



FILMES POLIMÉRICOS CONTENDO DERIVADOS DE CURCUMINA:
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS E DO POTENCIAL DE
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Beatriz Regina Santos Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz

Marcel Guimarães Martins

Rio de Janeiro

Março de 2025

FILMES POLIMÉRICOS CONTENDO DERIVADOS DE CURCUMINA:
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS E DO POTENCIAL DE
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Beatriz Regina Santos Silva

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA

Examinada por:

Prof^a Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Marcel Guimarães Martins, D.Sc.

Prof. Paulo Henrique de Souza Picciani, D.Sc.

Prof^a Sara Gemini Piperni, D.Sc.

Bruna Martins de França, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Março de 2025

Silva, Beatriz Regina Santos

Filmes poliméricos contendo derivados de curcumina: avaliação das propriedades fotofísicas e do potencial de aplicação em terapia fotodinâmica / Beatriz Regina Santos Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2025.

XIV, 116 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Marcel Guimarães Martins

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2025.

Referências Bibliográficas: p. 101-119.

1. Filmes poliméricos. 2. Curcumina. 3. Terapia fotodinâmica. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio durante toda minha jornada educacional, mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha irmã, por inúmeras vezes me incentivar a ‘largar’ o mestrado pois eu ‘estava ficando doida’, mas por entender que o mestrado era importante para mim. E pelas dicas em como não tirar mais fotos tortas dos filmes poliméricos.

Aos meus orientadores, Profa. Helen e Marcel, por todo o auxílio e sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa. Ao Marcel, agradeço principalmente o acompanhamento durante os experimentos, auxílio na rotina de laboratório, e pelas inúmeras reuniões tarde da noite para discutir o andamento da dissertação.

Aos amigos do PEQ Leonan, Pedro e Ruan, pelos estudos em grupo via chamadas de vídeo durante a pandemia, e paciência para me ouvir nos vários momentos de ‘desespero’. Especialmente Leonan, por todas as conversas filosóficas e existenciais, e por me hospedar durante as minhas idas e vindas ao RJ.

Ao Ivo, amigo que desde a graduação me apoia e me ajuda em tudo o que preciso. Por todas as conversas, incentivos, ajuda com conceitos de química orgânica e, claro, sugestões de animes.

À Bruna, pela síntese dos derivados de curcumina. Sem eles esta dissertação não existiria. À Marla, ao Célio e ao Wesley, pelo auxílio nas caracterizações dos filmes enquanto eu ficava indo e voltando do RJ. A Ju, pelas conversas e incentivo de que, no final, essa dissertação daria certo.

À Alana e Rafaela, do Laben, pelo auxílio na microscopia óptica dos filmes e soluções.

À Flora e Prof. Igor, do LISbio, pela colaboração nos ensaios biológicos.

Ao Arthur por emprestar a mesa na qual fiz os primeiros filmes e por ceder os polímeros PLA e PCL.

Ao Prof. João, que, durante a graduação, me ensinou muito mais que termodinâmica. Obrigada por todas as conversas, apoio e incentivo durante a graduação e o mestrado.

À Margot, por ficar dormindo ao meu lado durante as madrugadas de escrita e pela manutenção do resquício da minha sanidade.

A mim, por não ter desistido.

À ANP pelo auxílio financeiro.

Resumo da dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

FILMES POLIMÉRICOS CONTENDO DERIVADOS DE CURCUMINA:
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS E DO POTENCIAL DE
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Beatriz Regina Santos Silva

Março/2025

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Marcel Guimarães Martins

Programa: Engenharia Química

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento e a avaliação das propriedades fotofísicas e físico-químicas, de filmes poliméricos contendo derivados de curcumina, bem como avalia o potencial de aplicação destes em terapia fotodinâmica (TFD), visando ampliar as possibilidades terapêuticas para além das aplicações tópicas. Os filmes contendo os fluoróforos sintéticos foram produzidos via evaporação do solvente, utilizando clorofórmio para solubilizar a matriz polimérica (PMMA, PLA e PCL) e as moléculas de interesse (curcumina (C1) e curcumina modificada com NPh₂ (C2), NMet₂ (C3) e NEt₂ (C4)). Os fotossensibilizadores foram caracterizados por espectroscopia de absorção em solução de etanol e acetona, bem como nos filmes poliméricos de diferentes polaridades, apresentando absorção máxima em torno de 420, 470, 480 e 500 nm, respectivamente, para C1, C2, C3 e C4, em todas as condições. As moléculas C1 e C4 apresentaram maior fotoestabilidade e foram adicionadas aos filmes poliméricos, que apresentaram aspecto visualmente homogêneo, sem indício de materiais cristalinos. No entanto, inspeções por microscopia óptica demonstraram presença de cristais dos fluoróforos em dimensões inferiores a 100 µm, que foram confirmados por microscopia eletrônica de transmissão. A presença de cristais, tanto em meio aquoso quanto nos filmes, foi avaliada a fim de verificar a influência da solubilidade e dispersão da curcumina na geração de oxigênio singlete. Embora não tenha sido possível quantificá-lo, sua formação foi confirmada em ensaio biológico. O potencial antimicrobiano do filme polimérico contendo o derivado de curcumina (C4) foi avaliado em ensaio *in vitro* com *L. amazonensis*, demonstrando uma redução de 16% de viabilidade do microrganismo em presença do filme polimérico de PMMA contendo 20,0% p/p de C4, quando exposto a luz verde. Assim, foi demonstrado o potencial de aplicação da TFD em sistemas que não sejam apenas superficiais, possibilitando o desenvolvimento futuro de uma sonda óptica para aplicação de TFD em órgãos internos.

Abstract of dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

POLYMERIC FILMS CONTAINING CURCUMIN DERIVATIVES:
EVALUATION OF PHOTOPHYSICAL PROPERTIES AND POTENTIAL
APPLICATION IN PHOTODYNAMIC THERAPY

Beatriz Regina Santos Silva

Março/2025

Advisors: Helen Conceição Ferraz
Marcel Guimarães Martins

Department: Chemical Engineering

This work presents the development and evaluation of the photophysical and physicochemical properties of polymeric films containing curcumin derivatives, as well as assesses their potential application in photodynamic therapy (PDT), aiming to expand therapeutic possibilities beyond just topical applications. The films containing the synthetic fluorophores were produced via solvent evaporation, using chloroform to solubilize the polymeric matrix (PMMA, PLA, and PCL) and the molecules of interest (curcumin (C1) and curcumin modified with NPh₂ (C2), NMet₂ (C3), and NEt₂ (C4)). The photosensitizers were characterized by absorption spectroscopy in ethanol and acetone solutions, as well as in polymeric films of different polarities, showing maximum absorbance around 420, 470, 480, and 500 nm, respectively, for C1, C2, C3, and C4, under all conditions. The molecules C1 and C4 exhibited greater photostability and were incorporated into the polymeric films, which presented a visually homogeneous appearance with no indication of crystalline materials. However, optical microscopy inspections revealed the presence of fluorophore crystals with dimensions smaller than 100 μm, which were confirmed by transmission electron microscopy. The presence of crystals in both aqueous media and films was evaluated to verify the influence of curcumin solubility and dispersion on singlet oxygen generation, which, although not quantifiable, was confirmed in a biological assay. The antimicrobial potential of the polymeric film containing the curcumin derivative (C4) was evaluated in an in vitro assay with *L. amazonensis*, demonstrating a 16% reduction in microorganism viability in the presence of the PMMA polymeric film containing 20.0% w/w of C4 when exposed to green light. Thus, the potential application of PDT in systems beyond just superficial treatments was demonstrated, envisioning the future development of an optical probe for PDT application in internal organs.

Sumário

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	18
1.1. Estado da arte.....	18
1.2. Objetivos	20
1.2.1. Objetivo Geral	20
1.2.2. Objetivos específicos.....	20
1.3. Estrutura da dissertação	21
CAPÍTULO II: REVISÃO TEÓRICA E BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. Terapia Fotodinâmica	22
2.1.1. Princípios de terapia fotodinâmica	22
2.1.2. Mecanismos de geração de oxigênio singlete.....	23
2.1.3. Quantificação de oxigênio singlete	24
2.1.4. Rendimento quântico de fluorescência e rendimento quântico de geração de oxigênio singlete	28
2.2. Curcumina e seus derivados	30
2.2.1. Extrato de cúrcuma e potencial biológico	30
2.2.2. Derivados sintéticos de curcumina.....	31
2.3. Matriz polimérica	33
2.3.1. Incorporação de fotossensibilizadores em polímeros	33
2.3.2. Influência do tipo de polímero.....	33
2.4. Revisão da literatura	35
2.4.1. Potencial antimicrobiano da curcumina.....	35
2.4.2. Matrizes poliméricas contendo curcumina e usos na TFD	41
2.5. Considerações gerais	51
CAPÍTULO III: MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1. Especificação dos insumos.....	52

3.2. Preparo de soluções curcumina e derivados.....	53
3.3. Avaliação da precipitação de derivado de curcumina em meio aquoso	53
3.4. Preparo dos filmes poliméricos via evaporação do solvente	54
3.5. Avaliação da precipitação de derivado de curcumina em filme polimérico.	55
3.6. Caracterizações fotofísicas e físico-químicas.....	56
3.6.1. Espectrofotometria de absorção e emissão	56
3.6.2. Microscopia óptica	57
3.6.3. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	57
3.6.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	57
3.6.5. Difração de raios-X (DRX).....	58
3.6.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	58
3.7. Determinação da geração de oxigênio singlete.	58
3.8. Ensaios biológicos	61
3.8.1. Inoculação da <i>L. amazonensis</i>	61
3.8.2. Citotoxicidade do derivado de curcumina livre.....	61
3.8.3. Citotoxicidade do derivado de curcumina em matriz polimérica....	62
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1. Avaliação da curcumina e derivados	64
4.1.1. Estabilidade dos derivados de curcumina em solução	64
4.1.2. Precipitação da curcumina em meio aquoso.....	67
4.2. Filmes poliméricos contendo derivados de curcumina	71
4.2.1. Fotoestabilidade dos filmes poliméricos contendo curcumina e derivado	72
4.2.2. Propriedades fotofísicas e físico-químicas dos filmes contendo derivado de curcumina (C4).....	78

4.2.3. Investigação da formação de precipitados de derivado de curcumina em filmes de PMMA.....	83
4.3. Validação da terapia fotodinâmica	86
4.3.1. Validação fotofísica da terapia fotodinâmica.....	86
4.3.2. Validação biológica da terapia fotodinâmica.....	94
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	98
5.1. Conclusões	98
5.2. Perspectivas.....	100
Referências Bibliográficas	101
ANEXOS	120

Lista de Figuras

- Figura 1** – Sugestão de desenvolvimento de sonda óptica, contendo curcumina ou derivados, para aplicação interna da terapia fotodinâmica..... 19
- Figura 2** – Processo de inversão de spin do oxigênio triplete para oxigênio singlete... 22
- Figura 3** - Diagrama de Jablonski simplificado para geração de EROs, contemplando as etapas de (a) excitação; (b) fluorescência; (c) cruzamento intersistemas e (d) fosforescência..... 24
- Figura 4** - Fórmula estrutural dos principais curcuminoides presentes na cúrcuma (se $R_1 = R_2 = OCH_3$, tem-se a curcumina; se $R_1 = OCH_3$ e $R_2 = H$, tem-se a dimetoxicurcumina; se $R_1 = R_2 = H$, tem-se a bidimetoxicurcumina) 31
- Figura 5** – Ressonância da dupla ligação entre os grupamentos hidroxila e cetona da curcumina 32
- Figura 6** - Fórmulas estruturais dos polímeros (a) poli (metacrilato de metila) (PMMA), (b) poliácido lático (PLA), e (c) poli ϵ -caprolactona (PCL). 33
- Figura 7** - Complexo metálico com derivado de curcumina e corantes. Ligantes ($M = Cu(II)$ ou $Pd(II)$). 40
- Figura 8** - Estrutura da curcumina e seus derivados sintéticos utilizados neste trabalho. 52
- Figura 9** - Espectros de absorção das soluções de derivados de curcumina em etanol no dia do preparo (a), e três dias após o preparo (b). Dados normalizados em intensidade de sinal..... 65
- Figura 10** - Espectros de absorção normalizados das soluções de derivados de curcumina em acetona no dia do preparo (a), e três dias após o preparo (b). 66
- Figura 11** – Inspeção visual da formação de precipitados do derivado de curcumina C4, em função da concentração do fotossensibilizador e teor de DMSO em relação a água. 68
- Figura 12** - Microscopia óptica da solução de C4 em DMSO com aumento de 4x 69
- Figura 13** - Microscopia óptica da solução de C4 em DMSO com aumento de 10x 69

Figura 14 - Distribuição do tamanho hidrodinâmico das partículas de C4 solubilizadas em DMSO em diferentes proporções. Primeira leitura em verde; segunda leitura em amarelo e terceira leitura em vermelho.	70
Figura 15 - Diâmetros hidrodinâmicos médios em meios aquosos com diferentes proporções de DMSO:H ₂ O e concentrações de curcumina (C4).....	71
Figura 16 - Filmes contendo C1 e C4 (nas concentrações de 1,0; 0,5 e 0,25% p/p) expostos a luz branca e UV.	72
Figura 17 – Espectros de absorção dos filmes poliméricos contendo diferentes proporções de C1 (A) e C4 (B). Filmes de PMMA, em vermelho, de PLA, em azul e de PCL, em verde.	74
Figura 18 - Decaimento da intensidade de absorção de filmes poliméricos contendo C1 (A) e C4 (B) exposto às luzes (1) azul, (2) verde e (3) vermelha.....	76
Figura 19 - Espectros de absorção e emissão normalizados dos filmes poliméricos contendo 1,0% em massa de C4.	78
Figura 20 - Espectros de FT-IR para o PMMA puro, C4 puro, e PMMA contendo com C4	79
Figura 21 - Espectros de FT-IR para o PLA puro, C4 puro, e PLA contendo C4.....	80
Figura 22 - Espectros de FT-IR para o PCL puro, C4 puro, e PCL contendo C4	80
Figura 23 - Padrão de difração de raios X (DRX) para os filmes poliméricos (PMMA, PLA e PCL) contendo C4 na proporção de 1,0 % em massa, e o derivado de curcumina C4 puro	82
Figura 24 - Filmes de PMMA contendo (a) 1,0, (b) 10, 0 (c) 20,0 e (d) 30,0 % de C4	83
Figura 25 - Microscopia óptica dos filmes de PMMA contendo 1,0/10,0/20,0 e 30,0% de C4 em diferentes aumentos.	84
Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura de filme de PMMA contendo 1,0; 10; 20 e 30 % em massa de C4.	85
Figura 27 - Espectro de absorção da solução azul de metileno e RNO após 60 min de irradiação, apresentando o decaimento da banda do RNO em 440 nm.....	87

Figura 28 - Intensidade de absorção: (a) de soluções contendo diferentes concentrações de RNO e Imd em PBS; (b) de soluções contendo diferentes concentrações de RNO e AM em PBS	88
Figura 29 - Decaimento da intensidade máxima do RNO em função da geração de EROs pelo AM.....	89
Figura 30 - Ensaio de degradação do RNO em solução contendo apenas Imd. (a) Sem exposição à luz; (b) com exposição à luz	90
Figura 31 - Ensaio de degradação do RNO em solução contendo apenas H ₂ O ₂	90
Figura 32 - Degradação de RNO em solução de C4 solubilizado em DMSO suspenso em PBS. (a) [C4] = 50 uM, sem luz; (b) [C4] = 50 uM, com luz; (c) [C4] = 75 uM, sem luz; (d) [C4] = 75 uM, com luz; (e) [C4] = 100 uM, sem luz; (f) [C4] = 100 uM, com luz	91
Figura 33 - Degradação de solução de RNO em PBS em contato com filme polimérico de PMMA. (a) [C4] = 10%, sem luz; (b) [C4] = 10%, com luz; (c) [C4] = 20%, sem luz; (d) [C4] = 20%, com luz; (e) [C4] = 30%, sem luz; (f) [C4] = 30%, com luz.	93
Figura 34 - Tubo de ensaio contendo filme de PMMA contendo C4 na proporção de 20,0 % em massa do polímero em relação ao volume total de solvente	94
Figura 35 - Inibição de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 48 h de tratamento com solução de C4	95
Figura 36 - Inibição de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 48 h de tratamento com: (a) filme contendo 20,0% em massa de C4 e exposição à luz, (b) filme contendo 20,0% em massa de C4 sem exposição à luz, (c) filme contendo apenas PMMA sem exposição à luz (controle -)	96
Figura 37 – Tipos de vibrações moleculares: simétrica (a1), assimétrica (a2), deformação angular, de balanço no plano (b1), tesoura no plano (b2), oscilação fora do plano (b3) e torção fora do plano (b4)	123

Lista de Esquemas

Esquema 1 - Reação do ácido úrico com oxigênio singlete	27
Esquema 2 - Geração de oxigênio singlete através do rosa bengala como FS e oxidação do RNO.....	28
Esquema 3 - Obtenção dos filmes poliméricos contendo curcumina e derivados via evaporação do solvente, com auxílio de extensor	55
Esquema 4 - Ensaio de fotoestabilidade dos filmes poliméricos contendo curcumina sintética e derivados.....	57
Esquema 5 - Geração de oxigênio singlete através da curcumina sintética como FS e oxidação do RNO	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tempo de vida ($\tau\Delta$) do $^1\text{O}_2$ em diferentes solventes.	26
Tabela 2 - Aplicações da curcumina em TFD.	36
Tabela 3 - Aplicações da curcumina em filmes poliméricos	43
Tabela 4 – Decaimento percentual de absorção dos filmes poliméricos contendo C1 e C4 expostos às luzes azul, verde e vermelha, por um período de 2h.	77
Tabela 5 - Principais bandas de absorção e respectivas atribuições do espectro de FT-IR para os polímeros em estudo	81
Tabela 6 – Principais bandas de absorção e respectivas atribuições do espectro de FT-IR para o derivado C4 em estudo	81
Tabela 7 - Dose total de luz e CI_{50} contra a <i>L. amazonensis</i> para diferentes FS	95
Tabela 8 - Comprimentos de ondas do espectro visível	120

Nomenclatura

ABDA	Ácido 9,10-antracenediil-bis(metileno) dimalônico
AM	Azul de metileno
AmimCl	Cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio
C1	Curcumina
C2	Curcumina modificada com NPh ₂
C3	Curcumina modificada com NMet ₂
C4	Curcumina modificada com NEt ₂
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPA	9,10-difenilantraceno
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
DRX	Difração de raios X
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizante
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPF	Hidroxifenil fluoresceína
Imd	Imidazol
NPh ₂	Grupamento N-fenil
NMet ₂	Grupamento N-metil
Net ₂	Grupamento N-etil
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

PBS	Solução tampão fosfato salino
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PLA	Poliácido lático
PMMA	Poli (metacrilato de metila)
PVB	Polivinil butiral
RNO	N,N-Dimetil-4-nitrosoanilina
SOSG	Singlet Oxygen Sensor Green®
TBO	Azul de toluidina
TEMP	2,2,6,6-tetrametilpiperidina
TFD	Terapia fotodinâmica
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetraidrofurano
UV-vis	Espectroscopia na região de ultravioleta e visível

Lista de símbolos

τ_{Δ}	tempo de meia vida
ϕ_{fl}	rendimento quântico de fluorescência
I_0	intensidade da luz incidente na amostra
I	intensidade da luz transmitida através da uma amostra
ε	coeficiente de absortividade molar
L	caminho óptico
c	concentração da solução
A	Absorção (adimensional)
%T	porcentagem da transmitância
W	número de onda
λ	comprimento de onda
n	número inteiro do comprimento de onda
d_{hkl}	distância entre planos os cristalinos paralelos identificados pelos índices de Miller
θ	ângulo entre os raios incidentes e os planos de difração

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1.1. Estado da arte

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento fotoquímico que utiliza luz para excitação de um determinado elemento fotossensibilizante (FS) que atua sobre o oxigênio do meio, gerando espécies reativas de oxigênio (mais especificamente oxigênio singlete) que promovem a destruição de células (Kalka, Merk e Mukhtar, 2000). Esse tipo de terapia tem aplicações em diversos casos clínicos como câncer de pele e dermatoses não neoplásicas, bem como apresenta potencial de utilização no combate a infecções provocadas por microrganismos (Issa e Manela-Azulay, 2010; Maria *et al.*, 2022).

A TFD é um tratamento não invasivo, mas apresenta limitações principalmente relacionadas à oxigenação do meio e penetração da luz nos tecidos. Por exemplo, no tratamento do carcinoma mamário há estudo empregando o comprimento de onda da luz vermelha para excitação do fotossensibilizadores comuns como o azul de metileno, porém a penetração da luz no tecido é de aproximadamente 2,87 mm, o que limita a ação do tratamento a tecidos até a hipoderme (Gunaydin, Gedik e Ayan, 2021; Mh *et al.*, 2018; Stolik *et al.*, 2000). Na terapia fotodinâmica, em meios ricos em oxigênio, sabe-se que o oxigênio singlete produzido é o principal responsável pela morte celular, embora a contribuição de outras espécies reativas de oxigênio também exista. Por outro lado, em meios com baixo teor de oxigênio outras espécies reativas de oxigênio são o principal elemento para ocorrência da morte celular (Juarranz *et al.*, 2008).

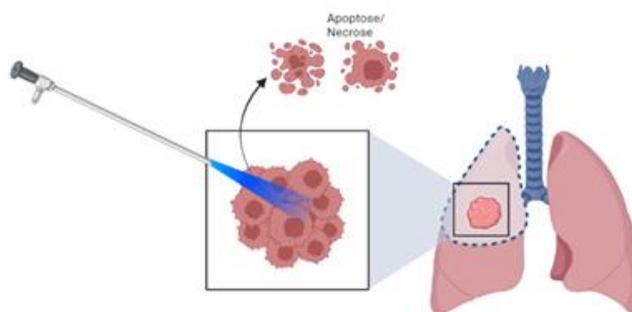
Um FS amplamente conhecido e utilizado na literatura é o azul de metileno, que apresenta utilização na forma de organogel, nanopartículas e em solução para tratamento de câncer e de infecções por microrganismos (Soares Lima *et al.*, 2023; Solovieva *et al.*, 2024; Tardivo *et al.*, 2005). A curcumina, de forma similar ao azul de metileno, também é utilizada como agente FS aplicado à terapia fotodinâmica, apresentando potencial desde a inibição microbiana até o tratamento do câncer (Babinski *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2022). O potencial da curcumina como agente FS no combate a microrganismos como *E. coli*, *C. albicans*, *L. amazonensis* é amplamente abordado na literatura (Corrêa *et al.*, 2020; Sakima *et al.*, 2018). Já em relação ao tratamento de câncer, estudos já demonstraram o

potencial da curcumina contra alguns tipos de câncer como de pele, de mama e de pulmão (Kah, Chandran e Abrahamse, 2023; Sakima *et al.*, 2018; Shao *et al.*, 2022). Vale ressaltar que a substituição de fotossensibilizadores tradicionais por curcumina agrega o efeito sinérgico das atividades antiinflamatórias e antimicrobianas desta molécula mesmo em ausência de luz (Cai *et al.*, 2022).

A utilização da curcumina na TFD utiliza abordagens como suspensões de curcumina, nanopartículas contendo curcumina, curcumina incorporada a lipossomas dentre outros (Ailioaie, Ailioaie e Litscher, 2021; Bender *et al.*, 2024; Szlasa *et al.*, 2020). Até o momento, não foram encontrados trabalhos que utilizem filmes poliméricos contendo curcumina para a finalidade de tratamento oncológico. Já para o uso da TFD visando a inativação de microrganismos, diversos trabalhos utilizaram a curcumina incorporada em matrizes poliméricas.

Para superar a limitação da penetração da luz nos tecidos e viabilizar a aplicação da terapia fotodinâmica em doenças localizadas em regiões mais internas do organismo, poderia ser utilizado um sistema específico, como exemplificado pela Figura 1. O sistema se baseia na utilização de matrizes inertes ao organismo (polímeros) em conjunto ao elemento fotossensibilizador (curcumina e derivados sintéticos) para aplicações internas ao organismo. A utilização de tal sistema contorna o limite da baixa penetração da luz no organismo, tornando possível a utilização da TFD para aplicações além da superfície da pele.

Figura 1 – Sugestão de desenvolvimento de sonda óptica, contendo curcumina ou derivados, para aplicação interna da terapia fotodinâmica.



Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.com

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

O objetivo desta dissertação foi produzir filmes poliméricos contendo curcumina sintética e seus derivados e avaliar suas propriedades fotofísicas e físico-químicas, bem como seu potencial de aplicação em terapia fotodinâmica.

1.2.2. Objetivos específicos

- 1) Analisar a fotoestabilidade dos fotossensibilizadores sintéticos curcumina (C1) e curcumina modificada com NPh_2 (C2), NMe_2 (C3) e NEt_2 (C4), em solventes prótico e aprótico.
- 2) Avaliar a tendência de precipitação da curcumina em meio aquoso (não solvente), quando previamente solubilizada em um solvente (DMSO), analisando a influência da concentração da curcumina em DMSO e do teor de DMSO em água, mimetizando biodisponibilidade em meios biológicos.
- 3) Desenvolver filmes poliméricos (matrizes com diferentes polaridades: PMMA, PLA e PCL) fluorescentes, contendo curcumina sintética e derivados, visando ampliar possibilidades de aplicação da TFD.
- 4) Analisar a fotoestabilidade e cinética de degradação por exposição a luz de filmes poliméricos fluorescentes.
- 5) Avaliar se ocorre precipitação do fotossensibilizador em matrizes poliméricas.
- 6) Validar procedimento de quantificação de oxigênio singlete em meio aquoso.
- 7) Validar o potencial antimicrobiano de derivado de curcumina na forma livre e incorporados em filmes poliméricos.

1.3. Estrutura da dissertação

No Capítulo I é apresentado o estado da arte como motivação para o desenvolvimento deste trabalho. Nessa seção são explanadas diferentes aplicações da terapia fotodinâmica como tratamento de câncer e inativações microbiológicas bem como a problemática da inacessibilidade da TFD para tratamento de condições que não sejam superficiais ao organismo. Além disso também é apresentado o objetivo da dissertação e sua estrutura.

O Capítulo II aborda a contextualização teórica, onde são explicados os conceitos fundamentais em que esta dissertação é baseada, como a teoria em que se fundamenta a terapia fotodinâmica, definição e aplicação de materiais fotossensibilizantes, propriedades fotofísicas da curcumina e seus derivados, espectro de emissão e solvatocromismo, comportamento da curcumina e derivados em matriz sólida e características dos polímeros escolhidos. Ademais, são apresentadas revisões da literatura centradas em (i) potencial antimicrobiano da curcumina e (ii) incorporação de curcumina em matrizes poliméricas e usos em TFD.

O Capítulo III apresenta materiais e métodos empregados. São descritos os insumos utilizados, além da metodologia de preparo das soluções e dos filmes poliméricos contendo derivados de curcumina. A subseção de caracterizações aborda as técnicas utilizadas para analisar as propriedades fotofísicas e físico-químicas dos materiais em estudo. Além disso, é apresentada uma subseção que detalha os ensaios biológicos correlatos ao projeto.

No Capítulo IV são apresentados os resultados e confrontados com a literatura. Este aborda a estabilidade dos derivados de curcumina em solução, as características fotofísicas e físico-químicas dos filmes produzidos e a validação dos filmes poliméricos em ensaio físico-químico de liberação de oxigênio singlete e ensaio biológico de inibição do crescimento do protozoário *L. amazonensis*, modelo biológico para tratamento tópico.

Finalmente, o Capítulo V apresenta as principais conclusões deste projeto de pesquisa, as principais limitações e dificuldades encontradas, além de propostas para trabalhos futuros como possíveis desdobramentos desta dissertação.

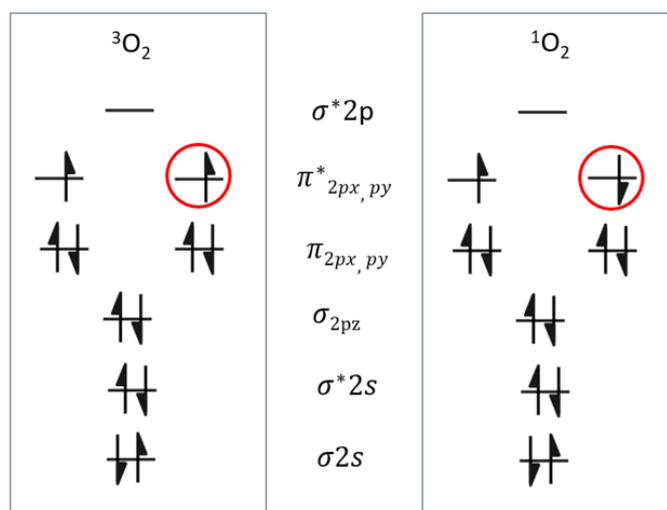
CAPÍTULO II: REVISÃO TEÓRICA E BIBLIOGRÁFICA

2.1. Terapia Fotodinâmica

2.1.1. Princípios de terapia fotodinâmica

Descoberto em 1924, o oxigênio singlete demonstrou potencial de aplicações principalmente nas áreas de fotooxidação e terapia fotodinâmica (DeRosa e Crutchley, 2002; Khan, 1991). Sabe-se que, em função dos diferentes arranjos eletrônicos do orbital $2p\pi^*$, o oxigênio molecular pode existir em dois estados: oxigênio singlete (1O_2) ou triplete (3O_2). O estado fundamental, ou seja, estado eletrônico de menor energia do oxigênio molecular é o estado triplete, que é o estado onde os elétrons da camada de valência assumem a configuração de menor energia, com dois elétrons desemparelhados no orbital antiligante π^* . Quando se fornece quantidade de energia adequada ao oxigênio molecular no estado triplete há uma inversão de spin, como exemplificado pela Figura 2, e o oxigênio triplete assume a configuração de oxigênio singlete que, por ser uma molécula no estado excitado com maior nível energético deve decair para o estado fundamental através da liberação de energia (Blázquez-Castro, 2017).

Figura 2 – Processo de inversão de spin do oxigênio triplete para oxigênio singlete.



Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.com

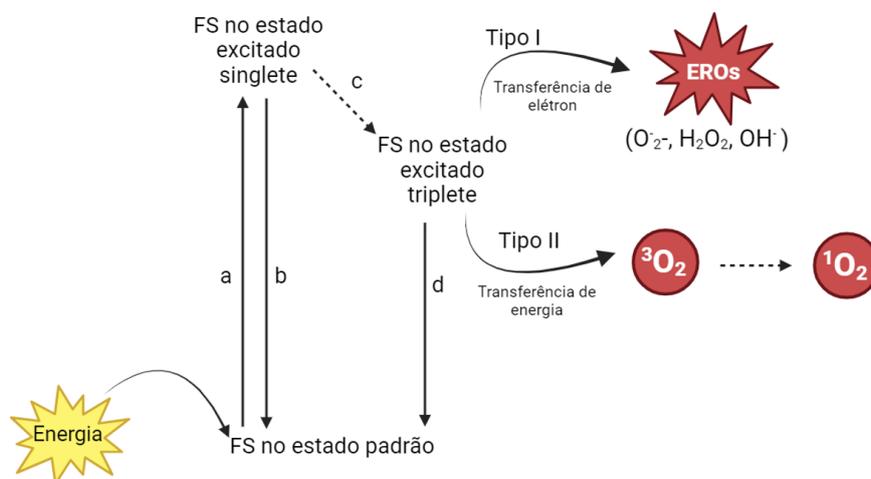
A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica que utiliza um agente fotossensibilizador, luz em um comprimento de onda específico, e o oxigênio do meio para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxidos (O_2^-), peróxidos de hidrogênio (H_2O_2), hidroxilas (OH^\cdot) e o oxigênio singlete (1O_2), que apresentam efeito citotóxico (Li *et al.*, 2020). Tratamentos utilizando a TFD são fundamentados na administração tópica ou intravenosa do agente fotossensibilizador que deve ser específico para as células alvo e se acumula no objeto de interesse (Correia *et al.*, 2021). Após à aplicação do agente fotossensibilizador (FS), luz de comprimento de onda adequado para excitar esse composto é aplicada *in situ*, através de fibras óticas, utilizando um laser como fonte de luz (Dougherty e Marcus, 1992). A terapia fotodinâmica apresenta diversas áreas de aplicação, entre elas há, por exemplo, o tratamento do câncer e a inativação bacteriana.

2.1.2. Mecanismos de geração de oxigênio singlete

Os processos energéticos que demonstram a geração de EROs por um FS bem como retorno da espécie excitada para o estado fundamental são exemplificados pelo diagrama de Jablonski simplificado pela Figura 3. Vale ressaltar que existem diferentes mecanismos de transferência de energia que podem levar uma espécie ao estado excitado. Quando o modo de excitação é a absorção de fótons, e a emissão desses fótons ocorre num intervalo de 10^{-10} a 10^{-7} s esse fenômeno é chamado de fluorescência (Valeur e Berberan-Santos, 2012). E, as moléculas capazes de emitir luz quando excitadas a partir de um comprimento de onda adequado são chamadas de fluoróforos ou cromóforos.

A primeira etapa para a geração do oxigênio singlete é a transferência de energia da luz de comprimento de onda adequada para o cromóforo. Após essa etapa, o cromóforo sai do estado fundamental e passa para o estado excitado singlete (a). A partir desse estado excitado, o agente fotossensibilizador relaxa para o estado fundamental diretamente (b) ou via cruzamento intersistema (c). Quando a espécie retorna para o estado padrão diretamente isso ocorre via emissão de fóton, já o cruzamento intersistema envolve um processo de inversão de spin dos elétrons da molécula excitada. A molécula do elemento fotossensibilizador retorna, então, para o estado padrão a partir da emissão de energia via fosforescência (d), ou a partir de interações com o meio por dois caminhos de reações denominados tipo I e tipo II.

Figura 3 - Diagrama de Jablonski simplificado para geração de EROs, contemplando as etapas de (a) excitação; (b) fluorescência; (c) cruzamento intersistemas e (d) fosforescência.



Fonte: Adaptado de MACDONALD; DOUGHERTY (2012) e DOLMANS; FUKUMURA; JAIN (2003).
Criado com BioRender.com

A reação do tipo I ocorre quando em ambientes com a presença de oxigênio o estado tripleto do cromóforo transfere rapidamente a energia liberada do cruzamento energético para algum substrato do meio. Ao ocorrer a transferência de elétrons entre o substrato e o oxigênio molecular do meio, espécies reativas de oxigênio são produzidas (MacDonald e Dougherty, 2012). Por sua vez, a reação do tipo II é caracterizada pela transferência de energia do FS excitado no estado tripleto para o oxigênio no seu estado fundamental tripleto, produzindo, assim o oxigênio no estado singlete (MacDonald e Dougherty, 2001).

2.1.3. Quantificação de oxigênio singlete

A utilização de elementos fotossensibilizantes na terapia fotodinâmica, requer a avaliação da capacidade desses reagentes em gerar espécies reativas de oxigênio, pois, de forma geral um bom elemento fotossensibilizante deve apresentar um alto rendimento quântico de geração de oxigênio singlete, ser citotóxico apenas em presença de luz de determinado comprimento de onda, e apresentar alta especificidade com as células alvo (Detty, Gibson e Wagner, 2004; Juarranz *et al.*, 2008).

Como explanado, a curcumina apresenta potencial de geração de espécies reativas de oxigênio (inclusive o oxigênio singlete). Nesse contexto e sabendo da existência de diversas

modificações na molécula da curcumina para potencialização das suas aplicações, se faz necessária a utilização de metodologias analíticas que quantifiquem o potencial de geração das espécies reativas de oxigênio e de geração de oxigênio singlete dos derivados de curcumina. Na literatura, o método mais confiável para detecção da geração de oxigênio singlete é através do método direto via fosforescência do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm utilizando um fluorímetro acoplado a uma fotomultiplicadora NIR (França, de, 2022). No entanto, esta técnica é onerosa, o que traz como alternativas para detecção o método indireto utilizando sonda química.

Técnicas analíticas de detecção e quantificação da geração de EROs incluem a detecção do decaimento de espécies que reagem especificamente com o oxigênio singlete. Métodos indiretos de detecção de oxigênio singlete como espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, e uso de sondas químicas são comumente empregados (Nakamura *et al.*, 2011). Por definição, sondas fluorescentes são compostos fluorescentes capazes de detectar qualitativamente ou quantitativamente, e eletivamente a presença de determinado composto alvo (Wei *et al.*, 2022). Dessa forma entende-se por sonda química ou quimioluminescente, um composto capaz de detectar um analito de interesse.

Algumas sondas utilizadas para detecção de EROs são 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), ácido 9,10-antracenediil-bis(metileno) dimalonico (ABDA), hidroxifenil fluoresceína (HPF) e 9,10-difenilantraceno (DPA). Vale destacar que o DPBF não é específico para detecção de oxigênio singlete, pois interage com outras espécies reativas de oxigênio, entretanto é como a utilização dessa sonda para detecção de oxigênio singlete na literatura devido à alta reatividade de aproximadamente 50% com o total do oxigênio singlete gerado no meio. A detecção do oxigênio singlete utilizando DPBF como sonda tem como princípio a fluorescência desse composto em 410 nm, comprimento de onda o qual a sonda apresenta seu máximo de absorção. Através do acompanhamento da emissão de fluorescência resolvida no tempo, o decaimento do máximo de absorção da sonda é observado devido à produção do o-dibenzobenzeno como produto final entre o DPBF e o oxigênio singlete (Wozniak *et al.*, 1991). O DPBF é solúvel apenas em solventes orgânicos, e o ABDA e HPF são solúveis em solução aquosa, mas o ABDA, de forma similar ao DPBF não é específico para detecção de oxigênio singlete (Entradas, Waldron e Volk, 2020; Garcia-Diaz, Huang e Hamblin, 2016; Umezawa *et al.*, 1999). Já o DPA, é específico para detecção de oxigênio singlete, mas não é solúvel em água. A utilização do ABDA como sonda para oxigênio singlete tem como princípio o acompanhamento do

decaimento do máximo de absorção da sonda em 800 nm devido à oxidação desse composto em presença de oxigênio singlete (Szerb *et al.*, 2021). De forma similar ao ABDA, o DPA utilizado como sonda também tem como princípio o acompanhamento do decaimento do máximo de absorção da sonda. O máximo de absorção dessa sonda é no comprimento de 355 nm. Ao reagir com o oxigênio singlete, o DPA forma um endoperóxido estável, que faz o máximo de absorção do DPA decair (Wu *et al.*, 2011). Por sua vez, a detecção de oxigênio singlete pelo HPF é verificada via acompanhamento do espectro de fluorescência do composto em 525 nm (Price *et al.*, 2009).

Algumas sondas comercialmente disponíveis para detecção do oxigênio singlete são a 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMP); Singlet Oxygen Sensor Green® (SOSG), mas de forma similar às demais, tais sondas são solúveis apenas em solventes orgânicos (Li *et al.*, 2013).

Outro obstáculo na detecção da geração do oxigênio singlete além da especificidade da sonda é o baixo tempo de vida do oxigênio singlete em meios aquosos, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 - Tempo de vida (τ_{Δ}) do $^1\text{O}_2$ em diferentes solventes.

Solvente	$\tau_{\Delta}/\mu\text{s}$	Solvente	$\tau_{\Delta}/\mu\text{s}$
H ₂ O	3,3 ± 0,5	Pentano	29 ± 6
D ₂ O	66 ± 2	THF	23 ± 2,6
CH ₃ OH	9,9 ± 0,5	DMSO	24,6 ± 5,4
CD ₃ OD	240 ± 10	Piridina	37 ± 20
CH ₃ CH ₃ OH	15,5 ± 3,5	Hexano	30 ± 1
(CH ₃) ₂ CO	50,5 ± 4	Cicloexano	21 ± 4
(CD ₃) ₂ CO	750 ± 80	CS ₂	37000 ± 8000
CH ₂ Cl ₂	101 ± 39	Benzeno	32 ± 3,3
CHCl ₃	235 ± 30	C ₆ H ₅ Br	96 ± 53
CDCl ₃	560 ± 150	C ₆ F ₆	12000 ± 8000
CCl ₄	73000 ± 14000	C ₆ D ₆	665 ± 95
CH ₃ CN	66,7 ± 13,5	Tolueno	27 ± 2

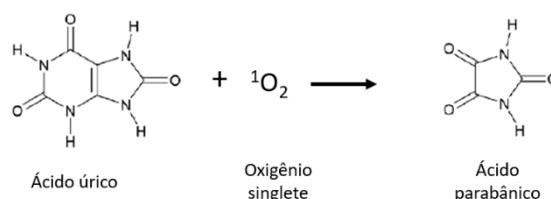
Fonte: Adaptado de Marrugat (2016)

A análise da Tabela 1 permite supor que sondas utilizadas para detecção de oxigênio singlete em sua maioria são solúveis em solventes orgânicos clorados pois o tempo de meia vida nesses solventes é maior, facilitando, desta forma, a detecção desta espécie. No entanto, é importante a existência de metodologias de quantificação de oxigênio singlete em meio aquoso, considerando a aplicação biológica da terapia fotodinâmica.

De forma geral, pode-se afirmar que há uma dificuldade na especificidade das sondas para detecção específica de oxigênio singlete, ademais, sondas específicas para oxigênio singlete solúveis em água são escassas na literatura. Em uma vasta busca na literatura foram encontrados apenas dois métodos específicos para quantificação de oxigênio singlete em água, apresentando como sondas o RNO (Kraljić e Mohsni, 1978) e uma sonda desenvolvida por Nardello e colaboradores (1997) derivada a partir da antraquinona denominada (BPAA). Em meio aquoso, ainda tem-se o ácido úrico sendo utilizado como sonda, entretanto como sonda não específica, pois o ácido úrico também reage com outras espécies reativas de oxigênio (Rabello *et al.*, 2012). A detecção da presença do oxigênio singlete pelo ácido úrico tem como fundamento a formação do ácido parabânico através da reação do ácido úrico em contato com o oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio, como é demonstrado pelo Esquema 1 a seguir. O ácido úrico apresenta dois picos de absorção característicos em água nos comprimentos de 235 e 2932 nm; quando o ácido parabânico é formado, a intensidade de absorção da solução contendo ácido úrico decai, e de tal forma a geração de EROs é comprovada.

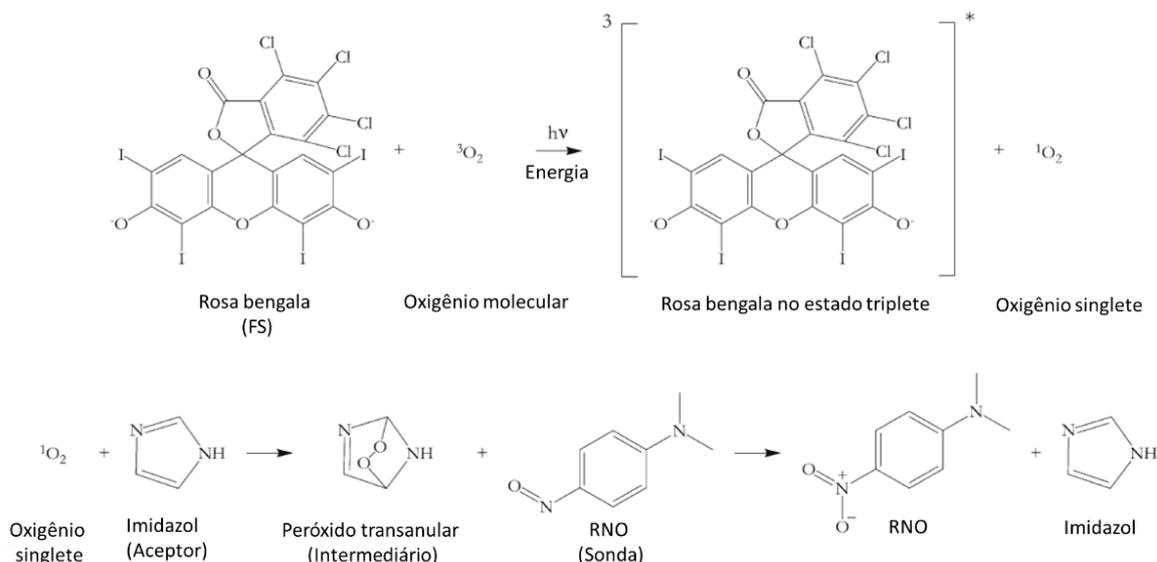
A detecção da presença do oxigênio singlete pelo RNO tem como fundamento o decaimento do máximo de absorção dessa espécie em presença de uma molécula intermediária, um peróxido transanular, formada a partir da reação do imidazol com o oxigênio singlete. O esquema reacional é demonstrado pelo Esquema 2.

Esquema 1 - Reação do ácido úrico com oxigênio singlete



Fonte: Adaptado de (Bregnhøj *et al.*, 2019)

Esquema 2 - Geração de oxigênio singlete através do rosa bengala como FS e oxidação do RNO



Fonte: Adaptado de (Herman e Neal, 2019)

2.1.4. Rendimento quântico de fluorescência e rendimento quântico de geração de oxigênio singlete

Para a molécula cromófora, uma característica importante é o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{fl}). Por definição, o rendimento quântico de fluorescência é a fração de moléculas excitadas que retornam ao estado padrão, com a emissão de fótons (Valeur e Berberan-Santos, 2012). Numericamente, o rendimento quântico de fluorescência informa a razão entre a quantidade de fótons emitidos pela quantidade de fótons absorvidos. Substâncias com alto rendimento quântico de fluorescência apresentam altos valores de emissão de fótons, ou seja, visualmente se apresentam de forma ‘mais brilhante’ durante o processo de emissão, o que é uma característica desejável para um bom fluoróforo (Lovell, Branchaud e Jasti, 2024).

Tipos de cromóforos comumente utilizados na TFD in vivo são as porfirinas, devido à alta absorção de luz no comprimento de onda próximo ao vermelho, que apresenta maior penetração no tecido (Hamblin e Newman, 1994; MacDonald e Dougherty, 2012). Além das porfirinas, outro FS comumente utilizado na TFD é o azul de metileno (AM), devido à grande capacidade de geração de oxigênio singlete. O AM apresenta máximo de absorção entre 650 e 670 nm e apresenta rendimento quântico de fluorescência de aproximadamente 0,5 em solução aquosa (Gabielli *et al.*, 2004; Shahinyan, Amirbekyan

e Markarian, 2019). Os corantes usados como elementos fotossensibilizantes como o azul de metileno se enquadram na classe de fenotiazinas, além desse, destaca-se ainda a utilização do azul de toluidina e rosa bengala. Na classe de fotossensibilizadores naturais, tem-se, como exemplos, a curcumina e hipericina.

Por sua vez, o rendimento quântico de geração de oxigênio singlete, como o nome informa, define a eficiência pela qual o FS consegue gerar oxigênio singlete. Essa relação é medida através do número de moléculas de oxigênio singlete geradas em relação à energia (número de fótons) absorvida (Gandin, Lion e Vorst, Van de, 1983). O rendimento quântico de fluorescência e rendimento quântico de geração de oxigênio singlete desses e outros FS é exemplificado pelas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Rendimento quântico de fluorescência de alguns fotossensibilizadores em água e etanol

FS	CHCl ₂	Água	EtOH	Referência
Azul de metileno	*	0,04	-	(Tardivo <i>et al.</i> , 2005)
Rosa bengala	*	< 0,01	0,05	(Linden e Neckers, 1988; Song <i>et al.</i> , 2011)
Curcumina	0,1	*	0,07	(CHIGNELL <i>et al.</i> , 1994; FRANÇA, 2022)

*dados não encontrados na literatura

Tabela 3 - Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete

FS	CHCl ₂	Água	EtOH	Referência
Azul de metileno	*	0,52	0,50	(Gross, Ehrenberg e Johnson, 1993; <u>Shahinyan, Amirbekyan e Markarian, 2019</u>)
Rosa bengala	*	0,05 0,75	0,86	(Neckers, 1989; Redmond e Gamlin, 1999)
Hipericina	*	< 0,02	0,36	(<u>Darmanyan <i>et al.</i>, 1994</u>)
Curcumina	0,18	*	< 0,01	(<u>Chignell <i>et al.</i>, 1994; França, de, 2022</u>)

*dados não encontrados na literatura

Além das moléculas orgânicas (sintéticas e/ou naturais), existem nanoestruturas que podem ser utilizadas como elementos fotossensibilizantes como o dióxido de titânio (Fekrazad, Zare e Vand, 2016; García *et al.*, 2015; Ghorbani *et al.*, 2018; Maness *et al.*, 1999; Shrestha e Kishen, 2012).

Particularmente, no presente trabalho, avaliaremos a curcumina e seus derivados sintéticos como agente fotossensibilizante. De forma geral, a curcumina pode ser utilizada como elemento fotossensibilizante para a inativação de microrganismos (bactéria, fungos e protozoários). Pode ser usada ainda como FS para tratamento de câncer e outras condições médicas (Dovigo *et al.*, 2011; França, de *et al.*, 2022; Hegge *et al.*, 2012).

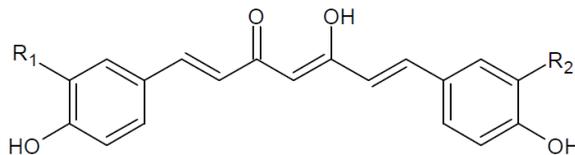
2.2. Curcumina e seus derivados

2.2.1. Extrato de cúrcuma e potencial biológico

A cúrcuma é extraída do rizoma *Curcuma longa* L., comumente utilizado como tempero na culinária, apresentando coloração amarela característica. Na medicina esse composto é conhecido pelas suas características antioxidantes, anti-inflamatórias, e na literatura existem diversos estudos que mostram a capacidade antitumoral desse composto (Dujic *et al.*, 2009; Kazantzis *et al.*, 2020). A cúrcuma é composta majoritariamente por três curcuminóides: a curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), dimetoxicurcumina ($C_{20}H_{18}O_5$) e bidimetoxicurcumina ($C_{19}H_{16}O_4$), como exemplifica a Figura 4 a seguir (Cousins *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2024). Em cúrcuma comercialmente disponível, acredita-se que a composição da mistura seja de aproximadamente 80% de curcumina, 17% de dimetoxicurcumina e 3% de bidimetoxicurcumina (Naksuriya *et al.*, 2014).

A curcumina, ou diferuloilmetano, apresenta baixa solubilidade em água, rápida metabolização e degradação em outros compostos (Wang *et al.*, 1997). Quando administrada oralmente, é perceptível a sua rápida metabolização, considerando o nível de curcumina detectado no plasma após sua administração oral em seres humanos na faixa de 10 a 100 nM (Lao *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2004).

Figura 4 - Fórmula estrutural dos principais curcuminoides presentes na cúrcuma (se $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$, tem-se a curcumina; se $R_1 = \text{OCH}_3$ e $R_2 = \text{H}$, tem-se a dimetoxicurcumina; se $R_1 = R_2 = \text{H}$, tem-se a bidimetoxicurcumina)



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, dada a baixa biodisponibilidade no organismo, bem como o potencial de uso da curcumina como agente antitumoral e antimicrobiano, o desenvolvimento de novas formas de utilização da curcumina como nanocompósitos e nanofármacos foi instigado para uma melhor utilização desse composto (Ailioaie, Ailioaie e Litscher, 2021; Ashkbar *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2023, 2024).

2.2.2. Derivados sintéticos de curcumina

Derivados sintéticos da curcumina também foram desenvolvidos em busca de aplicações biológicas potenciais usando-se substituição de ligantes principalmente nos grupamentos hidroxila, metoxila e β -dicetona por ligantes aromáticos, ou ainda utilizando reações de esterificação com aminoácidos, e outros (González *et al.*, 2023; Kuzminska *et al.*, 2024).

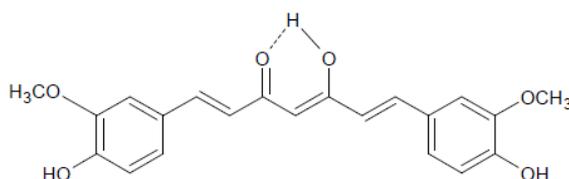
Além da compreensão da influência da adição de diferentes grupamentos à molécula de curcumina em propriedades como solubilidade e biodisponibilidade, visando aplicação da curcumina e seus derivados na TFD deve-se compreender, ainda, como a curcumina interage com a luz em relação a absorção, emissão, estabilidade e transferência de energia. Tais propriedades são denominadas propriedades fotofísicas da matéria.

A estrutura da molécula, sua rigidez, e meio ao qual a molécula está exposta influenciam na posição, intensidade e/ou forma da banda de absorção/emissão do fluoróforo, entretanto é comum que o solvente tenha maior influência que a rigidez da molécula, pois quando um composto está dissolvido em outro, é necessário pensar em termos de polaridade do soluto e solvente. Quando a polaridade do soluto influencia no espectro de absorção (e emissão), esse composto é denominado solvatocrômico (Valeur e Berberan-Santos, 2012).

Quando o aumento da polaridade do solvente provoca uma maior estabilização do estado fundamental do composto, e a banda de emissão é deslocada para comprimentos de onda menores, ocorre o solvatocromismo negativo, hipsocrômico ou *blueshift*. O oposto a isso é o solvatocromismo positivo, batocrômico, ou *redshift*, quando há o deslocamento da banda para comprimentos de ondas maiores do estado excitado em relação ao fundamental (Reichardt, 1994).

Em solventes apolares e moderadamente polares, bem como em estado sólido cristalino, a curcumina assume a configuração ceto-enol, exemplificada pela Figura 5, estabilizada pela ressonância da dupla ligação entre os grupamentos hidroxila e cetona (Priyadarsini, 2014).

Figura 5 – Ressonância da dupla ligação entre os grupamentos hidroxila e cetona da curcumina



Fonte: Autoria própria.

Também são encontrados na literatura derivados sintéticos de curcumina como os complexos metálicos sintetizado por De França e colaboradores (2022). A adição de grupos funcionais doadores de elétrons promove red-shift, e complexos com metais e ligantes também potencializam a ação antimicrobiana, intensificada pela exposição a luz em comprimentos de onda específicos. Demonstrando que além da ação antimicrobiana intrínseca à molécula, este efeito é potencializado para uma abordagem de TFD (Deus, De *et al.*, 2021).

2.3. Matriz polimérica

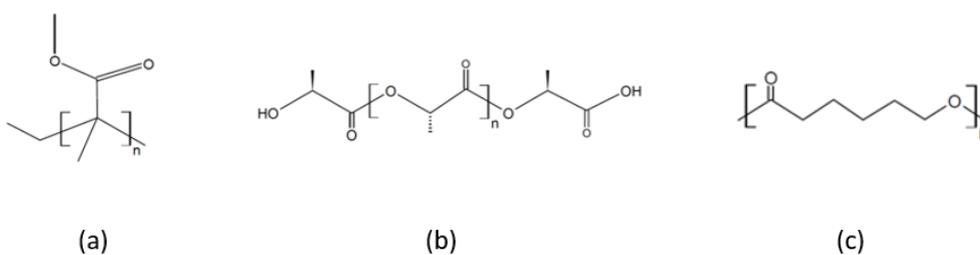
2.3.1. Incorporação de fotossensibilizadores em polímeros

A incorporação de FS em matrizes poliméricas é estudada na literatura visando principalmente a inativação microbiana. Polímeros como poli 2-hidroxietilmetacrilato, fluoreto de polivinilideno, pectina, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol, alginato de sódio, e FS como rosa bengala e azul de metileno são comumente estudados (Chakraborty *et al.*, 2024; Johnson *et al.*, 2024; Kuryanova *et al.*, 2023; López-Fernández *et al.*, 2022). Ademais, a curcumina incorporada em polímeros também é um campo amplamente estudado, como será detalhado na revisão da literatura, na seção seguinte.

2.3.2. Influência do tipo de polímero

A escolha dos polímeros para desenvolvimento de filmes envolve características como flexibilidade, degradabilidade e biocompatibilidade. Exemplos de polímeros que podem ser utilizados para produção de filmes e uso na TFD incluem: Poliácido lático (PLA), Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli (metacrilato de metila) (PMMA). As fórmulas estruturais dos polímeros destacados são exemplificadas pela Figura 6 a seguir.

Figura 6 - Fórmulas estruturais dos polímeros (a) poli (metacrilato de metila) (PMMA), (b) poliácido lático (PLA), e (c) poli ϵ -caprolactona (PCL).



Fonte: Autoria própria.

O poli (metacrilato de metila) é um polímero amorfo, termoplástico que tem o ácido acrílico como monômero. É um material transparente, de boas condições de processamento e resistente à quebra (Ali *et al.*, 2015). Devido a sua biocompatibilidade, em aplicações biomédicas, o PMMA é aplicado como cimento para ossos, sistema para envio de drogas e substituto de tecidos para implantes dentários (Manoukian *et al.*,

2019). No que se refere a solubilidade, o PMMA é solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio, benzeno, acetona, tetrahidrofurano (THF), tolueno e metanol (Daoust e Rinfret, 1952). Martins e colaboradores (2023) avaliaram a adição de curcumina (na forma de extrato de cúrcuma) em PMMA e o efeito da copolimerização com ácido acrílico, destacando a influência a polaridade da matriz na absorção/emissão do polímero fluorescente, bem como foi observado um efeito de cristalinidade da curcumina na matriz polimérica em presença do comonômero.

O poliácido láctico é um polímero termoplástico, biocompatível e biodegradável obtido a partir da fermentação do ácido láctico (ácido 2-hidroxi-propionico) ou, seguindo uma rota sintética como a hidrólise da lactonitrila (Swetha *et al.*, 2023). Vale ressaltar que a primeira rota é a mundialmente mais utilizada devido ao baixo impacto ambiental por se tratar de um processo fermentativo natural a partir de fontes renováveis (Lunelli *et al.*, 2010). Devido a sua capacidade absorção pelo organismo, em aplicações médicas o PLA é indicado para fixações de fraturas ósseas a curto termo, e utilização em cirurgias craniofaciais (Manoukian *et al.*, 2019; Peltoniemi *et al.*, 2002). De Deus e colaboradores (2021) incorporaram derivados sintéticos de curcumina em PLA, obtendo membranas poliméricas eletrofiadas. Foi observado que as nanofibras apresentaram diferentes comprimentos de onda de absorção/emissão a depender do derivado incorporado no polímero.

Por fim, a poli ϵ -caprolactona é um polímero de estrutura semi-cristalina, biocompatível e biodegradável. Em temperatura ambiente é altamente solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio, diclorometano, benzeno; pouco solúvel em acetona acetato de etila e insolúvel em éter etílico (Sinha *et al.*, 2004). Alguns dos mecanismos de obtenção desse polímero são via abertura do anel do estér cíclico ϵ -caprolactona, ou ainda condensação do ácido 6-hidroxi-hexanoico (Labet e Thielemans, 2009). A temperatura de transição vítrea na faixa de -65 a -60°C e temperatura de derretimento entre 59 e 64°C (dependendo da sua estrutura cristalina) fazem com que em temperaturas ambientes o PCL apresente estrutura flexível passível de utilização como scaffold para tecidos ósseos, entre outras aplicações na engenharia de tecidos (Dwivedi *et al.*, 2019). Merrell e colaboradores (2009) desenvolveram nanofibras de PCL contendo curcumina via eletrofiação visando aplicação em curativos para feridas e demonstraram a capacidade antioxidante, anti-inflamatória e potencial de aumento da taxa de

recuperação da ferida em modelo in-vivo de ratos diabéticos através da utilização do material produzido.

2.4. Revisão da literatura

2.4.1. Potencial antimicrobiano da curcumina

A cúrcuma, ou açafrão-da-terra é um polifenol hidrofóbico extraído da raiz da *Curcuma longa L.* amplamente utilizado na medicina asiática há diversos anos (Mahmood *et al.*, 2015). Sabe-se que esse composto apresenta capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e cicatrizante (Alven, Nqoro e Aderibigbe, 2020; Gonçalves De Oliveira Filho *et al.*, 2021).

Visando uma otimização no uso das propriedades de interesse da cúrcuma e derivados diversas formas de utilizar a curcumina em benefício humano foram desenvolvidas ao longo dos anos, como organogéis para aplicação em sensores, nanoemulsões para entrega de fármacos e incorporação em matrizes poliméricas para uso em embalagens inteligentes (Park e Lee, 2015; Rachmawati, Budiputra e Mauludin, 2015; Roy e Rhim, 2019).

No que se refere ao potencial de utilização da curcumina sintética contra variados tipos de microrganismos, uma breve revisão da literatura é exposta na Tabela 2.

Tabela 2 - Aplicações da curcumina em TFD.

Referência	Objetivo	Microrganismos avaliados	Solvente
(Dovigo <i>et al.</i> , 2011)	Avaliar o efeito fotodinâmico da curcumina contra uma espécie de fungo.	<i>C. albicans</i>	DMSO
(Paschoal <i>et al.</i> , 2015)	Avaliar o potencial de utilização de uma nova fonte de luz na inativação bacteriana visando tratamento de infecções orais	<i>S. mutans</i>	DMSO
(Wu <i>et al.</i> , 2016)	Avaliar o efeito fotodinâmico da curcumina contra <i>V. parahaemolyticus</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	Álcool
(Penha <i>et al.</i> , 2017)	Avaliar a eficácia da inativação fotodinâmica de bactérias	<i>S. aureus</i> ; <i>A. hydrophila</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>S. enterica</i> serotype; <i>S. Typhimurium</i> ; <i>P. aeruginosa</i>	DMSO
(Henrique <i>et al.</i> , 2021)	Avaliação do potencial de utilização da curcumina para tratamento de leishmaniose cutânea	<i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	DMSO e álcool
(França, de <i>et al.</i> , 2022)	Caracterização das propriedades fotofísicas de complexos metálicos de curcumina e avaliação do potencial de aplicação contra determinados microrganismos	<i>C. albicans</i> , <i>S. brasiliensis</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>E. floccosum</i> ; <i>L. amazonensis</i>	DMSO

Dovigo e colaboradores (2011), avaliaram o potencial de utilização da curcumina contra a espécie de fungo *C. albicans*. Preparou-se solução de curcumina utilizando-se dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente numa concentração final de 10% em relação à solução salina. Após inoculação adequada da suspensão de fungos em análise, volume suficiente de microrganismos foi transferido para poços numa placa de 96 poços e soluções de curcumina de concentrações 5, 10 e 20 μM foram adicionadas aos poços. Além disso, a viabilidade de biofilmes de candida expostos à curcumina também foi avaliada utilizando-se ensaio viabilidade com sal de tetrazolio XTT. Após o contato da solução de curcumina com os microrganismos as soluções e biofilmes foram expostos à luz azul (440 – 460 nm). Caracterizações como espectro de absorção/fluorescência da solução de curcumina foram realizadas. Foi observado que para o ensaio com os fungos em suspensão a inativação completa do fungo foi obtida quando a concentração de curcumina na solução era igual a 20 μM , a uma dose de luz de 5,28 Jcm^{-2} . Já para o ensaio utilizando biofilme, percebeu-se que quanto maior a concentração de curcumina maior o declínio na viabilidade dos microrganismos. Além disso, os autores também perceberam que quanto maior o tempo de pré inoculação do microrganismo, ou seja, quanto maior o tempo o biofilme ficava em contato com a solução de curcumina antes de ser exposto à luz, maior o potencial de inativação do microrganismo após exposição a luz.

Paschoal e colaboradores (2015), avaliaram o efeito dos fotossensibilizadores curcumina e azul de toluidina (TBO) para inibição da viabilidade do microrganismo *S. mutans*. A solução de curcumina foi preparada dissolvendo-se o esse FS em DMSO, seguido pela adição de água deionizada para obtenção de soluções com concentrações finais de curcumina de 0,75; 1,25 e 2,5 mM, com uma concentração de DMSO de 10%. Para o TBO, soluções de concentração 25, 50 e 10 μM foram produzidas utilizando água deionizada como solvente. Não foram realizadas quaisquer caracterizações das soluções preparadas. Os ensaios biológicos foram feitos após a inoculação adequada do microrganismo. Para as soluções de curcumina, as diferentes concentrações foram adicionadas à suspensão, e as soluções foram mantidas no escuro por um tempo de 60 s. Já para a avaliação do TBO, as suspensões foram mantidas no escuro por um tempo de 5 min. Após esse tempo de pré-irradiação ambas as soluções foram expostas à luz de diferentes comprimentos de onda (luz vermelha para o TBO, e azul para a curcumina) por tempo menor que 60 s. Além disso, grupos controle contendo apenas os FSs sem exposição do sistema a luz também foram avaliados, e apenas exposição a luz sem

presença dos FSs foram avaliados. Foi concluído que apenas o FS, ou apenas a exposição a luz não inibe significativamente a viabilidade do microrganismo.

Por fim, os autores concluíram, via contagem de unidades formadoras de colônia que para todas as doses de luz (24, 48, 72 Jcm⁻²) e todas concentrações de curcumina, e de forma similar, para todas as concentrações de TBO e respectivas doses de luz (18, 35, 53 Jcm⁻²) a porcentagem de morte do microrganismo foi de quase 100%.

Wu e colaboradores (2016), avaliaram o potencial de utilização da curcumina *in vitro* e *in vivo* contra a bactéria gram-negativa *V. parahaemolyticus*. A solução de curcumina foi preparada utilizando-se etanol de grau alimentício de 95% de pureza. Após inoculação adequada das bactérias foi produzida suspensão salina com as mesmas onde foi adicionada a solução de curcumina para obtenção de concentrações finais de 5, 10 e 20 µM. O tempo de pré-irradiação das soluções foi mantido em 5 min, e após esse intervalo as soluções foram expostas a luz de comprimento de onda de 470 nm (azul), por um tempo de irradiação de 60 s, o que corresponde a uma dose total de energia fornecida de 3,6 J.cm⁻². A viabilidade celular foi analisada via contagem de unidades formadoras de colônias após inoculação das amostras de *V. parahaemolyticus*. Além disso, os seguintes grupos para controle foram analisados: Ausência de luz e ausência de FS; ausência de FS e presença de luz; presença do FS e ausência de luz. Os autores concluíram que houve diminuição significativa da viabilidade apenas nos ensaios onde houve a presença do FS e da luz, e que a inativação fotodinâmica foi mais eficiente com a curcumina nas concentrações de 10 e 20 µM. Além disso, os autores ainda comprovaram a geração de oxigênio singlete utilizando ABDA como sonda através do acompanhamento do decaimento do pico de absorção do ABDA em 400 nm. Para as soluções preparadas, não foram avaliados os espectros de absorção/emissão, ou quaisquer outras caracterizações.

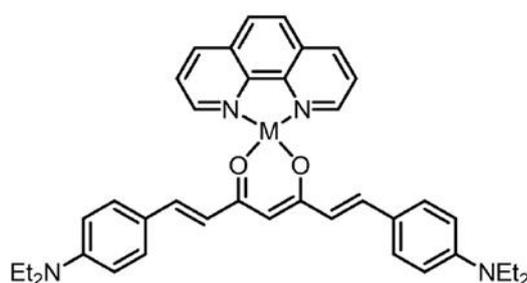
Para o ensaio *in vivo*, os autores contaminaram ostras com a bactéria *V. parahaemolyticus* e após uma inoculação das bactérias no molusco por 3 h foi analisada a viabilidade celular. Os autores concluíram novamente que apenas a presença do FS e da luz trouxe resultados significativos na inibição do microrganismo, demonstrando assim o potencial de utilização da curcumina como agente bactericida para descontaminação de *V. parahaemolyticus* em ostras, o que pode ajudar na diminuição de casos de gastroenterite.

Penha e colaboradores (2017), avaliaram o potencial de utilização da curcumina como elemento FS contra as bactérias: *S. aureus*; *A. hydrophila*; *E. coli*; *S. enterica serotype*; *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*. Nesse estudo, similar aos anteriores, a solução de curcumina foi preparada utilizando-se DMSO como solvente. O ensaio de viabilidade celular foi realizado incubando cada bactéria em solução de curcumina de concentração 75 μM . Após a incubação as soluções foram expostas à luz azul por 10, 20 e 30 min (que corresponde a uma dose de 139, 278 e 417 Jcm^{-2} respectivamente). O controle negativo foi avaliado com amostras sem exposição à luz. A viabilidade celular foi determinada via contagem das unidades formadoras de colônia através da diluição seriada das soluções em placa com meio de cultura apropriado. Os autores concluíram que para a *S. aureus* o tempo de exposição de 10 min foi suficiente para obtenção de valor significativo de viabilidade celular, e que uma exposição de luz por 30 min promoveu completa inativação bacteriana. Para a *A. hydrophila*, 10 min de exposição também trouxe redução significativa na viabilidade, e exposição por 20 e 30 min promoveram completa inativação bacteriana. De forma geral, foi demonstrado o potencial de inativação bacteriana de todas as espécies estudadas exceto *P. aeruginosa*. De forma similar aos demais trabalhos, não foram mostradas caracterizações de absorção/emissão das soluções ou outras caracterizações físico-químicas.

Henrique e colaboradores (2021), avaliaram o potencial de utilização da curcumina para o tratamento da leishmaniose cutânea causada pelos protozoários *L. braziliensis* e *L. major*. A solução de curcumina utilizada nesse estudo foi preparada utilizando DMSO (numa concentração final da solução menor que 1%) e álcool como solventes e ainda solução tampão fosfato para uma viabilidade de utilização da solução. Após preparo dos promastigotas dos protozoários *L. braziliensis* e *L. major* em solução adequada os parasitas foram postos em poços de placa de 24 poços visando infecção dos macrófagos. Após a infecção da cultura, solução de curcumina foi adicionada aos poços e mantida por um tempo de pré-irradiação de 1h. Após esse período o meio foi irradiado com luz de comprimento de onda azul por 278 s, totalizando uma dose total de luz de 10 Jcm^{-2} . Os autores concluíram que a curcumina foi capaz de inibir a viabilidade dos amastigotos analisados reduzindo a carga parasitária nas células com apenas uma aplicação da terapia fotodinâmica. Mais uma vez, não foram mostradas caracterizações de absorção/emissão das soluções ou outras caracterizações físico-químicas.

De França e colaboradores (2022), desenvolveram complexos metálicos de curcumina e avaliaram as propriedades desse material, bem como analisaram o potencial de utilização antimicrobiano de tais complexos contra os fungos *C. albicans*, *S. brasiliensis*, *M. canis*, *M. gypseum*, e *E. floccosum*; e contra o protozoário *L. amazonensis*. A fórmula estrutural do complexo metálico utilizada pelos colaboradores é exemplificada Figura 7 seguir. Ademais os resultados foram comparados em relação à curcumina.

Figura 7 - Complexo metálico com derivado de curcumina e corantes. Ligantes (M = Cu(II) ou Pd(II)).



Fonte: Adaptado de DE FRANÇA et al. (2022)

Para os ensaios biológicos, as espécies escolhidas para o estudo foram inoculadas com soluções de curcumina e seus derivados em concentrações variando de 0,009 a 10 μM , com tempo de pré irradiação variando de 5 a 10 min. Após a inoculação as soluções foram irradiadas com luz verde por períodos de 30 s (13,76 Jcm^{-2}), 60 s (27,56 Jcm^{-2}) e 120 s (55,06 Jcm^{-2}). Os autores concluíram que para os microrganismos avaliados apenas foi detectada potencial antifúngico da terapia fotodinâmica dos complexos produzidos apenas contra a *C. albicans*, quando a concentração dos mesmos era de 100 μM . Ademais, o complexo (1b) demonstrou potencial antifúngico contra o *S. brasiliensis* em condições sem luz, além de que quando exposto a luz o potencial de inativação aumentou, demonstrando assim o potencial de utilização do derivado de curcumina produzidos contra *S. brasiliensis*. No que se refere à inativação das promastigotas de *L. amazonensis*, o complexo (1a) também demonstrou capacidade de inativação em condições com e sem luz, numa concentração de 10 μM , enquanto a curcumina não apresentou potencial de inativação para nenhuma das espécies em estudo na concentração de 10 μM analisada.

Nesse trabalho foram avaliados os espectros de absorção/emissão em diversos solventes e rendimento quântico de fluorescência das soluções preparadas.

Percebe-se, então, que além de serem utilizados para terapias antimicrobianas, embalagens inteligentes e tratamento do câncer, derivados sintéticos da curcumina também apresentam potencial de utilização contra algumas espécies de protozoários, entre eles a *Leishmania amazonensis*. Segundo o (Ministério da Saúde, 2017) a Leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que apresenta as formas flagelada e de promastigota. Por definição, espécies promastigotas são organismos presentes no intestino de insetos da subfamília flebotomíneos e que se movimentam através de flagelos (Bates, 2006). Dentre os tipos de protozoários desse gênero, a *Leishmania amazonensis* é a espécie causadora da leishmaniose tegumentar, que acomete a pele e mucosas, e pode ser transmitida de animais para humanos (Gontijo e Carvalho, De, 2003).

De forma geral, diversos trabalhos foram capazes de mostrar o potencial de atuação dos derivados de curcumina como agente fotossensibilizante, e é esta a principal característica que será explorada neste trabalho.

2.4.2. Matrizes poliméricas contendo curcumina e usos na TFD

A utilização da curcumina em filmes poliméricos apresenta diversas possibilidades, como aplicação em embalagens inteligentes para controle da qualidade de alimentos, promoção de atividade antimicrobiana e uso na cicatrização de feridas (Cai *et al.*, 2021; Roy *et al.*, 2022; Zangirolami *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2019). No que se refere à incorporação da curcumina em matrizes poliméricas visando atividade antimicrobiana, uma característica da curcumina que pode ser explorada é o potencial de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Pois, sabe-se que quando exposta a comprimento de luz adequado e em presença de oxigênio a curcumina atua como FS gerando espécies reativas de oxigênio que são capazes de promover a inativação de bactérias e microorganismos (Chen *et al.*, 2021a).

O desenvolvimento de materiais para inativação fotodinâmica de bactérias é de interesse científico, principalmente, mas não somente em diversos ramos da medicina, e a utilização de elementos fotossensibilizantes incorporados a matrizes poliméricas foi reportado como desenvolvimento inovador para esse fim (Sharma, Dube e Kumar Majumder, 2020). Desta forma, neste trabalho serão exploradas as características de

filmes poliméricos contendo curcumina e derivado sintético de curcumina, e será avaliado o potencial de geração de EROs de tais filmes. Por fim, possíveis formas de utilização dos filmes poliméricos serão investigadas.

Trabalhos utilizando derivados de curcumina sintéticos em matrizes poliméricas são vastos na literatura, e em sua maioria esses trabalhos visam aplicação em embalagens inteligentes, ou seja, embalagens que impeçam a contaminação microbiana em alimentos, ou ainda embalagens que mudem de cor devido a mudanças de pH. Entretanto, com base na revisão da literatura feita até o momento, não foram encontrados trabalhos que explorem a utilização da curcumina e derivados em matriz polimérica visando aplicação dos filmes em TFD de forma interna ao organismo.

Alguns trabalhos que exemplificam a utilização da curcumina em matriz polimérica, seja para embalagens inteligentes ou aplicações médicas são mostrados na Tabela 3 .

Tabela 3 - Aplicações da curcumina em filmes poliméricos

Referência	Objetivo	Microrganismo avaliado	Matriz do filme
(Luo <i>et al.</i> , 2012)	Desenvolvimento de dispositivos médicos e embalagens inteligentes	<i>E. coli</i>	Celulose e pectina
(Govindaraj, Kandasubramanian e Kodam, 2014)	Avaliação do potencial antimicrobiano e caracterização dos filmes produzidos	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	Poliacrilonitrila
(Jesus, Sarika e Shankaran, 2016)	Avaliação do potencial do filme como sensor de pH	-	PMMA
(Qiao e Duan, 2020)	Desenvolvimento de dispositivos médicos e embalagens inteligentes	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Polivinil butiral
(Chen <i>et al.</i> , 2021)	Utilização em embalagens antimicrobianas	<i>L. monocytogenes</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , e <i>S. putrefaciens</i>	Celulose
(Roy e Rhim, 2020)	Caracteriza as propriedades do filme produzido e avaliar o potencial bactericida	<i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i>	Poliácido láctico

(Wang <i>et al.</i> , 2022)	Utilização em embalagens antimicrobianas	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>S. putrefaciens</i>	Quitosana e gelatina
(Lai <i>et al.</i> , 2022)	Desenvolvimento de embalagens inteligentes	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	κ-Carrageenan
(Mohan e Panneerselvam, 2022)	Avaliação das propriedades bactericidas e antioxidantes do filme produzido	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. substills</i>	PLA
(Cai <i>et al.</i> , 2022)	Avaliação das propriedades bactericidas do filme produzido	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	PCL
(Pedro <i>et al.</i> , 2023)	Tratamento de infecções de pele resistentes	<i>S. aureus</i>	Pululano
(Wen <i>et al.</i> , 2023)	Desenvolvimento de embalagens antimicrobianas	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Quitosana
(Teodoro <i>et al.</i> , 2023)	Desenvolvimento de filme com potencial de utilização como curativo	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	PCL

Luo e colaboradores utilizaram celulose para a criação de filmes contendo diversas concentrações de curcumina e avaliaram o potencial de aplicação destes filmes para embalagens inteligentes e aplicações médicas. Os filmes foram preparados dispersando a curcumina em polpa de algodão no líquido iônico AmimCl. Após a completa dissolução da celulose as soluções foram transferidas para recipiente de vidro onde através da adição de água deionizada os filmes foram formados via inversão de fase. Após lavagem dos filmes para remoção de líquido iônico residual os filmes foram secos por 12 h e deixados em dessecador até sua utilização. Através do método da zona de inibição foi observado que os filmes demonstraram capacidade bactericida contra a *E. Coli*. Caracterizações como microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica e teste de tração dos filmes foram realizados e foi percebido que as propriedades térmicas e mecânicas dos filmes foram mantidas mesmo com a adição da curcumina na matriz. Ademais, a técnica de microscopia foi utilizada para avaliação da solubilidade da curcumina em solução de líquido iônico.

Govindaraj e colaboradores (2014) tiveram como objetivo preparar filmes contendo curcumina e avaliar o potencial bactericida de tais materiais. A metodologia de preparo dos filmes consistiu em adicionar óleo essencial de curcumina à poliácridonitrila dissolvida em DMF. A solução foi deixada para evaporar a temperatura ambiente, e em seguida foi utilizado água deionizada para remoção do excesso de solvente. Caracterizações como medida do ângulo de contato, microscopia de força atômica e FT-IR foram realizadas. A avaliação do potencial antibacteriano dos filmes foi investigada através de ensaio de zona de inibição com os microrganismos *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. Foi constatado que os filmes foram eficazes na inibição dos microrganismos em estudo, e que a capacidade bactericida permaneceu ativa por mais de 30 dias.

Jesus e colaboradores (2016), avaliaram o potencial de utilização de um filme polimérico contendo com curcumina como sensor de pH. O filme foi desenvolvido utilizando PMMA como matriz e dimetilformamida como solvente. Os autores observaram que para variações em uma unidade no intervalo de 7 a 14 de pH, a mudança na coloração do filme era facilmente perceptível, e que quando submetido a um retorno do pH original do meio a cor do filme também retornava ao padrão. Análises como espectroscopia UV-vis e FTIR foram realizadas, e os autores concluíram que há potencial

de utilização do filme produzido como sensor de pH para aplicações ambientais, preservação de alimentos e outros.

De forma similar ao trabalho de Luo e colaboradores, o potencial de utilização de filmes poliméricos contendo curcumina para embalagens inteligentes e aplicações médicas foi avaliado por Qiao e colaboradores. Neste trabalho, utilizou-se uma matriz de polivinil butiral contendo curcumina. Os filmes foram produzidos via método da evaporação do solvente da seguinte forma: Preparou-se solução de PVB em etanol, e posteriormente a essa solução foi adicionada curcumina numa proporção de 5% em massa em relação ao PVB. Após a obtenção de uma solução homogênea, a solução foi transferida para uma placa de polifluortetraetileno onde foi deixada para secar a uma temperatura de 37°C. Caracterizações como UV-vis, FT-IR, análise termogravimétrica (TGA), teste de tração e medida de ângulo de contato foram realizadas. Visando avaliar a atividade antibacteriana dos filmes contra a *E. Coli*, o método de quantificação de unidades formadoras de colônias foi empregado. Essa metodologia consiste na inoculação bacteriana em meio apropriado, e após crescimento são contadas as colônias formadas (Bhuyan *et al.*, 2023). Através dessa metodologia os autores demonstraram que há atividade antimicrobiana dos filmes produzidos, logo, grande potencial de aplicação para aplicações médicas.

Chen e colaboradores (2021), fabricaram filme contendo o complexo β -ciclodextrina/curcumina (β -CD/Cur) visando inativação fotodinâmica de microrganismos. Primeiramente preparou-se uma solução contendo o complexo β -CD/Cur, e essa solução foi adicionada ao 2,3-dialdeído-celulose (DAC). Essa solução foi posta em um molde de poliestireno e colocada para secar em estufa a 38°C por aproximadamente dois dias. Caracterizações como TGA, solubilidade em água, microscopia eletrônica de varredura, espectro UV-vis, FT-IR, tração, alongamento na ruptura foram realizadas. A micrografia de varredura dos filmes contendo apenas DAC-Cur apresentou agregados de curcumina na superfície devido à rápida evaporação do etanol presente na solução formadora dos filmes. Já os filmes contendo o complexo β -CD/Cur apresentaram uma superfície lisa com ausência de poros. Segundo os autores isso ocorreu devido à formação de ligações cruzadas entre o complexo e a matriz o que propiciou uma distribuição uniforme do complexo na matriz em estudo. A avaliação do potencial de inativação de bactérias foi realizada utilizando *L. monocytogenes*, *V. paraahaemolyticus* e *S. putrefaciens* através da adição de solução contendo cada um dos

microrganismos à superfície do filme. Esse sistema foi, então, exposto à luz azul por intervalos de 10, 20 e 30 min para o *L. monocytogenes*, 20, 40, 60 min para o *V. parahaemolyticus* e *S. putrefaciens*. O potencial antimicrobiano foi determinado a partir da incubação dessa solução e contagem das células sobreviventes em unidades formadoras de colônia. Foi observado o potencial antimicrobiano dos filmes produzidos, além de uma influência da concentração de curcumina no filme e da dose de luz irradiada para a inativação bacteriana.

Roy e Rhim (2020) desenvolveram um filme de PLA contendo curcumina visando analisar as propriedades do material desenvolvido além de avaliar o potencial bactericida do filme contra as espécies *E. coli* e *L. monocytogenes*. Os filmes foram preparados via metodologia de evaporação do solvente utilizando clorofórmio como solvente. Caracterizações como microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, FT-IR, análises térmicas e mecânicas além de permeabilidade ao vapor d'água, medida de ângulo de contato e análise da liberação da curcumina foram realizadas. A análise de liberação da curcumina foi realizada imergindo uma amostra do filme produzido em frasco cônico contendo água destilada a 37 °C por 96 h em agitação. Ao acompanhar o espectro de absorção da solução, foi concluído que após 96 h o filme contendo 1,5% de curcumina liberou aproximadamente 2,8 μgmm^{-2} de curcumina. A atividade antibacteriana dos filmes foi avaliada inoculando a suspensão bacteriana em contato com os filmes por 12 h, e avaliado a quantidade de unidades formadoras de colônias inoculando a suspensão em placas ágar. Foi concluído que a baixa atividade antibacteriana dos filmes ocorreu devido a baixa taxa de liberação de curcumina pelos filmes em meio aquoso, entretanto, o potencial bactericida da curcumina foi validado.

Wang e colaboradores (2022), também estudaram a curcumina em matriz polimérica. Os filmes foram preparados a partir da dissolução da gelatina em água, e posterior adição da quitosana solubilizada em ácido acético. Após a homogeneização dessas soluções, a essa solução foi adicionada a curcumina solubilizada em etanol. Por fim, foi adicionado o glicerol às soluções e os filmes foram obtidos via evaporação do solvente via secagem em placa petri em estufa com circulação de ar a 40 °C por 24 a 35h. Caracterizações como microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica, DRX, FT-IR, teor de umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água foram realizadas. As imagens da microscopia de varredura mostraram que o aumento da concentração de curcumina influenciou no surgimento de pequenas protuberâncias na superfície dos

filmes, embora a solubilidade da curcumina na matriz também fosse determinada. Além disso, a análise de DRX não apresentou os picos característicos da curcumina entre 7 e 30°, o que ocorreu, segundo os autores, devido à baixa concentração de curcumina nos filmes (Wang *et al.*, 2024; Xu *et al.*, 2021). A avaliação do potencial de inativação bacteriana dos filmes foi avaliada com os seguintes microrganismos: *L. monocytogenes*, *E. coli*, e *S. putrefaciens*. A metodologia de avaliação da inativação bacteriana consistiu em expor os filmes com diferentes concentrações de curcumina (0,025; 0,05; 0,1, e 0,2 mM) às soluções contendo cada um dos microrganismos, e posterior exposição à luz azul por 10 min, exceto os filmes contendo 0,1 mM de curcumina, que foram expostos a 30, 50, 70 e 90 min. Após exposição à luz os filmes foram lavados com solução de cloreto de sódio 0,85% m/m por 5 min e quantidade determinada da solução contendo os microrganismos em suspensão era inoculada em placas ágar por 12 a 48 h. Após a incubação a viabilidade celular era determinada a partir da contagem de unidades formadoras de colônia.

Lai e colaboradores (2022), prepararam um filme biodegradável e investigaram a performance antibacteriana. O filme foi preparado solubilizando k-carragenina em água, seguida pela adição de glicerol. A essa solução foi adicionada o complexo curcumina- β -ciclodextrina (Cur- β -CD) e a solução foi seca por 48h a uma temperatura de 24 °C. Caracterizações como microscopia eletrônica de varredura, FT-IR, DRX, permeabilidade ao vapor de água e estabilidade térmica dos filmes foram realizadas. Para baixas concentrações (0,5 e 1,0%) do complexo Cur- β -CD, a microscopia de varredura demonstrou que o complexo estava bem distribuído na superfície rugosa da matriz. Já para maiores concentrações (1,5 e 2,0%), o filme mostrou aglomerados do complexo na superfície, além de maior rugosidade e presença de ranhuras, que podem influenciar nas propriedades mecânicas dos filmes. O potencial antimicrobiano dos filmes foi avaliado nos microrganismos *S. aureus* e *E. Coli*, através da inoculação dos microrganismos no filme e posterior exposição dos filmes à luz azul por 30 min. Os filmes foram mais efetivos na inibição da *S. aureus* quando comparado à inibição da *E. Coli*, e o sistema exposto à luz apresentou maior inibição que o não exposto à luz, mostrando que a luz é fator determinante para a inativação bacteriana.

Também investigando o potencial antimicrobiano, Subbuvel e colaborador (2022), desenvolveram um filme de PLA contendo curcumina e óleo de nim (óleo natural com propriedades de interesse biológico). O filme foi preparado utilizando a metodologia de

evaporação do solvente, utilizando clorofórmio como solvente para o meio. Caracterizações como ressonância magnética nuclear, espectrometria FTIR, permeabilidade ao vapor d'água, análises térmicas e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas. Através de ensaio de difusão em placa ágar os autores confirmaram que há um potencial antimicrobiano dos filmes produzidos. Não foram realizados ensaios expondo os filmes à luz, portanto a aplicação dos filmes na TFD não foi avaliada. Ademais, a avaliação da liberação de curcumina pelos filmes também foi investigada, visando compreensão sobre a difusão da curcumina em meio líquido.

Cai e colaboradores (2022), desenvolveram um filme multicamadas de PCL e gelatina contendo 4% em massa de curcumina em relação ao polímero usando a técnica de solution blow spinning. Análises como DRX, MEV, medida de ângulo de contato e propriedades mecânicas e taxa de liberação de curcumina pelos filmes em meio aquoso foram avaliadas. O potencial antimicrobiano dos filmes foi validado a partir da inibição das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Nesse trabalho os autores concluíram que os filmes foram capazes de liberar a curcumina continuamente no meio por até 312h, e que devido ao potencial antimicrobiano comprovado, e boas características mecânicas dos filmes os mesmos apresentam potencial de utilização para utilização em embalagens de alimentos.

Pedro e colaboradores (2023), desenvolveram um filme adesivo com o biopolímero pululano (polissacarídeo biodegradável) como matriz, contendo curcumina visando aplicação tópica para o tratamento de infecções de pele resistentes (Singh *et al.*, 2023). Os filmes foram preparados utilizando uma solução aquosa contendo betaína (molécula orgânica que auxilia na regulação da pressão osmótica), ácido levulínico e tendo acetona como solvente (Zhou *et al.*, 2012). Para o procedimento de preparo dos filmes a metodologia de evaporação do solvente foi utilizada, onde a solução foi submetida a ambiente ventilado a 40 °C durante a noite. Os filmes produzidos continham 4,4 ugcm⁻² de curcumina e a capacidade antimicrobiana dos filmes foi testada contra *S. aureus*. Caracterizações como espectroscopia UV-vis e FT-IR, análise termogravimétrica, capacidade de absorção de umidade, e teste de tração foram realizados. Após verificação da inativação bacteriana L-histidina e D-manitol foram usados como sondas para detecção de oxigênio singlete e de espécies reativas de oxigênio. Foi constatado que a inibição da *S. aureus* ocorre via geração de oxigênio singlete nos primeiros 15 minutos de exposição a luz, e que nos seguintes 15 minutos outras espécies reativas de oxigênio que contribuem para a inativação microbiana.

Wen e colaboradores (2023) e colaboradores preparam quantum dots de carbono aos quais extrato de curcumina foi incorporado utilizando etanol como solvente. Após a inserção da curcumina, os quantum dots foram adicionados à matriz de quitosana utilizando ácido acético como solvente, e os filmes foram formados via evaporação do solvente em ambiente a uma temperatura de aproximadamente 40 °C por 24 a 48 h. Caracterizações como microscopia eletrônica de varredura, teor de água, solubilidade em água, medida do ângulo de contato, calorimetria exploratória diferencial, e permeabilidade ao vapor d'água foram realizadas. A avaliação do potencial antimicrobiano dos filmes produzidos foi feita utilizando *S. aureus* e *E. coli* como microrganismos de interesse. O método de contagem de unidades formadoras de colônia foi utilizado após exposição dos filmes a uma solução contendo suspensão bacteriana de cada organismo e posterior exposição a luz azul por um período de 20 a 40 min. Além disso a atividade antimicrobiana também foi analisada em pedaços de carne de porco. Nessa análise o filme foi posto em contato com a carne de porco e submetido a irradiação com luz azul por 40min. Novamente o método de contagem da quantidade formadora de colônias foi utilizado. Os autores concluíram que o potencial antibacteriano do filme foi maior na *S. aureus* (bactéria gram positiva) que na *E. coli* (bactéria gram negativa) possivelmente devido a diferenças na estrutura celular desses microrganismos. Já para os ensaios realizados em carne de porco, os autores concluíram que a presença dos filmes nesse material inibiu a proliferação bacteriana, aumentando, portanto, o tempo de preservação do alimento e demonstrando o potencial de aplicação do filme como embalagem inteligente. Além da avaliação da capacidade da atividade antimicrobiana, o rendimento quântico de geração de oxigênio singlete dos filmes foi quantificado utilizando-se 1,3-difenilisobenzofurano como sonda de detecção, e utilizando DMSO como solvente. Os autores concluíram que após a irradiação dos filmes com luz azul houve um rápido decaimento da intensidade de absorção da sonda, indicando, portanto, a capacidade de geração de oxigênio singlete do filme desenvolvido.

Teodoro e colaboradores (2023), desenvolveram um filme de PCL contendo curcumina utilizando a técnica de *solution blow spinning* visando aplicação tópica dos filmes como curativos. Análises como MEV, FTIR, medida de ângulo de contato e ensaios de inibição bacteriana foram realizados. A inibição da *S. aureus* foi avaliada, ainda, via TFD via exposição de ratos previamente infectados com essa bactéria a aplicação tópica dos filmes e exposição à luz. Os autores concluíram que o filme

desenvolvido apresentou potencial de aplicação para o tratamento de feridas pois os filmes apresentaram potencial de inibição da *S. aureus* e *E. coli*. Além disso, devido a capacidade da curcumina em mudar de cor em meios com diferentes pHs, o filme também funcionou como sensor colorimétrico de pH na faixa de 4 a 11, demonstrando dessa forma, a multifuncionalidade do filme desenvolvido.

2.5. Considerações gerais

A partir do exposto, percebe-se o vasto potencial de utilização da curcumina, que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais já relatadas na literatura e que são potencializadas quando associada a exposição à luz em comprimento de onda específico, possibilitando a abordagem de terapia fotodinâmica. Apesar das potencialidades da curcumina, esta é pouco solúvel em meio aquoso, o que reduz significativamente sua biodisponibilidade em água. Visando incrementar a eficiência da abordagem da TFD, há possibilidade de utilizar derivados sintéticos de curcumina, que apresentem maior eficiência quântica de geração de oxigênio singlete. Além disso, são utilizadas estratégias para incrementar a biodisponibilidade dessas moléculas, como desenvolvimento de nanoformulações, impregnação em substratos ou incorporação em filmes finos. Neste contexto, o presente trabalho está centrado na estratégia de desenvolvimento de filmes poliméricos contendo curcumina sintética e derivados na matriz polimérica. Uma vez inseridas nas matrizes poliméricas, essas moléculas fotossensibilizantes podem promover a disponibilização de oxigênio singlete para um meio biológico, na interface sólido-líquido (membrana-organismo). Além disso, a utilização destas moléculas em filmes poliméricos pode ampliar as possibilidades de aplicação de TFD de forma não restrita apenas a aplicações tópicas, além de garantir que não reste resíduo de fotossensibilizador no organismo, incrementando a segurança da aplicação de TFD. Essa abordagem permite vislumbrar futuro desenvolvimento de sonda óptica para aplicação de TFD em órgãos internos.

CAPÍTULO III: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Especificação dos insumos

Foram utilizados como fotossensibilizadores no presente trabalho a curcumina sintética e seus derivados, apresentados a seguir e ilustrados pela Figura 8 quanto suas respectivas estruturas químicas. Estas moléculas, com pureza maior que 95 %, foram fornecidas pela empresa Magtech Soluções em Nanopartículas Magnéticas Ltda.

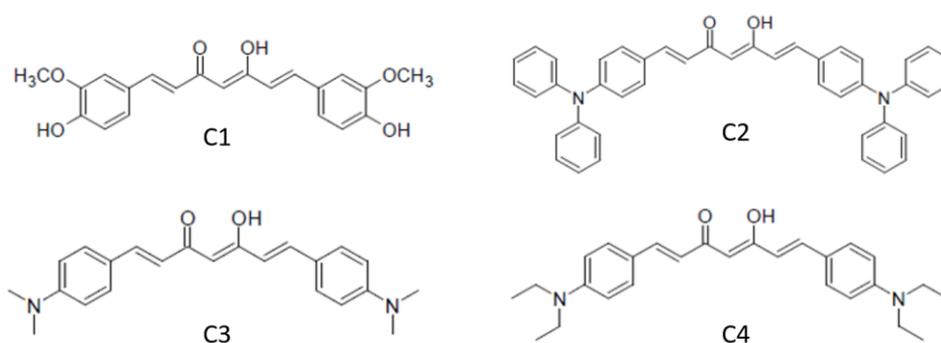
(C1) 5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,4,6-trien-3-ona;

(C2) 1,7-bis(4-(difenilamino)fenil)-5-hidroxi-hepta-1,4,6-trien-3-ona;

(C3) 1,7-bis(4-(dietilamino)fenil)-5-hidroxi-hepta-1,4,6-trien-3-ona;

(C4) 1,7-bis(4-(dimetilamino)fenil)-5-hidroxi-hepta-1,4,6-trien-3-ona.

Figura 8 - Estrutura da curcumina e seus derivados sintéticos utilizados neste trabalho.



Fonte: Autoria própria.

Visando compreender a influência das propriedades da matriz polimérica nas características dos derivados de curcumina em estudo, bem como buscando propriedades passíveis de uso na área médica, diferentes polímeros foram escolhidos como matriz, em

virtude principalmente da diferença de polaridade. Os polímeros utilizados no presente trabalho estão detalhados a seguir:

- (i) PMMA, Sigma-Aldrich,
- (ii) PLA 2003, NatureWorks,
- (iii) PCL, Sigma-Aldrich

Todos os solventes utilizados foram obtidos pela Sigma-Aldrich, com pureza analítica, a saber: álcool etílico (EtOH), acetona, clorofórmio (CHCl₃) e dimetil sulfóxido (DMSO).

Ademais, os reagentes Imidazol, N,N-Dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e pastilhas para preparo de solução tampão fosfato salino (PBS) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) também foram obtidos pela Sigma-Aldrich.

Para os ensaios biológicos, a cepa utilizada da *L. amazonensis* foi a IFLA/BR/1967/PH8, e o meio de cultura utilizado foi o PBHIL (Almeida Rodrigues, De *et al.*, 2010) suplementado com soro fetal bovino (SFB) obtido da LGC Biotecnologia.

3.2. Preparo de soluções curcumina e derivados

Foram preparadas soluções de curcumina e seus derivados em etanol (solvente prótico) e acetona (solvente aprótico), a 100,0 µM. Medidas de absorção foram realizadas logo após o preparo das soluções e três dias após o preparo (as soluções foram guardadas ao abrigo da luz). Após leituras os espectros de absorção obtidos foram normalizados para intensidade 1,0 e avaliados quanto ao perfil e comprimento de onda de máxima absorção.

3.3. Avaliação da precipitação de derivado de curcumina em meio aquoso

Visando analisar a possível formação de precipitados dos fotossensibilizadores em meio aquoso, foram preparadas soluções do derivado de curcumina C4 em DMSO em diferentes concentrações (50,0; 75,0 e 100,0 µM). Sobre as soluções de C4 em DMSO foram vertidas água deionizada em diferentes proporções DMSO:H₂O.

Primeiramente foi feita uma solução-mãe do derivado de curcumina C4 em DMSO, na concentração de 3,0 mM. Após a solubilização completa do C4, com auxílio de agitação manual, foram preparadas as diluições em DMSO nas concentrações de 50,0; 75,0 e 100,0 µM. Posteriormente, estas soluções foram aliqüotadas em placas de acrílico 96 poços e sobre estas foram adicionadas diferentes quantidades de água, garantindo

proporções finais de 5,0; 10,0 e 15,0% de DMSO em relação à água. As misturas DMSO_{C4}:H₂O foram preparadas mantendo-se sempre o mesmo volume dos poços, para garantia de um mesmo caminho óptico para todas as amostras.

A placa foi mantida em repouso por 1h e as soluções foram inspecionadas visualmente e com auxílio de microscópio óptico.

Visando obtenção de informações sobre a distribuição do tamanho de partículas nas soluções, as mesmas soluções preparadas anteriormente foram preparadas em maior volume, de 1,5 mL visando obtenção de volume mínimo para a análise. O tamanho das partículas foi analisado em analisador de tamanho de partícula.

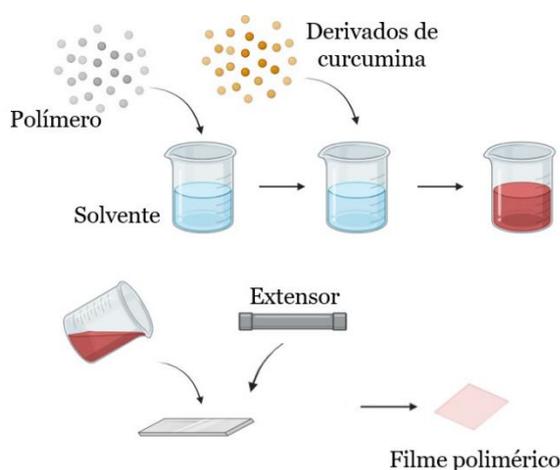
3.4. Preparo dos filmes poliméricos via evaporação do solvente

Os filmes poliméricos foram desenvolvidos utilizando-se a metodologia de evaporação do solvente. Como solvente, foi utilizado o clorofórmio, solvente polar aprótico, para evitar a degradação dos fluoróforos. Os polímeros utilizados foram PMMA, PLA e PCL. E os fotossensibilizadores, dentre os quatro avaliados em solução, o C1 e C4 foram adicionados aos filmes poliméricos.

A primeira etapa de elaboração dos filmes consistiu na produção de solução mãe do fotossensibilizador em clorofórmio. Essa solubilização foi feita sem aquecimento e com agitação manual. Após a obtenção dessa solução, preparou-se a solução polimérica solubilizando quantidade suficiente de polímero em volume de solvente, mantendo-se a proporção de 5,0 % de massa de polímero em relação ao volume total da solução. A solução foi mantida sob agitação magnética para auxílio da solubilização do polímero por tempo aproximado de 30 min. Finalmente, a solução de curcumina (C1) e derivado (C4) foram vertidas sobre a solução polimérica em quantidade suficiente para alcançar a proporção desejada de fotossensibilizador em relação ao polímero. A homogeneização das soluções foi realizada com auxílio de bastão de vidro. Em seguida, a solução polimérica fluorescente foi vertida em uma mesa plana de cerâmica e espalhada com o auxílio de um extensor de 0,4 µm de espessura, resultando na obtenção do filme, como ilustrado no Esquema 2. Este foi deixado para secar em temperatura ambiente, em ambiente sem convecção forçada de ar, para evaporação total do solvente por aproximadamente 3 min, e após esse tempo, o filme foi retirado com auxílio de uma espátula.

Para avaliar a fotoestabilidade dos filmes fluorescentes, foram preparadas soluções poliméricas contendo três concentrações de curcumina e derivados (0,25; 0,50 e 1,00% em massa), além de filmes contendo apenas os polímeros (brancos). Após a remoção do filme da mesa, o mesmo foi recortado com auxílio de ferramenta de corte em discos de aproximadamente 1 cm de diâmetro, e os filmes foram guardados em sacolas zip lock ao abrigo da luz e umidade, para posteriores caracterizações fotofísicas e físico-químicas.

Esquema 3 - Obtenção dos filmes poliméricos contendo curcumina e derivados via evaporação do solvente, com auxílio de extensor



Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.com

3.5. Avaliação da precipitação de derivado de curcumina em filme polimérico

Foram produzidos filmes poliméricos em maiores proporções do derivado de curcumina C4 (1,0; 10, 0; 20,0 e 30,0 % p/p em relação ao polímero. Neste caso, foi utilizado apenas o polímero PMMA, uma vez que este é mais translúcido, característica importante para incremento de eficiência da TFD. A obtenção destes filmes foi realizada para avaliar a possível formação de precipitados do fluoróforo em matriz polimérica. Neste caso, não foi utilizado o extensor e a solução polimérica fluorescente foi vertida diretamente sobre uma lâmina de microscópio óptico, sem ser removida da mesma após secagem, que durou aproximadamente 30 s.

3.6. Caracterizações fotofísicas e físico-químicas

As técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho estão detalhadas nessa seção e o conceito teórico das mesmas está exposto no ANEXO I.

3.6.1. Espectrofotometria de absorção e emissão

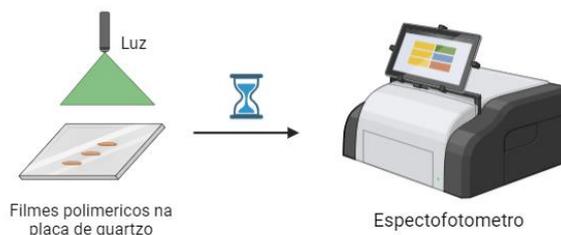
As medidas de espectroscopia de absorção e emissão correlatas ao trabalho foram realizadas no espectrofotômetro SpectraMax® iD3 da Molecular Devices.

Visando compreender perfil de absorção da curcumina sintética e seus derivados e determinar o comprimento de onda de máxima absorção destes nos diferentes solventes especificados na seção 3.2., foram obtidos espectros de absorção UV-vis das soluções no intervalo de 300 a 800 nm, com resolução de 1 nm, dispondo as soluções em placa de acrílico de 96 poços.

A fim de avaliar o perfil de absorção dos filmes poliméricos contendo curcumina (C1) e derivado (C4), em virtude da polaridade dos diferentes polímeros utilizados, foram realizadas leituras de absorção dos filmes no intervalo de 300 a 800 nm, com resolução de 1 nm, dispondo os filmes em placa de quartzo. Os filmes poliméricos contendo C4 também foram inspecionados quanto ao perfil de fluorescência, obtendo os espectros de emissão no intervalo de 510 a 800 nm, com excitação em 480 nm, e resolução de 1 nm, também em placa de quartzo.

Ademais, foi feito ensaio de fotoestabilidade dos filmes produzidos. Os filmes foram submetidos a ensaio de fotobranqueamento dos fotossensibilizadores a partir da exposição dos filmes a luz de diferentes comprimentos de onda. Os filmes foram expostos à luz azul ($\lambda_{ex} = 435$ a 480 nm), verde ($\lambda_{ex} = 500$ a 560 nm) e vermelha ($\lambda_{ex} = 650$ a 750 nm) por um tempo total de 2h. Para exposição à luz, utilizou-se refletor LED RGB com potência de 50 W. Os filmes foram colocados a uma distância de aproximadamente 10 cm do refletor, e o fotobranqueamento foi avaliado a partir de medições da intensidade de absorção dos filmes por espectroscopia de absorção UV-vis no intervalo de 0, 1, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 min. As leituras foram realizadas em varredura de 300 a 800 nm, com resolução de 1 nm dispondo os filmes em placa de quartzo. Tal procedimento está ilustrado no Esquema 4.

Esquema 4 - Ensaio de fotoestabilidade dos filmes poliméricos contendo curcumina sintética e derivados.



Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.com

3.6.2. Microscopia óptica

A microscopia dos precipitados do derivado de curcumina C4 em meio aquoso foi realizada em microscópio trinocular invertido modelo Nib 100, iluminado com lâmpada de halogênio de potência 30 W, lentes com aumento de 40 – 400x.

A técnica de microscopia óptica também foi utilizada para analisar a presença de imperfeições e de cristais na superfície dos filmes poliméricos contendo o derivado de curcumina C4. A microscopia das lâminas foi realizada em microscópio óptico de polarização Leica modelo DM750, iluminado com lâmpada led branca e lentes com aumento de 4 – 100x.

3.6.3. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A distribuição de tamanho das partículas em meio aquoso foi obtida utilizando-se o equipamento Litesizer 500 Anton Paar, visando identificar variações na distribuição de tamanho dos precipitados de curcumina formados, em virtude das diferentes proporções de DMSO:H₂O e teor de curcumina.

3.6.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier na configuração de reflectância total atenuada (ATR) foi utilizada visando identificar as bandas de ligações características entre os fluoróforos sintéticos e os polímeros em estudo. As leituras dos filmes produzidos foram realizadas no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹ com resolução de 2 cm⁻¹ em equipamento da marca Shimadzu, modelo IRTracer-100, com acessório QATR 10.

3.6.5. Difração de raios-X (DRX)

Neste trabalho utilizou-se a técnica de DRX visando avaliar a existência de domínios cristalinos nos filmes poliméricos em decorrência da presença do derivado de curcumina C4. Após o preparo dos filmes como descrito na seção 3.4., os discos de aproximadamente 1 cm de diâmetro foram utilizados para a investigação da cristalinidade do material. O difratômetro de raios-X utilizado foi do modelo Empryean. A técnica não necessitou de nenhum preparo da amostra, consistindo apenas na fixação dos filmes produzidos no porta amostra.

3.6.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Neste trabalho a técnica de MEV foi utilizada para avaliar a formação de precipitados/cristais do derivado de curcumina C4 no filme polimérico de PMMA. Foram preparados filmes com diferentes concentrações de C4, como descrito na seção 3.5. Após preparo das lâminas, as amostras foram metalizadas com ouro em metalizadora modelo Emitech K550X. O processo de metalização consistiu no recobrimento das amostras com um filme de espessura aproximada de 20 nm utilizando a técnica de magnetron sputtering. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em equipamento modelo Jeol 7100FT.

3.7. Determinação da geração de oxigênio singlete.

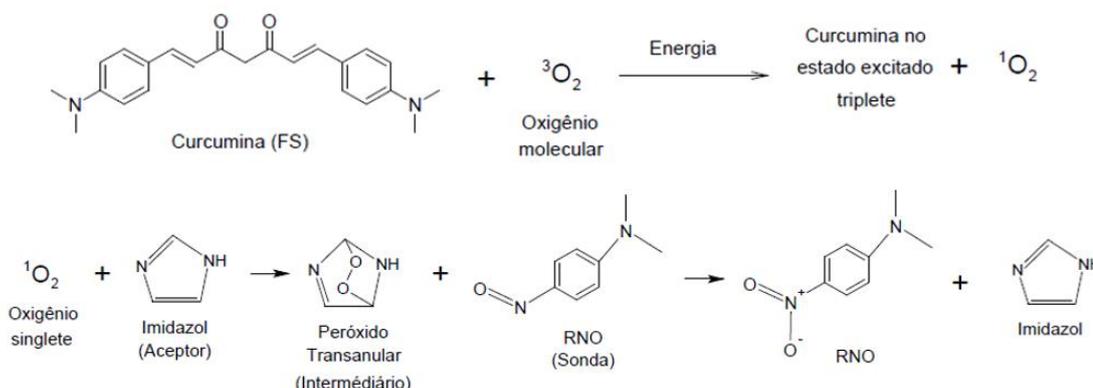
Conforme discutido na revisão da literatura, há poucas sondas químicas específicas para a detecção de oxigênio singlete em meio aquoso. Neste trabalho, busca-se avaliar o potencial de filmes poliméricos, contendo derivados de curcumina solúveis em solventes orgânicos, na geração de oxigênio singlete. Para garantir que o material desenvolvido mantenha sua estrutura intacta, é essencial o uso de uma sonda química solúvel em meio aquoso. Além disso, é importante ser possível detectar a geração de oxigênio singlete em meio aquoso, mesmo o tempo de meia vida deste em água sendo muito rápido, pois será mais fidedigno à condição biológica, considerando a aplicação terapêutica. Neste contexto, e considerando as opções de sondas específicas para detecção de oxigênio singlete apresentadas na seção 2.1.4, foi utilizada a sonda N,N-Dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) neste trabalho.

A detecção da presença do oxigênio singlete pelo RNO tem como fundamento o decaimento do máximo de absorção dessa espécie em presença de uma molécula

intermediária, peróxido transanular, formada a partir da reação do Imidazol com o oxigênio singlete. O

Esquema 5 demonstra o mecanismo envolvido na quantificação de oxigênio singlete, considerando a curcumina como fotossensibilizador. Essa metodologia foi adaptada de Kraljić, (1978), onde os FSs utilizados no estudo foram a eosina, fenosafranina e tionina, corantes já conhecidos na literatura pela capacidade de geração de oxigênio singlete.

Esquema 5 - Geração de oxigênio singlete através da curcumina sintética como FS e oxidação do RNO



Fonte: Adaptado de Kraljić, (1978).

Primeiramente fez-se a validação da metodologia exposta por Kraljić (1978). Foi desenvolvida uma curva de calibração do RNO em PBS (10 mM). Foram preparadas soluções de 10 a 100 μM de RNO em PBS, e o espectro de absorção das soluções foi obtido utilizando o espectrofotômetro SpectraMax® iD3 no intervalo de 230 a 900 nm com resolução de 10 nm. O preparo da curva de calibração teve como objetivo determinar a concentração de RNO a ser utilizada nos experimentos seguintes visando uma boa sensibilidade do método.

Após a elaboração da curva de calibração e determinação da concentração de RNO a ser utilizada nos experimentos subsequentes, fez-se análise da influência da presença do Imidazol (Imd) no espectro do RNO. Mantendo-se a proporção molar de 1 mol de RNO

para 1 mol de Imd. Foram preparadas soluções de concentrações variadas de 10 a 100 μM de RNO e 10 a 100 μM de Imd. O espectro de absorção das soluções foi obtido a partir da varredura absorção em espectrofotômetro no intervalo de 230 a 900 nm com resolução de 10 nm utilizando o espectrofotômetro SpectraMax® iD3.

O terceiro experimento visou validar o decaimento do máximo de absorção do RNO em virtude da presença oxigênio singlete. A metodologia foi analisada inicialmente utilizando o azul de metileno como elemento fotossensibilizante devido à capacidade de solubilização do azul de metileno em soluções aquosas, e ao fato de ser estabelecido na literatura a elevada capacidade de geração de oxigênio singlete por esta espécie. Para tal experimento, primeiramente foi avaliado a degradação do AM em solução PBS visando verificar a estabilidade do FS. De forma similar a curva de calibração, foram preparadas soluções de AM em PBS nas concentrações de 10 a 100 μM , e o espectro de absorção das soluções foi obtido utilizando o espectrofotômetro SpectraMax® iD3 no intervalo de 230 a 900 nm com resolução de 10 nm. Após acompanhamento da estabilidade do AM, foi preparada solução contendo RNO e azul de metileno em PBS nas concentrações equimolares de 50 μM , e o decaimento do máximo de absorção do RNO foi acompanhado, novamente, utilizando-se espectrofotômetro SpectraMax® iD3 no intervalo de 230 a 900 nm com resolução de 10 nm.

Além disso, foi avaliada a especificidade do RNO em detectar oxigênio singlete, e não espécies reativas de oxigênios (EROs) em geral. Para tal, foi preparada solução contendo RNO, Imd e H_2O_2 em PBS nas concentrações equimolares de 50 μM , e o decaimento do máximo de absorção do RNO foi acompanhado, novamente, utilizando-se espectrofotômetro SpectraMax® iD3 no intervalo de 230 a 900 nm com resolução de 10 nm.

Finalmente, foi avaliada a capacidade do filme de PMMA contendo o derivado sintético de curcumina C4 em liberar oxigênio singlete. Para tal, foram preparados filmes de PMMA_C4, com teor de 5,0 % em massa do polímero em relação ao volume total de solvente e 20,0 % em massa de C4 em relação a massa de PMMA, via evaporação do solvente em tubos de ensaio. A solução polimérica contendo o derivado de curcumina foi preparada de forma similar a descrita em 3.4. Entretanto, os filmes não foram preparados com auxílio do extensor, e sim diretamente no interior do tubo de ensaio onde ficou aderido. Para o preparo dos filmes, 200 μL da solução polimérica fluorescente preparada

previamente foram transferidos para tubos de ensaio de 10 mL, e a parede dos tubos de ensaio foram cobertas até aproximadamente 70% da altura do tubo. Movimentos circulares foram realizados com a solução dentro dos tubos de ensaio visando manutenção a uniformidade da espessura do filme durante a evaporação do solvente. Após o estabelecimento de uma película de filme de PMMA contendo o derivado de curcumina C4 nos tubos de ensaio, foi adicionada solução de RNO e Imd nas concentrações de 50 μ M, preparados em PBS. Os tubos foram expostos à luz verde por tempo total de 60 min, e o espectro de absorção do RNO foi obtido, no intervalo de 230 a 900 nm, recolhendo diferentes alíquotas ao longo do tempo de ensaio.

3.8. Ensaios biológicos

Como explanado na revisão da literatura, diversos estudos já validaram o potencial bactericida da curcumina em microrganismos como *E. Coli*, *S. aureus* e *S. putrefaciens*, por exemplo. Neste trabalho, o potencial antimicrobiano do derivado sintético C4 foi avaliado em modelo biológico do protozoário unicelular *L. amazonensis*. Os ensaios biológicos foram realizados em parceria com o Laboratório de Investigação de Substâncias Bioativas (LISbio) da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

3.8.1. Inoculação da *L. amazonensis*

As promastigotas da *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foram inoculadas em meio PBHIL suplementado com 10% de SFB a 26°C por 4 dias, visando obtenção do parasita na fase log tardia. Os protozoários foram, então, transferidos juntamente com o meio de cultura em concentração adequada para os ensaios de citotoxicidade do derivado de curcumina livre (seção 3.8.2) e do derivado de curcumina no filme polimérico de PMMA (seção 3.8.3).

3.8.2. Citotoxicidade do derivado de curcumina livre

Visando analisar o potencial de utilização do derivado de curcumina C4 livre, verificou-se o potencial de inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* através da técnica de diluição seriada em placas de 96 poços. Primeiramente foram preparadas as soluções de C4 em DMSO nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 μ g/mL. Já a solução de promastigotas de *L. amazonensis* foi preparada na concentração de 10^6 μ g de promastigotas/mL, de através da diluição seriada da cultura original. O experimento foi dividido em três placas:

Grupo 1 – Controle negativo. Placa (1) com parasitos em contato com o derivado de curcumina sem exposição à luz verde e (2) sem parasitos, com solução do derivado de curcumina e sem exposição à luz verde.

Grupo 2 – Aplicação da TFD. Placa contendo parasitos em contato com o derivado de curcumina e exposição a luz.

Grupo 3 – Controle positivo de viabilidade (100%). Placa contendo parasitos não tratados (sem contato com o derivado de curcumina) e sem exposição à luz verde.

Para o grupo 2, aos poços de uma placa de 96 poços foram adicionados a suspensão de promastigotas na concentração de 10^6 µg de promastigotas/mL, e a placa foi irradiada por um período de 60 s com luz no comprimento de onda verde a uma distância aproximada de 5 cm da fonte, totalizando uma dose de luz de $27,53 \text{ Jcm}^{-2}$.

Em todas as placas, normalizou-se para 1% a concentração final de DMSO.

Após tratamento da placa com luz, a incubação *in vitro* dos parasitos ocorreu por 48h a 28°C. O indicador de viabilidade resazurina (100 µM) foi adicionado aos poços 24 h antes do fim do tratamento. E, por fim, visando verificar a viabilidade celular das promastigotas, fez-se leitura do espectro de fluorescência em 555/585 nm (excitação/emissão) e calculou-se a porcentagem de viabilidade das espécies submetidas a cada tratamento comparando-se com dados do controle positivo que representam 100% de viabilidade.

3.8.3. Citotoxicidade do derivado de curcumina em matriz polimérica

Para avaliação do potencial antiprotozoário do derivado C4 em matriz polimérica, foram utilizados tubos de ensaio revestidos com filme polimérico de PMMA contendo 20,0% em massa de C4, como descrito na seção 3.7. Para o ensaio biológico, os tubos de ensaio recobertos com filme polimérico contendo o fotossensibilizador foram preparados em condições de esterilidade. Os tubos de ensaio utilizados foram previamente esterilizados em autoclave (Stermax Extra, Stermax) a 121 °C e 1 atm por 20 min e o procedimento de revestimento dos tubos de ensaio com polímero fluorescente foi realizado em capela de fluxo laminar. Assim foi garantida a manutenção da esterilidade do meio durante ensaio de viabilidade da *L. amazonensis*.

Aos tubos de ensaio, foram adicionadas suspensão de promastigotas de concentração de 10^6 promastigotas/mL obtidas a partir da inoculação inicial. O tempo de pré-irradiação foi de aproximadamente 30 s, e os tubos contendo os filmes contendo o derivado C4 foram irradiados por 60 s com luz verde, o que correspondeu a uma dose total de luz de $27,53 \text{ J/cm}^2$. A distância da fonte de luz para os tubos de ensaio foi de aproximadamente 5 cm.

Os grupos existentes nesse ensaio foram:

Grupo 1 – Controle negativo. Tubo de ensaio revestido com PMMA_C4, contendo parasitos sem exposição à luz verde.

Grupo 2 – Aplicação da TFD. Tubo de ensaio revestido com PMMA_C4, contendo parasitos e exposição à luz verde.

Grupo 3 – Controle positivo de viabilidade (100%). Tubo de ensaio revestido apenas com PMMA, contendo parasitos, e sem exposição à luz verde.

Para ambos os ensaios biológicos, a análise estatística foi realizada usando Two-Way ANOVA para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dentro da mesma coluna, indicadas por letras diferentes.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

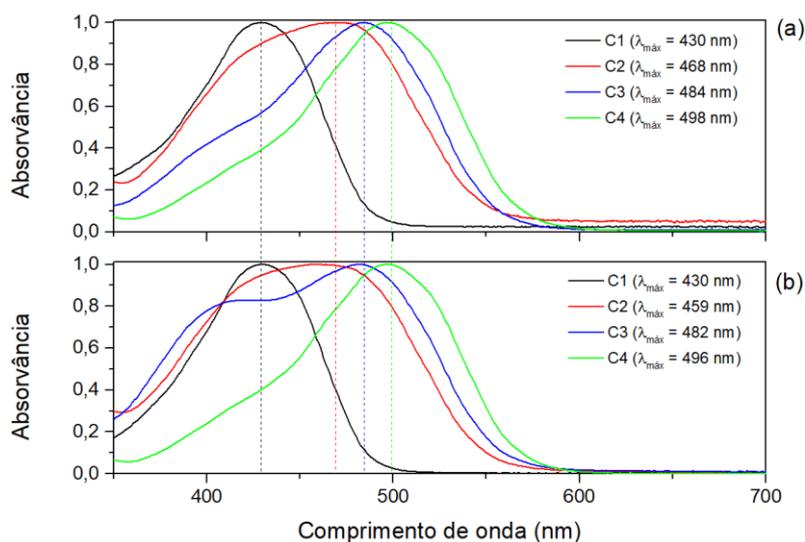
Neste capítulo os resultados obtidos serão confrontados com dados da literatura. Primeiramente será avaliada a fotoestabilidade da curcumina sintética e seus derivados (C1, C2, C3 E C4) de forma livre em solução. Também será avaliada a tendência a precipitação do derivado de curcumina C4 em partição DMSO:H₂O, mimetizando condições de ensaios biológicos. Em seguida serão apresentados os filmes poliméricos fluorescentes obtidos e suas caracterizações fotofísicas e físico-químicas, além da avaliação de fotoestabilidade dos filmes contendo os fotossensibilizadores e a tendência de formação de precipitados//cristais do fotossensibilizador na matriz polimérica. Também será avaliada, em ensaio físico-químico, a capacidade de geração de oxigênio singlete do derivado de curcumina C4 livre e em matriz polimérica de PMMA. Por fim, a TFD intermediada pelo C4, livre e em PMMA, será validada em ensaio biológico de inibição do crescimento do protozoário *L. amazonensis*.

4.1. Avaliação da curcumina e derivados

4.1.1. Estabilidade dos derivados de curcumina em solução

A fotoestabilidade da curcumina e de seus derivados em solução é influenciada pelo pH, tipo de solvente (prótico ou aprótico, polar ou apolar), exposição à luz, e até mesmo temperatura do meio (Kharat *et al.*, 2017; Mondal, Ghosh e Moulik, 2016). Visando avaliar a influência de diferentes tipos de solvente na estabilidade da curcumina e seus derivados, bem como verificar possíveis deslocamentos no espectro de absorção, foram preparadas soluções contendo curcumina sintética e seus derivados em meio polar prótico (etanol) e polar aprótico (acetona). Os espectros de absorção de tais soluções foram obtidos via espectrofotometria UV-vis e estão apresentados Figuras 9 e 10.

Figura 9 - Espectros de absorção das soluções de derivados de curcumina em etanol no dia do preparo (a), e três dias após o preparo (b). Dados normalizados em intensidade de sinal.



Fonte: Autoria própria.

A cúrcuma (C1) possui um largo espectro de absorção no intervalo de 300 a 500 nm devido à presença de grupamentos fenólicos. Em relação a estabilidade da C1 em solução, tanto para o dia 0 quanto para o dia 3, o máximo de intensidade da absorção foi de 430 nm, o que é próximo de valores da literatura que exibem máximo de absorção de 425 nm em etanol, demonstrando que o composto não degradou com o tempo (França, de, 2022; Kim *et al.*, 2013).

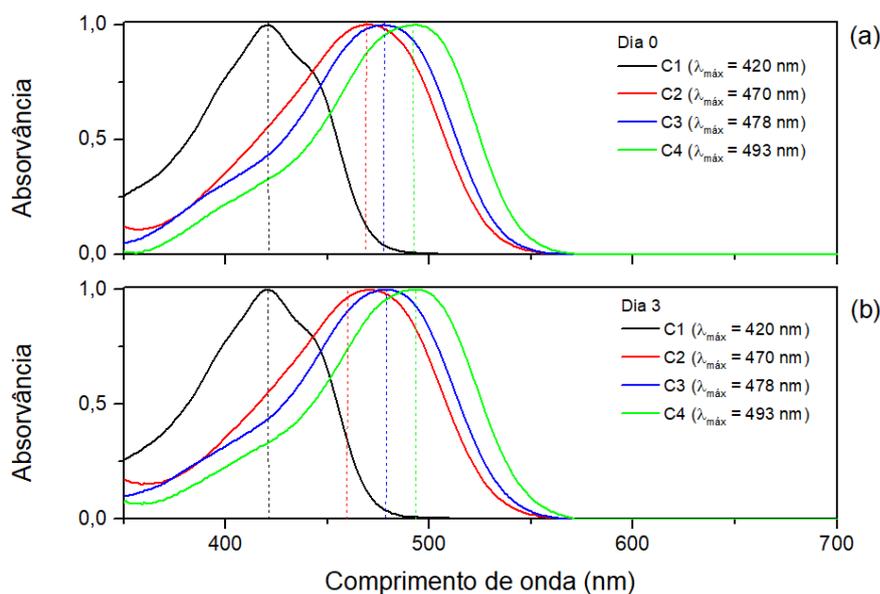
Por sua vez, os compostos C2 e C4, apresentam um irrelevante deslocamento no λ_{max} de absorção de aproximadamente, pois para o C2 o comprimento máximo de absorção passou de 468 para 459 nm. Já o C4, o comprimento máximo de absorção passou de 498 para 496 nm. Pode-se afirmar que tais compostos, de forma similar à C1 também apresentam estabilidade na solução e não degradaram com o tempo. Ademais, os máximos de absorção ficaram próximo de valores de referência na literatura, sendo de 465 e 492 nm, respectivamente (França, de, 2022).

Diferentemente da curcumina e seus derivados, o C3 apresentou o surgimento de um ombro em aproximadamente 400 nm três dias após o preparo da solução, indicativo de fotoinstabilidade. Na literatura não há relatos sobre o espectro de absorção desse composto nos solventes aqui estudados. Entretanto, sabe-se que em DMSO, solvente

aprótico polar, esse composto apresenta máximo de absorção em 512 nm, valor relativamente próximo ao máximo encontrado para ambos os solventes em estudo (Deus, De *et al.*, 2021).

Diferentemente de quando solubilizados em etanol, a curcumina e seus derivados sintéticos quando solubilizados em acetona tanto no dia quanto três dias após o preparo não apresentaram nenhuma diferença no comprimento máximo de absorção como mostra a Figura 10. Ademais, todos os compostos se comportaram de forma estável e não apresentaram o surgimento de novas bandas de absorção. Ademais, os máximos de absorção dos compostos C1, C2 e C4 condizem com resultados existentes na literatura, onde o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção é de 420, 467 e 492 nm em acetona (França, de, 2022). Na literatura, não há relatos do $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do derivado C3 em acetona, apenas em DMSO, que corresponde a 497 nm (Deus, De *et al.*, 2021).

Figura 10 - Espectros de absorção normalizados das soluções de derivados de curcumina em acetona no dia do preparo (a), e três dias após o preparo (b).



Fonte: Autoria própria.

Vale ressaltar que a curcumina e seus derivados apresentam tendência a fotoinstabilidade em solventes próticos (como é o caso do etanol), dado o equilíbrio ceto-enol dessas moléculas (Kazakova, Lipkovska e Barvinchenko, 2022). Portanto, para

garantir maior estabilidade dessas moléculas em solução é importante a utilização de um solvente aprótico, como demonstrada a manutenção de fotoestabilidade em acetona.

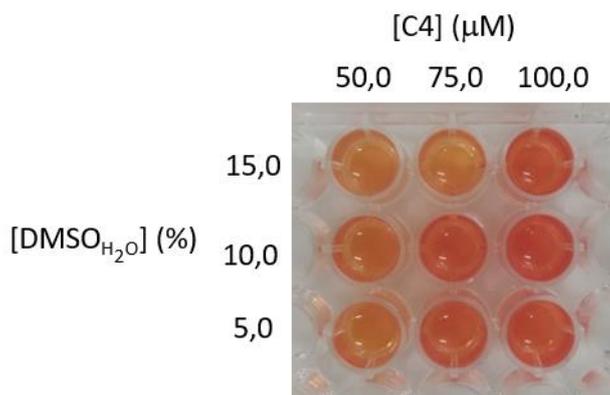
De forma semelhante à acetona, o clorofórmio é um solvente polar aprótico, e é capaz de solubilizar tanto a curcumina e seus derivados quanto os polímeros em estudo. Desta forma, o clorofórmio foi escolhido para ser utilizado como solvente para a elaboração dos filmes poliméricos fluorescentes, pois favorece a estabilidade fotofísica da curcumina e seus derivados, além de garantir a solubilização dos polímeros.

4.1.2. Precipitação da curcumina em meio aquoso

A curcumina é pouco solúvel em meio aquoso, levando à formação de precipitados em concentrações superiores à saturação, reduzindo sua biodisponibilidade. A presença de cristais de curcumina em meio aquoso não é um fator comumente analisado em trabalhos que envolvem o potencial de utilização da curcumina como elemento antimicrobiano, como exemplificado pela revisão da literatura. Entretanto, tal análise se faz necessária para uma avaliação da competição da geração de EROs versus potencial de biodisponibilidade do derivado no microrganismo. Sabe-se que o potencial antimicrobiano da curcumina envolve a sua biodisponibilidade, desta forma, a formação de precipitados de curcumina (e derivados) reduz sua biodisponibilidade, pois não estando solúvel, apenas as moléculas presentes na superfície do cristal estarão bioativas. Desta forma, a avaliação da precipitação de cristais de derivados de curcumina em solução se faz necessária para compreensão dos mecanismos de inativação de microrganismos.

Neste contexto, foi avaliada a tendência de formação de precipitados/cristais do derivado de curcumina C4, variando a concentração do fotossensibilizador e o teor de DMSO em relação a água, como descrito na seção 3.3. A Figura 11 apresenta a inspeção visual do ensaio, apresentando turvação nos poços, como indício de formação de precipitados. No entanto, foi necessária uma inspeção mais detalhada por microscopia óptica para confirmar tal precipitação.

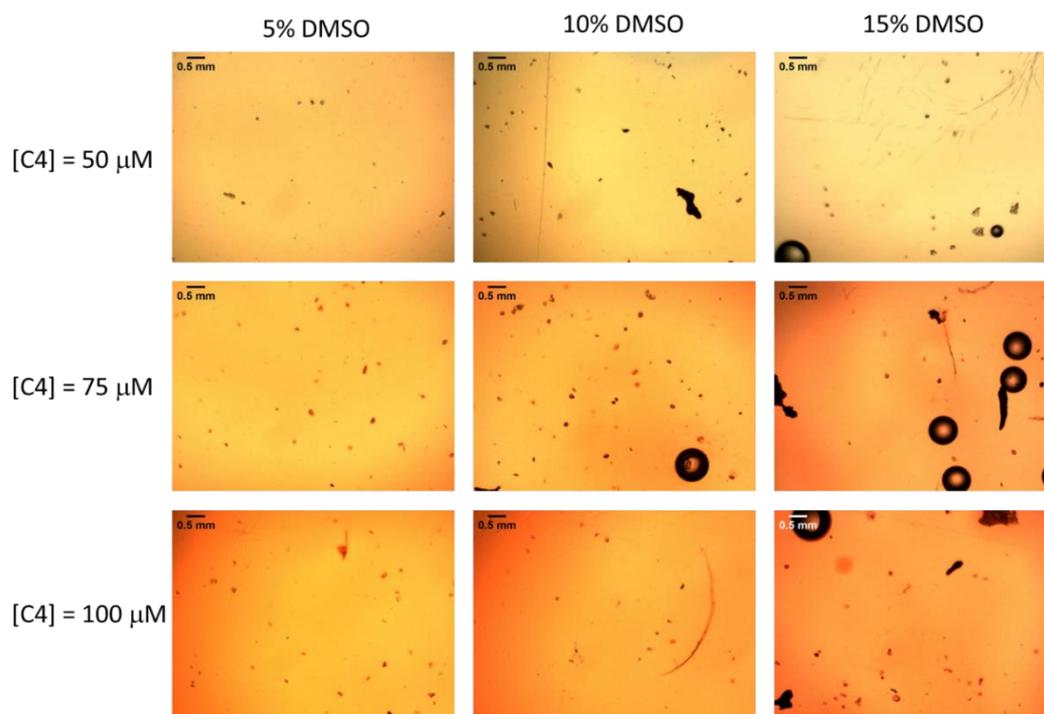
Figura 11 – Inspeção visual da formação de precipitados do derivado de curcumina C4, em função da concentração do fotossensibilizador e teor de DMSO em relação a água.



Fonte: Autoria própria.

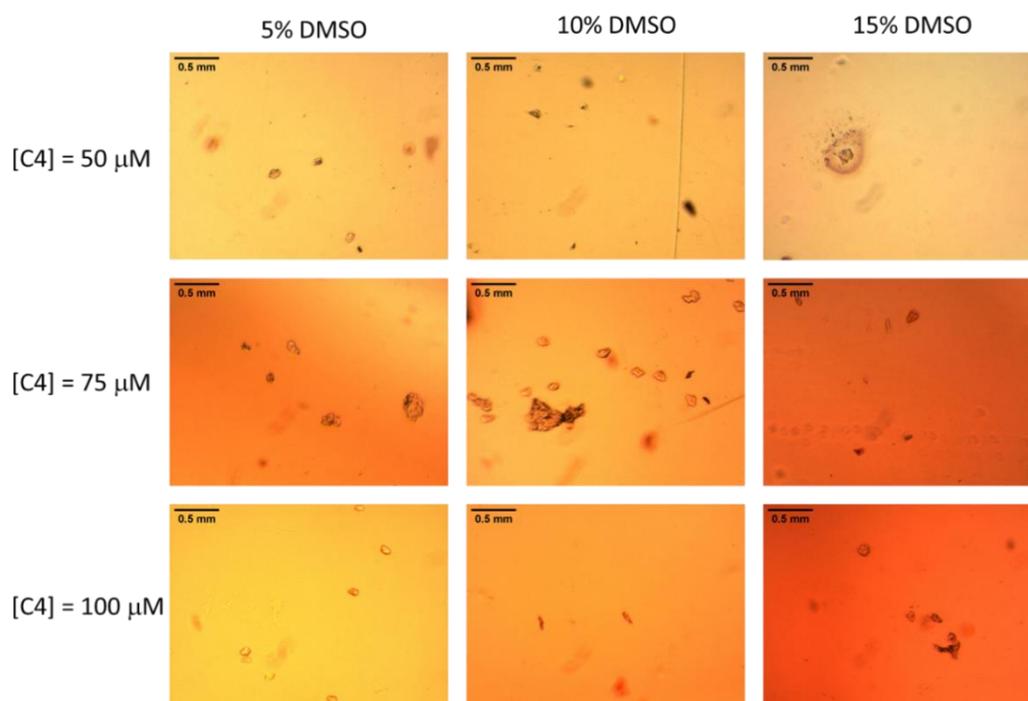
A microscopia óptica é um método qualitativo que pode ser utilizado para avaliar a presença de cristais, em ordem de grandeza de micrômetros, em solução. A análise das misturas de C4/DMSO/H₂O por microscopia óptica (Figuras 12 e 13) permitiu confirmar a existência de cristais em meio aquoso, com tamanho micrométrico e submicrométrico. Foi detectada a presença de cristais de tamanhos distintos em todas as soluções, com dimensão inferior a 100 μm . Foram identificados cristais na borda de bolhas de ar na solução, e internos às bolhas, demonstrando a tendência a precipitação na interface líquido-gás. Não foi observada correlação entre o tamanho do precipitado em relação a concentração de C4 e o teor de DMSO, o que pode estar relacionado a limitação da técnica. Assim, visando compreender com maior precisão a dimensão dos precipitados formados em meio aquoso, foi empregada a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para determinar a distribuição de tamanho de partículas.

Figura 12 - Microscopia óptica da solução de C4 em DMSO com aumento de 4x



Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Microscopia óptica da solução de C4 em DMSO com aumento de 10x



Fonte: Autoria própria.

A distribuição de diâmetro hidrodinâmico das partículas em meio aquoso é apresentada na Figura 14 e os diâmetros hidrodinâmicos médios dos cristalitos formados em cada condição estão sumarizados na Figura 15. Foi observado a concentração de curcumina (C4) não apresentou uma influência no crescimento dos cristais na faixa de concentração avaliada. Já as diferentes proporções de DMSO em água influenciaram de maneira diretamente proporcional no tamanho dos precipitados formados. Esta dinâmica pode ser explicada pelo aumento da solubilidade da curcumina vinculado ao aumento do teor de DMSO no meio, de forma que a formação de pontos de nucleação é dificultada tendendo a formar menor quantidade de cristais com maior tamanho. Em oposição, com menor teor de DMSO a precipitação é facilitada, tendendo a formar maior número de precipitados com menor tamanho, dada a indução de uma precipitação acelerada (Jikazana *et al.*, 2025)

O tamanho médio do diâmetro hidrodinâmico das partículas formadas variou entre 200 e 500 nm, com as menores partículas sendo observadas no cenário de menor concentração de curcumina e menor teor de DMSO. Vale destacar que a distribuição de tamanhos da solução contendo 100 μM de C4 e 15% DMSO:H₂O não apresentou boa reprodutibilidade devido a uma provável aglomeração das partículas em solução.

Figura 14 - Distribuição do tamanho hidrodinâmico das partículas de C4 solubilizadas em DMSO em diferentes proporções. Primeira leitura em verde; segunda leitura em amarelo e terceira leitura em vermelho.

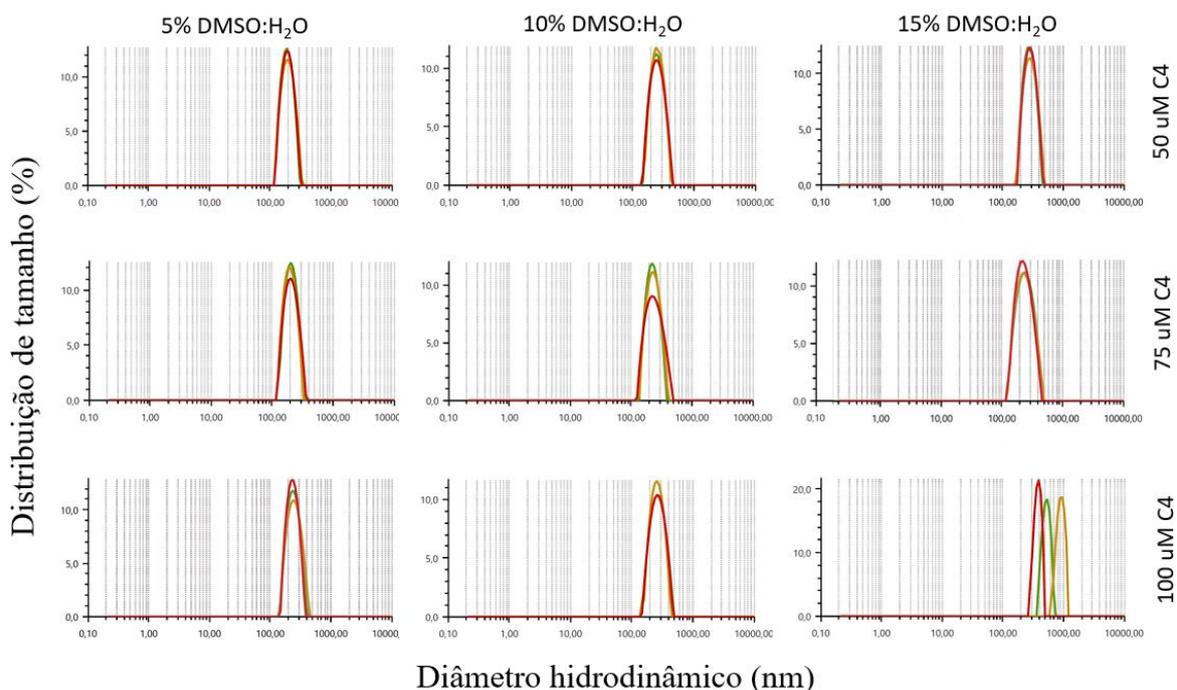
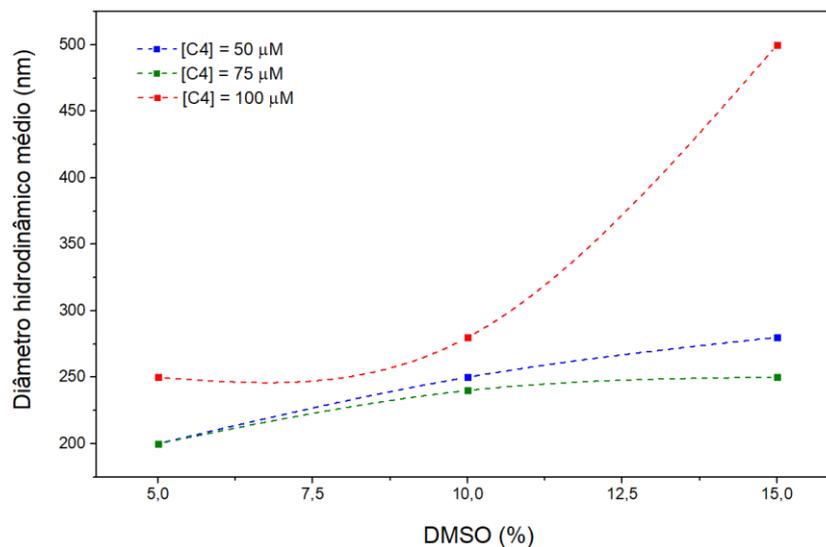


Figura 15 - Diâmetros hidrodinâmicos médios em meios aquosos com diferentes proporções de DMSO:H₂O e concentrações de curcumina (C4)



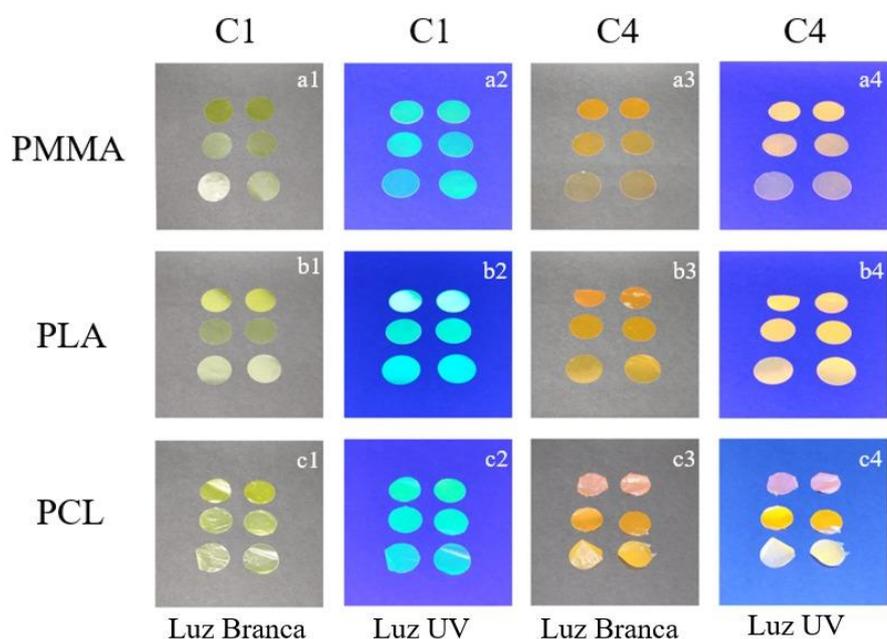
A presença de cristais em solução pode ser indício de que nos filmes poliméricos ocorra a precipitação do derivado de curcumina na superfície da matriz polimérica, não estando a molécula totalmente dispersa na matriz polimérica. Isto pode influenciar na geração de oxigênio singlete, pois se a curcumina estiver dispersa de forma molecular no filme polimérico o fotossensibilizador estará disponível de forma homogênea na interface polímero-meio, mas se a curcumina precipitar no interior ou na superfície do filme polimérico a disponibilidade da biomolécula será alterada. Estes cenários impactam diretamente no potencial de geração de oxigênio singlete, pois influencia a interação da molécula fotossensibilizante com o oxigênio do meio. Assim, é importante entender como a curcumina (ou derivado) estará disposta na matriz polimérica, quando contido nos filmes. Esta condição será explorada na seção 4.2.3.

4.2. Filmes poliméricos contendo derivados de curcumina

A análise inicial macroscópica dos filmes preparados, exemplificados pela Figura 16, destacou diferenças características de cada material. Para as concentrações iniciais de 0,25; 0,5 e 1,0%, os filmes poliméricos de PMMA mostraram-se rígidos e com aspecto brilhante, entretanto 30 dias após o preparo os filmes ficaram quebradiços. Imediatamente após o preparo, os filmes tendo PLA como matriz demonstraram-se brilhantes e quebradiços ao toque, características que foram mantidas após 30 dias. Por fim, os filmes preparados com PCL, demonstraram características elásticas e de forma semelhante aos

filmes de PLA, apresentaram aspecto brilhante, entretanto opaco à luz quando comparado aos demais filmes. Portanto, considerando a importância da integridade do filme polimérico e a necessidade do material ser translúcido, para favorecer a interação com a luz na TFD, o filme de PMMA será investigado em maior detalhe, principalmente na validação da TFD (seção 4.3).

Figura 16 - Filmes contendo C1 e C4 (nas concentrações de 1,0; 0,5 e 0,25% p/p) expostos a luz branca e UV.



Fonte: Autoria própria.

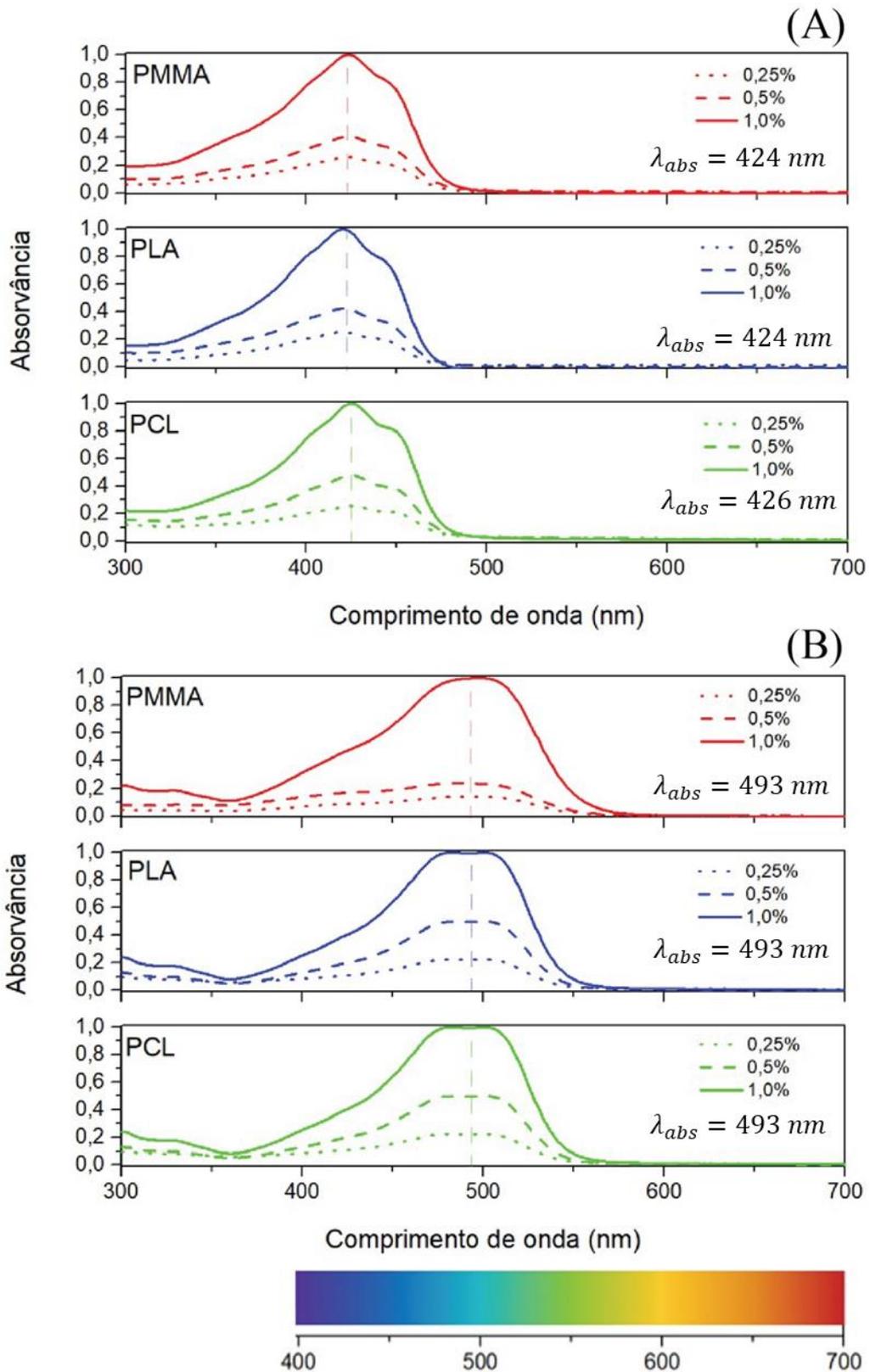
4.2.1. Fotoestabilidade dos filmes poliméricos contendo curcumina e derivado

Os filmes contendo C1 e C4 foram avaliados segundo a fotoestabilidade pela exposição a luz em diferentes comprimentos de onda como descrito na seção 3.5. Primeiramente, foram avaliados os espectros de absorção, mostrados pela Figura 17, visando obter informações sobre o comprimento de onda onde há o máximo de absorção de cada material, e verificar possíveis desvios no espectro devido à diferente polaridade das matrizes.

A investigação dos espectros de absorção (Figura 17) permite afirmar que a polaridade dos polímeros não provocou alterações nos espectros do C1 e C4, nas

diferentes matrizes poliméricas. Além disso, analisando os espectros de absorção das matrizes poliméricas contendo C1, foi observado absorção máxima em 425 nm, com sinal de absorção detectado nos comprimentos de onda na faixa de 300 a 490 nm. De forma similar, as matrizes poliméricas contendo C4 apresentam absorção máxima em 493 nm, com sinal de absorção detectado nos comprimentos de onda na faixa de 360 a 560 nm. Assim a curcumina sintética (C1) e seu derivado (C4) mantiveram a coloração similar a apresentada em solução (como demonstrado na seção 4.1.1).

Figura 17 – Espectros de absorção dos filmes poliméricos contendo diferentes proporções de C1 (A) e C4 (B). Filmes de PMMA, em vermelho, de PLA, em azul e de PCL, em verde.

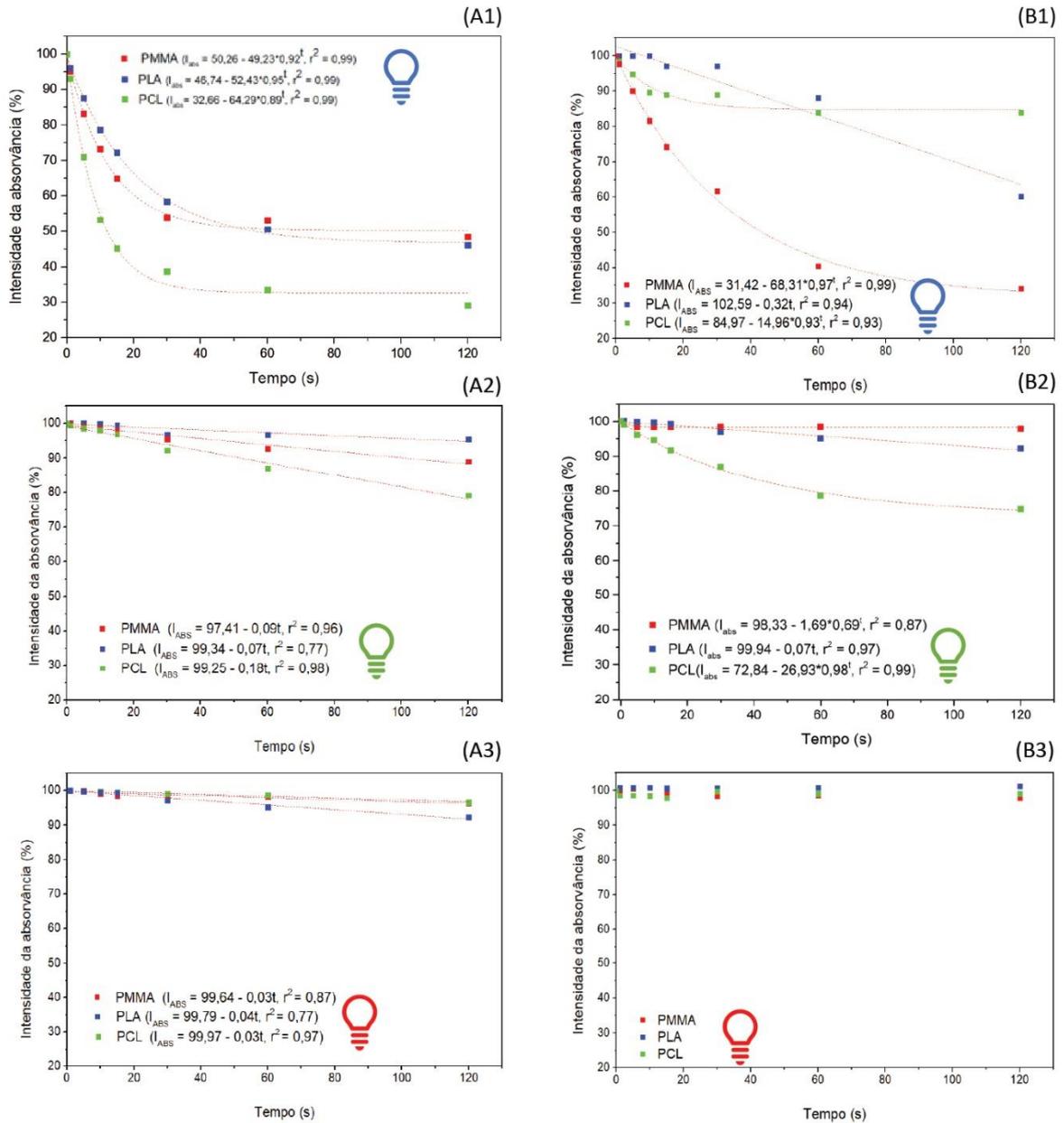


Fonte: Autoria própria. Adaptado com BioRender.com

Um bom cromóforo deve ser estável perante a excitação no comprimento de onda de sua maior absorção (Zheng e Lavis, 2017). Para avaliar se há degradação do composto fotossensibilizante no comprimento de onda de maior absorção do material, se faz necessária a análise da estabilidade fotofísica do filme polimérico fluorescente exposto a uma fonte luminosa (excitação) correspondente a este comprimento de onda. Neste contexto, e avaliando a Figura 17, os filmes poliméricos contendo C1 foram avaliados quanto a estabilidade fotofísica expostos à luz azul (excitação em 435 a 480 nm, vide I.1). De forma similar, a análise da estabilidade fotofísica dos filmes poliméricos contendo C4 deve ser feita em exposição à luz verde/azul (excitação em 435 a 560 nm, vide I.1). Tal estudo de estabilidade fotofísica dos filmes poliméricos (de PMMA, PLA e PCL) contendo curcumina sintética e derivado (C1 e C4) foi realizado expondo os materiais a luzes azul, verde e vermelha, com auxílio de refletor, como especificado na seção 3.6.1. Os respectivos perfis de decaimento de intensidade de máxima absorção dos fluoróforos nas diferentes matrizes poliméricas quando expostos a luz com diferentes comprimentos de onda (azul, verde e vermelho) estão apresentados na Figura 16 e os respectivos percentuais de decaimento correspondentes a 2h de exposição as luzes estão sumarizados na Tabela 6.

Vale ressaltar que a intensidade de máxima absorção do C1 nas três matrizes poliméricas é por volta de 425 nm, que corresponde ao comprimento de onda da luz azul. Assim, espera-se maior eficiência de geração de oxigênio singlete expondo à luz azul os filmes poliméricos contendo C1. De forma similar a intensidade máxima de absorção do C4 nas matrizes poliméricas é por volta de 495 nm, e se espera maior eficiência de geração de oxigênio singlete expondo à luz verde os filmes poliméricos contendo C4. Isto porque a geração de oxigênio singlete é diretamente proporcional a excitação na intensidade de maior absorção do fotossensibilizador (Oskolkova *et al.*, 2023).

Figura 18 - Decaimento da intensidade de absorção de filmes poliméricos contendo C1 (A) e C4 (B) exposto às luzes (1) azul, (2) verde e (3) vermelha.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Decaimento percentual de absorção dos filmes poliméricos contendo C1 e C4 expostos às luzes azul, verde e vermelha, por um período de 2h.

	C1_Azul (%)	C1_Verde (%)	C1_Vermelha (%)	C4_Azul (%)	C4_Verde (%)	C4_Vermelha (%)
PMMA	51,53	10,89	3,63	65,89	2,15	2,15
PLA	53,85	7,75	4,51	39,92	7,75	0
PCL	70,91	20,84	3,36	16,13	25,24	0,92

Analisando a Figura 18, o perfil de decaimento da intensidade da absorção dos filmes contendo C1 e C4 foi mais pronunciado quando exposto à luz azul. Para o filme contendo C4 também foi observado um decaimento expressivo quando exposto à luz verde. Tal comportamento corrobora o perfil de absorção observado na Figura 17. Analisando de forma mais detalhada a Tabela 6, e considerando as faixas de maior absorção dos materiais, percebe-se que as melhores alternativas de matrizes poliméricas para utilização do C1 e C4 na TFD, seriam o PMMA e PLA devido a menor degradabilidade dos fluoróforos quando incorporado nestas matrizes e expostos a luz correspondente ao comprimento de onda de maior absorção dos mesmos (luz azul para C1 e luz azul/verde para C4).

Vale ressaltar que os filmes poliméricos contendo C1 apresentam uma expressiva instabilidade perante a excitação no comprimento de onda de maior absorção do fluoróforo. Já os filmes poliméricos contendo C4 apresentaram-se fotoestável por exposição a luz azul, mas apresentaram fotoestabilidade considerável por exposição a luz verde. É importante considerar que a luz azul corresponde a um comprimento de onda mais energético, frente a luz verde, tendo a tendência de induzir maior degradação ao fotossensibilizador.

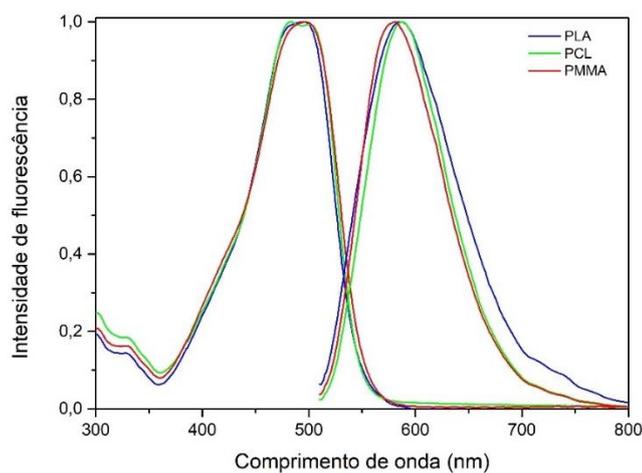
Dado o exposto nesta seção, a melhor alternativa para aplicação destes filmes poliméricos no contexto de TFD é o filme de PMMA contendo C4. Isto porque o C4 apresenta maior fotoestabilidade na matriz polimérica de PMMA quando exposto a uma fonte luminosa de comprimento de onda correspondente a maior absorção do fluoróforo. Neste caso o C4 apresentou fotoestabilidade muito maior que o C1. Por fim é indicado que o filme de PMMA contendo C4 (PMMA_C4) seja exposto à luz verde, para promover a maior geração de oxigênio singlete na aplicação de TFD.

4.2.2. Propriedades fotofísicas e físico-químicas dos filmes contendo derivado de curcumina (C4)

Segundo DE FRANÇA (2022), em diclorometano, o derivado C4 apresenta o maior rendimento quântico de fluorescência (0,6) quando comparado aos derivados C1 e C2 (0,10 e 0,48 respectivamente) - não há na literatura caracterizações sobre o rendimento quântico de fluorescência do derivado C3. Portanto, neste trabalho optou-se por dar prosseguimento às próximas caracterizações a serem discutidas apenas do composto C4, devido ao seu potencial de maior geração de oxigênio singlete, logo maiores chances de sucesso em sua aplicação como FS na TFD. Tal escolha também corrobora a maior fotoestabilidade deste composto em matriz polimérica, como demonstrado na seção anterior.

Como já identificado que a diferença de polaridade da matriz não influencia no perfil do espectro de absorção (Figura 17), supõe-se que dessa forma os espectros de fluorescência dos filmes produzidos sejam similares. Tal hipótese é ratificada pelo espectro de emissão demonstrado pela Figura 19.

Figura 19 - Espectros de absorção e emissão normalizados dos filmes poliméricos contendo 1,0% em massa de C4.



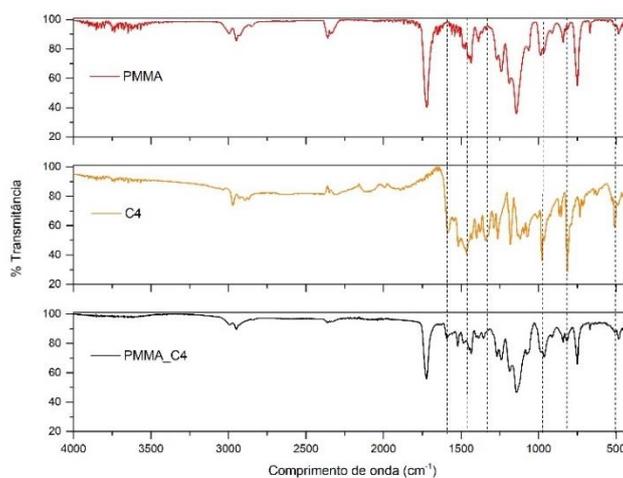
Fonte: Autoria própria.

Após análise macroscópica e fotofísica dos filmes, onde foi inspecionado a adição de carga de fotossensibilizador até o máximo de 1,0%, foram preparados filmes com maior

concentração em massa do derivado C4 (1,0 a 10,0% p/p), para avaliação das propriedades físico-químicas, que serão discutidas nessa seção.

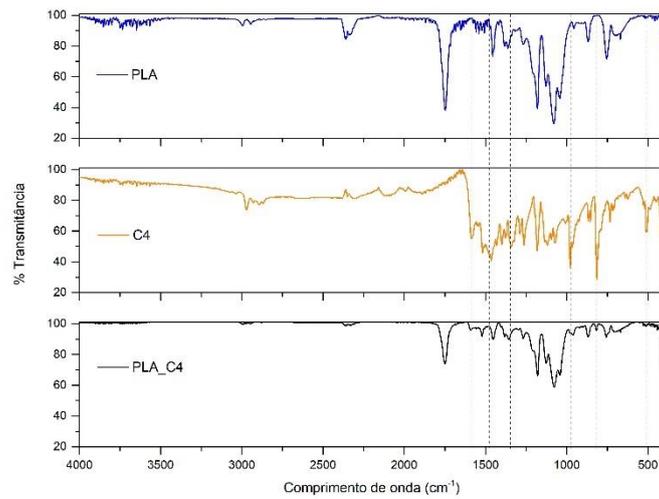
A interação química entre os polímeros e o derivado C4 foi investigada via FT-IR, como mostram as Figura 20, 21 e 22. De forma geral, o espectro FT-IR dos polímeros contendo curcumina e seus derivados foram similares ao espectro do polímero puro, indicando que as estruturas químicas foram preservadas sem a formação de novas ligações significativas entre a curcumina e os polímeros. Entretanto, discretas diferenças entre os espectros dos polímeros puros e polímeros contendo C4 foram encontradas, demonstrando uma fraca interação química entre os compostos. Os picos relacionados à composição dos polímeros e ao derivado C4 são descritos, respectivamente, nas tabelas 7 e 8.

Figura 20 - Espectros de FT-IR para o PMMA puro, C4 puro, e PMMA contendo com C4



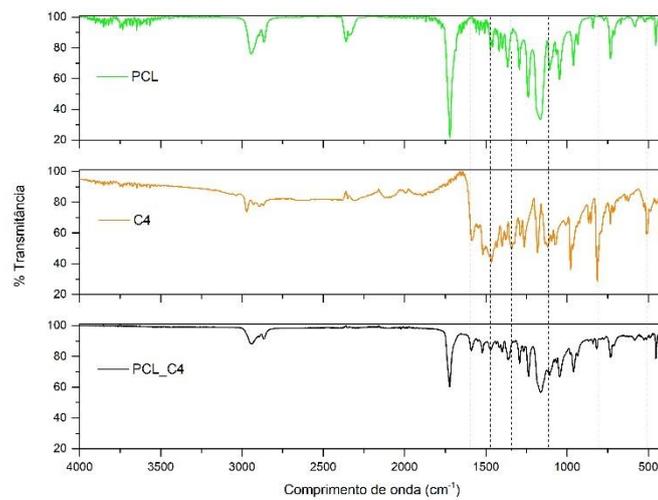
Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Espectros de FT-IR para o PLA puro, C4 puro, e PLA contendo C4



Fonte: Autoria própria.

Figura 22 - Espectros de FT-IR para o PCL puro, C4 puro, e PCL contendo C4



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Principais bandas de absorção e respectivas atribuições do espectro de FT-IR para os polímeros em estudo

Polímero	Banda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração
PMMA	2991 e 1433	Deformação axial da ligação C–H do grupamento -CH ₃
	2953	Deformação axial da ligação C–H do grupamento -CH ₂
	1724	Deformação axial grupo carbonila (C=O)
	1144	Deformação da ligação C–O–C
	1066 - 843	Vibração C-O do grupamento éster
	750	Vibração α-metil
PCL	2868 e 2937	Estiramento -CH ₂
	1720	Deformação axial grupo carbonila (C=O)
	1365	Vibração angular -CH ₂
	1240	Deformação axial da ligação C–O–C
	1163	Deformação axial C-O e C-C
	1047	Deformação C-O
	731	Estiramento C-C
PLA	2995 e 1456	Deformação axial da ligação C–H do -CH ₃
	1750	Vibração C=O do grupamento ac carboxílico
	1182	Deformação C-O
	1082	Deformação C-O-C
	864 e 750	Estiramento ligações –C–C–

Tabela 6 – Principais bandas de absorção e respectivas atribuições do espectro de FT-IR para o derivado C4 em estudo

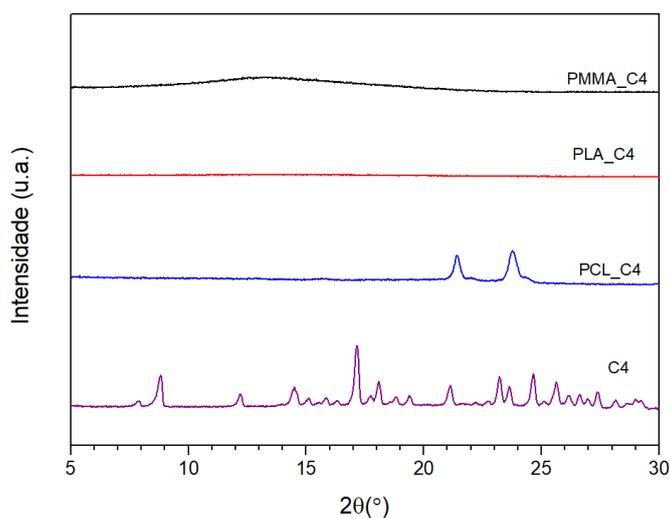
Derivado	Banda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração
C4	1589	Estiramento da ligação C=C em anéis aromáticos
	1462	Deformações angulares de ligações C-H em anéis aromáticos e deformações angulares de ligações C-H em grupos metileno (-CH ₂) ou metil (-CH ₃)
	1338	Deformação angular C-H de grupos metileno (-CH ₂) ou metil (-CH ₃) e estiramento assimétrico de ligações C-N em aminas
	980 e 815	Balanço fora do plano de grupamentos C-H em compostos aromáticos
	510	Deformações angulares de ligações C-H em anéis aromáticos

Por fim, a caracterização dos filmes contendo 1,0 % em massa de C4 foi complementada avaliando-se a cristalinidade das curcuminas contidas nas matrizes poliméricas. Sabendo da importância da dispersão uniforme da curcumina na matriz polimérica, informações sobre a cristalinidade do filme devem ser obtidas visando

identificar a presença da curcumina na superfície dos filmes, desta forma, a análise de DRX foi realizada.

Como mostrado pela Figura 23, o difratograma sugere tanto para os filmes contendo com C1, tanto para os filmes contendo C4, que não houve a precipitação de cristais na matriz polimérica, já que não há a presença dos picos característicos entre 8 e 30° desses compostos (Donsí *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2022). Percebe-se a existência tanto para o filme de PCL_C1, quanto para o PCL_C4, de dois picos em aproximadamente 21,5° e 24°, que são picos característicos do polímero (Fakhrali *et al.*, 2021; Kandi *et al.*, 2021). Por sua vez, o PMMA e PLA são definidos como materiais amorfos, pois não há uma periodicidade na estrutura desses materiais e o difratograma desses polímeros puros não traz picos de difração (Biron, 2016; Santos e Tavares, 2013).

Figura 23 - Padrão de difração de raios X (DRX) para os filmes poliméricos (PMMA, PLA e PCL) contendo C4 na proporção de 1,0 % em massa, e o derivado de curcumina C4 puro



Fonte: Autoria própria.

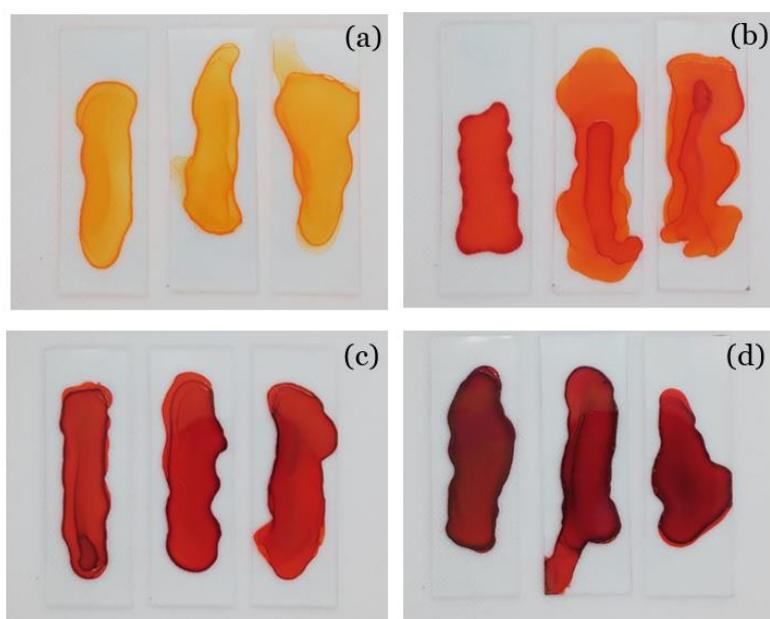
Sabendo que o filme de PMMA exposto a luz verde é a matriz onde o C4 apresenta maior estabilidade à degradação e levando em consideração a transparência deste polímero, optou-se por prosseguir o estudo apenas com o filme de PMMA. Vale ressaltar a importância do filme polimérico contendo o fotossensibilizador ser translúcido, para

facilitar a interação com a luz no mecanismo de fotoativação (e geração de oxigênio singlete) na TFD.

4.2.3. Investigação da formação de precipitados de derivado de curcumina em filmes de PMMA

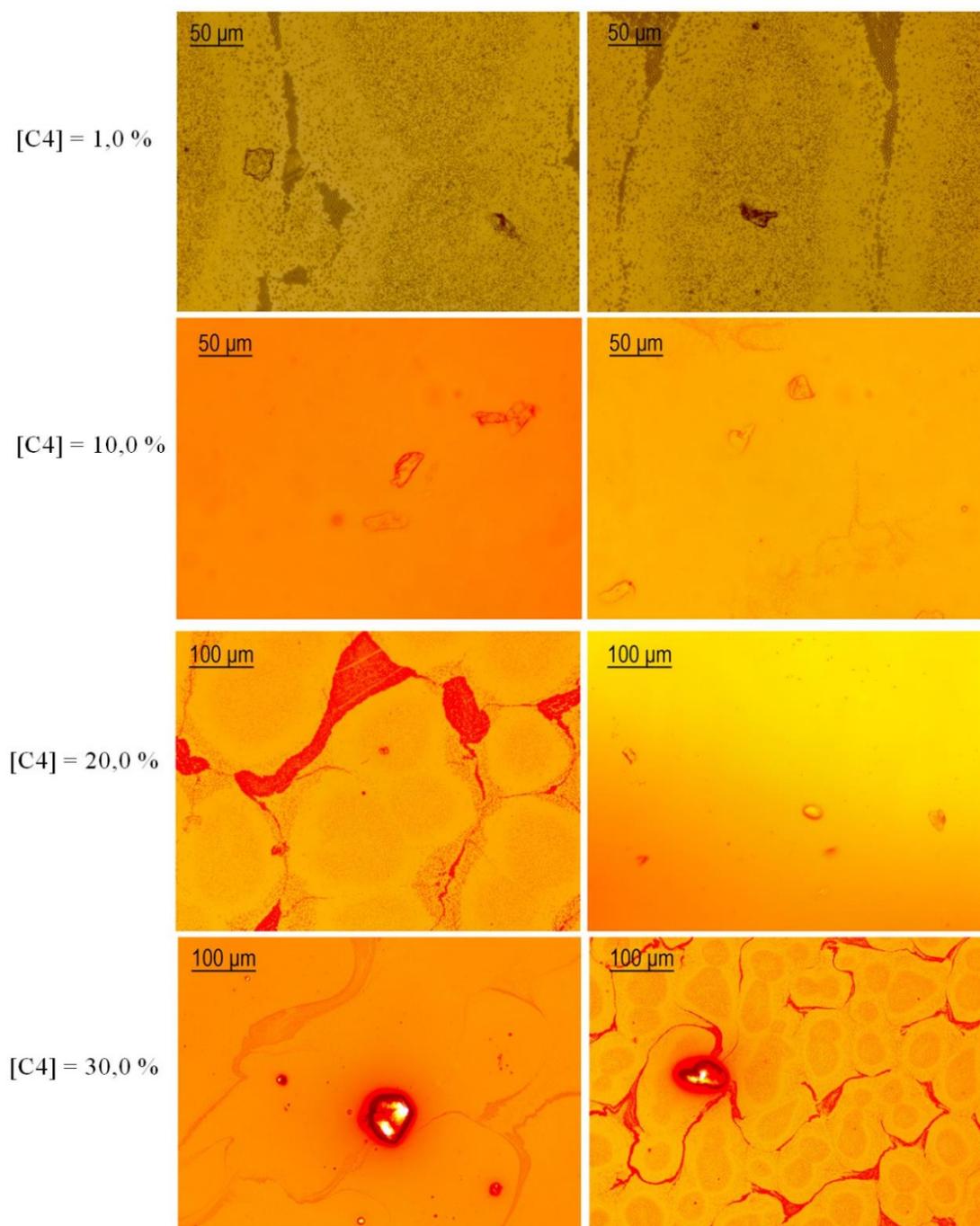
Embora a análise de DRX indique uma uniformidade dos filmes produzidos, a análise da microscopia óptica dos filmes mostra a presença de cristais na superfície dos filmes contendo 1,0 % de C4. Os filmes analisados estão demonstrados na Figura 25, que demonstra, macroscopicamente a homogeneidade dos filmes, sem a presença de bolhas ou cristais. Visando melhores informações, investigou-se também a presença de cristais e análise dos seus tamanhos nos filmes de PMMA contendo 10,0, 20,0 e 30,0 % de C4, como mostra a Figura 25. Vale destacar que para as concentrações de 20,0 e 30,0 % de C4, devido à alta intensidade da cor dos filmes, não foi possível a obtenção de imagens com menor aumento devido a saturação da lente.

Figura 24 - Filmes de PMMA contendo (a) 1,0, (b) 10,0 (c) 20,0 e (d) 30,0 % de C4



Fonte: Autoria própria.

Figura 25 - Microscopia óptica dos filmes de PMMA contendo 1,0/10,0/20,0 e 30,0% de C4 em diferentes aumentos.

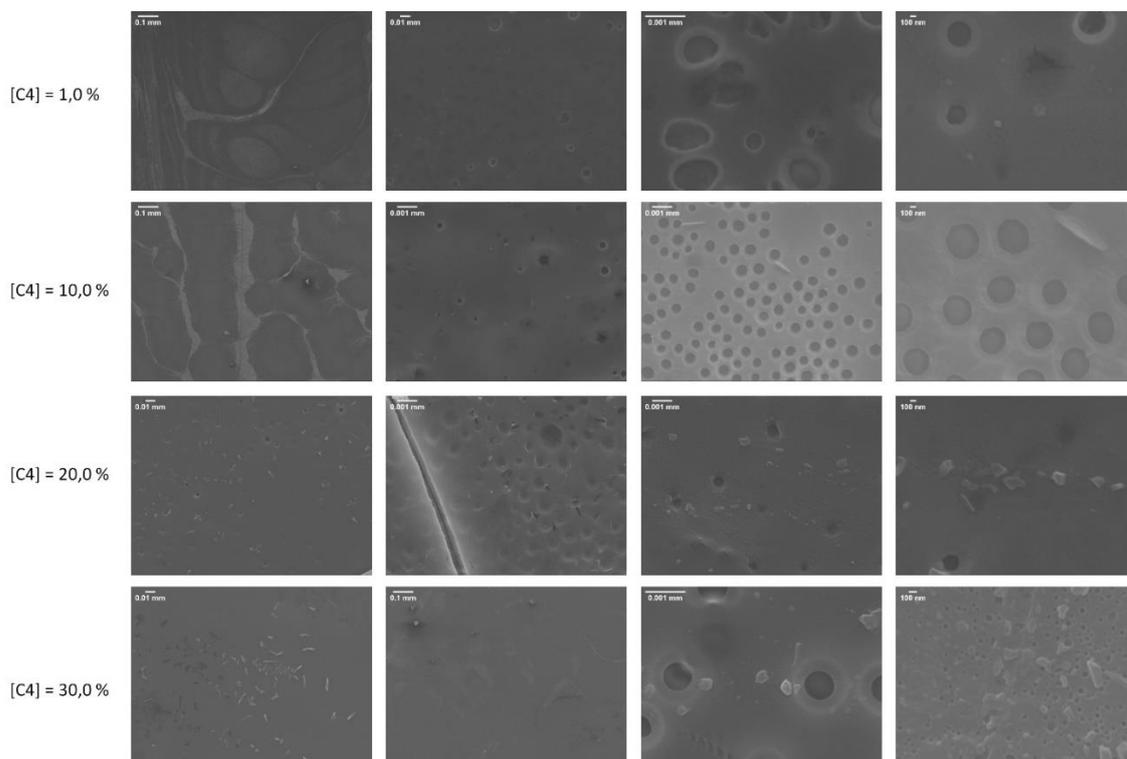


Fonte: Autoria própria.

A análise da superfície dos filmes indica que quanto maior a concentração de C4 no filme, maior o tamanho dos cristais encontrados na superfície. Pode-se supor que a presença de tais cristais facilite a utilização do filme desenvolvido na TFD, pois, sabendo que o tempo de vida do oxigênio singlete em água é da ordem de micro segundos (Nonell e Flors, 2016), a presença dos cristais na superfície pode facilitar a difusão do oxigênio singlete no meio e facilitar o seu contato com o objeto de interesse.

Embora a análise de DRX não tenha sugerido a presença de cristais de curcumina nos filmes, a microscopia eletrônica de varredura dos filmes trouxe novas informações sobre tal aspecto. A análise da Figura 26, permite a visualização da existência de aglomerados de curcumina nos filmes. Esses aglomerados são presentes em filmes com baixas e altas concentrações de C4 (1,0 % a 30,0 % em massa). Ademais, é fácil perceber que, de forma similar à solução de C4 em DMSO, existem cristais na borda das bolhas, e que não há uma distribuição uniforme nem no tamanho nem na posição dos aglomerados nos filmes.

Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura de filme de PMMA contendo 1,0; 10; 20 e 30 % em massa de C4.



Fonte: Autoria própria.

Nas micrografias dos filmes é possível ver a formação de poros nos filmes devido à evaporação do solvente, bem como a presença de pequenas bolhas. O tamanho dos

aglomerados de curcumina nos filmes foi de aproximadamente 0,78 μm . Além disso, é possível afirmar que quanto maior a concentração do C4 no filme, maior a presença de cristais na superfície do filme. Vale ressaltar que em estudos onde filmes poliméricos contendo curcumina (C1), e a metodologia de desenvolvimento também foi de evaporação de solvente, há relatos de formação de filmes com superfícies uniformes sem a presença de aglomerados, como mostrado por Wang et al., (2022), como também há relatos de superfícies semelhantes às aqui descritas onde há a formação de aglomerados como visualizado por Lai et al., (2022).

4.3. Validação da terapia fotodinâmica

Visando validar o potencial dos filmes produzidos em serem utilizados como ferramenta para a TFD, foram realizados testes com o ácido úrico e ABDA como sondas para detecção de oxigênio singlete (dados não mostrados), entretanto, o ácido úrico não apresentou sensibilidade para detecção do analito de interesse, e o ABDA degradava rapidamente em solução aquosa impedindo a sua utilização. Desta forma uma terceira metodologia de validação foi proposta para a detecção qualitativa da geração de oxigênio singlete. Além disso, ensaios biológicos também foram realizados com o mesmo propósito. Em ambas as situações primeiramente foi analisado o derivado C4 em solução, e depois o C4 contido ao filme polimérico.

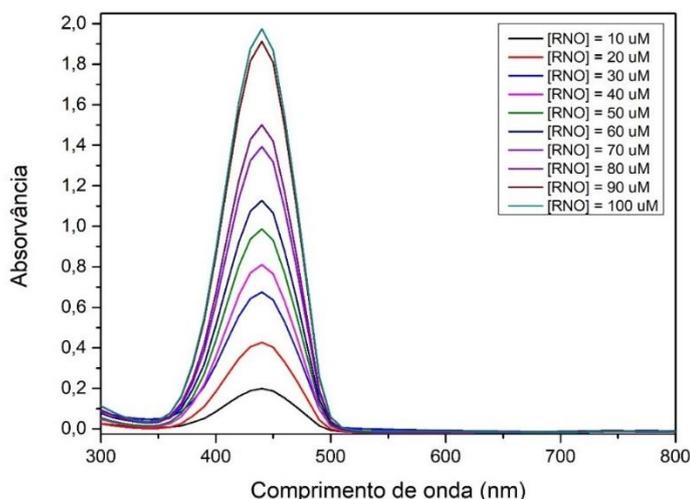
Para os ensaios biológicos, o microrganismo escolhido foi a *L. amazonensis*, protozoário causador da leishmaniose tegumentar americana, devido a presença de casos em todas as regiões do Brasil e ao fato de tal protozoário apresentar resistência aos tratamentos usuais, além de efeitos colaterais causados pelos medicamentos (Rodrigues et al., 2011).

4.3.1. Validação fotofísica da terapia fotodinâmica

A validação fotofísica foi realizada pelo método indireto de detecção de oxigênio singlete. Como descrito nos materiais e métodos, a primeira etapa para validação do potencial de utilização do RNO como sonda para detecção de oxigênio singlete em meio aquoso consistiu na determinação da concentração ideal de RNO que correspondesse a aproximadamente 1 de intensidade de absorção. Pois, sabendo que o protocolo de referência avaliou a empregabilidade de 10 e 50 μM de RNO para avaliação do

decaimento da absorção da sonda, foi necessária avaliação da concentração adequada do reagente. A elaboração da curva de calibração com a concentração de RNO variando de 10 a 100 μM como exemplificado pela Figura 27 a seguir, demonstrou que na concentração de 50 μM de RNO a absorção apresenta intensidade em torno de 1,0. Portanto, os ensaios subsequentes foram realizados com $[\text{RNO}] = 50 \mu\text{M}$ visando acompanhar o decaimento de intensidade da sonda ao interagir com o oxigênio singlete com boa sensibilidade.

Figura 27 - Espectro de absorção da solução azul de metileno e RNO após 60 min de irradiação, apresentando o decaimento da banda do RNO em 440 nm



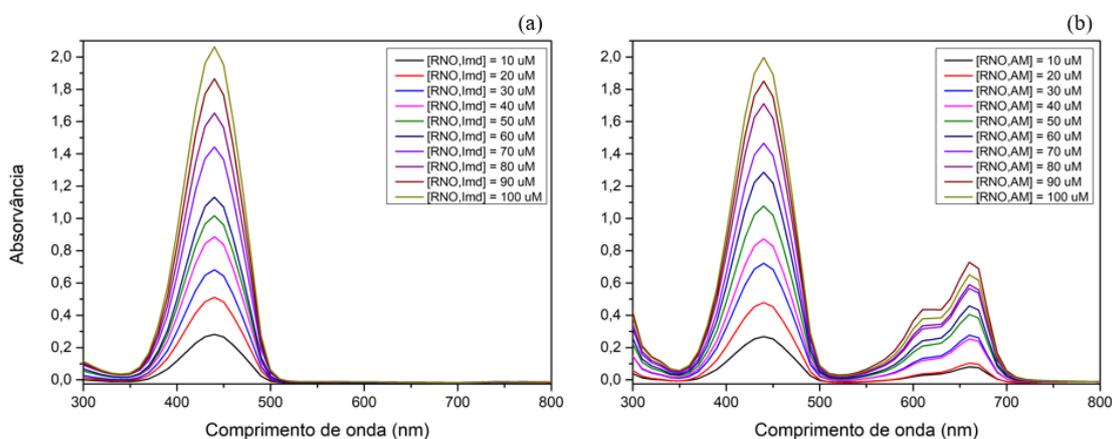
Fonte: Autoria própria.

É claro observar que o RNO apresenta faixa de absorção entre aproximadamente 350 a 500 nm, com máximo de absorção em 440 nm, valor ratificado pela literatura (Herman e Neal, 2019; Kraljić e Mohsni, 1978). A partir disso, destaca-se a importância de o comprimento máximo de absorção da sonda ser localizado em um espectro distinto ao do FS, pois se tanto a sonda quanto o FS apresentarem mesmo valor de intensidade máxima de absorção, o sinal obtido será uma soma de ambos os sinais, e a detecção do decaimento da intensidade de absorção da sonda será impossível de ser observado. Desta forma, considerando a curcumina e seus derivados sintéticos aqui em estudo, percebe-se que o C1 não pode ser utilizado como FS em conjunto com o RNO como sonda pois, como mostrado anteriormente, quando contidas nas matrizes poliméricas, comprimento máximo de absorção é de aproximadamente 430 nm. Logo, seria inviável observar o decaimento da intensidade do RNO em função dos filmes poliméricos contendo C1 pois

haveria sobreposição de picos entre a sonda e o elemento fotossensibilizante. Por outro lado, os filmes contendo o derivado C4 apresentam máximo de absorção de aproximadamente 500 nm, tornado assim viável a utilização do RNO como sonda.

Após determinação da concentração ótima de utilização, foi avaliada a influência do Imd e do AM no espectro de absorção do RNO, buscando verificar possíveis interações entre os reagentes. Sendo assim, soluções com diferentes concentrações de RNO e Imd e outras soluções com diferentes concentrações de RNO e AM foram preparadas e analisadas conforme descrito nos materiais e métodos. Para as soluções preparadas, percebeu-se, como mostra a Figura 28, que o RNO não interage nem com o Imd nem com o AM, portanto, tais reagentes podem ser utilizados em conjunto para a determinação da geração de oxigênio singlete. Ademais, aqui corrobora-se a necessidade do máximo de absorção do FS ser em faixa distinta da sonda, pois, caso o AM que apresenta intensidade máxima de absorção de 660 nm estivesse deslocado para a esquerda, seria clara a sobreposição de picos (Dinh *et al.*, 2019).

Figura 28 - Intensidade de absorção: (a) de soluções contendo diferentes concentrações de RNO e Imd em PBS; (b) de soluções contendo diferentes concentrações de RNO e AM em PBS

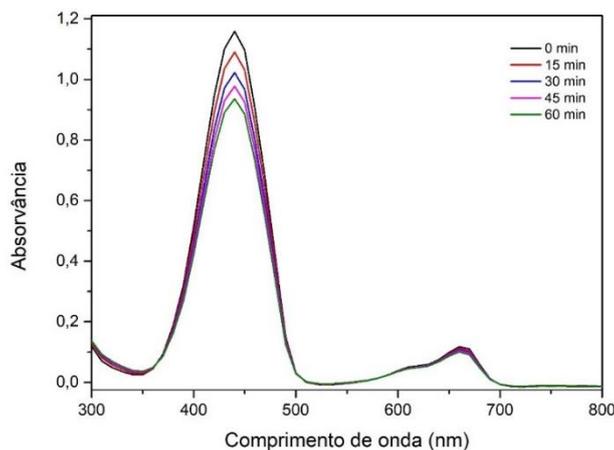


Fonte: Autoria própria.

Concluída a etapa de validação da possibilidade de utilização do RNO juntamente com o Imd e AM, e sabendo que o AM é capaz de gerar EROs, entre elas oxigênio singlete, o decaimento da intensidade de absorção do RNO foi realizado visando validar o declínio do máximo de absorção em função da geração de EROs. Solução equimolar de concentração 50 μM de RNO, Imd e AM foi produzida, e o decaimento do sinal quando

a solução é exposta a luz vermelha por 60 min foi acompanhado, e é exemplificado pela Figura 29 a seguir.

Figura 29 - Decaimento da intensidade máxima do RNO em função da geração de EROs pelo AM

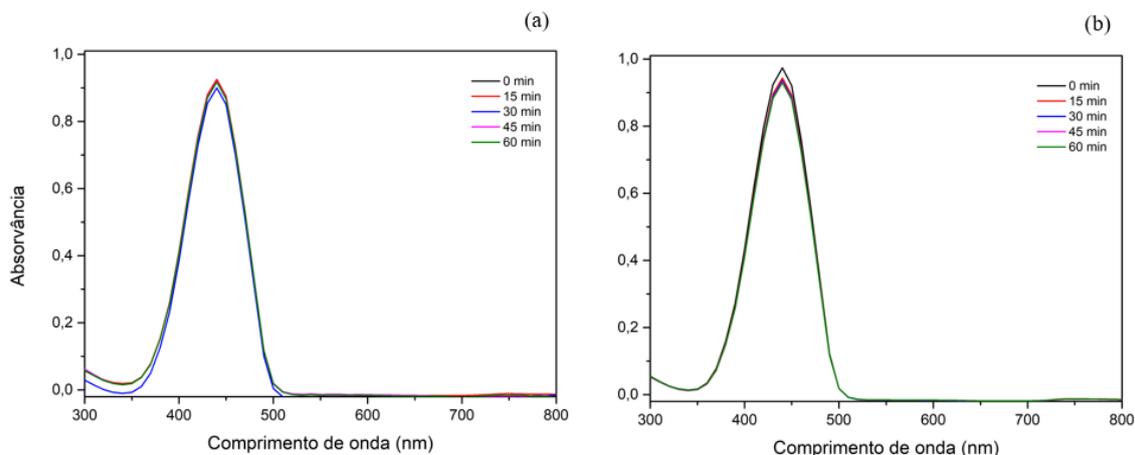


Fonte: Autoria própria.

A análise da Figura 29 permitiu concluir que houve decaimento significativo da intensidade do RNO em função da geração de EROs pelo AM. Ademais, percebeu-se leve decaimento da intensidade máxima do AM.

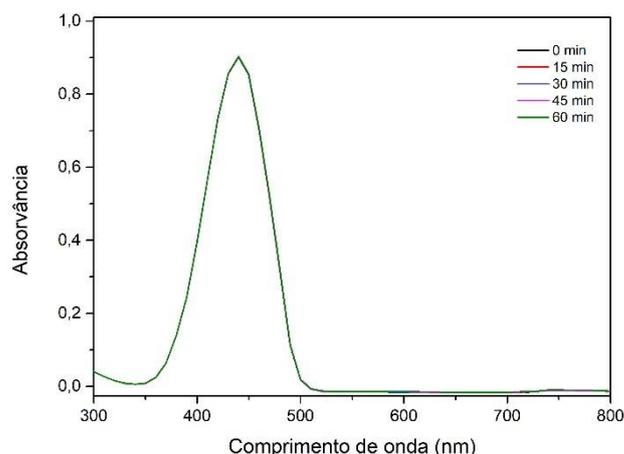
A última etapa para validação do protocolo para utilização do RNO consistiu em verificar a especificidade da sonda em detectar apenas oxigênio singlete e não quaisquer EROs. Tal procedimento foi realizado produzindo-se soluções contendo RNO e Imd, sem AM, pois sem a presença do FS espera-se que não haja o decaimento da sonda devido apenas a presença do oxigênio do ar, e soluções contendo RNO, Imd e H_2O_2 , pois sabe-se que o H_2O_2 não é capaz de gerar oxigênio singlete. Vale ressaltar que para as soluções contendo RNO e Imd foram feitos ensaios com e sem luz. A ausência do FS e a ausência da luz deixam incompleto o mecanismo da TFD, pois sem FS e com luz não há a espécie para gerar o oxigênio singlete, e com o FS e sem a luz, não há como excitar o FS para a geração de oxigênio singlete. O ensaio com a solução de RNO e Imd é demonstrado pela Figura 30 a seguir, e o ensaio da solução contendo RNO, Imd e H_2O_2 pela Figura 31.

Figura 30 - Ensaio de degradação do RNO em solução contendo apenas Imd. (a) Sem exposição à luz; (b) com exposição à luz



Fonte: Autoria própria.

Figura 31 - Ensaio de degradação do RNO em solução contendo apenas H₂O₂



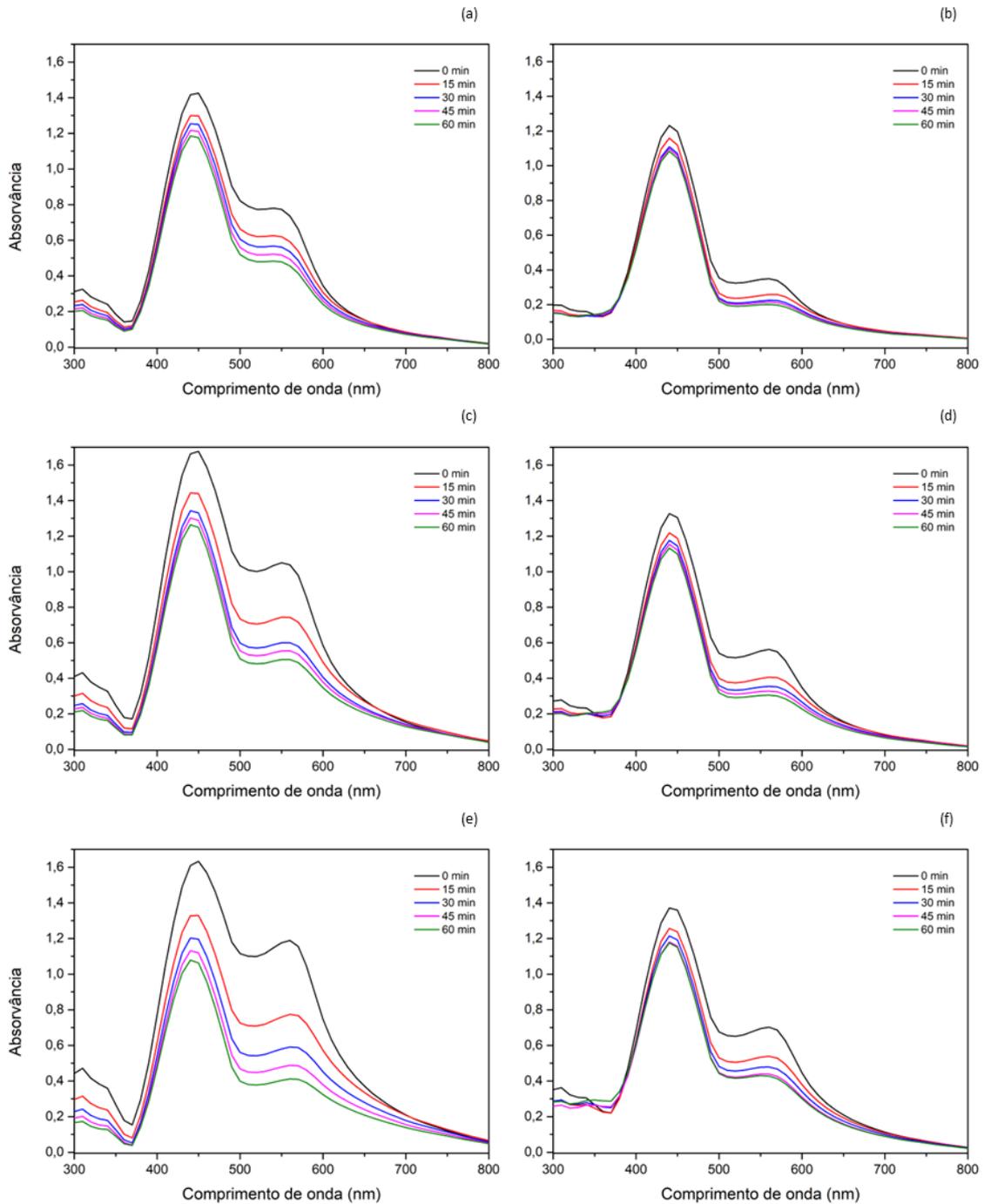
Fonte: Autoria própria.

Esses ensaios ratificaram a capacidade do RNO em detectar oxigênio singlete e não detecta espécies reativas de oxigênio do tipo peróxido, sendo possível, desta forma utilizar o RNO como sonda para avaliação da capacidade do C4 em solução e filmes produzido contendo C4 em gerar oxigênio singlete.

A técnica foi então empregada para avaliação do C4 em solução. Como esse composto não é solúvel em água, foi necessária a solubilização do C4 em DMSO. As soluções foram preparadas como descritas nos materiais e métodos, com as concentrações de RNO e Imd

sendo fixas em 50 μM , e a concentração do C4 variando de 50, 75 e 100 μM . Os ensaios foram realizados na ausência e na presença de luz verde, e os espectros são apresentados na Figura 32 a seguir.

Figura 32 - Degradação de RNO em solução de C4 solubilizado em DMSO suspenso em PBS. (a) [C4] = 50 μM , sem luz; (b) [C4] = 50 μM , com luz; (c) [C4] = 75 μM , sem luz; (d) [C4] = 75 μM , com luz; (e) [C4] = 100 μM , sem luz; (f) [C4] = 100 μM , com luz

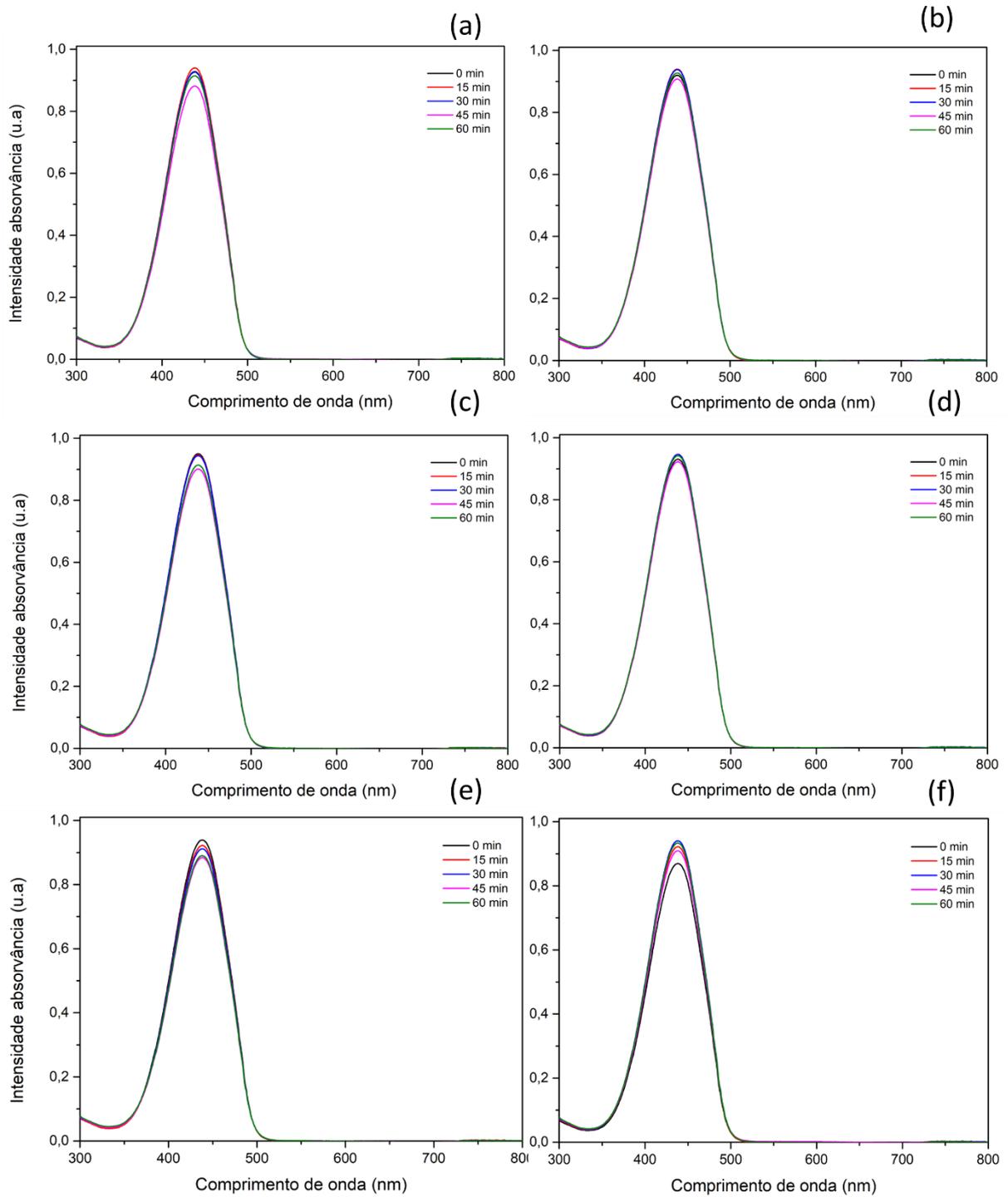


Fonte: Autoria própria.

Em ambos os ensaios, com e sem exposição à luz, não foi possível validar a liberação de oxigênio singlete pelo derivado C4 devido a existência de uma interação entre a curcumina e a solução, provavelmente influenciada pela precipitação de cristais de C4 que interferem na intensidade do espectro de absorção da solução.

Finalmente, quando testado o potencial de geração de oxigênio singlete do filme de PMMA utilizando-se a metodologia de acompanhamento do decaimento da intensidade do RNO, de forma semelhante à suspensão, não foram encontrados resultados significativos de diminuição do máximo de absorção em do RNO em 440 nm, não sendo possível comprovar a geração de oxigênio singlete. A Figura 33 demonstra que tanto no ensaio sem luz quanto no ensaio com luz não houve decréscimo da intensidade máxima de absorção do RNO. Desta forma, tentando validar o potencial de aplicação do filme de uma forma direta pelo seu desempenho na inibição da viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* em ensaio microbiológico, discutido a seguir.

Figura 33 - Degradação de solução de RNO em PBS em contato com filme polimérico de PMMA. (a) [C4] = 10%, sem luz; (b) [C4] = 10%, com luz; (c) [C4] = 20%, sem luz; (d) [C4] = 20%, com luz; (e) [C4] = 30%, sem luz; (f) [C4] = 30%, com luz.



Fonte: Autoria própria.

4.3.2. Validação biológica da terapia fotodinâmica

Os ensaios de validação do potencial de aplicação na TFD do derivado C4 em solução e do filme de PMMA contendo C4 foram realizados como descrito nos materiais e métodos. Os filmes preparados estão exemplificados pela Figura 34 a seguir.

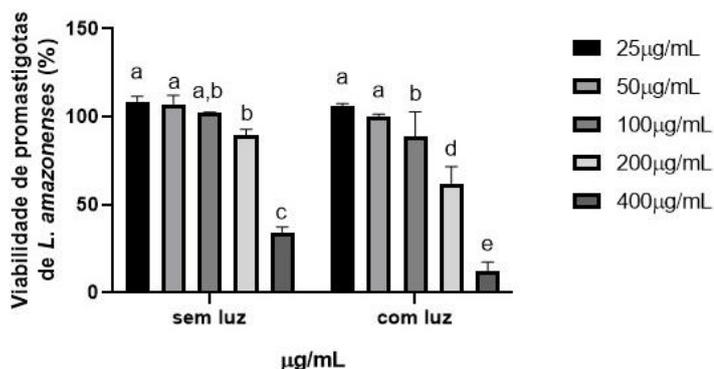
Figura 34 - Tubo de ensaio contendo filme de PMMA contendo C4 na proporção de 20,0 % em massa do polímero em relação ao volume total de solvente



Fonte: Autoria própria.

Para os ensaios da curcumina livre em solução, a análise estatística não mostrou diferença significativa da viabilidade dos poços tratados com concentração de C4 abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ expostos à luz verde. Ademais, comparando os grupos com e sem exposição à luz, o efeito inibitório da C4 é mais intenso na condição exposta à luz verde demonstrando, portanto, que a inibição ocorre devido à geração de oxigênio singlete, e não ao potencial antimicrobiano do derivado C4. A inibição da viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* após 48 h de tratamento com solução de C4 é mostrada pela Figura 35 a seguir. Comparando os ensaios com e sem luz, é possível concluir que o ensaio com a exposição de luz apresentou as melhores taxas de inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Figura 35 - Inibição de promastigotas de *L. amazonensis* após 48 h de tratamento com solução de C4



Fonte: Autoria própria.

Para esse ensaio, a concentração inibitória mínima de 50% dos parasitos (CI_{50}) foi de $247,06 \pm 9,3 \mu\text{g/mL}$ ($588,83 \pm 22,1 \mu\text{M}$) para a amostra exposta à luz verde e $342,32 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$ ($815,86 \pm 9,05 \mu\text{M}$) para a amostra não exposta à luz verde. Na literatura, ensaios de inativação fotodinâmica contra a *L. amazonensis* com diferentes elementos fotossensibilizantes como o azul de metileno e rosa bengala são avaliados. Alguns trabalhos são resumidos na Tabela 7.

Tabela 7 - Dose total de luz e CI_{50} contra a *L. amazonensis* para diferentes FS

Referência	FS	Cepa da <i>L. amazonensis</i>	Dose total de luz (Jcm^{-2})	IC_{50} (μM)
(França, de <i>et al.</i> , 2022)	Complexo metálico de curcumina	IFLA/BR/1967/PH8	13,76	2,29
(Song <i>et al.</i> , 2011)	Azul de metileno	MHO/BR/73/M2269	9	17,9
(Cabral <i>et al.</i> , 2024)	Azul de metileno	MHOM/BR/73/M2269	7,8*	0,034
(Navasconi <i>et al.</i> , 2017)	Rosa bengala	MHOM/BR/1977/LTB0016	2,98	9,8

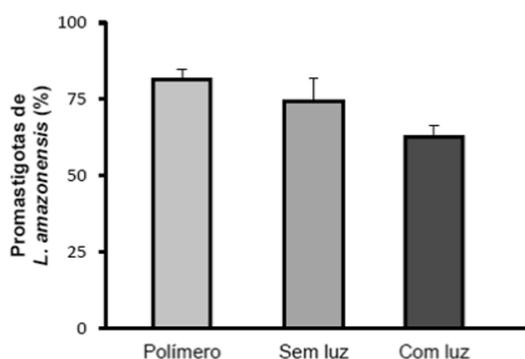
*dose de luz por sessão de tratamento. Tratamento ocorreu 3x por semana por 2 semanas

Pode-se perceber, portanto que o C4 em solução apresentou uma concentração inibitória mínima e dose de luz de 27,53 Jcm⁻² muito superior aos outros elementos fotossensibilizadores descritos na Tabela 7.

Mesmo apresentando maior dose de luz e maior concentração em solução quando comparado com outros FS, o potencial do C4 em filme foi avaliado. Os ensaios de validação do potencial de aplicação do filme polimérico contendo 20% em massa do derivado C4 foram realizados como descrito nos materiais e métodos.

Como controle negativo, a cultura contendo promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliada quando exposta apenas ao polímero puro, visando confirmar que caso alguma quantidade de solvente ainda esteja presente no filme, seja um teor desprezível e que não tenha influência nos ensaios biológicos. Ao contrário do experimento em solução, a viabilidade celular não foi analisada via método espectrofotométrico, mas via contagem direta de células vivas e células mortas em câmara de Neubauer. Através da contagem a porcentagem de viabilidade de cada tratamento foi calculada através da comparação com o controle positivo (100% de viabilidade). A inibição da viabilidade das promastigotas submetidas a tratamento com filme polimérico é mostrada pela Figura 36 a seguir.

Figura 36 - Inibição de promastigotas de *L. amazonensis* após 48 h de tratamento com: (a) filme contendo 20,0% em massa de C4 e exposição à luz, (b) filme contendo 20,0% em massa de C4 sem exposição à luz, (c) filme contendo apenas PMMA sem exposição à luz (controle -)



Fonte: Autoria própria.

Percebe-se, portanto que há um efeito inibitório na viabilidade das promastigotas nos ensaios com e sem exposição à luz, e que o polímero puro não apresenta inibição significativa dos protozoários ($81,5 \pm 3,2$ promastigotas/mL). Ademais, quando o filme foi exposto à luz, a média de viabilidade foi de $62,5 \pm 3,8$ promastigotas/mL versus $74,3 \pm 7,7$ promastigotas/mL para a amostra sem exposição à luz verde. Logo, a amostra exposta à luz verde apresentou máximo de viabilidade de $66,3$ promastigotas/mL enquanto a amostra não exposta à luz apresentou limite inferior de viabilidade de $66,7$ promastigotas/mL, demonstrando que não há sobreposição dos intervalos. Vale ressaltar que nenhuma das condições testadas obteve 50% de inibição.

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1. Conclusões

Foi realizado o desenvolvimento e a avaliação das propriedades fotofísicas e físico-químicas, de filmes poliméricos contendo derivados de curcumina, bem como avaliação do potencial de aplicação destes em terapia fotodinâmica (TFD). Ao longo do desenvolvimento do trabalho constatou-se que a adição destas moléculas em filmes poliméricos é capaz de ampliar as possibilidades de aplicação de TFD de forma não restrita apenas a aplicações tópicas, além de garantir que não reste resíduo de fotossensibilizador no organismo, incrementando a segurança da aplicação de TFD.

Foram empregadas quatro moléculas sintéticas como fotossensibilizantes: curcumina (C1) e curcumina modificada com NPh_2 (C2), $NMet_2$ (C3) e NEt_2 (C4). Os filmes contendo os fluoróforos sintéticos foram produzidos via evaporação do solvente. Foi utilizado clorofórmio como solvente capaz de solubilizar a matriz polimérica (PMMA, PLA e PCL) e as moléculas de interesse (curcumina sintética e derivado).

Os fotossensibilizadores foram caracterizados por espectroscopia de absorção, em solução de etanol e acetona, bem como nos filmes poliméricos de diferentes polaridades, apresentando absorção máxima em torno de 420, 470, 480 e 500 nm, respectivamente, para C1, C2, C3 e C4, em todas as condições. Nesses ensaios, não foi observado um efeito significativo no deslocamento de absorção das moléculas nos diferentes solventes e matrizes poliméricas de diferentes polaridades. No entanto, foi observado um alargamento nos espectros de C2 e C3 em solução, sugerindo maior fotoestabilidade de C1 e C4, que foram caracterizados em maior detalhe quando em presença nos filmes poliméricos (FTIR e DRX). Os filmes poliméricos fluorescentes obtidos apresentaram aspecto visualmente homogêneo, sem indício de materiais cristalinos precipitados na matriz polimérica. No entanto, inspeções por microscopia óptica demonstraram presença de cristais dos fluoróforos em dimensões inferiores a 100 μm , que foram confirmados por microscopia eletrônica de transmissão.

A adição destas moléculas em filmes finos também são uma alternativa para aumentar a biodisponibilidade destas, uma vez que são muito pouco solúveis em meio aquoso. A presença de cristais tanto em meio aquoso quanto em filme foi avaliada buscando verificar a influência da solubilidade e dispersão da curcumina na geração de oxigênio singlete. A liberação do oxigênio singlete em meio aquoso foi avaliada utilizando RNO como sonda, no entanto não foi possível quantificar a eficiência de liberação de oxigênio singlete da curcumina e derivado, devido a sobreposição de seu espectro de absorção com o da sonda.

Por fim, o potencial antimicrobiano do filme polimérico contendo o derivado de curcumina (C4) foi avaliado em ensaio *in vitro* com *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), demonstrando uma redução de 16% de viabilidade do microrganismo em presença do filme polimérico, de PMMA contendo 20,0% p/p de C4, quando exposto a luz verde. Desta forma, foi concluído que o filme polimérico contendo derivado de curcumina apresentou potencial de aplicação da TFD em sistemas que não sejam somente superficiais, permitindo vislumbrar futuro desenvolvimento de sonda óptica para aplicação de TFD em órgãos internos.

5.2. Perspectivas

Algumas propostas para trabalhos futuros são:

- 1) Investigação do perfil de absorção e emissão da curcumina sintética e derivados em DMSO, acetona e álcool bem como análise da fotodegradação.
- 2) Análise do tamanho dos cristais de C4 em solução aquosa utilizando DLS.
- 3) Avaliação do potencial de utilização de blendas poliméricas contendo o derivado C4 para aplicação na TFD.
- 4) Estudo da influência do tamanho dos aglomerados da curcumina e seus derivados na superfície de filmes poliméricos para utilização na TFD.
- 5) Validação biológica dos filmes poliméricos contendo curcumina e seus derivados em bactérias e fungos.

Referências Bibliográficas

ABRAMOWITZ, M.; SPRING, K. R.; KELLER, H. E.; DAVIDSON, M. W. Basic Principles of Microscope Objectives. 2018.

ADAMS, F. X-RAY ABSORPTION AND DIFFRACTION | Overview. **Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition**, p. 365–377, 1 jan. 2005.

AILIOAIE, L. M.; AILIOAIE, C.; LITSCHER, G. Latest Innovations and Nanotechnologies with Curcumin as a Nature-Inspired Photosensitizer Applied in the Photodynamic Therapy of Cancer. **Pharmaceutics** **2021**, Vol. **13**, Page **1562**, v. 13, n. 10, p. 1562, 26 set. 2021.

ALI, A.; CHIANG, Y. W.; SANTOS, R. M. X-ray Diffraction Techniques for Mineral Characterization: A Review for Engineers of the Fundamentals, Applications, and Research Directions. **Minerals** **2022**, Vol. **12**, Page **205**, v. 12, n. 2, p. 205, 6 fev. 2022.

ALI, U.; JUHANNI BT ABD KARIM, K.; AZIAH BUANG, N.; JUHANNI ABD KARIM, K. B. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). **Polymer Reviews**, 24 jun. 2015.

ALMEIDA RODRIGUES, I. DE; SILVA, B. A. DA; SANTOS, A. L. S. DOS; VERMELHO, A. B.; ALVIANO, C. S.; SOCORRO SANTOS ROSA, M. DO. A new experimental culture medium for cultivation of *Leishmania amazonensis*: Its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. **Parasitology Research**, v. 106, n. 5, p. 1249–1252, 23 fev. 2010.

ALVEN, S.; NQORO, X.; ADERIBIGBE, B. A. Polymer-Based Materials Loaded with Curcumin for Wound Healing Applications. 2020.

ASHKBAR, A.; REZAEI, F.; ATTARI, F.; ASHKEVARIAN, S. Treatment of breast cancer in vivo by dual photodynamic and photothermal approaches with the aid of curcumin photosensitizer and magnetic nanoparticles. 2020.

BABINSKI, T. P.; GROSSKO, D.; PAULA, D. DE; TOMINAGA, T. T. Uso da curcumina na terapia fotodinâmica antimicrobiana: uma revisão/ Use of curcumin in antimicrobial photodynamic therapy: a review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 7259–7271, 22 abr. 2022.

BATES, P. A. Housekeeping by Leishmania. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 447–448, 1 out. 2006.

BENDER, L.; AYOUB, A. M.; SCHULZE, J.; AMIN, M. U.; LIBRIZZI, D.; ENGELHARDT, K. H.; ROSCHENKO, V.; YOUSEFI, B. H.; SCHÄFER, J.; PREIS, E.; BAKOWSKY, U. Evaluating the photodynamic efficacy of nebulized curcumin-loaded liposomes prepared by thin-film hydration and dual centrifugation: In vitro and in ovo studies. **Biomaterials advances**, v. 159, 1 maio 2024.

BERGSTRÖM, J. Experimental Characterization Techniques. **Mechanics of Solid Polymers**, p. 19–114, 1 jan. 2015.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis research**, v. 101, n. 2–3, p. 157–170, set. 2009.

BHUYAN, S. *et al.* Microliter spotting and micro-colony observation: A rapid and simple approach for counting bacterial colony forming units. **Journal of Microbiological Methods**, v. 207, p. 106707, 1 abr. 2023.

BIRON, M. Thermoplastic Specific Properties. **Material Selection for Thermoplastic Parts**, p. 39–75, 1 jan. 2016.

BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Direct 1O₂ optical excitation: A tool for redox biology. **Redox Biology**, v. 13, p. 39–59, 1 out. 2017.

BOURAKADI, K. EL; BOUHFI, R.; QAISS, A. EL K. Characterization techniques for hybrid nanocomposites based on cellulose nanocrystals/nanofibrils and nanoparticles. **Cellulose Nanocrystal/Nanoparticles Hybrid Nanocomposites: From Preparation to Applications**, p. 27–64, 1 jan. 2021.

BREGNHØJ, M.; DICHMANN, L.; MCLOUGHLIN, C. K.; WESTBERG, M.; OGILBY, P. R. Uric Acid: A Less-than-Perfect Probe for Singlet Oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 95, n. 1, p. 202–210, 1 jan. 2019.

CABRAL, F. V.; RIAHI, M.; PERSHEYEV, S.; LIAN, C.; CORTEZ, M.; SAMUEL, I. D. W.; RIBEIRO, M. S. Photodynamic therapy offers a novel approach to managing miltefosine-resistant cutaneous leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 177, p. 116881, 1 ago. 2024.

CAI, Y.; GUAN, J.; WANG, W.; WANG, L.; SU, J.; FANG, L. pH and light-responsive polycaprolactone/curcumin@zif-8 composite films with enhanced antibacterial activity. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 8, p. 3550–3562, 1 ago. 2021.

CAI, Z.; SHEN, C.; DENG, Z.; WU, D.; CHEN, K. Solution blow spinning of multilayer polycaprolactone/curcumin-loaded gelatin/polycaprolactone nanofilm for slow release and bacterial inhibition. **Food Hydrocolloids for Health**, v. 2, p. 100062, 1 dez. 2022.

CHAKRABORTY, S.; SHUKLA, S.; RASTOGI, M.; MUND, S. S.; CHOWDHURY, A.; MUKHERJEE, C.; SAHU, K.; MAJUMDER, S. K. Evaluation of antimicrobial photodynamic action of a pluronic and pectin based film loaded with methylene blue against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Biomedical Materials**, v. 19, n. 2, p. 025004, 19 jan. 2024.

CHEN, L.; DONG, Q.; SHI, Q.; DU, Y.; ZENG, Q.; ZHAO, Y.; WANG, J. J. Novel 2,3-Dialdehyde Cellulose-Based Films with Photodynamic Inactivation Potency by Incorporating the β -Cyclodextrin/Curcumin Inclusion Complex. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 7, p. 2790–2801, 12 jul. 2021a.

_____. Novel 2,3-Dialdehyde Cellulose-Based Films with Photodynamic Inactivation Potency by Incorporating the β -Cyclodextrin/Curcumin Inclusion Complex. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 7, p. 2790–2801, 12 jul. 2021b.

CORRÊA, T. Q.; BLANCO, K. C.; GARCIA, É. B.; PEREZ, S. M. L.; CHIANFRONE, D. J.; MORAIS, V. S.; BAGNATO, V. S. Effects of ultraviolet light and curcumin-mediated photodynamic inactivation on microbiological food safety: A study in meat and fruit. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101678, 1 jun. 2020.

CORREIA, J. H.; RODRIGUES, J. A.; PIMENTA, S.; DONG, T.; YANG, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1332, 1 set. 2021.

COUSINS, M.; ADELBERG, J.; CHEN, F.; RIECK, J. Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric (*Curcuma longa* L.) grown in vitro. **Industrial Crops and Products**, v. 25, n. 2, p. 129–135, fev. 2007.

DAOUST, H.; RINFRET, M. Solubility of polymethyl methacrylate and polyvinyl acetate. **Journal of Colloid Science**, v. 7, n. 1, p. 11–19, 1 fev. 1952.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233–234, p. 351–371, 1 nov. 2002.

DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897–3915, 29 jul. 2004.

DEUS, W. F. DE; FRANÇ, B. M. DE; FORERO, S. B.; GRANATO, A. E. C.; ULRICH, H.; DÓRIA, A. C. O. C.; AMARAL, M. M.; SLABON, A.; RODRIGUES, B. V. M. Curcuminoid-Tailored Interfacial Free Energy of Hydrophobic Fibers for Enhanced Biological Properties. **Cite This: ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 13, p. 24493–24504, 2021.

DINH, V. P.; HUYNH, T. D. T.; LE, H. M.; NGUYEN, V. D.; DAO, V. A.; HUNG, N. Q.; TUYEN, L. A.; LEE, S.; YI, J.; NGUYEN, T. D.; TAN, L. V. Insight into the adsorption mechanisms of methylene blue and chromium(III) from aqueous solution onto pomelo fruit peel. **RSC Advances**, v. 9, n. 44, p. 25847–25860, 2019.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer** 2003 3:5, v. 3, n. 5, p. 380–387, maio 2003.

DONSÍ, F.; WANG, Y.; LI, J. I.; HUANG, Q. Preparation of Curcumin Sub-micrometer Dispersions by High-Pressure Homogenization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2848–2853, 10 mar. 2010.

DOUGHERTY, T. J.; MARCUS, S. L. Photodynamic therapy. **European Journal of Cancer**, v. 28, n. 10, p. 1734–1742, 1992.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, A. P. D.; BRUNETTI, I. L.; COSTA, C. A. D. S.; JACOMASSI, D. P.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, jul. 2011.

DUJIC, J.; KIPPENBERGER, S.; RAMIREZ-BOSCA, A.; DIAZ-ALPERI, J.; BEREITER-HAHN, J.; KAUFMANN, R.; BERND, A.; HOFMANN, M. Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1422–1428, 15 mar. 2009.

DWIVEDI, R.; KUMAR, S.; PANDEY, R.; MAHAJAN, A.; NANDANA, D.; KATTI, D. S.; MEHROTRA, D. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. 2019.

ENTRADAS, T.; WALDRON, S.; VOLK, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, p. 111787, 1 mar. 2020.

FAKHRALI, A.; NASARI, M.; POURSHARIFI, N.; SEMNANI, D.; SALEHI, H.; GHANE, M.; MOHAMMADI, S. Biocompatible graphene-embedded PCL/PGS-based nanofibrous scaffolds: A potential application for cardiac tissue regeneration. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 40, 20 out. 2021.

FEKRAZAD, R.; ZARE, H.; VAND, S. M. S. Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by Radachlorin and toluidine blue O on Staphylococcus aureus and Escherichia coli: An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 213–217, 1 set. 2016.

FRANÇA, B. M. DE. **Derivados de curcumina com sistema push-pull: síntese, caracterização, estudo fotofísico e potenciais aplicações**. [s.l.] UFRJ, 2022.

FRANÇA, B. M. DE; OLIVEIRA, S. S. C.; SOUZA, L. O. P.; MELLO, T. P.; SANTOS, A. L. S.; BELLO FORERO, J. S. Synthesis and photophysical properties of metal complexes of curcumin dyes: Solvatochromism, acidochromism, and photoactivity. **Dyes and Pigments**, v. 198, p. 110011, 1 fev. 2022.

FRIED, J. R. **Polymer science and technology**. 3. ed. [s.l.] Pearson, 2014.

GABRIELLI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A. J.; BAPTISTA, M. S. Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227–232, 1 mar. 2004.

GANDIN, E.; LION, Y.; VORST, A. VAN DE. QUANTUM YIELD OF SINGLET OXYGEN PRODUCTION BY XANTHENE DERIVATIVES. **Photochemistry and Photobiology**, v. 37, n. 3, p. 271–278, 1 mar. 1983.

GARCÍA, I.; BALLESTA, S.; GILABERTE, Y.; REZUSTA, A.; PASCUAL, Á. Antimicrobial photodynamic activity of hypericin against methicillin-susceptible and

resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Future microbiology**, v. 10, n. 3, p. 347–356, 1 mar. 2015.

GARCIA-DIAZ, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 109, p. 158, 15 out. 2016.

GHORBANI, J.; RAHBAN, D.; AGHAMIRI, S.; TEYMOURI, A.; BAHADOR, A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. **LASER THERAPY**, v. 27, n. 4, p. 293–302, 28 dez. 2018.

GONÇALVES DE OLIVEIRA FILHO, J.; ROMANELLI, M.; BERTOLO, V.; ALISON, M.; RODRIGUES, V.; MARANGON, C. A.; DA, G.; SILVA, C.; CAMPOS, F.; ODONI, A.; BURANELO EGEA, M. Curcumin: A multifunctional molecule for the development of smart and active biodegradable polymer-based films. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 840–849, 2021.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONZÁLEZ, Y.; MOJICA-FLORES, R.; MORENO-LABRADOR, D.; CUBILLARIOS, L.; RAO, K. S. J.; FERNÁNDEZ, P. L.; LARIONOV, O. V.; LAKEY-BEITIA, J. Polyphenols with Anti-Inflammatory Properties: Synthesis and Biological Activity of Novel Curcumin Derivatives. 2023.

GOVINDARAJ, P.; KANDASUBRAMANIAN, B.; KODAM, K. M. Molecular interactions and antimicrobial activity of curcumin (*Curcuma longa*) loaded polyacrylonitrile films. **Materials Chemistry and Physics**, v. 147, n. 3, p. 934–941, 15 out. 2014.

GRUBB, D. T. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Em: **Polymer Science: A Comprehensive Reference**. [s.l: s.n.]. v. 2.

GUNAYDIN, G.; GEDIK, M. E.; AYAN, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 691697, 10 jun. 2021.

HAMBLIN, M. R.; NEWMAN, E. L. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 26, n. 2, p. 147–157, 1 nov. 1994.

HEGGE, A. B.; NIELSEN, T. T.; LARSEN, K. L.; BRUZELL, E.; TØNNESEN, H. H. Impact of Curcumin Supersaturation in Antibacterial Photodynamic Therapy—Effect of Cyclodextrin Type and Amount: Studies on Curcumin and Curcuminoides XLV. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 4, p. 1524–1537, 1 abr. 2012.

HENRIQUE, A.; PEREIRA, C.; MARCOLINO, L. M. C.; GUERRA PINTO, J.; FERREIRA-STRIXINO, J.; PINTO, L. M. C.;; FERREIRA-STRIXINO, J. G.; Evaluation of the Photodynamic Therapy with Curcumin on *L. braziliensis* and *L. major* Amastigotes. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 634, 1 jun. 2021.

HERMAN, J.; NEAL, S. L. Efficiency comparison of the imidazole plus RNO method for singlet oxygen detection in biorelevant solvents. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 411, n. 20, p. 5287–5296, 1 ago. 2019.

INOUE, K.; NOMURA, C.; ITO, S.; NAGATSU, A.; HINO, T.; OKA, H. Purification of Curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin by High-Speed Countercurrent Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9328–9336, 22 out. 2008.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica * Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 4, p. 501–512, 2010.

JESUS, M. R.; SARIKA, R.; SHANKARAN, D. R. Curcumin Labeled PMMA Halochromic Smart Flexible Films. **Materials Focus**, v. 5, n. 2, p. 177–181, 12 abr. 2016.

JIKAZANA, A.; GARG, K.; CORRE PIDOU, K. LE; CAMPO, P.; MCADAM, E. J. The role of mixing on the kinetics of nucleation and crystal growth in membrane distillation crystallisation. **Separation and Purification Technology**, v. 353, p. 128533, 19 jan. 2025.

JOHNSON, A.; WU, J.; ZHOU, Z.; LI, Y.; YIN, Y.; PONDER, M. A.; KIM, Y. T.; SHUAI, D.; HUANG, H. Efficacy of a Rose Bengal-Embedded Antimicrobial Packaging

Film in Inactivating Escherichia coli under Visible Light Irradiation. **ACS Food Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 561–566, 15 mar. 2024.

JUARRANZ, Á.; JAÉN, P.; SANZ-RODRÍGUEZ, F.; CUEVAS, J.; GONZÁLEZ, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. **Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico**, v. 10, n. 3, p. 148–154, 2008.

KAH, G.; CHANDRAN, R.; ABRAHAMSE, H. Curcumin a Natural Phenol and Its Therapeutic Role in Cancer and Photodynamic Therapy: A Review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 639, 1 fev. 2023.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Photonics and Lasers in Medicine**, v. 4, n. 4, p. 378–379, 1 nov. 2000.

KANDI, R.; PANDEY, P. M.; MAJOOD, M.; MOHANTY, S. Fabrication and characterization of customized tubular scaffolds for tracheal tissue engineering by using solvent based 3D printing on predefined template. **Rapid Prototyping Journal**, v. 27, n. 2, p. 421–428, 2 mar. 2021.

KAZAKOVA, O.; LIPKOVSKA, N.; BARVINCHENKO, V. Keto-enol tautomerism of curcumin in the preparation of nanobiocomposites with fumed silica. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 277, p. 121287, 5 set. 2022.

KAZANTZIS, K. T.; KOUTSONIKOLI, K.; MAVROIDI, B.; ZACHARIADIS, M.; ALEXIOU, P.; PELECANOU, M.; POLITOPOULOS, K.; ALEXANDRATOU, E.; SAGNOU, M. Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: Photophysical properties and: In vitro studies with prostate cancer cells. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 19, n. 2, p. 193–206, 1 fev. 2020.

KHAN, A. U. The discovery of the chemical evolution of singlet oxygen. Some current chemical, photochemical, and biological applications. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 251–267, 1 mar. 1991.

KHANGAONKAR, P. R. An Introduction to Material Characterization. p. 379, 2010.

KHARAT, M.; DU, Z.; ZHANG, G.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature,

and Molecular Environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1525–1532, 1 mar. 2017.

KIM, H. J.; KIM, D. J.; KARTHICK, S. N.; HEMALATHA, K. V.; JUSTIN RAJ, C.; OK, S.; CHOE, Y. Curcumin Dye Extracted from *Curcuma longa* L. Used as Sensitizers for Efficient Dye-Sensitized Solar Cells. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 6, p. 8320–8328, 1 jun. 2013.

KRALJIĆ, I.; MOHSNI, S. EL. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, n. 4–5, p. 577–581, 1 out. 1978.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**, p. 43–58, 1 jan. 2017.

KURYANOVA, A. S.; KARDUMYAN, V. V.; KAPLIN, V. S.; AKSENOVA, N. A.; CHERNYAK, A. V.; TIMOFEEVA, V. A.; GLAGOLEV, N. N.; TIMASHEV, P. S.; SOLOVIEVA, A. B. Effect of amphiphilic polymers and sodium alginate on the activity of methylene blue in photogeneration of singlet oxygen 1O_2 . **Laser Physics Laser Phys**, v. 33, p. 95601–95611, 2023.

KUZMINSKA, J.; SZYK, P.; MLYNARCZYK, D. T.; BAKUN, P.; MUSZALSKA-KOLOS, I.; DETTLAFF, K.; SOBCZAK, A.; GOSLINSKI, T.; JELINSKA, A.; PL, A. J. Curcumin Derivatives in Medicinal Chemistry: Potential Applications in Cancer Treatment. **Molecules**, p. 29, 2024.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484–3504, 17 nov. 2009.

LAI, D.; ZHOU, F.; ZHOU, A.; HAMZAH, S. S.; ZHANG, Y.; HU, J.; LIN, S. Comprehensive properties of photodynamic antibacterial film based on κ -Carrageenan and curcumin- β -cyclodextrin complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, p. 119112, 15 abr. 2022.

LAO, C. D.; RUFFIN IV, M. T.; NORMOLLE, D.; HEATH, D. D.; MURRAY, S. I.; BAILEY, J. M.; BOGGS, M. E.; CROWELL, J.; ROCK, C. L.; BRENNER, D. E. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, 17 mar. 2006.

LI, B.; LIN, H.; CHEN, D.; WILSON, B. C.; GU, Y. SINGLET OXYGEN DETECTION DURING PHOTSENSITIZATION. <https://doi.org/10.1142/S1793545813300024>, v. 6, n. 1, 1 fev. 2013.

LI, X.; LOVELL, J. F.; YOON, J.; CHEN, X. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology** **2020** **17:11**, v. 17, n. 11, p. 657–674, 22 jul. 2020.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, A. M.; MOISESCU, E. E.; LLANOS, R. DE; GALINDO, F. Development of a Polymeric Film Entrapping Rose Bengal and Iodide Anion for the Light-Induced Generation and Release of Bactericidal Hydrogen Peroxide. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 10162, 1 set. 2022.

LOVELL, T. C.; BRANCHAUD, B. P.; JASTI, R. An Organic Chemist's Guide to Fluorophores – Understanding Common and Newer Non-Planar Fluorescent Molecules for Biological Applications. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 9, p. e202301196, 1 mar. 2024.

LUNELLI, B. H.; ANDRADE, R. R.; ATALA, D. I. P.; MACIEL, M. R. W.; FILHO, F. M.; FILHO, R. M. I. Production of lactic acid from sucrose: Strain selection, fermentation, and kinetic modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 227–237, 27 maio 2010.

LUO, N.; VARAPRASAD, K.; REDDY, G. V. S.; RAJULU, A. V.; ZHANG, J. Preparation and characterization of cellulose/ curcumin composite films. **RSC Advances**, v. 2, n. 22, p. 8483–8488, 28 ago. 2012.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 1 fev. 2001.

_____. Basic principles of photodynamic therapy. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>, v. 5, n. 2, p. 105–129, 17 abr. 2012.

MAHMOOD, K.; ZIA, K. M.; ZUBER, M.; SALMAN, M.; ANJUM, M. N. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 877–890, 1 nov. 2015.

MANESS, P. C.; SMOLINSKI, S.; BLAKE, D. M.; HUANG, Z.; WOLFRUM, E. J.; JACOBY, W. A. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4094–4098, 1999.

MANOUKIAN, O. S.; SARDASHTI, N.; STEDMAN, T.; GAILIUNAS, K.; OJHA, A.; PENALOSA, A.; MANCUSO, C.; HOBERT, M.; KUMBAR, S. G. Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Encyclopedia of Biomedical Engineering**, v. 1–3, p. 462–482, 1 jan. 2019.

MARIA, P.; SANTOS, L.; SANTOS, D. P.; THAIS, R.; SILVA, G.; VICTOR, P.; MORAIS, A.; EMILLIANY, S.; MACHADO, F. USO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E NEGATIVAS RESISTENTES. **Revista Eletrônica da Estácio Recife**, v. 8, n. 1, 17 ago. 2022.

MARRUGAT, S. N.; FLORS, C. Singlet Oxygen. Applications in Biosciences and Nanosciences. *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences*. v. 2, 1 jan. 2016.

MARTINS, M. G. *et al.* Development of polymeric nanoparticles associated with SPION and curcumin: a versatile magnetic and fluorescent platform for Life Science applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 693, p. 133966, 20 jul. 2024.

MARTINS, M. G.; PAIVA, T. F.; GOULART, J. S.; ABREU, C. R. A.; FINOTELLI, P. V.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. Development of a fluorescent PMMA-based polymer material through in-situ incorporation of curcuma extract. **Polymer**, v. 273, p. 125870, 24 abr. 2023.

MERRELL, J. G.; MCLAUGHLIN, S. W.; TIE, L.; LAURENCIN, C. T.; CHEN, A. F.; NAIR, L. S. Curcumin Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanofibers: Diabetic Wound Dressing with Antioxidant and Anti-inflammatory Properties. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 36, n. 12, p. 1149, dez. 2009.

MH, G.; MAS, S.; MFG, R.; EB, C. Terapia fotodinâmica com azul de metileno em linhagem de fibroblastos 3T3 e células de melanoma murino B16-F10. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 7, n. 6, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. 2017.

MOHAN, S.; PANNEERSELVAM, K. Development of polylactic acid based functional films reinforced with ginger essential oil and curcumin for food packaging applications. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 6, p. 4703–4715, 1 dez. 2022.

MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, 1 maio 2016.

NAKAMURA, K.; ISHIYAMA, K.; IKAI, H.; KANNO, T.; SASAKI, K.; NIWANO, Y.; KOHNO, M. Reevaluation of analytical methods for photogenerated singlet oxygen. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 49, n. 2, p. 87–95, set. 2011.

NAKSURIYA, O.; OKONOGI, S.; SCHIFFELERS, R. M.; HENNINK, W. E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, v. 35, n. 10, p. 3365–3383, 1 mar. 2014.

NARDELLO, V.; AUBRY, J. M. Synthesis and properties of a new cationic water-soluble trap of singlet molecular oxygen. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 42, p. 7361–7364, 20 out. 1997.

NAVASCONI, T. R.; REIS, V. N. DOS; FREITAS, C. F.; PEREIRA, P. C. DE S.; CAETANO, W.; HIOKA, N.; LONARDONI, M. V. C.; ARISTIDES, S. M. A.; SILVEIRA, T. G. V. Photodynamic Therapy With Bengal Rose and Derivatives Against *Leishmania amazonensis*. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 8, n. 1, p. 46–50, 2017.

NONELL, S.; FLORS, C. (EDS.). Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences. Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences. v. 1, 2016.

ORTEZ, E. O.; HOSSEINIAN, H.; LÓPEZ, M. J. R.; VERA, A. R.; HOSSEINI, S. Characterization Techniques for Morphology Analysis. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 1–45.

OSKOLKOVA, T. O.; MATIUSHKINA, A. A.; BORODINA, L. N.; SMIRNOVA, E. S.; DADADZHANOVA, A. I.; SEWID, F. A.; VENIAMINOV, A. V.; MOISEEVA, E. O.; ORLOVA, A. O. FRET-Amplified Singlet Oxygen Generation by Nanocomposites Comprising Ternary AgInS₂/ZnS Quantum Dots and Molecular Photosensitizers. **ChemNanoMat**, v. 10, n. 3, 18 set. 2023.

PARK, S.; LEE, S.-Y. Significant enhancement of curcumin photoluminescence by a photosensitizing organogel: An optical sensor for pyrrole detection. **Sensors and Actuators B**, v. 220, p. 318–325, 2015.

PASCHOAL, M. A.; LIN, M.; SANTOS-PINTO, L.; DUARTE, S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 885–890, 1 fev. 2015.

PEDRO, S. N.; VALENTE, B. F. A.; VILELA, C.; OLIVEIRA, H.; ALMEIDA, A.; FREIRE, M. G.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R. Switchable adhesive films of pullulan loaded with a deep eutectic solvent-curcumin formulation for the photodynamic treatment of drug-resistant skin infections. **Materials Today Bio**, v. 22, p. 100733, 1 out. 2023.

PELTONIEMI, H.; ASHAMMAKHI, N.; KONTIO, R.; WARIS, T.; SALO, A.; LINDQVIST, C.; GRÄTZ, K.; SUURONEN, R. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 94, n. 1, p. 5–14, 1 jul. 2002.

PENHA, C. B.; BONIN, E.; SILVA, A. F. DA; HIOKA, N.; ZANQUETA, É. B.; NAKAMURA, T. U.; ABREU FILHO, B. A. DE; CAMPANERUT-SÁ, P. A. Z.; MIKCHA, J. M. G. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 198–202, 1 mar. 2017.

PRICE, M.; REINERS, J. J.; SANTIAGO, A. M.; KESSEL, D. Monitoring Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical Formation with Fluorescent Probes During Photodynamic Therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1177, set. 2009.

PRIYADARSINI, K. I. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091, 1 dez. 2014.

QIAO, Y.; DUAN, L. Curcumin-loaded polyvinyl butyral film with antibacterial activity. **E-Polymers**, v. 20, n. 1, p. 673–681, 1 jan. 2020.

RABELLO, B. R.; GEROLA, A. P.; PELLOSI, D. S.; TESSARO, A. L.; APARÍCIO, J. L.; CAETANO, W.; HIOKA, N. Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 238, p. 53–62, 15 jun. 2012.

RACHMAWATI, H.; BUDIPUTRA, D. K.; MAULUDIN, R. Curcumin nanoemulsion for transdermal application: formulation and evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 4, p. 560–566, 1 abr. 2015.

REICHARDT, C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. **Chemical Reviews**, v. 94, n. 8, p. 2319–2358, 1994.

RODRIGUES, I. A. *et al.* In vitro anti-Leishmania amazonensis activity of the polymeric procyanidin-rich aqueous extract from Syagrus coronata. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 16, p. 3781–3790, 2011.

ROSS HALLETT, F. Scattering and Particle Sizing Applications. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, Second Edition**, p. 2488–2494, 1 jan. 1999.

ROY, S.; PRIYADARSHI, R.; EZATI, P.; RHIM, J. W. Curcumin and its uses in active and smart food packaging applications - a comprehensive review. **Food Chemistry**, v. 375, p. 131885, 1 maio 2022.

ROY, S.; RHIM, J. W. Preparation of bioactive functional poly(lactic acid)/curcumin composite film for food packaging application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1780–1789, 1 nov. 2020.

ROY, S.; RHIM, J.-W. Preparation of antimicrobial and antioxidant gelatin/curcumin composite films for active food packaging application. 2019.

SAKIMA, V. T.; BARBUGLI, P. A.; CERRI, P. S.; CHORILLI, M.; CARMELLO, J. C.; PAVARINA, A. C.; OLIVEIRA MIMA, E. G. DE. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 8, 19 ago. 2018.

SANDERSON, J. Fundamentals of Microscopy. **Current Protocols in Mouse Biology**, v. 10, n. 2, p. e76, 1 jun. 2020.

SANTOS, F. A. DOS; TAVARES, M. I. B. Preparo e caracterização de filmes obtidos a partir de poli(ácido láctico) e celulose microcristalina. **Polímeros**, n. ahead, p. 0–0, 2013.

SHAHINYAN, G. A.; AMIRBEKYAN, A. Y.; MARKARIAN, S. A. Photophysical properties of methylene blue in water and in aqueous solutions of dimethylsulfoxide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 217, p. 170–175, 15 jun. 2019.

SHAO, L.; ZHU, Y.; LIAO, B.; WANG, G.; HUANG, L.; YU, L.; BAI, D. Effects of Curcumin-mediated photodynamic therapy on autophagy and epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, p. 102849, 1 jun. 2022.

SHARMA, M.; DUBE, A.; KUMAR MAJUMDER, S. Antibacterial photodynamic activity of photosensitizer-embedded alginate-pectin-carboxymethyl cellulose composite biopolymer films. **Lasers in Medical Science**, 7 ago. 2020.

SHARMA, R. A. *et al.* Phase I clinical trial of oral curcumin: Biomarkers of systemic activity and compliance. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 20, p. 6847–6854, 15 out. 2004.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Polycationic chitosan-conjugated photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n. 3, p. 577–583, maio 2012.

SINGH, R. S.; KAUR, N.; SINGH, D.; PUREWAL, S. S.; KENNEDY, J. F. Pullulan in pharmaceutical and cosmeceutical formulations: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 231, p. 123353, 15 mar. 2023.

SINGH, S.; DASH, A. K.; AGRAWAL, S. Semisolid Dosage Forms. **Pharmaceutics: Basic Principles and Application to Pharmacy Practice, Second Edition**, p. 341–391, 1 jan. 2024.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 18 jun. 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. S; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. [s.l: s.n.].

SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Brian C. Smith - Google Livros**. 2. ed. [s.l: s.n.].

SOARES LIMA, T.; SILVA DE OLIVEIRA, M. S.; REIS, A. V. F.; PETRILLI, R.; ELOY, J. O. Nanoencapsulation of Methylene-Blue for Enhanced Skin Cancer Cell Phototoxicity and Cutaneous Penetration in Association with Sonophoresis. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, p. 1371, 1 maio 2023.

SOLOVIEVA, A. *et al.* Methylene Blue Solid Alginate Gels for Photodynamic Therapy: The Peculiarities of Production and Controlled Release of the Dye. **Polymers** **2024**, Vol. **16**, Page **2819**, v. 16, n. 19, p. 2819, 5 out. 2024.

SONG, D.; LINDOSO, J. A. L.; OYAFUSO, L. K.; KANASHIRO, E. H. Y.; CARDOSO, J. L.; UCHOA, A. F.; TARDIVO, J. P.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. **Photomedicine and laser surgery**, v. 29, n. 10, p. 711–715, 1 out. 2011.

STOLIK, S.; DELGADO, J. A.; PÉREZ, A.; ANASAGASTI, L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 57, n. 2–3, p. 90–93, 2000.

SUBBUVEL, M.; KAVAN, P. Development and investigation of antibacterial and antioxidant characteristics of poly lactic acid films blended with neem oil and curcumin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 14, p. 51891, 10 abr. 2022.

SWETHA, T. A.; BORA, A.; MOHANRASU, K.; BALAJI, P.; RAJA, R.; PONNUCHAMY, K.; MUTHUSAMY, G.; ARUN, A. A comprehensive review on polylactic acid (PLA) – Synthesis, processing and application in food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 234, p. 123715, 15 abr. 2023.

SZERB, E. I.; CHATTERJEE, S.; DEDA, M. LA; PALERMO, G.; SANCEY, L.; STRANGI, G.; RICCIARDI, L. A luminescent, water-soluble ir(III) complex as a potential photosensitizer for two-photon photodynamic therapy. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 24, 1 dez. 2021.

SZLASA, W.; SUPPLITT, S.; DRĄG-ZALESIŃSKA, M.; PRZYSTUPSKI, D.; KOTOWSKI, K.; SZEWCZYK, A.; KASPERKIEWICZ, P.; SACZKO, J.; KULBACKA, J. Effects of curcumin based PDT on the viability and the organization of

actin in melanotic (A375) and amelanotic melanoma (C32) – in vitro studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 132, p. 110883, 1 dez. 2020.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. DEL; OLIVEIRA, C. S. DE; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; FÁTIMA TURCHIELLO, R. DE; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, 1 set. 2005.

TEODORO, K. B. R. *et al.* Fast Fabrication of Multifunctional PCL/Curcumin Nanofibrous Membranes for Wound Dressings. **ACS Applied Bio Materials**, v. 6, n. 6, p. 2325–2337, 19 jun. 2023.

UMEZAWA, N.; TANAKA, K.; URANO, Y.; KIKUCHI, K.; HIGUCHI, T.; NAGANO, T. Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen. **Angew. Chem. Int. Ed**, v. 38, n. 19, p. 3, 1999.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Edition. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Edition**, 3 maio 2012.

WANG, F.; WANG, R.; PAN, Y.; DU, M.; ZHAO, Y.; LIU, H. Gelatin/Chitosan Films Incorporated with Curcumin Based on Photodynamic Inactivation Technology for Antibacterial Food Packaging. **Polymers 2022, Vol. 14, Page 1600**, v. 14, n. 8, p. 1600, 14 abr. 2022.

WANG, Y.; FENG, Y.; WANG, X.; JI, C.; XIAO, Z.; LUO, Y. Ultrasonication-based preparation of raw chitin nanofiber and evaluation of its reinforcement effect on chitosan film for functionalization with curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 155, p. 110193, 1 out. 2024.

WANG, Y. J.; PAN, M. H.; CHENG, A. L.; LIN, L. I.; HO, Y. S.; HSIEH, C. Y.; LIN, J. K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867–1876, 1 ago. 1997.

WEI, D.; LV, S.; ZUO, J.; ZHANG, S.; LIANG, S. Recent advances research and application of lignin-based fluorescent probes. **Reactive and Functional Polymers**, v. 178, p. 105354, 1 set. 2022.

WEN, F.; LI, P.; YAN, H.; SU, W. Turmeric carbon quantum dots enhanced chitosan nanocomposite films based on photodynamic inactivation technology for antibacterial food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 311, p. 120784, 1 jul. 2023.

WOZNIAK, M.; TANFANI, F.; BERTOLI, E.; ZOLESE, G.; ANTOSIEWICZ, J. A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1082, n. 1, p. 94–100, 26 fev. 1991.

WU, H.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; GAO, B.; LI, Y.; HE, X.; SUN, J.; CHOE, U.; CHEN, P.; BLAUSTEIN, R. A.; YU, L. Chemical Composition of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Ethanol Extract and Its Antimicrobial Activities and Free Radical Scavenging Capacities. **Foods**, v. 13, n. 10, p. 1550, 1 maio 2024.

WU, H.; SONG, Q.; RAN, G.; LU, X.; XU, B. Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 133–141, 1 jan. 2011.

WU, J.; MOU, H.; XUE, C.; LEUNG, A. W.; XU, C.; TANG, Q. J. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 15, p. 34–39, 1 set. 2016.

XIE, L.; JI, X.; ZHANG, Q.; WEI, Y. Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112567, 1 fev. 2022.

XU, YIXIN; LIU, X.; JIANG, Q.; YU, D.; XU, YANSHUN; WANG, B.; XIA, W. Development and properties of bacterial cellulose, curcumin, and chitosan composite biodegradable films for active packaging materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 260, p. 117778, 15 maio 2021.

ZANGIROLAMI, A. C.; CARBINATTO, F.; FILHO, J. D. V.; BAGNATO, V. S.; BLANCO, K. C. Impact of light-activated curcumin and curcuminoids films for catheters decontamination. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 213, p. 112386, 1 maio 2022.

ZHANG, X.; CHEN, Z.; BAO, H.; LIANG, J.; XU, S.; CHENG, G.; ZHU, Y. Fabrication and Characterization of Silk Fibroin/Curcumin Sustained-Release Film. 14 out. 2019.

ZHENG, Q.; LAVIS, L. D. Development of photostable fluorophores for molecular imaging. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 39, p. 32–38, 1 ago. 2017.

ZHOU, Y.; HOLMSETH, S.; HUA, R.; LEHRE, A. C.; OLOFSSON, A. M.; POBLETE-NAREDO, I.; KEMPSON, S. A.; DANBOLT, N. C. The betaine-GABA transporter (BGT1, slc6a12) is predominantly expressed in the liver and at lower levels in the kidneys and at the brain surface. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 302, n. 3, 2012.

ANEXOS

ANEXO I – Princípios das técnicas de caracterizações fotofísicas e físico-químicas

Considerando as diferentes propriedades dos poliméricos citados, faz-se necessário, então, a caracterização dos filmes produzidos visando seleção do material com melhores características visando aplicação dos filmes na TFD. Desta forma, a seguir serão apresentados os fundamentos das principais técnicas utilizadas para caracterização dos materiais produzidos.

I.1. Espectrofotometria de absorção e emissão UV-vis

A espectroscopia é uma técnica analítica que estuda a interação da luz com a matéria, e tem como fundamento a análise da quantidade de radiação produzida ou refletida pela espécie em estudo. No que se refere à espectrofotometria de absorção do UV-vis, a região de interesse é a região visível do espectro eletromagnético, que corresponde à faixa aproximada de 380 a 780 nm. Esse espectro pode ser dividido, ainda, nas faixas referentes à cada cor observada pelo olho humano, como exemplificado pela Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Comprimentos de ondas do espectro visível

Comprimento de onda (nm)	Cor observada
400–435	Violeta
435–480	Azul
480–490	Azul-esverdeada
490–500	Verde-azulada
500–560	Verde
560–580	Amarela-esverdeada
580–595	Amarela
595–650	Laranja
650–750	Vermelha

Adaptado de (Skoog *et al.*, 2006)

Os espectros de absorção fundamentalmente representam as transições eletrônicas para estados de níveis energéticos mais elevados. Dado um comprimento de onda adequado para a excitação do elétron, este absorve a energia e transiciona para um estado de maior energia. Essa absorção de energia e consequente transição energética é, então, identificada pelo espectrofotômetro, e a partir de um intervalo de comprimento de onda é obtido o espectro de absorção.

A absorção de uma solução pode ser calculada a partir da intensidade de luz fornecida para a amostra, como exemplificado pela Equação 1.

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad \text{Equação 1 - Cálculo da absorção}$$

Onde, A = Absorção (adimensional),

I_0 = intensidade da luz incidente na amostra

I = intensidade da luz transmitida através da amostra

Quando relacionada à concentração de moléculas na solução, a absorção pode ser calculada utilizando-se a lei de Lambert-Beer, exemplificada pela Equação 2.

$$A = \epsilon Lc \quad \text{Equação 2 - Lei de Lambert-Beer}$$

Onde, A = Absorção (adimensional),

ϵ = coeficiente de absorvidade molar ($M^{-1}cm^{-1}$)

L = caminho óptico (cm)

c = concentração da solução ($molL^{-1}$)

A espectroscopia de emissão, por sua vez visa a obtenção de dados de fluorescência da espécie em estudo. A fluorescência molecular é medida excitando-se a amostra no comprimento de onda de absorção/excitação, e analisando o espectro de emissão obtido em comprimentos de onda mais altos, denominados comprimentos de onda de fluorescência (Skoog *et al.*, 2006).

I.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de espectroscopia que tem como região de interesse o intervalo do comprimento de onda infravermelho, tipicamente na região de 4000 a 400 cm^{-1} ; Diferentemente da espectroscopia UV-vis, na técnica de FT-IR é comum que o espectro seja plotado em função da transmitância (T), que é definida como a porcentagem de luz transmitida pela amostra, é calculada pela Equação 3 e do número de onda, W, definido pela Equação 4 como segue (Smith, 2011):

$$\%T = 100 \cdot \left(\frac{I}{I_0}\right) \quad \text{Equação 3 - Porcentagem da transmitância}$$

Onde, %T = porcentagem da transmitância (%)

I = intensidade da luz transmitida através da uma amostra

I_0 = intensidade da luz incidente na amostra

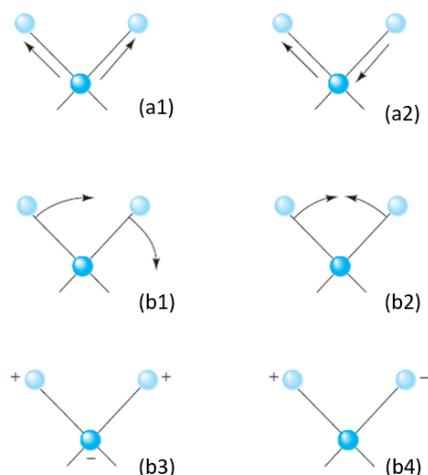
$$W = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Equação 4 - Definição do número de onda}$$

Onde, W = número de onda (cm^{-1})

λ = comprimento de onda (cm)

As bandas características de absorção da espectroscopia na região do infravermelho identificam as vibrações moleculares associadas aos grupos funcionais das moléculas (Berthomieu e Hienerwadel, 2009). As vibrações moleculares podem ser classificadas como de estiramento (a), que podem ser simétrica (a1) ou assimétrica (a2) e de deformação angular, que podem ser de balanço no plano (b1), tesoura no plano (b2), oscilação fora do plano (b3) e torção fora do plano (b4), como exemplificado pela Figura 37 a seguir.

Figura 37 – Tipos de vibrações moleculares: simétrica (a1), assimétrica (a2), deformação angular, de balanço no plano (b1), tesoura no plano (b2), oscilação fora do plano (b3) e torção fora do plano (b4)



Fonte: Adaptado de (Skoog *et al.*, 2006)

Os acessórios empregados durante a técnica de FT-IR caracterizam diferentes metodologias de obtenção do espectro infravermelho das amostras. Dentre alguns acessórios comumente utilizados, a configuração de reflectância total atenuada (ATR), caracteriza na obtenção de dados via reflectância total do feixe de luz incidente à amostra. Essa metodologia tem como fundamento a existência de meios com diferentes índices de refração e no ângulo crítico de refração para a superfície em estudo. Algumas das vantagens dessa configuração em relação a outras existentes é que ela pode ser facilmente utilizada para o estudo de polímeros, pois não requer que o material esteja solubilizado, na forma líquida, ou em pastilhas, e na simplicidade de uso do equipamento nesta configuração (Smith, 2011).

I.3. Microscopias Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia é técnica espectroscópica utilizada para obtenção de imagens magnificadas de moléculas, determinação de propriedades ópticas dos materiais e para análises de filmes polimérico finos (Ortez *et al.*, 2022; Sanderson, 2020). A microscopia utiliza microscópios ópticos e eletrônicos. Dentre os microscópios ópticos existem os de luz polarizada, de fluorescência, microscópio de campo escuro e outros. Já os microscópios eletrônicos podem ser classificados como de transmissão ou de varredura eletrônica (Khangaonkar, 2010).

Dentre alguns tipos de microscópios ópticos, existe o microscópio de luz invertida. Esse equipamento permite a visualização da amostra a partir da partir inferior do solvente ou meio de cultura (Abramowitz *et al.*, 2018). Por sua vez, microscópios ópticos de luz polarizada, como diz o nome, utilizam da luz polarizada para investigação de materiais. Em estudos de polímeros, sabe-se que esta é uma técnica recomendada devido a capacidade desse tipo de ferramenta em identificar a anisotropia de materiais, ou seja, de identificar diferentes características em diferentes planos cristalográficos (Grubb, 2012).

A técnica de eletrônica de varredura são comumente empregadas na caracterização morfológica de matérias poliméricos e determinação de orientações cristalográficas das estruturas em análise (Fried, 2014; Khangaonkar, 2010).

O fundamento do funcionamento da técnica de MEV é a existência de dois eletrodos conectados a uma fonte de alta voltagem onde a partir da aplicação de um campo elétrico há a produção de um feixe de elétrons que quando impacta a superfície a ser analisada faz com que a superfície libere elétrons, produzindo, desta forma, imagens tridimensionais da superfície (Ortez *et al.*, 2022).

I.4. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico é uma técnica capaz de medir diferentes tamanhos e sua distribuição em soluções ou suspensões através do espalhamento da luz incidente sobre a amostra. A técnica requer baixa concentração de partículas, tem seu princípio de funcionamento baseado no movimento browniano das partículas em correlação com a equação de Stokes–Einstein (Kumar e Dixit, 2017). Essa técnica utiliza um laser monocromático que incide sobre a amostra e as flutuações e espalhamento da luz são analisados para obtenção do tamanho e distribuição de partículas (Ross Hallett, 1999; Singh, Dash e Agrawal, 2024).

I.5. Difração de raios-X (DRX)

Segundo Callister, define-se por material cristalino

“um material no qual os átomos estão posicionados segundo um arranjo periódico ou repetitivo ao longo de grandes distâncias atômicas; isto é, existe uma ordem de longo alcance, tal que, quando ocorre solidificação, os átomos se posicionam em um

padrão tridimensional repetitivo, no qual cada átomo está ligado aos seus átomos vizinhos mais próximos.”

Esse arranjo periódico dos átomos é organizado em planos cristalográficos, que são orientados pelos índices de Miller seguindo a estrutura de valores (hkl). Os índices de Miller são números inteiros obtidos a partir da origem da célula unitária e um novo plano construído paralelamente à esta origem.

A difração de raios-x (DRX) é uma técnica tem como base a lei de Bragg, exemplificada pela à Equação 5 exemplificada a seguir.
Por fundamento, a lei de Bragg estabelece uma relação entre o comprimento de onda dos raios X e o espaçamento interatômico com o ângulo do feixe difratado.

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin(\theta) \qquad \text{Equação 5 - Lei de Bragg}$$

Onde, n = número inteiro do comprimento de onda;

λ = comprimento de onda do feixe de raios-x incidente (nm);

d_{hkl} = distância entre planos os cristalinos paralelos identificados pelos índices de Miller (Å);

θ = ângulo entre os raios incidentes e os planos de difração (°)

O DRX é uma técnica analítica que estuda o grau de cristalinidade de sólidos amorfos e semi-cristalinos. A partir desta técnica é possível a obtenção do difratograma, que contém informações como o grau de cristalinidade e tamanho do grão (Adams, 2005; Ali, Chiang e Santos, 2022; Bergström, 2015; Bourakadi, El, Bouhfid e Qaiss, 2021).