos nanoestruturados para incorporação de ftalocianina e utilização na terapia fotodinâmica. **Uepb.edu.br**, 2020. Disponível em: <<https://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/4153>>. Acesso em: 18 jul. 2024.

Y ARAÚJO, Sara Efigênia Dantas De Mendonça. Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ftalocianina dispersos em materiais híbridos associados a terapia fotodinâmica para a candidíase vulvovaginal. 2022. Disponível em: <<https://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/169?offset=60>>. Acesso em: 10 de ago. 2024.