



Laís Fernandes Aguilera

**Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana carreando curcumina para
avaliação de inativação fotodinâmica**

Campo Grande – MS

2024



Laís Fernandes Aguilera

**Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana carreando curcumina para
avaliação de inativação fotodinâmica**

Dissertação apresentada a banca examinadora, como critério parcial de aprovação para a obtenção do Título de Mestre em Ciências dos Materiais do Programa de Pós-graduação em Ciências dos Materiais do Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof. ° Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires.

Campo Grande – MS

2024



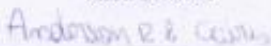

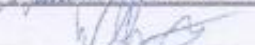
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais
Mestrado

Aos catorze dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e quatro, às oito horas, na Viconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Anderson Rodrigues Lima Caires (UFMS), Samuel Leite de Oliveira (UFMS) e William Marcondes Facchinatto (Aveiros/Port), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **LAÍS FERNANDES AGUILERA**, CPF 04159883141, do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana carreando curcumina para avaliação de inativação fotodinâmica**" e orientação de Anderson Rodrigues Lima Caires. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires (Interno)		Aprovada
Dr. Cicero Rafael Cena da Silva (Interno) (Suplente)	_____	_____
Dr. Evaristo Alexandre Falcão (Externo) (Suplente)	_____	_____
Dr. Samuel Leite de Oliveira (Interno)		Aprovada
Dr. William Marcondes Facchinatto (Externo)		Aprovada

RESULTADO FINAL:


Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

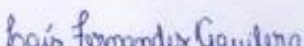
OBSERVAÇÕES:

Nada a declarar.

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:


Presidente da Banca Examinadora


Aluna

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que iluminou meu caminho e me fez prosseguir firme em meus objetivos. A minha família por todo apoio e compreensão nos momentos de ausência, em especial aos meus irmãos Thais Fernandes Aguilera e André Luiz Aguilera, e aos meus pais Dorival Aguilera e Maria Cícera Fernandes Aguilera, por todos os ensinamentos e conselhos ao longo de minha vida, sou muito grata por tudo que fizeram por mim desde a minha existência.

Ao meu amado esposo Leandro Oliveira Araujo, pelos ensinamentos, esclarecimentos de dúvidas e paciência, por todo apoio, incentivo, suporte e colaboração em todo esse caminho e por sempre estar comigo em todos os momentos de conquistas e aflições.

Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson Lima Caires, por toda sua disponibilidade para esclarecimentos de dúvidas, paciência e orientação durante todo o processo da minha pesquisa.

A todos os professores que fizeram parte da minha trajetória.

Aos meus colegas de laboratório do grupo Óptica e Fotônica da UFMS, em especial Dr. William M. Facchinatto, Dr. Montcharles Pontes da Silva, Dra. Regiane Godoy de Lima, aos doutorandos Thalita Hellen Nunes Lima, Fernando da Conceição, que me auxiliaram, compartilhando experiências e ensinamentos, auxiliando no desenvolvimento de várias etapas da minha pesquisa.

A nossa querida técnica de laboratório Hellenicy que sempre esteve disposta a ajudar, pela amizade e parceria.

Aos alunos de iniciação científica pela amizade, parceria e colaborações, Jhoenne Vasconcelos, Gabriella Miessi e Raphael Flores.

Também gostaria de agradecer a CAPES pela bolsa de mestrado concedida no segundo ano da realização da minha pesquisa.

Enfim agradeço imensamente a todos que me auxiliaram de forma direta ou indireta em cada etapa dessa conquista.



“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.” Sócrates.

RESUMO

Há muito tempo a humanidade enfrenta diversas doenças ocasionadas por infecções bacterianas. A descoberta dos antibióticos mudou completamente a medicina moderna e prolongaram a expectativa de vida humana. Contudo, abusos e utilização indevida de antibióticos ao longo dos anos é um dos fatores que leva a atingir a resistência bacteriana a níveis alarmantes. O desenvolvimento de uma nova geração de medicamentos anti-infecciosos utilizando produtos naturais antimicrobianos é bastante promissor, outra estratégia promissora para erradicar os microrganismos é a inativação fotodinâmica (IFD). Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas (NPs) de quitosana carreando curcumina (NPs Cur) para avaliar sua eficácia no processo de inativação fotodinâmica (IFD). As NPs Cur foram caracterizadas por microscopia de força atômica, espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta. Além disso as NPs-Cur obtiveram uma eficiência de encapsulação de 96%, e uma liberação mais lenta em comparação a curcumina livre. Para a realização dos ensaios biológicos foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Elas foram divididas em dois grupos: (I) grupo irradiado e (II) grupo não-irradiado. O tempo de internalização das NPs foi de 1 hora. Os grupos irradiados de ambas as cepas foram submetidos a 1 hora de iluminação com luz LED, no comprimento de onda de 450 nm (azul) e dose energética de $28,84 \text{ mW.cm}^{-2}$. As concentrações de NPs Cur, $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$; Polaxamer 407 a 25 mg.mL^{-1} e Quitosana + TPP a 1 mg.mL^{-1} , para IFD foram testadas. Para realizar as análises morfológicas das cepas após a IFD, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Crio-ME). Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) utilizou-se o marcador fluorescente dihydroethidium (DHE) e monitorou a produção de EROs ao longo do tempo. As NPs Cur apresentaram efeitos fotodinâmicos para as duas cepas testadas, bem como induziram efeitos bactericidas nas concentrações mais altas testadas. Os resultados de MEV e Crio-ME mostraram que a IFD promoveu mudanças morfológicas nas estruturas das paredes celulares das bacterianas, lisando as células. Os resultados obtidos indicam que as NPs Cur possuem potencial para fotoinativação de bactérias e que esses resultados estão diretamente relacionados a produção de EROs.

Palavras chaves: nanopartículas, quitosana, curcumina, inativação fotodinâmica, bactérias.

ABSTRACT

For a long time, humanity has faced several diseases caused by bacterial infections. The discovery of antibiotics completely changed modern medicine and extended human life expectancy. However, abuse and misuse of antibiotics over the years is one of the factors that leads to bacterial resistance reaching alarming levels. The development of a new generation of anti-infective medicines using natural antimicrobial products is very promising. Another promising strategy to eradicate microorganisms is photodynamic inactivation (PDI). In view of this, the present work aimed to synthesize and characterize chitosan nanoparticles (NPs) carrying curcumin (Cur NPs) to evaluate their effectiveness in the photodynamic inactivation (PDI) process. Cur NPs were characterized by atomic force microscopy, dynamic light scattering and Zeta potential. Furthermore, Cur-NPs achieved an encapsulation efficiency of 96%, and a slower release compared to free curcumin. To carry out the biological tests, the strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) were used. They were divided into two groups: (I) irradiated group and (II) non-irradiated group. The NPs internalization time was 1 hour. The irradiated groups of both strains were subjected to 1 hour of illumination with LED light, at a wavelength of 450 nm (blue) and an energy dose of 28.84 mW.cm⁻². The concentrations of NPs Cur, 0.02 mg.mL⁻¹; 0.04 mg.mL⁻¹; 0.08 mg.mL⁻¹; Polaxamer 407 at 25 mg.mL⁻¹ and Chitosan + TPP at 1 mg.mL⁻¹ for IFD were tested. To perform morphological analyzes of the strains after IFD, scanning electron microscopy (SEM) and Transmission Electron Cryomicroscopy (Cryo-ME) images were obtained. To evaluate the production of reactive oxygen species (ROS), the fluorescent marker dihydroethidium (DHE) was used and the production of ROS was monitored over time. Cur NPs showed photodynamic effects for the two strains tested, as well as inducing bactericidal effects at the highest concentrations tested. The SEM and Cryo-ME results showed that IFD promoted morphological changes in the structures of bacterial cell walls, lysing the cells. The results obtained indicate that Cur NPs have the potential for photoinactivation of bacteria and that these results are directly related to the production of ROS.

Key words: nanoparticles, chitosan, curcumin, photodynamic inactivation, bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 DESCOBRINDO OS MICRORGANISMOS.....	14
1.2 EXPLORANDO O MUNDO MICROSCÓPIO: CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS	15
1.3 DESAFIOS E IMPLICAÇÕES DAS BACTÉRIAS NO PASSADO E NA ERA MODERNA	18
1.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	19
1.5 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA (IFD)	21
1.6 NANOPARTÍCULAS	23
1.7 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (NPsP).....	24
1.8 QUITOSANA	25
1.9 CURCUMINA.....	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 MATERIAIS.....	30
3.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	30
3.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS.....	30
3.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DAS NPs-CUR QUANDO REFRIGERADA E DEIXADA A TEMPERATURA AMBIENTE.....	31
3.5 ANÁLISE DO EFEITO TYNDALL.....	32
3.6 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL) E POTENCIAL ZETA (Z).....	32
3.7 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	33
3.8 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV-VIS) E FLUORESCÊNCIA	33
3.9 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) ..	34
3.10 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA.....	35
3.11 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	35
3.12 EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS	36
3.13 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS INTERFACES SOBRE A VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA	38

3.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS BACTÉRIAS	38
3.15 CRIOMICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (CRIO-ME) DAS BACTÉRIAS....	39
3.16 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	40
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	41
4.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS E CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA	42
4.3 ANÁLISE DO EFEITO TYNDALL.....	44
4.4 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL) E POTENCIAL ZETA (Z).....	45
4.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	46
4.6 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR).....	46
4.7 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV-VIS) E FLUORESCÊNCIA	48
4.8 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA.....	49
4.9 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	50
4.9 EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS	53
4.10 EFEITO DAS INTERFACES SOBRE A VIABILIDADE CELULAR BACTERIANA	60
4.11 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA: MEV DAS BACTÉRIAS E. COLI E S. AUREUS SUBMETIDA À IFD.....	61
4.12 CRIOMICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (CRIO-ME)	64
4.13 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	66
5 CONCLUSÕES.....	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: O MICROSCÓPIO DE VAN LEEUWENHOEK; A) RÉPLICA DO MICROSCÓPIO DE VAN LEEUWENHOEK; B) DESENHOS DE LEEUWENHOEK, REPRESENTANDO AS BACTÉRIAS	14
FIGURA 2: ALGUNS TIPOS DE MORFOLOGIA BACTERIANA	16
FIGURA 3: PROCESSO DE REPRODUÇÃO BACTERIANA ATRAVÉS DA FISSÃO BINÁRIA.....	16
FIGURA 4: COLORAÇÃO DE GRAM.	17
FIGURA 5: PAREDES CELULARES DE BACTÉRIAS. A) E B) DIAGRAMAS ESQUEMÁTICOS DE PAREDES CELULARES GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS, RESPECTIVAMENTE. A FOTO NO CENTRO MOSTRA CÉLULAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E <i>ESCHERICHIA COLI</i> , APÓS A COLORAÇÃO DE GRAM.....	18
FIGURA 6: PRINCIPAIS MECANISMOS BACTERIANOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	20
FIGURA 7: PRINCÍPIOS DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DEMOSTRADO NO DIAGRAMA DE JABLONSKI.....	22
FIGURA 8: CARACTERÍSTICAS DAS NANOPARTÍCULAS – SISTEMAS DE ENTREGA E APLICAÇÕES.	23
FIGURA 9: TÉCNICAS DE PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	25
FIGURA 10: ESTRUTURAS QUÍMICAS DA QUITINA E QUITOSANA.....	25
FIGURA 11: CÚRCUMA LONGA E MOLÉCULA CURCUMINA.....	27
FIGURA 12: CONCENTRAÇÕES PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO.	30
FIGURA 13: PROCESSO DE PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS.....	31
FIGURA 14: ANÁLISE QUALITATIVA DO EFEITO TYNDALL.....	32
FIGURA 15: ILUSTRAÇÃO AFM WORKSHOP TT2.	33
FIGURA 16: ILUSTRAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO INFRAVERMELHO FTIR.	34
FIGURA 17: PROCESSO DE CRESCIMENTO BACTERIANO.	36
FIGURA 18: PROCESSO ESQUEMATIZADO DO ENSAIO BIOLÓGICO.....	37
FIGURA 19: ILUSTRAÇÃO DO LEITOR DE MICROPLACAS BIOTEK.....	38
FIGURA 20: A) PROCESSO DE DEPOSIÇÃO DE OURO NAS AMOSTRAS; B) MICROSCÓPIO MEV JEOL MODELO (JSM-6380LV).	39
FIGURA 21: A) ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA CURCUMINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DILUÍDA EM ETANOL; B) CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CURCUMINA NO $\lambda = 430$ NM.....	41
FIGURA 22: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DA NPS- CUR.	42
FIGURA 23: A) CURCUMINA EM ÁGUA DEIONIZADA; B) NPS CUR	43
FIGURA 24: ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	43

FIGURA 25: AVALIAÇÃO DO EFEITO TYNDALL NAS SOLUÇÕES: A) ÁGUA DEIONIZADA; B) CURCUMINA EM ETANOL E C) NPs-CUR.....	44
FIGURA 26: IMAGENS DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA: A) IMAGEM MORFOLÓGICA DAS NPs-CUR; B) IMAGEM TOPOGRÁFICA DAS NPs-CUR.....	46
FIGURA 27: ESPECTROS DE FTIR DA NPs-CUR E SEUS CONSTITUINTES.....	47
FIGURA 28: A) ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DA NPs-CUR EM ÁGUA DEIONIZADA. B) IMAGEM DA NPs CUR NA CUBETA E DA MOLÉCULA DE CURCUMINA (FIGURA INSERIDA)...	48
FIGURA 29: A) ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DA NPs-CUR EM ÁGUA DESTILADA, B) NPs-CUR EM ÁGUA DESTILADA EXCITADA COM LUZ UV 380 NM E IMAGEM DA MOLÉCULA DE CURCUMINA (IMAGEM INSERIDA).....	49
FIGURA 30: CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DA CURCUMINA LIVRE E DAS NPs CUR.	50
FIGURA 31: CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DA NPs CUR E CURCUMINA LIVRE NO INTERVALO MENOR QUE 60% DA CURCUMINA LIBERADA, COM FITING DA CURVA COM O MODELO DE KORSMEYER-PEPPAS (A); E GRÁFICO DO LN (QTQ ∞) VS LN (T) PARA DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE DE LIBERAÇÃO (B).	51
FIGURA 32: A) E B) AMOSTRAS SOB IRRADIAÇÃO DA LUZ AZUL. EM B) IMAGEM FOI OBTIDA UTILIZANDO FILTRO BLOQUEADOR DE LUZ AZUL PARA VISUALIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA; C) AMOSTRAS DEIXAS NA AUSÊNCIA DE LUZ.	53
FIGURA 33: REDUÇÃO EM PORCENTAGEM DE UFC VARIANDO O TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO DAS NPs-CUR.....	54
FIGURA 34: ENSAIOS BIOLÓGICOS VARIANDO TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO: A) 30 MINUTOS DE INTERNALIZAÇÃO; B) 1 HORA DE INTERNALIZAÇÃO; C) 2 H DE INTERNALIZAÇÃO.....	55
FIGURA 35: RESULTADO DO ENSAIO BIOLÓGICO DA E. COLI.	56
FIGURA 36: IMAGENS DAS PLACAS DE PETRI DA BACTÉRIA E. COLI PARA O GRUPO IRRADIADO: A) CN; B) P407; C) QUIT. + TPP; NPs CUR D) 0,02 MG.ML ⁻¹ ; E) 0,04 MG.ML ⁻¹ ; F) 0,08 MG.ML ⁻¹ . E GRUPO SUBMETIDO AO ESCURO: G) CN; H) P 407; I) QUIT. + TPP; CONCENTRAÇÕES DE NPs CUR J)	57
FIGURA 37: RESULTADO DO ENSAIO BIOLÓGICO DA S. AUREUS.	58
FIGURA 38: IMAGEM DAS PLACAS DE PETRI DA BACTÉRIA S.AUREUS PARA O GRUPO IRRADIADO: A) CN; B) P 407; C) QUIT. + TPP; CONCENTRAÇÕES DE NPs CUR D) 0,02 MG.ML ⁻¹ ; E) 0,04 MG.ML ⁻¹ ; F) 0,08 MG.ML ⁻¹ . E GRUPO SUBMETIDO AO ESCURO: G) CN; H) P 407; I) QUIT. + TPP; NPs CUR : J) 0,02 MG.ML ⁻¹ ; K) 0,04 MG.ML ⁻¹ ; L) 0,08 MG.ML ⁻¹	59

FIGURA 39: A) CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA <i>S. AUREUS</i> CONTROLE NEGATIVO; B) CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA <i>S. AUREUS</i> COM NPS-CUR; C) CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA <i>E. COLI</i> , CONTROLE NEGATIVO; D) CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA <i>E. COLI</i> COM NPS- CUR.	60
FIGURA 40: IMAGEM DO MEV DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO <i>E. COLI</i>	61
FIGURA 41: IMAGENS DE MEV DAS <i>E. COLI</i> SUBMETIDAS A IRRADIAÇÃO NA PRESENÇA DAS NPS-CUR.....	61
FIGURA 42: IMAGENS DE MEV DAS <i>E. COLI</i> SUBMETIDAS AS NPS-CUR E MANTIDAS NO ESCURO.	62
FIGURA 43: IMAGEM DE MEV DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO <i>S. AUREUS</i>	62
FIGURA 44: IMAGENS DE MEV DAS <i>S. AUREUS</i> SUBMETIDAS A IRRADIAÇÃO NA PRESENÇA DAS NPS-CUR.....	63
FIGURA 45: IMAGENS DE MEV DAS <i>S. AUREUS</i> SUBMETIDAS ÀS NPS-CUR E MANTIDAS NO ESCURO.....	63
FIGURA 46: IMAGEM DA CRIOMICROSCOPIA DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO <i>E. COLI</i>	64
FIGURA 47: IMAGEM DA CRIOMICROSCOPIA DO GRUPO IRRADIADO <i>E. COLI</i> QUANDO SUBMETIDO AO IFD PELAS NPS-CUR, ONDE OBSERVA-SE OS DANOS: A) ROMPIMENTO DE MEMBRANA; B) INCHAÇO DA MEMBRANA.	65
FIGURA 48: IMAGEM DA CRIO-MICROSCOPIA DA <i>E. COLI</i> DO GRUPO SUBMETIDO AO ESCURO NA PRESENÇA DAS NPS-CUR, ONDE OBSERVAMOS: A) DANO PARCIAL NA MEMBRANA; B) ADERÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS NA SUPERFÍCIE BACTERIANA.	66
FIGURA 49: EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA PROMOVIDA PELA PRODUÇÃO DE EROS: A) INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA AO LONGO DE TODO EXPERIMENTO (10 MINUTOS ESCURO E 10 MINUTOS IRRADIADO), B) ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DO ETIDIO AO LONGO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO, C) PRODUÇÃO DE EROS DAS NPS CUR E CN AO LONGO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO E FITTING DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE EROS.	68



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros da medida de fluorescência.....	34
Tabela 2: Resultados do Dh, PDI e ζ das NPs-Cur.....	45
Tabela 3: Descrição do Mecanismo em função do expoente de liberação.....	51
Tabela 4: Constante de produção de EROs.....	69

1 Introdução

1.1 Descobrimos os microrganismos

A descoberta dos microrganismos está associada à invenção do microscópio. A primeira descrição conhecida dos microrganismos foi relatada pelo matemático e historiador natural inglês Robert Hooke, ele era um excelente microscopista. Em seu famoso livro, *Micrographia* (1665), primeiro livro dedicado a observações microscópicas, ele ilustrou estruturas de frutificação de bolores. O microscopista amador Antoni van Leeuwenhoek foi a primeira pessoa a visualizar bactérias em 1676, enquanto estudava infusões aquosas de pimenta, e relatou suas observações em uma série de cartas enviadas à prestigiosa “*Royal Society of London*”, que as publicou em 1684 (Figura 1) (MICHAEL T. MADIGAN et al., 2016).

Figura 1: O microscópio de van Leeuwenhoek; A) Réplica do microscópio de van Leeuwenhoek; B) Desenhos de Leeuwenhoek, representando as bactérias.



Fonte: MICHAEL T. MADIGAN et al., 2016.

Foi no século XIX que aconteceu grandes avanços da microbiologia, no qual o cientista alemão-polonês Ferdinand Cohn foi um dos grandes contribuidores, assim como o químico francês Louis Pasteur e o médico alemão Robert Koch, considerados dois gigantes no campo da microbiologia (MICHAEL T. MADIGAN et al., 2016).

Louis Pasteur marcou o fim da teoria da geração espontânea, de dois milênios. Sua descoberta da vacina contra a cólera aviária pode ser considerada o nascimento da imunologia. Uma das grandes realizações de Pasteur ocorreu em 1885 com a aplicação da primeira vacina antirrábica em humano para curar uma doença universalmente letal (BERCHE, 2012). Este foi um dos feitos mais marcantes deste grande cientista.

Koch criou métodos de cultivos artificiais que lhe possibilitaram a observação de alterações nas bactérias ao longo do tempo. Além disso desenvolveu técnicas extremamente refinadas de microscopia. Por mais que a teoria microbiana da doença o tenha precedido há muito tempo, Koch foi o primeiro a vincular uma bactéria específica a uma doença específica (BLEVINS; BRONZE, 2010).

Os avanços no estudo e compreensão da microbiologia tiveram grandes contribuições destes cientistas entre outros. E ao longo dos anos, a microscopia e o sequenciamento genético se tornaram tecnologias dominantes que contribuíram para a expansão ainda maior de microbiologia (KUMAR et al., 2022).

Durante as duas últimas décadas do século XIX, muitas bactérias foram isoladas e designadas agentes etiológicos de doenças infecciosas humanas. Assim como acontece com muitos casos na interface entre a causa e a terapia eficaz, a caracterização de agentes patogênicos ficaram a cargo de pesquisadores dedicados até que medicamentos com potencial terapêutico se tornaram disponíveis. Este período vago antes do advento de curas adequadas para infecções explica a origem da microbiologia clínica ou diagnóstica. (ISENBERG, 2003).

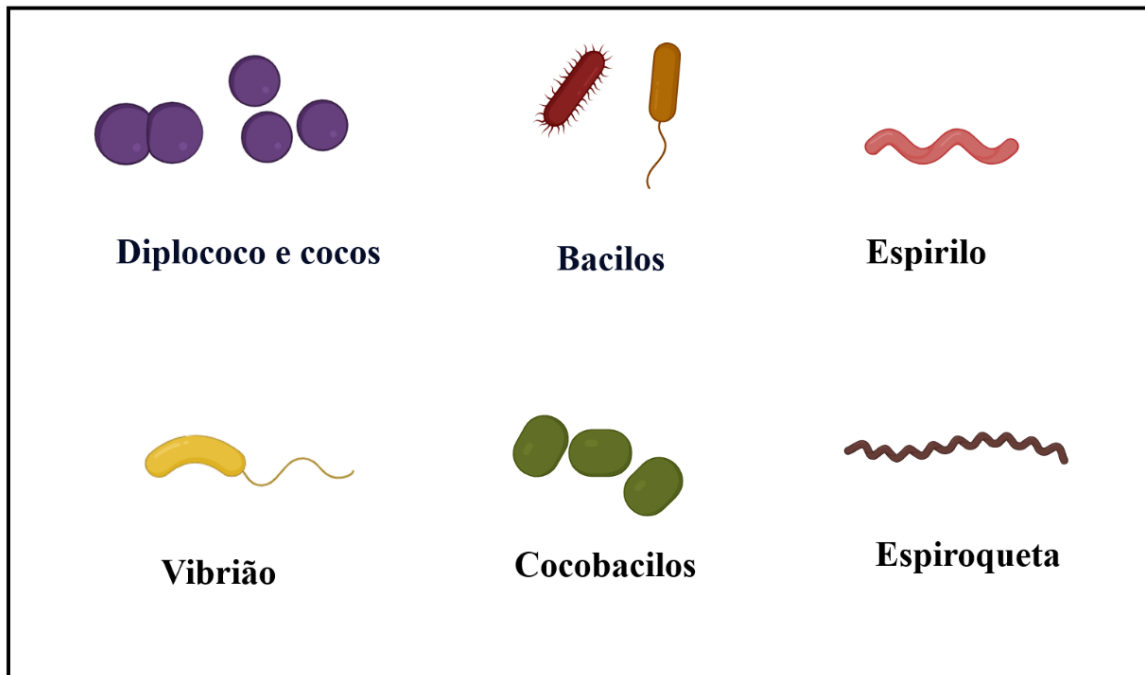
Durante a segunda metade do século XX, surgiram diversas subdisciplinas fundamentais e aplicadas a microbiologia. Elas abriram o caminho para a era contemporânea da microbiologia molecular, na qual as ciências genômicas ocupam uma posição central (MICHAEL T. MADIGAN et al., 2016).

1.2 Explorando o mundo microscópico: características das bactérias

As bactérias são organismos microscópicos procariontes, unicelulares, que não apresentam organelas membranosas (BRADSHAW; STAHL, 2016). Elas podem ser encontradas em uma ampla variedade de ambientes, podendo ser aeróbicas ou anaeróbicas, benéficas ou trazer malefícios para o ser humano, diversas áreas são impactadas por esses microrganismos como a agricultura, alimentação, energia e meio ambiente de diversas maneiras (MICHAEL T. MADIGAN et al., 2016).

A morfologia bacteriana é bastante diversificada (Figura 2), as principais formas são denominadas cocos, bacilos e espirilos, mas também existem outras que representam uma grande porção como, estrelas serpentina, bigodes entre outras, embora indefinidas (MICHAEL T. MADIGAN et al., 2016; VAN TEESELING; DE PEDRO; CAVA, 2017).

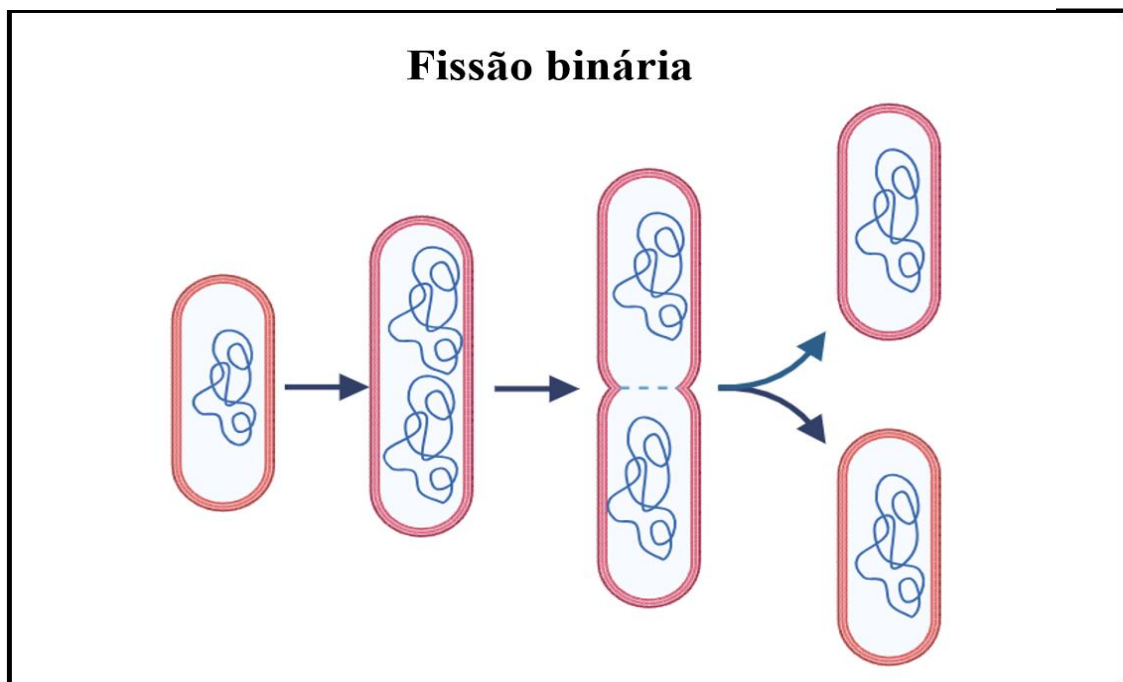
Figura 2: Alguns tipos de morfologia bacteriana



Fonte: Autora.

Dentre as formas de reprodução bacteriana a fissão binária é a mais comum e mais bem compreendida, como podemos observar na Figura 3. Em dado momento de crescimento das bactérias as células dobram de massa e depois se dividem ao meio para produção de células-filhas de tamanhos equivalentes(CHIEN; HILL; LEVIN, 2012).

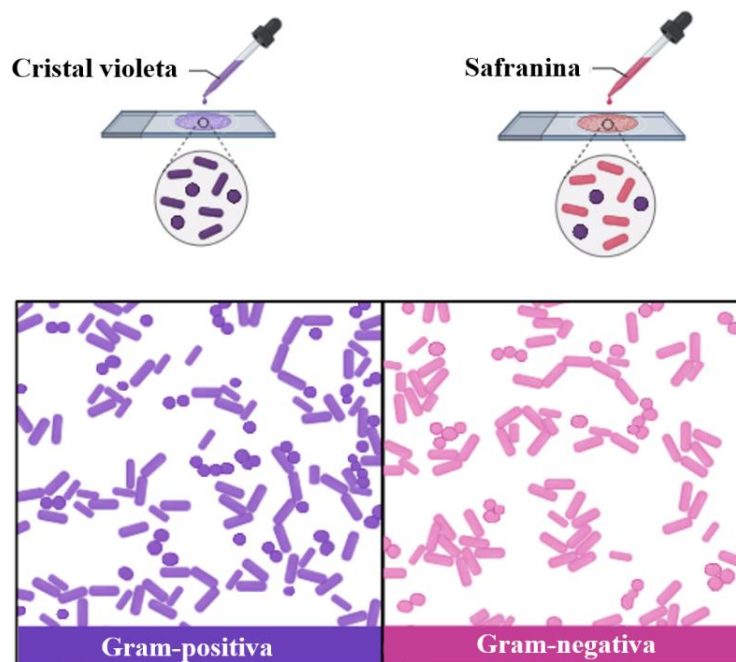
Figura 3: Processo de reprodução bacteriana através da fissão binária.



Fonte: Autora

As bactérias também podem ser classificadas em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. A coloração de Gram realiza a distinção entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (YOSHIMURA; OGURA; ODA, 2023). As bactérias gram-positivas retêm o corante cristal violeta pós adição de um descolorante como o etanol em um tom quase roxo, enquanto as bactérias gram-negativas retêm o corante em menor grau ou não retêm e têm que ser contrastadas com um segundo corante, Safranina ou fucsina aparecendo rosa ou avermelhado (Figura 4), (ROHDE, 2019).

Figura 4: Coloração de Gram.



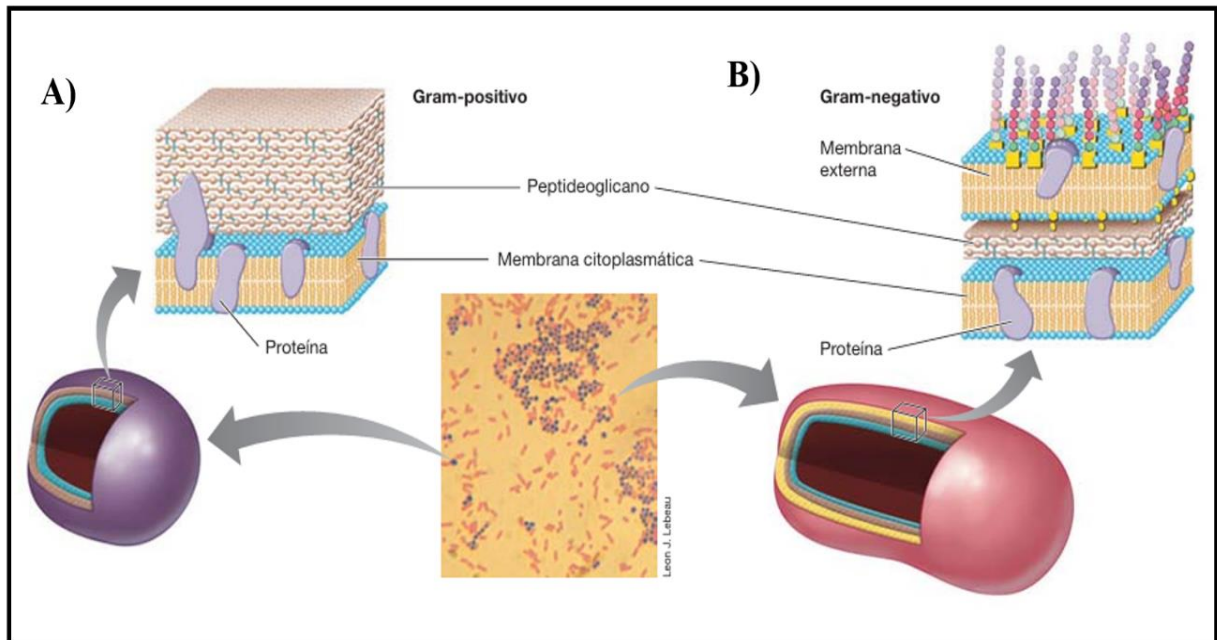
Fonte: Autora.

Essa diferença de reação à coloração de Gram deve-se às diferenças da parede celular das células Gram-positivas e Gram-negativas (ROHDE, 2019). Nas bactérias Gram-negativas, as células contam com a proteção que envolve uma membrana interna de bicamada fosfolipídica, um espaço periplasmático com uma camada de Peptideoglicano e uma membrana externa formada de folhetos assimétricos de fosfolipídios e lipopolissacarídeos (VAIWALA et al., 2020).

As bactérias Gram-positivas não possuem membrana externa, elas constituem uma parede celular de estrutura rígida e espessa, composta por múltiplas camadas de Peptideoglicano que envolvem a membrana citoplasmática (ZHANG et al., 2023). Ambas classes de bactérias possuem uma camada de Peptideoglicano, a diferença se dá na espessura, sendo a das Gram-positivas bem mais espessas do que as das Gram-negativas (ROHDE, 2019).

Devido a esta diferença na estrutura celular (Figura 5), de maneira geral espera-se que as bactérias Gram-positivas sejam mais fáceis de serem inativadas pelos antibióticos do que as Gram-negativas (ZHANG et al., 2023).

Figura 5: Paredes celulares de bactérias. A) e B) Diagramas esquemáticos de paredes celulares gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. A foto no centro mostra células de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, após a coloração de Gram.



Fonte: MICHAEL T. MADIGAN et al., 2016.

As paredes celulares bacterianas exigem uma atenção especial, por diversas razões pois elas: (I) protegem as bactérias de ambientes hostis, fornecendo a estrutura essencial para sua viabilidade; (II) exibem componentes únicos; (III) expõem locais receptores para drogas ou vírus; (IV) representam os principais alvos para ataque de antibióticos; (V) fornecem estruturas para diferenciação e variação imunológica (ROHDE, 2019).

Um entendimento molecular da membrana celular bacteriana e dos seus componentes exerce um papel fundamental no desenvolvimento da persistência em cepas bacterianas de resistência antimicrobiana. Diversos antibióticos têm como alvo direto vários componentes da membrana celular (VAIWALA et al., 2020).

1.3 Desafios e implicações das bactérias no passado e na era moderna

Doenças infecciosas estão entre as maiores causas de morte humana em todo o planeta, e um dos principais agentes causadores dessas inúmeras doenças infecciosas são as bactérias

(GUO et al., 2020). Há muito tempo a humanidade enfrenta diversas doenças ocasionadas por infecções bacterianas bem como pandemias que desencadearam diversas mortes em massa.

Durante o século XIV, a doença conhecida popularmente como Peste Negra, ocasionou o maior episódio de mortalidade registrado na história. Foi causada pela bactéria Gram-negativa *Yersinia pestis*, e dizimou cerca de 30-50% da população da Afro-Eurásia. (BOS et al., 2011; KLUNK et al., 2022). A cólera também causou pandemia, seu agente etiológico é a bactéria aquática Gram-negativa *Vibrio cholerae*, e tende a ocorrer principalmente em locais em que não há acesso a água potável disponível e saneamento (KANUNGO et al., 2022).

A tuberculose, causada pela *Mycobacterium tuberculosis*, é outro exemplo de doença causada por bactéria que levou diversas pessoas a morte, ela tornou-se epidêmica durante a revolução industrial no século XVIII (BAÑULS et al., 2015).

Em 1910, o primeiro antibiótico é implantado, salvarsan, usado no tratamento contra sífilis. Os antibióticos mudaram completamente a medicina moderna e prolongaram a expectativa de vida humana em uma média de 23 anos. Em 1928 iniciou a era de ouro da descoberta de antibióticos de produtos naturais, com a descoberta da penicilina, onde atingiu o pico por volta da década de 1950 (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

A chegada dos antibióticos no uso clínico foi um imenso avanço médico do século XX, além de realizar o tratamento de doenças infecciosas, tornaram possível diversos tratamentos médicos modernos, dentre eles transplante de órgãos e tratamento de câncer. Entretanto o seu uso inadequado acelerou o processo natural de resistência das bactérias, ocasionando resistência antimicrobiana (RAM), tornando algumas infecções intratáveis (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

1.4 Resistência antimicrobiana

Como já vimos a humanidade tem um longo histórico de luta contra doenças infecciosas. A introdução dos antibióticos foi um grande avanço na área médica e possibilitou diversas práticas que sem eles seriam impossíveis (GONZÁLEZ-BELLO, 2017). O aumento da RAM e a estagnação no desenvolvimento de novos antibióticos representa uma ameaça à saúde pública (YE et al., 2020).

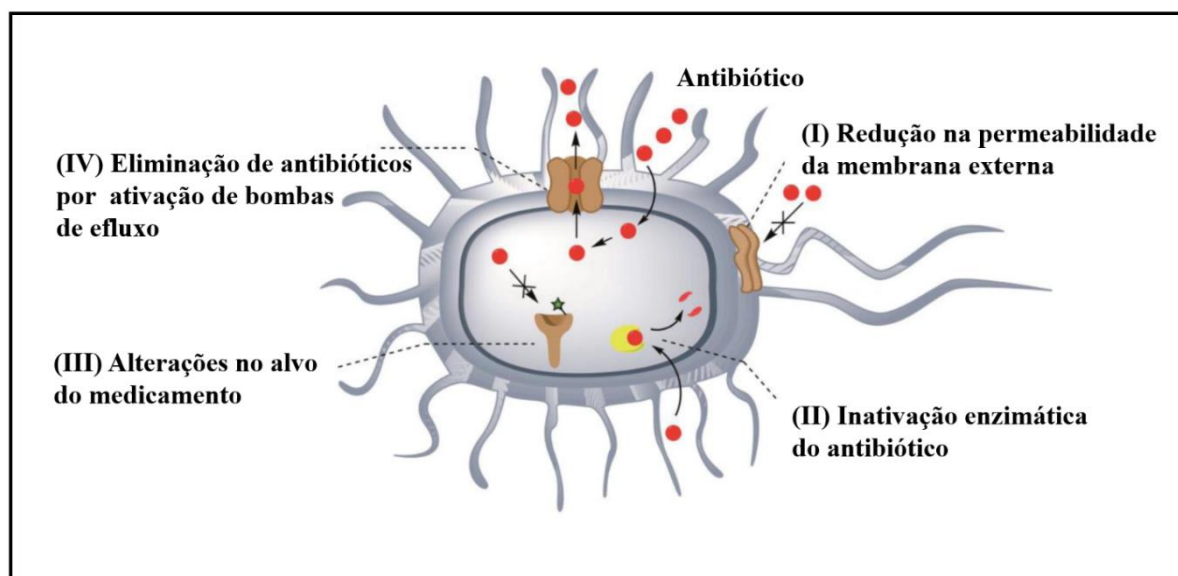
A resistência bacteriana já ocorre de uma forma natural, devido ao caráter evolutivo intrínseco e à adaptabilidade das bactérias. Eventos evolutivos levam a novos surgimentos de resistência de patógenos. Temos também o comportamento humano, que leva a atingir a

resistência bacteriana a níveis alarmantes, devido a abusos e utilização indevida de antibióticos ao longo dos anos (GONZÁLEZ-BELLO, 2017).

O surgimento da resistência aos antibióticos pode aparecer tanto por mutações no genoma da bactéria quanto da adsorção de DNA estranho. Quando ocorrem mutações elas logo se fixam no paciente ou animal tratado com antibiótico. Na absorção de novos fatores de resistência a microbiota ambiental pode fornecer vários genes em potencial que poderiam ser obtidos e utilizados por agentes patogênicos para anular os efeitos dos antibióticos (LARSSON; FLACH, 2022).

A transferência de genes fornece ao receptor novas capacidades metabólicas auxiliando sua adaptação a novos ambientes ecológicos (SULTAN et al., 2018). A resistência aos antibióticos por meio de elementos genéticos cromossômicos ou móveis, ocorrem através de quatro mecanismos principais (Figura 6): (I) Redução na permeabilidade da membrana externa – variação que dificulta a entrada efetiva dos antibióticos; (II) Inativação enzimática do antibiótico – uma enzima celular já existente se modifica, reagindo com o antibiótico, de modo que não afete mais as bactérias; (III) Alterações no alvo do medicamento – essas alterações diminuem ou destroem a eficiência de ligação dos antibióticos, o que muitas vezes limitam sua ação; (IV) Eliminação de antibióticos por ativação de bombas de efluxo – algumas proteínas são ativadas pela bactéria para eliminar o antibiótico, elas são capazes de eliminar uma grande quantidade de compostos do periplasma para o exterior da célula (GONZÁLEZ-BELLO, 2017; SULTAN et al., 2018).

Figura 6: Principais mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos.



Fonte: GONZÁLEZ-BELLO, 2017.

Com o intuito de bloquear os mecanismos de resistência aos antibióticos mencionados acima, foram desenvolvidos três tipos principais de adjuvantes antibióticos: (a) inibidores da enzima β -lactamase; (b) inibidores de bomba de efluxo; e (c) permeabilizadores de membrana externa. Ademais, os medicamentos anti-virulência são uma estratégia promissora (GONZÁLEZ-BELLO, 2017).

O desenvolvimento de uma nova geração de medicamentos anti-infecciosos utilizando produtos naturais microbianos é bastante promissor, pois estes compostos são incomparáveis em sua diversidade química e eficiência como antibióticos (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Outra estratégia promissora para erradicar os microrganismos é a inativação fotodinâmica (IFD), essa técnica consiste em um simples mecanismo de ação, pois após a exposição de um fotossensibilizador à luz em um comprimento de onda específico, pode-se induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são bastante reativas a várias moléculas biológicas e capaz de causar danos nas estruturas das células ocasionando morte celular por oxidação (YANG et al., 2021).

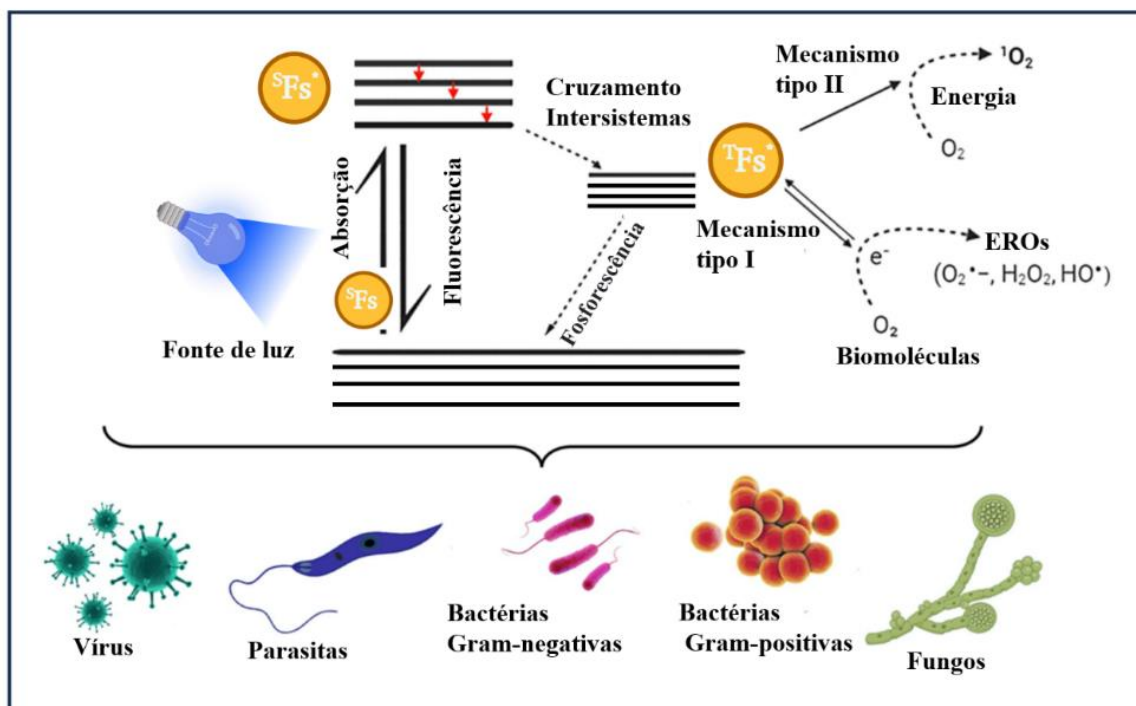
1.5 Inativação fotodinâmica (IFD)

A primeira descrição de efeito antimicrobiano através de processos fotodinâmicos foi relatado por Oskar Raad em 1890, ele observou uma redução da viabilidade do microrganismo *Paramecium caudatum* na presença do corante acridina quando exposto à luz (ORUBA et al., 2015). Após alguns anos foi descoberto que era necessária a presença de oxigênio no ambiente para que a reação de morte acontecesse e denominaram então o termo “fotodinâmico” para descrevê-la (HAMBLIN; ABRAHAMSE, 2020).

A IFD consiste na utilização de um corante que não seja tóxico, chamado de fotossensibilizador (Fs), que interage com a luz em um comprimento de onda específico na presença de oxigênio molecular (O_2) para gerar oxigênio singleto e/ou espécies reativas de oxigênios (EROs), levando a morte de microrganismos (KASHEF; HAMBLIN, 2017; LIN et al., 2021).

Podemos observar os princípios da IFD por meio do Diagrama de Jablonski (**Figura 7**).

Figura 7: Princípios da inativação fotodinâmica demonstrado no Diagrama de Jablonski.



Fonte: Adaptado, SOUZA et al., 2021.

Após o Fs no estado fundamental singleto (1SFS) absorver o fóton em um comprimento de onda específico, a interação resulta em estados excitados de curta duração resultando em um estado singleto excitado ($^1SFS^*$). Ao retornarem ao estado fundamental (1SFS), o $^1SFS^*$ pode perder o excesso de energia na forma de relaxação vibracional (processo não radiativo) e/ou fluorescência (processo radiativo). Todavia, quando no estado excitado ($^1SFS^*$), os elétrons também podem realizar cruzamento inter-sistemas passando para um estado tripleto ($^3TFS^*$), que apresenta um tempo de vida muito maior que os estados singletos excitados, permitindo que o $^3TFS^*$ interaja com um oxigênio molecular por meio de duas vias fotoquímicas diferentes (SOUZA et al., 2021; WOZNIAK; GRINHOLC, 2018).

O mecanismo tipo I, envolve a transferência de elétrons, do estado tripleto ao oxigênio molecular, e ocorre a produção de EROs, como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila (HO^\bullet). No mecanismo tipo II, ocorre a transferência de energia, excitando a molécula de oxigênio que está no estado tripleto fundamental, para produção de oxigênio singleto (1O_2) (HUANG et al., 2018; WOZNIAK; GRINHOLC, 2018).

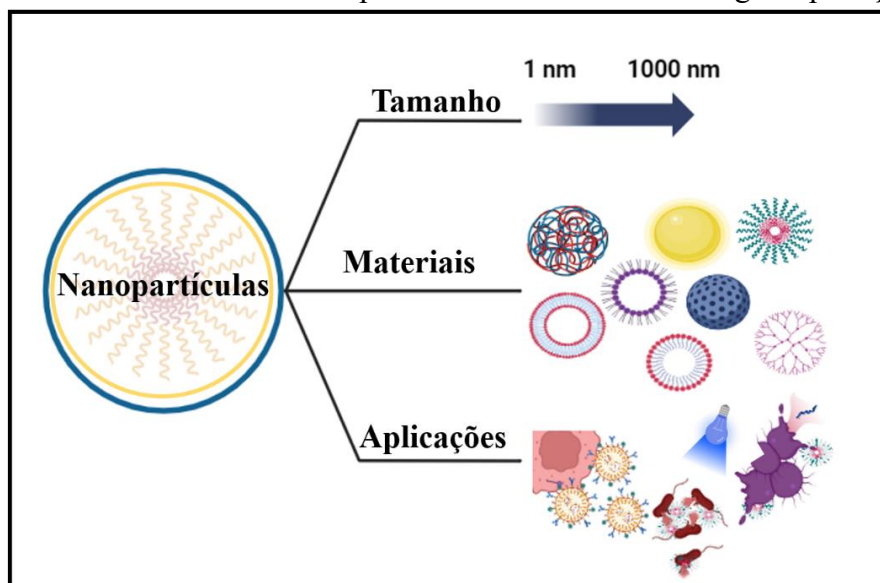
A produção de EROs e/ou $^1\text{O}_2$ pode danificar biomoléculas (como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos), através da promoção de stress oxidativo levando a morte celular (HUANG et al., 2018).

A IFD tem grandes vantagens como sua alta seletividade, pois ela possui ação local, sem afetar tecidos saudáveis, limitando-se a área irradiada com o comprimento de onda específico na presença do Fs (DAI et al., 2012). Ademais a IFD é um processo multialvo, o que evita o desenvolvimento de resistência em patógenos, ao contrário dos antibióticos que atuam de forma muito específica (CIEPLIK et al., 2013).

1.6 Nanopartículas

Nanopartículas (NPs) são partículas submicrométricas com diâmetros variando de 1 - 1000 nm (BOLHASSANI et al., 2014). Elas apresentam diversas aplicações, podem ser utilizadas como carreadores de fármacos, na medicina são utilizadas tanto para diagnósticos quanto terapias (BOLHASSANI et al., 2014; CHUTO; CHAUMET-RIFFAUD, 2010). O fármaco pode estar em diferentes sistemas de entrega como em uma matriz, dissolvido, encapsulado ou aprisionado, em diversos materiais, o que resulta em diversos nomes empregados como nanopartículas, nanoesferas ou nanocápsulas (Figura 8), todos estes termos remetem a sua característica geral que são partículas de tamanho nanométrico (NAGARWAL et al., 2009). Na IFD e na terapia fotodinâmica (TFD), elas podem ser utilizadas como Fs, como relatado em diversos trabalhos (CHEN; CHEN; TSAI, 2012; GONZÁLEZ-DELGADO et al., 2016; OSUCHOWSKI et al., 2021).

Figura 8: Características das nanopartículas – sistemas de entrega e aplicações.



Fonte: Autora.

As NPs apresentam diversas vantagens como: liberação controlada de fármacos, capacidade de solubilizar substâncias hidrofóbicas e boa qualidade de transporte do fármaco (LOGESH et al., 2023). Além disso elas podem ser sintetizadas de diversos materiais, sendo os polímeros um dos mais comuns (BOLHASSANI et al., 2014). Seu sistema de entrega é bem versátil com capacidade de superar barreiras fisiológicas e guiar o fármaco para células específicas, seja por direcionamento ou por ligantes (NAGARWAL et al., 2009).

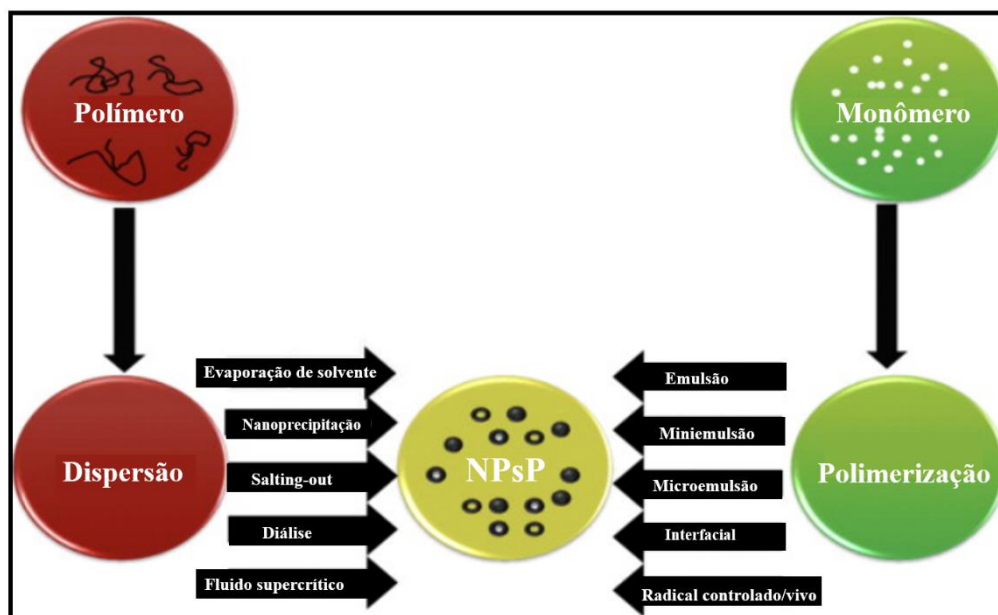
1.7 Nanopartículas poliméricas (NPsP)

As nanopartículas poliméricas (NPsP) desempenham um papel fundamental em um amplo espectro de áreas e está se expandindo rapidamente. Existem vários tipos de NPsP sendo as mais comuns as nanoesferas e nanocápsulas (RAO; GECKELER, 2011). Os polímeros utilizados para formação das nanopartículas podem ser naturais ou sintéticos (BOLHASSANI et al., 2014).

As NPsP possuem inúmeras aplicações, também realizam entrega de fármacos, incluindo imagens e diagnósticos. A natureza biocompatível e biodegradável torna as NPsP ideais para aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, podem ser utilizadas como transportadoras, fatores de crescimento e biomoléculas, facilitando reparos teciduais, regeneração bem como cicatrização de feridas (KAPOOR et al., 2023).

A preparação das NPsP podem ser via polímeros pré-formados ou por polimerização direta de monômeros (Figura 9). Os métodos de preparação por meio de polímeros pré-formados, envolvem: evaporação de solvente, salga, diálise, tecnologia de fluido supercrítico. Por outro lado, as NPsP podem ser feitas diretamente pela polimerização de monômeros: como emulsão, miniemulsão, microemulsão, emulsão livre de surfactante e interfacial (RAO; GECKELER, 2011).

Figura 9: Técnicas de preparo das nanopartículas poliméricas.



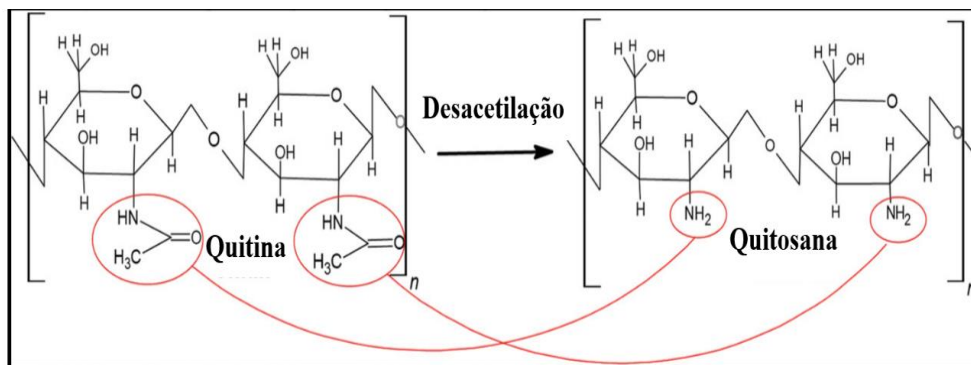
Fonte: RAO; GECKELER, 2011.

O método de preparação é escolhido com base em alguns fatores, como a área de aplicação, sistema polimérico, requisitos de tamanho etc. Esses devem ser alguns fatores a serem levados em consideração antes de escolher a técnica específica para o preparo das NPsP (RAO; GECKELER, 2011).

1.8 Quitosana

A quitosana é um polímero natural, um polissacarídeo cuja estrutura é composta por 2-amino-2desoxi-B-D- glicose (D- glucosamina desacetilada) e *N*- acetil-D -glucosamina ligadas a B- 1,4. Ela é derivada da quitina através da desacetilação alcalina (Figura 10). A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza e possui alto potencial catiônico, ela forma o exoesqueleto de muitos organismos vivos, como caranguejos, camarões, insetos e paredes celulares de fungos (POLINARSKI et al., 2021; SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

Figura 10: Estruturas químicas da quitina e quitosana.



Fonte: POLINARSKI et al., 2021.

A quitosana possui inúmeras propriedades biológicas, tais como antimicrobianas, antifúngicas, antitumorais, imunopotenciadoras, antioxidantes e cicatrizantes. Além disso apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta permeabilidade, não toxicidade e um baixo custo. Essas características tornam a quitosana um biomaterial versátil com extensas aplicações em diversas áreas como sistemas de administração de medicamentos, cosmética, farmacêutica, biomédica entre outras (SAHARIAH; MÁSSON, 2017; SHARIATINIA, 2019).

Em vista de suas múltiplas propriedades a quitosana possui uma ampla gama de aplicações e vários estudos têm explorado o uso de nanopartículas de quitosana. Um exemplo disso é a utilização de nanopartículas de quitosana como transportador para o clotrimazol (CLT) no tratamento tópico da candidíase vulvovaginal (FACCHINATTO et al., 2021). Facchinatto e colaboradores mostraram que o nanossistema apresenta uma liberação sustentada do medicamento, produzindo valores de índice de seletividade favoráveis para cepas padrão e isolados clínicos de *Candida ssp.* e linhas celulares do trato genital feminino quando comparados com o medicamento livre. Também foi demonstrado neste estudo que as nanopartículas melhoraram a permeabilidade *in vitro* do fármaco, sugerindo que o nanotransportador pode fornecer níveis mais elevados do composto ativo no tecido da mucosa (FACCHINATTO et al., 2021).

Em outro estudo foi sintetizada uma nanoformulação de dextrano e quitosana carreando curcumina para aplicações biológicas. O trabalho demonstrou que as nanopartículas de dextrano e quitosana são ótimos veículos de medicamentos hidrofóbicos como a curcumina na administração de medicamentos contra o câncer (ANITHA et al., 2011a).

O grau de desacetilação e peso molecular da quitosana podem variar, desempenhando diversos papéis significativos em suas propriedades e aplicações. Alguns estudos demonstram que ambas influenciam o comportamento da quitosana. Como no estudo realizado por Nguyen et al., 2022, que avaliaram quitosana com diferentes graus de desacetilação e pesos moleculares na preparação de nanopartículas pelo método de eletropulverização, o qual foi observado que o grau de desacetilação pode afetar a solubilidade, tensão superficial e cristalinidade, neste estudo a quitosana indicada como mais favorável foi a de maior grau de desacetilação e menor peso molecular (NGUYEN et al., 2022). Em outro estudo que avaliou os efeitos do peso e grau de desacetilação da quitosana para complexos de nanocristais de quitosana-celulose mostrou através de testes que os diferentes pesos moleculares da quitosana não tiveram efeito na formação de partículas, apenas um efeito menor no tamanho e forma das partículas, e quitosanas

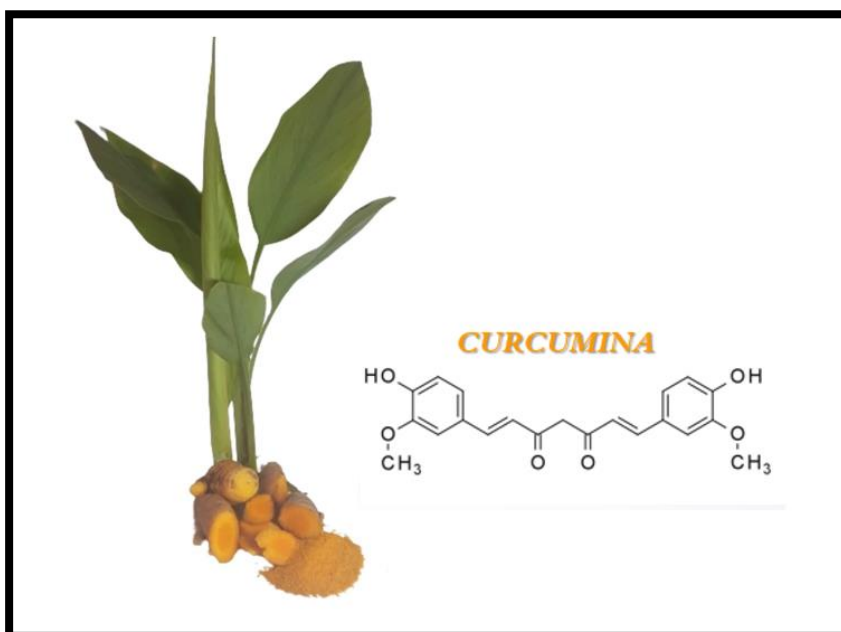
com maior grau de desacetilação proporcionaram níveis de turbidez mais elevados atribuíveis a maior densidade de carga de quitosana (WANG; ROMAN, 2023).

Em vista disso tanto o grau de desacetilação como o peso molecular da quitosana são fatores a serem levados em consideração na otimização da síntese de nanopartículas de diversas aplicações.

1.9 Curcumina

Um dos principais componentes da Cúrcuma Longa conhecido como açafrão-da-terra (Figura11), a curcumina é um composto polifenólico considerada um nutraceutico natural de cor amarela vibrante comumente usada como especiaria e corante alimentício (LIU et al., 2016).

Figura 11: Cúrcuma longa e molécula curcumina.



Fonte: Autora.

Por ser natural e possuir diversas propriedades terapêuticas interessantes, a curcumina vem sendo amplamente explorada por apresentar propriedades que incluem efeitos antioxidantes, anticancerígenos, anti-inflamatórios e antimicrobianos (TRIGO-GUTIERREZ et al., 2021).

Como apresentado em um artigo de revisão que reúne estudos recentes das ações da curcumina frente a prevenção e tratamento de diversos tipos de câncer, fica evidenciado que ela possui capacidade imunomoduladora interagindo com vários mediadores imunológicos, daí sua propriedade anticancerígena.(GIORDANO; TOMMONARO, 2019).

Apesar de possuir diversas propriedades terapêuticas, a curcumina tem limitação em sua ampla aplicabilidade devido a sua baixa solubilidade em solução aquosa, baixa biocompatibilidade e baixa estabilidade química (LI et al., 2016).

Uma alternativa para ampliar seu uso é o nanoencapsulamento, pois as NPs podem preservar e aumentar a retenção da curcumina. Neste contexto, a quitosana pode ser uma ótima opção para encapsular a curcumina, pois é um biopolímero, e apresenta diversas características biológicas únicas, incluindo propriedades bacteriostáticas, biodegradabilidade e biocompatibilidade (XIAO et al., 2021a).

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver nanopartículas de quitosana carreando curcumina (NPs-Cur) para servir como agente fotoinativador de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas quando submetidas à luz azul.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Realizar a síntese das NPs-Cur por meio da combinação dos métodos de gelificação iônica e nanoprecipitação;
- ❖ Caracterizar as propriedades ópticas das NPs-Cur por espectroscopia de absorção UV-visível, fluorescência e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- ❖ Avaliar a estabilidade de armazenamento das NPs-Cur quando refrigerada e deixada a temperatura ambiente;
- ❖ Determinar o diâmetro hidrodinâmico das NPs-Cur, utilizando espectroscopia EDL (Espalhamento Dinâmico da Luz), e carga superficial através do Potencial Zeta;
- ❖ Determinar a morfologia das NPs-Cur com auxílio da técnica de microscopia de força atômica (AFM);
- ❖ Determinar o potencial fotoinativador das NPs-Cur frente às cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa), quando irradiada com luz LED azul (450 nm);
- ❖ Avaliar alterações morfológicas nas bactérias após a IFD, através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-ME);
- ❖ Avaliar o potencial fotodinâmico das NPs-Cur a partir da produção de espécies reativas de oxigênio por meio de marcador fluorescente DHE;

3 Materiais e métodos

3.1 Materiais

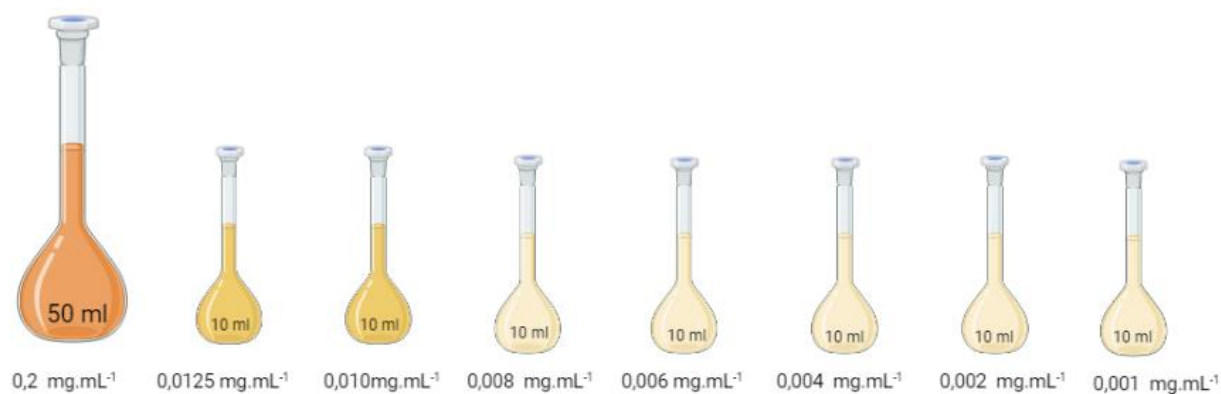
A curcumina ($\geq 98\%$) foi sintetizada e cedida pelo professor Kléber T. de Oliveira, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A Quitosana de peso médio molecular (grau de desacetilação $\geq 75\%$), Tripolifosfato de sódio (TPP), Kolliphor P 407, Dihydroethidium (DHE) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Para os ensaios biológicos foram utilizadas as cepas de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923), meio Plate Count Agar (PCA) e Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (KASVI, São Paulo, Brasil). Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico.

3.2 Curva de calibração

Para determinar a concentração de curcumina, foi construída uma curva de calibração de acordo com a Lei de Beer-Lambert.

Foi preparada uma solução estoque de curcumina em etanol, cuja concentração obtida foi de $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$, para construção da curva de calibração. A partir do estoque, foram realizadas diluições em etanol, variando as concentrações de $0,0125 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Figura 12). Essas soluções foram submetidas à análise em um espectrofotômetro de absorção UV-visível (LAMBDA™ 265 UV/Vis) utilizando cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico, coletando 2 mL de cada solução.

Figura 12: Concentrações para curva de calibração.



Fonte: Autora.

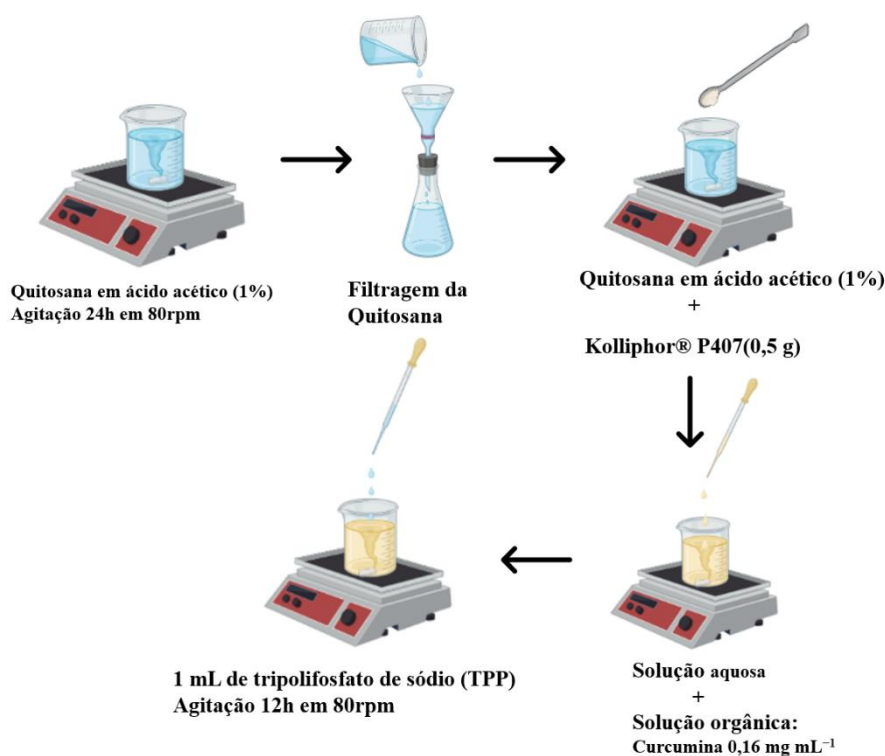
3.3 Síntese das nanopartículas

A síntese da nanopartícula foi realizada seguindo a combinação de protocolos já bem estabelecidos (ABELHA et al., 2019; FACCHINATTO et al., 2022), seguido de algumas modificações. Inicialmente, 16 mg de quitosana foram dispersas em 8 mL de ácido acético

1%(v/v) e mantida sob agitação magnética a 80 rpm durante 24h em temperatura ambiente, após esse período a quitosana foi filtrada.

Após a diluição da solução de quitosana foi adicionada 0,5 g de Polaxamer 407 (P 407) em pó na solução de quitosana sob agitação até sua completa dissolução. Na sequência 1 mL de curcumina em Tetraidrofurano (THF, IMPEX), a uma concentração de $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, foi adicionada gota a gota e por fim foi adicionada 1 mL de tripolifosfato de sódio (TPP) gota a gota, a uma concentração de 2 mg.mL^{-1} . A solução foi protegida da luz e ficou sob agitação constante de 80 rpm durante 12h para evaporação completa do solvente, conforme representado na Figura 13. Após esse processo completou-se o volume da solução.

Figura 13: Processo de preparo das nanopartículas.



Fonte: Autora.

Também foi realizada a síntese da nanopartícula sem a curcumina, com a quitosana e TPP, preparada na mesma concentração da nanopartícula com curcumina e seguindo o mesmo protocolo. Além disso, o P 407 foi diluído separadamente em água na mesma concentração da nanopartícula.

3.4 Avaliação da estabilidade de armazenamento das NPs-Cur quando refrigerada e deixada a temperatura ambiente

Foi realizado um teste de bancada analisando visualmente sua estabilidade, num período de 5, 15 ,30 e 60 dias. Um grupo de amostras, em duplicata, foi deixado em temperatura

ambiente e o outro foi armazenado a 4 °C, todas as amostras protegidas da luz. Durante esse período foram registradas imagens para visualização de mudanças na estabilidade da solução contendo as NPs-Cur.

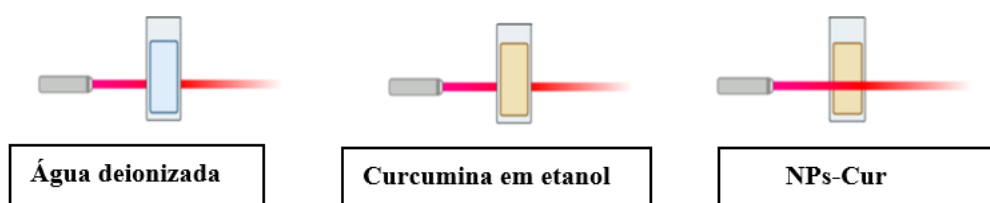
3.5 Análise do Efeito Tyndall

O Efeito Tyndall é um fenômeno de dispersão de luz que ocorre quando uma solução coloidal contém partículas de tamanho menor do que o comprimento de onda da luz visível, que varia de 400 a 760 nm. O feixe de laser vermelho se torna invisível quando incidido em água deionizada, sem a presença dessas partículas.(XIAO et al., 2019).

Para realização desse teste, um feixe de laser de comprimento de onda de 630-650 nm com potência máxima de 5mW da marca WEN ZHOU foi incidido sobre as amostras.

Para verificação de presença de nanopartículas, foi utilizado o Efeito Tyndall, para isso foram separadas amostras das NPs-Cur na concentração de 0,16 mg.mL⁻¹ de curcumina e preparadas dispersões de curcumina em etanol na concentração de 0,16 mg.mL⁻¹ e separada uma amostra de água deionizada ambas foram comparadas com a nanopartícula, para verificação qualitativa do efeito Tyndall, conforme podemos observar na Figura 14.

Figura 14: Análise qualitativa do Efeito Tyndall.



Fonte: Autora.

3.6 Espalhamento dinâmico de luz (EDL) e Potencial Zeta (ζ).

A amostra de NPs-Cur na concentração de 0,16 mg.mL⁻¹ foi diluída em solução de água destilada com NaCl (10 mM). O espalhamento dinâmico de luz (EDL) determinou a distribuição de tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta (ζ) caracteriza a carga superficial da nanopartícula, ambos foram determinados por meio do equipamento Zetasizer Nano-Zs ZEN 3600, marca Malvern com óptica NIBS (Non-Invasive Backscatter) utilizando uma cubeta de eletroforese (DTS1070), a temperatura mantida a 25 °C, essa análise foi realizada em triplicata.

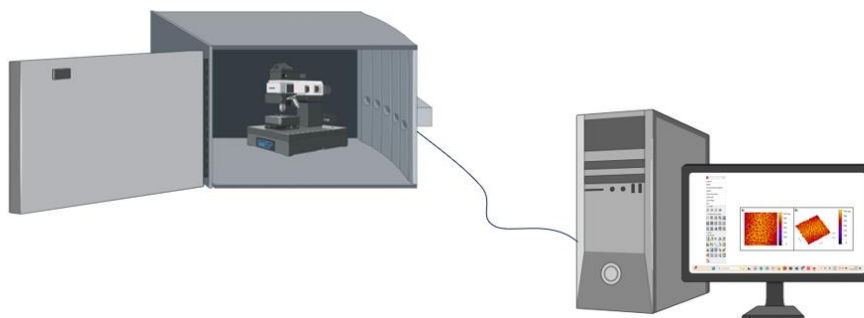
O instrumento dispõe de um laser em 633 nm e a detecção de luz espalhada é feita nos ângulos de 90° e 173°. As análises EDL e ζ foram feitas nas dependências do grupo de Química de Superfície e Moléculas Bioativas (QSMB) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

3.7 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para realização desta análise foi depositado 10 μL da NPs- Cur em um substrato de silício. A solução de NPs- Cur foi mantida em substrato por 24h em temperatura ambiente de 25°C em placa de Petri de vidro para secagem da amostra.

O equipamento utilizado foi o AFM Workshop TT2 (ilustrado na Figura 15) para obtenção de imagens de topografia com resolução atômica, para o estudo de morfologia. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente. As varreduras da amostra foram realizadas pelo modo não-contato (vibrating), equipado com um Cantiléver de silício revestido de alumínio com uma constante de mola de 5.0N/m com frequência de 160 KHz. Elas foram realizadas em áreas de 5x5, 15x15 e 50x50 μm^2 com 256x256 pixels a uma taxa de varredura de 1Hz. Para o tratamento e ajuste das imagens foi utilizado o software Gwyddion (64bit).

Figura 15: Ilustração AFM Workshop TT2.



Fonte: Autora.

3.8 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-vis) e Fluorescência

Para realização da medida de espectrofotometria de absorção UV-visível (LAMBDA™ 265 UV/Vis) foram utilizados 200 μL da amostra de NPs-Cur na concentração 0,16 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e foi completado o volume de 2 mL com água deionizada na cubeta. Inicialmente foi realizado o baseline (“*blank*”) com o diluente e em seguida coletado o espectro de absorção da amostra diluída. Posteriormente, foi realizada a medida de fluorescência (Scinco FluoroMate FS-2) da amostra, com os parâmetros apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros da medida de fluorescência.

Voltagem (V)	600
Tempo de integração (ms)	20
Velocidade de digitalização (nm/min)	600
Largura da fenda de excitação (nm)	5
Largura de fenda de emissão (nm)	5
Excitação (nm)	460
Emissão (nm)	470-780

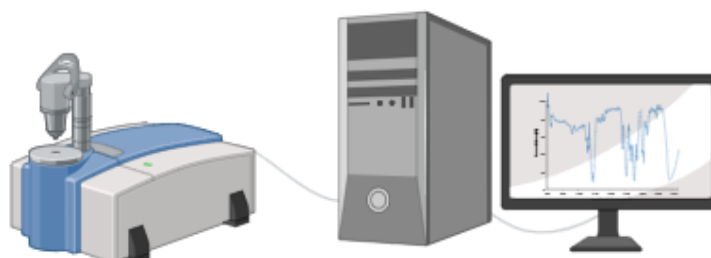
Fonte: Autora.

Para ambas medidas, UV-vis e fluorescência, foi utilizada uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas com 10 mm de caminho óptico contendo um volume de 2 mL da amostra com o diluente.

3.9 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As NPs-cur e seus componentes foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em um espectrômetro infravermelho Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA), modelo espectro 100, com o auxílio de um acessório de refletância total atenuada (ATR) com cristal de germânio (ilustração na Figura 16). Inicialmente foi realizado o “*background*” antes de coletar o espectro de cada amostra em pó no modo transmitância. Para tal, as nanopartículas foram liofilizadas para realização dessa análise. Os parâmetros foram definidos em 10 varreduras no intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução 4 cm^{-1} com passo de 0,5 cm^{-1} .

Figura 16: Ilustração do espectrômetro infravermelho FTIR.



Fonte: Autora.

3.10 Eficiência de encapsulação da curcumina

Foi utilizado o método de ultrafiltração/centrifugação para determinar a eficiência de encapsulação da curcumina nas NPs Cur, onde 500 µL das soluções de nanopartículas e 500 µL de curcumina livre em etanol são depositadas em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 30 kDa (Microcon, Amicon, Beverly USA). Em seguida são levadas para centrífuga refrigerada (Kasvi), em temperatura de 25 °C durante 60 minutos a 5000 rpm. Após o processo de centrifugação é realizada a medida de absorbância do filtrado por espectrofotometria de absorção UV-visível (LAMBDA™ 265 UV/Vis). Apenas a curcumina livre atravessa a membrana, portanto a quantidade quantificada representa a concentração de curcumina. Dessa forma, pela diferença entre o 100% teórico da curcumina utilizado na síntese e a quantidade quantificada após a centrifugação é possível quantificar a eficiência de encapsulação da curcumina, através da equação (1).

$$EE(\%) = \frac{Cur(teórico) - Cur(filtrado)}{Cur(teórico)} \times 100 \quad (1)$$

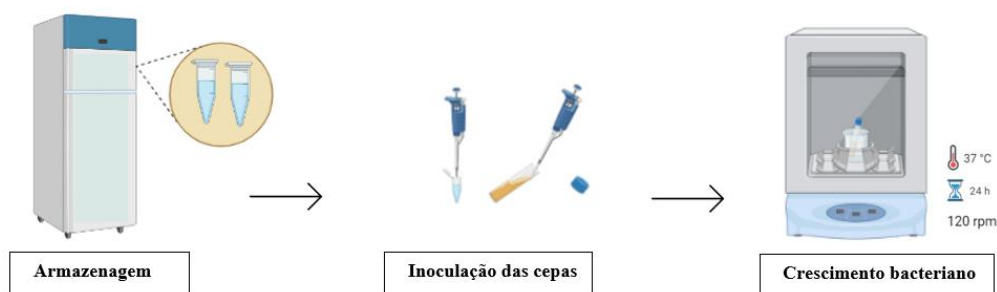
3.11 Cinética de liberação *in vitro*

Para analisar a cinética de liberação da curcumina livre (associada ao processo de difusão) e as NPs Cur, foi utilizado um modelo de dois compartimentos (um compartimento doador e outro receptor), unidos por uma membrana de celulose (Spectrapore®, com poro para exclusão molecular de 1 KDa.). As NPs Cur foram dispostas no compartimento doador enquanto o compartimento receptor contendo o solvente (50% água - 50%etanol), da mesma forma a curcumina livre foi disposta, ambas foram feitas em triplicata. Na sequência alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo, durante 48h e quantificadas por espectroscopia de UV-visível em seguida devolvida no compartimento receptor, e os resultantes foram plotados em porcentagem de liberação em função do tempo.

3.12 Experimentos biológicos

Para realização dos experimentos biológicos foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) Gram-positiva e *Escherichia coli* (ATCC 25922) Gram-negativa. As cepas foram mantidas em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescidas de glicerol a 20% e armazenadas em ultra freezer. As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de estoque disposto em um *ependorf* que é mantido no freezer. Foi adicionado 40 μL do estoque em 5 mL de caldo BHI, em seguida, a solução foi mantida em um agitador orbital com incubadora (Marconi, MA 420) sob agitação de 120 rpm e com controle de temperatura em 37 °C durante um período de 24 h para o crescimento bacteriano, conforme ilustrado na Figura 17.

Figura 17: Processo de crescimento bacteriano.



Fonte: Autora.

Após o período de 24 h, o inóculo foi diluído em solução PBS – Salina (Phosphate Buffered Saline) até que a turbidez de 1,0 na escala McFarland fosse alcançada. Na sequência foi adicionada 500 μL das nanopartículas diluídas em PBS em *ependorfs* nas seguintes concentrações: 0 (controle negativo - CN); 0,02; 0,04 e 0,08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após a adição das nanopartículas foram adicionados 500 μL das bactérias, obtendo assim soluções de 1 mL. Dessa forma temos soluções contendo as NPs-Cur em cada uma das concentrações já citadas e as bactérias na concentração de $1,5\cdot 10^8$ UFC. mL^{-1} na escala 0,5 de McFarland (SCALIA et al., 2015).

Na sequência ao tratamento com as nanopartículas, as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram protegidas da luz sendo envoltas de papel alumínio e submetidas a 1h de internalização.

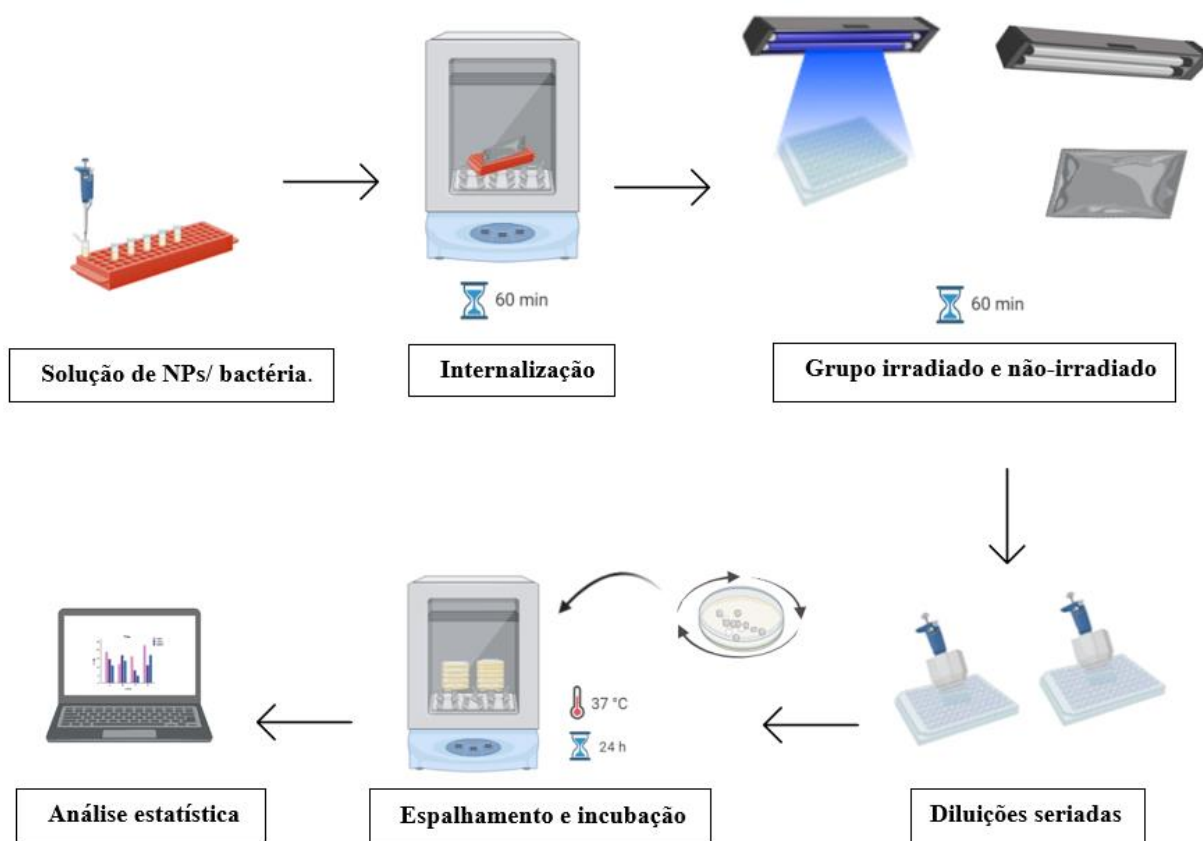
Após o processo de internalização, foram distribuídos 200 μL de cada amostra em duas microplacas de 96 poços separadas em dois grupos: irradiado e não irradiado (escuro). O grupo irradiado foi exposto a luz LED azul (450 nm; 28,82 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) por 1h.

Em seguida foram realizadas diluições seriadas para os dois grupos: irradiado e não irradiado (escuro). Sendo a primeira 1:16 e a segunda 1:32, a diluição 1:32 foi escolhida para

realizar o plaqueamento. Dessa maneira foi coletado 1 μL de cada poço dessa diluição e adicionado no meio PCA (Plate Count Agar) na sequência o espalhamento foi realizado pelo método Copacabana (WORTHINGTON; LUO; PELO, 2001), no qual é realizado com o auxílio de pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro esterilizadas, na qual cerca de 40 pérolas de vidro são adicionadas em cada placa e durante 30 segundos é feito movimentos rotacionais, para um espalhamento efetivo.

Depois de realizar o plaqueamento todas as placas foram colocadas na estufa com a temperatura em 37 °C por 24 h. A Figura 18 apresenta o processo esquematizado do ensaio biológico. Após 24h, o crescimento bacteriano foi avaliado e as unidade formadoras de colônia (UFC) foram contadas, determinando dessa forma a viabilidade bacteriana em relação ao efeito fotodinâmico das NPs-Cur. Todas as análises ocorreram em duplicata e o experimento foi repetido em outras ocasiões.

Figura 18: Processo esquematizado do ensaio biológico.



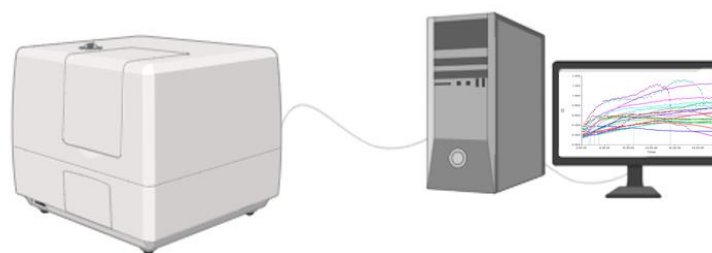
Fonte: Autora.

3.13 Avaliação dos efeitos das interfaces sobre a viabilidade celular bacteriana

Foi realizado um estudo seguindo a cinética de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, para analisar a interação entre a NPs-Cur e as bactérias. Para tal análise as suspensões bacterianas foram preparadas a partir de estoque e realizado o ensaio biológico conforme descrito no item 3.11. Após a realização do ensaio biológico 200 μL do grupo irradiado e não irradiado, das concentrações: 0 (CN); 0,02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram monitoradas.

Os estudos cinéticos de crescimento foram realizados medindo a densidade óptica (DO) a 650 nm utilizando o leitor de microplacas BioTek (SYNERGY H1) durante 46 h, como ilustrado na figura 19.

Figura 19: Ilustração do leitor de microplacas BioTek.



Fonte: Autora.

3.14 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das bactérias

Para o preparo das amostras inicialmente foi realizado um ensaio biológico com as duas cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ambas foram submetidas a IFD, onde temos dois grupos de amostras o grupo irradiado e não-irradiado, utilizou-se a nanopartícula na concentração de 0,08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e um grupo controle, todo o ensaio biológico foi realizado conforme o item 3.9.

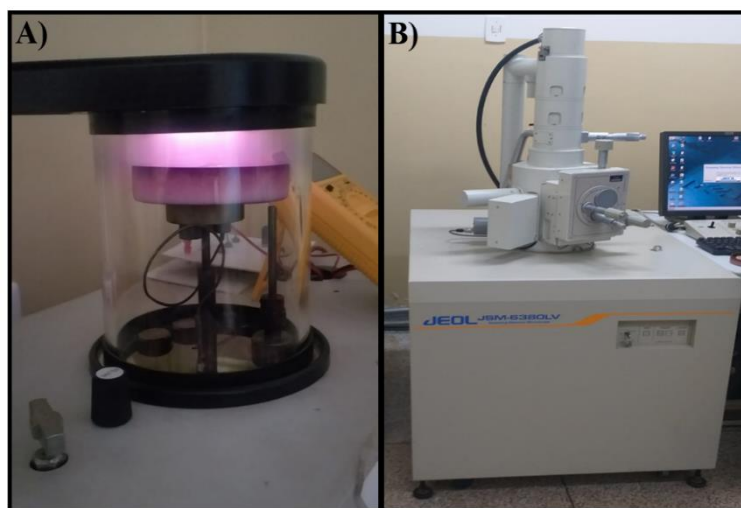
Após a realização do ensaio biológico, os dois grupos de amostras irradiados e não-irradiados, das duas cepas bacterianas, foram coletados 200 μL de cada amostra e distribuídos em *ependorfs*. Em seguida foi adicionado 1 mL de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato em cada um dos *ependorfs* e as amostras foram deixadas nessa solução por um período de 3h, para fixação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 1000 rpm a uma temperatura de 20 °C, após a centrifugação foi retirado 1 mL do sobrenadante e adicionado 1

mL de tampão fosfato, novamente foram levadas para a centrifugação por 5 min a 1000 rpm a uma temperatura de 20 °C, esse processo foi repetido três vezes.

Para a desidratação foi utilizado etanol nas concentrações de 25%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%. A primeira concentração utilizada foi a de 25%, inicialmente foi retirado 1 mL de tampão fosfato e em seguida adicionado 1 mL de etanol a 25%, a amostra permaneceu por 5 min e em seguida foi centrifugada por 5 min a 1000 rpm a uma temperatura de 20°C, logo 1 mL foi retirado e adicionado 1mL da concentração de 50% e levado a centrifugação durante 5 min a 1000 rpm a 20°C, esse processo foi repetido até chegar a concentração de etanol de 100%.

Na sequência foram depositados 10 µL de cada uma das amostras em lamínulas de vidro 18 mm x 18 mm, onde permaneceram por 24h em temperatura ambiente para secagem e fixação. Por fim, as amostras foram colocadas em suporte e revestidas com uma fina camada de ouro depositada pela evaporadora (Denton Vacuum Desk III) como podemos observar na Figura 20A. Depois, imagens foram coletadas como auxílio do microscópio. Após a deposição de ouro, as amostras foram levadas ao microscópio MEV JEOL modelo (JSM-6380LV) (Figura 20B) e obtidas as imagens, a uma tensão de 15 KV e ampliações de 10.000x, 25.000x e 50.000x.

Figura 20: A) Processo de deposição de ouro nas amostras; B) Microscópio MEV JEOL modelo (JSM-6380LV).



Fonte: Autora.

3.15 Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-ME) das bactérias

Para a obtenção das imagens de Crio-ME, inicialmente foi realizado o ensaio biológico conforme descrito no item 3.9. Para essa análise foram utilizados o CN, e a concentração 0,08

mg.mL⁻¹ das NPs-Cur, ambos os grupos irradiado e não irradiado. Logo em seguida a IFD as amostras foram preparadas para visualização das imagens geradas pelo Crio-ME.

As amostras foram vitrificadas com Vitrobot (FEI) a 4°C e 100% de umidade. Então uma alíquota de 3 µL de cada uma das amostras foi aplicada a grades de carbono perfuradas cobertas com óxido de grafeno, em seguida depois as grades foram congeladas com nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram levadas para o microscópio eletrônico de transmissão Talos Arctica G2 (Thermo Fisher Scientific), com feixes de elétrons emitido por efeito de campo e voltagem de 200Kv, para obtenção das imagens das bactérias.

As análises foram realizadas no centro nacional de pesquisa-cnpem em Campinas-SP, no laboratório de nanotecnologia (LNNa).

3.16 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

A determinação de EROs foi realizada com base em adaptações do procedimento realizado por CAIRES et al., 2020. Para tal, 0,06 mL de solução aquosa das NPs à 100 ppm foi adicionado em 0,14 mL de dihydroethidium (DHE) diluído em água destilada na concentração de 0,34 mM. Foi utilizada uma concentração saturante de DHE, para que o surgimento das espécies fluorescentes não cessasse por não ter marcador suficiente para a produção total de EROs.

Os espectros de emissão foram obtidos na região de 515 a 700 nm, quando excitado em 500 nm, por meio de um fluorímetro de bancada (FluoroMate FS-2, Sinco). Durante as análises utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e quatro faces polidas. A produção de EROs produzida pela amostra foi inicialmente monitorada no escuro (reação química) durante 10 min, coletando a intensidade de fluorescência de 1 em 1 minuto. Em seguida as amostras foram expostas a luz azul (450 nm) com uma irradiância de 28,82 mW.cm⁻² durante 10 min, também coletando os espectros de fluorescência de 1 em 1 min. Essa última etapa foi feita para determinar a capacidade de produção de EROs das amostras sob iluminação. O mesmo procedimento foi realizado com o controle negativo, 0,14 mL de dihydroethidium (DHE) diluído em água destilada na concentração de 0,34 mM, para avaliar o efeito de fotólise.

3.17 Análise estatística

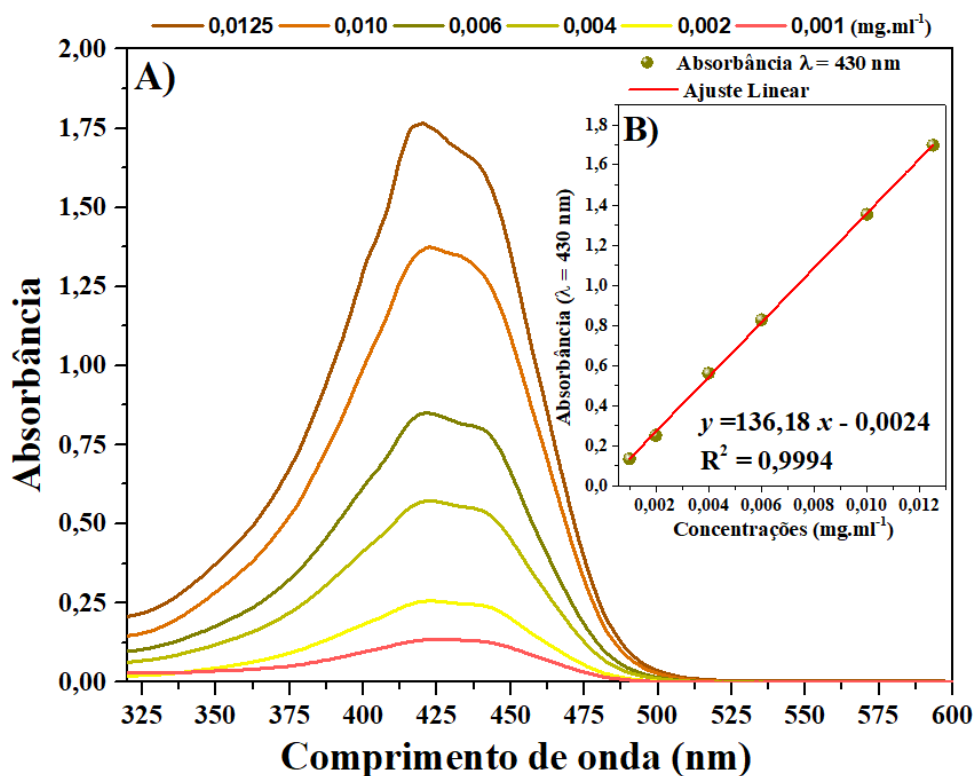
Os experimentos biológicos foram realizados em duplicata. As análises estatísticas dos resultados foram feitas utilizando o teste t-Student ($p \leq 0,05$) com o auxílio do software OriginPro 9.

4 Resultados e discussões

4.1 Curva de calibração

Foi construída uma curva de calibração para realizar a quantificação de concentração da curcumina nas nanopartículas. A Figura 21A apresenta os espectros de absorbância de diferentes concentrações de curcumina em etanol. Para construção da curva de calibração foi escolhido o valor da absorbância em 430 nm em função da concentração de curcumina, conforme mostrado na Figura 21B.

Figura 21: A) Espectros de absorção da curcumina em diferentes concentrações diluída em etanol; B) Curva de calibração da curcumina no $\lambda = 430$ nm.



Fonte: Autora.

Podemos observar que a curva de calibração apresenta uma grande correlação de linearidade entre a absorbância e a concentração da curcumina, representada pela Equação 1 com $R^2 = 0,9994$, onde y representa o valor da absorbância em 430 nm e x a concentração de curcumina em etanol.

$$y = 136,18x - 0,0024 \quad (1)$$

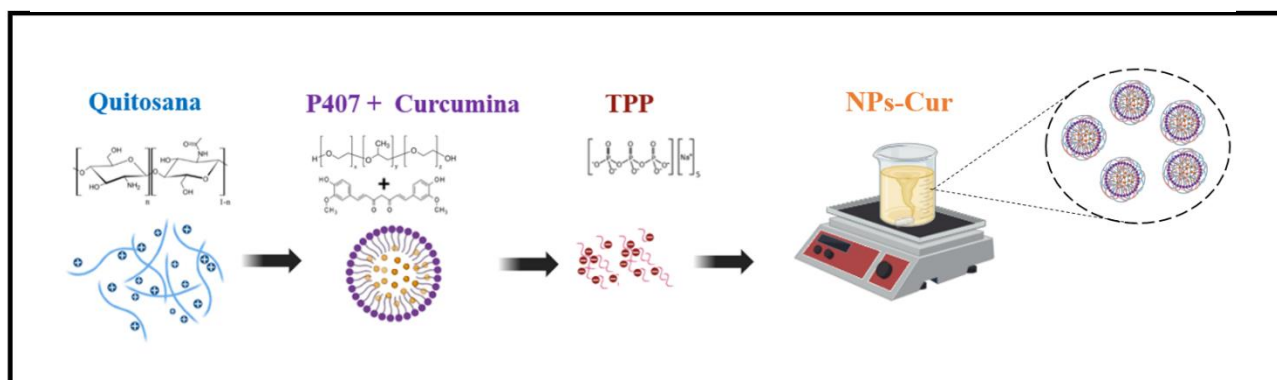
4.2 Síntese das nanopartículas e caracterização da nanopartícula

Apesar da curcumina possuir diversos efeitos terapêuticos e farmacológicos, são muito restritivos devido baixa biodisponibilidade, solubilidade e rápida degradação. Para resolver esse problema, ela pode ser carregada ou conjugada com nanopartículas, que servem como um eficaz sistema de administração de medicamentos (SHOME et al., 2016).

A quitosana também possui propriedades antimicrobianas sendo um biopolímero, biodegradável e biocompatível, com caráter policatiônico intrínseco em meio ácido (FACCHINATTO et al., 2022). O copolímero Polaxamer 407 contém blocos de poli (óxido de etileno) (PEO) e poli (óxido de propileno) (PPO). Esses blocos possuem características anfífilas que conferem propriedades valiosas de associação e adsorção, tornando-o um componente essencial na síntese da nanopartícula (BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018).

Em vista disso, no presente trabalho, com objetivo de aproveitar da melhor maneira as propriedades da curcumina e viabilizar seu uso, foi realizado a síntese de nanopartículas de quitosana carregando curcumina. O copolímero Polaxamer 407 foi fundamental na solubilização da curcumina em solução aquosa atuando também como surfactante na formação da nanopartícula. Podemos observar na Figura 22 a representação esquemática da formação da NPs-Cur.

Figura 22: Representação esquemática da formação da NPs- Cur.

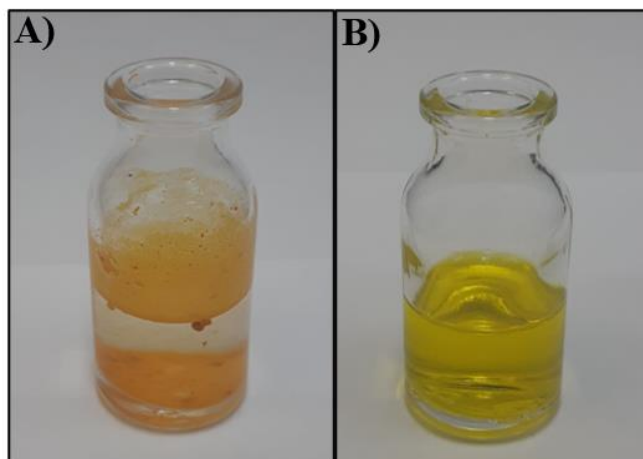


Fonte: Autora.

A nanopartícula obtida possui pH de 3,6 o que contribui na estabilidade da curcumina, uma vez que a curcumina é conhecida por ser estruturalmente mais estável em soluções ácidas do que em soluções neutras ou alcalinas (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005; ZHENG et al., 2017). A Figura 23A e B mostram de maneira comparativa a curcumina livre e na formulação de nanopartículas em água deionizada, respectivamente. Em ambas as amostras temos a curcumina na mesma concentração de 0,16 mg.mL⁻¹. Como podemos observar não

ocorre a solubilização da curcumina em solução aquosa (Figura 23A). Diferentemente, a nanopartícula carreando a curcumina possui aspecto translúcido e não indica a formação de agregados (Figura 23B).

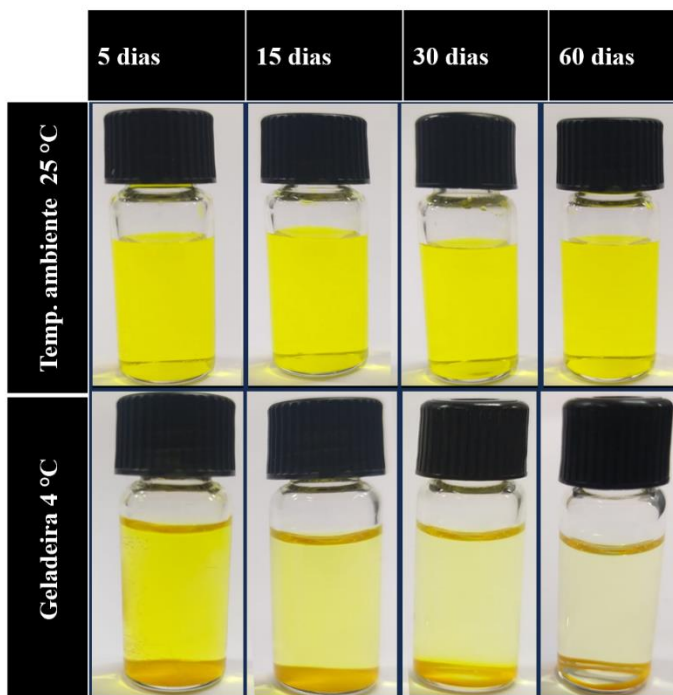
Figura 23: A) Curcumina em água deionizada; B) NPs Cur.



Fonte: Autora.

A nanopartícula tem uma boa estabilidade quando armazenada em temperatura ambiente (em torno de 25°C). A Figura 24 mostra o teste visual de estabilidade.

Figura 24: Estabilidade das nanopartículas em diferentes temperaturas.



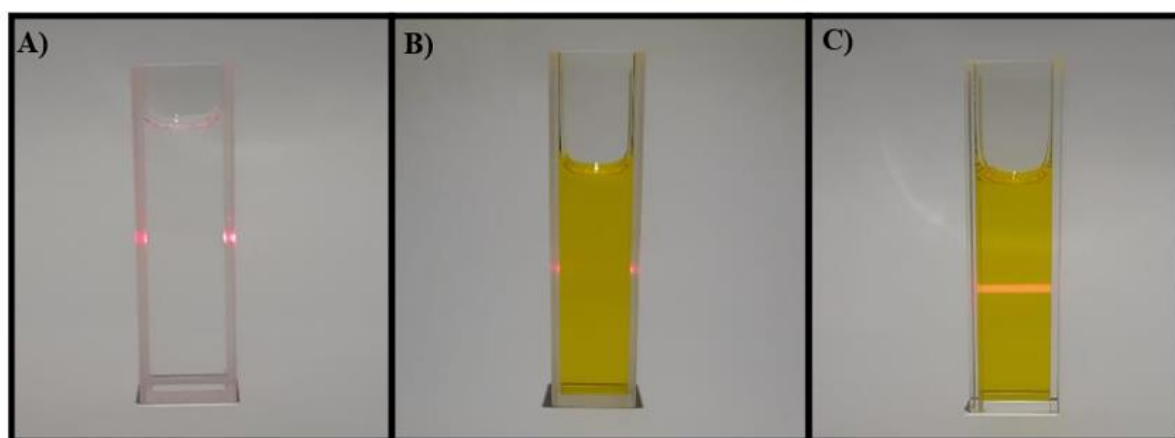
Fonte: Autora.

Neste teste inicial de avaliação de estabilidade, realizado apenas pela inspeção visual, podemos notar que as nanopartículas armazenadas em temperatura ambiente não tiveram mudanças em seu aspecto visual, indicando uma melhor estabilidade que a nanopartícula armazenada na geladeira, na qual ocorreu precipitação. Embora é possível a solubilização desses precipitados através de banho ultrassônico por 15 minutos. Em decorrência desta característica apresentada as NPs-Cur sempre foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento do preparo e a utilização nos ensaios biológicos.

4.3 Análise do Efeito Tyndall

Como podemos observar na Figura 25, os resultados confirmam a obtenção de uma solução coloidal para as NPs-Cur (Figura 25C), diferentemente do obtido para a interação do laser vermelho com as soluções de água deionizada (Figura 25A) e curcumina em etanol (Figura 25B), na qual temos soluções homogêneas não coloidais.

Figura 25: Avaliação do efeito Tyndall nas soluções: A) Água deionizada; B) Curcumina em etanol e C) NPs-Cur.



Fonte: Autora.

Uma vez que os coloides são formados por partículas muito pequenas, não podendo ser identificada a olho nu, os coloides parecem constituir sistemas realmente homogêneos. Entretanto, essas partículas de tamanho nanométrico espalham a luz com eficiência, permitindo a visualização de sua trajetória dentro de um fluido. Portanto, quando conseguimos observar o feixe no interior do sistema, estamos lidando com um coloide, caso contrário, estamos diante de um sistema homogêneo. Neste caso as partículas (moléculas) possuem tamanho inferior a 1 nm, e nos sistemas coloidais o tamanho das partículas varia de 1 a algumas centenas de

nanômetros. (HENRIQUE E. TOMA; DELMÁRCIO GOMES DA SILVA; ULISSES CONDOMITTI, 2016).

4.4 Espalhamento dinâmico de luz (EDL) e Potencial Zeta (ζ).

O espalhamento dinâmico de luz (EDL) e o potencial Zeta (ζ) foram avaliados nas NPs-Cur a fim de caracterizar o diâmetro hidrodinâmico (Dh), índice de polidispersividade (PDI) e carga superficial das nanopartículas em solução. Na Tabela 2 está apresentado os valores do Dh, PDI e ζ da NPs-Cur.

Tabela 2: Resultados do Dh, PDI e ζ das NPs-Cur.

Nanopartícula	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI
NPs-Cur	339 ± 162	20,8 ± 6,8	0,712

Fonte: autora.

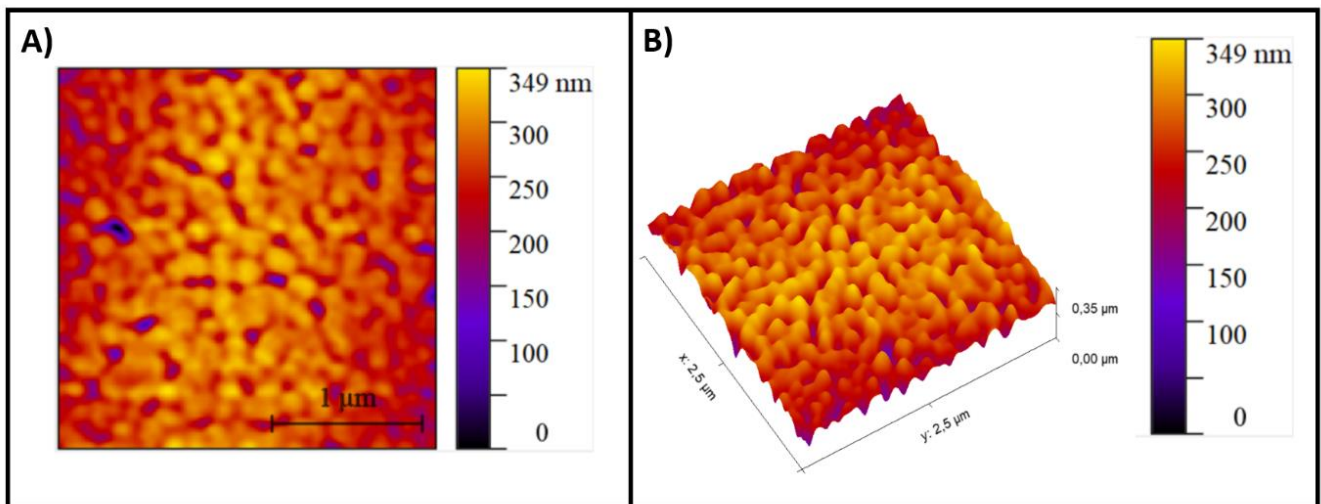
As nanopartículas sintetizadas do presente estudo têm tamanho médio de 339 nm, próximo a outras formulações relatados na literatura, que também utilizam o polímero quitosana e a molécula curcumina. No estudo realizado por (ZAHIRI et al., 2020), onde foi realizada a síntese de nanopartículas de quitosana com curcumina para ser encapsulada em uma estrutura de policaprolactona (PCL) e gelatina (Gela) eletrofiada, para avaliação de cicatrização de feridas in vivo, o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi de 359 nm. Em outro estudo realizado por (ANITHA et al., 2011b), no qual foi realizada síntese de nanopartículas de sulfato de dextrano-quitosana carregados com curcumina, os dados de tamanho de partícula mostraram uma faixa de tamanho de 180–300 nm com um tamanho médio de 220 nm.

O PDI é uma medida da dispersão do tamanho da amostra em relação à sua distribuição de intensidade, com valores variando de 0 a 1. Quando o PDI é menor que 0,2 indica uma população de partículas mais homogêneas, enquanto um valor de PDI maior que 0,3 indica mais heterogeneidade.(LEUNG; SHEN, 2018). As NPs-Cur apresentaram PDI de 0,7, indicando que possuem alta polidispersividade e potencialmente a formação de aglomerados. O potencial Zeta positivo observado na NPs- Cur, se deve a composição de quitosana na formulação, ela é responsável por induzir uma carga positiva na superfície da nanopartícula (WALBI et al., 2022).

4.5 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise por AFM foi realizada para verificação dos aspectos morfológicos e topográficas das NPs-Cur. As imagens obtidas podem ser observadas na Figura 26.

Figura 26: Imagens do Microscópio de Força Atômica: A) Imagem morfológica das NPs-Cur; B) Imagem topográfica das NPs-Cur.



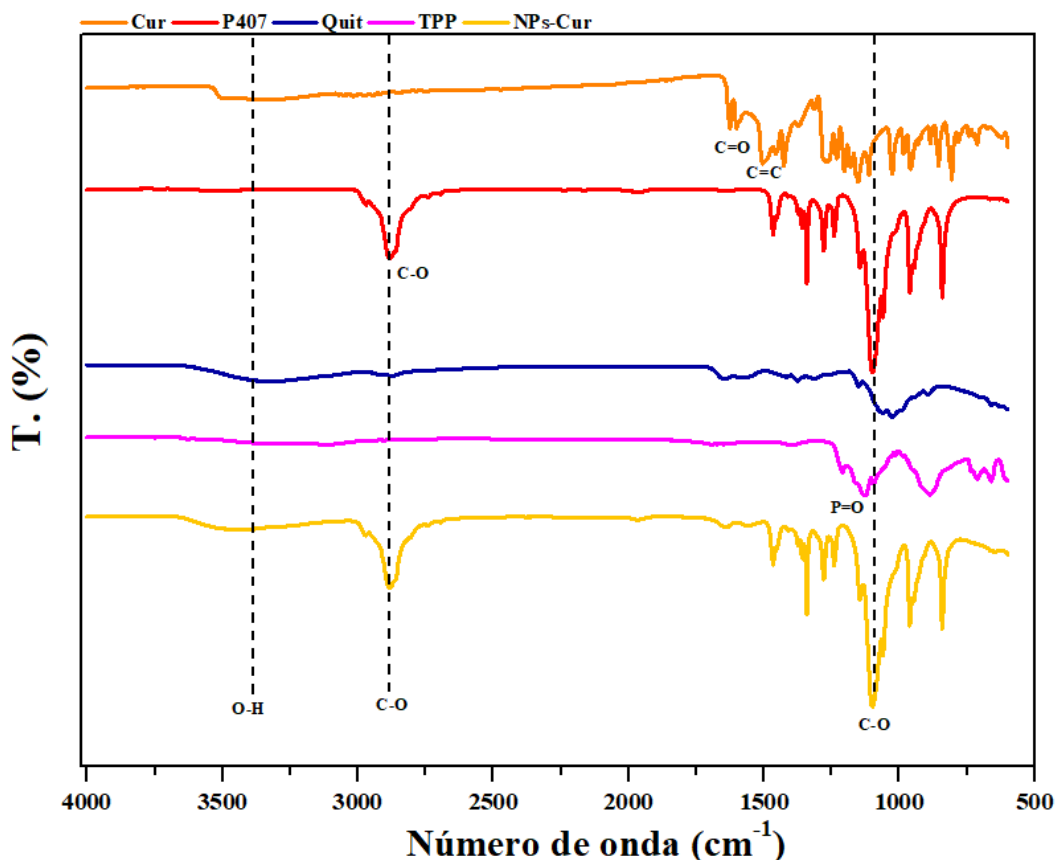
Fonte: Autora.

Na imagem mostrada na Figura 26A podemos observar os aspectos morfológicos das NPs-Cur em 2D, indicando um aspecto esférico. A imagem topográfica em 3D mostra na Figura 26B também sugere que as NPs-Cur apresentam formato esférico, todavia, a distribuição de tamanho não é muito uniforme em concordância com os resultados de EDL.

4.6 Análise por Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Por meio da espectroscopia de FTIR, foi avaliado a composição química das NPs-Cur e investigado a formulação, as potenciais interações entre seus constituintes (P407, quitosana, TPP, curcumina). Na Figura 27 está apresentado os espectros das NPs-Cur e seus constituintes.

Figura 27: Espectros de FTIR da NPs-Cur e seus constituintes.



Fonte: Autora.

Pode-se notar no espectro da curcumina suas bandas características em 1629 cm^{-1} (C=O), 1605 cm^{-1} , 1509 cm^{-1} (C=C), 1428 cm^{-1} (CH alcenos) (LEMES et al., 2017; MASSIMINO; FARIA; YOSHIOKA, 2017). Os espectros de FTIR mostraram bandas características em relação às vibrações do grupo livre de fenol O-H para a curcumina (MASSIMINO; FARIA; YOSHIOKA, 2017)

Os mais característicos do P407 foram as bandas de em torno 1110 cm^{-1} característico de éter C-O e 2883 cm^{-1} referente a C-H, que estão em conformidade com os grupos funcionais do P407. O espectro de quitosana revelou a presença de algumas bandas características em 3335 cm^{-1} O-H. Dentre as principais bandas percebe-se a amida I (deformação axial C = O) situada em 1648 cm^{-1} referente ao grupo NH_2 (Figura 27) e as bandas em 1072 e 1029 cm^{-1} correspondendo à vibração de deformação angular do grupo amina (Divya et al., 2017). O espectro do TPP mostrou suas bandas características nas regiões de 1095 cm^{-1} relacionadas ao grupo fosfato (P = O).

Nos espectros das nanopartículas é notável um deslocamento da banda característica da quitosana em 3335 cm^{-1} relaciona-se com a vibração de estiramento O-H para 3456 cm^{-1} , o que pode indicar uma grande interação do copolímero com a quitosana. O espectro de NPs-

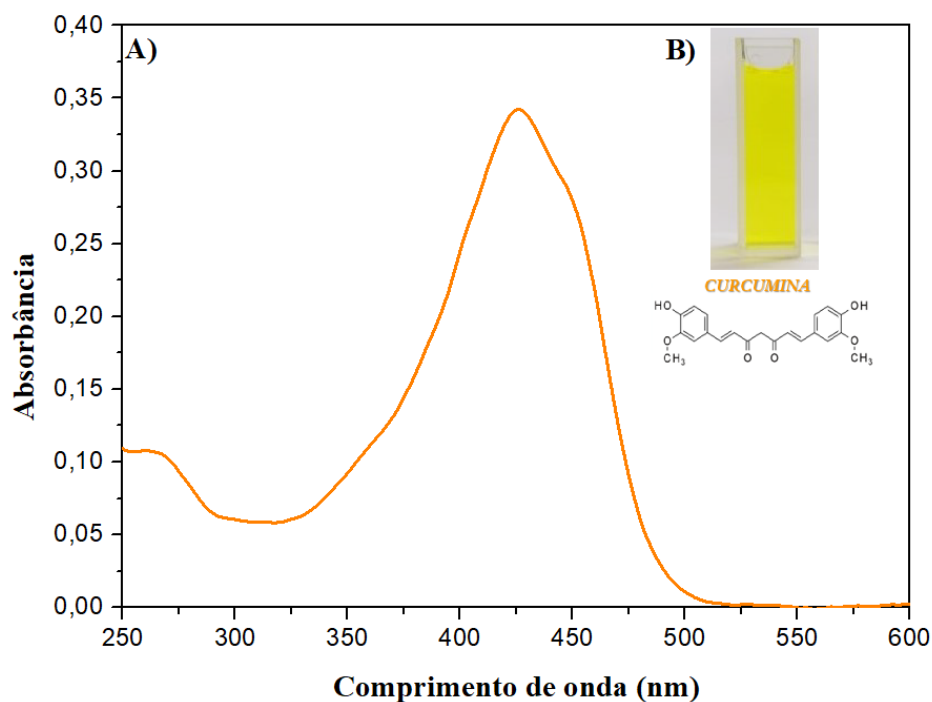
Cur foi em grande parte similar ao dos grupos funcionais do P407, sobrepondo praticamente todas as bandas da curcumina, o que pode indicar que a curcumina está encapsulada dentro das nanopartículas e estamos vendo de forma mais evidente as características da parte externa das micelas.

Essa caracterização da composição química das NPs é fundamental para garantir que as nanopartículas sejam compostas pelos materiais desejados e que a formulação seja bem-sucedida. A presença dos componentes, é crucial para a eficácia das nanopartículas em aplicações práticas.

4.7 Espectroscopia de absorção ultravioleta/visível (UV-vis) e Fluorescência

Para analisar a interação da luz com as nanopartículas é fundamental verificar sua região de absorção. A fim de realizar essa avaliação, a abordagem envolvida utiliza o uso da espectroscopia de absorção UV-Vis. Portanto, foi obtido o espectro de absorção da NPs-Cur, como apresentado na Figura 28 A, também podemos visualizar na Figura 28 B a solução com as NPs-Cur diluída em água deionizada na cubeta. Podemos observar que as NPs-Cur possuem uma banda de absorção na região do azul, com absorção máxima em torno de 425 nm, apresentando a característica de absorção da curcumina.

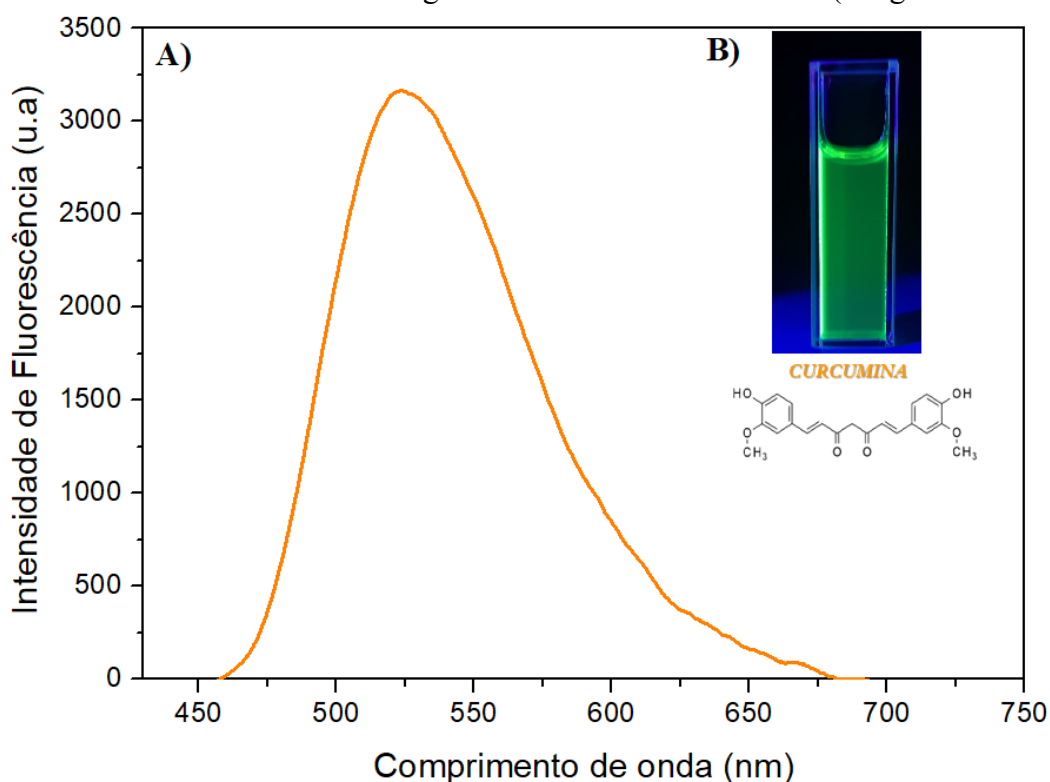
Figura 28: A) Espectros de absorção UV-vis da NPs-Cur em água deionizada. B) imagem da NPs Cur na cubeta e da molécula de curcumina (figura inserida).



Fonte: Autora.

A Figura 29A apresenta o espectro de Fluorescência da NPs-Cur em água deionizada podemos observar uma banda de fluorescência entre 470 e 700 nm, quando excitada em 460 nm, com máxima intensidade de emissão em torno de 525 nm, região do verde do espectro eletromagnético. Na Figura 29 B mostra a fluorescência da NPs-Cur quando excitada com luz UV (380nm).

Figura 29: A) Espectro de Fluorescência da NPs-Cur em água destilada, B) NPs-Cur em água destilada excitada com luz UV 380 nm e imagem da molécula de curcumina (imagem inserida).



Fonte: Autora.

4.8 Eficiência de encapsulação da curcumina

A eficiência de encapsulação obtida pela NPs Cur foi de 96% o que demonstra uma excelente afinidade da curcumina com a matriz polimérica.

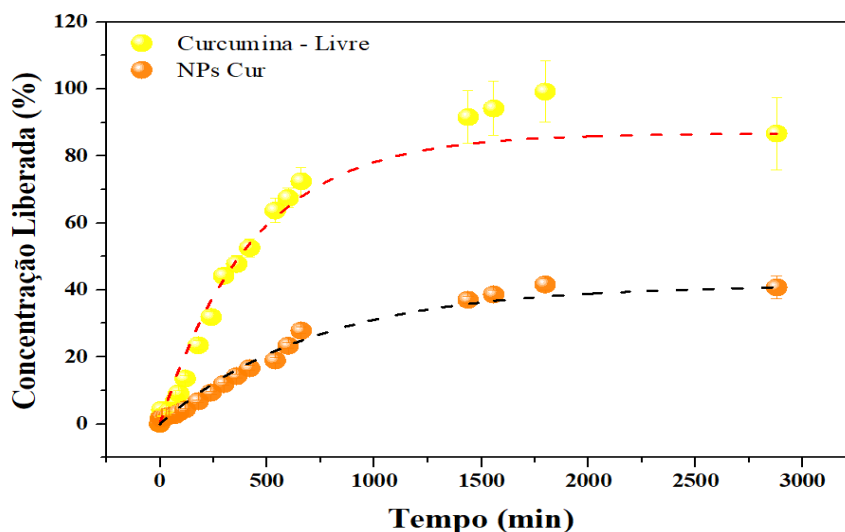
Há uma ampla variação na eficiência de encapsulação, dependendo do material e do processo. Estudos demonstram altas eficiências de encapsulamento para diferentes nanopartículas à base de polímeros. Como no estudo realizado por WILHELM ROMERO et al., 2021, que sintetizaram nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas (NPsHLP) carregando desmetoxicurcumina (DMC) e bisdemetocurcumina (BDM). Essas NPsHLP carregadas com DMC e BDM alcançaram uma eficiência de encapsulamento $\geq 92\%$ de ambas as sínteses. No estudo realizado por CHEN et al., 2021, foram produzidas NPs com quitosana para o transporte de curcumina, através do método de nanoprecipitação flash, cuja eficiência de encapsulamento

foi acima de 95%. Temos também como exemplo o estudo realizado por YUAN et al., 2022, que produziram nanopartículas de nanocristais de celulose carregando curcumina, que exibiram uma alta eficiência de encapsulação de mais de 90%. Esses estudos demonstraram a alta eficácia de sistemas de encapsulamento baseados em polímeros, para a encapsulação eficiente da curcumina. Em vista disso a quitosana se mostra uma excelente matriz polimérica para encapsulação da curcumina, o que justifica seu uso na síntese do presente trabalho.

4.9 Cinética de liberação *in vitro*

A investigação da cinética de liberação das amostras revela informações sobre a eficácia e o perfil de liberação da curcumina. A análise dos dados cinéticos proporciona uma melhor compreensão sobre os mecanismos de liberação e as características de transporte. Com base nos resultados da cinética de liberação, observou-se uma diferença significativa na taxa e no perfil de liberação entre a curcumina livre (associada ao processo de difusão) e a nanopartícula desenvolvida. Enquanto a curcumina livre demonstrou uma liberação muito mais rápida, com cerca de 50% liberado em apenas 400 minutos, as nanopartículas apresentaram uma liberação mais gradual e prolongada ao longo do tempo. As NPs Cur liberaram aproximadamente 17% da curcumina nesse mesmo intervalo de tempo, como apresentado na Figura 30.

Figura 30: Cinética de liberação *in vitro* da curcumina livre e das NPs Cur.

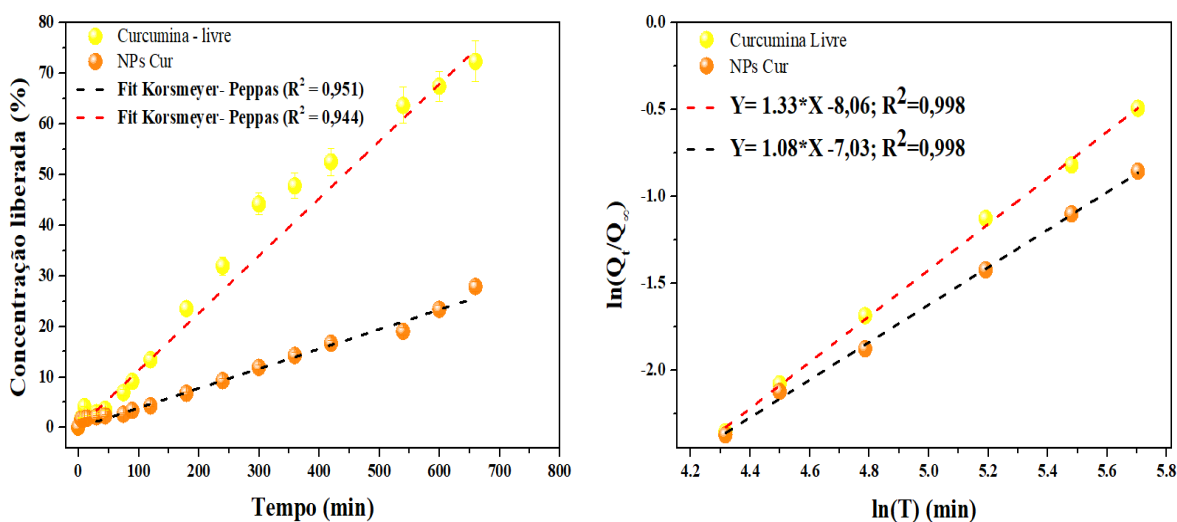


Fonte: Autor

A escolha do Modelo de Korsmeyer-Peppas (equação 2) para análise da cinética de liberação foi utilizado para descrever adequadamente o perfil de liberação observado, por possuir um melhor ajuste aos dados experimentais com um valor mais alto de R^2 em comparação com outros modelos.

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = Kt^n \quad (2)$$

Figura 31: Cinética de liberação in vitro da NPs Cur e curcumina livre no intervalo menor que 60% da curcumina liberada, com fitting da curva com o modelo de Korsmeyer-Peppas (A); E gráfico do $\ln\left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right)$ vs $\ln(T)$ para determinação do expoente de liberação (B).



* Q_t é a quantidade de curcumina liberada em um determinado tempo t , Q_∞ é a quantidade de curcumina liberada em um tempo infinito, k é a constante cinética de liberação e n é o expoente de liberação.

Fonte: Autor

Tabela 3: Descrição do Mecanismo em função do expoente de liberação.

Expoente de liberação (n)	Mecanismo de transporte
$n = 0,5$	Modelo de Fick (ou Fickiano) (Caso I)
$n = 1,0$	Modelo não-Fickiano (Caso II)
$0,5 < n < 1,0$	Modelo não-Fickiano (Caso Anomalo)
$n < 0,5$	Comportamento pseudo Fickiano
$n > 1,0$	Modelo não-Fickiano (Super Caso II)

Fonte:(PAULA; MENDES, 2019)

As constantes cinéticas (K) calculadas para Curcumina livre e para NPs Cur foram de 0,3365 e 0,1970 respectivamente, indicando a taxa de liberação da curcumina livre mais rápida que a curcumina encapsulada, o que é esperado, uma vez que para ocorrer a liberação as NPs precisam de desfazer, e isso leva um tempo a mais para ocorrer. Além disso, os expoentes de

liberação (n) foram de para curcumina livre é 1,33 para NPs Cur é 1,08, sugerindo um mecanismo do modelo correspondente é não-Fickiano (super caso II), o que pode significar que acontece os fenômenos de tensão e quebra das cadeias poliméricas no caso das NPs Cur. Ou seja, o núcleo polimérico da quitosana acaba se rompendo e ocorre a liberação da curcumina. É importante dizer, que para determinar o expoente n, é recomendado o uso dos dados experimentais de até 60% de liberação acumulada ($\frac{Q_t}{Q_\infty} < 0,60$)(COSTA; SOUSA LOBO, 2001; KORSMEYER et al., 1983; RITGER; PEPPAS, 1987).

Os resultados evidenciam a eficácia das nanopartículas como sistemas de liberação controlada para curcumina. A liberação mais gradual e prolongada das nanopartículas em comparação com a curcumina livre é atribuída à presença da matriz polimérica, que retarda a liberação do fármaco.

Outras pesquisas utilizam nanopartículas para liberação modificada de curcumina. Por exemplo, a pesquisa realizada por SHEN et al., 2023, investigou neste estudo, nanopartículas compostas por quitosana modificada com ácido esteárico (SA-CS) e caseinato de sódio (NaCas) foram formadas utilizando dextrano oxidado com periodato de sódio com diferentes pesos moleculares como agente de reticulação. Nesse estudo comparou a curcumina livre, a liberação sustentada da curcumina encapsulada e demonstram que essa liberação foi significativamente reduzida para 17,9% e a capacidade de eliminação de radicais livres melhorou para 78,7% para curcumina encapsulada.

Além disso, estudos como o de (ZARE-ZARDINI et al., 2022) exploraram Nanopartículas de proteína de soja contendo curcumina (curcumina – SPNs) para avaliação da atividade anticancerígena, que foram testadas linhagens celulares de sarcoma osteogênico (SAOS2) foram incubadas com diferentes concentrações de nanoestruturas. A liberação da curcumina livre foi mais de 50% do fármaco foi liberado nas primeiras 2 horas. Após este período, a liberação lenta do medicamento continuou até 62-83% do medicamento pelas próximas 48h.

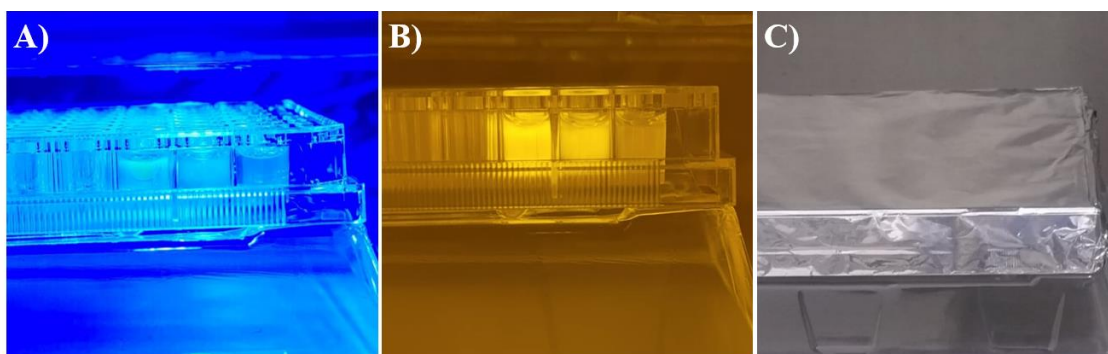
É importante ressaltar que a eficácia das nanopartículas como carreadores pode ser influenciada por diversos fatores, como o tipo de polímero utilizado, o método de preparação das nanopartículas e as condições de liberação do composto. Estudos adicionais são necessários para otimizar esses parâmetros e entender melhor o mecanismo de liberação da curcumina.

4.9 Experimentos biológicos

Os experimentos biológicos foram realizados para avaliar a capacidade da nanopartícula de inibir o crescimento bacteriano, quando na ausência e presença da luz (efeitos químicos e fotoquímicos). Para tal, as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram divididas em dois grupos: (I) irradiado e (II) não irradiado. Elas foram submetidas a algumas concentrações da nanopartícula, bem como alguns de seus componentes, ambos na mesma concentração do preparo das nanopartículas.

O grupo I foi irradiado por um LED azul, no comprimento de onda de 450 nm, por uma dose energia de 28,84 mW.cm⁻². Já o grupo II, não irradiado, ficou submetido ao escuro, sendo isolado com papel alumínio, como apresentado na Figura 32.

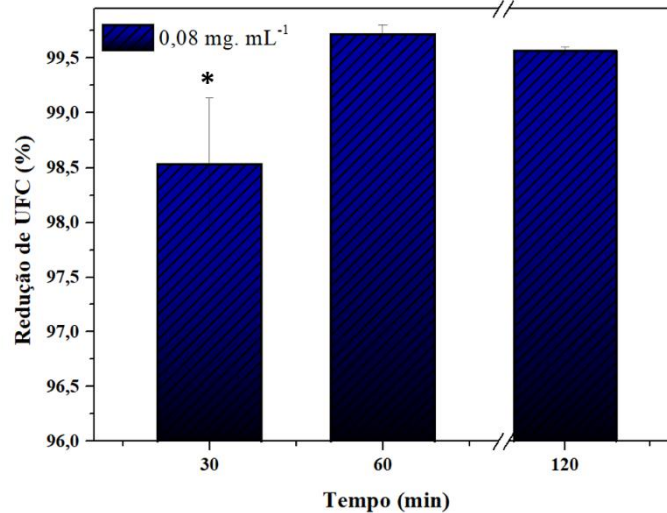
Figura 32: A) e B) Amostras sob irradiação da luz azul. Em B) imagem foi obtida utilizando filtro bloqueador de luz azul para visualização da fluorescência; C) Amostras deixadas na ausência de luz.



Fonte: Autora.

Inicialmente foi analisado a internalização das nanopartículas com bactéria *E. coli*, variando-se o tempo de internalização. Com base na literatura alguns estudos mostram que as bactérias Gram-negativas são menos suscetíveis à IFD que as Gram-positivas (HUANG et al., 2012). Por esta razão, iniciamos os testes com a bactéria *E. coli*. No primeiro teste realizado utilizou-se um tempo de 30 minutos de internalização e 30 minutos de irradiação. Mantendo-se o tempo de irradiação, foi variado os tempos de internalização em 1h e 2h. O resultado da redução percentual de UFC em função dos tempos de internalização está representado na Figura 31. O tempo de 30 min apresentou diferença significativa em relação aos tempos de 60 e 120 min, neste tempo houve menor redução no crescimento bacteriano, o tempo que apresentou uma melhor redução no crescimento bacteriano foi de 60 min.

Figura 33: Redução em porcentagem de UFC variando o tempo de internalização das NPs-Cur



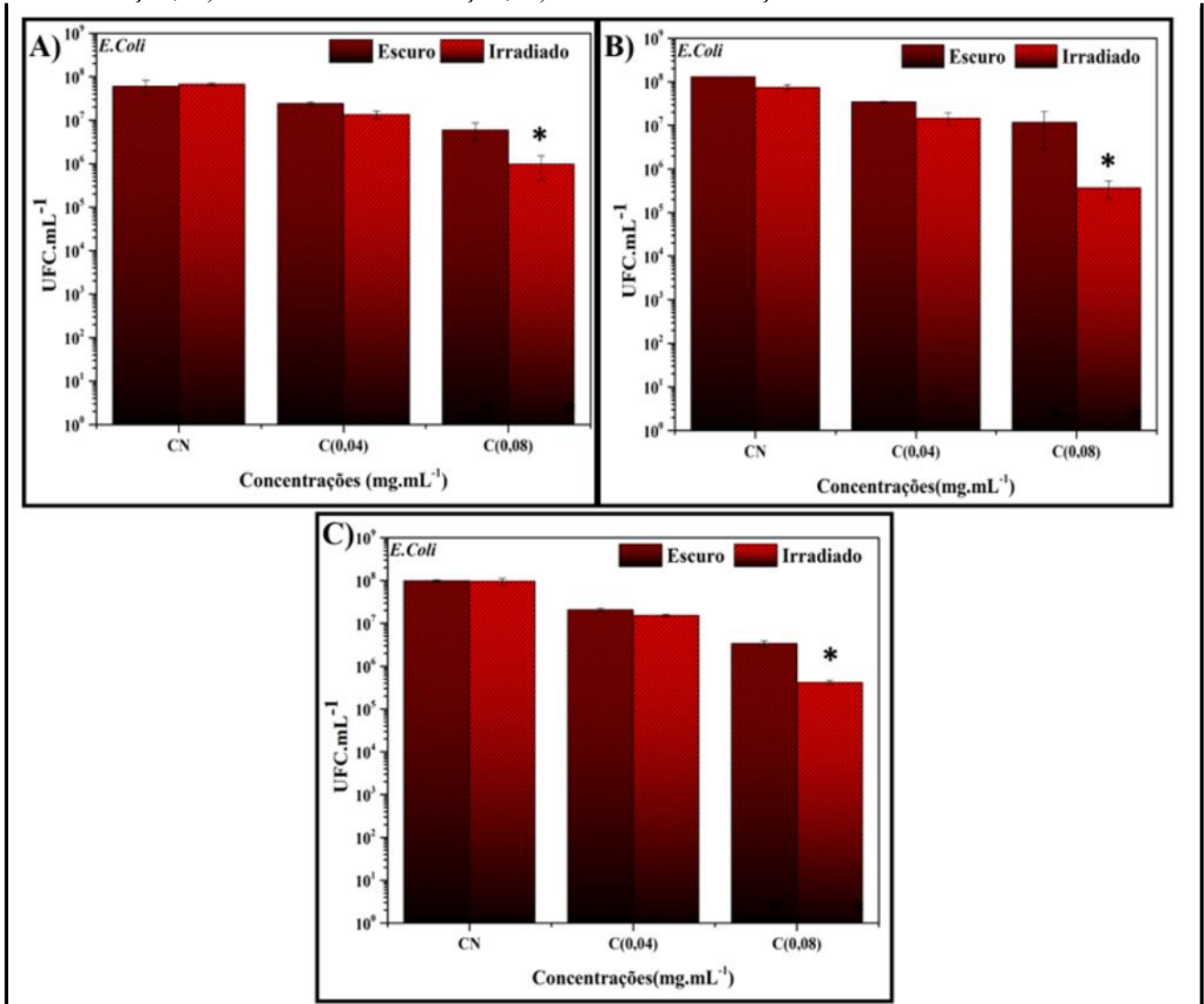
Legenda: * Apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste T-Student em relação ao tempo 60 e 120 min.

Fonte: autora.

O Gráfico da Figura 33 traz os resultados da concentração $0,08 \text{ mg. mL}^{-1}$ do grupo irradiado, pois foi a concentração que apresentou maior inibição bacteriana. Esta avaliação inicial realizou o monitoramento das concentrações $0,04$ e $0,08 \text{ mg. mL}^{-1}$ comparando com o controle negativo, no gráfico apresentado pela Figura 34. Com base nos resultados deste estudo inicial em relação aos efeitos das NPS-Cur referente ao tempo de internalização, todos os testes realizados na sequência fixaram-se com o tempo de internalização de 1 h, pois foi o que apresentou o melhor efeito inibitório como mostrado na Figura 33.

Nesse estudo as NPs-Cur apresentaram efeito fotodinâmico com reduções significativas quando comparadas ao controle negativo, como podemos observar na Figura 34.

Figura 34: Ensaio biológicos variando tempo de internalização: A) 30 minutos de internalização; B) 1 hora de internalização; C) 2 h de internalização.



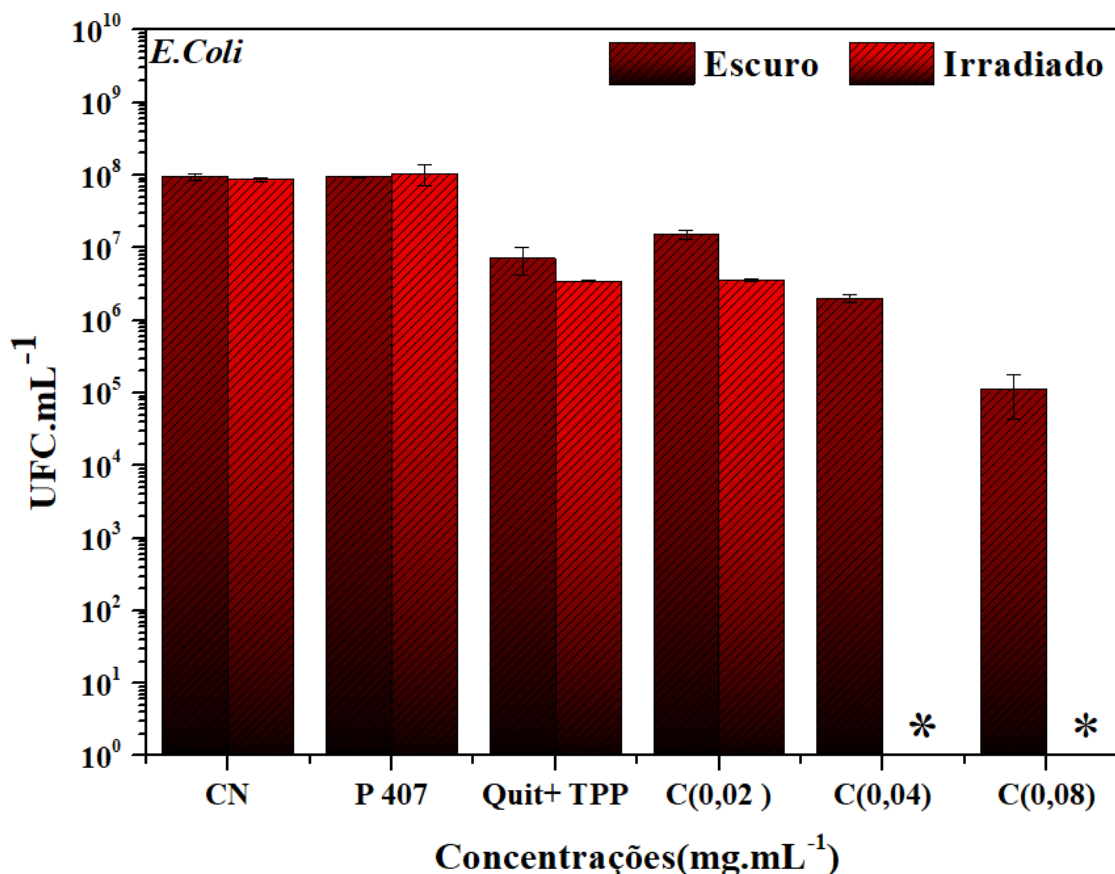
Legenda: * Apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste T-Student em relação ao CN.

Fonte: autora.

Podemos observar que houve uma melhora no efeito fotodinâmico principalmente para concentração mais alta, para os diferentes tempos de internalização, os resultados indicam que as NPs -Cur na concentração de $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$, apesar de exibirem um efeito fotodinâmico, não se revelaram capazes de eliminar as bactérias, seu efeito foi bacteriostático ($< 3 \log_{10}$ UFC de redução) (FRENCH, 2006), pois inibiu o crescimento de colônias após o IFD.

No intuito de aumentar a inibição bacteriana, e verificar se as NPS possuem propriedades bactericidas e fotobactericidas aumentou-se o tempo de irradiação para uma hora. Neste ensaio biológico também foram testados os elementos que compõem a NPs-Cur, P 407 na concentração de 25 mg.mL^{-1} e Quitosana + TPP a 1 mg.mL^{-1} , ambos na mesma concentração que estão presentes nas NPs, bem como as concentrações da NPs-Cur de $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$. O resultado está apresentado na Figura 35.

Figura 35: Resultado do ensaio biológico da *E. coli*.



Legenda: * Apresentou atividade fotobactericida (>3 log₁₀ UFC de redução).

Fonte: Autora.

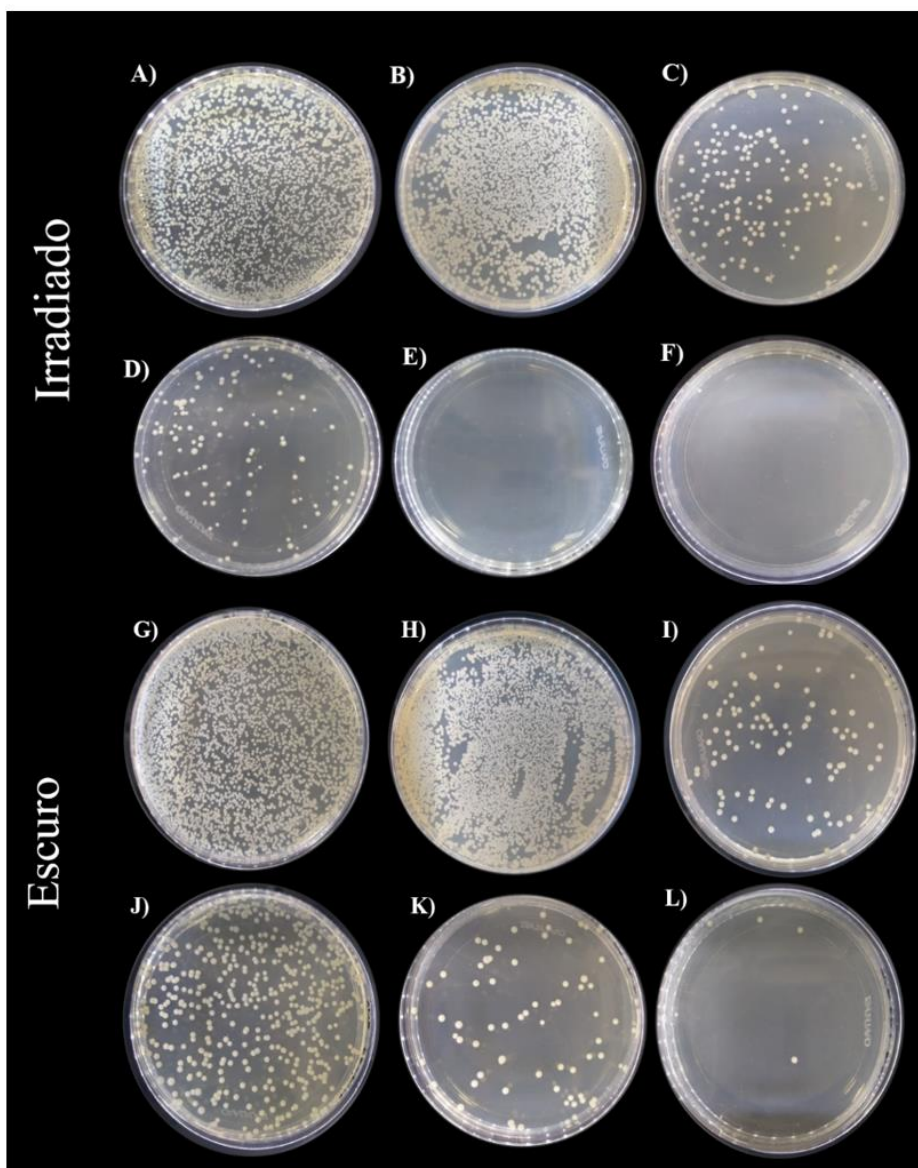
Notavelmente ocorreu efeito fotodinâmico, mostrando o potencial das NPs-Cur como fotobactericida (>3 log₁₀ UFC de redução) para as concentrações 0,04 e 0,08 mg.mL⁻¹ do grupo irradiado (FRENCH, 2006). Ocorreram reduções também nos grupos irradiados, Quitosana +TPP a 1 mg.mL⁻¹ e NPs na concentração de 0,02 mg.mL⁻¹ de ~ 1,5 log₁₀ para ambos.

Podemos observar na Figura 35, que houve efeito químico, reduções significativas no grupo submetido ao escuro, quando comparados ao grupo CN, temos uma redução próxima de ~ 0,9 log₁₀ para o grupo submetido ao escuro da solução Quitosana +TPP a 1mg.mL⁻¹, uma redução de ~1,3 log₁₀, ~1,8 log₁₀ e ~3 log₁₀ para as concentrações de 0,02 mg.mL⁻¹; 0,04 mg.mL⁻¹ e 0,08mg.mL⁻¹ respectivamente. Este efeito químico é esperado pois a quitosana possui efeito antimicrobiano de amplo espectro, mostrando que as nanopartículas de quitosana podem gerar um efeito adicional que poderá ser somado aos da IFD, ampliando a efetividade da inativação das bactérias (DARABPOUR; KASHEF; MASHAYEKHAN, 2016).

A solução de P407 na concentração de 25 mg.mL⁻¹ não apresentou efeitos químicos e nem fotodinâmicos, o que também é esperado, pois seu papel principal na síntese é a

estabilização das NPs. Este resultado confirma o que já é reportado na literatura, que o P407 não apresenta toxicidade (DE DIOS-PÉREZ et al., 2023). A Figura 36 apresenta imagens ilustrativas das UFCs em placas de Petri para os grupos testados no ensaio biológico da IFD e não irradiados, respectivamente.

Figura 36: Imagens das placas de Petri da bactéria *E. coli* para o grupo irradiado: A) CN; B) P407; C) Quit. + TPP; NPs Cur D) 0,02 mg.mL⁻¹; E) 0,04 mg.mL⁻¹; F) 0,08 mg.mL⁻¹. E grupo submetido ao escuro: G) CN; H) P 407; I) Quit. + TPP; concentrações de NPs Cur J) 0,02 mg.mL⁻¹; K) 0,04 mg.mL⁻¹; L) 0,08 mg.mL⁻¹.



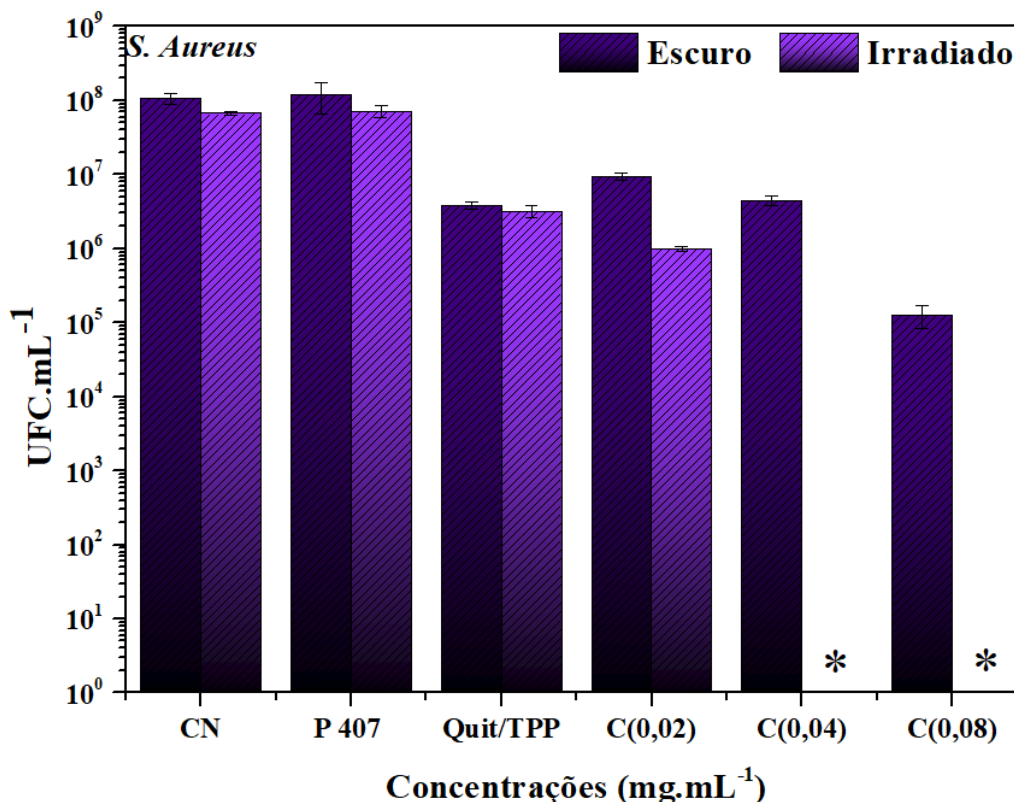
Fonte: Autora.

No ensaio biológico realizado com a bactéria *Staphylococcus aureus* foram testados elementos que compõem a NPs-Cur, o P 407 na concentração de 25 mg.mL⁻¹ e a Quitosana

+TPP a $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, ambos na mesma concentração da síntese da nanopartícula, bem como as concentrações da NPs Cur de $0,02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,04\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,08\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Seguindo os mesmos parâmetros do ensaio realizado com a bactéria *E.coli*.

Na figura 37 está apresentado o resultado do teste realizado com a bactéria *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva).

Figura 37: Resultado do ensaio biológico da *S. aureus*.



Legenda: * Apresentou atividade fotobactericida ($>3\text{ log}_{10}$ UFC de redução).

Fonte: autora.

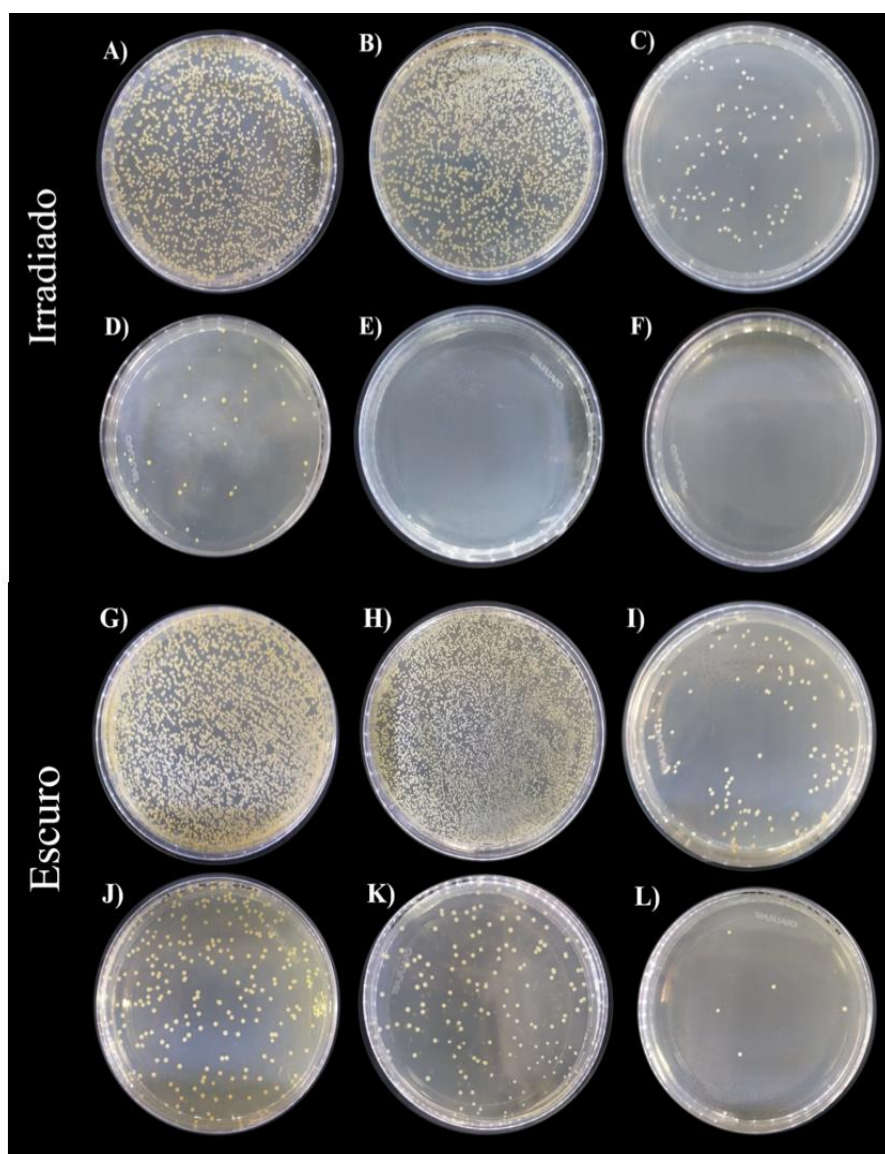
Assim como nos ensaios realizados com a *E.coli* houve efeito fotodinâmico, mostrando efeitos fotobactericida ($>3\text{ log}_{10}$ UFC de redução) para as concentrações $0,04$ e $0,08\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do grupo irradiado (FRENCH, 2006). Ocorreram reduções também nos grupos irradiados, Quitosana +TPP a $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e NPs Cur na concentração de $0,02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de $\sim 1,5\text{ log}_{10}$ e $\sim 2,0\text{ log}_{10}$ respectivamente.

Da maneira semelhante houve efeito químico, no ensaio realizado com a *S. aureus*, também ocorreram reduções significativas no grupo submetido ao escuro, quando comparados ao grupo CN, temos uma redução próxima de $\sim 0,9\text{ log}_{10}$ para o grupo submetido ao escuro da solução Quitosana +TPP a $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, uma redução de $\sim 1,5\text{ log}_{10}$, $\sim 1,0\text{ log}_{10}$ e $\sim 2,9\text{ log}_{10}$ para as concentrações de $0,02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,04\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,08\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. Este efeito

químico se justifica pelo fato da quitosana possuir efeito antimicrobiano (ONG et al., 2017). Da mesma forma que ocorreu no ensaio com a E.coli a solução de P 407 na concentração de $25\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, não apresentou efeitos químicos nem fotodinâmicos.

As imagens das placas de Petri, para os grupos testados no ensaio biológico da IFD, estão nas imagens 38.

Figura 38: Imagem das placas de Petri da bactéria S.aureus para o grupo irradiado: A) CN; B) P 407; C) Quit. + TPP; concentrações de NPs Cur D) $0,02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; E) $0,04\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; F) $0,08\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. E grupo submetido ao escuro: G) CN; H) P 407; I) Quit. + TPP; NPs Cur : J) $0,02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; K) $0,04\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; L) $0,08\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

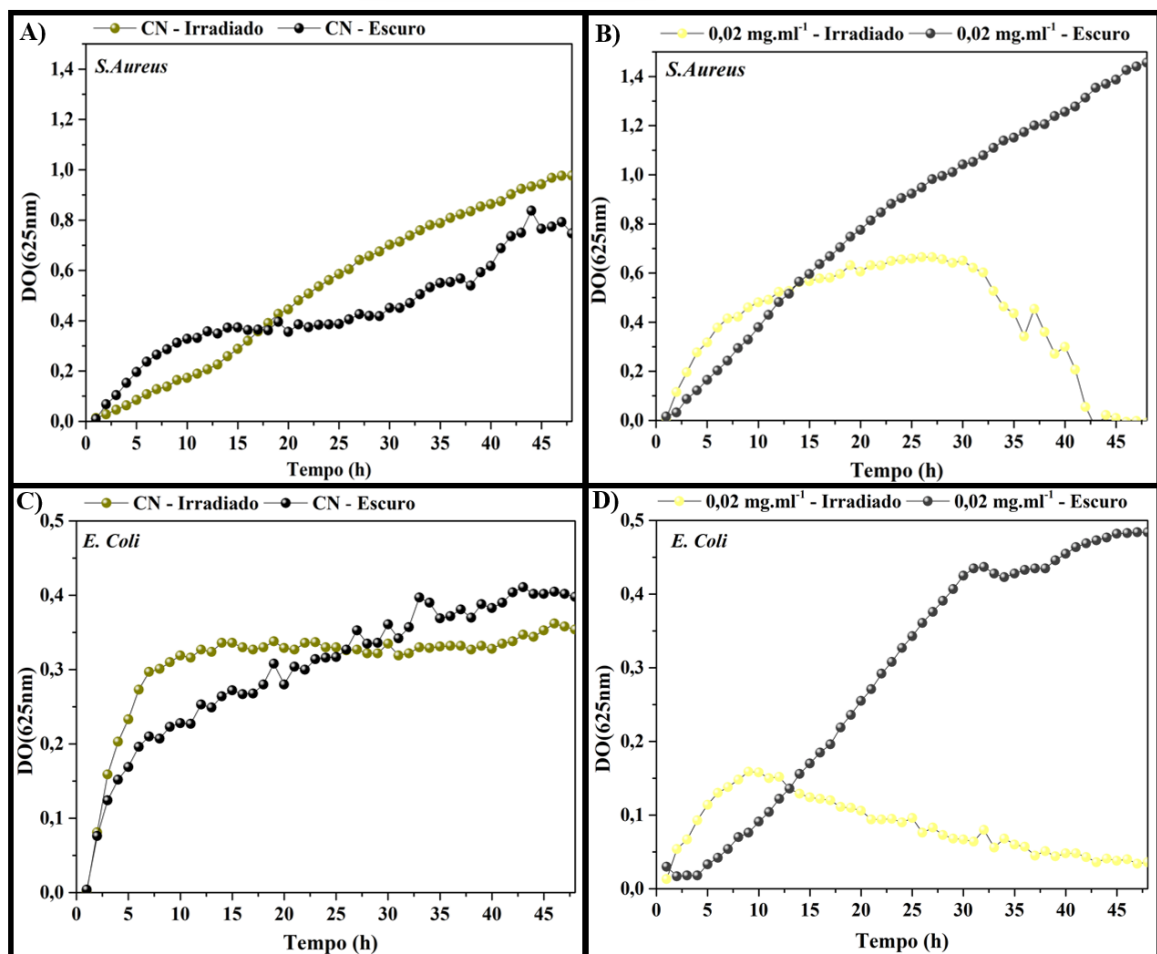


Fonte: autora

4.10 Efeito das interfaces sobre a viabilidade celular bacteriana

Os estudos de cinética de crescimento de *S. Aureus* e *E. Coli* são apresentados na Figura 39, na presença de NPs-Cur a uma concentração de $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ e um controle negativo, divididos em dois grupos: um grupo irradiado e um grupo submetido ao escuro.

Figura 39: A) cinética de crescimento da *S. aureus* controle negativo; B) cinética de crescimento da *S. Aureus* com NPs-Cur; C) cinética de crescimento da *E. coli*, controle negativo; d) cinética de crescimento da *E. coli* com NPs- Cur.



Fonte: autora.

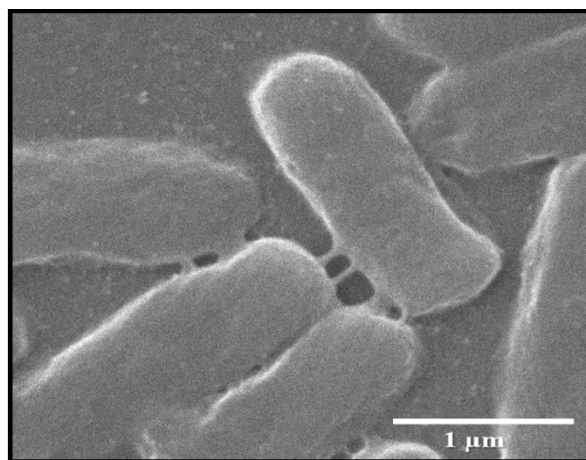
A Figura 39-A ilustra a curva de crescimento de *S. aureus*, representando a densidade óptica do controle negativo, e na Figura 39-B a curva de crescimento de *S. aureus* submetida à IFD com as NPs- Cur e respectivamente o mesmo para 39 - C e D com a *E. coli*. Como evidenciado pelas figuras, foi observada uma notável alteração do crescimento no grupo irradiado em comparação com o grupo de controle e o grupo mantido no escuro.

4.11 Avaliação morfológica: MEV das bactérias *E. Coli* e *S. Aureus* submetida à IFD

Para realização de análises morfológicas das bactérias foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV), após os grupos serem submetidos a inativação fotodinâmica, as amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.10.

O grupo controle negativo apresenta a morfologia da superfície da bactéria *E. coli* no formato de bastonetes, com diâmetro de 0,5 μm a 0,7 μm por 1,5 a 3 μm de comprimento aproximadamente, conforme mostrado na Figura 40. No grupo controle negativo, podemos notar sua estrutura lisa e intacta apresentando morfologia normal.

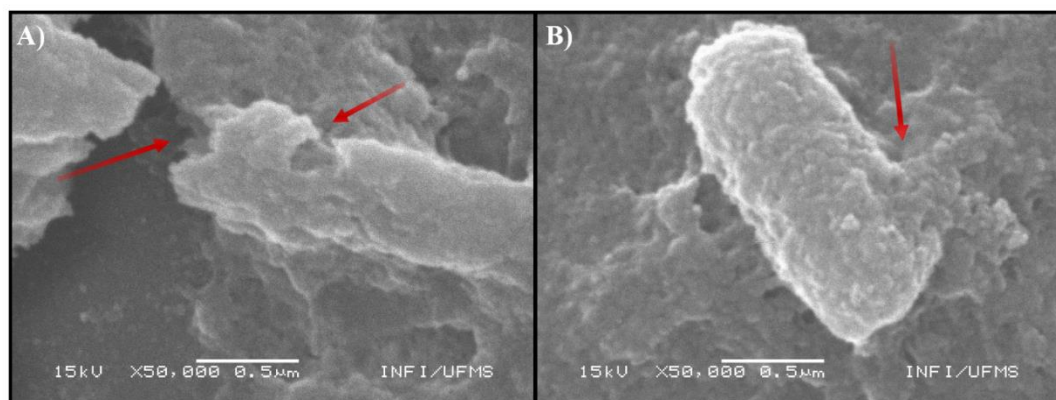
Figura 40: Imagem do MEV do grupo controle negativo *E. coli*.



Fonte: Autora

As Figuras 41A e B mostram imagens representativas das *E. coli* que foram submetidas a irradiação, onde as setas em vermelho indicam severos danos nas bactérias ocasionando a lise celular. Além disso, podemos observar também que as nanopartículas em formatos próximos ao esférico estavam presente na membrana da bactéria.

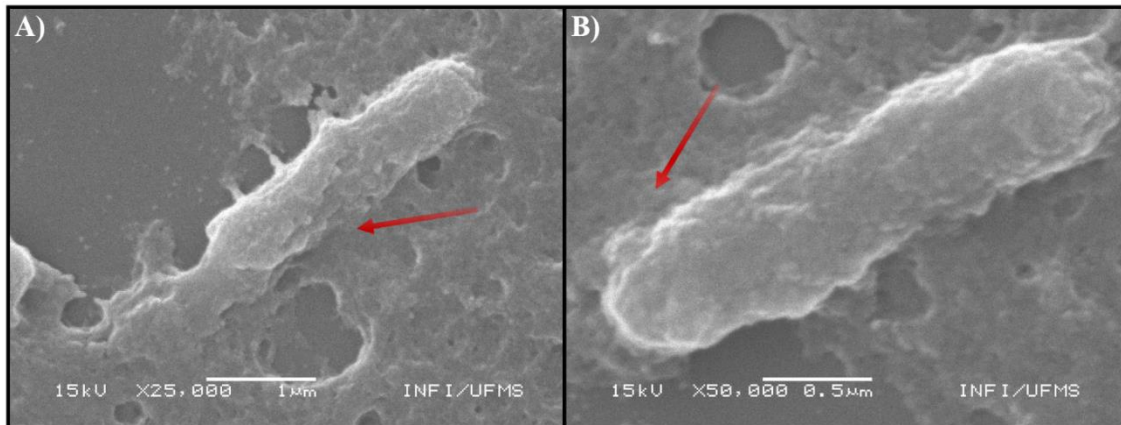
Figura 41: Imagens de MEV das *E. coli* submetidas a irradiação na presença das NPs-Cur.



Fonte: Autora.

As Figuras 42A e B apresentam os resultados do grupo não-irradiado, na qual observamos que existem nanopartículas presente em sua membrana, ocorre um elevado aumento de rugosidade em sua superfície e danos parciais em sua membrana.

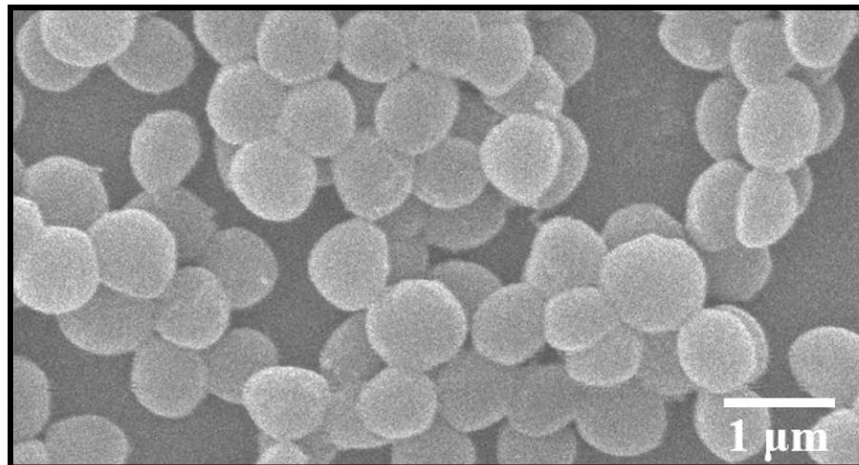
Figura 42: Imagens de MEV das *E. coli* submetidas as NPs-Cur e mantidas no escuro.



Fonte: Autora.

A morfologia da superfície da bactéria *S. aureus* no formato de cocos agrupadas em cachos, com diâmetro de 1 µm aproximadamente, está apresentada na Figura 43. No grupo controle negativo, podemos notar sua estrutura lisa e intacta apresentando morfologia normal.

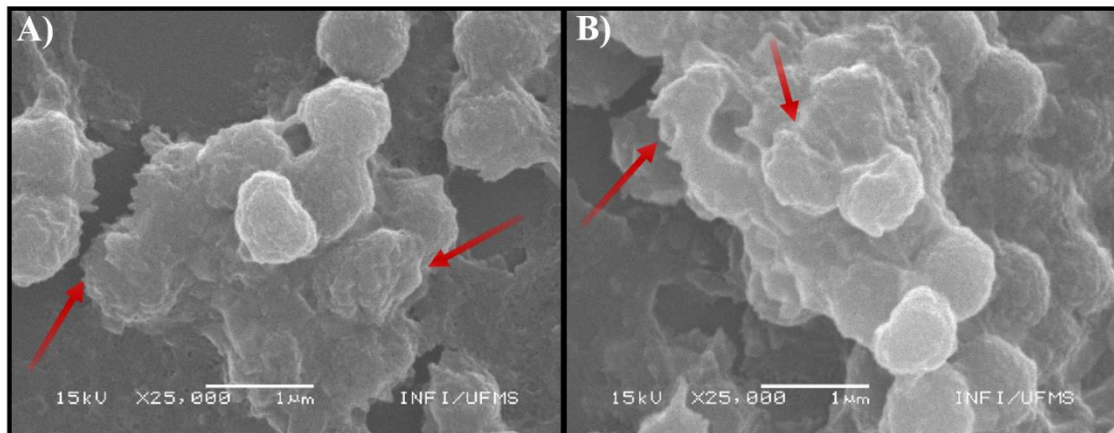
Figura 43: Imagem de MEV do grupo controle negativo *S. aureus*.



Fonte: Autora.

As Figuras 44A e B representam o grupo que foi submetido a irradiação, *S. aureus*, onde as setas em vermelho indicam severos danos nas bactérias ocasionando a lise celular e um grande aumento de rugosidade e mudanças em sua morfologia.

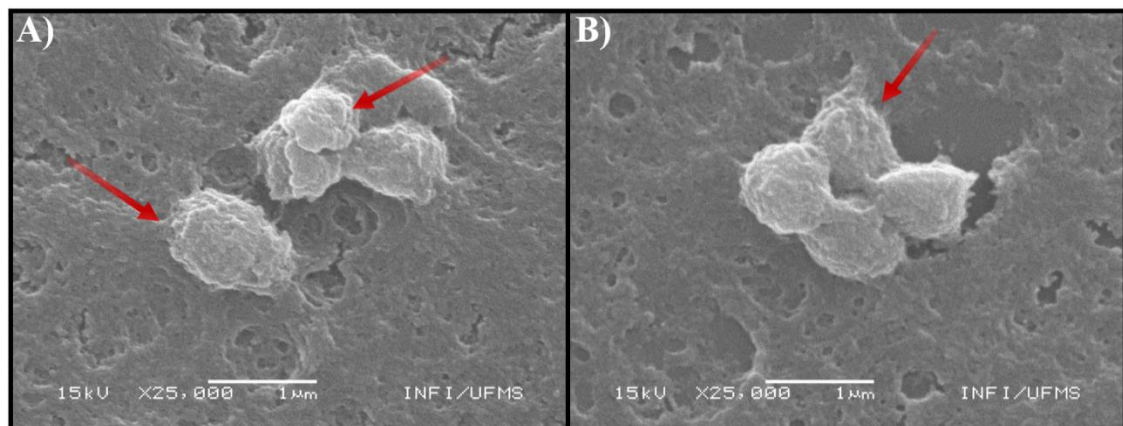
Figura 44: Imagens de MEV das *S. aureus* submetidas a irradiação na presença das NPs-Cur.



Fonte: Autora.

Os resultados do grupo não-irradiado estão apresentados na Figura 45A e B, observamos que ocorre um elevado aumento de rugosidade em sua superfície e danos parciais em sua morfologia.

Figura 45: Imagens de MEV das *S. aureus* submetidas às NPs-Cur e mantidas no escuro.



Fonte: Autora.

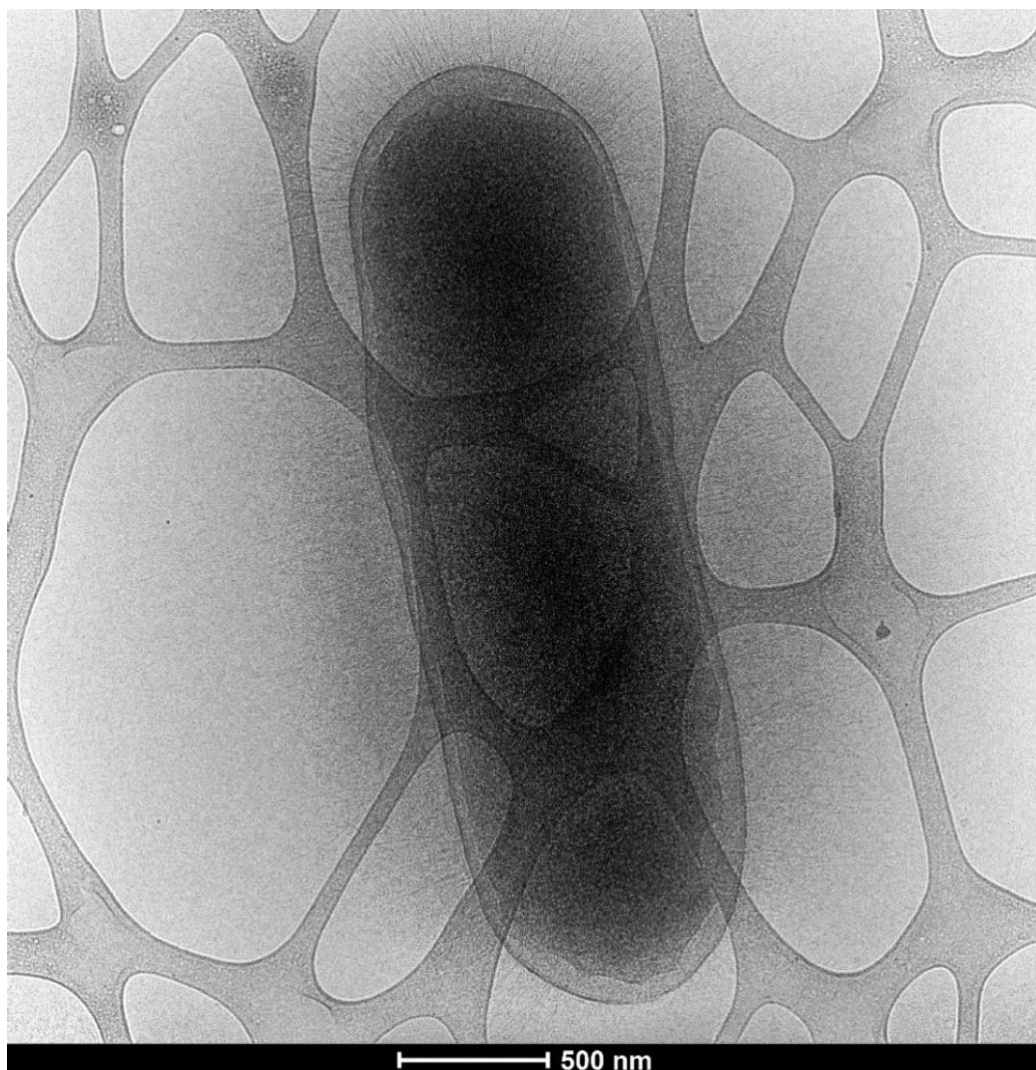
As análises de MEV mostram de forma clara alterações morfológicas da superfície bacteriana, como rupturas de membranas, aumento da rugosidade superficial, após o tratamento fotodinâmico antimicrobiana, indicando que tais danos são responsáveis pela inibição no crescimento bacteriano e confirmando o potencial efeito antimicrobiana das NPs-Cur.

4.12 Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-ME)

As técnicas de Criomicroscopia eletrônica de transmissão permitem a visualização das células em um estado totalmente hidratado sem a necessidade de utilização de fixadores químicos ou recobrimentos metálicos para melhorar o contraste. O método de congelamento rápido permite a visualização de células bacterianas em seu estado nativo. Esse método contribui para o conhecimento de estruturas das bactérias revelando riqueza de detalhes (PILHOFER et al., 2010).

A Figura 46 mostra a bactéria *E. coli*, pertencente ao grupo do controle negativo, seu tamanho está próximo a 3 μ m, sua estrutura se apresenta intacta.

Figura 46: Imagem da Criomicroscopia do grupo controle negativo *E. coli*.

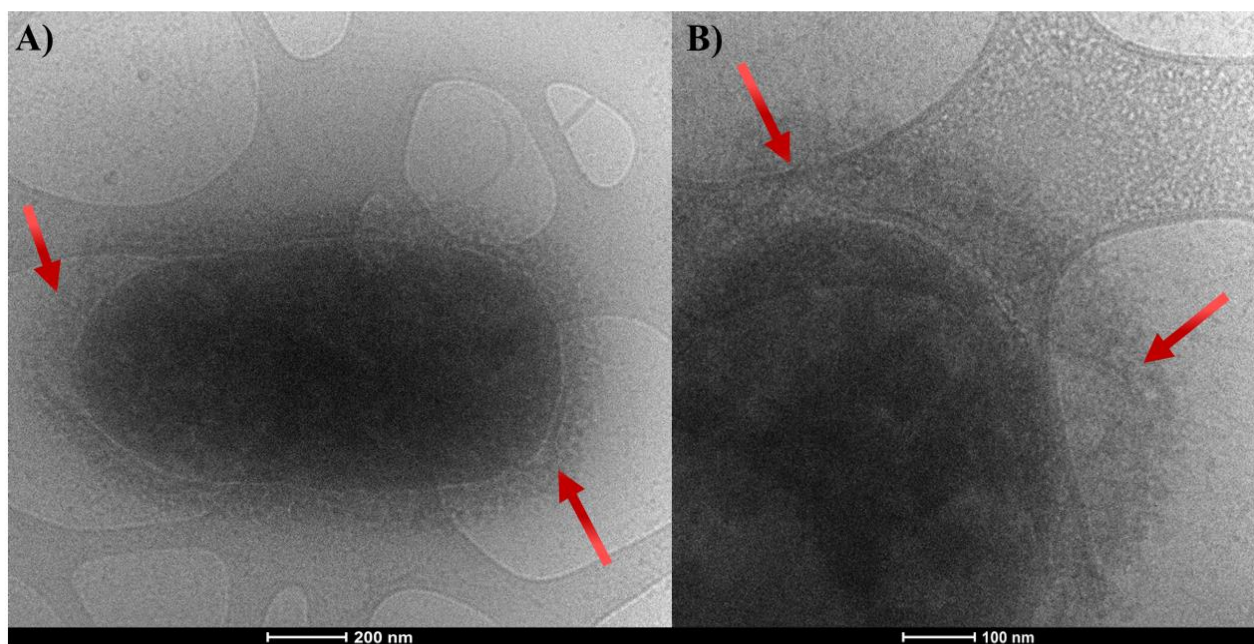


Fonte: Autora.

Conseguimos visualizar nitidamente suas membranas, a camada de peptidoglicano. Podemos notar também um tipo de pelos ou fios presentes na superfície celular da bactéria *E.coli*, eles são os apêndices proteicos chamados de pili ou fimbrias. Desempenham diversas funções na fisiologia bacteriana, podem estar envolvidos na adesão e invasão de células hospedeiras, secreção e absorção de DNA e proteínas, formação de biofilme, motilidade celular entre outros (LUKASZCZYK; PRADHAN; REMAUT, 2019).

A Figura 47 mostra a bactéria *E. coli*, pertencente ao grupo irradiado que foi submetido a IFD, podemos observar algumas mudanças morfológicas.

Figura 47: Imagem da Criomicroscopia do Grupo irradiado *E. coli* quando submetido ao IFD pelas NPs-Cur, onde observa-se os danos: A) Rompimento de membrana; B) Inchaço da membrana.

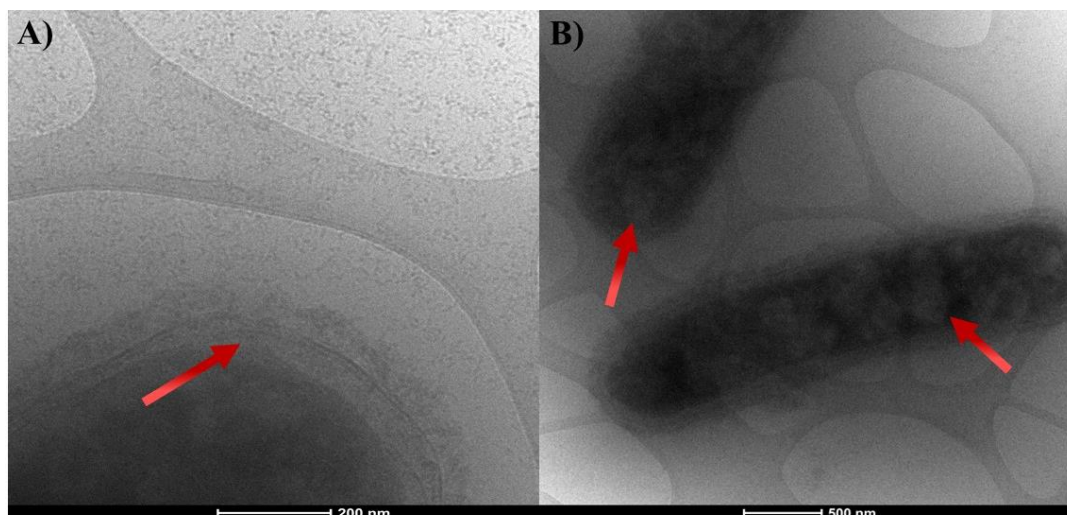


Fonte: Autora.

Na Figura 47A, as setas indicam que houve rompimento das membranas da bactéria, ao compararmos com o CN, conseguimos perceber a ausência dos pilis e aderência das nanopartículas na superfície bacteriana, vários aglomerados próximos ao formato esférico. Já na Figura 47B é observado inchaços nas membranas (indicadas pelas setas), mostrando fortes indícios de futuras rupturas. Esses rompimentos de membranas levam a morte celular das bactérias (WONG; AMIR, 2019).

A Figura 48 mostra a bactéria *E. coli*, pertencente ao grupo submetido ao escuro na presença das NPs-Cur, onde podemos observar algumas mudanças morfológicas.

Figura 48: Imagem da Crio-microscopia da *E. coli* do grupo submetido ao escuro na presença das NPs-Cur, onde observamos: A) dano parcial na membrana; B) aderência das nanopartículas na superfície bacteriana.



Fonte: Autora

Na Figura 48A as setas indicam um dano parcial na membrana externa da bactéria. A Figura 48B mostra a aderência das nanopartículas na superfície bacteriana, vários aglomerados próximos ao formato esférico são observados. Nas duas imagens é possível observar as nanopartículas aderidas em toda superfície, esta interação resulta na inibição do crescimento bacteriano, devido a efeitos bacteriostáticos característica apresentada pela quitosana (ABBASPOUR et al., 2015).

De maneira geral, os resultados gerados através da técnica de Crio-ME, nos permitem visualizar os efeitos da IFD com as NPS Cur e estão de acordo com os testes biológicos realizados com a bactéria *E. coli*.

4.13 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Com objetivo de entender melhor os mecanismos de fotoinativação das bactérias ocasionados pelas NPs-Cur, foi realizado um teste de produção de EROs, analisando a cinética do produto fluorescente gerado (étideo) (Figura 49B). A constante da taxa de produção de EROs (K_{EROS}), foi estimada através da análise cinética do produto fluorescente gerado pela interação entre DHE e EROs. O DHE foi usado em uma concentração saturante, para que as medidas de fluorescência não cessassem, por não ter marcador suficiente para a produção de EROs, e foi assumida a taxa de formação de novos produtos fluorescentes $[F]$ proporcional àquela gerada pela produção de EROs, devido as NPs Cur que estavam sob iluminação, logo temos:



Conseqüentemente, a taxa de produção de EROs pode ser escrita como:

$$-\frac{d[\text{EROS}]}{dt} = k_{\text{EROS}} [\text{DHE}] [\text{EROS}] \quad (4)$$

Onde k_{EROS} é a constante da taxa aparente de produção de EROs (isto é, a constante da taxa aparente para a reação de **DHE** com **EROs**), com $[\text{EROs}] \propto F$. Portanto, a Equação 4 pode ser reescrito como:

$$-\frac{dF}{dt} = k_f F \quad (5)$$

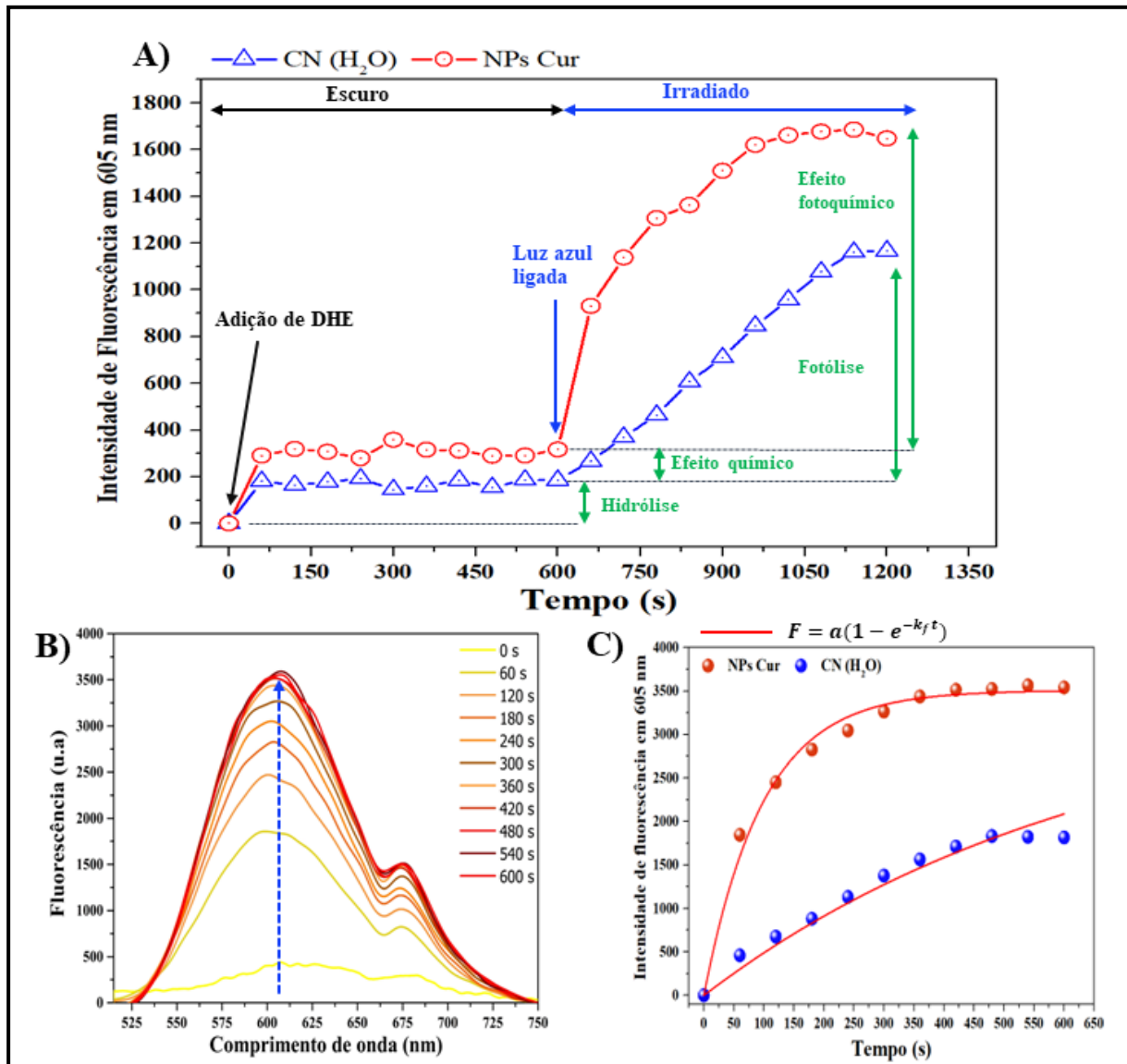
$$F = a(1 - e^{-k_f t})$$

Onde $k_f = k_{\text{EROS}}[\text{DHE}]$:

$$F = a(1 - e^{-k_f t}) \quad (6)$$

Apartir da Equação 6, fizemos um ajuste de curva para produção de EROs das NPs Cur, e construímos a curva da Figura 49C. É importante ressaltar que fixamos o valor da constante a , permitindo que só k_f pudesse variar. Obtemos o valor de k_{EROS} , dividindo k_f pela concentração constante do **DHE = 0,34mM**. A partir das curvas e dos valores das constantes k_{EROS} conseguimos comparar a produção de EROs, das NPs-Cur entre a produção ocasionada por efeito de fotólise entre a sonda e o CN(H₂O).

Figura 49: Emissão de fluorescência promovida pela produção de EROs: A) Intensidade de fluorescência produzida ao longo de todo experimento (10 minutos escuro e 10 minutos irradiado), B) espectros de fluorescência do Etídio ao longo do tempo de irradiação, C) produção de EROs das NPs Cur e CN ao longo do tempo de irradiação e fitting da cinética de produção de EROs.



Fonte: Autora.

A capacidade de geração de EROs pelos nanomateriais sob a irradiação de luz azul é apresentada na Figura 49-C onde é demonstrando uma grande capacidade de produção de EROs, devido ao efeito fotoquímico, gerado pela interação da luz Azul com as NPs-Cur, essa produção foi muito maior que a produção do CN, o que é um resultado esperado visto que essas produções por causa da fotólise e da hidrólise (Figura 49-A) não foi suficiente para ter efeito nos testes biológicos apresentados anteriormente.

A constante da produção de EROs (k_f), foi obtida usando a Equação 6 e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Constante de produção de EROs.

Amostra	k_f (10^{-3} s^{-1})	k_{EROS} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
NPs Cur	$10,20 \pm 0,491$	$30 \pm 1,40$
CN (H_2O)	$1,510 \pm 0,059$	$4,44 \pm 0,17$

Fonte: Autora

Podemos observar que a k_{EROS} das NPs-Cur é cerca de 6,7 vezes maior que o CN, essa grande capacidade de produção de EROs é devido principalmente as propriedades do fotossensibilizador carregado. A curcumina, tem sido extensivamente estudada quanto à sua atividade fotodinâmica, notadamente a geração de hidroxilação de compostos orgânicos durante sua fotodegradação, resultando na formação de fenóis, álcoois, aldeídos e ácidos carboxílicos o que estão diretamente relacionados ao mecanismo do tipo I de produção de EROs (DE MELO DA SILVA et al., 2016; VOGNA et al., 2004).

Outros estudos destacam a eficácia da curcumina, seja em sua forma pura ou incorporada em formulações farmacêuticas, na inibição do crescimento de fungos patogênicos, como o *Sporothrix brasiliensis*, e patógenos alimentares, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e destacam esses mecanismos de fotoinativação que está relacionado a produção de EROs (Legabão et al., 2023; Zhou et al., 2022).

Além disso, a quitosana carregada de curcumina, quando usada como fotossensibilizador no tratamento fotodinâmico, demonstrou efeitos de inativação significativos contra *Staphylococcus aureus* e seus biofilmes em superfícies de aço inoxidável (LI et al., 2020). Finalmente, NPs-Cur testadas nesse estudo se mostram altamente eficiente na IFD e que a quitosana em conjunto com a curcumina possuem um efeito combinado de atividade química e fotoquímica, devido a carga da quitosana nas membranas bacterianas e a atividade fotodinâmica da curcumina, e que esses resultados estão associados a alta capacidade de produção de EROs.

5 Conclusões

As NPs-Cur sintetizadas mostraram propriedade notáveis, como um tamanho médio de 339 nm e uma morfologia esférica. Além disso uma eficiência de encapsulação de 96%, e uma liberação mais lenta comparada a curcumina livre. Os ensaios biológicos realizados com as NPs-Cur, contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, demonstraram efeitos bacteriostáticos e bactericidas para algumas concentrações. As análises de microscopias via MEV e Crio-ME, revelaram as mudanças morfológicas substanciais após a exposição da IFD com as NPs-Cur. A identificação da EROs quando irradiadas confirmam a eficácia das NPs-Cur como agente antimicrobiano com destaque potencial em processos de IFD. De maneira geral, os resultados sugerem que as NPs-Cur possuem um grande potencial para atuar como fotossensibilizador na inativação fotodinâmica antimicrobiana. Dessa forma a presente pesquisa contribui com a preparação e o entendimento de nanomaterial inovador, as NPs-Cur, e mostra seu potencial para aplicações no combate às bactérias via IFD.

7 Referências

- ABBASPOUR, M. et al. Evaluation of the Antimicrobial Effect of Chitosan/Polyvinyl Alcohol Electrospun Nanofibers Containing Mafenide Acetate. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 10, 28 out. 2015.
- ABELHA, T. F. et al. Low molecular weight PEG-PLGA polymers provide a superior matrix for conjugated polymer nanoparticles in terms of physicochemical properties, biocompatibility and optical/photoacoustic performance. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 33, p. 5115–5124, 2019.
- ANITHA, A. et al. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1158–1164, mar. 2011a.
- ANITHA, A. et al. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate-chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1158–1164, 17 mar. 2011b.
- BAÑULS, A.-L. et al. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1261–1269, 1 nov. 2015.
- BERCHE, P. **Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination**. **Clinical Microbiology and Infection** Blackwell Publishing Ltd, , 2012.
- BLEVINS, S. M.; BRONZE, M. S. **Robert Koch and the “golden age” of bacteriology**. **International Journal of Infectious Diseases**, set. 2010.
- BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. **Formulation of poloxamers for drug delivery**. **Journal of Functional Biomaterials** MDPI AG, , 18 jan. 2018.
- BOLHASSANI, A. et al. Polymeric nanoparticles. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 2, p. 321–332, 15 fev. 2014.
- BOS, K. I. et al. A draft genome of Yersinia pestis from victims of the Black Death. **Nature**, v. 478, n. 7370, p. 506–510, 27 out. 2011.
- BRADSHAW, R. A.; STAHL, P. D. **Cell Biology: An Overview**☆. Em: **Reference Module in Biomedical Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2016.
- CAIRES, C. S. A. et al. Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by a Natural Food Colorant (E-141ii). **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4464, 29 set. 2020.

CHEN, C.; CHEN, C.; TSAI, T. Chitosan Nanoparticles for Antimicrobial Photodynamic Inactivation: Characterization and *In Vitro* Investigation †. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 570–576, 21 maio 2012.

CHEN, Z. et al. A Cost-Effective Nano-Sized Curcumin Delivery System with High Drug Loading Capacity Prepared via Flash Nanoprecipitation. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 734, 15 mar. 2021.

CHIEN, A.-C.; HILL, N. S.; LEVIN, P. A. Cell Size Control in Bacteria. **Current Biology**, v. 22, n. 9, p. R340–R349, maio 2012.

CHUTO, G.; CHAUMET-RIFFAUD, P. Les nanoparticules. **Médecine Nucléaire**, v. 34, n. 6, p. 370–376, jun. 2010.

CIEPLIK, F. et al. Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR—An exclusive singlet oxygen photosensitizer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 477–487, dez. 2013.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, maio 2001.

DAI, T. et al. Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

DARABPOUR, E.; KASHEF, N.; MASHAYEKHAN, S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 211–217, jun. 2016.

DE DIOS-PÉREZ, I. et al. Development of a thermosensitive hydrogel based on Poloxamer 407 and gellan gum with inclusion complexes (Sulfobutylated- β -cyclodextrin–Farnesol) as a local drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 191, p. 106618, dez. 2023.

DE MELO DA SILVA, L. et al. Tolfenamic acid degradation by direct photolysis and the UV-ABC/H₂O₂ process: factorial design, kinetics, identification of intermediates, and toxicity evaluation. **Science of The Total Environment**, v. 573, p. 518–531, dez. 2016.

DIVYA, K. et al. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. **Fibers and Polymers**, v. 18, n. 2, p. 221–230, 1 fev. 2017.

FACCHINATTO, W. M. et al. Clotrimazole-loaded N-(2-hydroxy)-propyl-3-trimethylammonium, O-palmitoyl chitosan nanoparticles for topical treatment of vulvovaginal candidiasis. **Acta Biomaterialia**, v. 125, p. 312–321, abr. 2021.

FACCHINATTO, W. M. et al. Antimicrobial and Photoantimicrobial Activities of Chitosan/CNPPV Nanocomposites. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, 1 out. 2022.

FRENCH, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections--the potential role of daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 1107–1117, 20 out. 2006.

GIORDANO, A.; TOMMONARO, G. **Curcumin and cancer**. **Nutrients**MDPI AG, , 1 out. 2019.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 18, p. 4221–4228, set. 2017.

GONZÁLEZ-DELGADO, J. A. et al. Hydrogels containing porphyrin-loaded nanoparticles for topical photodynamic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 1, p. 221–231, ago. 2016.

GUO, Y. et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 17 mar. 2020.

HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Oxygen-Independent Antimicrobial Photoinactivation: Type III Photochemical Mechanism? **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 53, 31 jan. 2020.

HENRIQUE E. TOMA; DELMÁRCIO GOMES DA SILVA; ULISSES CONDOMITTI. **Nanotecnologia Experimental**. [s.l: s.n.].

HUANG, L. et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 490–499, 3 ago. 2012.

HUANG, L. et al. Comparison of two functionalized fullerenes for antimicrobial photodynamic inactivation: Potentiation by potassium iodide and photochemical mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 186, p. 197–206, set. 2018.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, out. 2019.

ISENBERG, H. D. Clinical Microbiology: Past, Present, and Future. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 917–918, mar. 2003.

KANUNGO, S. et al. Cholera. **The Lancet**, v. 399, n. 10333, p. 1429–1440, abr. 2022.

KAPOOR, D. U et al. Polymeric nanoparticles approach and identification and characterization of novel biomarkers for colon cancer. **Results in Chemistry**, v. 6, p. 101167, dez. 2023.

KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, v. 31, p. 31–42, mar. 2017.

KLUNK, J. et al. Evolution of immune genes is associated with the Black Death. **Nature**, v. 611, n. 7935, p. 312–319, 10 nov. 2022.

KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of Potassium Chloride Release from Compressed, Hydrophilic, Polymeric Matrices: Effect of Entrapped Air. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 10, p. 1189–1191, out. 1983.

KUMAR, R. et al. **The rising dominance of microbiology: what to expect in the next 15 years? Microbial Biotechnology** John Wiley and Sons Ltd, , 1 jan. 2022.

LARSSON, D. G. J.; FLACH, C.-F. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 257–269, 4 maio 2022.

LEGABÃO, B. C. et al. In vitro antifungal activity of curcumin mediated by photodynamic therapy on *Sporothrix brasiliensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 43, p. 103659, set. 2023.

LEMES, G. F. et al. Enzymatically crosslinked gelatin coating added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes. **LWT**, v. 84, p. 175–182, out. 2017.

LEUNG, M. H. M.; SHEN, A. Q. Microfluidic Assisted Nanoprecipitation of PLGA Nanoparticles for Curcumin Delivery to Leukemia Jurkat Cells. **Langmuir**, v. 34, n. 13, p. 3961–3970, 3 abr. 2018.

LI, T. et al. Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* of curcumin-loaded chitosan spray coupled with photodynamic treatment. **LWT**, v. 134, p. 110073, dez. 2020.

LI, X. et al. Preparation and *in-vitro* / *in-vivo* evaluation of curcumin nanosuspension with solubility enhancement. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 980–988, 4 jul. 2016.

LIN, G. et al. Discovery of *Meso*-(*meta*-Pyridinium) BODIPY Photosensitizers: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluations for Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 24, p. 18143–18157, 23 dez. 2021.

LIU, Y. et al. Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin-chitosan blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 564–572, 1 jan. 2016.

LOGESH, K. et al. Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of rheumatoid arthritis: A comprehensive review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 81, p. 104241, mar. 2023.

LUKASZCZYK, M.; PRADHAN, B.; REMAUT, H. The Biosynthesis and Structures of Bacterial Pili. Em: [s.l: s.n.]. p. 369–413.

MASSIMINO, L. C.; FARIA, H. A. M.; YOSHIOKA, S. A. Curcumin bioactive nanosizing: Increase of bioavailability. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 493–497, dez. 2017.

MICHAEL T. MADIGAN et al. Microbiologia de Brock, 14ed. **ARTMED EDITORA LTDA**, p. 1–960, 2016.

NAGARWAL, R. C. et al. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 1, p. 2–13, 21 maio 2009.

NGUYEN, H. T.-T. et al. Impact of Deacetylation Degree on Properties of Chitosan for Formation of Electrosprayed Nanoparticles. **Journal of Nanotechnology**, v. 2022, p. 1–11, 26 maio 2022.

ONG, T. H. et al. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2017.

ORUBA, Z. et al. Antimicrobial photodynamic therapy—A discovery originating from the pre-antibiotic era in a novel periodontal therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 4, p. 612–618, dez. 2015.

OSUCHOWSKI, M. et al. The Use of Upconversion Nanoparticles in Prostate Cancer Photodynamic Therapy. **Life**, v. 11, n. 4, p. 360, 19 abr. 2021.

PAULA, A.; MENDES, P. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS “CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA EM NANOCOMPÓSITO DE MAGNETITA E QUITOSANA”**. [s.l: s.n.].

PILHOFER, M. et al. Bacterial TEM. Em: [s.l: s.n.]. p. 21–45.

POLINARSKI, M. A. et al. New Perspectives of Using Chitosan, Silver, and Chitosan-Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 38, n. 4, 7 abr. 2021.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, jul. 2011.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23–36, jun. 1987.

ROHDE, M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, 31 maio 2019.

SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846–3868, 13 nov. 2017.

SCALIA, R. A. et al. In vitro antimicrobial activity of *Luffa operculata*. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 4, p. 422–430, 1 jul. 2015.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 131–194, jan. 2019.

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

SHEN, D. et al. Effects of Different Molecular Weight Oxidized Dextran as Crosslinkers on Stability and Antioxidant Capacity of Curcumin-Loaded Nanoparticles. **Foods**, v. 12, n. 13, p. 2533, 29 jun. 2023.

SHOME, S. et al. **Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective. Journal of Pharmacy and Pharmacology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 dez. 2016.

SOUZA, T. H. S. et al. Advances on antimicrobial photodynamic inactivation mediated by Zn(II) porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 49, p. 100454, dez. 2021.

SULTAN, I. et al. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 21 set. 2018.

TRIGO-GUTIERREZ, J. K. et al. **Antimicrobial activity of curcumin in nanoformulations: A comprehensive review. International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 jul. 2021.

VAIWALA, R. et al. Developing a Coarse-Grained Model for Bacterial Cell Walls: Evaluating Mechanical Properties and Free Energy Barriers. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 8, p. 5369–5384, 11 ago. 2020.

VAN TEESELING, M. C. F.; DE PEDRO, M. A.; CAVA, F. Determinants of Bacterial Morphology: From Fundamentals to Possibilities for Antimicrobial Targeting. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 10 jul. 2017.

VOGNA, D. et al. Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ and ozone. **Water Research**, v. 38, n. 2, p. 414–422, jan. 2004.

WALBI, I. A. et al. Development of a Curcumin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticle Utilizing a Box-Behnken Design of Experiment: Formulation Design and Influence of Process Parameters. **Polymers**, v. 14, n. 18, 1 set. 2022.

WANG, H.; ROMAN, M. Effects of Chitosan Molecular Weight and Degree of Deacetylation on Chitosan–Cellulose Nanocrystal Complexes and Their Formation. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1361, 31 jan. 2023.

WILHELM ROMERO, K. et al. Design of Hybrid Polymeric-Lipid Nanoparticles Using Curcumin as a Model: Preparation, Characterization, and In Vitro Evaluation of Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin-Loaded Nanoparticles. **Polymers**, v. 13, n. 23, p. 4207, 30 nov. 2021.

WONG, F.; AMIR, A. Mechanics and Dynamics of Bacterial Cell Lysis. **Biophysical Journal**, v. 116, n. 12, p. 2378–2389, jun. 2019.

WORTHINGTON, M. T.; LUO, R. Q.; PELO, J. Copacabana Method for Spreading. **BioTechniques**, v. 30, n. 4, p. 738–742, 2001.

WOZNIAK, A.; GRINHOLC, M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials–State of the Art. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 8 maio 2018.

XIAO, L. et al. Effect of chitosan nanoparticles loaded with curcumin on the quality of *Schizothorax prenanti* surimi. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101178, ago. 2021.

XIAO, W. et al. Highly Sensitive Colorimetric Detection of a Variety of Analytes via the Tyndall Effect. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 23, p. 15114–15122, 3 dez. 2019.

YANG, W. et al. Photodynamic Inactivation Using Natural Bioactive Compound Prevents and Disrupts the Biofilm Produced by *Staphylococcus saprophyticus*. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4713, 4 ago. 2021.

YE, M. et al. pH-Responsive Polymer–Drug Conjugate: An Effective Strategy to Combat the Antimicrobial Resistance. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 39, 21 set. 2020.

YOSHIMURA, J.; OGURA, H.; ODA, J. Can Gram staining be a guiding tool for optimizing initial antimicrobial agents in bacterial infections? **Acute Medicine & Surgery**, v. 10, n. 1, 24 jan. 2023.

YUAN, Y. et al. Encapsulation and delivery of curcumin in cellulose nanocrystals nanoparticles using pH-driven method. **LWT**, v. 155, p. 112863, fev. 2022.

ZAHIRI, M. et al. Encapsulation of curcumin loaded chitosan nanoparticle within poly (ϵ -caprolactone) and gelatin fiber mat for wound healing and layered dermal reconstitution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 1241–1250, 15 jun. 2020.

ZARE-ZARDINI, H. et al. Slow release curcumin-containing soy protein nanoparticles as anticancer agents for osteosarcoma: synthesis and characterization. **Progress in Biomaterials**, v. 11, n. 3, p. 311–320, 25 set. 2022.

ZHANG, J. et al. Impact of reactive oxygen species on cell activity and structural integrity of Gram-positive and Gram-negative bacteria in electrochemical disinfection system. **Chemical Engineering Journal**, v. 451, 1 jan. 2023.

ZHENG, B. et al. Impact of delivery system type on curcumin stability: Comparison of curcumin degradation in aqueous solutions, emulsions, and hydrogel beads. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p. 187–197, 1 out. 2017.

ZHOU, F. et al. Enhancement of photodynamic bactericidal activity of curcumin against *Pseudomonas Aeruginosa* using polymyxin B. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 37, p. 102677, mar. 2022.