

**Universidade Federal de Ouro Preto**  
**Escola de Farmácia**  
**Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Nanocápsulas e Nanoemulsões contendo  
antifúngicos: desenvolvimento farmacotécnico,  
caracterização e avaliação biológica em modelo  
de candidíase sistêmica**

**Pollyanna Álvaro Spósito**

**Ouro Preto - MG**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade Federal de Ouro Preto**  
**Escola de Farmácia**  
**Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Nanocápsulas e Nanoemulsões contendo  
antifúngicos: desenvolvimento farmacotécnico,  
caracterização e avaliação biológica em modelo  
de candidíase sistêmica**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Escola de Farmácia da  
Universidade Federal de Ouro Preto, como  
requisito parcial à obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Carla F.  
Mosqueira  
Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de  
Medeiros Teixeira

**Ouro Preto - MG**

**2008**

---

Aluna: Pollyanna Álvaro Spósito

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

---

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira

**Local de realização do projeto:**

Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia/ Departamento de Farmácia – Escola de Farmácia da UFOP.

*Pollyanna Álvaro Spósito*

**Este trabalho contou com a colaboração de:**

Dr. José Mário Carneiro Vilela

**Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC- MG**

Dra. Margareth Spangler de Andrade

**Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC- MG**

Dra. Cláudia Martins Carneiro

**Departamento de Análises Clínicas - UFOP**

Dra. Jacqueline de Souza

**Departamento de Farmácia - UFOP**

## DEDICATÓRIA

*Dedico essa dissertação, a DEUS, pela vida, pelas graças e por sempre caminhar ao meu lado. Aos meus pais, Sinvaldo e Mariza, pelo exemplo de vida, pelo amor e apoio incondicionais. À minha irmã Juliana, pelo carinho e incentivo. Ao Gustavo, pelo amor, companheirismo. Às minhas irmãs querubinas pelo apoio constante.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me permitido realizar este trabalho, caminhando ao meu lado em todas as horas difíceis e pela oportunidade de conviver com pessoas muito especiais.

Aos meus pais e a Ju, por tudo que sou. Vocês são o meu maior orgulho.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vanessa Carla F. Mosqueira, pelos ensinamentos transmitidos, pelas oportunidades concedidas, pela paciência, confiança, pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira pela valiosa colaboração neste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cláudia Martins Carneiro pela atenção e interesse dispensados ao longo deste trabalho e por sua orientação nas análises histológicas.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jacqueline de Souza pela grandiosa colaboração.

Ao professor Roney, por permitir a realização dos experimentos de contagem global de leucócitos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rachel Caligiorne e o Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa pelo fornecimento da cepa de *Candida albicans*.

À Margareth Spangler, pela oportunidade de realização dos experimentos de microscopia de força atômica (AFM) no Centro tecnológico de Minas Gerais (CETEC).

Ao Vilela, pela colaboração na execução das imagens de AFM, pela dedicação, paciência e atenção dispensada.

Ao Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), por permitir a realização dos experimentos de radiação dos animais. Agradeço principalmente aos funcionários Maria Aparecida, Rogério e Dante pela grandiosa atenção.

Aos professores Bibó, Andréa, Neila e Suzana pelas “caronas” para transportar os animais até Belo Horizonte.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelas contribuições na minha formação profissional e em especial, a Prof<sup>a</sup>. Dra. Dênia pelo grande esforço e dedicação para que nosso programa de pós-graduação fosse reconhecido.

Aos funcionários da escola de farmácia, em especial a Regiane (laboratório de microbiologia), Wilson e Cristina (biotério).

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia: Giane, Eliana, Gabriela, Juliana, João, Raquel, Lílian, Flávia pela ótima convivência, amizade e auxílio prestados, em especial Carina, Diego e Elaine por toda força e contribuições no meu trabalho. Agradeço a Taynara, pela grande ajuda nos experimentos *in vivo*.

À Aline, por me acompanhar e ajudar nos experimentos, mas, sobretudo pela amizade e incentivo durante todo meu mestrado.

Às minhas irmãs de república, pelo apoio, compreensão e ajuda nas horas difíceis.

Ao Gu, pelo amor, incentivo e por estar ao meu lado durante todo o desenvolvimento do meu trabalho.

À minha amiga Zilma, pelo companheirismo, incentivo e grandes momentos de alegria e à minha amiga Ana Paula, pela contribuição para minha entrada no laboratório e na iniciação científica.

À Universidade Federal de Ouro Preto, CAPES, CNPq e NANOBIOMG/FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram pela realização dessa conquista.

Obrigada!

*“Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.” (Isaac Newton)*



# **RESUMO**

## RESUMO

A frequência de infecções sistêmicas por espécies de *Candida* tem aumentado nos últimos anos, principalmente, em pacientes imunossuprimidos. Os fármacos disponíveis para o tratamento são limitados, tanto pelo espectro de ação quanto pelos efeitos adversos. A associação de antifúngicos a nanovetores é uma estratégia para melhorar a eficácia e alterar a biodistribuição dos fármacos no organismo reduzindo os efeitos tóxicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanocápsulas (NC) e nanoemulsões (NE) de fluconazol (FCZ), cetoconazol (CTZ) e miconazol (MCZ) e avaliar essas nanoestruturas em modelo de candidíase sistêmica. As NC e NE foram obtidas pelo método de nanoprecipitação (Fessi *et al.*, 1989). A concentração de fármaco utilizada variou de 1 a 5mg/mL na suspensão coloidal. A porcentagem de encapsulação foi determinada pelo método ultrafiltração/centrifugação e o doseamento dos fármacos por espectrometria no ultravioleta. Os maiores valores de encapsulação foram obtidos com NC convencionais de PCL, sendo que os valores máximos obtidos foram de 48, 97 e 96% para o FCZ, CTZ e MCZ, respectivamente e 37% para NC furtivas de FCZ. A distribuição de tamanho das nanopartículas, determinada por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) e por microscopia de força atômica (MFA), ficou entre 190-310nm e todas as formulações apresentaram-se monodispersas. O potencial zeta das NC e NE, determinado por microeletroforese associada à anemometria do laser doppler (ADL), variou com a adição dos fármacos, indicando, no caso do MCZ e CTZ, uma forte influência na superfície dos carreadores convencionais. Essa influência foi muito evidente no caso das NC furtivas de PLA-PEG contendo FCZ, onde valores de +2mV foram obtidos, evidenciando-se tanto uma influência do FCZ quanto das cadeias de PEG sobre a superfície. As imagens obtidas por MFA das NC e NE mostraram estruturas esféricas e bastante polidispersas em relação a determinação de tamanho feita por PCS. As NC mostraram capacidade de achatamento sobre a mica, evidenciado por MFA. A associação do MCZ às NC e NE não alterou significativamente a relação diâmetro/altura em comparação com as NC e NE vazias, enquanto a associação do FCZ aumentou essa relação. A inclusão do MCZ em altas concentrações nas NC resultou em modificação das estruturas não carregadas. O uso de glutaraldeído alterou a morfologia das nanoestruturas originais contendo MCZ. A avaliação do perfil de liberação do FCZ a partir dos carreadores foi realizado por dois métodos, diálise direta em salina e método sink externo em octanol, respectivamente. O perfil de

liberação no octanol do FCZ foi semelhante para as NC e NE, sendo que a liberação foi completa em 48h. A liberação do FCZ em salina foi semelhante para o FCZ livre e para o FCZ nanoestruturado. Entretanto, diferenças significativas foram observadas na quantidade de FCZ liberado, sendo que as NC liberaram menos que as NE. Em 6h a liberação do FCZ dos sistemas foi completada em salina, devido à hidrofília do FCZ.

A avaliação da eficácia *in vivo* das diferentes formulações e fármacos foram realizadas em modelo de candidíase disseminada em animais imunossuprimidos com radiação gama e, posteriormente infectadas com um inóculo de *Candida albicans* isolado de paciente sintomático. Foram avaliados diferentes parâmetros como a sobrevida, o peso, a presença da levedura no sangue e em alguns órgãos e alterações histológicas provocadas pela infecção e pelo tratamento. O tamanho do inóculo utilizado na infecção dos animais e o tempo para início do tratamento influenciaram significativamente na sobrevida dos animais e no nível de invasão dos órgãos. Esse parâmetro foi decisivo para a distinção entre diferentes esquemas terapêuticos e formulações. Em inóculos superiores a  $10^7$  UFC a mortalidade dos animais foi de 100% com tempo médio de sobrevida (TMS) inferior a 13 dias e todos os tratamentos e doses foram ineficazes. Em inóculos inferiores a  $10^4$  UFC a sobrevida foi próxima de 100% e o TMS superior a 60 dias, mesmo em animais imunossuprimidos, independentemente do uso ou não de tratamento. Os inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  UFC permitiram uma melhor análise entre os grupos e entre as formulações de FCZ, sendo que os dados indicam que a formulação de NC furtiva contendo FCZ foi a mais eficaz comparada ao uso do FCZ livre em termos de sobrevida. O MCZ e o CTZ não foram eficazes no tratamento deste isolado clínico de *C. albicans* em camundongos, nem na forma livre nem na forma encapsulada. O tratamento com NC de FCZ proporcionou uma invasão menos significativa dos órgãos, principalmente dos rins em comparação aos animais não tratados.

Em conclusão, nesse trabalho foram produzidos e caracterizados, sob o ponto de vista físico-químico, nanocarreadores contendo fármacos antifúngicos azólicos. Dentre eles, o FCZ associado às NC de PLA-PEG, ditas de circulação sanguínea prolongada, foi o mais eficaz no aumento da sobrevida de animais imunossuprimidos com candidíase disseminada. Esse resultado é provavelmente atribuído à capacidade das NC furtivas de 200nm de alterar a distribuição do FCZ no organismo, devido principalmente à sua circulação sanguínea prolongada, bem como a sua capacidade de acúmulo em focos infecciosos.

# ***ABSTRACT***

## ABSTRACT

The frequency of systemic fungal infections caused by *Candida* species in immunocompromised patients has been increased in the latter years. The available drugs are limited by their side effects and by the increasing of *Candida* resistance. The association of antifungal drugs and nanovectors is an interesting strategy to improve the drug targeting. It enhances the efficacy and alters the bioavailability in order to protect selected organs from side effects. The main goal of this work is the development and characterization of nanocapsules (NC) and nanoemulsions (NE) containing fluconazole (FCZ), ketoconazole (CTZ) e miconazole (MCZ) and the evaluation of them in systemic candidiasis infection in leukopenic mice. The nanocarriers were prepared by the previously described method of nanoprecipitation (Fessi et al., 1989). The colloidal suspensions were produced with 1-5mg/mL of the drugs. The percentage of drug loading in the nanocarriers, determined by ultrafiltration/centrifugation method and assayed by UV spectrometry, was 48, 97 and 96% for FCZ, CTZ and MCZ in polycaprolactone NC, respectively; and 37% in PLA-PEG NC. The mean size of the nanocarriers and the polydispersity index were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) and atomic force microscopy (AFM). The mean size ranged between 190-310nm for all formulations and the polydispersity index was lower than 0.3, indicating monodisperse populations. The zeta potential was determined by laser doppler anemometry (LDA). It was changed after drug association, particularly in the case of MCZ and CTZ associated with PLC NC. A strong effect of FCZ and PEG chains was observed in zeta potential of PLA-PEG NC, where values of +2mV were obtained, putting in evidence the shielding effect of hydrophilic PEG at the NC interface. The AFM images showed spherical nanostructures more polydispersed than those analyzed by PCS and they had tendency to flatten on mica plates, under tip pressure. The association of MCZ and CTZ to the NC and NE produced no significant changes in the diameter/height ratio compared with unloaded NC and NE. However, FCZ increased this ratio. The MCZ NC showed different structures around NC that have become thick when drug concentration increased. The glutaraldehyde produced significant changes in MCZ NC structures. The release of FCZ from NC and NE was performed by two methods: direct dialysis and external sink method in saline and octanol, respectively. The release profile of FCZ in octanol was similar for both systems and was completed in 48h. The release in saline was inverse compared to octanol, but similar for all FCZ formulations. However, the

amount of FCZ released from NC was lower than the others. In the first 6h all FCZ was released confirming its hydrophilic nature.

The evaluation of efficacy *in vivo* of the different formulations with antifungal drugs was performed in immunocompromised gamma irradiated mice infected with *Candida albicans* clinical isolate. Several parameters were followed such as: survival, body weight, yeast presence in the bloodstream, organs and the histological changes induced by infection/treatment. The inoculum's size and the time to begin the treatment had a dramatic influence on survival and in the fungal burden in organs. Inoculum's size was decisive in order to distinguish formulation differences. The inoculum size higher than  $10^7$  CFU produced 100% mortality with mean time survival (MTS) lower than 13 days, and all drugs and doses were ineffective. The inoculum size lower than  $10^4$  CFU increased the survival to 100% in all groups and MST > 60 days, even in non-treated mice. The  $10^5$  and  $10^6$  CFU allowed better differentiation between the groups and between FCZ formulations. In this protocol, the results indicated that long-circulating PLA-PEG NC was the most efficacious in terms of survival. MCZ and CTZ in all formulations failed to produce any effect in increasing survival using this clinical isolate of *C. albicans* in mice. The FCZ treatment reduced the fungal burden in organs, particularly in kidneys compared to untreated animals.

In conclusion, in the present work, nanocarriers containing antifungal azole drugs were produced and characterized in detail under physicochemical aspects. Among them, FCZ associated to the long-circulating PLA-PEG NC increased significantly the survival than free FCZ in immunosuppressed mice infected with disseminated candidiasis. This result is probably attributed to the property of the 200nm stealth nanocapsules to alter FCZ bioavailability, because they are long-circulating in blood and have the ability of accumulation in infectious foci.

## LISTA DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b>  | <i>Candida albicans</i> . Blastoconídio (A) e pseudo-hifas (B)....   | 5  |
| <b>Figura 2.</b>  | Alvos celulares para as diferentes classes de fármacos antifúngicos representados esquematicamente em fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma célula de levedura..... | 10 |
| <b>Figura 3.</b>  | Representação esquemática de alvos celulares para as diferentes classes de fármacos antifúngicos.....  | 10 |
| <b>Figura 4.</b>  | Estrutura química do Miconazol.....  | 12 |
| <b>Figura 5.</b>  | Estrutura química do Cetoconazol.....  | 13 |
| <b>Figura 6.</b>  | Estrutura química do Itraconazol.....  | 15 |
| <b>Figura 7.</b>  | Estruturas químicas dos novos triazólicos: voriconazol (A), posaconazol (B) e ravuconazol (C).....   | 16 |
| <b>Figura 8.</b>  | Estrutura química do Fluconazol.....   | 16 |
| <b>Figura 9.</b>  | Representação esquemática de nanocápsulas (a, b), nanoemulsões (c) nanoesferas (d, e, f).....  | 20 |
| <b>Figura 10.</b> | Método empregado na preparação de nanocápsulas baseado na precipitação do polímero pré-formado.....  | 25 |
| <b>Figura 11.</b> | Desenho esquemático e Princípio de Funcionamento da MFA.....   | 27 |
| <b>Figura 12.</b> | Representação esquemática de uma partícula de superfície positiva com uma camada de íons negativos adsorvidos na camada de Stern.....  | 29 |
| <b>Figura 13.</b> | Preparação do miconazol base livre a partir do nitrato de miconazol.....   | 38 |
| <b>Figura 14.</b> | Etapas da Preparação de Nanocápsulas e Nanoemulsões.....   | 40 |
| <b>Figura 15.</b> | Dilatação por aquecimento a 42°C da veia lateral da cauda e tratamento dos camundongos.....  | 54 |
| <b>Figura 16.</b> | Suspensões coloidais de nanocápsulas (A) e nanoemulsões (B) contendo fluconazol.....   | 60 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 17.</b> | Formas de associação do FCZ em NC-PCL (A), NC-PLA-PEG (B) e NE (C).....   | 66 |
| <b>Figura 18.</b> | Espectro de absorção do fluconazol na região do UV apresentando os picos de absorção máxima.....  | 67 |
| <b>Figura 19.</b> | Espectro de absorção dos excipientes utilizados na preparação das formulações nanoestruturadas na região do UV apresentando o pico de absorção da NE e NC após dissolução completa em acetonitrila (1:100)..... | 67 |
| <b>Figura 20.</b> | Curva de Calibração do fluconazol em acetonitrila (A), acetonitrila:salina 0,9% (1:1) (B), octanol:etanol (1:1) (C) em comprimento de onda igual a 261nm;.....  | 68 |
| <b>Figura 21.</b> | Diâmetro médio de NC e NE durante estocagem a 4°C por 4 meses determinado por PCS.....  | 70 |
| <b>Figura 22.</b> | Potencial zeta de NC e NE durante estocagem a 4°C por 4 meses determinado por ADL.....  | 71 |
| <b>Figura 23.</b> | Imagens de altura das nanocápsulas brancas obtidas por AFM. A) imagem de altura e B) imagem tridimensional das partículas.....  | 73 |
| <b>Figura 24.</b> | Imagens de altura das nanoemulsões brancas obtidas por AFM. A) imagem de altura e B) imagem tridimensional das partículas.....  | 74 |
| <b>Figura 25.</b> | Imagens de nanoemulsões de fluconazol 5mg/mL obtidas por AFM. A) imagem de altura (A.1 e A.2 e imagem de amplitude) e B) imagem tridimensional das partículas.....  | 75 |
| <b>Figura 26.</b> | Imagens de nanocápsulas de fluconazol 5mg/mL obtidas por AFM. A) imagem de altura (A.1 e A.2 imagem de fase) e B) imagem tridimensional das partículas.....   | 76 |
| <b>Figura 27.</b> | Perfis topográficos (A e B) e Imagens de nanocápsulas brancas de PCL (C e D), apresentando a relação diâmetro/altura das partículas (~10). Área: 3,2 µm x 3,2 µm.....   | 77 |
| <b>Figura 28.</b> | Perfis topográficos (A e B) e Imagens de nanoemulsões brancas (C e D), apresentando a relação diâmetro/altura (~11). Área: 4,5µm x 4,5 µm.....  | 77 |



|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 29.</b> | Perfis topográficos (A e B) e Imagens de nanocápsulas fluconazol 5mg/mL de PCL (C e D), apresentando a relação diâmetro/altura das partículas (~18). Área: 3,3 µm x 3,3 µm.....  | 78 |
| <b>Figura 30.</b> | Perfis topográficos (A e B) e Imagens de nanoemulsões de fluconazol 5mg/mL (C e D), apresentando a relação diâmetro/altura das partículas (~22). Área 5,0 µm x 5,0 µm.....   | 78 |
| <b>Figura 31.</b> | Cinética de liberação <i>in vitro</i> de NC e NE de fluconazol a 37°C, em n-octanol. Em (A) perfil total, em (B) perfil até 60 minutos. Formulações contendo 1mg/mL de FCZ, incubadas em meio na proporção de 1 mL da formulação por 0,4mL de octanol..... | 80 |
| <b>Figura 32.</b> | Cinética de liberação <i>in vitro</i> de NC e NE de fluconazol a 37°C, em meio aquoso isotônico (NaCl 0,9% p/v) Formulações contendo 1mg/mL de FCZ, incubadas em meio na proporção de 15mL da formulação por 300mL de salina.....                          | 82 |
| <b>Figura 33.</b> | Espectro de absorção do cetoconazol na região do UV apresentando o pico de absorção em acetonitrila (100µg/mL).....  | 85 |
| <b>Figura 34.</b> | Espectros de absorção do nitrato de miconazol e do miconazol base na região do UV apresentando os picos de absorção em acetonitrila (100µg/mL).....  | 86 |
| <b>Figura 35.</b> | Curva de Calibração em acetonitrila do cetoconazol a 260nm (A) e do miconazol base a 272nm (B); R <sup>2</sup> = coeficiente de correlação.....  | 86 |
| <b>Figura 36.</b> | Formas de associação do MCZ nas nanocápsulas (A) e nas nanoemulsões (B).....   | 88 |
| <b>Figura 37.</b> | Imagens de nanocápsulas de cetoconazol 1mg/mL (A e B) e 2mg/mL (C e D) obtidas por AFM. Área: 10µmx 10µm. (A e C) imagens de altura e (B e D) de fase.....   | 92 |
| <b>Figura 38.</b> | Imagens de nanocápsulas brancas (A e B), NC de miconazol base 1mg/mL (Ce D) e 5mg/mL (E e F) obtidas por AFM. (A, C e E) imagens de altura e (B, D e F) imagens de fase. Área: 5µm x 5µm.....  | 93 |
| <b>Figura 39.</b> | Imagens de nanocápsulas de miconazol base 5mg/mL (A e B) fixadas pelo glutaraldeído obtidas por AFM. Área: 10µm x 10µm.....  | 94 |

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| <b>Figura 40.</b> | Imagens de nanoemulsões de miconazol base 1mg/mL (A e B) e 5mg/mL (C e D) fixadas com glutaraldeído obtidas por AFM. (A e C) imagens de altura e (B e D) imagens de amplitude. Área: (A e B) 3µm x 3µm e (C e D) 6µm x 6µm.....   | 95  |
| <b>Figura 41.</b> | Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos infectados via intravenosa com diferentes inóculos de <i>Candida albicans</i> .....   | 102 |
| <b>Figura 42.</b> | Exemplar de placa de agar sabouraud dextrosado mostrando o padrão de crescimento de <i>C. albicans</i> . .....  | 103 |
| <b>Figura 43.</b> | Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PCL-NC i.v./s.c. ou FCZ livre i.v./s.c. 1h depois da infecção com <i>Candida albicans</i> (10 <sup>7</sup> UFC) durante 5 dias com 15mg/kg/dia.....   | 104 |
| <b>Figura 44.</b> | Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PCL-NC, FCZ-PLA-PEG ou FCZ livre 24h depois da infecção com <i>Candida albicans</i> (10 <sup>7</sup> UFC) durante 5 dias com 15mg/kg/dia via i.v.....   | 106 |
| <b>Figura 45.</b> | Rim normal (A) de animal do grupo controle irradiado e rim de animal infectado com <i>Candida albicans</i> não tratado (B).....   | 108 |
| <b>Figura 46.</b> | Fotomicrografias do fígado (A e B) e rim (C e D) dos animais pertencentes ao grupo controle irradiado não infectado, necropsiados 10 dias após irradiação. Observa-se, em ambos os órgãos, aspecto histológico normal após irradiação. Hematoxilina e Eosina.....   | 109 |
| <b>Figura 47.</b> | Fotomicrografias do cérebro (A e B), fígado (C e D) e coração (E e F) de animais pertencentes ao grupo infectado não tratado necropsiados sete dias após a infecção. Observa-se a presença de congestão em B, D e F (setas), hifas em B e F (cabeça de seta), esteatose em D e degeneração hialina (*) em F. Hematoxilina e Eosina..... | 110 |
| <b>Figura 48.</b> | Fotomicrografias do rim de animais pertencentes aos grupos infectado não tratado (A e B) e tratado após 1 hora de infecção (C e D) necropsiados sete dias após a infecção.....  | 111 |

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>Figura 49.</b> | Fotomicrografias do rim de animais pertencentes aos grupos infectado não tratado necropsiados após 1 dia de infecção (A e B) e tratado (C e D) - após 24 horas de infecção - necropsiados após 7 dias de infecção. Observa-se a presença de processo inflamatório em B e hifas em D (cabeça de seta). Hematoxilina e Eosina..... | 113 |
| <b>Figura 50.</b> | Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com MCZ-PCL-NC, MCZ-PLA-PEG, MCZ livre 15mg/kg/dia, durante 5 dias por via <i>i.v.</i> 1h após infecção com <i>Candida albicans</i> ( $10^7$ UFC). .....   | 115 |
| <b>Figura 51.</b> | Necrose na cauda dos animais causada pela administração do MCZ livre.....  | 117 |
| <b>Figura 52.</b> | Sobrevida e variação do peso corporal de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com CTZ-PCL-NC, CTZ-PLA-PEG, CTZ livre 20mg/kg/dia, durante 5 dias por via <i>i.v.</i> 6h após infecção com <i>Candida albicans</i> ( $10^6$ UFC).....   | 118 |
| <b>Figura 53.</b> | Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PLA-PEG 15mg/kg/dia, durante 5 dias por via <i>i.v.</i> 6h após infecção com <i>Candida albicans</i> ( $10^6$ UFC). .....  | 120 |
| <b>Figura 54.</b> | Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PCL-NC, FCZ-PLA-PEG-NC ou FCZ livre 6h depois da infecção com <i>Candida albicans</i> ( $10^4$ UFC) durante 5 dias com 15mg/kg/dia ou 50mg/kg/dia via <i>i.v.</i> .....                                      | 122 |
| <b>Figura 55.</b> | Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PLA-PEG-NC ou FCZ livre 6h depois da infecção com <i>Candida albicans</i> ( $10^5$ UFC) durante 5 dias com 50mg/kg/dia via <i>i.v.</i> .....   | 126 |

## LISTA DE TABELAS

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| <b>Tabela 1.</b>  | Padronização dos protocolos de imunossupressão com ciclofosfamida.....  | 46  |
| <b>Tabela 2.</b>  | Caracterização físico-química das nanoemulsões preparadas com diferentes concentrações de fluconazol...                                     | 60  |
| <b>Tabela 3.</b>  | Caracterização físico-química das nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona preparadas com diferentes concentrações de fluconazol..... | 61  |
| <b>Tabela 4.</b>  | Caracterização físico-química das nanocápsulas de PLA-PEG (furtivas).....   | 64  |
| <b>Tabela 5.</b>  | Características físico-químicas de NC e NE durante estocagem a 4°C por 4 meses.....   | 72  |
| <b>Tabela 6.</b>  | Tamanho médio e razão diâmetro/altura das formulações NC e NE obtidas por PCS e AFM.....  | 75  |
| <b>Tabela 7.</b>  | Caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas e nanoemulsões contendo miconazol base.                                       | 87  |
| <b>Tabela 8.</b>  | Caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas e nanoemulsões contendo cetoconazol.....                                      | 89  |
| <b>Tabela 9.</b>  | Análise do tamanho médio das formulações de NC e NE de miconazol base por PCS e AFM.....  | 96  |
| <b>Tabela 10.</b> | Contagem global de leucócitos em camundongos Swiss....  | 100 |
| <b>Tabela 11.</b> | Presença de <i>C. albicans</i> no sangue dos animais 48h após o final do tratamento.....  | 105 |
| <b>Tabela 12.</b> | Cultivo de sangue e macerado de órgãos 48horas após o final do tratamento.  | 119 |
| <b>Tabela 13.</b> | Cultivo de sangue e macerado de órgãos 48horas após o final do tratamento.....  | 121 |
| <b>Tabela 14.</b> | Cultivo de sangue e macerado de órgãos 48horas após o final do tratamento.....  | 123 |
| <b>Tabela 15.</b> | Presença de <i>C. albicans</i> no sangue dos animais após 25 dias da infecção.....  | 124 |
| <b>Tabela 16.</b> | Sobrevida e tempo médio de sobrevida após imunossupressão com radiação gama e ciclofosfamida.....   | 125 |

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| <b>Tabela 17.</b> | Presença de <i>C. albicans</i> no sangue dos animais após 30 dias, sobrevida e tempo médio de sobrevida. .... | 127 |
| <b>Tabela 18.</b> | Sobrevida e TMS com relação ao tamanho do inóculo.....  | 128 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\zeta$  – Potencial zeta

$\gamma$  - gama

Å – Ângstron

**ALD** – Anemometria do Laser Doppler

**BHI** – Infusão Cérebro coração

**CDTN** – Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear

**CETEC-MG** - Centro Tecnológico de Minas Gerais

**Co<sup>60</sup>** – Cobalto-60

**CTZ** – Cetoconazol

**CTZ-PCL-NC** - Nanocápsula de cetoconazol convencional

**CTZ-PLA-PEG** - Nanocápsula de cetoconazol furtiva

**Da** – Dalton

**DMA** – Dimetilacetamida

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**DP** – Desvio padrão

**DPPC** – Dipalmitoil fosfatidilcolina

**FCZ** – Fluconazol

**FDA** – Food and drug administration

**FCZ-PCL-NC** – Nanocápsula de fluconazol convencional

**FCZ-PLA-PEG** - Nanocápsula de fluconazol furtiva

**HE** – Hematoxilina-Eosina

**i.p.** – Intraperitoneal

**i.v.** – Intravenoso

**MCZ** – Miconazol

**MCZ-PCL-NC** - Nanocápsula de miconazol convencional

**MCZ-PLA-PEG** – Nanocápsula de miconazol furtiva

**MET** – Microscopia eletrônica de transmissão

**MEV** – Microscopia eletrônica de varredura

**MFA** – Microscopia de Força Atômica

- $\mu\text{L}$**  – Microlitros
- MM** – Massa molar
- NC** – Nanocápsulas
- NCCLS** – National Committee for Clinical Laboratory Standards
- NE** – Nanoemulsões
- nm** – nanômetros
- NS** – Nanoesferas
- PCL** – Poli- $\epsilon$ -caprolactona
- PCS** – Espectroscopia de correlação de fótons
- PEG** – Polietilenoglicol
- pH** – Potencial hidrogeniônico
- PI** – Índice de polidispersão
- PLA** – Ácido poli (*D, L* – lático)
- PGA** – Ácido poli (glicólico)
- PM** – Peso molecular
- p/p** – Peso por peso
- $P_{ow}$**  – Coeficiente de partição octanol-água
- p/v** – Peso por volume
- $R^2$**  – Coeficiente de correlação
- RNA** – Ácido ribonucléico
- rpm** – Rotações por minuto
- s.c.** – Subcutâneo
- SD** – Sabouraud dextrosado
- SFM** – Sistema fagocitário mononuclear
- AIDS** – Síndrome de imunodeficiência adquirida
- UFC** – Unidade formadora de colônia
- UV** – Ultravioleta
- v/v** – Volume por volume

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| <b>RESUMO</b>   | viii |
| <b>ABSTRACT</b>   | xi   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | xiv  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   | xix  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b>                           | xxi  |
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 1    |
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 2    |
| <b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA</b> .....                           | 4    |
| 1.1. <i>Candida spp.</i> .....  | 5    |
| 1.2. Epidemiologia.....   | 7    |
| 1.3. Agentes antifúngicos.....  | 8    |
| 1.3.1. Derivados Imidazólicos e Triazólicos.....                          | 11   |
| 1.4. Vetorização de fármacos.....   | 18   |
| 1.4.1. Nanocápsulas e nanoemulsões.....                                   | 22   |
| 1.4.2. Caracterização físico-química das nanocápsulas e nanoemulsões..... | 25   |
| 1.4.2.1. Avaliação morfológica.....                                       | 26   |
| 1.4.2.2. Distribuição de tamanho das nanopartículas.....                  | 27   |
| 1.4.2.3. Potencial zeta.....  | 28   |
| 1.4.2.4. pH.....  | 30   |
| 1.4.2.5. Teor de encapsulação.....  | 30   |
| 1.4.2.6. Cinética de liberação.....                                       | 31   |
| 1.4.2.7 Estudo da estabilidade física.....                                | 32   |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | 34   |
| 1. Objetivo Geral.....  | 35   |
| 2. Objetivos Específicos.....   | 35   |
| <b>CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                             | 36   |



|  |           |
|--|-----------|
| 2.1. Materiais.....  | 37        |
| 2.2. Animais e microrganismos.....   | 37        |
| 2.3. Preparação e caracterização físico-química das nanocápsulas e nanoemulsões.....       | 38        |
| 2.3.1. Preparação do miconazol base.....   | 38        |
| 2.3.2. Preparação das nanocápsulas e nanoemulsões.....                                     | 39        |
| 2.3.3. Determinação do teor de fármaco por espectroscopia no ultravioleta .....            | 40        |
| 2.3.4. Determinação da porcentagem de encapsulação.....                                    | 41        |
| 2.3.5. Distribuição de tamanho e potencial zeta.....                                       | 42        |
| 2.3.6. Análise da morfologia das nanocápsulas e nanoemulsões.....                          | 43        |
| 2.3.7. Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....   | 44        |
| 2.3.8. Estudo da estabilidade física.....  | 45        |
| 2.3.9. Purificação das nanocápsulas de fluconazol.....                                     | 45        |
| 2.4. Experimentação “ <i>in vivo</i> ”.....  | 46        |
| 2.4.1. Imunossupressão dos animais .....   | 46        |
| 2.4.2. Infecção dos animais.....   | 47        |
| 2.4.3. Preparo das soluções de fármaco para administração intravenosa.....                 | 48        |
| 2.4.4. Protocolos experimentais.....   | 49        |
| 2.4.5. Análise histológica.....  | 54        |
| 2.4.6. Análise estatística.....  | 58        |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>CAPÍTULO 3 - PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE FLUCONAZOL.....</b>          | <b>58</b> |
| 3.1. Caracterização físico-química de nanocápsulas e nanoemulsões contendo fluconazol..... | 59        |
| 3.1.1. Distribuição de tamanho.....  | 59        |
| 3.1.2. Potencial zeta .....  | 64        |
| 3.1.3. Doseamento do fluconazol .....  | 66        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.1.4. Determinação da porcentagem de encapsulação.....   | 68         |
| 3.1.5. Estudo da estabilidade física .....  | 70         |
| 3.1.6. Análise morfológica .....  | 73         |
| 3.1.7. Estudo de liberação do fluconazol a partir das nanoestruturas <i>in vitro</i> .....  | 79         |
| <b>CAPÍTULO 4 - PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE CETOCONAZOL E MICONAZOL BASE.....</b>                                       | <b>84</b>  |
| 4.1. Caracterização fisico-química de nanocápsulas e nanoemulsões contendo cetoconazol e miconazol base.....                              | 85         |
| 4.1.1. Doseamento do cetoconazol e do miconazol base.....   | 85         |
| 4.1.2. Distribuição de tamanho, porcentagem de encapsulação e potencial zeta .....  | 87         |
| 4.1.3. Análise morfológica.....   | 91         |
| <b>CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NC DE FLUCONAZOL, MICONAZOL BASE E CETOCONAZOL EM MODELO MURINO DE CANDIDÍASE SISTÊMICA.....</b> | <b>98</b>  |
| 5.1. Imunossupressão dos animais.....   | 99         |
| 5.1.2. Ciclofosfamida.....  | 99         |
| 5.1.3. Radiação gama.....   | 99         |
| 5.2. Infecção dos animais e eficácia dos tratamentos.....   | 100        |
| 5.2.1. Efeito dos diferentes inóculos.....  | 101        |
| 5.2.2. Tratamento.....  | 103        |
| <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>130</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>133</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>149</b> |

# ***INTRODUÇÃO***

*Pollyanna Álvaro Spósito*

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A incidência de infecções fúngicas sistêmicas tem aumentado nos últimos anos e o gênero *Candida spp.*, em especial a *Candida albicans*, é responsável pela maioria das infecções causadas por fungos (Singh, 2001; Maertens *et al.*, 2001). Essas infecções são um grande desafio tanto pelo aumento da incidência quanto pela alta taxa de mortalidade, da ordem de 40 a 60%, principalmente, entre indivíduos apresentando sistema imunológico debilitado. Dentre os principais fatores de risco envolvidos no aumento de tais infecções está o tratamento imunossupressor, a quimioterapia, o uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, o uso de cateteres e a infecção pelo vírus causador da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Wenzel, 1995). Em hospitais norte-americanos a *Candida spp.* é o 6º patógeno nosocomial e a 4ª causa mais comum de infecções da corrente sanguínea (Beck-Sague *et al.*, 1993; Pfaller *et al.*, 1998; Colombo *et al.*, 2003).

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado e a resposta imune do paciente é de grande importância na recuperação do indivíduo. Muitas vezes é necessário o uso de doses extremamente altas de fármaco, por um período prolongado ou a associação de vários antifúngicos para que o objetivo terapêutico seja alcançado. Porém, estes regimes terapêuticos podem aumentar a frequência de reações adversas e o risco de toxicidade no tratamento, principalmente em pacientes apresentando sistema imunológico debilitado (Mahfouz & Anaissie, 2003). Nos últimos anos os agentes antifúngicos mais utilizados são a anfotericina B, a nistatina, o fluconazol, o cetoconazol, o itraconazol, o voriconazol, a 5-fluorocitosina e a caspofungina (Andriole, 1999). Porém, o uso difundido e inadequado das drogas antifúngicas, em especial o fluconazol, deu origem ao desenvolvimento de resistência, particularmente em espécies de *Candida*. A resistência da *Candida albicans* aos azólicos, atualmente é bem descrita entre indivíduos infectados por HIV com história de candidíase oral periódica ou candidíase invasiva (Marr *et al.*, 1997).

Como é possível constatar, os medicamentos antifúngicos para infecções sistêmicas não satisfazem completamente as necessidades terapêuticas, devido a problemas relacionados ao espectro de ação, à toxicidade ou à resistência fúngica. Considerando o aumento das infecções sistêmicas e o conseqüente aumento na mortalidade de pacientes de risco, é necessário o desenvolvimento de novas formulações para reduzir a baixa eficácia das terapias já existentes.

Atualmente a associação de agentes antifúngicos a nanocarreadores tais como as nanocápsulas e as nanoemulsões são uma alternativa para melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade desses fármacos. Os nanocarreadores possuem um grande potencial na liberação do fármaco em sítios de ação específicos, permitem a otimização da velocidade de liberação e do regime de dosagem das substâncias, com conseqüente aumento do índice terapêutico e redução dos efeitos colaterais (Barratt 2000, Hans & Lowman 2002). Alguns antifúngicos como anfotericina B, nistatina, miconazol e fluconazol têm sido associados à nanopartículas e resultados promissores têm sido observados (Lopez-Berestein *et al* 1983; Otsubo, 1996; Metha *et al.*, 1987; Levy *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2000).

As nanocápsulas são carreadores nanoparticulados compostas de um núcleo oleoso, envolto por uma parede polimérica com surfactantes lipofílicos e/ou hidrofílicos na interface (Legrand *et al.*,1999) e as nanoemulsões são emulsões submicrométricas formadas pelos mesmos componentes presentes nas nanocápsulas, porém não possuem o envoltório polimérico (Benita & Levy, 1993).

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas e nanoemulsões contendo antifúngicos azólicos (miconazol, cetoconazol e fluconazol) e a avaliação dessas nanoestruturas em modelo experimental de candidíase sistêmica em camundongos imunossuprimidos.

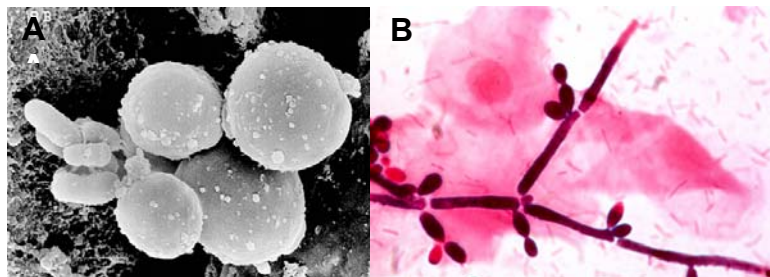
**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO DA LITERATURA**

*Pollyanna Álvaro Spósito*

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. *Candida spp.*

Os microrganismos do gênero *Candida* pertencem à classe dos deuteromicetos, onde são reunidos os chamados “fungos imperfeitos”, cujos estágios de reprodução sexuada ainda não são conhecidos. As espécies de *Candida* são dimórficas, ou seja, podem reproduzir-se por gemulação, dando à célula uma forma oval (característica das leveduras), também chamada de blastóporo ou blastoconídio, ou às vezes, as leveduras aderem entre si e formam cadeias ou "pseudo-hifas" (figura 1).



**FIGURA 1:** *Candida albicans*. Blastoconídio (A) e pseudo-hifas (B). Adaptada de: A ([www.fcm.unicamp.br/.../bineucryptococose.html](http://www.fcm.unicamp.br/.../bineucryptococose.html)) B ([www.asm.org/Division/c/fungi.htm](http://www.asm.org/Division/c/fungi.htm)).

A maior parte das espécies de *Candida* mostra uma predominância da forma filamentosa em meios com concentrações baixas de glicose, e concentrações elevadas de CO<sub>2</sub>. Pelo contrário, a forma de levedura prevalece quando estas espécies são crescidas em meios com elevadas concentrações de glicose e baixas concentrações de CO<sub>2</sub>. O gênero *Candida* tem ainda a capacidade de utilização de carbono e fermentação.

Existem cerca de 150 a 200 espécies reconhecidas, sendo que apenas algumas destas são de importância clínica. A *Candida albicans* é a mais freqüentemente isolada e a mais virulenta para o homem. Outras espécies de interesse clínico são: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. stellatoidea* e *C. kyfer* (McCullough *et al.*, 1996). A *Candida albicans* é considerada uma das leveduras mais patogênicas para o

hospedeiro humano, causando um grande número de infecções oportunistas, que particularmente em pacientes imunocomprometidos podem ser fatais (Gilfillan *et al.*, 1998; Baillie *et al.*, 1998; Lengeler *et al.*, 2000).

Esta levedura é um organismo comensal estando presente no ser humano sem causar infecções. Podem colonizar o tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável, entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina, além disso, podem ser encontradas no trato respiratório e no sangue. Estes microorganismos tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas, podendo causar sérias infecções nas mucosas, que incluem candidiases vaginais, infecções orais e sistêmicas (O'Sullivan *et al.*, 2000).

Infecções fúngicas sistêmicas causadas pelo gênero *Candida*, podem ser adquiridas tanto pela via endógena quanto pela exógena. Acredita-se que a maioria dos casos ocorra por colonização endógena, sendo seu maior reservatório o trato gastrointestinal (Pfaller, 1994; Reef & Mayer, 1995; Cole *et al.*, 1996). Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode facilitar a translocação da *Candida sp* até os capilares mesentéricos levando assim a infecções sistêmicas (Silva *et al.*, 2002). Diversos fatores levam à transformação deste microorganismo comensal a importante agente de infecções tais como: a antibioticoterapia, a quimioterapia, o cateterismo, as cirurgias, o tratamento imunossupressivo, a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) e o câncer (Swerdloff *et al.*, 1993; Rubin, 1993; Wenzel, 1995; Panizo *et al.*, 2001). Outros fatores predisponentes de candidíase sistêmica de menor impacto podem ser listados, tais como a insuficiência hepática, o alcoolismo, a *diabete mellitus*, a manipulação geniturinária, o aborto induzido, o envelhecimento, a gravidez, a hipovitaminose A, a desnutrição, a anemia ferropriva, o uso de anticoncepcionais orais, as próteses dentárias e o tabagismo.

Ainda que a invasão inicial dependa dos mecanismos imunes do hospedeiro, a *Candida albicans* possui características intrínsecas que promovem sua habilidade de causar enfermidades. Entre os fatores de



virulência incluem as adesinas, biomoléculas que promovem a aderência do fungo às células do hospedeiro ou às células ligantes, a conversão do microrganismo da fase filamentosa para a fase leveduriforme, a secreção de enzimas como proteases e fosfolipases que atua na hidrólise de fosfolipídios, dando origem a lisofosfolipídios que causam dano à célula epitelial e a imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, onde as células fúngicas têm a capacidade de ativar ou desativar a resposta imune, tendo implicações diretas na patogenicidade. São as manãs e as manoproteínas que desempenham a mais potente atividade modulatória, sendo capazes de regular a ação de defesas do sistema imunitário (células fagocitárias, células mediadoras da imunidade) (Cassone *et al.*, 1987; Cutler *et al.*, 1991; De Bernardis *et al.*, 1994; McCullough *et al.*, 1996; Chaffin *et al.*, 1998).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA

Nos últimos vinte anos, a freqüência de infecções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas invasivas têm crescido drasticamente e constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (Singh, 2001). Infecções fúngicas invasivas causadas por *Candida albicans* são um grande desafio não somente devido ao aumento da freqüência, mas também devido à taxa de mortalidade acima de 40% em infecções da corrente sanguínea.

Nos EUA, a taxa de fungemia entre 1980 e 1990 aumentou em torno de quatro vezes. Nos anos 90, segundo dados obtidos por Pfaller e colaboradores em 50 hospitais dos EUA, *Candida spp.* respondeu por 8% dos 4.725 episódios de infecção de corrente sanguínea documentados naquelas instituições, sendo considerada o sexto patógeno nosocomial e a quarta principal causa de infecção de corrente sanguínea em hospitais terciários americanos (Pfaller *et al.*, 1998). A espécie *albicans* é a mais freqüente, responsável por 50 a 70% de todas as infecções invasivas pelo gênero *Candida*. Colombo em 2003 publicou os resultados de um estudo multicêntrico randomizado no qual incluía 239 pacientes adultos de 20 países em cinco continentes e a *Candida albicans* foi a

espécie mais frequentemente isolada em todas as regiões ocupando cerca de 45% dos isolados (Colombo *et al.*, 2003).

No Brasil, Colombo e colaboradores em estudo epidemiológico sobre infecções de corrente sanguínea documentados em quatro hospitais da cidade de São Paulo entre março de 2002 e fevereiro de 2003, do total de 7.038 episódios de bacteremias e fungemias avaliados, a *Candida spp.* respondeu por 4,3 % do total das infecções de corrente sanguínea (Colombo, 2003). O mesmo autor em março de 2003 iniciou outro estudo que concluiu em dezembro de 2004 em 11 centros médicos localizados nas 9 maiores cidades brasileiras e a *Candida albicans* foi a espécie mais comum 40,9% seguida da *C. tropicalis* e da *C. parapsilosis* (Colombo *et al.*, 2006).

Em outro estudo realizado na Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, de um total de 133 espécies de *Candida* isoladas entre março de 1995 e dezembro 1996, 51% dos isolados eram *Candida albicans* seguido de *C. tropicalis* (33%). A maior parte dos pacientes tinha entre 60 e 80 anos de idade e eram da Unidade de Terapia Intensiva (Resende *et al.*, 2002).

Os dados obtidos demonstram que, em nosso meio, candidemia também é uma complicação infecciosa encontrada em pacientes portadores de diferentes doenças degenerativas ou neoplásicas, internados por períodos prolongados e submetidos a procedimentos invasivos, antibióticos de amplo espectro e quimioterápicos.

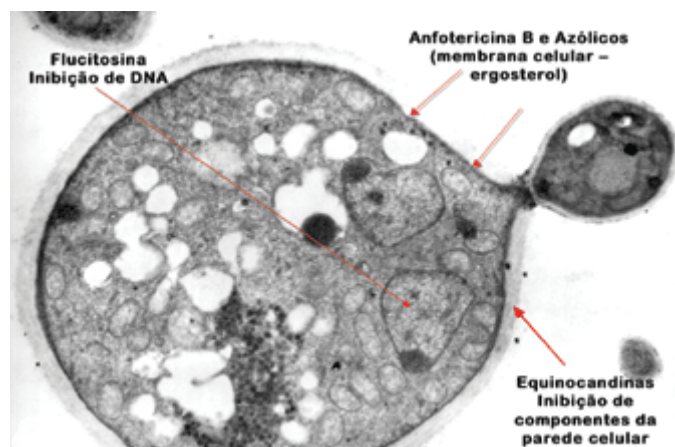
### **1.3. AGENTES ANTIFÚNGICOS**

Dentre as classes de agentes antifúngicos mais comumente utilizadas no tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida* encontram-se, os derivados poliênicos (ex. anfotericina B, nistatina); os derivados imidazólicos e azólicos (miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol), pirimidinas (5-fluorocitosina), as equinocandinas (caspofungina) e a alilamina terbinafina (Andriole, 1999).

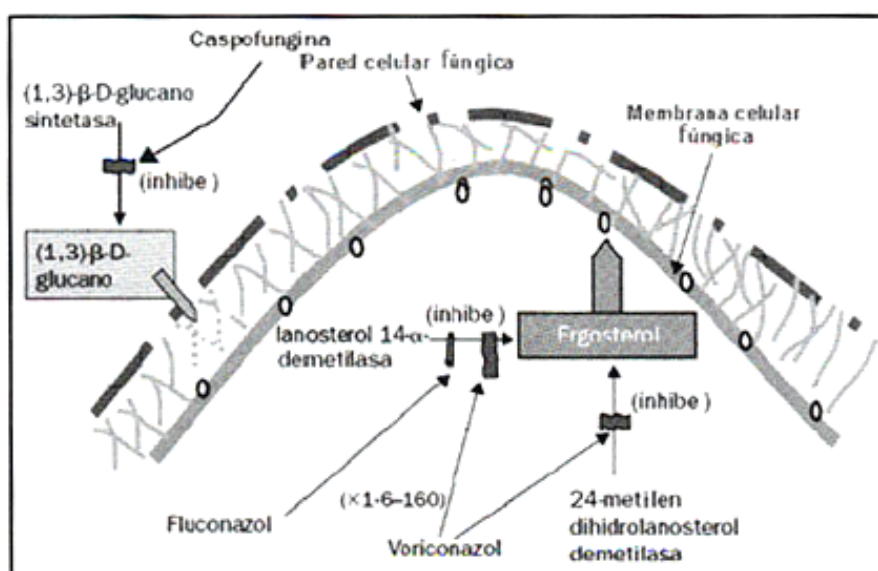
A anfotericina B e a nistatina pertencem à classe dos antibióticos poliênicos. Elas atuam ligando-se ao ergosterol, esteróide presente na

membrana de fungos, alterando a permeabilidade desta e causando a perda de constituintes citoplasmáticos (figura 2 e 3). Adicionalmente, esses fármacos levam a uma lesão oxidativa que resulta em alterações metabólicas prejudiciais à sobrevivência da célula (Gallis *et al.*, 1990). A anfotericina B é uma substância fungistática e fungicida isolada de cepas de *Streptomyces nodosus*. Seu espectro de ação inclui todas as espécies de *Candida*, algumas espécies de *Aspergillus*, entre outros fungos. Anfotericina B é o fármaco de primeira escolha no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, apesar de sua alta toxicidade (Viscoli & Castagnola, 1998). A disfunção renal é o mais importante efeito tóxico e ocorre na grande maioria dos pacientes (Dupon *et al.*, 1987; Pathak *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1990; Martindale, 2005). Recentemente, diferentes formulações vetorizadas de anfotericina B têm sido estudadas, complexos lipídicos (Abelcet®), dispersões coloidais (Amphocil®, Amphotec®) e lipossomas (Fungisome™) e (AmBisome®) sendo que o último vem sendo comercializado em 36 países, principalmente na Europa e EUA (Maesaki 2002; Kshirsagar *et al.*, 2005; Martinez, 2006).

A nistatina tem seu uso limitado ao tratamento de infecções da pele e mucosas causadas por todas as espécies do gênero *Candida*, pois apresenta problemas de solubilização em solventes injetáveis e é altamente tóxica quando usada por via sistêmica ou intravítrea (Newcomer *et al.* 1955; Larson *et al.*, 2000). Para contornar os problemas associados à administração sistêmica da nistatina livre, a Aronex Pharmaceuticals desenvolveu lipossomas de nistatina (Nyotran®) que se encontra em fase de avaliação clínica (Larson *et al.*, 2000). Diversos estudos demonstraram, de um modo geral, que a atividade antifúngica é mantida e a toxicidade é reduzida com as formulações vetorizadas (Reyes *et al.*, 2000; Arian & Rex, 2001).



**FIGURA 2:** Alvos celulares para as diferentes classes de fármacos antifúngicos representados esquematicamente em fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma célula de levedura (adaptado de: [www.praticahospitalar.com.br/pratica%2030/pag.](http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2030/pag.)).



**FIGURA 3:** Representação esquemática de alvos celulares para as diferentes classes de fármacos antifúngicos. (adaptado de: [www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-1018200402.](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-1018200402.))

A 5-flucitossina é uma pirimidina sintética fluorada que é convertida em 5-fluoruracila por todos os fungos sensíveis, os quais são capazes de realizar sua desaminação. Ela se incorpora ao longo do RNA e inibe a síntese protéica além de interferir na síntese do DNA do fungo (figura 2). A 5-flucitossina tem espectro de ação restrito e é usada clinicamente somente contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp.* e os agentes da cromomicose (Martindale, 2005; Bergold *et al.*, 2004).

A caspofungina é um derivado semi-sintético obtido a partir da fermentação do fungo *Glarea lozoyensis* (Abruzzo *et al.*, 2000). Têm como alvo

de ação a parede celular, inibindo a enzima ligada à síntese do  $\beta$ -(1.3)-*D*-glicano (Deresinski & Stevens, 2003) (figura 2 e 3). O glicano é um dos principais componentes da parede celular fúngica. O bloqueio de sua síntese resulta em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade do microorganismo. A caspofungina exibe atividade *in vitro* contra uma ampla variedade de leveduras, fungos filamentosos e dimórficos clinicamente importantes, inclusive *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* (Pfaller *et al.*, 1999; Vasquez *et al.*, 1997).

A terbinafina é uma alilamina com amplo espectro de ação contra dermatófitos, fungos filamentosos e fungos dimórficos como a *Candida albicans* (Barchiesi, 1998). Seu mecanismo de ação envolve a inibição específica da enzima esqualeno epoxidase, resultando na deficiência de ergosterol e acúmulo intracelular de esqualeno (Ryder, 1998).

### 1.3.1. Derivados Imidazólicos e Triazólicos

Os azólicos são compostos totalmente sintéticos, caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, o qual contém três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos). Considerando as drogas de uso sistêmico, o primeiro subgrupo compreende o miconazol e o cetoconazol e o último, o fluconazol, o itraconazol, o voriconazol, o posaconazol e o ravuconazol.

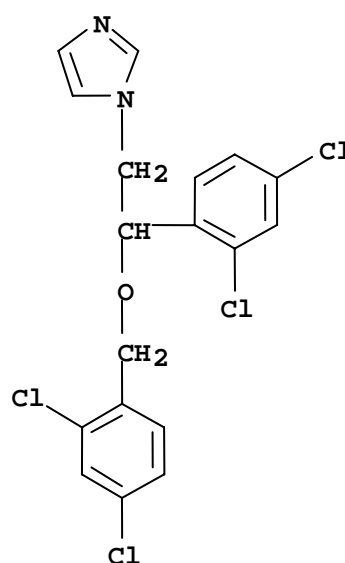
O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da enzima esterol-14- $\alpha$  demetilase, um sistema enzimático microssomal dependente do citocromo P450, responsável pela síntese do ergosterol na membrana citoplasmática fúngica. A inibição desta enzima leva ao acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (Como & Dismukes 1994; Tavares, 2001).

Os principais efeitos adversos dos derivados azólicos relacionam-se com intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade (Knight *et al.*, 1991; Jacobson *et*

*al.*, 1994), hipersensibilidade e, para o cetoconazol em doses elevadas, ginecomastia e irregularidades menstruais. Algumas delas são reconhecidamente teratogênicas e não devem ser administradas a gestantes (Martinez, 2006).

### Miconazol

O miconazol, 1-[2,4-dicloro- $\beta$ -(2,4-diclorobenziloxi) fenetil] imidazol (figura 4), foi o primeiro derivado azólico disponível no mercado, no início da década de 70, desenvolvido pela Janssen-CILAG Pharmaceutical e comercializado com o nome de Dacktarin® sob a forma de comprimidos, cápsulas, e em alguns países na forma de emulsões parenterais (Levy *et al.*, 1995).



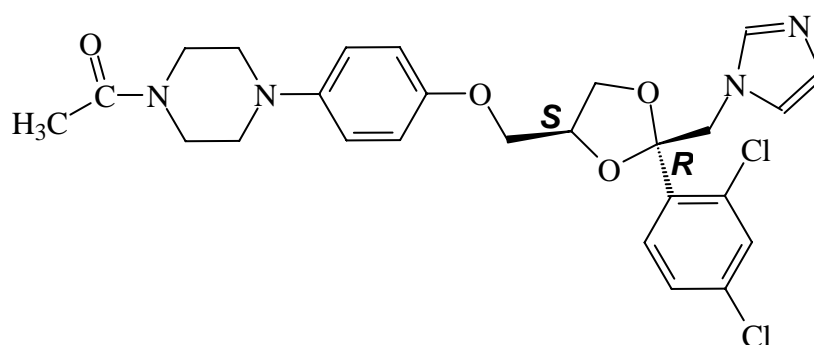
**FIGURA 4** – Estrutura química do Miconazol

O miconazol é um pó branco ou quase branco, muito pouco solúvel em água, facilmente solúvel no metanol e solúvel no etanol. O miconazol apresenta o fenômeno de polimorfismo e tem coeficiente de partição octanol-água ( $P_{ow}$ ) igual a 5,93 à temperatura de 25 °C e temperatura de transição vítrea de 1,8 °C para a base (Six *et al.*, 2001). Seu espectro de atividade é limitado aos dermatófitos, algumas espécies de *Candida* e fungos dimórficos. A dosagem

recomendada para o tratamento clínico de infecções por *Candida* é de 15mg/kg ao dia. Sua biodisponibilidade oral é baixa, aproximadamente 25%. Sua concentração plasmática máxima é de 1 µg/mL em cerca de 4h, após uma dose diária de 1g. Liga-se acima de 90% às proteínas plasmáticas, sendo metabolizado principalmente no fígado, com uma meia vida de eliminação de cerca de 24h.

É usado primeiramente como antifúngico tópico para tratamento de micoses cutâneas e é uma alternativa como antifúngico sistêmico quando a anfotericina B e o cetoconazol são contra-indicados ou não efetivos (Stevens, 1997; Heel *et al.*, 1980) sendo administrado por infusão intravenosa. Entretanto seu uso é limitado, devido à alta toxicidade das injeções de miconazol, atribuída à própria droga e principalmente aos excipientes farmacêuticos utilizados nas preparações. Formulações como Monistat<sup>®</sup> i.v. ou Daktarin<sup>®</sup> i.v. (Janssen-Cilag Pharmaceutical Inc., Titusville, NJ) contém Cremophor EL<sup>®</sup>, um tensoativo necessário para a solubilização micelar dessa droga lipofílica. O uso parenteral do miconazol é freqüentemente associado a severos efeitos adversos, tais como: anafilaxia, flebite, trombocitose que parecem estar associadas ao Cremophor EL<sup>®</sup> (Stevens, 1983). Outros efeitos adversos ocasionados incluem: náuseas, vômitos, diarréias, rash cutâneo, taquicardia e arritmia.

### Cetoconazol



**FIGURA 5:** Estrutura química do Cetoconazol

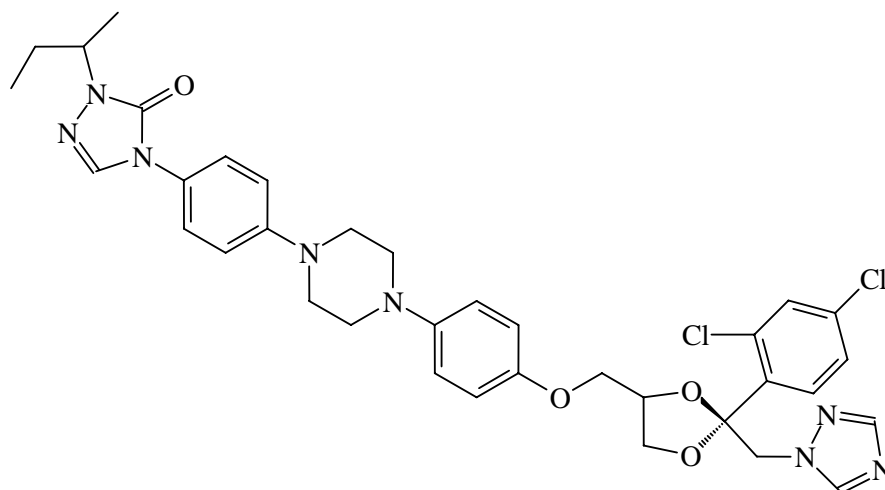
O cetoconazol, ( $\pm$ )-cis-1-acetil-4-{4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-imidazol-1-il-metil-1,3-dioxolan-4-il-metoxi] fenil} piperazina (figura 5), foi desenvolvido e sintetizado pela Janssen-CILAG Pharmaceutical, aprovado pelo FDA em 1981 como antifúngico sistêmico e comercializado com o nome comercial de NIZORAL®. O cetoconazol é um pó branco ou quase branco, praticamente insolúvel na água, facilmente solúvel no cloreto de metileno, solúvel no metanol e ligeiramente solúvel no etanol. Seu coeficiente de partição octanol-água ( $P_{ow}$ ) é de 3,547 à temperatura de 25°C. O cetoconazol possui propriedades físico-químicas semelhantes ao miconazol, entretanto, é menos tóxico e é melhor absorvido no trato gastrointestinal. Porém, para sua solubilização e absorção é necessário um pH gástrico inferior a 3. Pode ser administrado por via oral ou tópica. Seu pico de concentração plasmática é atingido em 2h (cerca de 3,5  $\mu\text{g/mL}$ ) após administração oral de 200mg. A ligação às proteínas plasmáticas é superior a 90%, principalmente a albumina. Apresenta pouca penetração no sistema nervoso central e sua meia-vida de eliminação inicia-se em 2h e termina em cerca de 8h, sendo metabolizado principalmente no fígado. A dose de 200 a 400mg ao dia é variável de acordo com o tipo de infecção a ser tratada, sendo muitas vezes necessário tratamento por vários meses, o que pode aumentar o risco de toxicidade hepática (Martindale, 2005). O cetoconazol é particularmente eficaz contra *Blastomices dermatitidis*, *Candida sp*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides braziliensis*.

São relatados alguns efeitos tóxicos atribuídos ao uso do cetoconazol tais como: náuseas, vômitos, diarreia e casos de disfunção hepática variando de elevação assintomática das enzimas até necrose hepática fatal. Pode causar irregularidades menstruais e em homens ginecomastia, impotência e diminuição da libido (Lewis *et al.*, 1984; Pont *et al.*, 1982).

### **Itraconazol**

O itraconazol, sintetizado pela Janssen-CILAG Pharmaceutical e comercializado com o nome de Sporanox® é um fármaco muito hidrofóbico, com coeficiente de partição octanol/água ( $P_{ow}$ ) de 5,66 em pH 8.1 (figura 6).

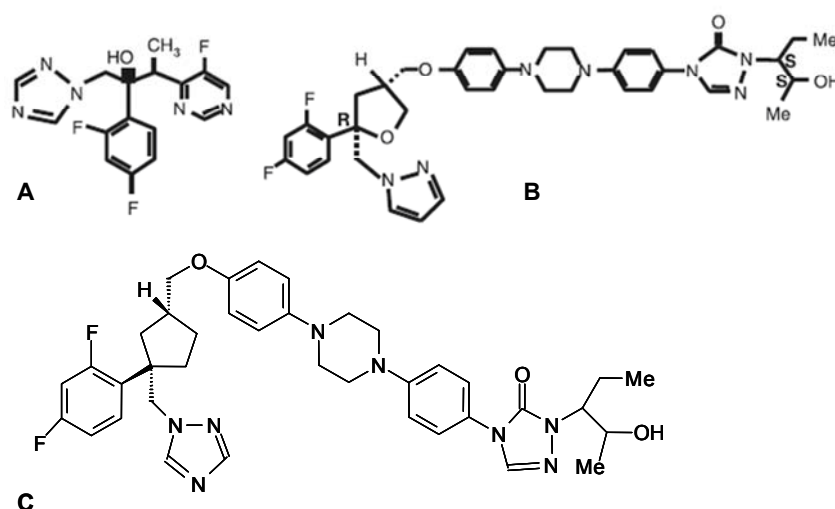




**FIGURA 6:** Estrutura química do Itraconazol

A insolubilidade deste fármaco restringe sua administração por via oral e provoca também sérias variações na sua biodisponibilidade por essa via (Chasteigner *et al.*, 1996). Apresenta amplo espectro de ação contra *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans* dentre outros (Martindale; Denning *et al.*, 1994). A viabilidade da associação do itraconazol com diferentes sistemas vetorizados coloidais foi investigada por Chasteigner e colaboradores (1996 a,b) que, verificaram que a maior eficiência de encapsulação foi observada em nanoesferas, sendo que 40% do fármaco fica retido na matriz e 60% associado à superfície. Entretanto, não foram relatados estudos *in vitro* e *in vivo* na literatura em relação ao itraconazol associado a nanoestruturas.

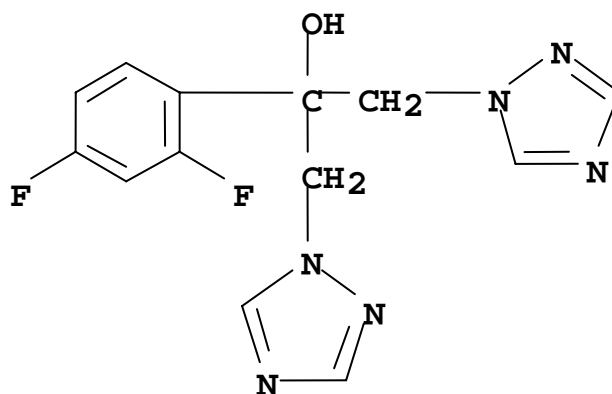
Os novos triazólicos, voriconazol, posaconazol e ravuconazol (figura 7), vêm sendo ativamente pesquisados e apresentam maior potência e espectro de ação mais amplo do que os antigos azólicos (Pfaller *et al.*, 1998; Pfaller *et al.*, 2001). Ambos os fármacos possuem amplo espectro de ação contra *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans*, dentre outros. O voriconazol foi desenvolvido pela Pfizer e lançado no Brasil com o nome comercial Vfend®, o posaconazol e o ravuconazol estão em fase III e II de estudos clínicos, respectivamente.



**FIGURA 7:** Estruturas químicas dos novos triazólicos: voriconazol (A), posaconazol (B) e ravuconazol (C).

## Fluconazol

O fluconazol, 2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis (1H- 1, 2, 4-triazol-1-ilmetil)-2-propanol (figura 8), foi o primeiro derivado triazólico disponível no mercado, desenvolvido pelo laboratório Pfizer em 1970 e aprovado para uso em 1990 com o nome de ZOLTEC® .



**FIGURA 8** – Estrutura química do Fluconazol

Apresenta-se como um pó cristalino, de cor branca, levemente solúvel em água (8mg/mL a 37°C) e solúvel em etanol (25mg/mL a 25° C) (AHFS Drug Information, 2003). Seu coeficiente de partição octanol-água ( $P_{ow}$ ) é  $0,5 \pm 0,887$

à temperatura de 25°. O fluconazol tem amplo espectro de ação, sendo ativo contra *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* spp., *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium* spp., e *Trichophyton* spp., podendo ser usado contra *Criptococosis meningea* (Martindale, 2005).

O fluconazol pode ser administrado via oral ou parenteral, sendo que após administração oral a absorção é quase completa, cerca de 90% e não sofre influência de mudanças no pH gástrico ou presença de alimentos (Brammer *et al.*, 1990; Fica, 2004). A concentração plasmática máxima, após uma dose de 400mg via oral, é de 6,92 µg/mL, sendo alcançado entre 1 e 2 horas. Liga-se pouco às proteínas plasmáticas (12%), distribuindo-se rapidamente nos tecidos, incluindo o sistema nervoso central. Níveis de concentração no líquido cefalorraquidiano representam de 50 a 90% da concentração plasmática (Arndt *et al.*, 1988) Cerca de 80% da dose é excretada na urina de forma inalterada e 11% na forma de metabólitos. A meia vida de eliminação é de 25 a 30 horas e pode ser prolongada na vigência de insuficiência renal, o que obriga os ajustes posológicos nestas circunstâncias (Humphrey *et al.*, 1985).

O fluconazol pode ser usado tanto para micoses mucocutâneas (orofaríngeas, esofagianas ou vaginais) quanto para micoses sistêmicas. Para candidíases superficiais a dose recomendada é de 50-400mg/dia, via oral. A duração do tratamento vai depender da natureza e da gravidade do processo. Na candidíase sistêmica o tratamento pode ser por via oral ou infusão intravenosa, com dose inicial de 400mg/dia seguido de 200-400mg/dia. A duração do tratamento é baseada na resposta clínica do paciente, mas geralmente é realizada por períodos prolongados. Em paciente imunossuprimidos, o fluconazol pode ser usado profilaticamente a doses de 50-400mg/dia via oral ou infusão intravenosa (Pappas *et al.*, 1995; Martindale, 2005). Os efeitos adversos mais comuns em alguns pacientes incluem: náuseas, dor abdominal, vômitos, diarreia, cefaléia, podendo ainda observar dermatite esfoliativa, hepatotoxicidade, plaquetopenia, leucopenia e anafilaxia (Grant *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1998).

O uso difundido e inadequado das drogas antifúngicas, em especial o fluconazol deu origem ao desenvolvimento de resistência, particularmente em espécies do gênero *Candida* e principalmente em pacientes com AIDS, que apresentam história de candidíase oral periódica e exposição à terapia antifúngica intermitente ou contínua, sobretudo tendo em conta o uso de doses únicas, que eliminam os sintomas, mas não são capazes de produzir a cura microbiológica nem clínica completa, tornando os pacientes suscetíveis a uma nova infecção. Os baixos índices de eficácia nos tratamentos antifúngicos levam ao uso de doses extremamente altas de fluconazol ou a associação com outros triazólicos como o itraconazol (Vasquez, 1999). Porém, estes regimes terapêuticos apresentam a desvantagem do aumento do risco da toxicidade no tratamento, principalmente em se tratando de pacientes com sistema imunológico debilitado.

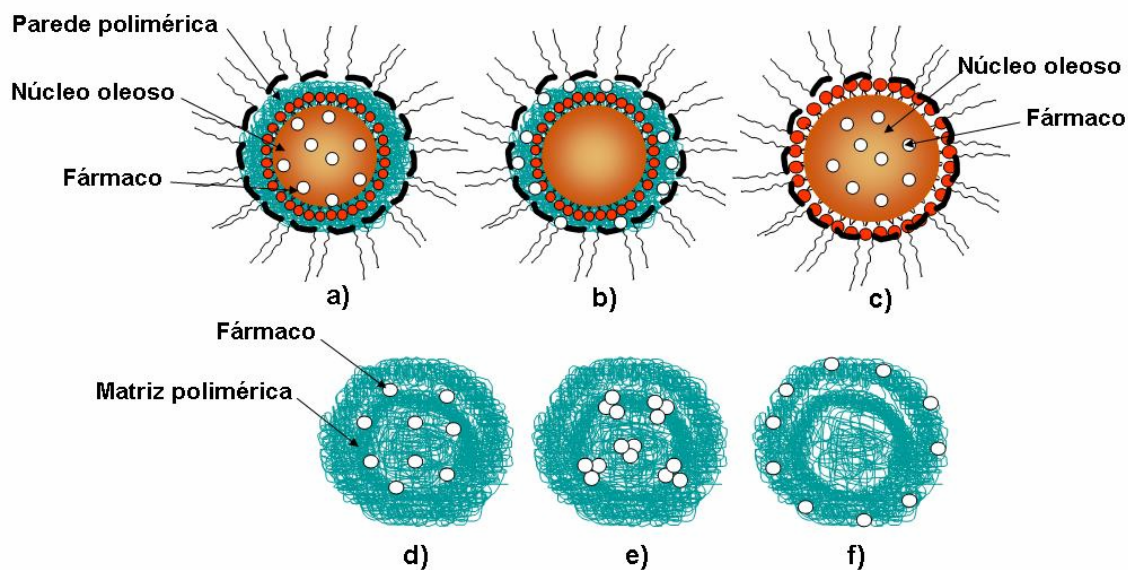
O desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, a partir do rejuvenescimento de drogas antifúngicas já disponíveis no mercado, por meio do desenvolvimento de vetores nanoestruturados pode possibilitar uma ação direcionada do fármaco no seu alvo e proporcionar um tratamento mais eficaz, com doses mais reduzidas e, portanto, menos tóxicas.

#### **1.4. VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS**

Nos últimos 30 anos, após a proposição do uso de lipossomas para o transporte de fármacos por Gregoriadis e colaboradores em 1974, os sistemas chamados de vetores nanométricos têm sido muito estudados (Couvreur *et al.*, 2006). Os nanocarreadores de fármacos possuem um grande potencial na liberação do fármaco em sítios de ação específicos, permitem a otimização da velocidade de liberação e do regime de dosagem das substâncias, com conseqüente aumento do índice terapêutico e diminuição dos efeitos colaterais (Barratt 2000, Hans & Lowman 2002). Além desses benefícios as nanoestruturas também são potencialmente capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática, química ou imunológica (Barratt 2000). Os sistemas nanoestruturados apresentam dimensões situadas entre 10

e 1000nm e diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural (Couvreur *et al.*, 2002). Os lipossomas e as nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) são os sistemas nanoestruturados mais estudados. As nanopartículas poliméricas apresentam algumas vantagens em relação aos lipossomas. Elas podem ser produzidas por métodos mais simples e rápidos, e também são mais estáveis tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo seu tempo de degradação controlado pela variação da natureza química dos polímeros empregados (Schaffazick *et al.*, 2003).

As nanocápsulas, em particular, são sistemas vesiculares constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, no qual o fármaco pode estar dissolvido ou disperso, ou mesmo adsorvido à parede polimérica (Legrand *et al.*, 1999). Por outro lado, as nanoesferas são sistemas matriciais e não apresentam óleo em sua composição, são constituídas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar dissolvido, fisicamente disperso ou adsorvido na matriz (Delie & Blanco-Príeto, 2005; Puisieux *et al.*, 1994; Allemann *et al.*, 1993). As nanoemulsões são emulsões submicrométricas, em geral menores que 300nm, na qual uma dispersão líquido-líquido é estabilizada por tensioativos (Magenheim & Benita, 1991; Langevin 1992). Elas são principalmente empregadas para encapsulação de fármacos hidrofóbicos, preferencialmente lipofílicos, embora sejam também empregadas para veiculação de moléculas hidrofílicas, tais como oligonucleotídeos (Teixeira *et al.*, 1999), que ficam adsorvidos por fortes interações com a superfície (figura 9).



**FIGURA 9** – Representação esquemática de nanocápsulas (a, b), nanoemulsões (c) nanoesferas (d, e, f). a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanoemulsões d) fármaco dissolvido na matriz polimérica das nanoesferas; e) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas f) fármaco adsorvido na matriz polimérica das nanoesferas.

O desenvolvimento destes sistemas visa várias aplicações terapêuticas, podendo ser administrados por via oral, parenteral, tópica, nasal e ocular (Barrat, 2000). Busca-se através da vetorização uma distribuição mais seletiva dos fármacos, aumentando assim o índice terapêutico. Por via oral, observa-se que muitos fármacos como a indometacina e o diclofenaco causam irritação gástrica e outros como a insulina são degradados. A encapsulação destes fármacos foi capaz de reduzir esses efeitos indesejáveis, além de proteger as moléculas biologicamente ativas da degradação levando a um aumento da resposta biológica (Guterres *et al.*, 2000; Guterres *et al.*, 2001; Aboukabar *et al.*, 1999). Pela via oftálmica (Calvo *et al.*, 1996) espera-se obter com o uso de vetores, o controle da liberação, o aumento da biodisponibilidade ocular com a diminuição dos efeitos colaterais devido à absorção sistêmica de certos fármacos.

Alguns antifúngicos como anfotericina B e nistatina têm sido associados a vetores poliméricos e lipídicos e resultados promissores em termos de redução de toxicidade foram observados (Lopez-Berestein *et al.* 1983.; Metha *et*

*al.*, 1987). A anfotericina B é um dos fármacos mais utilizados para tratar infecções fúngicas graves, porém, sua utilização é comprometida pela elevada incidência de reações adversas o que leva ao abandono precoce da terapia. Para contornar tais problemas, a anfotericina tem sido associada a vetores coloidais, que comprovadamente possuem menos efeitos tóxicos e que hoje estão disponíveis no mercado como: anfotericina B lipossomal (Ambisome®) e (Fungisome™), complexo lipídico (Abelcet®) e dispersão coloidal (Amphocil®) com a vantagem de terem baixa nefrotoxicidade (Maesaki 2002, Kshirsagar *et al.*, 2005; Barratt *et al.*, 2005; Martinez, 2006). Estudos realizados em ratos com candidíase sistêmica mostraram que a encapsulação da anfotericina B em lipossomas reduziu a sua toxicidade e permitiu o uso de doses mais elevadas, aumentando a eficácia terapêutica (Lopez-Berestein *et al.*, 1983). A associação da anfotericina B à nanoesferas (NS-718) mostrou atividade similar à forma convencional da anfotericina B (anfotericina B desoxicolato), contra cepas de *Aspergillus fumigatus in vitro*, porém atividade superior à anfotericina B lipossomal. Estes resultados foram confirmados em estudos *in vivo*, utilizando modelo de aspergilose pulmonar em ratos (Otsubo, 1996). Estudo em modelo murino de candidíase demonstrou que emulsões submicrométricas de anfotericina B foram mais efetivas em prolongar a sobrevivência dos animais do que a anfotericina B convencional (Levy *et al.*, 1993, Espuelas *et al.*, 2003).

A nistatina tem seu uso limitado ao tratamento de infecções da pele e mucosas devido a sua toxicidade por via parenteral. Em estudos realizados por Metha e colaboradores em 1987 a associação da nistatina em lipossomas demonstrou a diminuição da toxicidade desta em eritrócitos humanos e a atividade antifúngica contra a *C. albicans* foi mantida em comparação com a nistatina livre. Além disso, a dose máxima tolerada da nistatina livre não teve efeito no tratamento dos camundongos infectados, entretanto a nistatina lipossomal em doses equivalentes aumentou a sobrevivência dos animais.

A encapsulação de antifúngicos azólicos também tem sido descrita na literatura (Chasteigner *et al.*, 1996a, 1996b; Levy *et al.*, 1995). O tratamento com múltiplas doses de emulsões submicrométricas de miconazol melhorou a proteção contra *Cryptococcus neoformans* em camundongos infectados,

entretanto os níveis de miconazol no cérebro foram menores que o requerido para erradicação completa do fungo (Levy *et al.*, 1995). Em estudos *in vitro*, tanto o miconazol quanto o cetoconazol encapsulados em lipossomas mostraram menor atividade do que os respectivos fármacos livres em cultura de *C. albicans* (De Logu *et al.*, 1997). Quando o econazol e o clotrimazol foram associados à nanopartículas observou-se um aumento significativo da biodisponibilidade relativa e absoluta em comparação aos fármacos livres após administração oral e intravenosa em camundongos (Pandey *et al.*, 2005). Gupta e colaboradores em 2000 observaram que o fluconazol encapsulado em lipossomas tem sua meia vida significativamente aumentada na cavidade vítrea de coelhos em comparação ao fármaco livre, porém, quando os lipossomas foram utilizados em um modelo de endoftalmite induzida por *C. albicans* a capacidade de esterilização do humor vítreo foi inferior (Gupta *et al.*, 2000b). Em outro trabalho foi observada uma redução da toxicidade retinal de fluconazol associado à lipossomas após injeção intravitreal em coelhos albinos (Velpandian *et al.*, 2006). O fluconazol radiomarcado encapsulado em nanocápsulas estericamente estabilizadas foi detectado por maior tempo *in vivo* em infecções induzidas por *Candida albicans* que o fluconazol livre (Assis, 2007).

#### **1.4.1. NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES**

As nanocápsulas são carreadores nanoparticulados compostas de um núcleo oleoso, envolto por uma parede polimérica com surfactantes lipofílicos e/ou hidrofílicos na interface. Em sua preparação podem ser usados óleos de origem vegetal e mineral, sendo que os principais fatores para a escolha do óleo são: ausência de toxicidade, incapacidade de degradar o polímero e alta capacidade de dissolver o fármaco (Legrand *et al.*, 1999). Os polímeros biocompatíveis e biodegradáveis são os preferidos na encapsulação, pois são facilmente excretados pelo organismo evitando o risco do acúmulo. São utilizados, geralmente em concentrações entre 0,2 a 2% (p/p) podendo ser de diferentes origens: natural (goma arábica, gelatina, quitosana), semi-sintética



(etil celulose, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose,  $\beta$ -ciclodextrinas); ou, mais comumente, sintética, destacando-se os poliésteres como policaprolactona (PCL), ácido poli (*D, L* – láctico) (PLA), ácido poli (glicólico) (PGA) e seus copolímeros. Os tensoativos também são utilizados em concentrações baixas na ordem de 0,2 a 2% (p/p) e geralmente o tensoativo lipofílico é uma lecitina natural de conteúdo relativamente baixo de fosfatidilcolina, enquanto que o hidrofílico é sintético podendo ser aniônico (lauril sulfato), catiônico (quaternário de amônio) ou mais comumente, não iônico (polioxietileno-polioxipropileno ou derivados do sorbitan).

As nanocápsulas são tecnicamente atraentes devido à sua cavidade oleosa, que permite altos rendimentos de encapsulação de substâncias lipofílicas, além de serem constituídas por polímeros estáveis, com baixa toxicidade e capacidade de degradação controlada no organismo (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Podem ser classificadas como convencionais ou estericamente estabilizadas. As convencionais possuem superfície mais hidrofóbica e por isso são facilmente reconhecidas pelo sistema de defesa do organismo concentrando preferencialmente os fármacos encapsulados nos órgãos e células do sistema fagocitário mononuclear (Mosqueira *et al.*, 2001a), enquanto as estericamente estabilizadas possuem sua superfície modificada com cadeias de PEG ligadas covalentemente, permitindo que quando injetadas por via i.v., escapem das células do SFM. São também conhecidas como nanocápsulas furtivas (Mosqueira *et al.*, 2001a, 2001b), prolongando assim o tempo de circulação sanguínea e liberando lentamente, no compartimento plasmático, os princípios ativos encapsulados no seu interior.

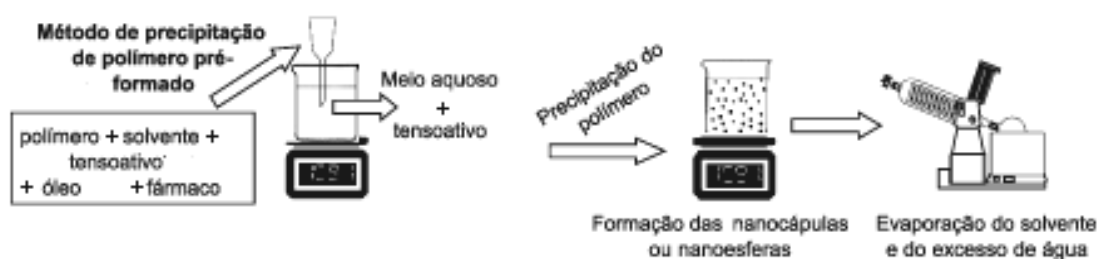
As nanoemulsões são emulsões submicrométricas, com tamanho inferior a 1 $\mu$ m, formadas pelos mesmos componentes presentes nas nanocápsulas, porém não possuem o envoltório polimérico. Nos últimos anos elas têm ganhado cada vez mais atenção, principalmente como carreadores de fármacos lipofílicos administrados via parenteral (Benita & Levy, 1993). Possuem inúmeros atrativos biológicos e farmacêuticos como biodegradabilidade, biocompatibilidade, estabilidade física e facilidade de produção e esterilização. Além disso, possuem preço reduzido de produção

quando comparadas com as nanocápsulas e lipossomas. Além de serem utilizadas como vetores de fármacos, direcionando-os a órgãos específicos, podem proteger compostos susceptíveis à hidrólise e reduzir irritação ou toxicidade causada por alguns fármacos. As nanoemulsões também têm utilidade como sistema de liberação sustentada por meio de formação depósito após injeção subcutânea (Benita, 1999; Pankerd & Stella, 1990; Lundberg, 1994; Mbela & Verschuren, 1997).

As nanocápsulas podem ser preparadas por diversos métodos, sendo que os dois principais métodos são: a polimerização interfacial de monômeros ou a deposição interfacial de polímeros pré-formados. A polimerização interfacial de monômeros apresenta como desvantagem o emprego de polímeros não biodegradáveis. Os subprodutos das reações, muitas vezes não são totalmente biocompatíveis, deixando resíduos tóxicos provenientes dos monômeros, oligômeros, tensioativos residuais ou catalisadores empregados na reação. Durante a reação de polimerização *in situ* podem ocorrer reações com o fármaco, por exemplo, e haver a degradação de outros componentes das nanopartículas, quando a radiação é utilizada como indutora da polimerização (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

Dentre os métodos que empregam a deposição interfacial de polímeros pré-formados encontram-se a emulsificação-evaporação, a nanoprecipitação, o método de *salting-out* e a emulsificação seguida de difusão (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Soppimath *et al.*, 2001). As formulações do presente estudo foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (figura 10), visto que é uma técnica simples de ser executada, reproduzível e facilmente transponível para a escala industrial. Foi descrita e patenteada por Fessi e colaboradores em 1989. O processo consiste na mistura, sob agitação moderada, de uma fase orgânica (contendo um solvente orgânico polar miscível com água, um tensioativo hidrofóbico, um ou mais polímeros insolúveis no óleo e na água e um fármaco lipofílico) miscível em uma fase aquosa (contendo um tensioativo hidrofílico). Após a adição da fase orgânica na fase aquosa, o polímero precipita na interface óleo-água pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes

fornece uma energia favorável para formação de gotas nanométricas de óleo que servem como núcleo para a precipitação do polímero. Instantaneamente as nanopartículas são formadas surgindo uma suspensão leitosa, com elevada opalescência. Em seguida, o solvente é removido sob pressão reduzida e a suspensão concentrada através da evaporação da água (Fessi *et al.*, 1989, Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). As nanoemulsões foram preparadas pelo mesmo método, porém com ausência do polímero.



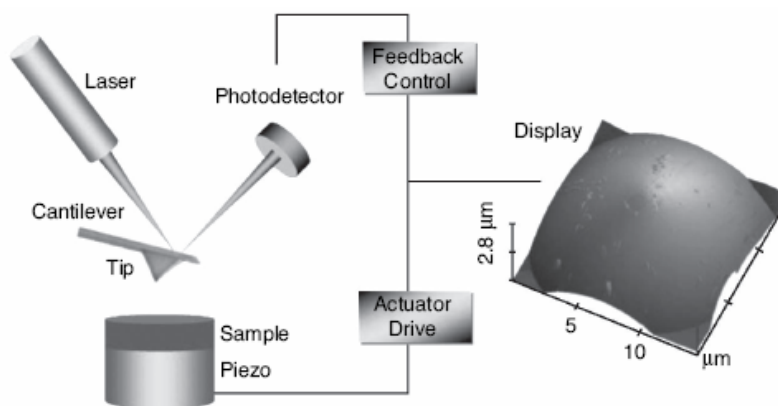
**Figura 10:** Método empregado na preparação de nanocápsulas baseado na precipitação do polímero pré-formado (Schaffazick *et al.*, 2003).

#### 1.4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES

A determinação das características físico químicas das nanopartículas é de grande importância, porém, é tecnicamente difícil de ser realizada, devido ao tamanho reduzido das partículas (inferior a  $1\mu\text{m}$ ) (Magenhein & Benita, 1991). A avaliação desses sistemas só é possível mediante a combinação de diversas técnicas de análise, sendo estas principalmente: a avaliação morfológica, o estudo da distribuição de tamanho das nanopartículas, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação do teor de encapsulação, o estudo da cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento (Legrand *et al.*, 1999).

### 1.4.2.1. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

A observação direta das nanopartículas pode ser realizada através de métodos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou de transmissão (MET). Essas técnicas têm sido empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas (Schaffazick *et al.*, 2003). Hoje, uma outra técnica que tem sido cada vez mais utilizada é a microscopia de força atômica (MFA) (Legrand *et al.*, 1999) que fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície em nível atômico (Neves *et al.*, 1998). A MFA pode ser utilizada para a caracterização de nanossistemas tais como lipossomas (Ruozzi *et al.*, 2005), nanoesferas (Feng *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005) e nanocápsulas (Leite *et al.*, 2005; Mosqueira *et al.*, 2005, Pereira *et al.*, 2007, Assis *et al.*, 2008, Montasser *et al.*, 2002). Neste trabalho a análise morfológica das nanocápsulas e nanoemulsões foi realizada por MFA, pois a técnica de microscopia de varredura não possui resolução suficiente para a determinação de tamanho na escala estudada e a MFA não necessita de tratamento prévio da amostra com agentes colorantes ou de recobrimento (Garg *et al.*, 2005). Na MFA, uma sonda extremamente fina (~100 Å de diâmetro na extremidade da sonda) montada sobre a extremidade de uma alavanca varre a superfície da amostra em inspeção, mantendo uma pequena força constante entre a sonda e a amostra que faz a alavanca defletir. Essa deflexão é detectada por um sistema laser-fotodetector que converte os dados em um mapa topográfico da superfície da amostra. A figura 11 apresenta um desenho esquemático e o princípio de funcionamento do MFA. Além das grandes ampliações, a MFA apresenta outras vantagens que incluem: a obtenção de informações nas três dimensões espaciais; utilização de amostras condutoras e/ou isolantes, além da simplicidade de preparo da amostra, permitindo a análise na amostra hidratada ou desidratada, sem necessidade de utilização de vácuo (Neves *et al.*, 1998).



**FIGURA 11:** Desenho esquemático e Princípio de Funcionamento do MFA (Garg, 2005).

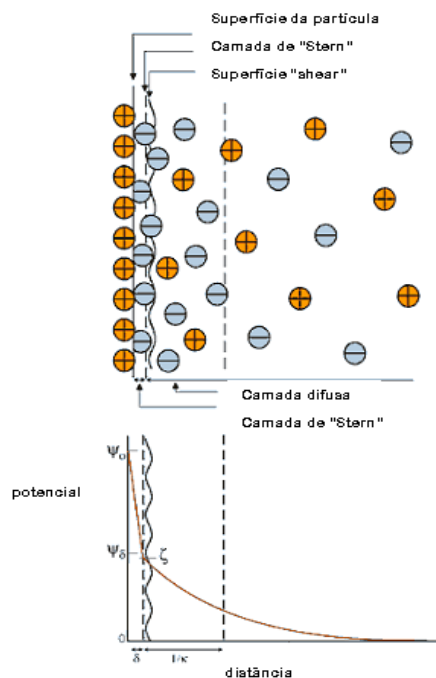
#### 1.4.2.2. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS

Para determinação do tamanho médio da população de nanocápsulas e nanoemulsões obtidas e a distribuição de tamanho indicada pelo seu índice de polidispersão o método mais utilizado é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS) associada a outras técnicas de imagem para confirmação do tamanho absoluto (Shekunov *et al.*, 2007). Esta técnica fornece medidas rápidas e precisas para determinação de partículas com tamanho entre 3nm e 3 $\mu$ m indicando a largura de distribuição de tamanho, o que é fundamental para caracterização das formulações. Geralmente, o tamanho das nanopartículas preparadas pela técnica de nanoprecipitação varia entre 100 e 500nm, sendo influenciado por diversos fatores tais como: natureza e concentração do polímero e do fármaco, concentração de tensoativos, proporção entre o solvente e a água, concentração do óleo, além da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (Legrand *et al.*, 1999, Mosqueira *et al.*, 2000; Schaffazick *et al.*, 2003). É importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho das partículas (Magenheim & Benita, 1991). No presente trabalho a técnica utilizada para avaliar a distribuição de tamanho foi a PCS e a MFA. Além disso, a técnica de PCS foi também utilizada para avaliar a estabilidade física das

preparações ao longo do tempo. A técnica de PCS baseia-se na análise do movimento browniano das partículas, ou seja, na capacidade de deslocamento constante das partículas presentes em determinado sistema fazendo com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento. Através da dispersão da luz é possível determinar o diâmetro médio das partículas (Manual do Malvern Instruments, 1996). Partículas grandes movem-se mais lentamente que as pequenas, de forma que a taxa de flutuação da luz espalhada por elas também é mais lenta. Utiliza-se a medida dessas flutuações da luz para determinar a distribuição do tamanho das partículas. Com a agregação das nanocápsulas e nanoemulsões, que pode ocorrer devido a instabilidades nos colóides, o tamanho das partículas pode variar e ser monitorado pelas técnicas supracitadas.

#### **1.4.2.3. POTENCIAL ZETA**

Para caracterização da superfície das nanopartículas um método muito empregado envolve a medida da mobilidade eletroforética das partículas, que por meio de uma equação é convertida em potencial zeta ( $\zeta$ ). Essa técnica é denominada Anemometria do Laser Doppler (ALD). O potencial  $\zeta$  reflete a carga superficial das partículas, a qual pode ser influenciada por mudanças na interface com o meio externo, devido à dissociação de grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso ou na dispersão (Legrand *et al*, 1999; Couvreur *et al.*, 2002). Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta, sendo esta velocidade medida através da técnica de espalhamento de luz. Na superfície de cisalhamento entre as camadas carregadas da superfície e o meio aquoso difuso em torno dela (*shear zone*) é medido o potencial zeta (figura 12).



**FIGURA 12:** Representação esquemática de uma partícula de superfície positiva com uma camada de íons negativos adsorvidos na camada de Stern. São apresentados o potencial de superfície  $\Psi_0$  e o potencial na camada de "Stern"  $\Psi_\zeta$ . No ponto de cisalhamento entre as camadas (shear zone) é medido o potencial zeta ( $\zeta$ ). Adaptada de: [www.bic.com/whatiszetapotential.html](http://www.bic.com/whatiszetapotential.html).

As nanopartículas geralmente apresentam uma carga superficial diferente de zero, o que conduz a sistemas relativamente estáveis. Legrand e colaboradores (1999) afirmam que formulações constituídas por partículas com altos valores de potencial zeta (acima de 30 mV) apresentam maior estabilidade, visto que grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação entre as partículas em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes. O potencial zeta é afetado principalmente pelo poloxamer (um tensoativo não-iônico que reduz, em valor absoluto, o potencial), pelas lecitinas e pelos polímeros do tipo poliésteres que favorecem uma carga negativa na interface (Legrand *et al.*, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003). A forma como o fármaco está associado à nanopartícula pode ser também determinada por medidas de potencial zeta comparando-se várias formulações. A adsorção de fármacos na superfície das nanoestruturas geralmente resulta em alterações dos valores do potencial zeta e também na estabilidade coloidal do sistema.

#### 1.4.2.4. pH

A análise e o monitoramento do pH das suspensões de nanopartículas, em função do tempo, fornecem informações relevantes sobre a estabilidade destes sistemas. Alterações no pH podem ser indícios de degradação do polímero ou ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero (Legrand *et al.*, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003). Em um trabalho realizado por Calvo e colaboradores foi verificada uma diminuição da massa molar da PCL em suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas (Calvo *et al.*, 1996), após 6 meses de armazenamento, com conseqüente redução do pH destas formulações. Gutterres e colaboradores avaliaram a estabilidade química de NC pelo pH e pelo peso molecular dos polímeros e tanto o pH das dispersões quanto o peso diminuíram em função do tempo, com alteração significativa após 6 meses (Gutterres *et al.*, 1995). O decréscimo do pH foi atribuído à degradação do polímero e à presença de ácido livre no meio. A redução do pH pode também ser atribuída à ionização do fármaco liberado a partir da forma nanoestruturada, ou sua degradação no meio aquoso externo.

#### 1.4.2.5. TEOR DE ENCAPSULAÇÃO

A determinação do teor de fármaco contido em nanopartículas é essencial para a verificação da eficiência do sistema em carrear o fármaco. Entretanto, a separação das nanopartículas do meio aquoso externo no qual em geral elas são produzidas é tarefa difícil, devido ao reduzido tamanho das partículas (Soppimath *et al.*, 2001), a possibilidade de desorção do fármaco durante o processo de separação e aos diferentes níveis de diluição da amostra durante os processos de separação. As técnicas de separação mais utilizadas são a ultracentrifugação, a cromatografia de exclusão em gel e a ultrafiltração/centrifugação. Na primeira, a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a ultracentrifugação (Marchal-Heussler *et al.*, 1990). A concentração total de



fármaco, por sua vez, é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. Por conseguinte, a concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre. A ultrafiltração/centrifugação (Losa *et al.*, 1993; Guterres *et al.*, 1995; Schaffazick *et al.*, 2002), que foi utilizada no presente estudo é uma técnica que emprega uma membrana de ultrafiltração (100kDa) que retém as nanopartículas em um compartimento superior do dispositivo e no filtrado é dosado o fármaco não associado intimamente às nanoestruturas. A fração de fármaco associada às nanopartículas é calculada pela subtração das concentrações total e livre (Schaffazick *et al.*, 2003).

Diversos fatores são capazes de influenciar na quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características de superfície das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a natureza do óleo utilizado (no caso das NC e NE) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (Schaffazick *et al.*, 2003). No caso de nanoemulsões e nanocápsulas a solubilidade na fase oleosa é o fator primordial na capacidade de carregamento do sistema, uma vez que a membrana polimérica é bastante permeável e flexível (Mosqueira *et al.*, 2006, Leite *et al.*, 2005).

#### **1.4.2.6. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO**

Para uma caracterização completa os sistemas nanoestruturados devem ser submetidos à determinação da cinética de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas. Diferentes comportamentos cinéticos são esperados para um fármaco dissolvido no núcleo oleoso, retido ou ainda adsorvido na parede polimérica. Métodos de separação da amostra do meio de liberação como a diálise, a separação baseada na ultracentrifugação, a filtração a baixa pressão ou a ultrafiltração-centrifugação têm sido utilizados para este fim. Experimentos *in vitro* podem ser realizados em diferentes meios, desde

que obedecem às condições “sink” (isto é, em meio de dissolução com concentração do fármaco equivalente a até 10% da concentração de saturação), conforme a via de administração pretendida (Legrand *et al.*, 1999).

A liberação do fármaco a partir de sistemas coloidais é dependente tanto do tipo de carreador quanto da maneira na qual o fármaco está associado ao vetor. Segundo Soppimath e colaboradores em um sistema de liberação de fármacos do tipo reservatório, como as nanocápsulas, o fármaco está envolto pelo polímero e a liberação ocorre pela difusão do fármaco através da membrana polimérica o que, teoricamente descreve cinética de ordem zero (Soppimath *et al.*, 2001). Cruz e colaboradores em um estudo comparativo avaliaram o perfil cinético da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina associado a três sistemas coloidais (NC, NS e NE). Nesse estudo, a fase de liberação rápida (burst) e sustentada da NC apresentou tempos de meia-vida maior que a NS e NE. Desta maneira, pode ser observado que a presença do polímero influenciou diminuindo a fase rápida de liberação. A presença do óleo aumentou o tempo de meia-vida da fase sustentada (Cruz *et al.*, 2006). Por outro lado, Santos-Magalhães e colaboradores observaram perfis de liberação similares para nanocápsulas de PLGA e nanoemulsões contendo penicilina G benzatina, sugerindo que a parede polimérica das nanocápsulas não influencia o processo de liberação e que o processo cinético é governado pelo coeficiente partição óleo/água (Santos-Magalhães *et al.*, 2000). Além disso, uma rápida liberação inicial dos fármacos pode ser atribuída a uma pequena quantidade destes adsorvida à superfície das partículas (Schaffazick *et al.*, 2003).

#### **1.4.2.7. ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICA**

Partículas submicrométricas normalmente não possuem tendência à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é minimizado pelo movimento browniano inerente aos colóides. No entanto, com o tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a cremagem ou a sedimentação.

A estabilidade das nanopartículas pode ser influenciada, por exemplo, pela adsorção de tensoativos ou de moléculas ativas à superfície e para monitorar esta estabilidade, o tamanho da partícula, o potencial zeta, o teor de fármaco e o pH são parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados (Calvo *et al.*, 1996, Losa *et al.*, 1993; Fessi *et al.*, 1989; Guterres *et al.*, 1995).

# **OBJETIVOS**

## 1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas e nanoemulsões contendo antifúngicos azólicos (miconazol, cetoconazol e fluconazol) e avaliação dessas nanoestruturas em modelo experimental de candidíase sistêmica em camundongos imunossuprimidos.

## 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desenvolvimento farmacotécnico de NC de poli- $\epsilon$ -caprolactona e NE contendo derivados azólicos (Fluconazol, Miconazol, Cetoconazol);
- Avaliação do teor de encapsulação;
- Caracterização físico-química das nanopartículas (aspecto macroscópico, pH, distribuição de tamanho, potencial zeta);
- Avaliação da morfologia, estrutura, características de organização e da distribuição de tamanho das nanopartículas por AFM;
- Estudo da cinética de liberação do fármaco a partir das nanoestruturas *in vitro*;
- Avaliação da estabilidade física das nanoestruturas durante 4 meses ;
- Desenvolvimento de modelo experimental murino de candidíase sistêmica;
- Avaliação da atividade *in vivo* das nanocápsulas comparadas ao fármaco livre em camundongos previamente imunossuprimidos e infectados com *Candida albicans*.

**CAPÍTULO 2**  
***MATERIAIS E MÉTODOS***

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAIS

Foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes: cetoconazol e fluconazol (Galena, Brasil), nitrato de miconazol (Sigma-Aldrich, Brasil), ciclofosfamida (Baxter Oncology, Alemanha), dimetilacetamida (DMA) (Sigma-Aldrich, USA), fosfolípide de soja (lecitina com fosfatidilcolina ~70%) (Epikuron 170<sup>®</sup>, Lucas Meyer, França), Miglyol 810 N (triglicéride cáprico/caprílico) (Hulls, Alemanha), poloxamer 188 (Pluronic F68) Mw 42.500Da (Aldrich, EUA), PLA-PEG (PM 66.000Da copolimerizado com PEG 5.000Da) (Alkermes, EUA), ágar sabouroud dextrosado e ágar infusão cérebro coração (BHI) (Difco<sup>™</sup>, Becton, Dickinson and Company, USA), octanol (Spectrum<sup>®</sup>, Brasil), acetonitrila grau HPLC, acetona, diclorometano, metanol (Tedia, Brasil) etanol (Ecibra<sup>®</sup>, CETUS, Brasil), sulfato de magnésio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio (Grupo química, Brasil), glicose P.A., fosfato de sódio monobásico P.A. e fosfato de sódio dibásico P.A., formaldeído (Vetec<sup>®</sup>, Brasil), xilol e parafina (Synth<sup>®</sup>, Brasil), hematoxilina-eosina e entellan (Merck<sup>®</sup>, Alemanha). A água de qualidade MilliQ foi purificada no sistema Symplicity/System 185 (Millipore<sup>®</sup> USA).

### 2.2. ANIMAIS E MICRORGANISMOS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando de 20 a 30 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP. Os animais foram mantidos no biotério da Escola de Farmácia - UFOP até a realização dos experimentos e tiveram livre acesso à comida e água.

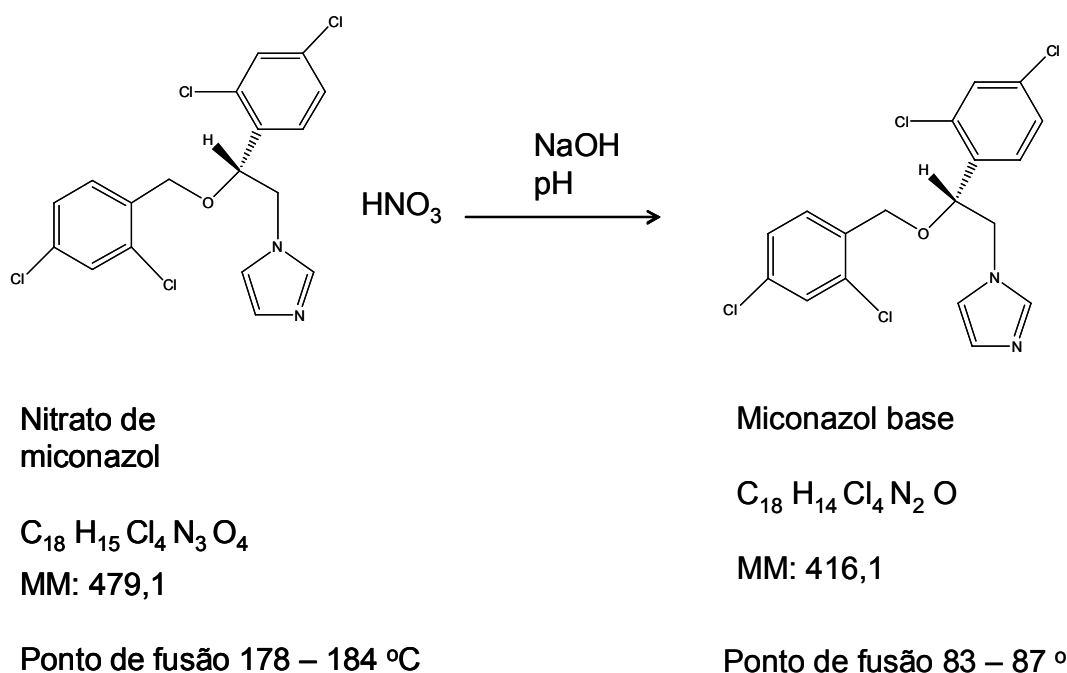
A cepa de *Candida albicans* utilizada foi adquirida da coleção do ICB-UFMG com código 9003, isolada de um portador sintomático com diagnóstico de candidíase cerebral, o qual foi tratado com fluconazol 400mg/dia durante duas semanas, seguido de 200mg/dia durante 3 meses. O paciente respondeu positivamente ao tratamento com fluconazol. Testou-se também cepas de *C.*

*albicans* (código 109) e *C. parapsilosis* (código 32), isoladas de pacientes assintomáticos do Hospital das Clínicas (Belo Horizonte-MG).

## 2.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES

### 2.3.1. PREPARAÇÃO DO MICONAZOL BASE

O miconazol base livre foi obtido a partir do nitrato de miconazol através da alcalinização do meio. A base livre é mais solúvel na fase oleosa utilizada na preparação das nanoemulsões e nanocápsulas, composta de triglicerídeos de cadeia média. A reação está esquematicamente representada na figura 13.



**FIGURA 13:** Preparação do miconazol base livre a partir do nitrato de miconazol.

A reação ocorreu a partir da dissolução de 2,0 g do nitrato de miconazol (Sigma-Aldrich) em 50 mL de uma mistura de solventes metanol/água (1:3), seguida pela alcalinização do meio com hidróxido de sódio até ocorrer turvação (pH = 10). A extração da base livre foi feita em um funil de separação com 20



mL de diclorometano (3X). Posteriormente, lavou-se a solução orgânica com 20 mL de água recém-destilada (2X) para eliminar o excesso de NaOH. Acrescentou-se à solução orgânica sulfato de magnésio para remoção do restante de água e em seguida o solvente foi eliminado sob pressão reduzida em um rotavapor (Heidolph Instruments, Alemanha). O miconazol base foi armazenado ao abrigo da luz em dessecador contendo sílica gel anidra e o peso do produto final avaliado até peso constante. A pureza do miconazol base foi avaliada pelo seu ponto de fusão.

### **2.3.2. PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES**

A preparação das nanocápsulas foi realizada pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido pela evaporação do solvente, método também conhecido como nanoprecipitação, descrito por Fessi *et al.* (1989). Para o preparo das NC convencionais, foram dissolvidos 60 mg de polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) em uma solução de acetona (10 ml) contendo 0,75% p/v de lecitina de soja (Epikuron®) e 2,5% v/v de Miglyol 810 N. A dissolução ocorreu por meio de agitação com o auxílio de um agitador magnético e aquecimento até 40°C. Em seguida, a solução orgânica foi vertida em uma solução externa aquosa (20 mL) contendo 0,75% p/v de Poloxamer 188 (Pluronic F68), mantendo a mesma agitação por 10 minutos, a fim de promover a formação das nanocápsulas. Posteriormente, esta suspensão foi levada ao rotavapor (Heidolph Instruments, Alemanha), mantendo-se a temperatura do banho em torno de 50°C para evaporação do solvente à pressão reduzida, até um volume final de 10 mL. Para a preparação das nanocápsulas furtivas foram seguidas as mesmas etapas, diferindo somente no polímero utilizado que foi o copolímero PLA-PEG (12mg/mL) e na fase aquosa não se adicionou o tensoativo poloxamer. As formulações de NC convencionais e furtivas contendo o fármaco foram preparadas nas mesmas condições descritas acima, adicionando-se os fármacos em diferentes concentrações (1-5 mg/ml) na fase orgânica. As nanoemulsões foram obtidas pelo mesmo método descrito para nanocápsulas, porém não continham o polímero PCL.

Depois da preparação, o pH das suspensões de NC e NE foi determinado usando um potenciômetro (pH 300 analyser). As etapas do preparo da NC e NE estão apresentadas na figura 14.



**FIGURA 14:** Etapas da Preparação de Nanocápsulas e Nanoemulsões. 1) Preparação das fases aquosa e oleosa; 2) Preparação das nanocápsulas e nanoemulsões; 3) Agitação após preparação; 4) evaporação do solvente.

### 2.3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO POR ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA

A determinação do espectro de absorção dos fármacos foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta utilizando um espectrofotômetro Hélios  $\alpha$ , identificando-se os picos de absorção máxima para a análise quantitativa. A partir de uma solução do fármaco em acetonitrila, foi realizada uma varredura na região do ultravioleta. Foram determinados também os picos máximos de absorção dos constituintes das nanocápsulas e das nanoemulsões brancas, diluídas em acetonitrila, para evidenciar possíveis interferentes na análise quantitativa.

Posteriormente, a partir de uma solução estoque do fármaco em acetonitrila, foram preparadas diferentes diluições. Essas preparações foram

utilizadas para determinação da curva de calibração dos fármacos. Todos os testes e doseamentos foram realizados em triplicata.

Além disso, foram determinados para o fluconazol os picos de absorção máxima por espectrofotometria no ultravioleta, a partir de uma solução do fluconazol em octanol-etanol (1:1) e acetonitrila-salina 0,9% (1:1) e em seguida foram determinadas as curvas de calibração para posterior utilização nos estudos de liberação *in vitro*.

#### 2.3.4. DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ENCAPSULAÇÃO

A porcentagem de fármaco encapsulado (A) e a eficiência de encapsulação (B) nas nanocápsulas e nanoemulsões foram determinadas pelas seguintes equações:

$$(A): \% \text{ encapsulação} = \frac{\text{conc. fármaco total suspensão coloidal (mL)} - \text{conc. fármaco filtrado (mL)}}{\text{conc. fármaco total suspensão coloidal (mL)}} \times 100$$

$$(B): \text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{quantidade de fármaco encapsulado (mL)}}{\text{quantidade de fármaco pesado para o preparo (mL)}} \times 100$$

A porcentagem de encapsulação visa determinar o teor de fármaco associado intimamente à nanopartícula em relação ao total de fármaco na preparação. Portanto, esse índice foi calculado pela diferença entre a quantidade de fármaco na suspensão (medida por dissolução da suspensão total em acetonitrila) e o fármaco livre no meio externo aquoso (ultrafiltrado) obtido após a ultrafiltração da amostra em unidades AMICON (membranas MICROCON de 100.000Da, Millipore®). No interior do filtro, foram adicionados 400 µL de suspensão de NC e NE, centrifugados de 20-60 minutos a 500 × g. 20 µL do ultrafiltrado contendo o fármaco livre foi misturado em 980 µL de acetonitrila, agitados no vortex por 15 minutos, centrifugados a 5900 × g por 10 minutos e a quantidade de fármaco no sobrenadante foi estimada por

espectroscopia no ultravioleta. A quantidade de fármaco aderida à membrana de ultrafiltração foi estimada por remoção da membrana, seguida de sua lavagem em água MilliQ. A membrana foi adicionada a 1000 µL de acetonitrila, agitada em vortex por 15 minutos, centrifugada a  $5900 \times g$  por 10 minutos e a quantidade de fluconazol foi determinada no sobrenadante. Para a determinação do fármaco total, 10 µL da suspensão das nanoemulsões ou nanocápsulas foram solubilizados em 990 µL de acetonitrila, homogeneizados em vortex e centrifugados a  $5900 \times g$  por 10 minutos. A quantidade de fármaco no sobrenadante foi estimada por espectroscopia no ultravioleta.

### **2.3.5. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E POTENCIAL ZETA**

A análise do tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Inglaterra). O potencial zeta foi determinado no mesmo aparelho usando a técnica de microeletroforese acoplado a Anemometria do Laser Doppler (ALD). Para a realização das medidas, 5 µL das amostras foram diluídos em 10 mL de NaCl 1mM previamente filtrado em filtro 0.45µm com o objetivo de se obter suspensões diluídas em soluções com forças iônicas constantes ( $1,2 \pm 0,2 \text{ mS/cm}^2$ ) e resultados comparativos em relação às modificações de potencial introduzidas pelo fármaco encapsulado. As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente, utilizando-se um ângulo de 90°. As medidas de tamanho e potencial zeta foram realizadas na mesma amostra. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

O índice de polidispersão, calculado pelo equipamento reflete o perfil de homogeneidade no tamanho das partículas. Amostras que apresentaram índice de polidispersão inferior a 0,3 foram consideradas monodispersas. A equação abaixo é utilizada para o cálculo do índice de polidispersão de tamanho de uma amostra, segundo a literatura (Zili *et al.*, 2005).

$$\text{Polidispersão} = \frac{D(0.9) - D(0.1)}{D(0.5)}$$

$D(0.9)$  = corresponde ao tamanho das partículas imediatamente acima de 90% na amostra.

$D(0.5)$  = corresponde ao tamanho das partículas imediatamente acima de 50% na amostra.

$D(0.1)$  = corresponde ao tamanho das partículas imediatamente acima de 10% na amostra.

### 2.3.6. ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES

A análise morfológica das nanocápsulas e nanoemulsões foi realizada por microscopia de varredura por sonda mecânica, utilizando-se a técnica de força atômica, à temperatura ambiente, nos equipamentos Multimode e Dimension 300, ambos monitorados por controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, EUA), do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC, MG). As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente (*tapping mode*) utilizando-se sondas de silício de comprimento de 228  $\mu\text{m}$ , com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 29-61 N/m e raio de curvatura de 5 a 10 nm. Aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  das amostras foram depositados em placas de mica clivadas no momento do uso. A mica foi utilizada como suporte para as amostras, uma vez que é um mineral com plano basal de clivagem muito fácil apresentando superfície atômica plana. A superfície exposta é hidrofílica e apresenta cargas negativas. Após a deposição das amostras na superfície da mica, essas foram secas utilizando-s por jato de argônio. Testou-se também a fixação das amostras através da deposição de uma gota ( $\sim 10 \mu\text{L}$ ) de glutaraldeído 25% sobre a superfície da mica, previamente à aplicação da amostra. Após homogeneização da mistura, secou-se a superfície com jato de argônio. A varredura foi efetuada em uma velocidade de 1 Hz com resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa de análise do sistema (Section Analysis). Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de aproximadamente 30 partículas analisadas.

### 2.3.7. ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

#### FLUCONAZOL

O estudo de liberação do fluconazol das nanocápsulas e nanoemulsões foi realizado por dois métodos: meio sink externo adaptado de Chorny e colaboradores (2002) e por diálise direta a 37°C em diferentes tempos em solução salina 0,9%.

Para realização do experimento de liberação pelo método sink externo, 1mL da suspensão de NC ou NE recém preparada foi incubada com 400µL de n-octanol em tubos testes, a 37°C sob agitação moderada. Nos intervalos de tempo de 0,25; 0,5; 1,0; 4,0; 6,0; 12; 24; 48 horas os tubos foram retirados e centrifugados a 5900 × g por 30 minutos. A camada orgânica foi completamente retirada e uma alíquota diluída em etanol e a quantidade de fluconazol foi determinada por espectrofotometria no UV a 261nm. Fluconazol disperso em água MilliQ na mesma concentração usada na NC e NE foi utilizado como controle. Um experimento adicional nas mesmas condições experimentais foi realizado, usando fluconazol disperso em água/ DMSO na mesma proporção.

Pelo método de diálise direta, 15mL da suspensão de NC ou NE recém preparada foi colocada em uma membrana de diálise semipermeável (12-14000 MWCO) e esta foi colocada em uma cuba com 300mL de salina 0,9% (meio de liberação) a 37°C, sob agitação (50rpm) em aparelho de dissolução (modelo 299/6 Nova Ética) utilizando-se aparato na forma de pá. Nos intervalos de tempo de 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 horas foram retiradas alíquotas de 2mL do meio de liberação e em seguida foi acrescentado ao meio 2mL de salina 0,9%. A alíquota foi diluída em acetonitrila (1:1) e a leitura da porcentagem de liberação do fármaco foi determinada por espectrofotometria no UV a 261nm. Fluconazol disperso em água MilliQ na mesma concentração usada na NC e NE foi utilizado como controle. Todos os experimentos de liberação em meio aquosos foram realizados em triplicata.

### **2.3.8. ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICA DE NANOESTRUTURAS DE FLUCONAZOL**

O efeito do tempo de estocagem na distribuição de tamanho e no potencial zeta das NC e NE foi avaliado. Para isso, as dispersões aquosas de NC e NE foram estocadas em frascos de vidro selados a 4°C e protegidos da luz, durante um período de 4 meses. As características macroscópicas referentes ao aparecimento de instabilidades da dispersão coloidal também foram avaliadas como cremagem, formação de sedimento e precipitação do fármaco, imediatamente após preparação e após 4 meses. As NC e NE foram submetidas à centrifugação a uma velocidade de 5900 *g* em uma centrífuga.

### **2.3.9. PURIFICAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE FLUCONAZOL**

A purificação das nanocápsulas foi realizada para retirada do fluconazol livre, não encapsulado. A técnica utilizada foi ultrafiltração/centrifugação em unidades AMICON (membranas MICROCON de 100.000Da, Millipore®). No interior do filtro, foram adicionados 400µL de suspensão de NC centrifugados por 20 minutos a 500 × *g*. Foi desprezado o filtrado e o que ficou retido na membrana foi recuperado vertendo o filtro invertido em outro tubo eppendorf e centrifugando por 5 minutos a 500 × *g*. Utilizando este procedimento sucessivamente o fármaco livre foi retirado da suspensão coloidal de nanocápsula. Em seguida foi avaliada a quantidade de fármaco que permaneceu nas nanocápsulas, realizando o procedimento descrito em 2.3.4. (determinação da porcentagem de encapsulação).

## 2.4. EXPERIMENTAÇÃO “IN VIVO”

### 2.4.1. IMUNOSSUPRESSÃO DOS ANIMAIS

#### A - Ciclofosfamida

Inicialmente foi utilizado a ciclofosfamida como agente imunossupressor para que a infecção com *C. albicans* fosse estabelecida adequadamente. Diferentes protocolos foram utilizados baseados em dados previamente descritos (Mikamo *et al.*, 2000; Shalit *et al.*, 2002). Avaliou-se o peso dos animais (n=6) por 30 dias e a sobrevivência. Foram utilizados os seguintes protocolos:

**TABELA 1:** Padronização dos protocolos de imunossupressão com ciclofosfamida

| Nº do Protocolo | Ciclofosfamida Dose/dia (mg/kg), i.p. | Regime de Dose       | Dose Total (mg/kg) | Dia da Infecção <sup>a</sup> | Via da infecção <sup>b</sup> |
|-----------------|---------------------------------------|----------------------|--------------------|------------------------------|------------------------------|
| P 1             | 200                                   | 200 mg/kg dose única | 200                | D4                           | i.p. <sup>c</sup>            |
| P 2             | 250                                   | 250 mg/kg dose única | 250                | D4                           | i.p. <sup>d</sup>            |
| P 3             | 250                                   | 250 mg/kg dose única | 250                | D4                           | i.v. <sup>d</sup>            |

<sup>a</sup> após início da imunossupressão; D0 = início da imunossupressão / <sup>b</sup> Administração intraperitoneal ou intravenosa de 100 µL de 10<sup>7</sup> UFC de <sup>c</sup>*Candida parapsilosis* e <sup>d</sup>*Candida albicans* (isolado de paciente assintomático).

#### B - Radiação gama

Utilizou-se também a radiação gama como agente imunossupressor. Os animais foram irradiados com radiação gama no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) em Belo Horizonte, com o objetivo de indução de imunossupressão. Este procedimento foi realizado no equipamento Gamacell 220 (Atomic Energy of Canadá Limited, Canadá), cuja fonte de radiação gama é o Co<sup>60</sup>. Os animais receberam uma dose de 6 Gray, durante aproximadamente 30 minutos.



Para avaliação do efeito da radiação na contagem global dos leucócitos, o sangue dos animais foi retirado 24 horas após irradiação. O material foi analisado no Laboratório de Análises Clínicas da Escola de Farmácia - UFOP onde foi realizado o leucograma das amostras no equipamento Micros 60 ABX, devidamente calibrado para a análise de leucócitos murinos. O mesmo procedimento foi realizado em camundongos não submetidos à irradiação.

#### **2.4.2. INFECÇÃO DOS ANIMAIS**

Para infecção dos animais, o isolado clínico de *Candida albicans* foi cultivado em ágar sabouraud dextrosado (SD) inclinado, sendo que duas culturas foram preparadas, uma cultura estoque (“mãe”), repicada a cada 30 dias e uma cultura para uso (“cultura de trabalho”). O meio foi incubado a 37°C por 24 horas, para o crescimento do fungo e, posteriormente, as culturas foram armazenadas à temperatura de 2 a 8°C.

Os camundongos foram infectados com *Candida albicans*, no quarto dia após a irradiação. Foi preparada uma suspensão do fungo em 10 mL de salina estéril 0,9%, padronizada através da comparação da turbidez com o padrão 0,5 da escala de MacFarland em espectrofotômetro Coleman SP a 580 nm. O resultado da absorbância ficou entre 0,08 e 0,10, o que equivale a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (NCCLS, 2002). A partir dessa suspensão de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL foram preparadas suspensões com  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  UFC/mL através da diluição seriada, retirando 1mL da suspensão e adicionando em 9,0mL de salina 0,9% estéril. Uma alíquota de 100 µL da suspensão fúngica foi injetada nos camundongos por via i.v. e i.p. Sendo assim, os inoculos testados foram  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC.

### **2.4.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FÁRMACO PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA**

#### **Fluconazol**

A solução de fluconazol foi preparada a partir da dissolução de 20mg de fluconazol em 200 $\mu$ L de dimetilacetamida (DMA) e em seguida em 9800  $\mu$ L de solução de glicose 5%. A concentração final de fluconazol foi de 2mg/mL.

#### **Cetoconazol**

A solução de cetoconazol foi preparada a partir da dissolução de 30mg de cetoconazol em 2mL de uma solução de dimetilacetamida (DMA/PEG400 4:6). Foi adicionado 13mL de solução de glicose 5%. A concentração final de cetoconazol na solução foi de 2mg/mL.

#### **Miconazol base**

A solução de miconazol base foi preparada a partir da dissolução de 20mg de miconazol base em 1mL de uma solução de dimetilacetamida (DMA/PEG400 4:6). Foi adicionado 9mL de solução de glicose 5%. A concentração final de miconazol base na solução foi de 2mg/mL.

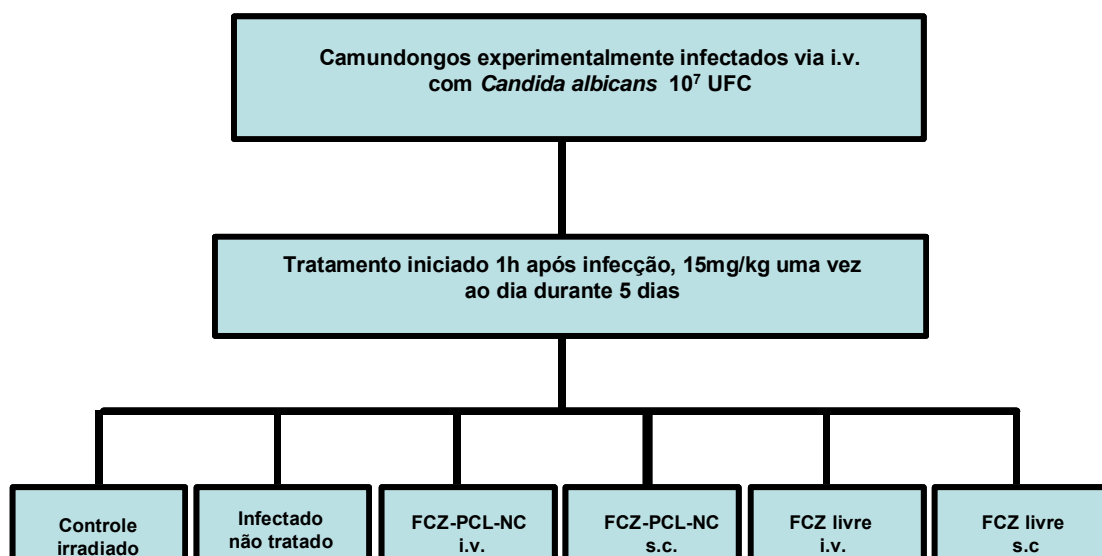
As preparações das suspensões coloidais de NC convencionais e furtivas foram realizadas como descrito no item 2.3.2. e as NC foram purificadas como no item 2.3.9. Todas as suspensões de nanoestruturas foram isotonizadas com adição de glicose em pó na concentração adequada para obtenção de 5% p/v. Todas as soluções de fármaco e suspensões coloidais foram filtradas em filtro Millipore 0,45 $\mu$ m (Milex™) estéril antes da administração para garantir a administração de partículas inferiores a 5 $\mu$ m, reduzindo-se a possibilidade de embolia e reduzindo-se as eventuais contaminações ou presença de material particulado e agregado.

#### 2.4.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Cada grupo experimental foi composto de 11 animais, sendo que todos os animais estavam imunossuprimidos por radiação gama ou ciclofosfamida. Somente nos protocolos IV e V utilizou-se também animais imunocompetentes. A infecção com a *Candida albicans* foi realizada por via i.v. Todos os experimentos de eficácia foram acompanhados de um grupo controle apenas irradiado, um grupo infectado/não tratado, grupos tratados com o fármaco livre (em solução) e outros tratados com as NC convencionais ou furtivas. O volume administrado aos animais por via i.v. foi de no máximo 0,2 mL, exceto quando volumes maiores foram necessários, onde o volume total foi dividido em aplicações de 0,2 mL em intervalos de 10 minutos. A duração dos tratamentos foi de 5 dias. Aos animais dos grupos controle irradiado, infectado/não tratado e imunocompetente/infectado não foi administrado nenhuma solução. O modelo experimental de tratamento foi dividido em diferentes protocolos descritos a seguir:

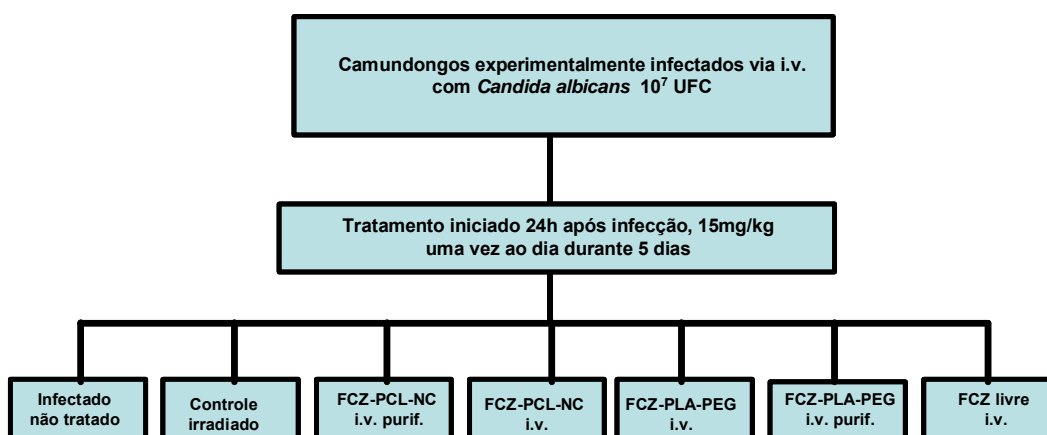
##### **PROTOCOLO I – Comparação da eficácia de nanocápsulas convencionais de PCL de fluconazol administradas por via intravenosa e subcutânea**

A eficácia do FCZ associado às NC convencionais (1mg/mL), administradas por via intravenosa e subcutânea foi avaliada em camundongos infectados com  $10^7$  UFC de *Candida albicans*. Os resultados foram comparados com a eficácia do FCZ livre (não encapsulado).



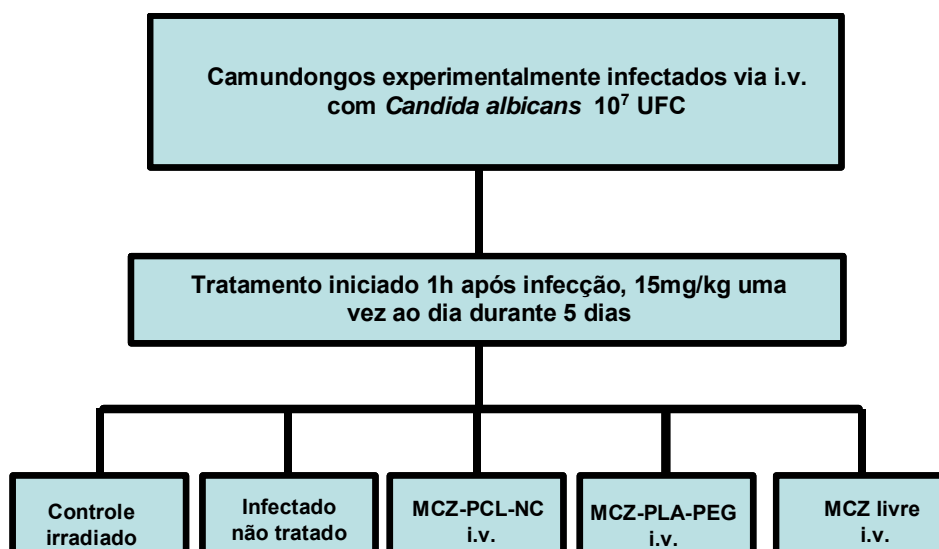
**PROTOCOLO II – Comparação da eficácia de nanocápsulas convencionais (PCL) e furtivas (PLA-PEG) de fluconazol administradas por via intravenosa**

A eficácia do FCZ associado às NC convencionais e furtivas (2mg/mL), administradas via intravenosa foi avaliada em camundongos infectados com  $10^7$  UFC de *Candida albicans*. Os resultados foram comparados com a eficácia do FCZ livre (não encapsulado).



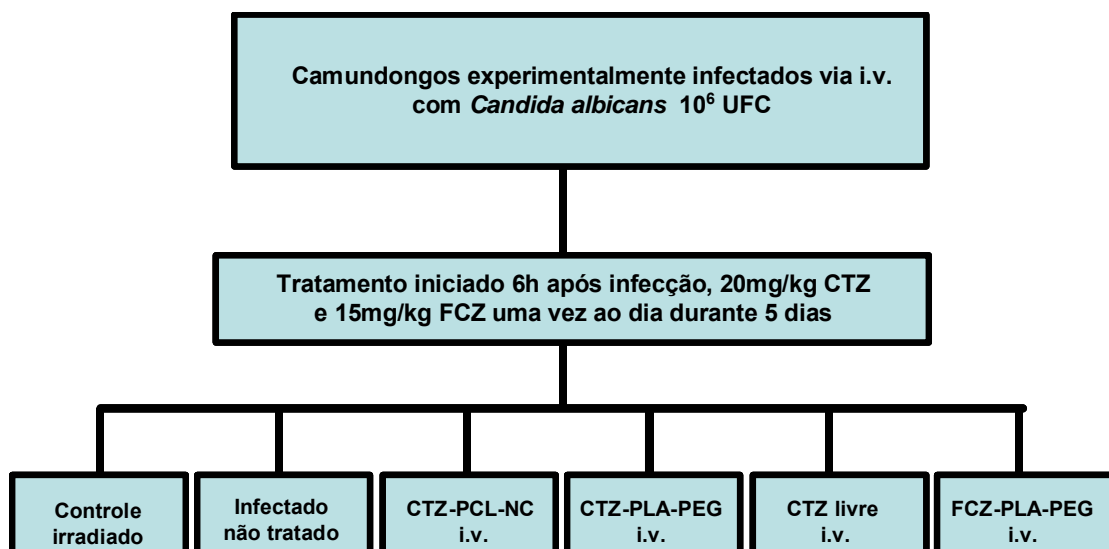
## Comparação da eficácia de nanocápsulas convencionais e furtivas de miconazol

A eficácia do MCZ associado às NC convencionais e furtivas (1,0mg/mL) administradas via intravenosa foi avaliada em camundongos infectados com  $10^7$  UFC de *Candida albicans*, segundo o protocolo I e II. Os resultados foram comparados com a eficácia do MCZ livre (não encapsulado).



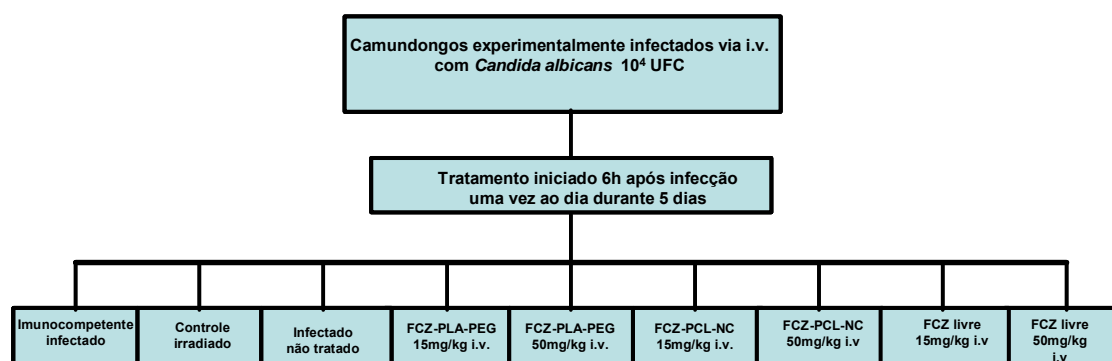
## PROTOCOLO III – Comparação da eficácia de nanocápsulas de cetoconazol e de fluconazol administradas por via intravenosa usando inóculo de $10^6$ UFC

A eficácia do CTZ associado às NC convencionais e furtivas (0,8mg/mL) e FCZ associado às NC furtivas (2,0mg/mL) administradas via intravenosa foi avaliada em camundongos infectados com  $10^6$  UFC de *Candida albicans*. Os resultados foram comparados com a eficácia do CTZ livre (não encapsulado).



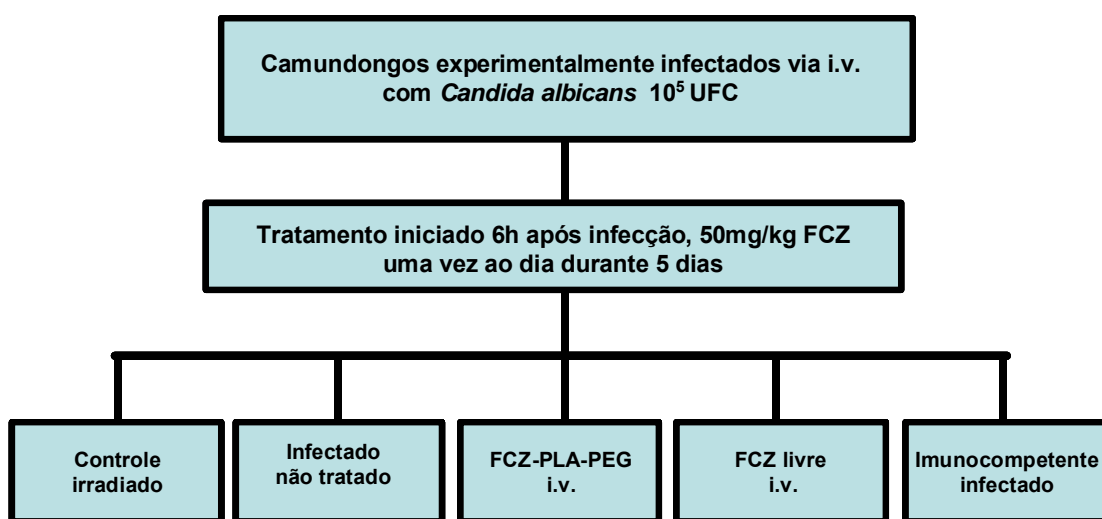
**PROTOCOLO IV – Comparação da eficácia de nanocápsulas convencionais e furtivas de fluconazol administradas por via intravenosa usando inóculo de 10<sup>4</sup> UFC**

A eficácia do FCZ associado às NC convencionais e furtivas (2,0mg/mL) administradas via intravenosa foi avaliada em camundongos infectados com 10<sup>4</sup> UFC de *Candida albicans*. Os resultados foram comparados com a eficácia do FCZ livre (não encapsulado).



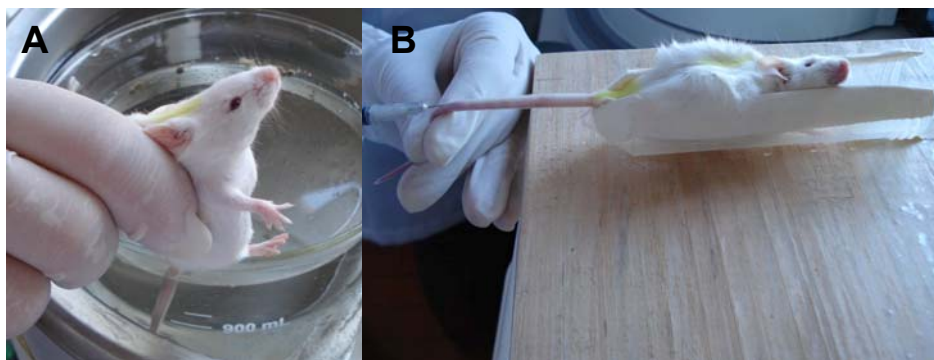
## PROTOCOLO V – Comparação da eficácia de nanocápsulas furtivas de fluconazol administradas por via intravenosa usando inóculo de $10^5$ UFC

A eficácia do FCZ associado à NC furtivas (2,0mg/mL) administradas via intravenosa foi avaliada em camundongos infectados com  $10^5$  UFC de *Candida albicans*. Os resultados foram comparados com a eficácia do FCZ livre (não encapsulado).



Para todos os protocolos a eficácia dos fármacos vetorizados em comparação com os fármacos na forma livre foi avaliada através da análise da sobrevivência, peso corporal por 30 dias, presença de *C. albicans* no sangue. Nos protocolos I e II também foi realizada a análise histológica. Os grupos foram constituídos por 11 animais, sendo 2 reservados para o sacrifício e análise histológica. Após 60 dias, os animais que permaneceram vivos foram mortos por deslocamento cervical.

Em todos os protocolos, para o tratamento i.v. a cauda do animal foi aquecida em água a uma temperatura de  $42^{\circ}\text{C}$  (figura 15 A) para que houvesse dilatação da veia lateral, permitindo administração das formulações (figura 15B).



**FIGURA 15:** Dilatação por aquecimento a 42°C da veia lateral da cauda (figura 17 A) e tratamento dos camundongos (figura 17 B).

Após 24h da inoculação da *Candida albicans* coletou-se sangue do plexo orbital de maneira estéril e fez-se cultura em ágar sabouroud dextrosado (SD) para verificar que o animal estava realmente infectado. O sangue foi colocado em placas de petri contendo ágar SD e cloranfenicol e as placas foram incubadas por 48h a 37°C. 48h após o final do tratamento, caso ainda houvesse animais vivos, 2 de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical e retirou-se sangue para posterior cultura e os seguintes órgãos: coração, fígado, rins e cérebro para realização de análises histológicas. O sangue foi cultivado da mesma forma que o sangue do plexo orbital. Parte dos rins e do cérebro dos 2 animais sacrificados em cada grupo (apenas para os protocolos III e IV) foram homogeneizados em condições assépticas em 2mL de salina estéril e colocados em tubos de ensaio contendo o ágar BHI e cloranfenicol e incubados por 48h a 37°C, para verificar a presença da infecção pela *C. albicans* nos órgãos.

#### 2.4.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Como descrito acima, durante a necropsia, os órgãos foram coletados e fixados por imersão em solução de formol tamponado a 10%, pH 7.2, com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do tecido. Após o período de fixação, os tecidos foram recortados e seccionados transversalmente. A



cada animal foi dado um código que apenas foi revelado ao final de todas as análises.

Os tecidos foram submetidos à desidratação, com a finalidade de se remover a água presente nos mesmos. O processo de desidratação foi realizado em concentrações crescentes de álcool (álcoois 70, 80, 90 e absoluto) sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool.

Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os fragmentos a dois banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina. Os blocos de parafina, contendo os fragmentos dos órgãos, foram submetidos à microtomia, sendo obtidos dois cortes seriados com 4 micrômetros de espessura. Cada corte foi colocado em banho-maria para que as fitas fossem esticadas e logo depois as lâminas foram colocadas na estufa para secarem a temperatura de 60° C. Foi realizada a coloração HE (Hematoxilina-Eosina) para observação das alterações histopatológicas.

O processo de coloração se iniciou com a imersão das lâminas em dois banhos de xilol, de duração de 15 minutos cada, para desparafinização. Em seguida estas lâminas foram imersas em banhos de álcool absoluto, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70% e água, sendo cada um dos banhos de 5 minutos, para hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante Hematoxilina (corante ácido) por 10 minutos, em seguida lavadas em água corrente por 5 minutos. A seguir, foi feita a diferenciação com a passagem rápida das lâminas em álcool-acidulado. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante Eosina (corante básico), por 30 segundos, e em seguida lavadas em água corrente por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram imersas em três banhos de álcool absoluto rapidamente e levadas à estufa a 60° C por alguns minutos para secagem. Depois de secas, as lâminas foram imersas em xilol e montadas com Entellan e lamínula. As lâminas coradas pela HE foram avaliadas

utilizando-se a objetiva de 20 e 40X, sendo a documentação realizada utilizando-se um microscópio Leica Dm5000 ACOPLADO a câmera digital.

#### **2.4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O diâmetro médio e o potencial zeta das NC e NE brancas e contendo o fármaco foram comparados por análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Epi Info versão 6.0. A análise de sobrevida entre os grupos experimentais foi realizada pelo teste de Kaplan-Meier log rank, o TMS (tempo médio de sobrevida) e o peso foram analisados por análise de variância (ANOVA) e submetidos em seguida ao teste de Tukey utilizando o programa Prisma versão 4.0. Para todas as análises adotou-se intervalo de confiança de 95%, sendo os valores de  $p < 0.05$  aceitos como estatisticamente significativos.

# ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

*Pollyanna Álvaro Spósito*

**CAPÍTULO 3**  
**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO**  
**DE NANOESTRUTURAS DE**  
**FLUCONAZOL**

### **3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES CONTENDO FLUCONAZOL**

A caracterização físico-química de nanoestruturas contendo fármacos é importante para a estimativa de seu perfil de biodistribuição e previsão da capacidade desses dispositivos em controlar a liberação dos ativos a eles associados. A caracterização visa também determinar a forma de associação entre fármaco e vetor, as modificações produzidas na interface entre a partícula e o meio aquoso externo causadas pela inclusão das moléculas ativas, a porcentagem de fármaco que o vetor é capaz de transportar e a eficiência do processo de nanoencapsulação, bem como, a influência do fármaco sobre o tamanho das partículas preparadas especificamente pelo método de nanoprecipitação utilizado nessa dissertação.

#### **3.1.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO**

A análise do tamanho e do índice de polidispersão das nanoemulsões e nanocápsulas convencionais e furtivas foi determinada por espectroscopia de correlação de fótons. Foram analisadas tanto partículas não carregadas quanto associadas ao fármaco em todas as concentrações trabalhadas. De acordo com os dados da literatura o tamanho das nanoestruturas é influenciado pela concentração do polímero na fase orgânica, pela viscosidade das fases; pela polaridade dos solventes, e pela relação de volume entre as duas fases, utilizando-se o método conhecido como nanoprecipitação (Fessi, 1989; Mosqueira *et al.*, 2000; Zili *et al.*, 2005). O diâmetro médio das partículas produzidas neste estudo foi compatível com os previamente descritos na literatura que mostram que as nanocápsulas geralmente apresentam diâmetro médio compreendido entre 200 e 300nm (Legrand *et al.*, 1999; Couvreur *et al.*, 2002; Mosqueira *et al.*, 2006; Assis *et al.*, 2008). As nanocápsulas e nanoemulsões apresentaram-se com um aspecto leitoso característico de suspensões coloidais nanométricas, como pode ser observado na figura 16.



**FIGURA 16:** Suspensões coloidais de nanocápsulas (A) e nanoemulsões (B) contendo fluconazol.

Todas as formulações de NC e NE não carregadas de fármaco ou associadas ao fluconazol foram obtidas como suspensões coloidais com tamanho da partícula variando entre 180 e 240nm e revelaram uma distribuição de tamanho unimodal, com índice de polidispersão menor que 0,25 como apresentados nas tabelas 2, 3, 4. O tamanho das nanopartículas influencia na distribuição destas no organismo, quando administradas pela via intravenosa.

**TABELA 2:** Caracterização físico-química das nanoemulsões preparadas com diferentes concentrações de fluconazol

| Formulações | FCZ (mg/mL) | Encapsulação (%) $\pm$ DP <sup>c</sup> | Eficiência de Encapsulação (%) $\pm$ DP <sup>c</sup> | Tamanho Médio $\pm$ DP <sup>ac</sup> (nm) | Potencial zêta ( $\zeta$ ) $\pm$ DP (mV) | Índice de Polidispersão <sup>b</sup> $\pm$ DP |
|-------------|-------------|--|--|---|--|---|
| NE-0        | 0           | -                                      | -  | 214,3 $\pm$ 0,96                          | -55,1 $\pm$ 3,5                          | 0,141 $\pm$ 0,016                             |
| NEFCZ-1     | 1           | 37,8 $\pm$ 0,3                         | 38,75 $\pm$ 1,25                                     | 195,6 $\pm$ 0,89                          | -53,2 $\pm$ 0,0                          | 0,122 $\pm$ 0,004                             |
| NEFCZ-3     | 3           | nd                                     | nd   | 206,4 $\pm$ 0,86                          | -61,3 $\pm$ 1,2                          | 0,134 $\pm$ 0,003                             |
| NEFCZ-5     | 5           | 22,8 $\pm$ 1,4                         | 13,5 $\pm$ 0,5                                       | 181,8 $\pm$ 1,80                          | -63,4 $\pm$ 6,3                          | 0,132 $\pm$ 0,011                             |

<sup>a</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>b</sup> Amostras monodispersas (<0.3); <sup>c</sup> n=3, Desvio Padrão determinado em três diferentes lotes; nd = não determinado.

Os valores apresentados (tabela 2) permitem sugerir que as preparações contendo fluconazol são favoráveis para utilização i.v., uma vez que apresentam populações homogêneas e monodispersas com tamanho inferior a 300nm. Torchilin (2000) demonstrou que nanopartículas com tamanho compreendido entre 10 e 500nm podem atravessar o endotélio e acumular-

se em áreas com permeabilidade vascular aumentada causada por processos inflamatórios ou infecciosos. Desta forma, as nanoestruturas produzidas nesse trabalho seriam potencialmente capazes de atingirem focos infecciosos ou inflamatórios (Torchilin, 2000).

Houve em geral uma redução significativa do tamanho das NC e NE após a inclusão do FCZ ( $p < 0,05$ ), como mostrado nas tabelas 2 e 3. Foi observado que as nanoemulsões tiveram seu tamanho reduzido entre 4 e 15% dependendo da concentração de fluconazol empregada. Ambrosini e colaboradores demonstraram que o fluconazol interage com a região da cabeça polar dos fosfolípides componentes das bicamadas (DPPC) sem penetração na porção apolar. Seria, portanto, provável uma interação com a fosfatidilcolina componente das nanoemulsões que acarretaria uma modificação na compactação da monocamada de tensioativos reduzindo o tamanho das nanogotas da emulsão. A maior concentração de fluconazol nas nanoemulsões foi responsável pela maior redução no tamanho médio das gotículas e pelo menor índice de polidispersão das amostras. Esse fato reforça a hipótese supracitada (tabela 2).

**TABELA 3:** Caracterização físico-química das nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona preparadas com diferentes concentrações de fluconazol

| Formulações <sup>a</sup> | FCZ (mg/mL) | Encapsulação (%) $\pm$ DP <sup>d</sup> | Eficiência de Encapsulação (%) $\pm$ DP <sup>d</sup> | Tamanho Médio $\pm$ DP <sup>bd</sup> (nm) | Potencial $\zeta$ $\pm$ DP (mV) | Índice de Polidispersão <sup>c</sup> $\pm$ DP |
|--------------------------|-------------|--|--|---|---------------------------------|---|
| NC-0                     | 0           | -                                      | -  | 238,3 $\pm$ 1,70                          | -63,1 $\pm$ 1,6                 | 0,153 $\pm$ 0,021                             |
| NCFCZ-1                  | 1           | 47,7 $\pm$ 0,3                         | 47,89 $\pm$ 0,21                                     | 212,7 $\pm$ 0,95                          | -58,9 $\pm$ 1,2                 | 0,119 $\pm$ 0,020                             |
| NCFCZ-2                  | 2           | 41,3 $\pm$ 0,3                         | 27,05 $\pm$ 0,5                                      | 219,3 $\pm$ 2,50                          | -55,6 $\pm$ 3,5                 | 0,163 $\pm$ 0,115                             |
| NCFCZ-2 *                | 2           | nd                                     | nd   | 220,6 $\pm$ 1,30                          | -57,4 $\pm$ 0,7                 | 0,012 $\pm$ 0,002                             |
| NCFCZ-3                  | 3           | nd                                     | nd   | 222,6 $\pm$ 0,54                          | -55,8 $\pm$ 3,3                 | 0,112 $\pm$ 0,002                             |
| NCFCZ-5                  | 5           | 28,5 $\pm$ 0,4                         | 22,93 $\pm$ 2,87                                     | 217,4 $\pm$ 0,84                          | -61,1 $\pm$ 2,5                 | 0,112 $\pm$ 0,015                             |

<sup>a</sup> Formulações de nanocápsulas constituídas por PCL = poli- $\epsilon$ -caprolactona; <sup>b</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>c</sup> Amostras monodispersas (<0.3); <sup>d</sup> n=3, determinado em três diferentes lotes; nd = não determinado. \* Nanocápsula de fluconazol purificada.

Em relação às nanocápsulas, o tamanho das partículas também foi ligeiramente reduzido, entretanto, de forma mais independente da dose de fluconazol incorporado (tabela 3).

Os índices de polidispersão também foram reduzidos significativamente ( $p < 0.05$ ) em concentrações maiores de fluconazol ou quando o fluconazol não encapsulado foi retirado da formulação (NC purificada), indicando formulações com dispersão de tamanho muito baixas e altamente reprodutíveis. A inclusão do polímero na formulação aumenta a complexidade da formulação e provavelmente outras interações começam a existir, embora o mesmo tipo de interação com a fosfatidilcolina possa também acontecer no caso das NC, que também possuem esse fosfolípido na mesma concentração das NE. É interessante, observar que os resultados obtidos com a inclusão de fluconazol em nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona são opostos em relação aos obtidos com nanocápsulas de ácido polilático (Assis *et al.*, 2008). O tamanho médio das NC de PLA<sub>50</sub> aumentou com a inclusão de fluconazol (2mg/mL) pela técnica da PCS. Entretanto, quando analisado pela técnica da AFM este tamanho foi reduzido. No presente trabalho, o tamanho das NC foi reduzido por ambas as técnicas, sendo que por AFM uma redução da ordem de 100nm foi observada com fluconazol a 5mg/mL (tabela 6). Esses dados sugerem que o fluconazol provavelmente interage diferentemente com os dois tipos de polímeros e que durante a formação do filme das nanocápsulas essas interações se traduzem em formação de partículas de menor tamanho no caso das NC de PCL.

As nanocápsulas apresentaram-se em geral maiores que as nanoemulsões em todas as formulações, esse aumento variou entre 16 e 36 nanômetros estimados pela técnica de PCS ( $p < 0.05$ ), indicando a existência de parede polimérica no caso das nanocápsulas. Utilizando-se a técnica de AFM, o cálculo da diferença entre os diâmetros de NC e NE foi de 36nm para as estruturas não carregadas de fármaco. Entretanto, por AFM essa diferença não é significativa ( $p > 0,05$ ), provavelmente devido ao número menor de amostra analisada. Calvo e colaboradores (1996) mostraram que nanocápsulas ou nanoemulsões contendo indometacina apresentaram tamanho de  $236,78 \pm$



20,26 e  $216,75 \pm 16,60$  respectivamente. Em outro estudo realizado por Cruz e colaboradores, também utilizando a indometacina ou éster etílico de indometacina, as nanocápsulas apresentaram um diâmetro superior ao das nanoemulsões, tanto as vazias quanto aquelas associadas à indometacina ou ao éster etílico de indometacina, sendo que a diferença do diâmetro variou de 30 a 70nm (Cruz *et al.*, 2006). Cauchetier e colaboradores (2003) em um trabalho de caracterização de nanocápsulas de atovaquone encontraram um diâmetro de aproximadamente 20nm para a parede polimérica das nanocápsulas utilizando diferentes polímeros (PCL, PLA e PLGA). Em outros estudos, a espessura da parede polimérica foi estimada em 10nm por microscopia eletrônica de transmissão (Fessi *et al.*, 1989; Ammoury *et al.*, 1989; Santos Magalhaes *et al.*, 1995; Dalençon *et al.*, 1997). Rube e colaboradores (2005) encontraram através da técnica de varredura neutrônica em pequenos ângulos um diâmetro de 9,8nm para a parede de nanocápsulas de PLA. O presente trabalho está em acordo com os dados da literatura, mostrando que as nanocápsulas apresentaram-se maiores que as nanoemulsões e, considerando que a diferença de tamanho encontrada entre a NC e a NE é devido à presença da parede polimérica nas NC, pode ser presumido que a parede polimérica das nanocápsulas de PCL tem um diâmetro próximo ao encontrado pelos diferentes autores, ficando entre 16 e 36nm. Foram também preparadas nanocápsulas com tempo de circulação sanguínea prolongada, conhecidas como nanocápsulas furtivas, produzidas a partir do polímero anfifílico de PLA-PEG. A caracterização físico-química dessas partículas está apresentada na tabela 4.

**TABELA 4:** Caracterização físico-química das nanocápsulas de PLA-PEG (furtivas)

| Formulações de Nanocápsulas | FCZ mg/mL | Encapsulação (%) $\pm$ DP <sup>d</sup> | Eficiência de Encapsulação (%) $\pm$ DP <sup>d</sup> | Tamanho Médio $\pm$ DP <sup>bd</sup> (nm) | Potencial $\zeta$ $\pm$ DP (mV) | Índice de Polidispersão <sup>c</sup> $\pm$ DP |
|-----------------------------|-----------|--|--|---|---------------------------------|---|
| PLA-PEG                     | 0         | -                                      | -  | 191,4 $\pm$ 0,43                          | -39,5 $\pm$ 1,5                 | 0,167 $\pm$ 0,023                             |
| FCZ-PLA-PEG-2               | 2         | 37,1 $\pm$ 0,9                         | 25,55 $\pm$ 0,65                                     | 202,2 $\pm$ 2,90                          | +2,3 $\pm$ 0,1                  | 0,200 $\pm$ 0,010                             |
| FCZ-PLA-PEG-2*              | 2         | Nd                                     | nd   | 200,0 $\pm$ 2,60                          | +2,3 $\pm$ 0,1                  | 0,160 $\pm$ 0,010                             |

<sup>a</sup> Formulações de nanocápsulas constituídas por PLA-PEG (PM 66.000Da copolímero com PEG 5.000Da), 12mg polímero/mL; <sup>b</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>c</sup> Amostras monodispersas (<0.3); <sup>d</sup> n=3, Desvio Padrão determinado em três diferentes lotes; nd = não determinado. \* Nanocápsula de fluconazol purificada.

Foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no tamanho das nanocápsulas de PLA-PEG associadas ao fluconazol, ao contrário do que ocorreu com as nanocápsulas convencionais. Além disso, a porcentagem de encapsulação do fármaco nessas NC foi inferior à obtida com as NC de PCL. O valor da porcentagem de encapsulação obtido nesse trabalho foi ligeiramente superior ao obtido por Assis e colaboradores (2008), no valor de 32,2% para NC PLA-PEG, utilizando-se o FCZ marcado, provavelmente devido ao maior teor de polímero utilizado nesse trabalho.

### 3.1.2. POTENCIAL ZETA

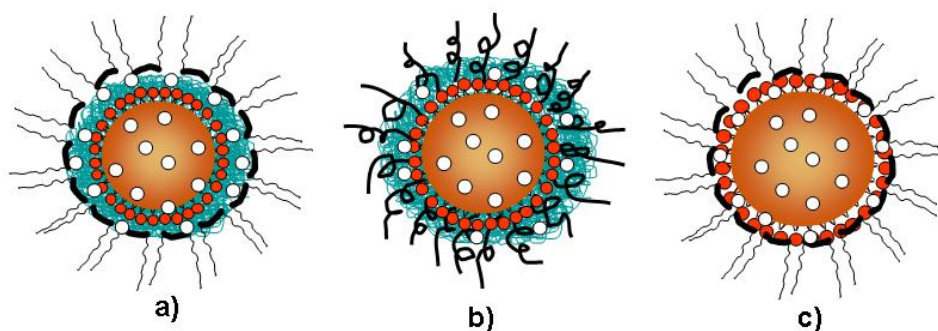
A existência de cargas elétricas na área interfacial da partícula constitui uma importante contribuição para estabilidade física das dispersões coloidais. Valores absolutos de potencial zeta acima de 30mV levam à maior estabilidade das dispersões de nanopartículas, devido à repulsão entre as partículas, evitando a agregação destas (Legrand *et al.*, 1999). O potencial zeta é afetado principalmente pelo poloxamer (um tensoativo não-iônico que reduz, em valor absoluto, o potencial), pelos fosfolípides e pelos polímeros do tipo poliésteres que favorecem uma carga negativa na interface (Legrand *et al.*, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003). A adsorção de fármacos na superfície das nanoestruturas geralmente resulta em alterações dos valores do potencial zeta e também na estabilidade coloidal do sistema.

O potencial zeta das nanopartículas convencionais exibiu uma carga negativa entre  $-63,4 \pm 6,3$  a  $-55,1 \pm 3,5$  mV (tabela 2, 3). O aumento da concentração de fluconazol de um 1mg/mL para 3mg/mL não afetou significativamente o potencial zeta das NC ( $p > 0.05$ ). Entretanto, para o mesmo intervalo a diferença foi significativa no caso das NE ( $p < 0.05$ ). O potencial zeta das NE foi mais influenciado pela associação do fluconazol, provavelmente devido à interação entre o fármaco com a camada de fosfolipídios (Ambrosini *et al.*, 1998), que ficam mais evidentes nas nanoemulsões do que nas NC.

A carga superficial das NC sem o fármaco foi significativamente diferente das associadas ao fluconazol, exceto para aquelas contendo 5mg/mL de fármaco, onde houve uma redução muito grande da associação do fármaco com o sistema (menor teor de encapsulação), provavelmente devido à saturação da interface.

O potencial zeta das nanocápsulas furtivas sem o fármaco foi de  $-39,5 \pm 1,5$  e das associadas à 2mg/mL de fluconazol foi de  $+2,3 \pm 0,1$  exibindo carga positiva. Isso demonstra forte influência do fluconazol na superfície das partículas na ausência de poloxamer (tabela 4). Há vários trabalhos que demonstram que as nanopartículas revestidas pelo PEG apresentam o potencial  $\zeta$  reduzido em valor absoluto, quando comparadas às nanopartículas convencionais (Fresta *et al.*, 2001; Ameller *et al.*, 2004, Faria *et al.*, 2005). Observa-se também a redução do potencial zeta entre NC de PCL e PLA-PEG sem o fármaco de  $-63,1 \pm 1,6$  para  $-39,5 \pm 1,5$ . Nas nanocápsulas vazias de PLA-PEG esse efeito foi observado em relação às NC de PCL, sugerindo que o teor de PEG na formulação (12mg/mL) tenha sido suficiente para reduzir o potencial zeta, mas não para uma redução a valores muito próximos de zero. Por sua vez, a ausência de poloxamer na formulação de NC furtivas pode possibilitar a exposição de cargas positivas resultantes da interação do fármaco com grupos funcionais presentes na superfície do sistema. Isso provavelmente não acontecia de forma tão acentuada nas NC de PCL devido à presença do poloxamer. Este fato confirma a neutralização de cargas negativas na superfície do colóide pela presença do FCZ, adsorvido na região interfacial, já observado de forma menos acentuada no caso das NC de PCL. Nanocápsulas

estabilizadas por cadeias de PEG, embora possuam em geral potencial zeta mais baixo, podem ser efetivamente estabilizadas estericamente por essas cadeias evitando a agregação das partículas coloidais. Um trabalho anterior, utilizando NC de fluconazol marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  mostrou um teor de encapsulação de aproximadamente 30% para NC de PLA e PLA-PEG e um potencial zeta que não foi alterado de -57,9 para -58,1 na presença de FCZ (Assis *et al.*, 2008). A diferença entre os valores encontrados pode ser explicada pelo maior teor de PEG utilizado em nossa formulação comparado ao teor utilizado por Assis e colaboradores (2008). Evidencia-se, portanto que o FCZ e as cadeias de PEG exercem uma forte influência na superfície das NC furtivas (PLA-PEG) indicando que o mecanismo de associação do fármaco com este sistema possa ser a adsorção superficial do fármaco via interação com fosfolípides ou com outros grupos funcionais dos polímeros aí presentes (figura 17).

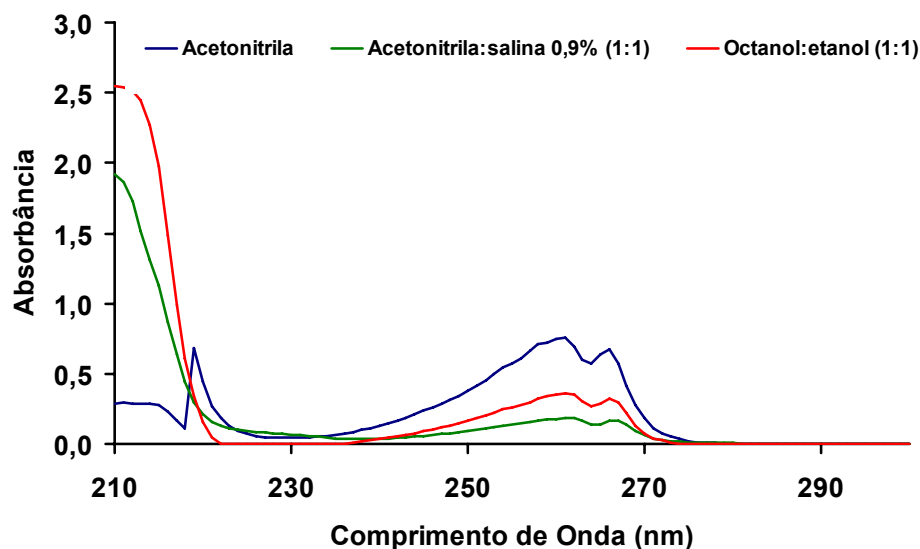


**FIGURA 17:** Formas de associação do FCZ em NC-PCL (A), NC-PLA-PEG (B) e NE (C).

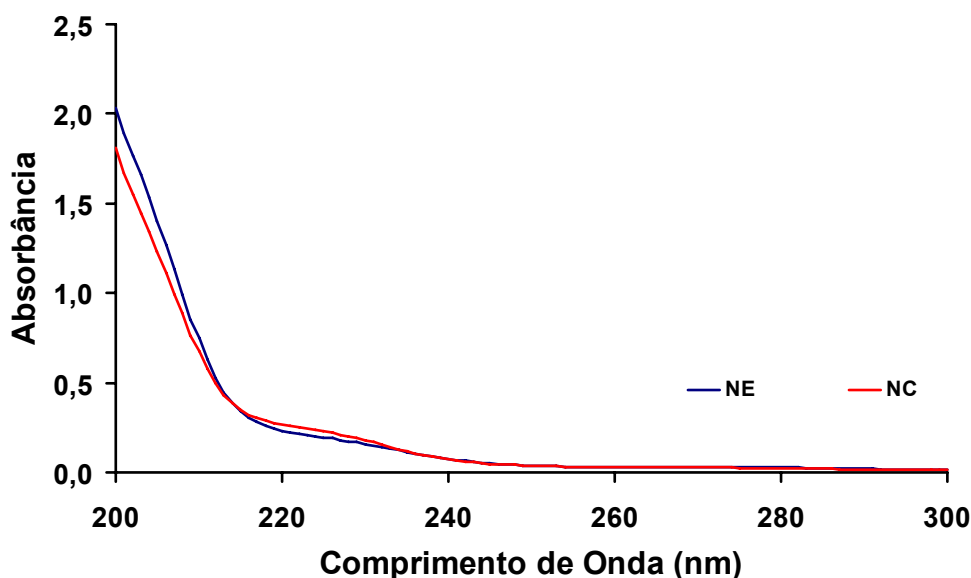
### 3.1.3. DOSEAMENTO DO FLUCONAZOL

A quantificação do fluconazol nas NC e NE foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta. O espectro de UV do fluconazol foi determinado em diferentes solventes utilizados durante os experimentos. Na figura 18 estão representados os espectros do FCZ em acetonitrila, octanol-etanol (1:1) e acetonitrila-salina 0,9% (1:1). Foi observado um pico de absorção máxima em 261nm em todos os solventes utilizados. Nesses comprimentos de onda foram realizados os ensaios de doseamento do

fluconazol para a determinação da porcentagem de encapsulação e os estudos de liberação, utilizando curvas de calibração nos respectivos solventes. A absorção máxima em 220nm não foi utilizada, pois tanto os excipientes das NC quanto das NE sem fármaco absorvem nesse comprimento de onda (figura 19). Desta maneira comprimentos de onda acima de 240nm são mais seletivos no caso da presença de nanocápsulas ou nanoemulsões nas amostras.

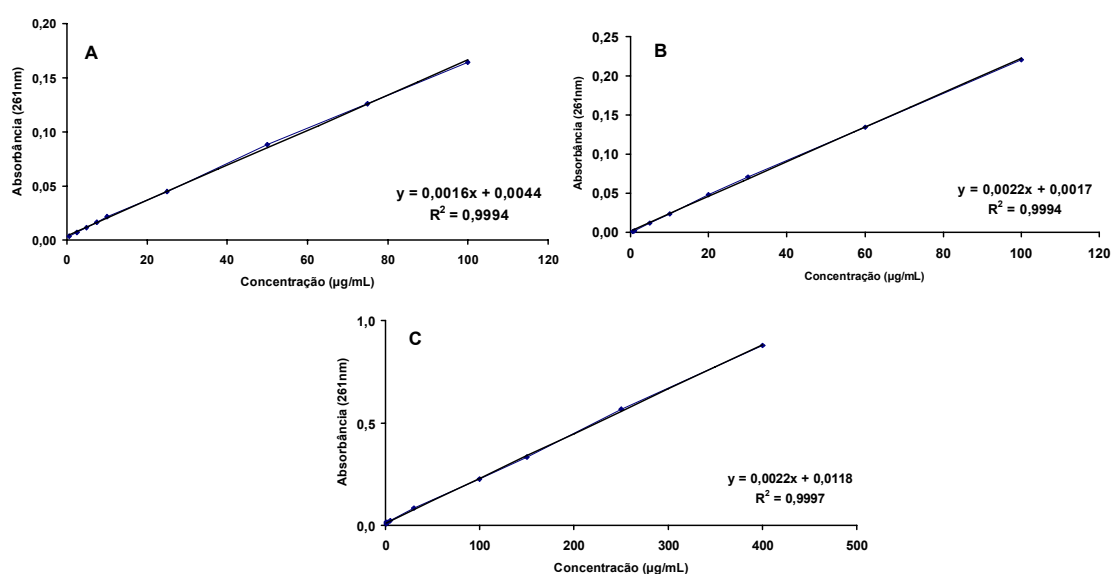


**FIGURA 18:** Espectro de absorção do fluconazol na região do UV apresentando os picos de absorção máxima.



**FIGURA 19:** Espectro de absorção dos excipientes utilizados na preparação das formulações nanoestruturadas na região do UV apresentando o pico de absorção da NE e NC após dissolução completa em acetonitrila (1:100).

Uma curva de calibração do fluconazol em acetonitrila (figura 22 A) foi construída a partir das medidas de absorbância de 0,5µg/mL a 100µg/mL. A correlação entre as concentrações e os valores de absorbância realizadas em 261nm estão apresentados na figura 20 com as respectivas equações das retas, sendo utilizadas nos ensaios de determinação do teor de fluconazol. Foram construídas também curvas de calibração em acetonitrila-salina 0,9% (1:1) e octanol-etanol (1:1) em 261nm (figura 20 B, C) para determinação das concentrações de fluconazol nos estudos de liberação.



**FIGURA 20:** Curva de Calibração do fluconazol em acetonitrila (A), acetonitrila:salina 0,9% (1:1)(B), octanol:etanol (1:1)(C) em comprimento de onda igual a 261nm;  $R^2$  = coeficiente de correlação.

### 3.1.4. DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ENCAPSULAÇÃO

As porcentagens de encapsulação encontradas para NC convencionais de 1mg/mL, 2mg/mL e 5 mg/mL foram  $47,7 \pm 0,3$ ,  $41,3 \pm 0,3$  e  $28,5 \pm 0,4\%$  e  $37,8 \pm 0,3$  e  $22,8 \pm 1,4$  % para NE de 1mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente, considerando três diferentes lotes. A porcentagem de encapsulação para NC furtiva de 2mg/mL foi de  $37,1 \pm 0,9$ . Em geral, observou-se uma baixa eficiência de encapsulação tanto nas NC quanto nas NE, indicando que durante o

processo de preparação das formulações há uma grande perda do fármaco. Esses resultados estão apresentados nas tabelas (2, 3, 4). Para as mesmas concentrações, a quantidade de fármaco incluído nas nanocápsulas convencionais foram maiores que nas nanoemulsões. A maior associação do FCZ às NC pode ser devido a interações com a parede polimérica, ou mesmo a maior capacidade de retenção dentro do núcleo oleoso. As nanocápsulas furtivas, contendo cadeias de polietilenoglicol ligadas covalentemente à sua superfície possuem em geral maior capacidade de retenção de fármacos com alto coeficiente de partição ( $P_{oc/a}$ ) (Mosqueira *et al.*, 2006). No presente trabalho devido à maior solubilidade do FCZ em água, as cadeias hidrofílicas da superfície parecem ter desfavorecido a associação do fármaco com as nanocápsulas, ocasionado menor porcentagem de encapsulação. Também, como ressaltado anteriormente, o FCZ parece competir por sítios de adsorção na superfície dos sistemas, sendo que as cadeias de PEG bloqueariam estericamente estes sítios, evitando a adsorção do fármaco.

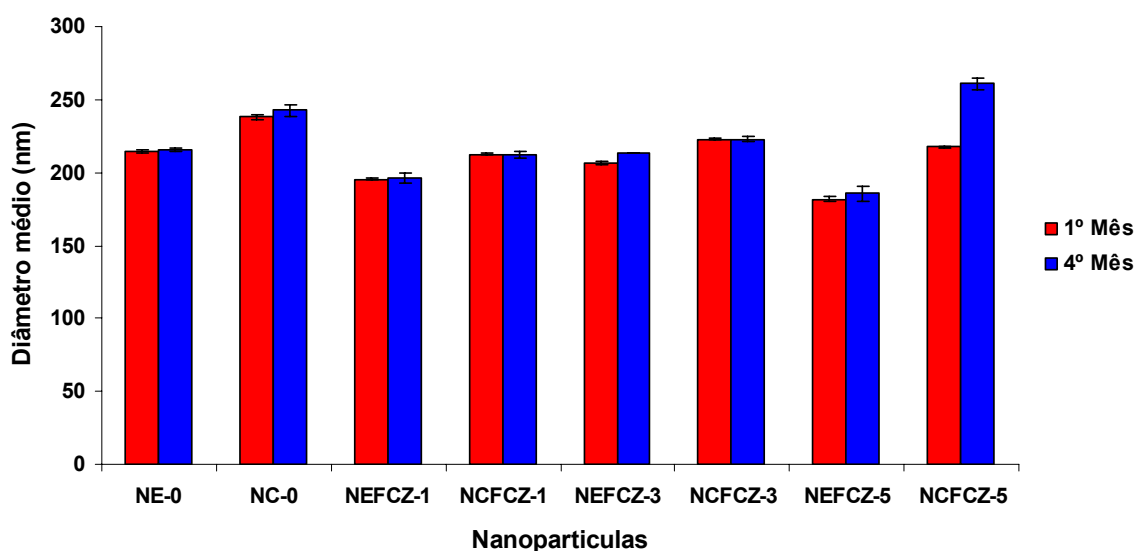
Observou-se, em geral, uma baixa porcentagem de encapsulação para os sistemas vetores testados que pode ser explicada pela baixa solubilidade do FCZ no óleo, ou mesmo pelo seu baixo coeficiente de partição octanol/água ( $\log P = 0.5$ ). Segundo Legrand e colaboradores (1999) a porcentagem de encapsulação é geralmente relacionada à solubilidade do fármaco no núcleo oleoso das NC e NE. Esse fato justifica a baixa taxa de associação do fluconazol às nanoestruturas, pois o FCZ apresenta solubilidade na água em torno de 8 mg/mL a 37°C). Esta pequena lipofilicidade provavelmente não foi suficiente para uma retenção do fármaco no núcleo oleoso dos nanocarreadores. Entretanto, em termos de massa, o carregamento de até 16% p/p de fármaco em relação à massa de polímero foi possível no caso das NC, enquanto que para as nanoemulsões esse valor cai para 5%p/p. Em trabalhos anteriores, relativos à preparação de lipossomas de fluconazol, a quantidade de fármaco incluída nas preparações foi 4 a 8% p/p (Ambrosini *et al.*, 1998).

É interessante observar que mesmo o fármaco estando solúvel no meio dispersante nas doses de FCZ utilizadas para a encapsulação (1-5mg/mL), os teores de encapsulação foram ainda em torno de 30-40%, indicando que

interações de diferentes naturezas, entre os sistemas nanométricos e o fármaco realmente foram a causa da associação.

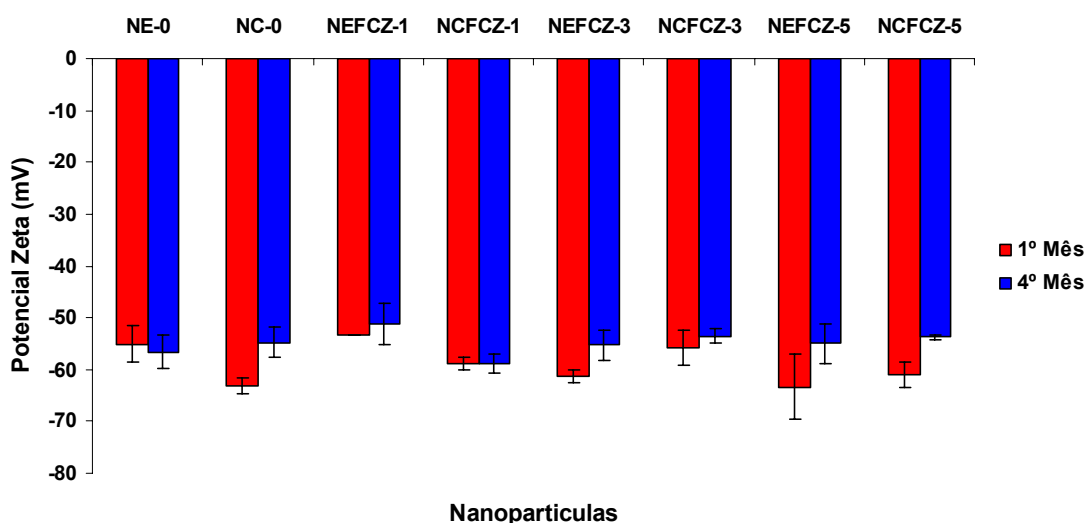
### 3.1.5. ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICA

O tamanho das partículas é uma importante propriedade das dispersões coloidais, uma vez que a tendência à sedimentação é determinada por alterações neste parâmetro (Magenheim *et al.*, 1991). Sendo assim, é de grande importância à avaliação do tamanho em função do tempo de armazenamento. Outros parâmetros como o potencial zeta e o pH também podem ser utilizados para avaliar a estabilidade das nanopartículas.



**FIGURA 21:** Diâmetro médio de NC e NE durante estocagem a 4°C por 4 meses determinado por PCS.





**FIGURA 22:** Potencial zeta de NC e NE durante estocagem a 4°C por 4 meses determinado por ADL.

De acordo com a figura 21, não houve diferença significativa ( $p > 0.05$ ) em relação ao tamanho médio das NC e NE brancas e associadas ao fluconazol, durante o tempo em que ficaram armazenadas a 4°C com exceção da NCFCZ-5 e NEFCZ-3 que tiveram um aumento do tamanho médio. Na NCFCZ-5 o tamanho passou de  $217,4 \pm 0,84$  para  $260,8 \pm 3,61$ , sugerindo uma possível formação de cristais na superfície do sistema ou mesmo na formulação, o que resulta em aumento geral do tamanho da partícula. Do mesmo modo, nenhuma variação significativa nos valores de potencial zeta (figura 22) foi observada durante o armazenamento, com exceção da NC branca ( $-63,1 \pm 1,6$  para  $-54,8 \pm 2,9$ ), NCFCZ - 5 ( $-61,1 \pm 2,5$  para  $-53,7 \pm 0,5$ ) e NEFCZ - 3 ( $-61,3 \pm 1,2$  para  $-55,3 \pm 2,9$ ), onde ocorreu uma redução no potencial zeta.

**TABELA 5:** Características físico-químicas de NC e NE durante estocagem a 4 °C por 4 meses

| Caracterização físico-química               | Nanocápsulas                |                             |                |                |                |                | Nanoemulsões   |                |                |                |                |                |
|---|-----------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   | NC- 0                       |                             | NCFCZ-1        |                | NCFCZ- 5       |                | NE- 0          |                | NEFCZ-1        |                | NEFCZ- 5       |                |
|   | T <sub>0</sub> <sup>c</sup> | T <sub>4</sub> <sup>d</sup> | T <sub>0</sub> | T <sub>4</sub> | T <sub>0</sub> | T <sub>4</sub> | T <sub>0</sub> | T <sub>4</sub> | T <sub>0</sub> | T <sub>4</sub> | T <sub>0</sub> | T <sub>4</sub> |
| pH  | 5,0                         | 4,4                         | 5,2            | 5,2            | 5,0            | 5,0            | 5,0            | 5,0            | 4,8            | 4,8            | 5,0            | 5,0            |
| <b>Antes da centrifugação</b>               |                             |                             |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Creme <sup>a</sup>                          | -                           | -                           | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| Sedimento <sup>b</sup>                      | -                           | -                           | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| <b>Após centrifugação 5900 g /10minutos</b> |                             |                             |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| Creme <sup>a</sup>                          | -                           | +                           | -              | +              | +              | +              | -              | +              | -              | +              | +              | ++             |
| Sedimento <sup>b</sup>                      | -                           | -                           | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |

<sup>ab</sup>(Alta +++; Média ++; Pouca +; Nenhuma –; <sup>c</sup>Dia da preparação; <sup>d</sup> Estocagem a 4 °C por 4 meses

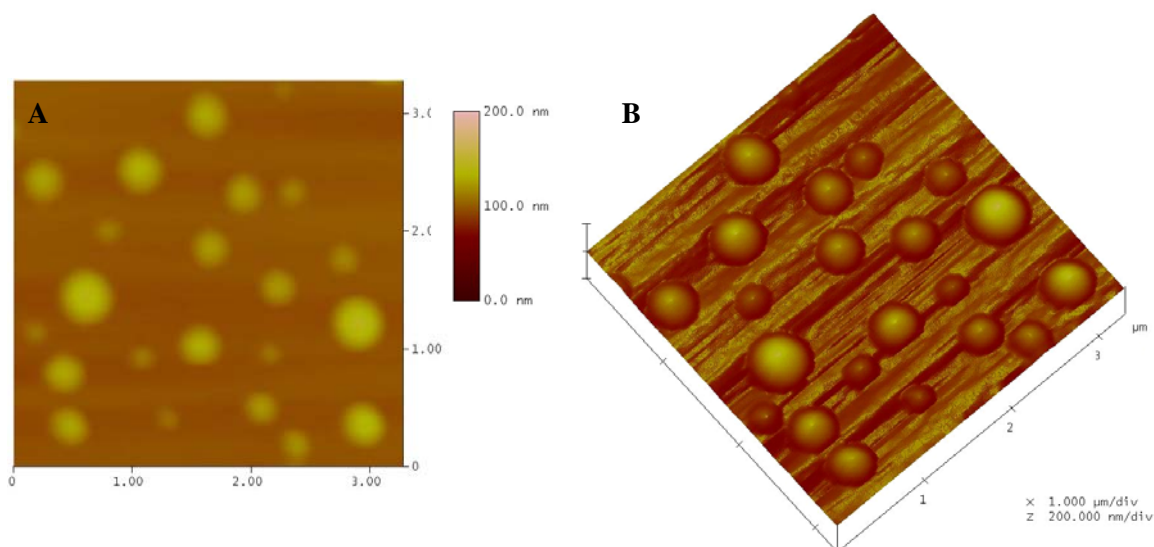
Não foi observada a formação de sedimento em nenhuma das formulações e a redução do pH de 5,0 – 4,4 ocorreu apenas na NC branca, podendo indicar algum tipo de degradação do polímero ou dos fosfolipídios utilizados, liberando ácidos graxos que reduziram o pH da formulação. Houve, no entanto, formação de creme após o armazenamento e centrifugação, com exceção das NC e NE brancas e NCFCZ-1 e NEFCZ-1 (tabela 5). Isso indica que uma porção de fase oleosa livre, ou mesmo gotículas de tamanho maior que 1µm estavam presentes na formulação. A cremagem e a sedimentação de partículas maiores que 1µm eventualmente presentes no sistema foi acelerada pelo uso da centrifugação da suspensão coloidal a 5900 × g por 10 minutos.

Além disso, nenhum cristal macroscópico de fluconazol foi observado durante o período de 4 meses de armazenamento. De acordo com os resultados, as formulações de NC e NE brancas e associadas ao fluconazol foram em geral estáveis durante o período de armazenamento de 4 meses.

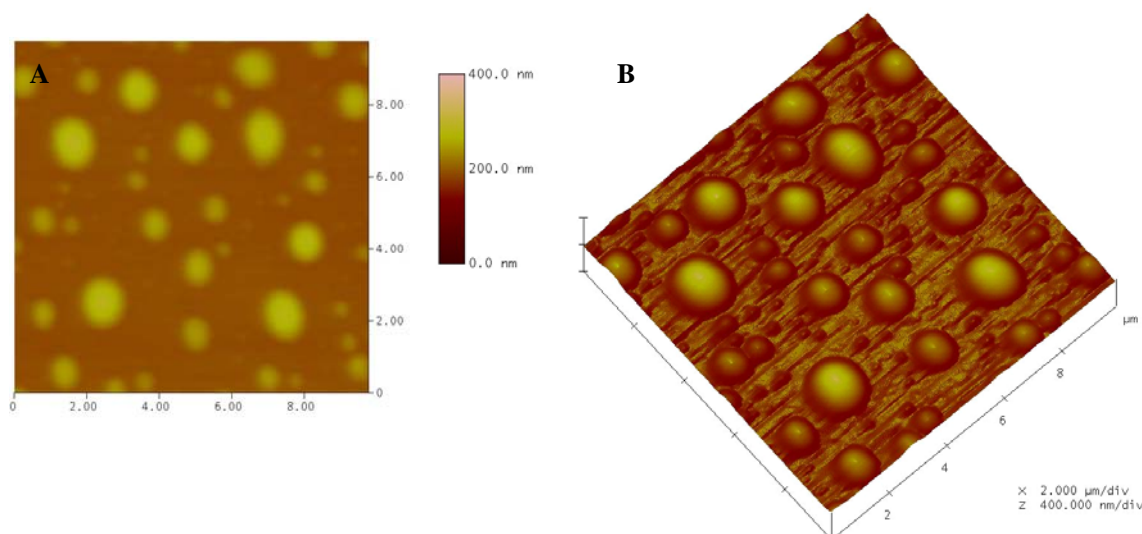
### 3.1.6. ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica das NC e NE foi realizada por microscopia de força atômica (MFA). Foram analisadas formulações de nanocápsulas e nanoemulsões brancas e associadas a 5mg/mL de fluconazol.

As NC e NE brancas apresentaram-se como partículas esféricas de formato regular, observando-se uma homogeneidade das mesmas como pode ser visualizado nas figuras 23 e 24. As imagens de NE foram mais difíceis de serem obtidas por AFM, devido à menor fixação das gotículas sobre à mica e a presença de gotículas maiores de óleo livres.



**FIGURA 23:** Imagens de altura das nanocápsulas brancas obtidas por AFM. (A) imagem de altura e (B) imagem tridimensional das partículas.



**FIGURA 24:** Imagens de altura das nanoemulsões brancas obtidas por AFM. (A) imagem de altura e (B) imagem tridimensional das partículas.

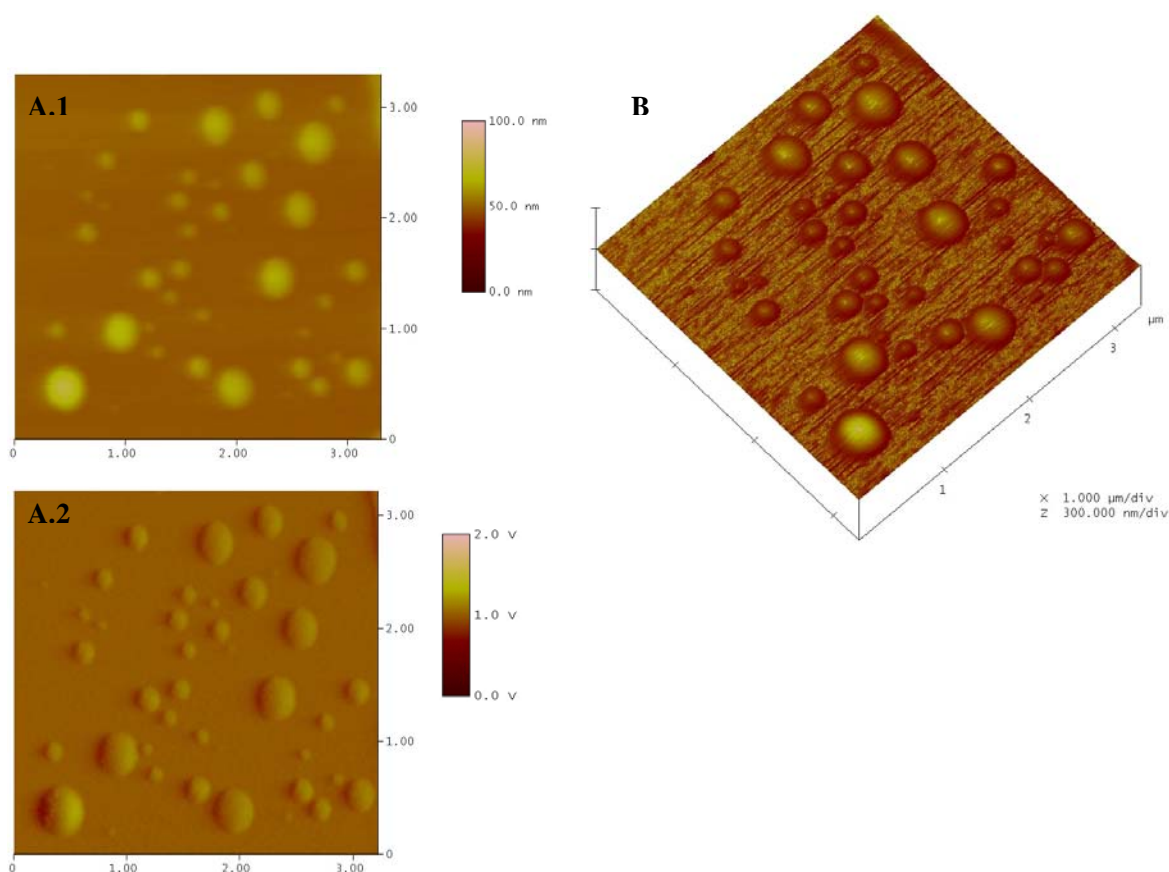
O diâmetro médio das NC e NE brancas obtido por MFA está apresentado na (tabela 6). De acordo com estes resultados, observa-se que na MFA há uma maior variação de tamanho médio das NC e NE em comparação aos valores encontrados por PCS, conforme avaliado pelo desvio padrão das medidas. Assis e colaboradores (2008) também observaram que o diâmetro de NC de PLA<sub>50</sub> quando medido por MFA ( $411 \pm 128$ ) sofre uma maior variação de tamanho quando comparado ao diâmetro medido por PCS ( $282 \pm 24$ ). O mesmo foi observado por Pereira e colaboradores (2007) em NC brancas de PLA-PEG ( $216 \pm 36$  e  $238 \pm 124$  por PCS e AFM, respectivamente). Esta diferença pode ser atribuída a diversos fatores como agregação ou achatamento das NC e NE quando depositadas sobre a superfície da mica, dando origem a populações heterogêneas de partículas e também ao menor número de partículas analisadas pela técnica de AFM (tabela 6). Além disso, o processo de secagem das amostras leva a uma alteração das “condições naturais” das partículas, resultando num possível fenômeno de agregação ou ruptura, principalmente no caso das nanoemulsões (Leite *et al.*, 2005).

**TABELA 6:** Tamanho médio e razão diâmetro/altura das formulações de NC e NE obtidas por PCS e AFM

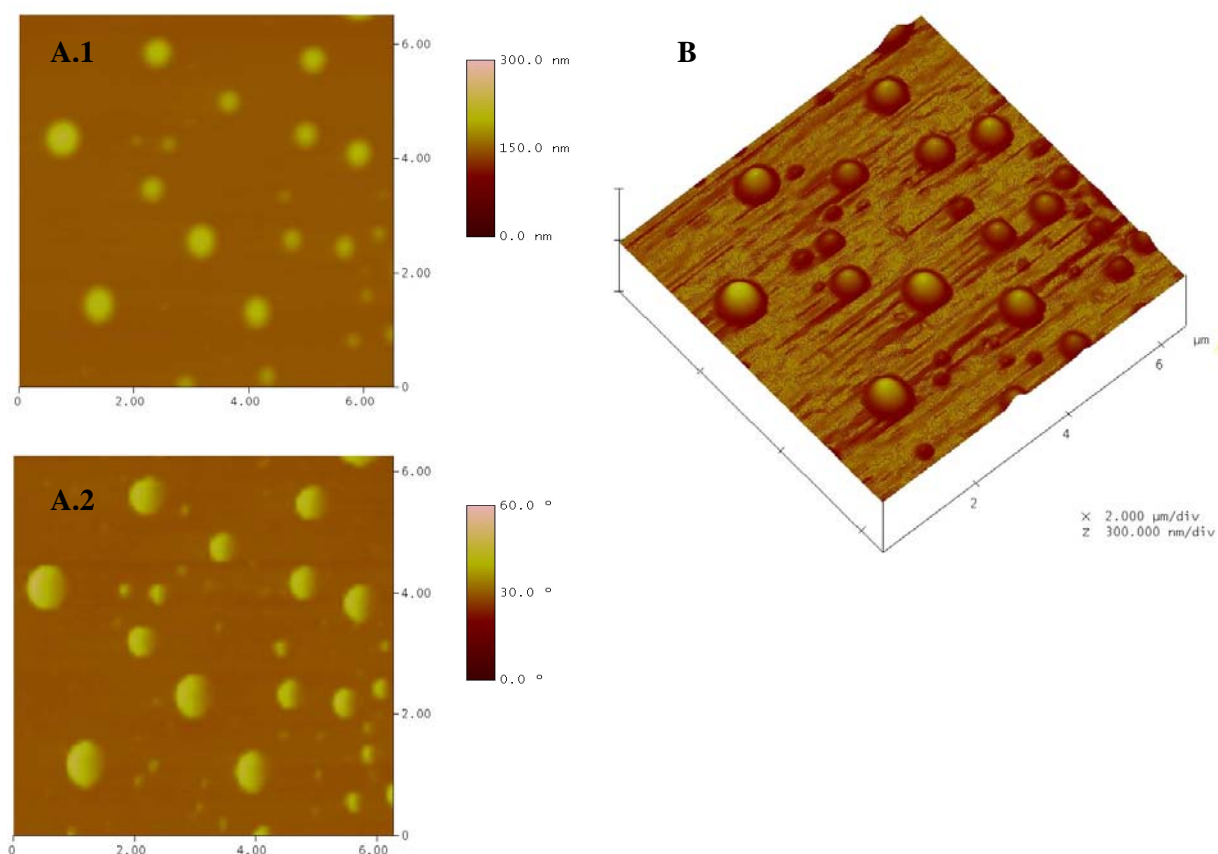
| Formulações | FCZ<br>(mg/mL) | Tamanho Médio das Partículas |                           | Relação diâmetro/<br>altura AFM $\pm$ SD <sup>b</sup> |
|-------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---|
|             |                | $\pm$ DP (nm)                |                           |   |
|             |                | PCS $\pm$ DP <sup>a</sup>    | AFM $\pm$ DP <sup>b</sup> |   |
| NC-0        | 0              | 238,3 $\pm$ 1,70             | 286,11 $\pm$ 83,67        | 10,25 $\pm$ 1,64                                      |
| NCFCZ-5     | 5              | 217,4 $\pm$ 0,84             | 186,00 $\pm$ 50,89        | 18,34 $\pm$ 2,05                                      |
| NE-0        | 0              | 214,3 $\pm$ 0,96             | 250,51 $\pm$ 24,42        | 10,36 $\pm$ 1,15                                      |
| NEFCZ-5     | 5              | 181,8 $\pm$ 1,80             | 199,21 $\pm$ 28,01        | 21,92 $\pm$ 4,35                                      |

<sup>a</sup>Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>b</sup>Desvio Padrão (n=30) medidas.

A associação do fluconazol na concentração de 5 mg/mL aos sistemas coloidais não alterou a estrutura esférica e o formato regular das partículas (figuras 25, 26), entretanto, produziu alterações no padrão de achatamento das partículas (tabela 6).



**FIGURA 25:** Imagens de nanoemulsões de fluconazol 5mg/mL obtidas por AFM. Imagem de altura (A.1), imagem de amplitude (A.2) e imagem tridimensional das partículas (B).

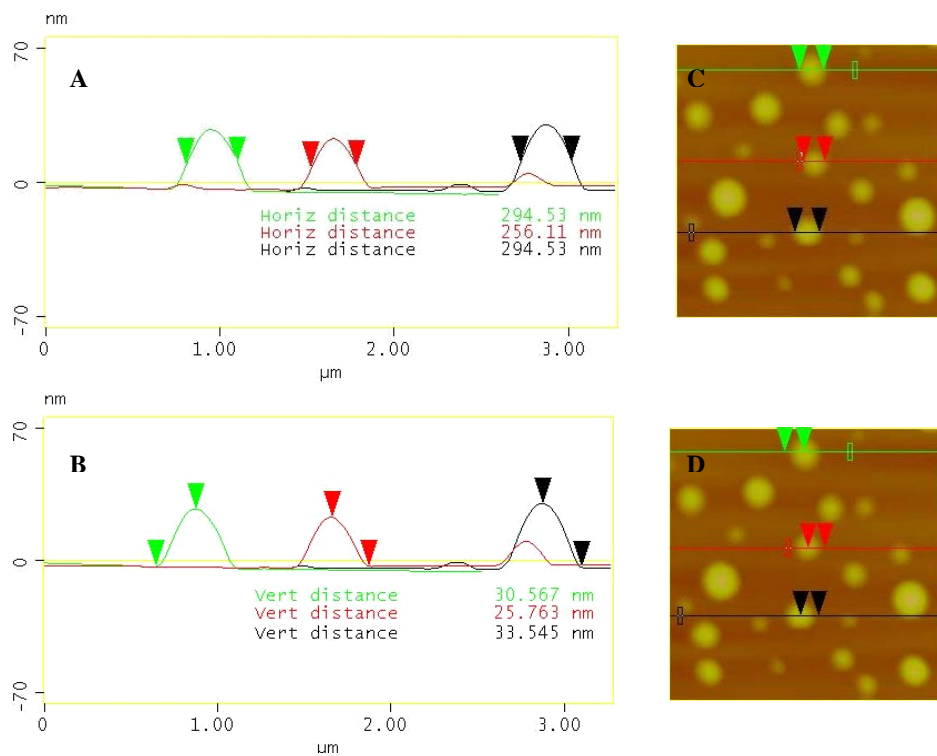


**FIGURA 26:** Imagens de nanocápsulas de fluconazol 5mg/mL obtidas por AFM. Imagem de altura (A.1), imagem de fase (A.2) e imagem tridimensional das partículas (B).

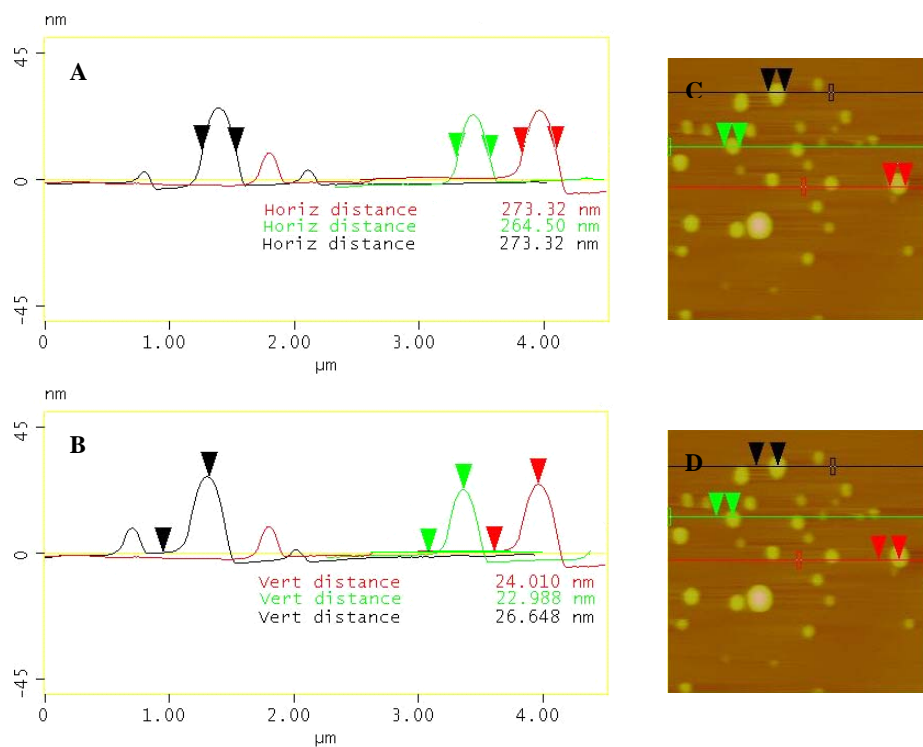
Observou-se também que há uma maior variação de tamanho das NC e NE associadas ao fluconazol quando medidas por MFA em comparação com os valores encontrados por PCS.

Quando se compara o tamanho médio das formulações obtido pela técnica de PCS àqueles obtidos por MFA não se observa diferença significativa em relação aos tamanhos das NC brancas e associadas ao FCZ. O mesmo se observa para NE de 5mg/mL. Entretanto houve diferença entre o tamanho obtido para a NE branca. Também não há diferença entre as nanopartículas brancas e associadas ao FCZ pela técnica de MFA, enquanto que por PCS a associação do fármaco levou à diminuição do tamanho.

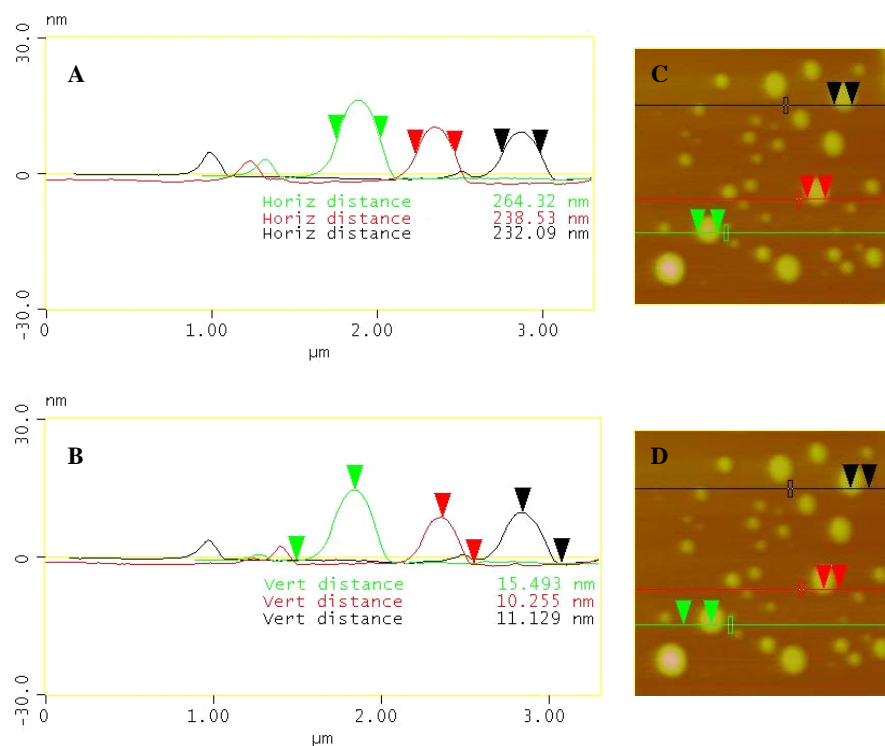
A relação diâmetro/altura dessas partículas apresentada na tabela 6 foi calculada a partir do perfil topográfico (figuras 27-30) obtido em software do aparelho (Section analysis).



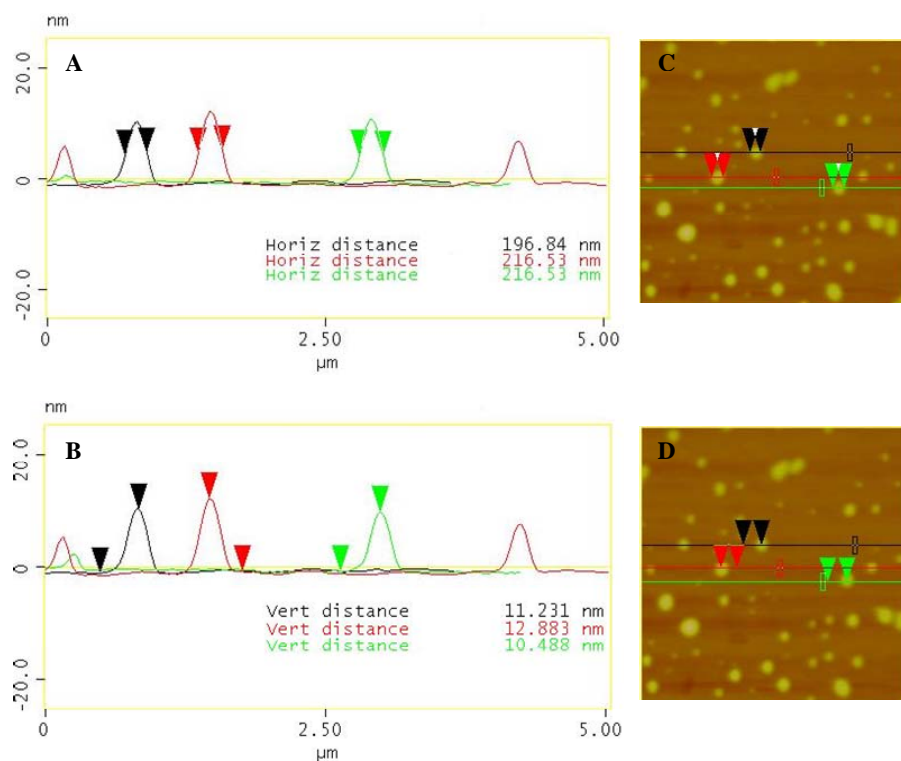
**FIGURA 27:** Perfis topográficos (A e B) e Imagens de nanocápsulas brancas de PCL (C e D), apresentando a relação diâmetro/altura das partículas ( $\sim 10$ ). Área:  $3,2 \mu\text{m} \times 3,2 \mu\text{m}$ .



**FIGURA 28:** Perfis topográficos (A e B) e Imagens de nanoemulsões brancas (C e D), apresentando a relação diâmetro/altura das partículas ( $\sim 11$ ). Área:  $4,5 \mu\text{m} \times 4,5 \mu\text{m}$ .



**FIGURA 29:** Perfis topográficos (A e B) e Imagens de nanocápsulas fluconazol 5mg/mL de PCL (C e D), apresentando a relação diâmetro/altura das partículas (~18). Área: 3,3  $\mu\text{m}$  x 3,3  $\mu\text{m}$ .



**FIGURA 30:** Perfis topográficos (A e B) e Imagens de nanoemulsões de fluconazol 5mg/mL (C e D), apresentando a relação diâmetro/altura das partículas (~22). Área 5,0  $\mu\text{m}$  x 5,0  $\mu\text{m}$



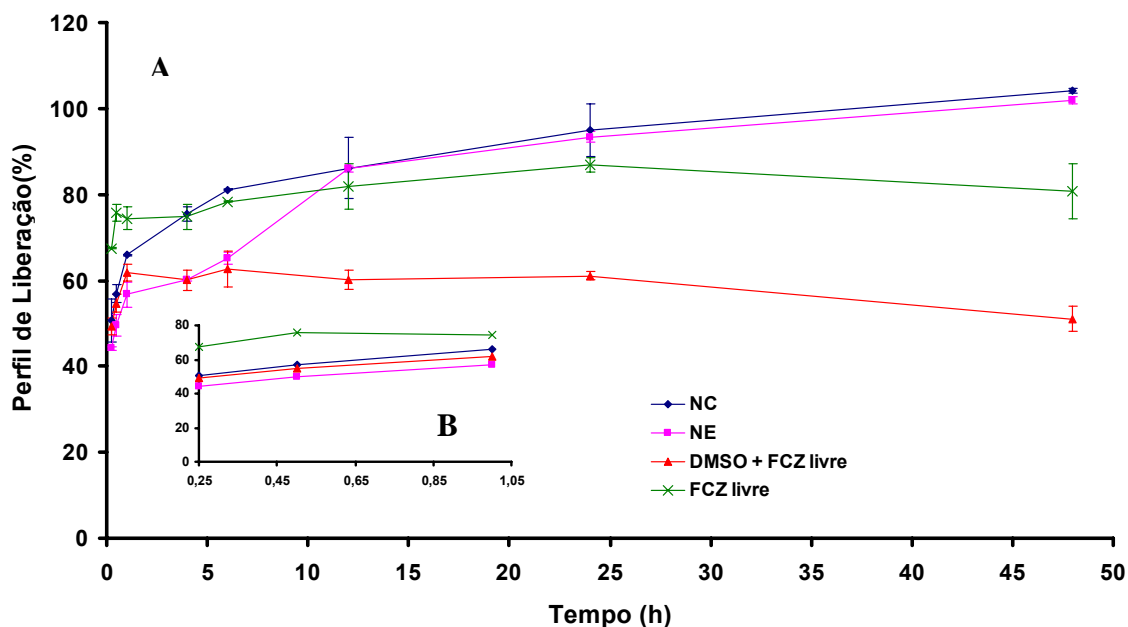
Os valores mostraram uma relação de aproximadamente 10 para ambos os tipos de nanopartículas brancas (tabela 6). Esses dados sugerem a existência de formas mais achatadas ou partículas em forma de disco, provavelmente devido à estrutura interna das NC e NE ser preenchida de óleo e, no caso da NC, ser ainda envolvida por uma membrana polimérica flexível. Este resultado foi evidenciado em estudos anteriores por Assis e colaboradores (2008) que encontram uma relação diâmetro/altura de aproximadamente 11 para NC de PLA<sub>50</sub> e PLA-PEG e Leite e colaboradores (2005) que encontram a relação de aproximadamente 10 para nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona. Similarmente, Montasser e colaboradores (2002) encontraram uma relação de 12 para NC, usando o co-polímero dicloroftaloil-co-dietilenotriamina estabilizado pelo poloxamer 188. Quando o fluconazol foi associado às NC e NE a relação diâmetro/altura aumentou para aproximadamente 18 e 22, respectivamente, demonstrando partículas mais achatadas (tabela 6) o que também foi observado por Assis e colaboradores (2008).

Estes resultados indicam que a introdução do FCZ no sistema aumenta a sua complexidade, aumentando a polidispersão de tamanho. A inclusão do FCZ parece influenciar na fluidez da parede polimérica ou na interface das NC e NE aumentando o achatamento das partículas sobre a mica.

### **3.1.7. ESTUDO DE LIBERAÇÃO DO FLUCONAZOL A PARTIR DAS NANOESTRUTURAS *IN VITRO***

Os estudos de liberação *in vitro* de fármacos determinam a fração do fármaco liberada das nanoestruturas em função do tempo em meios artificiais ou fisiológicos. A caracterização do perfil de liberação do fármaco pode fornecer informações quanto à estrutura do sistema, o mecanismo envolvido no processo de liberação, a interação fármaco-carreador. Diferentes comportamentos cinéticos são esperados para um fármaco dissolvido no núcleo oleoso, retido ou ainda adsorvido na parede polimérica. No presente trabalho, o estudo da cinética de liberação do fluconazol das NC convencionais e NE foram realizados em dois meios diferentes: octanol e NaCl 0,9%. O

espectro de UV do fluconazol foi determinado em octanol-etanol (1:1) e acetonitrila-salina 0,9% (1:1) sendo o pico de absorção de 261nm utilizado para os ensaios de liberação. A figura (31 e 32) mostra o perfil de liberação do fluconazol.



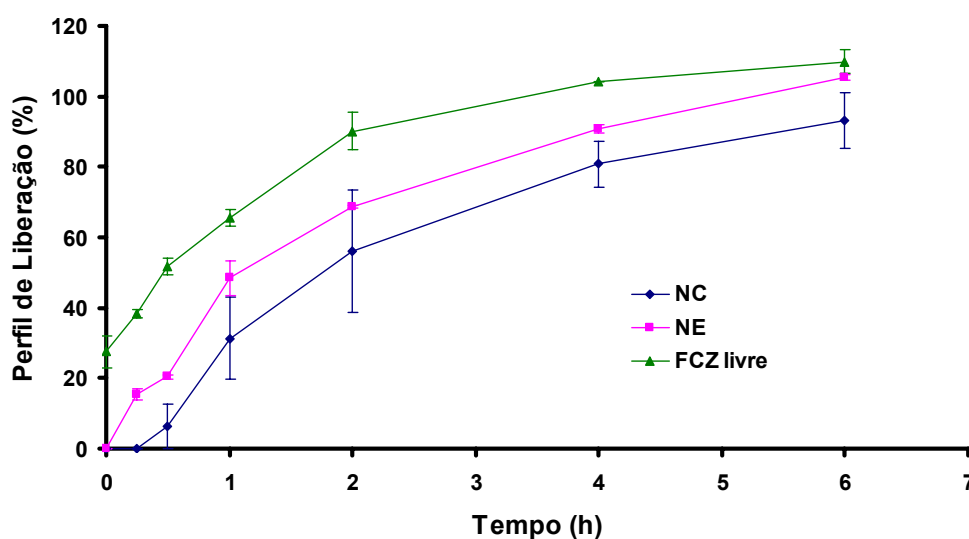
**FIGURA 31:** Cinética de liberação *in vitro* de NC e NE de fluconazol a 37°C, em n-octanol. Em (A) perfil total, em (B) perfil até 60 minutos. Formulações contendo 1mg/mL de FCZ, incubadas em meio na proporção de 1 mL da formulação por 0,4mL de octanol.

O protocolo de estudo de liberação foi realizado segundo descrito por Chorny e colaboradores (2002), utilizando-se o octanol como solvente para obtenção da condição sink externa. De acordo com a figura 33 a cima, o perfil de liberação do fluconazol em octanol a partir da NC e NE foi similar, mostrando uma completa liberação do fármaco em 48h. A taxa de difusão do fluconazol livre (solução de fluconazol) da fase aquosa para a fase orgânica foi mais rápida nos tempos iniciais quando comparado à difusão do fluconazol a partir da NC e NE. Em geral o fármaco livre, não encapsulado (efeito burst observado nos primeiros 15 minutos) migrou imediatamente após a diluição no meio para a fase de n-octanol, indicando a forte afinidade do FCZ pelo solvente. Essa afinidade pelo n-octanol pode ser correlacionada com a afinidade pelas membranas biológicas. Até 6h, as NE reduziram significativamente a migração do fluconazol para o n-octanol. No caso das NC

até 1h essa diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ) com relação ao FCZ livre. Em seguida, para ambas nanoestruturas, manteve-se uma taxa de transferência mais lenta e sustentada do resíduo de 10% de fármaco para a fase orgânica, em comparação com o fármaco livre. Observa-se uma maior afinidade do fármaco pelas NE nos tempos iniciais, o que pode ser devido às interações com os fosfolípidos da monocamada da emulsão, que teoricamente retardariam a migração do FCZ para a fase lipofílica.

O fármaco livre não foi totalmente transferido para a fase orgânica ao final de 48h, estabilizando-se em torno de 85% em octanol, ficando o restante na fase aquosa. Observou-se também que a inclusão na fase aquosa de solvente polar com constante dielétrica mais baixa que a água aumenta a solubilidade do FCZ na fase aquosa e reduz a quantidade de fármaco transferido para a fase lipofílica, como aconteceu com a inclusão do DMSO. No entanto, a migração do FCZ no estado livre para a fase orgânica parece obedecer a uma lei de simples difusão e partição. As concentrações da droga não encapsulada em ambas as fases, octanol e água, estavam intimamente relacionados com o coeficiente de partição nessas diferentes fases. Observa-se que as nanoestruturas possuem um perfil de liberação do FCZ diferente do perfil de solubilização do FCZ puro, seja em água ou em outro solvente, principalmente nos tempos iniciais.

Os resultados indicam que o fármaco livre na fase aquosa (não encapsulado), em todas as formas testadas foi rapidamente transferido para a fase lipofílica, porém o fármaco associado à NC e NE (fármaco encapsulado) foi transferido mais lentamente nos tempos iniciais, o que *in vivo* poderia gerar efeitos diferenciados na fase inicial de distribuição no organismo após administração intravenosa.



**FIGURA 32:** Cinética de liberação *in vitro* de NC e NE de fluconazol a 37°C, em meio aquoso isotônico (NaCl 0,9% p/v) Formulações contendo 1mg/mL de FCZ, incubadas em meio na proporção de 15mL da formulação por 300mL de salina.

O estudo de liberação do FCZ em função do tempo apresentado na figura 34 realizado em salina a 37°C utilizando-se a técnica de diálise direta apresenta um perfil bem diferente daquele mostrado na figura 33. Observa-se uma difusão rápida e completa em 6h do FCZ livre para o meio externo, evidenciando-se a hidrofília do fluconazol. Por outro lado, a taxa de liberação do FCZ a partir das nanoestruturas foi significativamente menor em relação ao fármaco livre. Houve diferença significativa entre NC e NE somente nos tempos iniciais e após 4h. As nanocápsulas reduzem o efeito burst nos tempos iniciais provavelmente devido à presença da parede polimérica. O mesmo foi relatado por Cruz e colaboradores em um estudo no qual avaliaram o perfil cinético da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina associado a três sistemas coloidais (NC, NS e NE), no qual a fase de liberação rápida (burst) foi menor nas NC em comparação com os outros sistemas (Cruz *et al.*, 2006). Entretanto, a semelhança no perfil de liberação obtido para ambos os sistemas no presente estudo evidencia que a parede polimérica das nanocápsulas influencia pouco no processo de liberação, sendo que a partição do FCZ entre gotículas de óleo e o meio aquoso externo ou mesmo a desorção da superfície das partículas seria o passo limitante do processo de liberação, como já foi

relatado para outras drogas (Calvo *et al.*, 1996; Losa *et al.*, 1993, Santos-Magalhães *et al.*, 2000).

Diante dos dois perfis de liberação experimentais apresentados, ambos em condições sink, mas em meios diferentes, pode-se inferir que as NE reduzem a taxa de transferência do FCZ para sítios mais hidrofóbicos no organismo de forma mais eficaz que as NC. De forma oposta as NC reduzem a taxa de liberação do FCZ para o meio aquoso sendo provavelmente mais propícias para a retenção do fármaco no compartimento sanguíneo, por exemplo.

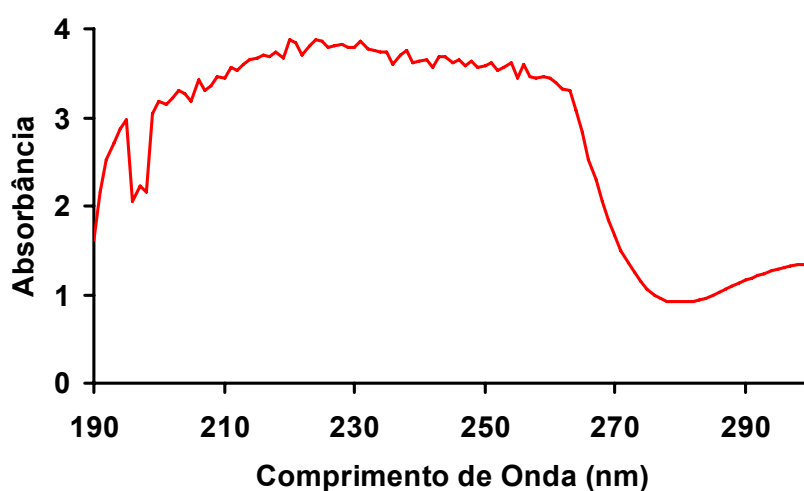
**CAPÍTULO 4**  
**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO**  
**DE NANOESTRUTURAS DE**  
**CETOCONAZOL E MICONAZOL**  
**BASE**

## 4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES CONTENDO CETOCONAZOL E MICONAZOL BASE

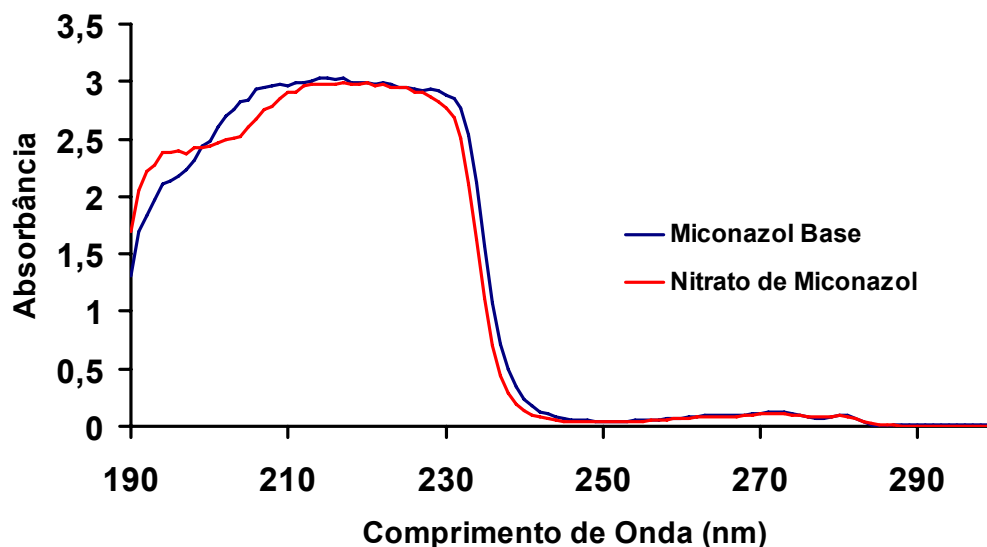
O miconazol base livre foi obtido a partir do nitrato de miconazol através da alcalinização do meio. A pureza do miconazol base foi confirmada pelo ponto de fusão a 79-82°C que está próximo ao encontrado na literatura (Farmacopéia Portuguesa VII edição, 2002). As nanocápsulas convencionais e nanoemulsões contendo miconazol base ou o cetoconazol foram caracterizadas de acordo com a distribuição de tamanho, o índice de polidispersão, o potencial zeta e o teor de encapsulação.

### 4.2.1. DOSEAMENTO DO CETOCONAZOL E DO MICONAZOL BASE

A quantificação do cetoconazol e do miconazol base nas NC e NE foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta. O espectro de UV dos fármacos foi determinado em acetonitrila como apresentado nas figuras 33 e 34.

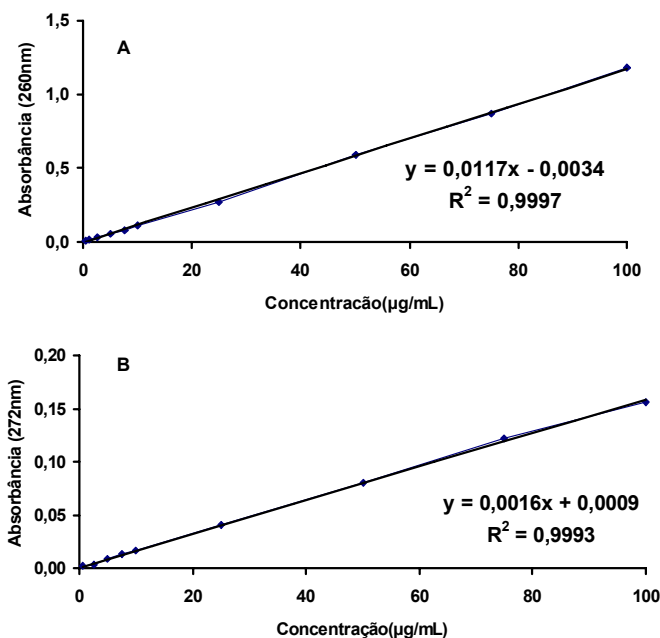


**FIGURA 33:** Espectro de absorção do cetoconazol na região do UV apresentando o pico de absorção em acetonitrila (100µg/mL).



**FIGURA 34:** Espectros de absorção do nitrato de miconazol e do miconazol base na região do UV apresentando os picos de absorção em acetoneitrila (100µg/mL).

Os comprimentos de onda de 260nm e 272nm foram utilizados para construção das curvas de calibração do cetoconazol e do miconazol base respectivamente (figura 35), sendo utilizadas nos ensaios de determinação do teor de encapsulação.



**FIGURA 35:** Curva de Calibração em acetoneitrila do cetoconazol a 260nm (A) e do miconazol base a 272nm (B);  $R^2$  = coeficiente de correlação.



#### 4.2.2. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO, PORCENTAGEM DE ENCAPSULAÇÃO E POTENCIAL ZETA

O primeiro parâmetro analisado foi o diâmetro médio das nanopartículas de miconazol base e cetoconazol o qual ficou compreendido entre 200-315nm estando de acordo com os dados da literatura (Legrand *et al.*, 1999; Couvreur *et al.*, 2002; Mosqueira *et al.*, 2006). Os resultados da caracterização físico-química dos nanossistemas estão apresentados nas tabelas 7 e 8, para o miconazol e cetoconazol, respectivamente.

**TABELA 7:** Caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas e nanoemulsões contendo miconazol

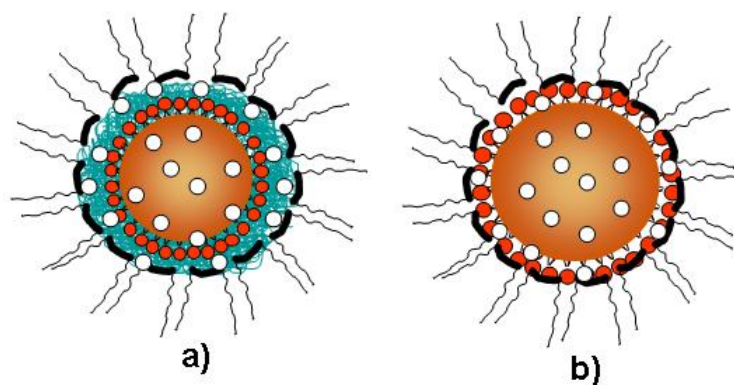
| Formulações <sup>a</sup> | (mg/mL) | Encapsulação (%) ± DP <sup>d</sup> | Eficiência de Encapsulação (%) ± DP <sup>c</sup> | Tamanho Médio das Partículas ± DP <sup>b</sup> (nm) | Potencial ζ ± DP (mV) | Índice de Polidispersão <sup>c</sup> |
|--------------------------|---------|------------------------------------|--|---|-----------------------|--------------------------------------|
| NC                       | 0       | -                                  | -  | 238,3 ± 1,7   | -63,1 ± 1,6           | 0,153 ± 0,021                        |
| NCMCZ-1                  | 1       | 91,3 ± 1,7                         | 67,17 ± 0,6                                      | 267,9 ± 2,8   | -31,7 ± 1,5           | 0,102 ± 0,030                        |
| NCMCZ-3                  | 3       | nd                                 | nd   | 275,0 ± 2,5   | -19,0 ± 0,3           | 0,160 ± 0,020                        |
| NCMCZ-5                  | 5       | 96,2 ± 0,3                         | 63,2 ± 0,2                                       | 311,0 ± 3,1   | -11,7 ± 0,7           | 0,178 ± 0,02                         |
| NE                       | 0       | -                                  | -  | 214,3 ± 0,9   | -55,1 ± 3,5           | 0,141 ± 0,016                        |
| NEMCZ-1                  | 1       | 87,0 ± 1,4                         | 76,35 ± 1,2                                      | 267,9 ± 2,5   | -31,1 ± 0,6           | 0,268 ± 0,056                        |
| NEMCZ-3                  | 3       | nd                                 | nd   | 266,9 ± 2,0   | -15,7 ± 1,0           | 0,064 ± 0,016                        |
| NEMCZ-5                  | 5       | 84,5 ± 0,4                         | 50,75 ± 0,25                                     | 278,0 ± 1,6   | -10,9 ± 1,5           | 0,121 ± 0,006                        |

<sup>a</sup> Nanocápsulas formuladas com PCL = poli-ε-caprolactona; <sup>b</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>c</sup> Amostras monodispersas (<0.3); <sup>d</sup> n=3, determinado em três diferentes lotes; nd = não determinado.

Todas as formulações apresentaram-se como sistemas monodispersos com índice de polidispersão menor que 0,3. Quando o miconazol base foi associado às nanocápsulas e as nanoemulsões houve um aumento significativo no diâmetro médio ( $p < 0,05$ ) à medida que se aumentou a concentração do fármaco, esse aumento variou de 29 a 73nm para as NC e de 52 a 64nm para as NE quando comparado às NC e NE brancas. As NC de miconazol base apresentaram-se em geral maiores que as NE (tabela 7). Em

alguns casos a inclusão do fármaco aumenta o tamanho da partícula, pois interfere na viscosidade ou na constante dielétrica da fase orgânica durante a preparação da partícula resultando em aumento do tamanho do nanosistema produzido. O miconazol base possui solubilidade na fase oleosa ( $P_{ow} = 5,93$ , 25°C) das NC e NE o que, em geral, pode contribuir para a modificação das propriedades da fase oleosa como um todo no momento da nanoprecipitação. A redução da constante dielétrica (polaridade) da fase orgânica implica em aumento do tamanho da partícula utilizando-se o método de nanoprecipitação, como discutido por Mosqueira e colaboradores (Mosqueira *et al.*, 2000).

A inclusão de um fármaco básico em sistemas coloidais contendo cargas negativas na região interfacial pode resultar na associação de parte do fármaco com a superfície, ou por interação eletrostática ou mesmo por adsorção, dependendo das características químicas do sistema e dos grupos funcionais presentes na interface. No caso do miconazol base, realmente a redução do potencial zeta com a inclusão de quantidades crescentes do fármaco descreve bem essa situação (figura 36). Essa redução do valor absoluto do potencial zeta acontece com os dois tipos de sistemas, sugerindo que as interações podem estar acontecendo com os fosfolipídios com atividade tensioativa localizadas na interface água/óleo, uma vez que eles estão presentes nos dois sistemas.



**FIGURA 36:** Formas de associação do MCZ nas nanocápsulas (A) e nas nanoemulsões (B).

**TABELA 8:** Caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas e nanoemulsões contendo cetoconazol

| Formulações <sup>a</sup> | (mg/mL) | Encapsulação (%) ± DP <sup>d</sup> | Eficiência de Encapsulação (%) ± DP <sup>d</sup> | Tamanho Médio das Partículas ± DP <sup>bd</sup> (nm) | Potencial ζ ± DP (mV) | Índice de Polidispersão <sup>c</sup> |
|--------------------------|---------|------------------------------------|--|--|-----------------------|--------------------------------------|
| NC                       | 0       | nd                                 | nd   | 238,3 ± 1,7  | -63,1 ± 1,6           | 0,153 ± 0,021                        |
| NCCTZ-0,5                | 0,5     | nd                                 | nd   | 223,1 ± 0,5  | -47,0 ± 0,8           | 0,093 ± 0,001                        |
| NCCTZ-1                  | 1       | 95,4 ± 0,1                         | 56,4 ± 0,05                                      | 212,4 ± 0,4  | -47,2 ± 1,8           | 0,133 ± 0,001                        |
| NCCTZ-2                  | 2       | 96,9 ± 0,1                         | 50,47 ± 0,02                                     | 210,6 ± 0,5  | -52,2 ± 2,2           | 0,129 ± 0,013                        |
| NE                       | 0       | nd                                 | nd   | 214,3 ± 0,9  | -55,1 ± 3,5           | 0,141 ± 0,016                        |
| NECTZ-0,5                | 0,5     | nd                                 | nd   | 255,8 ± 0,9  | -59,3 ± 0,6           | 0,150 ± 0,016                        |
| NECTZ-1                  | 1       | 94,5 ± 0,5                         | 72,99 ± 0,41                                     | 226,6 ± 3,1  | -58,7 ± 0,8           | 0,092 ± 0,007                        |
| NECTZ-2                  | 2       | 95,1 ± 0,10                        | 51,7 ± 0,04                                      | 210,0 ± 0,2  | -58,8 ± 2,6           | 0,172 ± 0,018                        |

<sup>a</sup> Nanocápsulas formuladas com PCL = poli-ε-caprolactona; <sup>b</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>c</sup> Amostras monodispersas (<0.3); <sup>d</sup> n=3, determinado em três diferentes lotes; nd = não determinado.

Nas tabelas 7 e 8, observa-se igualmente para o MCZ e para o CTZ altas porcentagens de encapsulação nos dois sistemas, sendo a porcentagem de encapsulação nas NC ligeiramente maior que nas NE, principalmente para o MCZ. A alta porcentagem de encapsulação observada para o cetoconazol e para o miconazol base nos sistemas nanoparticulados testados era esperada, devido ao coeficiente de partição que os fármacos possuem o que faz com sejam muito solúveis no óleo. O cetoconazol tem coeficiente partição octanol/água ( $P_{ow}$  = 3,547 à temperatura de 25°C) e o miconazol ( $P_{ow}$  = 5,93 à temperatura de 25°C) e segundo Legrand e colaboradores (1999), a porcentagem de encapsulação é geralmente relacionada à solubilidade do fármaco no núcleo oleoso das NC e NE. Entretanto, observa-se uma queda da eficiência do processo de encapsulação nas NC comparado as NE. Há uma saturação da capacidade do sistema em carrear o fármaco a partir de 1mg/mL para ambos os fármacos, pois a eficiência cai com o aumento da concentração do fármaco no sistema.

Os resultados parecem indicar que uma vez formadas as nanogotas, a parede polimérica é importante para reter o material encapsulado no núcleo oleoso, mas no processo como um todo existe menores perdas no caso das NE. Isso provavelmente se dá devido à precipitação microscópica de parte do polímero utilizado nas NC durante a evaporação que arrasta consigo parte do fármaco, em geral, na parede do balão do evaporador, reduzindo assim no caso das NC a eficiência do processo.

Quando se compara as NC e as NE vazias com as associadas ao cetoconazol há uma diminuição do tamanho com a inclusão do cetoconazol. As NE de cetoconazol apresentaram-se maiores que as NC, com exceção das que continham 2mg/mL de fármaco, as quais foram semelhantes no tamanho (tabela 8).

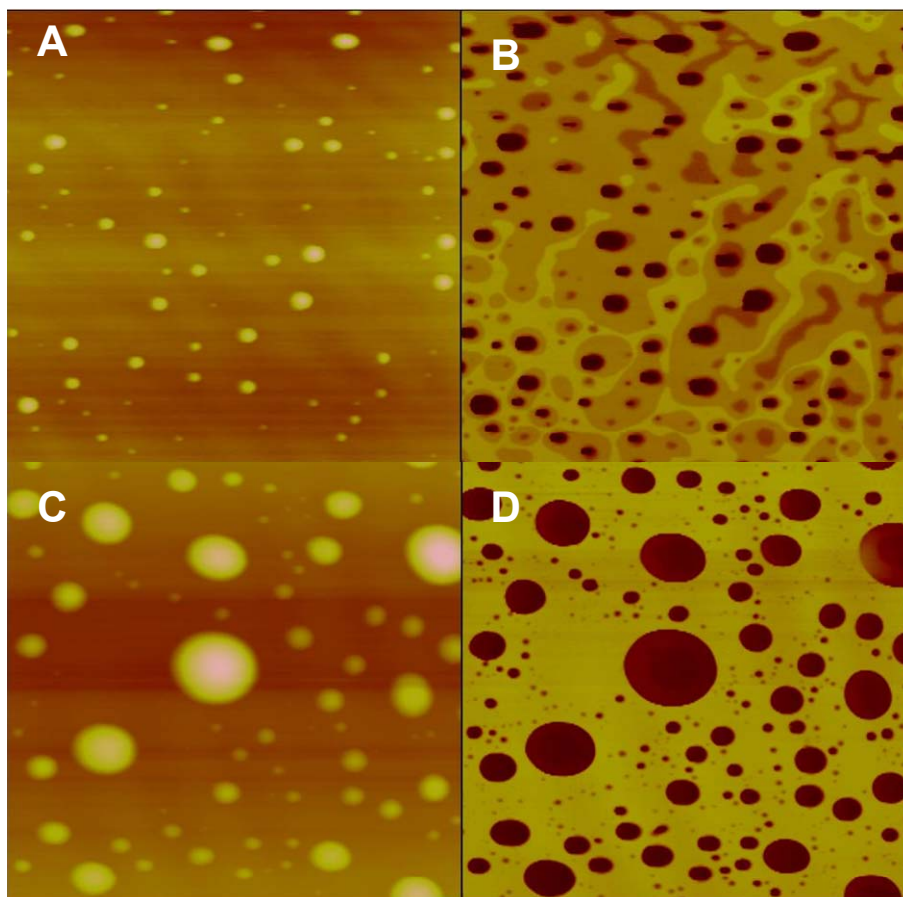
É provável que o CTZ esteja mais associado ao núcleo das NE do que das NC, aumenta o volume do núcleo nas NE. Sendo que através das análises de potencial zeta, o CTZ interfere mais na superfície das NC. De forma contrária ao miconazol, embora o cetoconazol seja também uma base, as modificações de potencial de superfície não são significativas no caso das NE ( $p > 0,05$ ) e significativas no caso das NC ( $p < 0,05$ ). Provavelmente, o cetoconazol interage mais com o polímero presente nas NC e com seus grupos funcionais, preponderantemente negativos. Existe mais CTZ nas NE que nas NC em massa. Isso indica que parte do CTZ pode estar associado à superfície das NC e mais no núcleo das NE com maior volume de carga. Na concentração de 2mg/mL a massa de CTZ nas NC e NE é igual e o tamanho também.

A solubilidade do cetoconazol em água ou mesmo em fases mais apolares depende fortemente do pH. O cetoconazol sofre forte influência do pH, pois é uma base com capacidade aceptora de 8 elétrons. Como as nanoestruturas são produzidas em meio neutro, o cetoconazol tem maior solubilidade no óleo nesse pH ( $\log D=3.51$ , pH 7,0) e provavelmente a maior parte dele se concentra no núcleo oleoso. No caso das NC, com o aumento do número de grupamentos ácidos na estrutura do polímero, o pH diminui, e o cetoconazol ( $\log D=1.19$ , pH 5,0, calculado por Software Solaris™) pode então

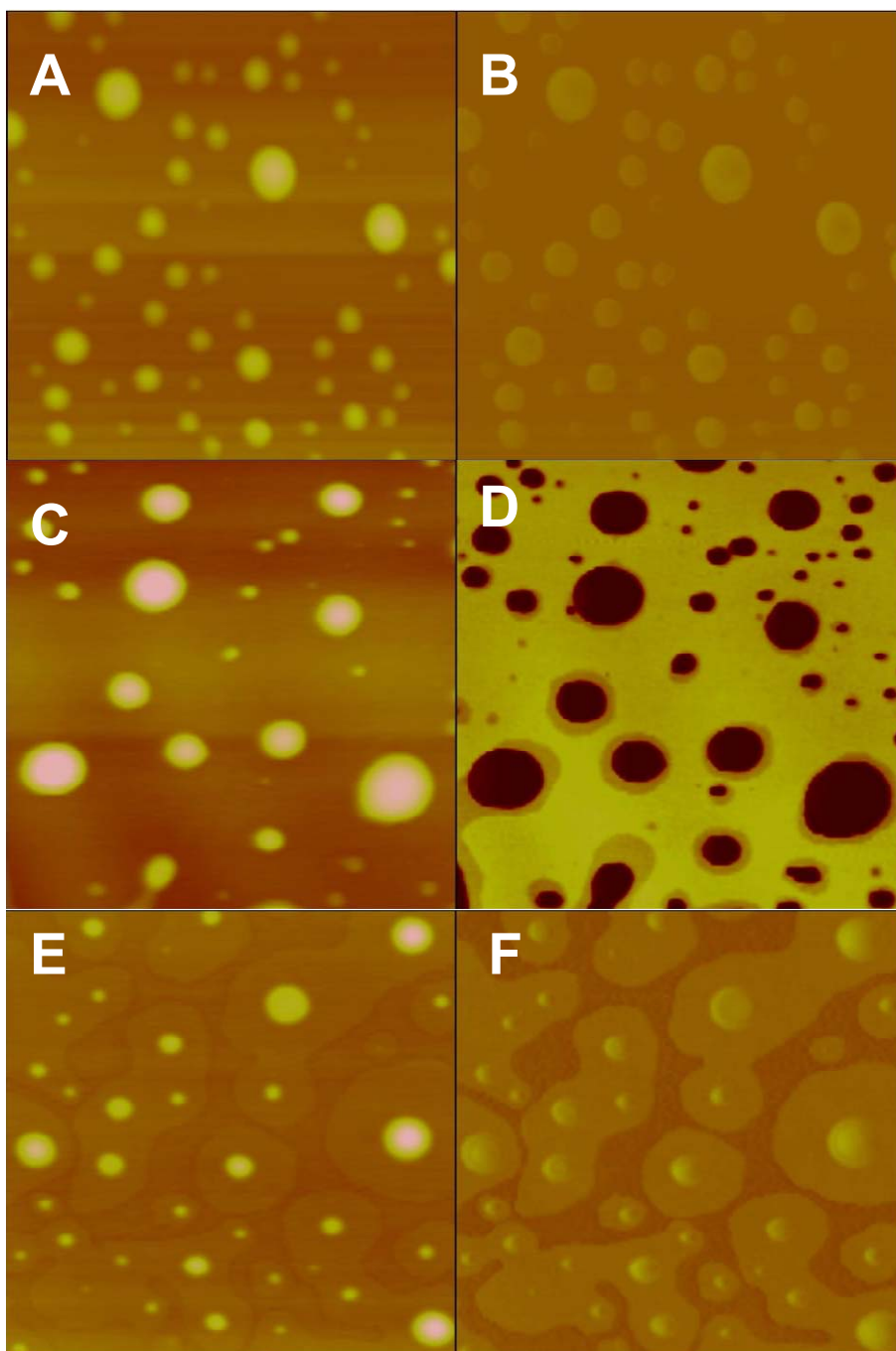
interagir mais com os grupos expostos na superfície do sistema produzindo maiores alterações na carga interfacial do colóide como um todo. Ao contrário do que ocorreu com o miconazol base, quando o cetoconazol foi associado às NC houve uma diminuição do tamanho à medida que a concentração do fármaco aumentou (tabela 8). O cetoconazol parece efetivamente interagir na interface do sistema, pois provavelmente sua presença reduz a tensão interfacial no momento da formação das nanogotas levando a produção de nanoestruturas com menor tamanho. Como previamente discutido por outros autores a redução da tensão interfacial durante a nanoprecipitação reduz o tamanho das partículas produzidas (Quintanar-Guerreiro *et al.*, 1998; Mosqueira *et al.*, 2000).

#### **4.2.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA**

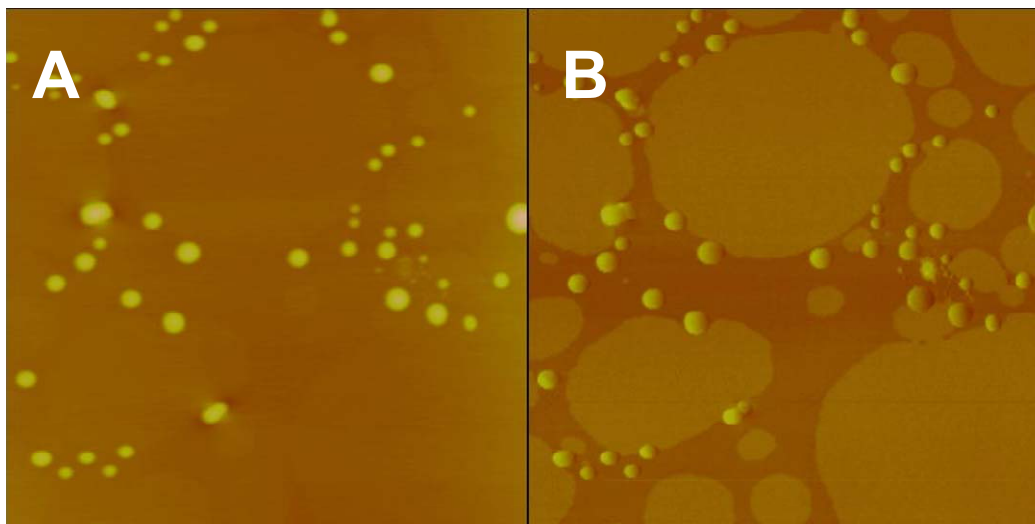
A análise morfológica das NC de cetoconazol e miconazol base e NE de miconazol base foram realizadas por microscopia de força atômica (MFA). As nanopartículas apresentaram-se como estruturas esféricas e formato regular como pode ser visualizado nas figuras seguintes.



**FIGURA 37:** Imagens de nanocápsulas de cetoconazol 1mg/mL (A e B) e 2mg/mL (C e D) obtidas por AFM. Área: 10 $\mu$ m x 10 $\mu$ m. (A e C) imagens de altura e (B e D) imagens de fase.



**FIGURA 38:** Imagens de nanocápsulas brancas (A e B), NC de miconazol base 1mg/mL (Ce D) e 5mg/mL (E e F) obtidas por AFM. (A, C e E) imagens de altura e (B, D e F) imagens de fase. Área: 5 $\mu$ m x 5 $\mu$ m.

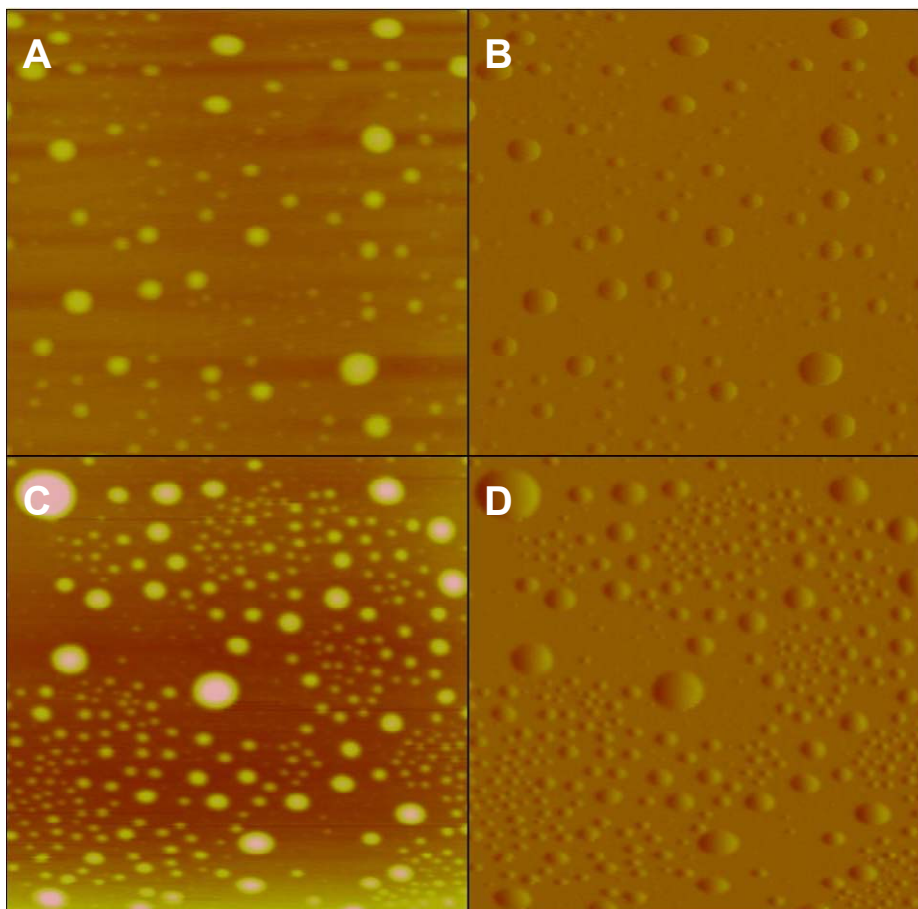


**FIGURA 39:** Imagens de nanocápsulas de miconazol base 5mg/mL (A e B) fixadas pelo glutaraldeído obtidas por AFM. Área: 10 $\mu$ m x 10 $\mu$ m

Como pode ser observado na figura 37, a inclusão do miconazol nas NC resultou na modificação das estruturas não carregadas, surgindo ao redor das partículas uma camada com altura de  $2,44 \pm 0,36$  nm (figura 38 E e F). Quando o glutaraldeído foi utilizado como agente fixador na mica (figura 39), ocorreu uma modificação muito grande na morfologia das nanoestruturas originais contendo MCZ. Essa modificação não foi possível ser explicada.

Com relação às NE de miconazol base, no qual as imagens foram realizadas apenas na presença do glutaraldeído, não observou-se alterações estruturais com o aumento da concentração do fármaco de 1mg/mL para 5mg/mL (figura 40).





**FIGURA 40:** Imagens de nanoemulsões de miconazol base 1mg/mL (A e B) e 5mg/mL (C e D) fixadas com glutaraldeído obtidas por AFM. (A e C) imagens de altura e (B e D) imagens de amplitude. Área: (A e B) 3 $\mu$ m x 3 $\mu$ m e (C e D) 6 $\mu$ m x 6 $\mu$ m.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 9, observa-se que à variação de tamanho das nanopartículas de miconazol base e da NC de cetoconazol de 1mg/mL quando medidas por MFA foi maior que os valores encontrados por PCS, conforme avaliado pelo desvio padrão das medidas, como foi observado para as NC e NE brancas e associadas ao fluconazol anteriormente no capítulo 3. Observa-se que as nanopartículas se fundem sobre a superfície da mica, dando origem a partículas de tamanho maior e com maior variação entre esses tamanhos. Quando o glutaraldeído foi utilizado para fixar a NCMCZ-5 à superfície da mica o tamanho das partículas não foi alterado significativamente ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 9:** Análise do tamanho médio das formulações de NC e NE de miconazol base por PCS e AFM

| Formulações | MCZ<br>(mg/mL) | Tamanho Médio das Partículas |                       | Relação               |
|-------------|----------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|             |                | ± DP (nm)                    |                       | diâmetro/ altura      |
|             |                | PCS ± DP <sup>a</sup>        | AFM ± DP <sup>b</sup> | AFM ± SD <sup>b</sup> |
| NCMCZ-1     | 1              | 267,9 ± 2,8                  | 274,7 ± 43,8          | 12,6 ± 1,9            |
| NCMCZ-3     | 3              | 275,0 ± 2,5                  | nd                    | nd                    |
| NCMCZ-5     | 5              | 311,0 ± 3,1                  | 336,7 ± 33,1          | 8,8 ± 1,0             |
| NCMCZ-5*    | 5              | nd                           | 343,9 ± 49,31         | 9,2 ± 2,5             |
| NEMCZ-1*    | 1              | 267,9 ± 2,5                  | 275,9 ± 28,3          | 9,3 ± 0,9             |
| NEMCZ-3     | 3              | 266,9 ± 2,0                  | nd                    | nd                    |
| NEMCZ-5*    | 5              | 278,0 ± 1,6                  | 277,4 ± 45,0          | 8,6 ± 0,9             |
| NCCTZ-1     | 1              | 212,4 ± 0,4                  | 312,50 ± 40           | 10,66 ± 0,44          |

<sup>a</sup>Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>b</sup>Desvio Padrão (n=30) medidas. \* Formulações fixadas com glutaraldeído 25%, na superfície da mica.

A relação diâmetro/altura das nanopartículas de miconazol base e cetoconazol foram calculadas a partir do perfil topográfico, como mostrado anteriormente no capítulo 3 para o fluconazol. A relação diâmetro/altura da NC de cetoconazol de 1mg/mL foi de aproximadamente 11 e para ambos os tipos de nanopartículas de miconazol base a relação foi de aproximadamente 9, exceto para NCMCZ-1 onde foi aproximadamente 12 (tabela 9). A associação do miconazol base às NC e NE ou do cetoconazol as NC não alterou significativamente ( $p>0,05$ ) a relação diâmetro/altura em comparação com as NC e NE brancas (~10). Isso não foi observado no caso do fluconazol, que quando associado às nanopartículas aumentou a relação diâmetro/altura das NC e NE para aproximadamente 18 e 22 respectivamente. Também não houve diferença no tamanho e na relação diâmetro/altura entre a NCMCZ-5 e a NCMCZ-5\* (fixada a superfície da mica com glutaraldeído 25%).

Em um trabalho realizado por Assis e colaboradores (2008), o uso do glutaraldeído como agente fixador e enriquecedor da parede polimérica de NC de PLA-PEG pode auxiliar na obtenção de imagens menos distorcidas por MFA. No caso das NC de PCL e NE utilizadas no presente estudo, não era

esperado alterações significativas em relação ao diâmetro/altura ou tamanho das partículas, pois o PCL apresenta poucos grupos hidroxilas para interagir com o glutaraldeído e conseqüentemente aumentar a rigidez da parede polimérica e no caso das NE, estas não apresentam o polímero.

**CAPÍTULO 5**  
**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NC**  
**DE FLUCONAZOL, MICONAZOL**  
**BASE E CETOCONAZOL EM**  
**MODELO MURINO DE**  
**CANDIDÍASE SISTÊMICA**

## 5.1. IMUNOSSUPRESSÃO DOS ANIMAIS

### 5.1.2. CICLOFOSFAMIDA

Nos animais imunossuprimidos com ciclofosfamida não houve variação significativa dos parâmetros avaliados ( $p>0,05$ ), como o peso corporal e sobrevivência durante um período de 60 dias após infecção com as diferentes espécies de *Candida*. Houve menos de 20% de mortalidade. Segundo esses resultados considerou-se que as doses de ciclofosfamida (200-250mg/kg) não induziram um efeito imunossupressor adequado para o estabelecimento da infecção sistêmica a partir dos inóculos administrados e com as cepas e espécies utilizadas. Considerando-se esse resultado, optou-se pelo uso da radiação gama e a utilização de uma cepa bastante patogênica de *Candida albicans* (coleção UFMG código 9003) isolada de um portador sintomático, não imunossuprimido, com diagnóstico de candidíase cerebral tratado de forma eficaz com fluconazol.

### 5.1.3. RADIAÇÃO GAMA

Para o desenvolvimento da infecção disseminada por *Candida albicans*, os animais foram imunossuprimidos através da utilização da radiação gama com uma dose de 6 Gray (Spindler *et al.*, 2001; Sechler *et al.*, 1999; Buisman *et al.*, 1999, Assis, 2007), durante aproximadamente 30 minutos. Para avaliar o efeito da radiação sobre a contagem global de leucócitos, esta foi realizada 24h após a exposição e comparada à contagem global de animais não irradiados.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 10, uma diminuição significativa na contagem global de leucócitos do grupo irradiado em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ ) foi observada. Essa alteração na contagem global é provavelmente devido a uma queda no número de linfócitos, que em geral, são as primeiras células brancas do sangue a desaparecer da circulação devido a sua maior sensibilidade a radiação (Trowell, 1952, Buisman *et al.*,

1999). Desse modo, é possível considerar que a imunossupressão foi estabelecida.

**TABELA 10:** Contagem global de leucócitos em camundongos Swiss

| <b>Grupo</b> | <b>Contagem Global de Leucócitos <math>\pm</math> DP*</b> |
|--------------|---|
| Controle     | 3450 $\pm$ 950  |
| Irradiado    | 1382 $\pm$ 790**  |

\*Desvio padrão de n=16 camundongos por grupo; \*\*valores obtidos após 24 horas da irradiação.

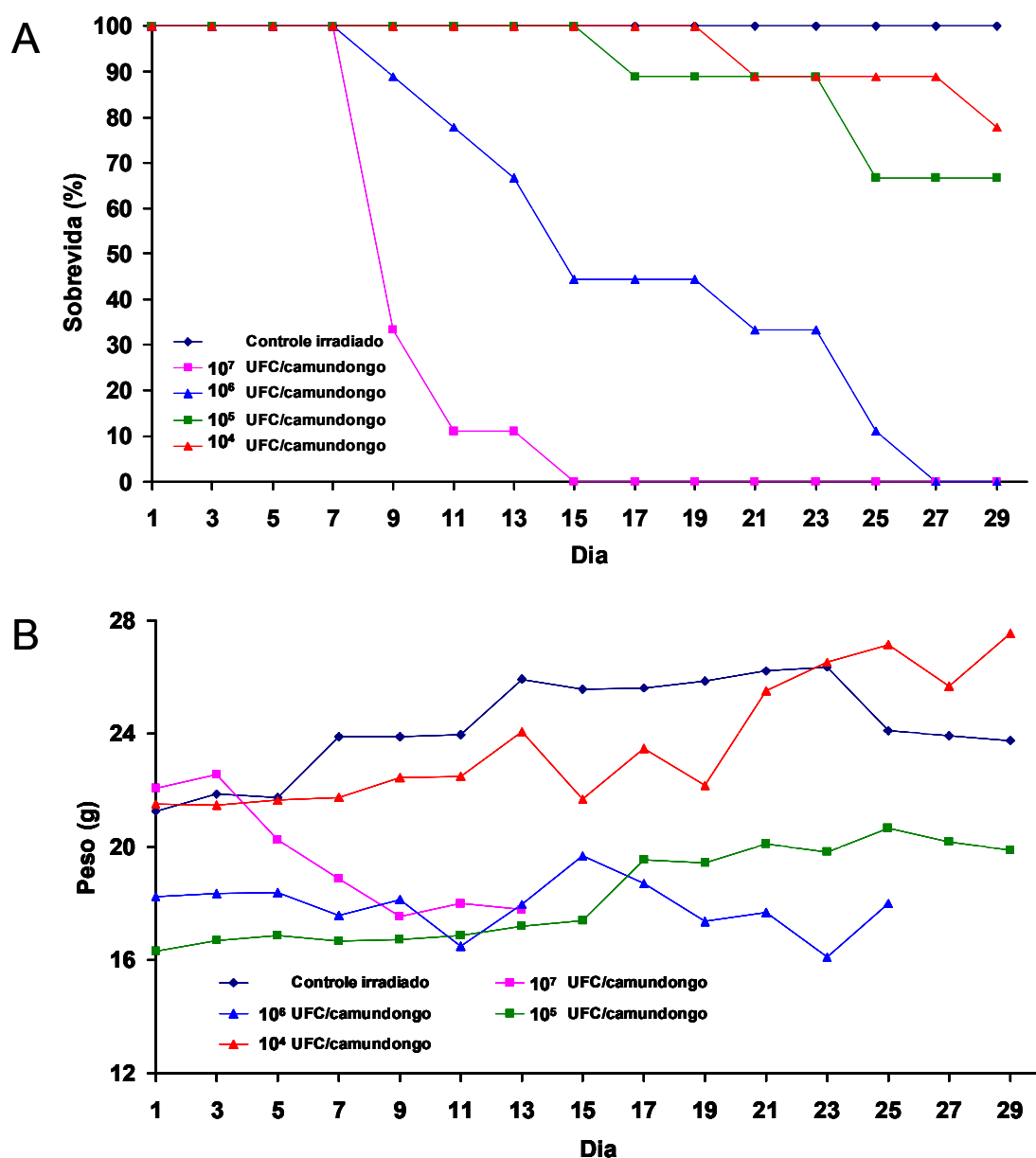
Além da diminuição na contagem global de leucócitos foi também observada a queda dos pêlos na região dorso-caudal em alguns animais e a presença de diarreia, o que é justificado pela sensibilidade dos folículos pilosos e da mucosa gastrointestinal a radiação. Após ter sido comprovado a imunossupressão, no quarto dia após radiação, os animais foram infectados com diferentes inóculos de *Candida albicans*.

## **5.2. INFECÇÃO DOS ANIMAIS E EFICÁCIA DOS TRATAMENTOS**

O desenvolvimento de candidíase invasiva disseminada foi induzida por via i.v. em camundongos imunossuprimidos com radiação gama após administração de diferentes inóculos de *C. albicans*. A eficácia dos derivados azólicos fluconazol, cetoconazol e miconazol vetorizados em nanocápsulas foi avaliada em comparação aos respectivos fármacos na forma livre. Nos vários experimentos realizados optou-se por utilizar as nanocápsulas, pois para as mesmas concentrações de fármacos utilizadas, a quantidade de fármaco incluído nas nanocápsulas foi maior que nas nanoemulsões, além de uma maior porcentagem de encapsulação. Os animais foram avaliados com relação à sobrevivência, a presença da levedura no sangue, o peso corporal e quanto às modificações histológicas ocasionadas pela infecção e pelo tratamento.

### 5.2.1. EFEITO DOS DIFERENTES INÓCULOS

Como a infecção produzida pelo isolado clínico utilizado de *C. albicans* não era adequadamente conhecida em camundongos e nem descrita na literatura, procedeu-se um estudo da influência do tamanho do inóculo sobre a infecção em modelo murino. O tamanho dos inóculos variou de  $10^4$  a  $10^7$  UFC por camundongo, administrados no quarto dia após irradiação e o tratamento iniciou-se 1, 6 ou 24h após infecção, com duração de cinco dias. Como descrito na literatura, o efeito do tamanho do inóculo na infecção por *Candida* spp. pode afetar bastante a possibilidade de cura e os danos causados aos tecidos (Shadkchan & Segal, 2001, Cacciapuoti *et al.*, 1992). A figura 41 abaixo mostra o efeito dos diferentes inóculos na sobrevida e no peso dos animais não tratados.



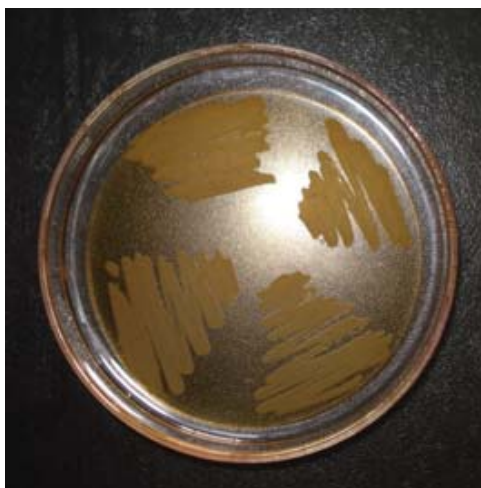
**FIGURA 41:** Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos infectados via intravenosa com diferentes inóculos de *Candida albicans*.

Como apresentado na figura 41A, os animais que receberam o inóculo de 10<sup>7</sup> UFC tiveram um tempo médio de sobrevida (TMS) de 10 dias, indicando que a infecção produzida por esse inóculo é mais severa e significativamente diferente do produzido pela administração de 10<sup>6</sup> UFC ( $p < 0,05$ ). Também foi observada uma progressiva diminuição no peso corporal desses animais logo após infecção com 10<sup>7</sup> UFC, que pode ser atribuído ao grave estresse sofrido



pelos animais devido ao estabelecimento da infecção fúngica sistêmica o que levou a anorexia e conseqüente perda de peso (figura 41B). O tempo médio de sobrevivida foi inversamente relacionado ao tamanho do inóculo, sendo que os animais que receberam os inóculos de  $10^5$  e  $10^4$  UFC tiveram TMS maior que 40 dias. O inóculo de  $10^7$  produziu uma infecção grave e a morte rápida dos animais, sendo que este modelo foi utilizado posteriormente para análise do tratamento com diferentes formulações de fluconazol e miconazol.

Todos os animais do estudo estavam realmente infectados, o que foi comprovado pela presença da *Candida albicans* no sangue dos animais 24h após a inoculação, evidenciada pelo crescimento da *C. albicans* em todas as placas (figura 42).



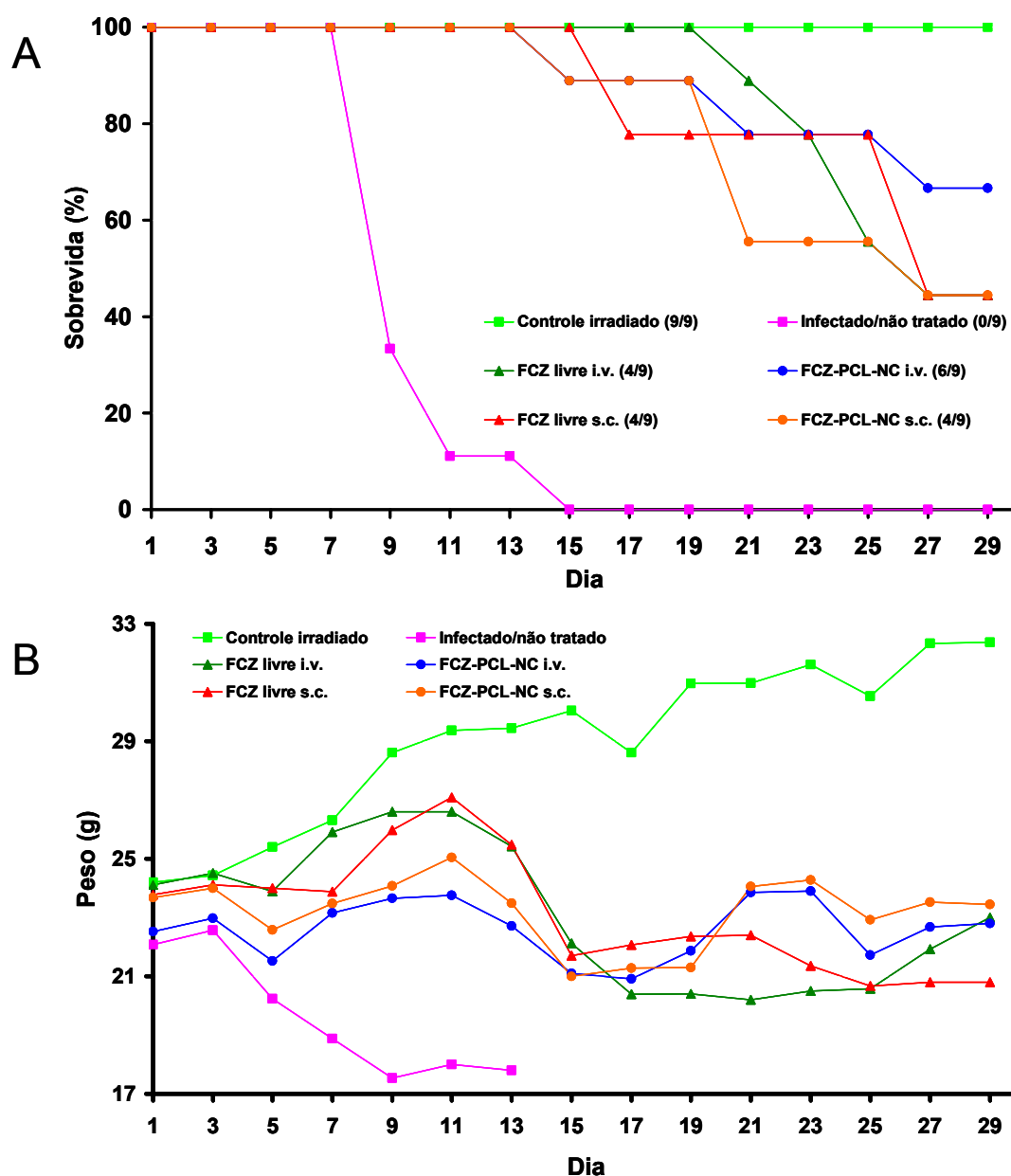
**FIGURA 42:** Exemplar de placa de agar sabouraud dextrosado mostrando o padrão de crescimento de *C. albicans*.

## 5.2.2. TRATAMENTO

### **PROTOCOLO I – Comparação da eficácia de nanocápsulas convencionais de PCL de fluconazol administradas via intravenosa e subcutânea**

A princípio, foi testado o inóculo de  $10^7$  UFC por camundongo e comparou-se a eficácia do FCZ associado às NC convencionais (1mg/mL), administradas por via intravenosa e subcutânea com o FCZ livre (não encapsulado). O tratamento foi iniciado 1h após infecção e o FCZ foi administrado na dose de 15mg/kg/dia. A análise estatística dos dados

apresentados no gráfico de sobrevivência (figura 43A) indicou que não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos tratados, o mesmo ocorreu com relação ao TMS. Entretanto, houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo não tratado, considerando ambas as vias de administração ( $p< 0,05$ ). O TMS dos animais não tratados foi de 10 dias enquanto que para os animais tratados o TMS foi maior que 30 dias.



**FIGURA 43:** Sobrevivência (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PCL-NC i.v./s.c. ou FCZ livre i.v./s.c. 1h depois da infecção com *Candida albicans* ( $10^7$  UFC) durante 5 dias com 15mg/kg/dia.

Em relação ao peso dos animais (figura 43B) também não foi possível verificar diferenças significativas entre as diferentes formulações utilizadas, entretanto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo não tratado indicando a importância do tratamento em relação à gravidade da infecção do ponto de vista de debilidade geral do animal. O peso dos animais pertencentes ao grupo controle irradiado aumentou progressivamente durante o período em que ocorreu o experimento e o TMS destes animais foi superior a 60 dias.

A confirmação da infecção, mesmo após o tratamento foi realizada pelo cultivo de amostras do sangue retiradas os animais sacrificados para necropsia. Esses resultados estão apresentados na tabela 11. Os dados sugerem que a administração intravenosa foi mais eficaz na redução da contaminação do sangue comparada à via subcutânea. Pela via intravenosa as formulações foram igualmente ativas. Já na via SC a forma livre do fármaco parece estar mais biodisponível para atingir o sangue sugerindo que seja mais eficaz que as NC, as quais provavelmente reduzem a cedência do fármaco a partir do tecido para o sangue.

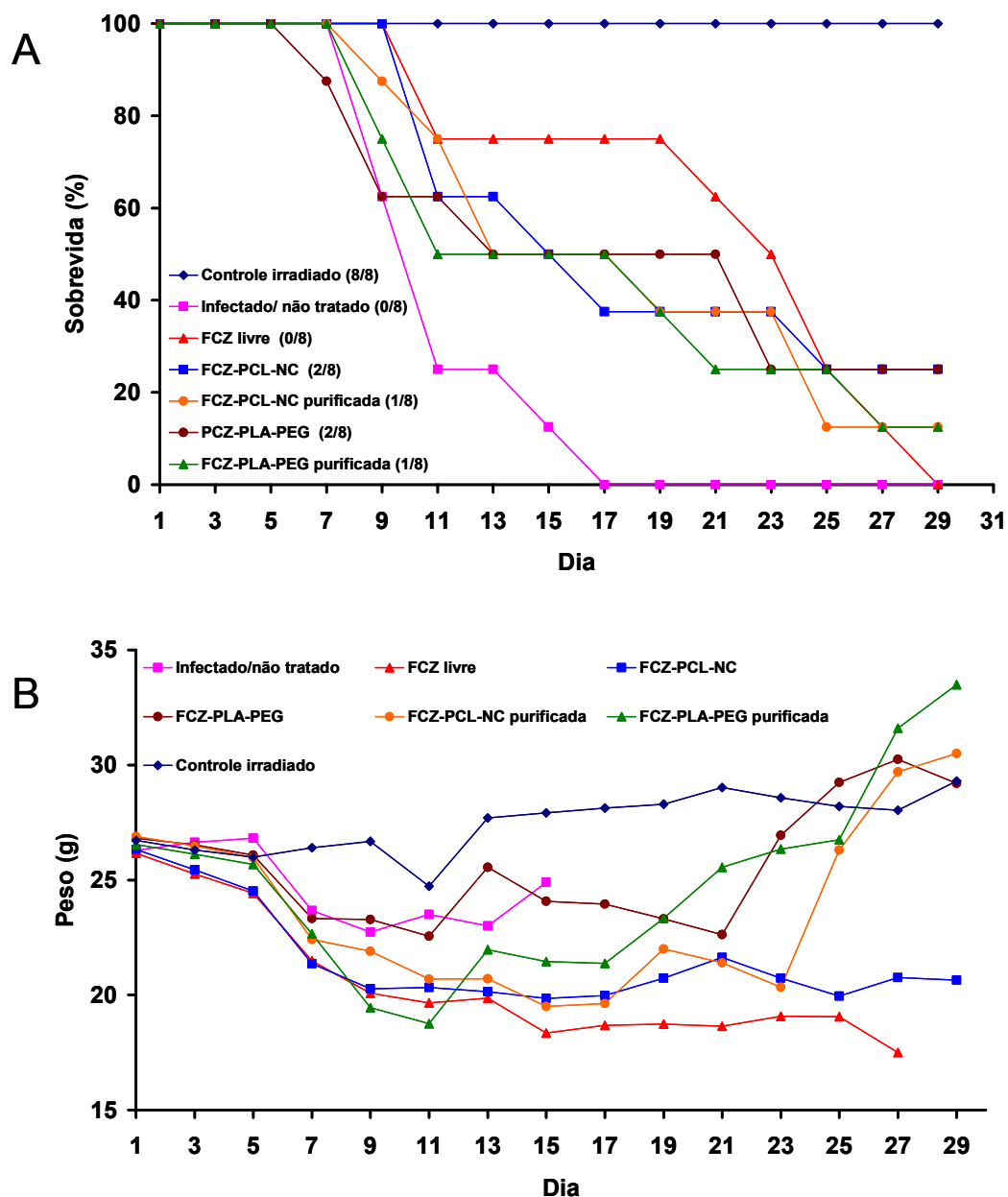
**TABELA 11:** Presença de *C. albicans* no sangue dos animais 48h após o final do tratamento

| <b>Formulação</b>           | <b>Animal 1</b> | <b>Animal 2</b> |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| Controle irradiado          | -               | -               |
| Infectado não tratado       | +               | +               |
| FCZ livre i.v. 15mg/kg/dia  | -               | -               |
| FCZ livre s.c. 15mg/kg/dia  | +               | -               |
| FCZ-PCL-NC i.v. 15mg/kg/dia | -               | -               |
| FCZ-PCL-NC s.c. 15mg/kg/dia | +               | +               |

Cultura positiva (+): Crescimento da *Candida albicans*; cultura negativa (-): ausência de crescimento

## **PROTOCOLO II – Comparação da eficácia de nanocápsulas convencionais e furtivas de fluconazol administradas via intravenosa**

A eficácia do FCZ associado às NC convencionais e furtivas (2mg/mL) administradas via intravenosa na dose de 15mg/kg/dia foi avaliada nesse protocolo utilizando ainda o inóculo de  $10^7$  UFC, entretanto administrando-se o tratamento 24h após infecção. O gráfico de sobrevivência na figura 44A mostra os resultados desse experimento.



**FIGURA 44:** Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PCL-NC, FCZ-PLA-PEG ou FCZ livre 24h depois da infecção com *Candida albicans* ( $10^7$ UFC) durante 5 dias com 15mg/kg/dia via i.v.

Os resultados indicam que devido à severidade da infecção e o início tardio do tratamento ocorreu uma maior letalidade dos animais infectados. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo não tratado em relação ao tempo de sobrevivência e o TMS. Este fato sugere que no presente protocolo é difícil a evidência de diferenças entre as formulações utilizadas, bem como entre os grupos tratados e não tratados. Portanto, é importante iniciar o tratamento em tempos menores 1 ou 6h após infecção, por exemplo.

Um decréscimo do peso corporal foi observado em todos os grupos infectados após inoculação da *Candida albicans* (quinto dia), entretanto após o tratamento com FCZ-PLA-PEG e FCZ-PLA-PEG purificada e FCZ-PCL-NC purificada os animais voltaram a recuperar o peso (figura 44B). Os animais tratados com o fármaco livre e com FCZ-PCL-NC não recuperaram o peso.

Os resultados obtidos com o inóculo de  $10^7$  UFC, iniciando o tratamento com 1 h ou 24h após infecção não mostraram diferenças significativas entre as formulações utilizadas em relação às curvas de sobrevivência.

### **Análise Histológica dos órgãos após tratamento com fluconazol segundo protocolos I e II**

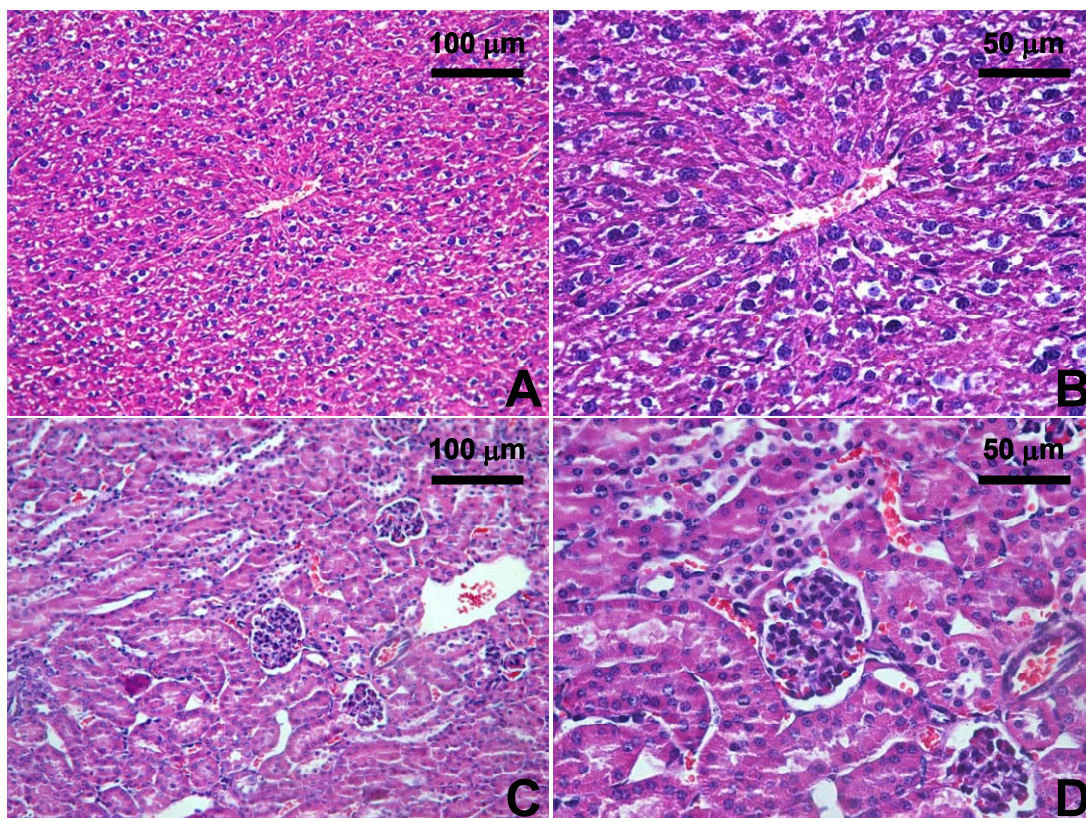
Nos grupos de animais não tratados foi observado congestão, edema e hemorragia em vários órgãos através da análise macroscópica. Entretanto, o aspecto macroscópico do rim chamou atenção pela presença de pontos esbranquiçados homogeneamente distribuídos sobre a superfície renal em 80% dos animais pertencentes ao grupo infectado não tratado (figura 45).



**FIGURA 45:** Rim normal (A) de animal do grupo controle irradiado e rim de animal infectado com *Candida albicans* não tratado (B).

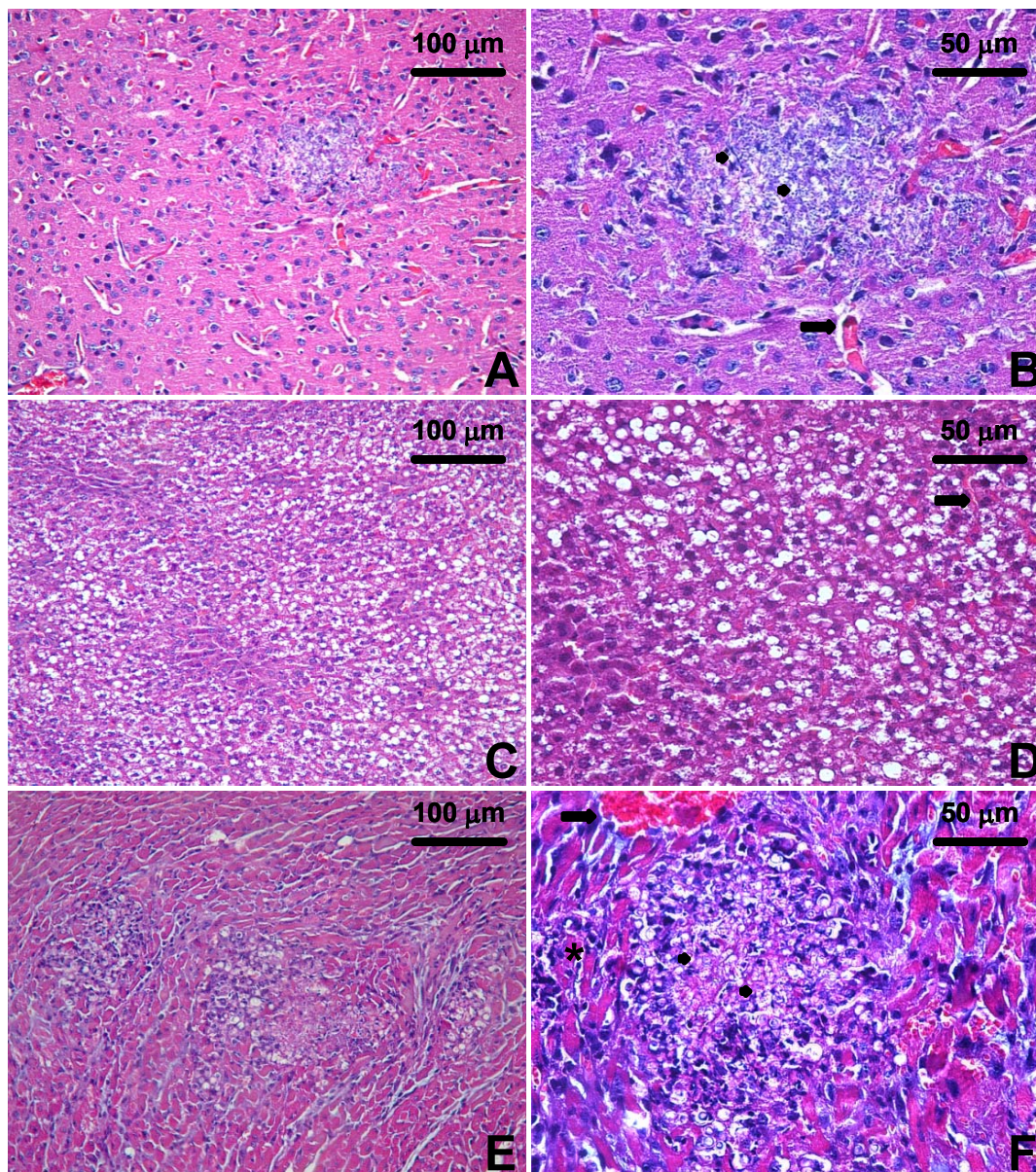
Nos grupos tratados 1h após a infecção nenhum dos animais apresentou rins com este aspecto. Já no tratamento iniciado 24h após a infecção, os pontos esbranquiçados foram evidenciados em 41,6% dos animais. O tratamento iniciado com 1h não induziu alterações macroscópicas nos rins, embora no nível microscópico tenham sido evidenciadas poucas lesões histológicas característica de infecção por *C. albicans*.

A avaliação dos rins e fígado dos animais do grupo controle irradiado mostrou aspecto histológico semelhante ao observado em animais normais não irradiados (figura 46).



**FIGURA 46:** Fotomicrografias do fígado (A e B) e rim (C e D) dos animais pertencentes ao grupo controle irradiado não infectado, necropsiados 10 dias após irradiação. Observa-se, em ambos os órgãos, aspecto histológico normal após irradiação. Hematoxilina e Eosina.

A figura 47 mostra cortes histológicos do cérebro, fígado e coração dos animais do grupo infectado não tratado. O cérebro (A e B) mostra-se congestionado com presença do fungo e de raras células inflamatórias. As lesões no fígado (C e D) apresentaram sob a forma de congestão, esteatose, inflamação discreta. No coração (E e F) houve destruição das fibras musculares pela presença do fungo com presença de degeneração hialina, e raras células inflamatórias. Esses dados indicam que a *Candida* induziu a alterações morfológicas em diferentes órgãos vitais, com lesões fúngicas características.

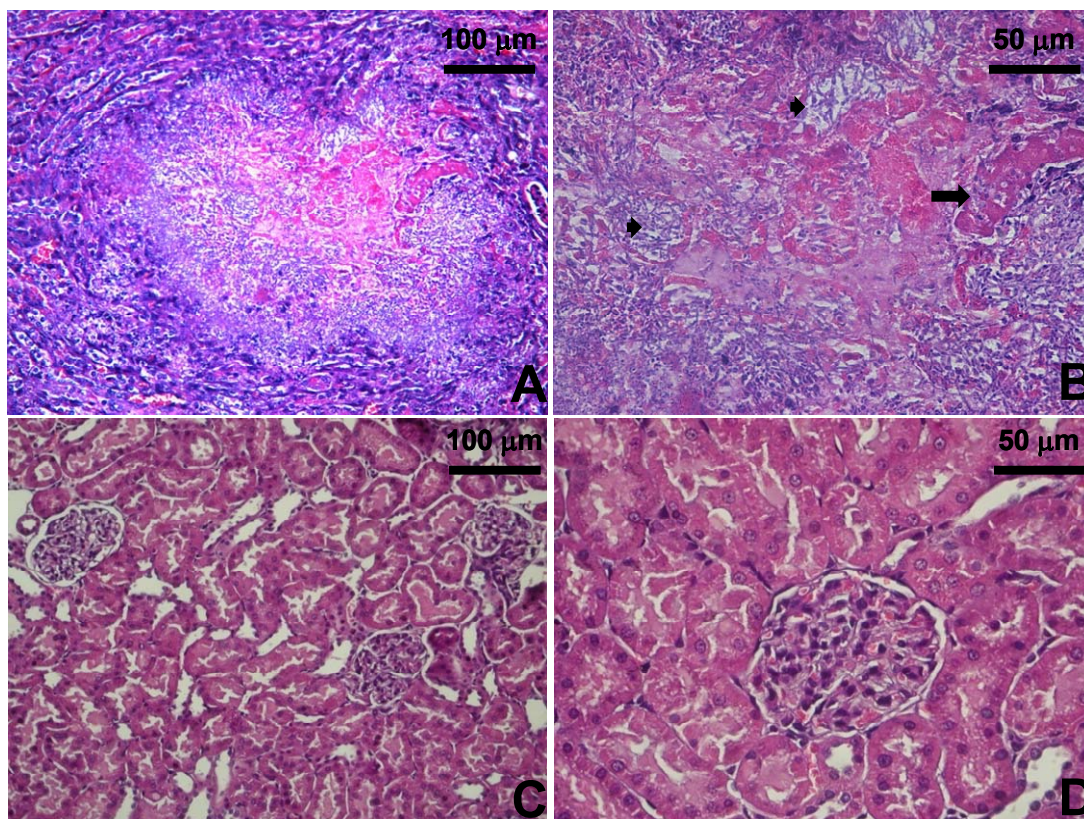


**FIGURA 47:** Fotomicrografias do cérebro (A e B), fígado (C e D) e coração (E e F) de animais pertencentes ao grupo infectado não tratado necropsiados sete dias após a infecção. Observa-se a presença de congestão em B, D e F (setas), hifas em B e F (cabeça de seta), esteatose em D e degeneração hialina (\*) em F. Hematoxilina e Eosina.

Os rins dos animais do grupo infectado não tratado figura 48 (A e B) revelaram degeneração glomerular, a presença de túbulos renais vacuolizados, congestão acentuada, abscessos repletos de fungo com hifas e pseudo-hifas, sem inflamação exuberante. Porém, a maior parte das células inflamatórias



está ao redor dos fungos. De todos os órgãos analisados, o rim foi o órgão que mostrou maiores alterações histológicas causadas pela *Candida albicans*



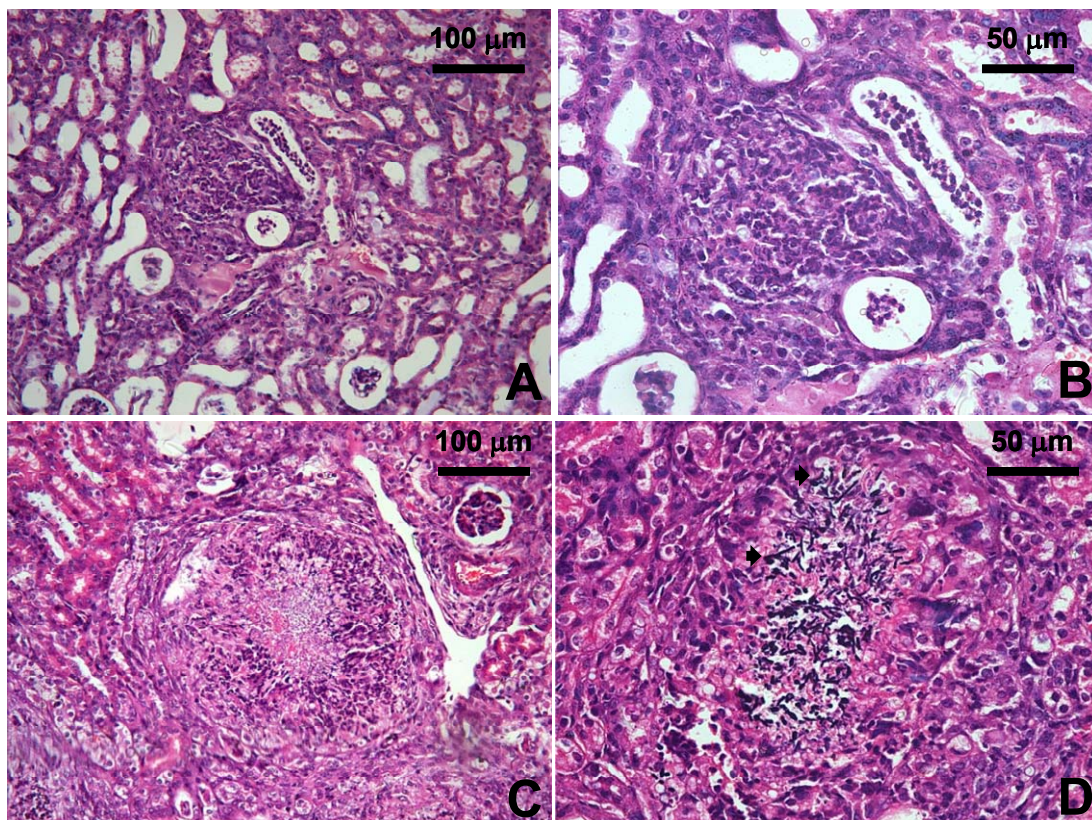
**FIGURA 48:** Fotomicrografias do rim de animais pertencentes aos grupos infectado não tratado (A e B) e tratado após 1 hora de infecção (C e D) necropsiados sete dias após a infecção. Observa-se a presença de congestão (seta) e hifas (cabeça de seta) em B. Hematoxilina e Eosina

Na literatura, o rim é mencionado como o órgão mais afetado em modelos de infecção por *Candida ssp* e também em candidíase humana disseminada devido à habilidade da levedura produzir pseudo-hifas no lúmen tubular renal e penetrar no parênquima renal. Os dados relatados no presente trabalho mostraram também que o rim foi o órgão mais suscetível à infecção pela *C. albicans* o que está de acordo com dados já relatados na literatura (Roger e Balish, 1976; Chaves *et al.*, 2004). As invasões severas nos rins por espécies de *Candida*, apresentam-se em cortes histológicos sob a forma de blastóporos e pseudohifas seguida de uma severa inflamação por neutrófilos polimorfonucleares, abscessos, necroses e vários graus de hidronefroses

(Chaves *et al.*, 2004). No presente trabalho foram observadas várias alterações nos rins, como as descritas na literatura citada acima, porém as células inflamatórias são raras nos vários órgãos analisados, o que pode ser justificado pelo fato dos animais terem sido imunossuprimidos antes da infecção pela *Candida albicans*, o que reduz drasticamente o número de leucócitos, como já observado em nossos resultados na tabela 10 referente ao leucograma dos animais irradiados. Roger e Balish (1976) relataram que, em ratos e camundongos, infectados via intravenosa com vários tamanhos de inóculos de *Candida albicans*, essa se multiplicou em maior extensão nos rins do que nos pulmões, fígado ou baço (Roger e Balish, 1976). Os mesmos autores também demonstraram que os rins são menos efetivos na clearance de *Candida albicans* do parênquima do próprio órgão, provavelmente devido ao menor número de células fagocitárias residentes nos rins comparados aos pulmões e ao fígado, segundo Louria e colaboradores (1963).

Nos grupos tratados 1h após a infecção observou-se a presença de poucas lesões, sem a visualização da *Candida albicans*, como apresentado na figura 48 (C e D) em todos os órgãos analisados, inclusive nos rins.

Nos grupos tratados 24 horas após a infecção foram observadas a presença de lesões e de fungos em todos os grupos tratados com fluconazol na forma livre ou vetorizada (figura 49 C e D). Porém, as lesões foram menos acentuadas e o número de células fúngicas menor que no grupo controle não tratado (figura 49 A e B). Como mostra a figura 51 (A e B), 24 após a inoculação via intravenosa da *Candida albicans*, já era possível observar a presença de raras células fúngicas e de algumas lesões nos rins. Esse fato pode ser justificado pelo início tardio do tratamento, o que o torna menos efetivo na eliminação do fungo do rim, propiciando a instalação do microorganismo e lesão irreversível do órgão.



**FIGURA 49:** Fotomicrografias do rim de animais pertencentes aos grupos infectado não tratado necropsiados após 1 dia de infecção (A e B) e tratado (C e D) - após 24 horas de infecção - necropsiados após 7 dias de infecção. Observa-se a presença de processo inflamatório em B (\*) e hifas em D (cabeça de seta). Hematoxilina e Eosina.

A eficácia devido à encapsulação do fluconazol estudada nos dois protocolos supramencionados não evidenciou melhorias com relação às lesões ou à presença de *Candida albicans* nos cortes histológicos dos órgãos estudados em comparação com o fluconazol livre. Entretanto, ficou claro que o tratamento iniciado 1h após a infecção aumenta as chances de recuperação dos animais tanto em termos de sobrevivência e aumento do peso corporal, quanto em relação aos aspectos histológicos da infecção em relação ao tratamento iniciado com 24h.

É interessante observar que o efeito do inóculo foi muito importante nesses estudos. O uso de  $10^7$  UFC reduz a possibilidade de cura e de aumento da sobrevivência dos animais, como já relatado por Cacciapuoti e colaboradores (1992), onde todas as drogas testadas (fluconazol e cetoconazol) demonstraram ineficácia nessas condições de infecção por *C. albicans*. Nossos dados estão de acordo com os relatados por esses autores.

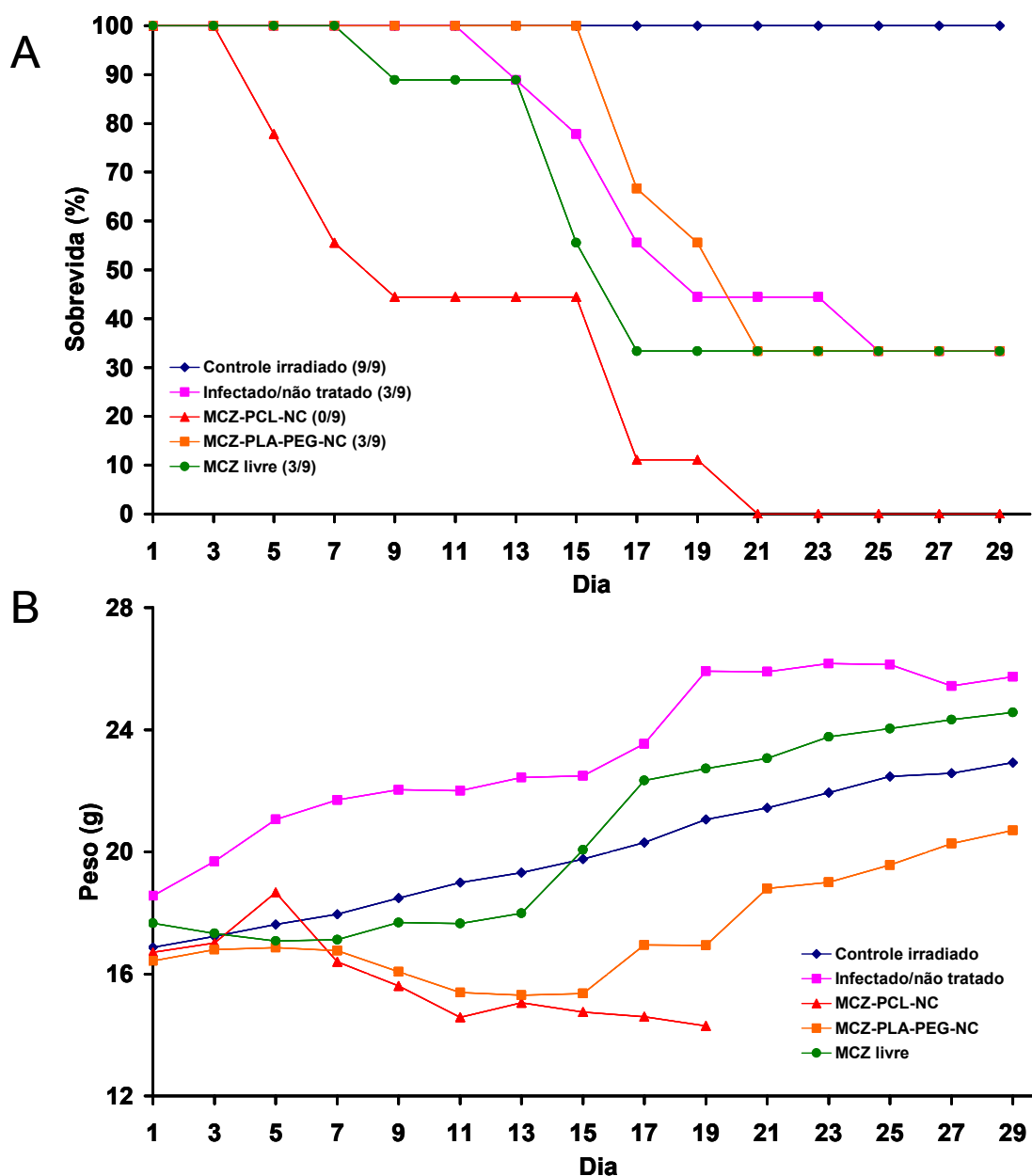
Do ponto de vista histológico, o tratamento após 1h foi mais eficaz na redução da quantidade de fungos nos órgãos que após 24h, em relação ao grupo não tratado. Essas diferenças são nítidas a partir das análises histológicas de diferentes órgãos.

É importante ressaltar que nos experimentos realizados no presente estudo, o organismo dos animais é imunocomprometido e os efeitos de recuperação atribuídos ao sistema de defesa estão minimizados em relação à atividade antifúngica dos fármacos. Esse fato, embora artificial, representa de certa forma a situação vivida por pacientes sob imunossupressão, devido ao uso de fármacos ou induzida por doenças específicas como o câncer e a AIDS.

### **Comparação da eficácia de nanocápsulas convencionais e furtivas de miconazol (PROTOCOLO II)**

O experimento com miconazol foi realizado segundo o protocolo II. Os resultados obtidos estão representados na figura 50.

A análise estatística dos dados apresentados no gráfico de sobrevivência (figura 50A) indicou que não houve diferença significativa entre o grupo não tratado e os grupos tratados com MCZ livre e MCZ-PLA-PEG ( $p>0,05$ ). Nos animais tratados com MCZ-PCL-NC o TMS foi de 11 dias, sendo significativamente ( $p<0,05$ ) inferior ao do grupo não tratado (TMS=23), indicando uma maior toxicidade da formulação de nanocápsula convencional contendo miconazol pela via intravenosa, que induziu a morte prematura dos animais.



**FIGURA 50:** Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com MCZ-PCL-NC, MCZ-PLA-PEG, MCZ livre 15mg/kg/dia, durante 5 dias por via *i.v.* 1h após infecção com *Candida albicans* ( $10^7$ UFC).

Como resultado pode-se sugerir que o miconazol não foi efetivo no tratamento dos animais infectados por este isolado clínico de *Candida albicans*, mesmo no grupo tratado com MCZ livre (TMS=21) ou com as formulações de circulação sanguínea prolongada, MCZ-PLA-PEG (TMS=24). Foi também realizado um experimento preliminar, utilizando-se inóculo de  $10^8$ UFC com tratamento iniciando-se 1h após a infecção, onde foi verificada a ausência de

atividade do miconazol na forma livre ou encapsulada. Finalmente, os experimentos com MCZ *in vivo*, não indicaram a possibilidade de sucesso terapêutico no modelo utilizado nessa dissertação, ao contrário de um trabalho anterior publicado na literatura (Levy *et al.*, 1995), onde NE em torno de 125 nm contendo MCZ reduziram a toxicidade do fármaco por via intravenosa em camundongos imunocompetentes infectados pelo *Cryptococcus neoformans*, embora a erradicação da infecção cerebral não tenha sido atingida. Entretanto, as NC do presente estudo possuem o dobro do tamanho, o que pode estar aumentando a toxicidade das partículas. As NC também possuem a parede polimérica o que aparentemente pode reduzir a liberação do fármaco em relação às NE (Cruz *et al.*, 2006; Mosqueira *et al.*, 2006).

Com relação à toxicidade geral das formulações de MCZ avaliadas pelo peso dos animais durante o curso do tratamento (figura 50B), observou-se que a formulação de MCZ livre foi significativamente ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ ) menos tóxica do que as NC de PCL e PLA-PEG, respectivamente, indicando que provavelmente as formulações coloidais não liberam imediatamente uma concentração suficiente do fármaco para a redução das lesões causadas pelo fungo. A hipótese de maior toxicidade das nanocápsulas não é suportada por dados publicados na literatura, onde geralmente a encapsulação aumenta os valores de  $DL_{50}$  para os fármacos testados (Leite *et al.*, 2007; Mosqueira *et al.*, 2004, Ameller *et al.* 2004). Uma formulação muito semelhante de NC de PCL não carregada de fármacos foi avaliado por Leite *et al.*, 2007 e esta não demonstrou maior toxicidade em relação a outros excipientes utilizados para administração intravenosa.

Observou-se também que o peso dos animais não tratados difere significativamente do peso dos animais tratados ( $p < 0,05$ ) com MCZ livre indicando que, efetivamente, além do MCZ não ter sido eficaz, o tratamento com MCZ por via intravenosa aumenta a debilidade do animal. Adicionalmente, uma toxicidade evidente no local da injeção pode ser observada na figura 51 após administração do MCZ livre, que pode ser atribuída ao próprio fármaco. Os mesmos excipientes para solubilização do MCZ foram utilizados com o

cetoconazol e o fluconazol nesse trabalho e estes achados não foram observados.



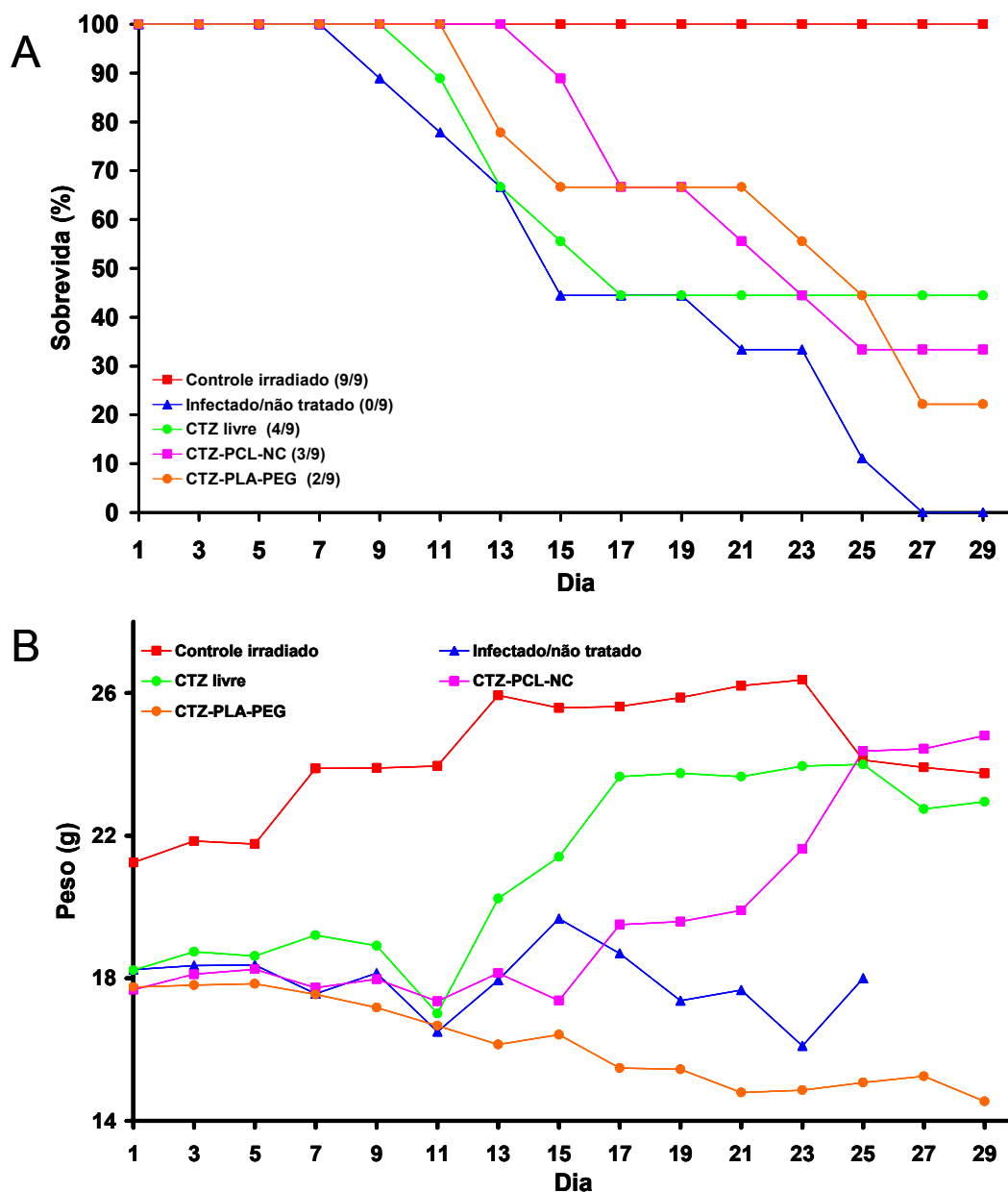
**FIGURA 51:** Necrose na cauda dos animais causada pela administração do MCZ livre.

A partir desses resultados, os experimentos posteriores foram realizados com inóculos menores visando reduzir a gravidade da infecção e facilitar a evidenciação de diferenças entre as formulações empregadas utilizando-se fluconazol e cetoconazol. O tratamento foi iniciado 6h após a infecção com inóculos variando entre  $10^4$  e  $10^6$  UFC.

### **PROTOCOLO III – Comparação da eficácia de nanocápsulas de cetoconazol e de fluconazol administradas via intravenosa usando inóculo de $10^6$ UFC**

No gráfico da figura 52A abaixo estão apresentados os dados de sobrevivência nos experimentos com o cetoconazol. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nas curvas de sobrevivência  $\times$  tempo entre os grupos tratados, e também entre os grupos tratados e não tratados. Do mesmo modo não há diferença significativa para os tempos médios de sobrevivência (TMS) entre nenhum dos grupos deste experimento nos animais infectados. Portanto, o cetoconazol na dose de 20mg/kg/dia foi considerado ineficaz dentro das

nossas condições experimentais e com a utilização da referida *Candida albicans*.



**Figura 52:** Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com CTZ-PCL-NC, CTZ-PLA-PEG, CTZ livre 20mg/kg/dia, durante 5 dias por via *i.v.* 6h após infecção com *Candida albicans* ( $10^6$  UFC).

Em estudos anteriores (Cacciapuoti *et al.*, 1992), a dose protetora de 50% (DP<sub>50</sub>) de cetoconazol foi de 20mg/kg/dia em modelo de camundongos imunocompetentes infectados com *C. albicans* usando o mesmo inóculo de  $10^6$



UFC. Em camundongos imunossuprimidos ( $\gamma$ -irradiados) o cetoconazol levou ao óbito todos os animais na dose de 10mg/kg/dia. Portanto, em nossos estudos a dose de cetoconazol utilizada estava adequada. Entretanto, é possível considerar que o isolado de *C. albicans* utilizado em nossos experimentos não foi susceptível ao cetoconazol.

Não houve diferença significativa entre os grupos de animais infectados, tratados ou não com CTZ em relação ao peso médio dos animais até o 11° dia (54B). O tratamento com CTZ livre e com CTZ-PLA-PEG, entretanto, aumentaram significativamente o ganho de peso em relação ao grupo não tratado, após o 11° dia. Não há diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os animais não tratados e os tratados com NC furtivas, provavelmente pela retenção do CTZ nas NC furtivas por mais tempo, o que retarda muito a recuperação dos animais em termos de peso.

Foram realizadas culturas do sangue e dos macerados de rins e de cérebro dos animais sacrificados 48 horas após o final do tratamento. Esses resultados estão representados na tabela 12.

**TABELA 12:** Cultivo de sangue e macerado de órgãos 48 horas após o final do tratamento

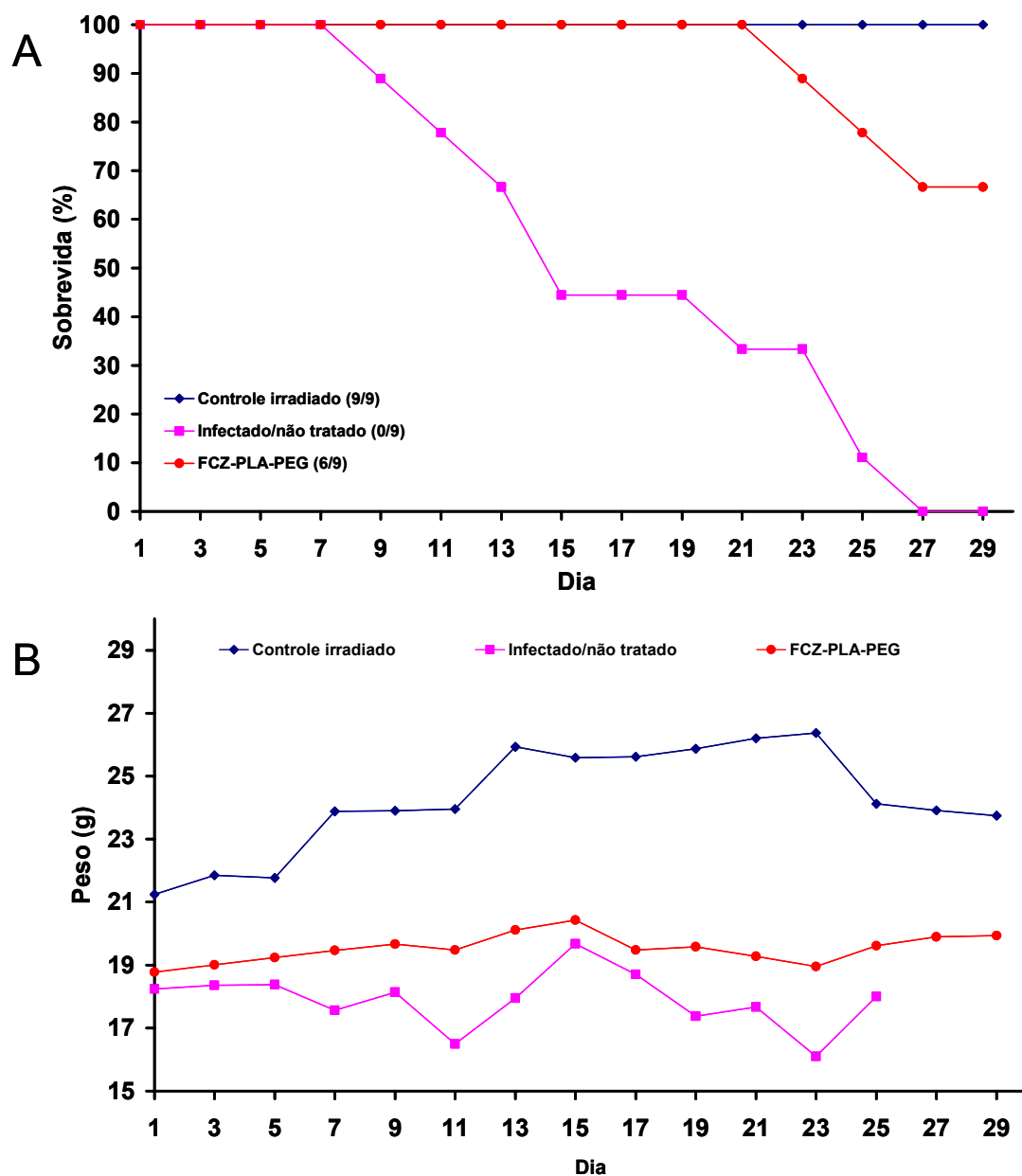
| Formulação              | Animal 1 |      |         | Animal 2 |      |         |
|-------------------------|----------|------|---------|----------|------|---------|
|                         | Sangue   | Rins | Cérebro | Sangue   | Rins | Cérebro |
| Controle irradiado      | -        | -    | -       | -        | -    | -       |
| Controle não tratado    | -        | +    | +       | -        | +    | +       |
| CTZ-PCL-NC 20mg/kg/dia  | -        | +    | +       | -        | +    | -       |
| CTZ-PLA-PEG 20mg/kg/dia | -        | +    | -       | -        | +    | -       |
| CTZ livre 20mg/kg/dia   | -        | +    | +       | -        | +    | +       |

Cultura positiva (+): Crescimento da *Candida albicans*. Cultura negativa (-): ausência de crescimento

Esses dados sugerem que todas as formulações foram mais efetivas na eliminação da *C. albicans* do sangue do que dos órgãos. Uma hipótese seria a dificuldade do CTZ e das NC contendo CTZ obtidas com tamanho médio superior a 210nm de extravasarem para o tecido eliminando focos da infecção, principalmente nos rins, uma vez que o CTZ, sendo mais hidrofóbico, e ficando

mais retido nas NC, em acordo com a porcentagem de encapsulação superior a 95%.

**Eficácia de nanocápsulas furtivas de fluconazol administradas por via intravenosa usando inóculo de  $10^6$  UFC (PROTOCOLO III).**



**FIGURA 53:** Sobrevivência (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PLA-PEG 15mg/kg/dia, durante 5 dias por via *i.v.* 6h após infecção com *Candida albicans* ( $10^6$ UFC).

Foi avaliada a eficácia do FCZ associado à NC furtivas de 2,0mg/mL. Como mostra a figura 53A, o tempo de sobrevida dos animais tratados com a NC furtiva foi significativamente maior que aqueles não tratados ( $p < 0,005$ ), sendo o TMS de 39 dias, enquanto que o TMS dos não tratados foi de 17 dias ( $p < 0,001$ ) utilizando-se inóculo de  $10^6$  UFC. Efetivamente a redução do inóculo reduz a gravidade da infecção e a diferenciação entre grupos tratados e não tratados pôde ser observada. O fluconazol em NC furtivas foi mais eficaz que o CTZ na forma de NC na dose de 20mg/kg/dia ( $p < 0,05$ ).

O peso médio dos animais tratados foi significativamente ( $p < 0,01$ ) maior que o peso médio dos animais não tratados, sendo que esta diferença foi mantida ao longo de todo experimento (figura 53B). Resultados obtidos por Khan e colaboradores (2006), com o tratamento de camundongos imunossuprimidos com 10 e 20 mg/kg/dia demonstraram a ineficácia do FCZ, com TMS inferior a 10 dias. A eficácia foi moderada em altas doses (50mg/kg/dia) usando inóculo de  $5,0 \times 10^5$  UFC e o tempo médio de sobrevida foi inferior a 30 dias (Khan *et al.*, 2006). Diante desses resultados previamente relatados, considera-se que o FCZ encapsulado em NC furtivas foi mais eficiente que o FCZ livre, pois os TMS foram significativamente aumentados com a dose de 15mg/kg/dia usando um inóculo maior de  $10^6$  UFC. Foram realizadas culturas do sangue e dos macerados de rins e de cérebro dos animais sacrificados 48 horas após o final do tratamento. Esses resultados estão representados na tabela 13.

**TABELA 13:** Cultivo de sangue e macerado de órgãos 48 horas após o final do tratamento

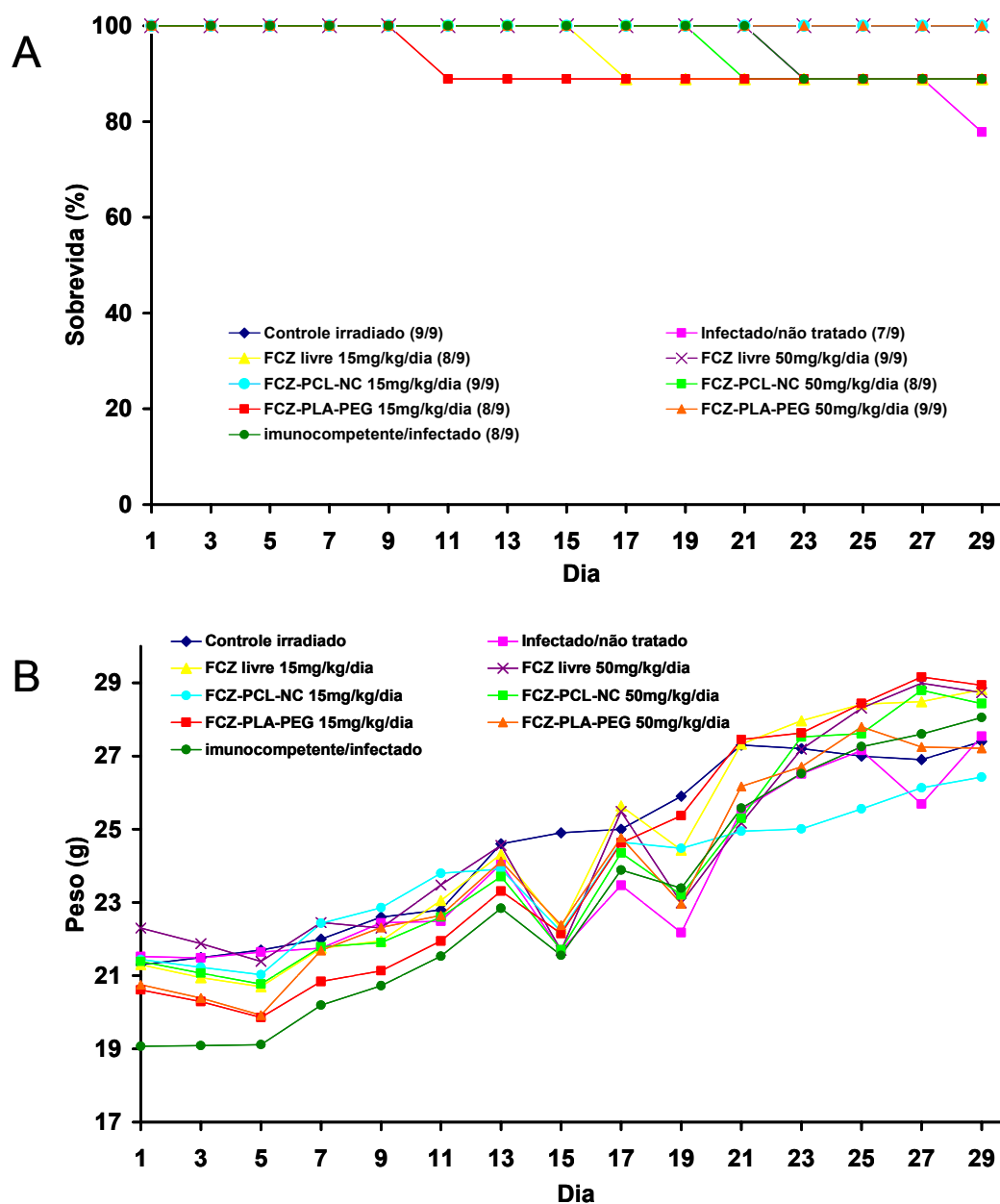
| Formulação              | Animal 1 |      |         | Animal 2 |      |         |
|-------------------------|----------|------|---------|----------|------|---------|
|                         | Sangue   | Rins | Cérebro | Sangue   | Rins | Cérebro |
| Controle irradiado      | -        | -    | -       | -        | -    | -       |
| Infectado não tratado   | -        | +    | +       | -        | +    | +       |
| FCZ-PLA-PEG 15mg/kg/dia | -        | +    | -       | -        | +    | -       |

Cultura positiva (+): Crescimento da *Candida albicans*. Cultura negativa (-): ausência de crescimento

Houve crescimento da *Candida albicans* tanto nos rins dos não tratados quanto nos tratados. Esses dados sugerem que as nanocápsulas de FCZ

foram mais efetivas na eliminação da *C. albicans* do sangue e do cérebro do que dos rins.

**PROTOCOLO IV – Comparação da eficácia de nanocápsulas convencionais e furtivas de fluconazol administradas por via intravenosa usando inóculo de  $10^4$  UFC**



**FIGURA 54:** Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PCL-NC, FCZ-PLA-PEG-NC ou FCZ livre 6h depois da infecção com *Candida albicans* ( $10^4$ UFC) durante 5 dias com 15mg/kg/dia ou 50mg/kg/dia via i.v.

Foi também testado o inóculo de  $10^4$  UFC de *C. albicans* por camundongo para avaliar a eficácia do FCZ associado às NC convencionais e furtivas (2,0mg/mL) administradas via intravenosa, utilizando uma dose de 15 e 50mg/kg/dia com início do tratamento 6h após infecção. De acordo com o gráfico de sobrevivência apresentado na figura 54A o uso de inóculo menor aumentou significativamente a sobrevivência de todos os animais. O tratamento com FCZ livre (15 e 50mg/kg/dia), FCZ em NC convencionais e furtivas nas doses de 15 e 50mg/kg/dia resultaram em sobrevivência de 100% ao final de 30 dias de experimento.

Entretanto, nesse modelo de menor gravidade da infecção, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, pois todos os animais conseguiram uma boa recuperação, mesmo o grupo não tratado, resultando também em uma pobre diferenciação entre os tratamentos (figura 54 A e B).

**TABELA 14:** Cultivo de sangue e macerado de órgãos 48 horas após o final do tratamento

| Formulação                | Animal 1 |      |         | Animal 2 |      |         |
|---------------------------|----------|------|---------|----------|------|---------|
|                           | Sangue   | Rins | Cérebro | Sangue   | Rins | Cérebro |
| Controle irradiado        | -        | -    | -       | -        | -    | -       |
| FCZ livre 15mg/kg/dia     | -        | +    | +       | -        | +    | +       |
| FCZ-PCL-NC 15mg/kg/dia    | -        | +    | +       | -        | -    | +       |
| FCZ-PLA-PEG 15mg/kg/dia   | -        | +    | -       | -        | -    | +       |
| FCZ livre 50mg/kg/dia     | -        | -    | -       | -        | +    | +       |
| FCZ-PCL-NC 50mg/kg/dia    | -        | +    | +       | -        | -    | +       |
| FCZ-PLA-PEG 50mg/kg/dia   | -        | -    | +       | -        | -    | -       |
| Controle não tratado      | -        | +    | +       | -        | +    | +       |
| Imunocompetente/infectado | -        | +    | -       | -        | -    | -       |

Cultura positiva (+): Crescimento da *Candida albicans*. Cultura negativa (-): ausência de crescimento

Segundo a tabela 14, dos dois animais necropsiados 48h após o final do tratamento, em todos os grupos, o cultivo de sangue foi negativo reforçando a hipótese de inóculo muito baixo, insuficiente para produzir um estado de debilidade fatal para o animal. Entretanto, houve diferença entre os órgãos cultivados. Reavaliando o sangue dos animais após 25 dias da infecção, um

novo cultivo de sangue indicou a presença de *C. albicans* em grande parte dos grupos, sugerindo um estabelecimento da infecção mais tardio (tabela 15).

**TABELA 15:** Presença de *C. albicans* no sangue dos animais 25 dias após a infecção

| <b>Formulação</b>         | <b>Cultivo sangue (+) <i>C. albicans</i>/(n)</b> |
|---------------------------|--|
| Controle irradiado        | 0/9  |
| FCZ livre 15mg/kg/dia     | 7/8  |
| FCZ-PCL-NC 15mg/kg/dia    | 8/9  |
| FCZ-PLA-PEG 15mg/kg/dia   | 4/8  |
| FCZ livre 50mg/kg/dia     | 7/9  |
| FCZ-PCL-NC 50mg/kg/dia    | 3/8  |
| FCZ-PLA-PEG 50mg/kg/dia   | 9/9  |
| Infectado não tratado     | 4/7  |
| Imunocompetente/infectado | 2/8  |

Não foi verificada diferença significativa nos animais imunossuprimidos em relação ao peso médio dos animais tratados e não tratados durante os primeiros 30 dias do experimento.

Sendo assim, na tentativa de submeter os animais a uma nova imunossupressão foi administrada uma dose de ciclofosfamida (250mg/kg), aos 45 dias do experimento, em todos os animais vivos. O objetivo foi promover uma agravação da infecção a partir de focos já controlados, ou pelo tratamento, ou pelo próprio mecanismo de defesa do organismo. Na semana seguinte observou-se a queda dos pêlos na região dorso-caudal como foi verificado após imunossupressão com radiação gama. Mesmo após a segunda imunossupressão não foram observadas variações significativas no tempo médio de sobrevivência dos grupos analisados. (tabela 16).

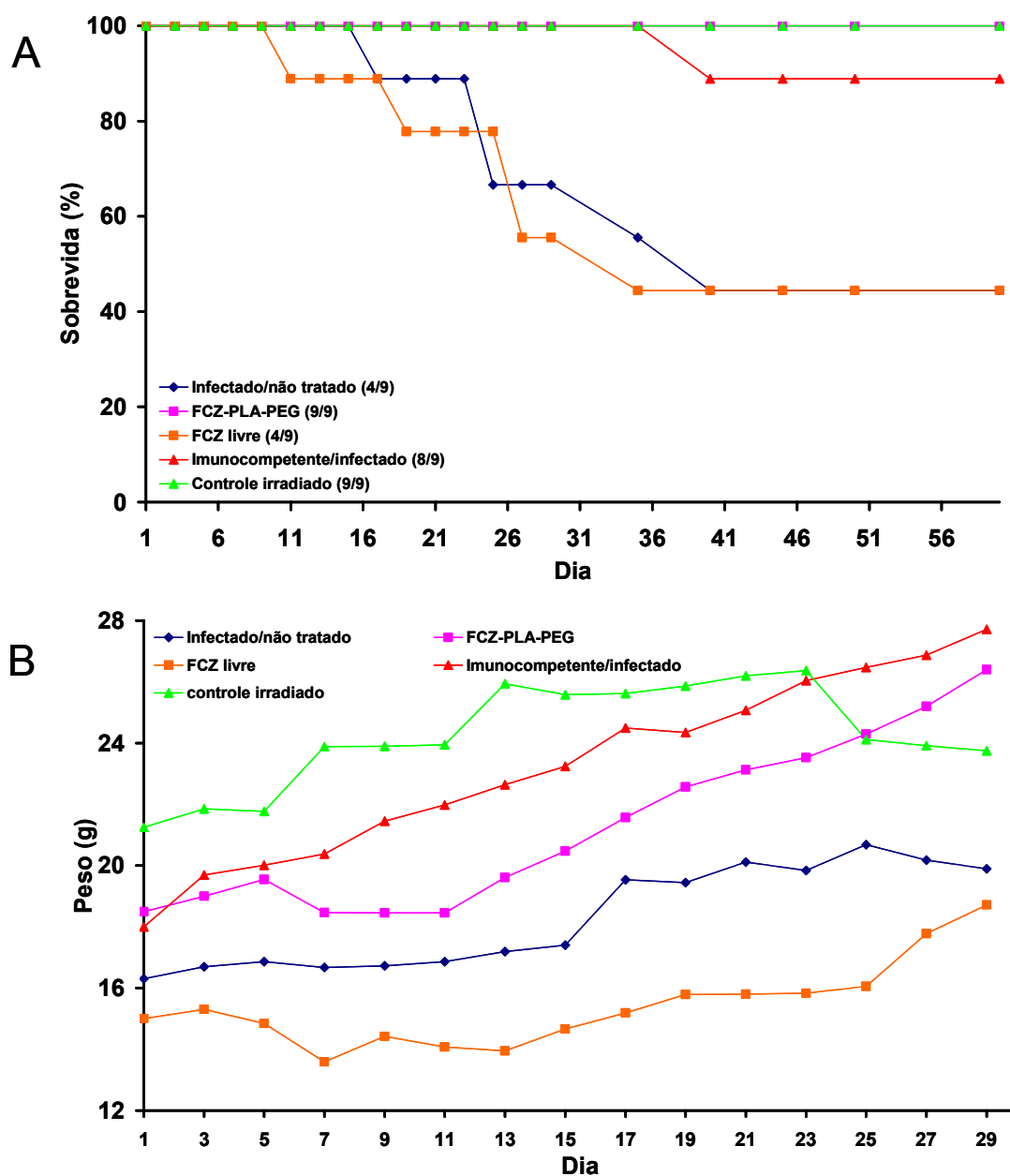
**TABELA 16:** Sobrevida e tempo médio de sobrevida após imunossupressão com radiação gama e ciclofosfamida

| <b>Formulação</b>         | <b>N° de animais vivos*</b> | <b>N° de animais vivos**</b> | <b>Sobrevida total</b> | <b>TMS</b> |
|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------|------------|
| Controle irradiado        | 9/9                         | 9/9                          | 9/9                    | >60        |
| Infectado não tratado     | 7/9                         | 6/7                          | 6/9                    | 51 ± 15    |
| Imunocompetente/infectado | 8/9                         | 6/8                          | 6/9                    | 53 ± 12    |
| FCZ livre 15mg/kg/dia     | 8/9                         | 6/8                          | 6/9                    | 53 ± 14    |
| FCZ-PCL-NC 15mg/kg/dia    | 9/9                         | 8/9                          | 8/9                    | 59 ± 3     |
| FCZ-PLA-PEG 15mg/kg/dia   | 8/9                         | 6/8                          | 6/9                    | 52 ± 15    |
| FCZ livre 50mg/kg/dia     | 9/9                         | 8/9                          | 8/9                    | 59 ± 3     |
| FCZ-PCL-NC 50mg/kg/dia    | 8/9                         | 7/8                          | 7/9                    | 54 ± 13    |
| FCZ-PLA-PEG 50mg/kg/dia   | 9/9                         | 7/9                          | 7/9                    | 58 ± 15    |

\* após imunossupressão com radiação gama, até 30 dias. \*\* após nova imunossupressão com ciclofosfamida (45 dias) acompanhados por 60 dias. O TMS (tempo médio de sobrevida) foi analisado pelo teste de Tukey utilizando Prisma 4.0 software.

De acordo com os resultados, apesar dos animais terem desenvolvido a infecção, não foi possível avaliar a eficácia do FCZ livre ou encapsulado frente ao grupo infectado não tratado, devido à dose infectante ter sido baixa ( $10^4$  UFC).

Por fim, um inóculo de  $10^5$  UFC, utilizando uma dose de 50mg/kg/dia de FCZ administrado via intravenosa, com início do tratamento 6h após infecção foi utilizado nos experimentos posteriores. Avaliou-se a eficácia do FCZ associado às NC convencionais e furtivas (2,0mg/mL) frente ao fármaco livre. Esses resultados estão apresentados na figura 55.



**FIGURA 55:** Sobrevida (A) e variação do peso corporal (B) de camundongos swiss imunossuprimidos tratados uma vez ao dia com FCZ-PLA-PEG-NC ou FCZ livre 6h depois da infecção com *Candida albicans* ( $10^5$ UFC) durante 5 dias com 50mg/kg/dia via i.v.

Os experimentos realizados com inóculo de  $10^5$  UFC permitiram uma efetiva diferenciação dos efeitos das formulações contendo fluconazol. Foi observada uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo de animais tratados com fluconazol livre e o grupo tratado com nanocápsulas furtivas de fluconazol na dose de 50mg/kg/dia. É interessante observar que não houve



diferença de eficácia entre o grupo não tratado ou tratado com FCZ livre, indicando, que as NC furtivas foram mais eficazes para atingir os focos infecciosos de *C. albicans* durante o período experimental (figura 55 A e B). Os dados apresentados na tabela 17 abaixo confirmam o maior ( $p < 0,05$ ) tempo médio de sobrevivência dos animais tratados com FCZ em NC furtivas em relação aos grupos de FCZ livre e não tratado. O comportamento dos animais tratados com as NC furtivas de FCZ foi muito próximo do grupo de animais imunocompetentes infectados em termos de sobrevivência x tempo ( $p > 0,05$ ). Entretanto, considerando-se a maior porcentagem de animais com cultura de sangue negativa no grupo de FCZ-PLA-PEG e o maior TMS em relação ao grupo de animais imunocompetentes, pode ser sugerido que essas nanocápsulas foram as mais eficazes na eliminação do fungo do sangue e no aumento da sobrevivência e na recuperação geral dos animais avaliada pela recuperação do peso corporal.

**TABELA 17:** Presença de *C. albicans* no sangue dos animais após 30 dias, sobrevivência e tempo médio de sobrevivência

| Formulação                  | Cultivo sangue (+) <i>C. albicans</i><br>/ (n° de animais vivos após 30<br>dias) | Sobrevivência<br>60 dias | TMS     |
|-----------------------------|--|--------------------------|---------|
| Controle irradiado          | 0/9  | 9/9                      | >60     |
| Infectado não tratado       | 3/6  | 4/9                      | 42 ± 17 |
| FCZ livre 50mg/kg/dia       | 2/5  | 4/9                      | 39 ± 19 |
| FCZ-PLA-PEG 50mg/kg/dia     | 2/9  | 9/9                      | >60     |
| Imunocompetentes/infectados | 4/8  | 8/9                      | 58 ± 7  |

TMS (tempo médio de sobrevivência) foi comparado pelo teste de Tukey utilizando Prisma 4.0 software.

Considerando a porcentagem de sobrevivência ( $p < 0,01$ ) e o peso ( $p < 0,001$ ), é possível dizer que a NC furtiva foi mais eficaz que o FCZ livre para o tratamento dos animais infectados com a *Candida albicans* (Tabela 17 e figura 57).

Embora tenha sido difícil estabelecer o tamanho do inóculo correto para realização dos experimentos devido à inexistência de dados sobre a infecção em camundongos com o isolado de *Candida albicans* utilizado nesse trabalho,

os inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  UFC foram os que permitiram uma melhor análise entre os grupos.

**TABELA 18:** Sobrevida e TMS com relação ao tamanho do inóculo

| Formulação              | Inóculo UFC de <i>C. albicans</i> | Sobrevida 30 dias | TMS         | Sobrevida x Tempo |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------|-------------------|
| Infectado não tratado   | $10^4$                            | 7/9               | $51 \pm 15$ | a, e              |
| Infectado não tratado   | $10^5$                            | 6/9               | $42 \pm 17$ | a, f              |
| FCZ livre 50mg/kg/dia   | $10^4$                            | 9/9               | $59 \pm 3$  | b, e              |
| FCZ livre 50mg/kg/dia   | $10^5$                            | 5/9               | $39 \pm 19$ | c, f              |
| FCZ-PLA-PEG 50mg/kg/dia | $10^4$                            | 9/9               | $58 \pm 4$  | d, e              |
| FCZ-PLA-PEG 50mg/kg/dia | $10^5$                            | 9/9               | >60         | d, g              |

Os TMS (tempo médio de sobrevida) avaliados até 60 dias foram comparados pelo teste de Tukey utilizando Prisma 4.0 software. Letras iguais indicam diferenças não significativas.

A tabela 18 mostra a diferença na sobrevida e no TMS em relação ao tamanho do inóculo,  $10^4$  e  $10^5$  UFC. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos infectados com o inóculo de  $10^4$ , porém quando se compara os grupos tratados com FCZ livre em ambos os inóculos, a sobrevida foi maior no grupo infectado com  $10^4$  UFC. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com a NC furtiva.

Nesses estudos os dados indicam que a formulação de NC furtiva é a mais eficaz comparada ao uso do FCZ livre. Novos experimentos estão em curso no laboratório para a comparação in vitro e in vivo das formulações furtivas e convencionais de nanocápsulas e sobre a eficácia dos dois tipos de NC não carregadas em modelo de *Candida albicans*. Assis e colaboradores (2008) estudando uma formulação de PLA-PEG contendo fluconazol radiomarcado pelo Tecnecio<sup>99m</sup>, observaram uma maior retenção do fármaco em nanocápsulas furtivas do que em NC de PLA, indicando que o PEG poderia aumentar a retenção da droga no interior da formulação, permitindo uma liberação tardia. Além disso, a formulação de PLA-PEG utilizada em nossos experimentos in vivo possui um teor maior de PEG na superfície e um tamanho médio de 202nm, o que poderia implicar em maior tempo de circulação sanguínea do fármaco com, portanto, maior probabilidade de atingir alvos em

tecidos mais irrigados por um período mais prolongado. Assim nossa hipótese é que as NC furtivas de PLA-PEG foram mais eficazes que o fármaco livre, pois conseguiram eliminar o fungo com maior eficiência do sangue e provavelmente reduzir a carga fúngica nos rins, por circularem mais tempo nos vasos (Mosqueira *et al.*, 2001b). Estudos posteriores de histologia relacionados aos experimentos usando o inóculo de  $10^5$  deverão ser realizados para que esses pontos sejam esclarecidos. Assis, (2007) também observou em experimentos *in vivo*, em animais imunossuprimidos, que as NC de PLA-PEG contendo FCZ se concentraram mais que as NC convencionais no foco infeccioso produzido por *C. albicans*. Assim sendo, no modelo de candidíase disseminada utilizado em nossos experimentos, esses dados previamente relatados parecem estar explicando parcialmente a maior eficácia das NC furtivas.

Espuelas e colaboradores (2003) descreveram que a anfotericina B (AMB) utilizada em modelo de candidíase disseminada em camundongos neutropênicos associada a carreadores coloidais como nanopartículas e micelas mistas de poloxamer foram menos eficazes que o fármaco livre, pois as nanopartículas convencionais se acumulam mais nos macrófagos do fígado e do baço, do que em outras partes do organismo. Doses bem maiores de AMB foram necessárias para obtenção do mesmo efeito terapêutico. Contrariamente, as NC furtivas, utilizadas aqui, possuem acumulação reduzida nos órgãos do SFM (fígado, baço) por terem a superfície hidrofílica pelo PEG (Mosqueira *et al.*, 2001a,b), e por isso circulam por mais tempo no sangue, mantendo o fármaco incorporado mais disponível para ser distribuído em outros alvos fora do SFM, tal como o rim.

# **CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

- ❖ Populações de nanocápsulas e nanoemulsões monodispersas, de tamanho médio variando entre 190 e 300nm, contendo fluconazol, cetoconazol e miconazol puderam ser produzidas pelo método de nanoprecipitação em concentrações entre 1 e 5 mg/ml. Entretanto, acima de 1mg/ml observou-se uma saturação da capacidade de carregamento dos vetores com eficiência inversamente relacionado à concentração de fármaco na formulação. Este efeito foi também observado em relação ao potencial zeta na interface das nanoestruturas, onde os valores absolutos foram reduzidos com a incorporação dos fármacos, evidenciando-se a adsorção dos mesmos à superfície dos vetores. No caso das NC de PLA-PEG este efeito foi muito evidente com o FCZ.
  
- ❖ As NC e NE foram caracterizadas adequadamente pelas diferentes técnicas descritas nesse trabalho, que proporcionaram análises detalhadas da estrutura tridimensional, de suas propriedades de deformação, das variações de tamanho e carga elétrica superficial, provocadas pela inclusão dos fármacos, e da estabilidade física ao longo de 4 meses de armazenamento. As NC e NE mostram-se estáveis durante este período, segundo os critérios analisados, sem alterações significativas do tamanho e do potencial de superfície dos colóides.
  
- ❖ Devido à alta hidrofília do FCZ, a associação dele às nanoestruturas foi inferior a 50%, fato esse que contribuiu para uma liberação rápida a partir das NC e NE em salina. Esse fato pode estar associado à dificuldade de se evidenciar *in vivo* diferenças de eficácia entre o FCZ livre ou vetorizado em nanocápsulas. Entretanto, quando associado às NC furtivas, esse diferença foi melhor observada.

- ❖ Como as NC furtivas encapsularam o FCZ em teores menores, pode-se sugerir que as diferenças de eficácia observadas *in vivo* em relação ao FCZ livre sejam devidas às propriedades de acúmulo das nanocápsulas furtivas em focos inflamatórios e infecciosos, como previamente demonstrado por outros autores (Pereira, 2007 e Assis, 2007).
- ❖ O tamanho do inóculo teve uma grande influência nos resultados de eficácia, tendo sido necessária uma otimização para impedir uma debilidade muito grande dos animais em valores maiores que  $10^7$  ou uma total inocuidade em valores inferiores a  $10^4$  UFC. Os valores entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC permitiram uma boa diferenciação entre grupos recebendo diferentes tratamentos.
- ❖ Nesse trabalho foi possível, através do uso de vários protocolos, estabelecer as melhores condições de imunossupressão e de infecção para a utilização do modelo murino de candidíase disseminada, visando o tratamento antifúngico. Esse modelo poderá ser utilizado em estudos futuros em nosso grupo, empregando-se outros fármacos antifúngicos.
- ❖ O tratamento iniciado 1h hora após a infecção reduziu significativamente o número de lesões nos órgãos comparado ao tratamento iniciado 24h após a infecção, sugerindo que as chances de cura e eliminação do fungo do organismo aumentam com tratamentos mais precoces com fluconazol.
- ❖ Estudos histológicos mais detalhados deverão ser realizados futuramente para a confirmação dos resultados mais promissores obtidos com as nanocápsulas furtivas de fluconazol na dose de 50mg/Kg/dia.

# ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUBAKAR, M.; COUVREUR, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; GOURITIN, B.; LACOUR, B.; FARINOTTI, R.; PUISIEUX, F.; VAUTHIER, C. Insulin-loaded nanocapsules for oral administration: *In vitro* and *in vivo* investigation. *Drug Development Research*, v. 49, n. 2, p. 109 – 117, 1999.

ABRUZZO, G. K.; GILL, C. J.; FLATTERY, A. M. Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis e candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, v. 42, p. 2310- 2318, 2000.

AHFS Drug information 2003.

ALLEMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. of Pharm. and Biopharm.*, v. 39 (5), p.173-191, 1993.

AMBROSINI, A.; BOSSI, G.; DANTE, S.; DUBINI, B.; GOBBI, L.; LEONE, L.; BOSSI, M. G. P.; ZOLESE, G. Lipid-drug interaction: thermodynamic and structural effects of antimicotic fluconazole on DPPC liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 95, p. 37-47, 1998.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; RENOIR, J. M. Pure antiestrogen RU 58668-loaded nanospheres: Morphology, cell activity and toxicity studies. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.21, p. 361-370, 2004.

AMMOURY, N.; FESSI, H., DEVISSAGNET, J.-P.; PUISIEUX, F.; BENITA, S. Physicochemical characterization of polymeric nanocapsules and *in vitro* release evaluation of indomthacin as a model drug. *STP Pharma.*, v. 5, p. 647-651, 1989.

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J. of Antimicrob. Chemotherapy*, v. 44, p. 151-162, 1999.

ARIKAN, S.; REX, J. H. Lipid-based antifungal agents: current status. *Curr. Pharm. Des.*, v.7, n.5, p. 393-415, 2001.

ARNDT, C. A. S.; WALSH, T. J.; MCCULLY, C. L. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid: implications for treating fungal infections of the central nervous system. *J. Infect. Dis.*, v. 157, p. 178-180, 1988.

ASSIS, D. N. Biodistribuição do fluconazol marcado com <sup>99m</sup>tecnécio em nanocápsulas convencionais e furtivas. *Dissertação de mestrado, 2007. Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte – MG.*



ASSIS, D. N.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of <sup>99m</sup>Techetium-fluconazole nanocapsules. *Int. J. Pharm.* v. 349, p. 152-160, 2008.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, v. 42 (8), p.1900-1905, 1998.

BARCHIESI, F.; DI FRANCESCO, L. F.; COMPAGNUCCI, P.; ARZENI, D.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G. *In-vitro* interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 41, p. 59–65, 1998.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Technol. Today*, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

BARRATT, G. M.; LEGRAND, P. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Current Opinion in Infect. Dis.*, v.18, n.6, p. 527-530, 2005.

BECK-SAGUE, C.; JARVIS, W. R. National nosocomial infections surveillance system. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. *J. of Infections Diseases*, v. 167, p. 1247- 1251, 1993.

BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. *Biomed. & Pharmacother.*, v.53, p. 193-206, 1999.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. 1993.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004

BRAMMER, K. W.; FARROW, P. R.; PAULKNER, J. K. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev. Infect. Dis.*, v. 12(3), p. 318-326, 1990.

BUISMAN, A. M.; VAN-ZWET, T. L.; LANGERMANS, J. A. M.; GEERTSMA, M. F.; LEENEN, P. J. M.; VAN-FURTH, R. Different effect of granulocyte colony-stimulating factor or bacterial infection on bone-marrow cells of cyclophosphamide-treated or irradiated mice. *Immunology*, v. 97, p. 601–610, 1999.

CACCIAPUOTI, A.; LOEBENBERG, D.; PARMEGIANI, R.; ANTONACCI, B.; NORRIS, C.; MOSS, E. L. JR.; MENZEL, F. JR.; YAROSH-TOMAINE, T.;

HARE, R. S.; MILLER, G. H. Comparison of SCH 39304, fluconazole, and ketoconazole for treatment of systemic infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 36(1), p. 64-67, 1992.

CALVO, P.; VILA JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, p. 530-536, 1996.

CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; CEDDIA, T.; AGATENSI, L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Dis.*, v. 156, p. 777-783, 1987.

CAUCHETIER, E.; PAUL, M.; RIVOLLET, D.; FESSI, H.; ASTIER, A.; DENIAU, M. Therapeutic evaluation of free and nanocapsule-encapsulated atovaquone in the treatment of murine visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 97(3), p. 259-268, 2003.

CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 130-180, 1998.

CHASTEIGNER, S.; CAVE, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.; PUISIEUX, F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: a feasibility study. *Drug Development Research*, v. 38, n. 2, p. 116 - 124, 1996a.

CHASTEIGNER, S.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.; PUISIEUX, F. Comparative study of the association of itraconazole with colloidal drug carriers. *Drug Development Research*, v. 38, n. 2, p. 125 - 133, 1996b.

CHAVES, G. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; LOPES, S. L. Model of experimental infection in healthy and immunosuppressed swiss albino mice (*Mus musculus*) using *Candida albicans* strains with different patterns of enzymatic activity. *Braz. J. Microbiol.*, v. 35, n.4, p. 324-329, 2004.

CHORNY, M. M.; FISHBEIN, I. M. D.; DANENBERG, H. D.; GOLOMB, G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *J. of Controlled Release*, v. 83, p. 389-400, 2002.

COLE, G. T.; HALAWA, A. A.; ANAISSE, E. J. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22 (2), p. 73-88, 1996.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUER, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. of Clin. Microbiology*, v. 44 (8), p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; PERFECT, J.; DINUBILE, M.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M.; HICKS, P.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *European J. Clin. Microb. Infect. Dis.*, v. 22, p. 470-474, 2004.

COLOMBO A. L. Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* e para sua abordagem terapêutica. *Tese para obtenção do título de livre-docência apresentada a Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.*

COMO, J. A.; DISMUKES, W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N. Engl. J. Med.*, v. 330, p. 263-71, 1994.

COUVREUR, P. Nanocapsule technology: a review. *Cri. Ver. Ther. Drug Carrier. syst.*, v. 19. n. 2, p. 99-134, 2002.

COUVREUR, P.; VAUTHIER C. Nanotechnology intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Research*, v. 23, n. 7, 2006.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; COSTA, T. D.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.*, v. 313, p. 198-205, 2006.

CUTLER, J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 45, p. 187-218, 1991.

DALENÇON, F.; AMJAUD, Y.; LAFFORGUE, C.; DEROURI, F.; FESSI, H. Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation studies. *Int. J. Pharm.*, v. 153, p. 127-130, 1997.

DE BERNARDIS, F.; MOLINARI, A.; BOCCANERA, M.; STRINGARO, A.; ROBERT, R.; SENET, J. M.; ARANCIA, G.; CASSONE, A. Modulation of cell surface-associated mannoprotein antigen expression in experimental candidal vaginitis. *Infect. Immun.* v. 62, p. 509-519, 1994.

DELIE, F.; BLANCO-PRÍETO, M. J. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules*, v.10, p. 65-80, 2005.

DE LOGU. A.; FADDA, A. M.; ANCHISI, C.; MACCIONI, A. M.; SINICO, C.; SCHIVO, M. L.; ALHAIQUE, F. Effects of in vitro activity of miconazole and ketoconazole in phospholipids formulations. *J. Antimicrob. Agents*, v. 40, n. 6, p. 889-893, 1997.

DENNING, D. W.; LEE, J. Y.; HOSTETLER, J. S.; PAPPAS, P.; KAUFFMAN, C. A.; DEWSNUP, D. H.; GALGANI, J. N.; GRAYBILL, J. R.; SUGAR, A. M.;

CATANZARO, A. Mycoses study group multicenter trial of oral itraconazole therapy for invasive aspergillosis. *Am. J. Med.*, v. 97(2), p. 135-445, 1994.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36(11), p. 1445-1457, 2003.

DUPON, B. Traitement des mycosis systemiques. *Press. Med.*, v. 16(24), 1987.

ESPUELAS, M. S.; LEGRAND, P. CAMPANERO, M. A.; APPEL, M.; CHÉRON, M.; GAMAZO, C.; BARRATT, G. Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. *J. of Antimicrob. Chemotherapy*, v. 52, p. 419-427, 2003.

FARIA, T. J.; CAMPOS, A. M.; SENNA, E. L. Preparation and characterization of poly(D,L-Lactide) (PLA) and poly(D,L-Lactide), poly(Ethylene Glycol) (PLA-PEG) nanocapsules containing antitumoral agent methotrexate. *Macromol. Symp.*, v. 229, n.1, p. 228-233, 2005.

Farmacopéia Portuguesa, VII edição, 2002.

FENG, S. S.; MU, L.; CHEN, B. H.; PACK, D. Polymeric nanospheres fabricated with natural emulsifiers for clinical administration of anticancer drug paclitaxel (Taxol®). *Materials Sci. Eng. C.*, v. 20, p. 85-92, 2002.

FERNÁNDEZ, C. A. M.; URÍA, J. C.; ARENAS, R. C.; PERURERA, J. M.; IRIBAR, W. T. Tratamiento de las micosis profundas. *Estado actual. Acta Medica*, v. 8(1), p. 81-85, 1998.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FICA, A. C. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas primeira parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev. Chil. Infectol.*, v. 21; p. 26-38, 2004.

FRESTA, M.; FONTANA, G.; BUCOLO, C.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G.; PUGLISI, G. Ocular tolerability and *in vivo* bioavailability of poly(ethylene glycol) (PEG)-coated polyethyl-2- cyanoacrylate nanosphere-encapsulated acyclovir. *J Pharm. Sci.*, 90(3), 288-97, 2001.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.*, v. 12(2), p. 308-329.

GARG, A.; KOKKOLI, E. Characterizing particulate drug-delivery carriers with atomic force microscopy. *Engineering in Medicine and Biology Magazine*, v. 24 n.1, p.87-95, 2005.

GILFILLAN, G. D.; SULLIVAN, D. J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D. C.; GOW, N. A. R. *Candida dubliniensis: phylogeny and putative virulence factors*. *Microbiology*, v. 144, p. 829-838, 1998.

GRANT, S. M.; CLISSOLD, S. P. Fluconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs*, v. 39, p. 887-916, 1990.

GREGORIADIS, G.; WILLS, E. J.; SWAIN, C. P.; TAVILL, A. S. Drug carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet*, v. 1, p. 1313-1316, 1974.

GUPTA, S. K.; DHINGRA, N.; VELPANDIAN, T.; JAISWAL, J. Efficacy of fluconazole and liposome-entrapped fluconazole for *Candida albicans*-induced experimental mycotic endophthalmitis in rabbit eyes. *Acta Ophthalmol Scand*, v. 78, p. 448-450, 2000.

GUPTA, S. K.; VELPANDIAN, T.; DHINGRA, N.; JAISWAL, J. Intravitreal pharmacokinetics of plain and liposome-entrapped fluconazole in rabbit eyes. *J. of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 16, p. 511-518, 2000.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly (D, L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: formulations and stability study. *Int. J. Pharm.*, v. 113, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S. S. ; FESSI, H. ; BARRATT, G.; PUISIEUX, F. ; DEVISSAGUET, J.-P. Poly(rac-lactide) nanocapsules containing diclofenac: Protection against muscular damage in rats. *J. of Biomaterials Sci. Polymer Edition*, v.11, n. 12, p. 1347-1355, 2000.

GUTERRES, S. S.; MULLER, C. R.; MICHALOWSKI, C. B.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *S.T.P. Pharma Sciences*, v. 11, n. 3, p. 229-233, 2001.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid Stat and Materials Science*, v.6, p. 319-327, 2002.

HEEL, R. C.; BROGDEN, R. N.; PAKES, G. E.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Miconazole: A preliminary review of its therapeutic efficacy in systemic fungal infections. *Drugs*, v. 19, p. 7-30, 1980.

HUMPHREY, M. J.; JEVONS, S.; TARBIT, M. H. Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, v. 28, p.648-653, 1985.

JACOBSON, M. A.; HANKS, D. K.; FERRELL, L. D. Fatal acute hepatic necrosis due to fluconazole. *American Journal of Medicine*, v. 96, n. 2, p.188–190, 1994.

KHAN, M. A.; KHAN, A.; OWAIS, M. Prophylactic use of liposomized tuftsin enhances the susceptibility of *Candida albicans* fluconazole in leukopenic mice. *Immunol. Med. Microbiol.*, v. 46, p. 63–69, 2006.

KNIGHT, T. E.; SHIKUMA, C. Y.; KNIGHT, J. Ketoconazole-induced fulminant hepatitis necessitating liver transplantation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 25, p. 398-400, 1991.

KSHIRSAGAR, N. A.; PANDYA, S. K.; KIRODIAN, B. G.; SANATH, S. Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic. *J. Postgrad. Méd.*, v. 51, n. 1, p. S5-S15, 2005.

KUTTIN, E. S.; MULLER, J.; DOUCHET, C.; VOGT, A. Immunological and pathological observations with *Candida albicans*-infected animals. *Sabouraudia*, v. 21, p. 185-194, 1983.

LANGEVIN, D. Micelles and microemulsions. *Annual Reviews of Physicochemistry*, v. 43, p. 341-369, 1992.

LARABI, M.; LEGRAND, P.; APPEL, M.; GIL, S.; LEPOIVRE M.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Reduction of NO synthase expression and tumor necrosis factor alpha production in macrophages by amphotericin B lipid carriers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 2, p. 553–562, 2001.

LARSON, J. L.; WALLACE, T. L.; TYL, R. W.; MARR, M. C.; MYERS, C. B.; COSSUM, P. A. The reproductive and developmental toxicity of the antifungal drug Nyotran<sup>®</sup> (liposomal nystatin) in rats and rabbits. *Toxicological Sciences*, v. 53, p. 421–429, 2000.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *S.T.P. Pharma Sci.*, v. 9, p. 411-418, 1999.

LEITE, E. A.; VILELA, J. M. C.; MOSQUEIRA, V. C. F.; ANDRADE, M. S. Polycaprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. *Microsc. Microanalysis*, v.11 (3), p. 48-51, 2005

LEITE, E. A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; GUIMARÃES, H. N.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sciences*, v. 80, p. 1327–1334, 2007.

LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R. C.; D'SOUSA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W.; WANG, P.; PAN, X.; WAUGH, M.; HEITMAN, J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64 (4), p. 746- 785, 2000.

LEVY, M. Y.; POLACHECK, I; BARENHOLZ, Y; BENITA, S. Efficacy evaluation of a novel submicron miconazole emulsion in a murine Cryptococcosis model. *Pharm. Res.*, v.12, p. 223-230, 1995.

LEWIS, J. H.; ZIMMERMAN, H. J.; BENSON, G. D.; ISHAK, K. G. Hepatic injury associated with ketoconazole therapy. Analysis of 33 cases. *Gastroenterology*, v. 86, p. 503-513, 1984.

LOPEZ-BERESTEIN, G. R.; MEHTA, R. L.; HOPFER, K.; MILLS, L.; KASI, K.; MEHTA, V.; FAINSTEIN, M.; LUNA, E. M.; HERSH, R. JULIANO, R. L. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposomal-encapsulated amphotericin B. *J. Infect. Dis.*, v. 147, p. 939-945, 1983.

LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J. L.; ALONSO, M. J.; Design of new formulations for topical ocular administration: Polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharm. Res.*, v.10, n. 1, p 80-87, 1993.

LOURIA, D. B.; BRAYTON, R. G.; FINKEL G. Studies on the pathogenesis of experimental *Candida albicans* infection in mice. *Sabouraudia*, v.2, p. 271-283, 1963.

LUNDBERG, B. Presentation of drug-carrier emulsions stabilized with phosphatidilcholine-surfactant mixtures. *J. Pharm. Sci*, v. 83, p. 72-75. , 1994.

MAERTENS, J.; VREBOS, M.; BOOGAERTS, M. Assessing risk factors for systemic fungal infections. *European J. of cancer care*, v. 10, p. 56-62, 2001.

MAESAKI, S. Drug delivery system of anti-fungal and parasitic agents. *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 433-440, 2002.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. *S. T. P. Pharm. Sci.*, v. 1, n.4, p. 221-241, 1991.

MALVERN Instruments. Zetasizer 1000/2000/3000 PCS Theory Manual n. 0152, Inglaterra, 1996. (Manual do equipamento).

MARCHAL-HEUSSLER, L.; MAICENT, P.; HOFFMAN, M.; SPITTLER, J.; COUVREUR, P.; Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto different isobutylcyanoacrylate nanoparticle preparation. *Int. J. Pharm.*, v.58, p. 115-122, 1990.

MARR, K. A.; WHITE, T. C.; VAN BURIK, J. A. H.; BOWDEN, R. A. Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in a patient undergoing marrow transplantation. *J. Clin. Infect. Dis.*, v. 25, p. 908-910, 1997.

MARTIN, V. M. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J. of Antimicrob. Chemotherapy*, v. 44, p. 429-437, 1999.

MARTINDALE: The complete drug reference<sup>©</sup>. The Pharmaceutical Press, 2005.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol.*, v. 32, n. 5, p. 449-60, 2006.

MBELA, T. K.; VERSCHUREN, E. The influence of additives on physical properties of emulsions prepared using lecithins and non-ionic surfactants. *Journal de pharmacie de Belgique*, v. 52, n. 3, p. 110-116, 1997.

McCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int. J. of Oral & Maxillofacial Surgery*, v. 25, p. 136-144, 1996.

MEHTA, R. T.; HOPFER, R. L.; GUNNER, L. A.; JULIANO, R. L.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Formulation, toxicity, and antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated nystatin as therapeutic agent for systemic candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 31, p. 1897-1900, 1987.

MEHTA, R. T.; HOPFER, R. L.; MCQUEEN, T.; JULIANO, R. L.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated nystatin for systemic fungal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 31, p. 1901-1903, 1987.

Mikamo, H.; Hua, Y. X.; Hayasaki, Y. Effect of fluconazole on viable cell count in experimental intraperitoneal *Candida* abscesses. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 6, 144-147, 2000.

MONTASSER, I.; FESSI, H.; COLEMAN, A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. *Eur. J. Pharm Biopharm*, v. 54, p. 281-284, 2002.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; BARRATT, G. Surface-modified and conventional nanocapsules as novel formulation for parenteral delivery of halofantrine. *J. Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, n. 9-10, p. 3193-3202, 2006.



MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, v. 22, p. 2967-2979, 2001a.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; MORGAT, J.; VERT, M.; MYSIAKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J.; BARRATT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharm. Res.*, v.18, n.10, p. 1411-1419, 2001b.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly (D, L -Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm.Sci.*, v. 89, n. 5, p.614-626, 2000.

MOSQUEIRA, V. C F.; LEITE E. A.; BARROS C. M.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Polymeric nanostructures for drug delivery: characterization by atomic force microscopy. *Microscopy & Microanalysis*, v. 1, n.3, p. 36-39, 2005.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; LEGRAND, P.; DEVISSAGUET, J-P.; BARRATT, G. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in Plasmodium berghei-infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 4, p. 1222-1228, 2004.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. wayne: NCCLS, p.133, 2002.

NEVES, B. R. A.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica*, v.44, n.290, p. 212-219, 1998.

O'SULLIVAN, J. M.; JENKINSON, H. F.; CANNON, R. D. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal. *Microbiology*, v.146, p. 41-48, 2000.

OTSUBO, T.; MAESAKI, S.; HOSSAIN, M.A.; YAMAMOTO, Y.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; SEKI, J.; TOMII, Y.; SONOKE, S.; KOHNO, S. *In vitro* and *in vivo* activities of NS-718, a new lipid nanosphere incorporating amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, n. 3, p. 471-475, 1999.

PANDEY, R.; AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Nano-encapsulation of azoles antifungals: potential applications to improve oral drug delivery. *Int. J. of Pharmaceutics*, v. 301, p. 268-276, 2005.

PANIZO, M. M.; REVIÁKINA, V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, v. 21, p. 1-13, 2001.

PANKERD, R. J.; STELLA, V. J. The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration. *J. Parenter Sci. Technol.*, v. 44(3), p. 139-149, 1990.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; PERFECT, J. Alopecia associated with fluconazole therapy. *Ann. Intern. Med.*, v. 123, p. 354-357, 1995.

PARK, J.; LEE, H. Specific immobilization of nanospheres on template fabricated by using atomic force microscopy lithography. *Colloids and surfaces A: Physic. Eng. Aspects*, v. 257-258, p. 133-135, 2005.

PATHAK, A.; PIEN, F. D.; CARVALHO, L. Amphotericin B use in a community hospital, with special emphasis on side effects. *Clin. Infect. Dis.*, v. 26(2), p. 334, 1998.

PEREIRA, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. M.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDESD, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with <sup>99m</sup>Techneium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *Eur. j. pharm. sciences*, 2007.

PEREIRA, M. A. Nanocápsulas: Preparação, caracterização e marcação com <sup>99m</sup>tecnécio-HMPA para estudos de biodistribuição em modelo experimental de inflamação. *Dissertação de mestrado, 2006. Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte – MG.*

PERFECT, J. R.; COX, G. M.; DODGE, R. K. *In vitro* and *in vivo* efficacies of the azole SCH 56592 against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, n. 40, p.1910-1913. 1996.

PERFECT, J. R.; GRANGER, D. L.; DURAK, D. T.; Effects of antifungal agents and gamma interferon on macrophage cytotoxicity for fungi and tumor cells. *J. Infect. Dis.*, v.156, n.2, p. 316-323, 1987.

PFALLER, M. A. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin. Infect. Dis.*, v. 19, n. 1, p. S8-S13, 1994.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V. - For the sentry participant group (Europe). International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the european sentry program: Species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, n. 35, p.19-25. 1999a.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J. Antifungal activity of posaconazole, ravuconazole e voriconazole compared to that of itraconazole tested against 213 clinical isolates of *Aspergillus spp.* and other filamentous fungi: report from the sentry antimicrobial surveillance program, 2000. In:

ABSTR 41ST INTERSCI CONF ANTIMICROB AGENTS AND CHEMOTER., n. J-813, p.379, 2001.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; EDMOND, M. B.; WENZEL, R. P. National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, v. 31, p. 327-332, 1998.

PONT, A.; WILLIAMS, P.L.; LOOSE, D. S. Ketoconazole blocks adrenal steroid synthesis. *Ann. Intern. Med.*, v. 97, p. 370-372, 1982.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J-P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. In: *Polymeric Biomaterials*; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York, cap. 16. 1994.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*, v. 15(7), p. 1056-1062, 1998a.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 24, p. 1113-1128, 1998b.

REEF, S. E.; MEYER, K. H. Opportunistic candidal infections in patients infected with human immunodeficiency virus: prevention issues and priorities. *Clin. Infect. Dis.*, v. 21 (1), p. S99-S102, 1995.

REYES, G. H.; LONG, L. A.; FLORENTINO, F.; GHANNOUM, M. A. *Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, abstr., J-1676, p. 385, 2000.

RESENDE, J. C. P.; DE RESENDE, M. A.; SALIBA, J. L. Prevalence of *Candida spp.* in hospitalized patients and their risk factors. *Mycoses*, v. 45(8), p. 306-312, 2002.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas às infecções nosocomiais. *NewsLab.*, v.12, n.64, p. 106-128, 2004.

RODRÍGUEZ-SILVA, H. Actualización en el uso de antimicrobianos. *Rev Acta Med*, v. 4(2), 1990.

ROGERS, T. J.; BALISH, E. Immunity to experimental renal candidiasis in rats. *Infection and Immunity*, v.19, n. 2, p. 737-740, 1978.

RÜBE, A.; HAUSE, G.; MÄDER, K.; KOHLBRECHER, J. Core-shell structure of miglyol/poly(d,l-lactide)/poloxamer nanocapsules studied by small-angle neutron scattering. *J. Controlled Release*, v. 107, n. 2, p. 244-252, 2005.

RUBIN, R. H. Fungal and bacterial infections in the immunocompromised host. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 12, p. 42-48, 1993.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLEY, M. A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur. J. Pharm. Sciences*, v. 25, p. 81-89, 2005 .

RYDER, N. S.; WAGNER, S.; LEITNER, I. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 42, n. 5, p. 1057-1061, 1998.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; SEILLER, M. An *in vitro* release kinetic examination and comparative evaluation between submicron emulsion and polylactic acid nanocapsules of clofibrade. *J. Microencapsulation*, v. 12, p. 195-205, 1995.

SANTOS-MAGALHAES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. ; CAETANO, M. N. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int.J. of Pharm.*, v. 208 (1-2), p. 71-80, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITA, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.

SECHLER, J. M. G.; HANSAL, S. A.; MORRIS, D. I.; McFARLAND, H. I.; ROSENBER, A. S. Antigen presentation determines the fate of the T memory response *in vivo* after sublethal gamma-irradiation. *The Journal of Immunology*, v. 163, p. 4701-4706, 1999.

SHADKCHAN, Y.; SEGAL, E. Treatment of experimental candidosis with amphotericin B-intralipid admixtures in immunocompromised mice. *J. of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, p. 245-251, 2001.

SHALIT, I.; HOREV-AZARIA, L.; FABIAN, I.; BLAU, H.; KARIV, N.; SHECHTMAN, I.; ALTERAZ, H.; KLETTER, Y. Immunomodulatory and protective effects of moxifloxacin against *Candida albicans*-induced bronchopneumonia in mice injected with cyclophosphamide. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, v. 46, n.8, p. 2442-2449, 2002

SHEKUNOV, B. Y.; CHATTOPADHYAY, P.; TONG, H. H. Y.; CHOW, A. H. L. Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications. *Pharmaceutical Research*, v. 24, n. 2, p. 203-227, 2007.

SILVA, V.; CRISTINA, M. D. J.; NALDY-FEBRÉ, Y. Red de diagnóstico en micología médica. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev. Chil. Infectol.*, v.19 (supp.2), p. 149-156, 2002.

SINGH, N. Trends in the Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections: Predisposing Factors and the Impact of Antimicrobial Use Practices. *Clin. Infect. Dis.*, v. 33, p.1692–1696, 2001.

SIX, K.; VERRECK, G.; PEETERS, J.; AUGUSTIJNS P., KINGET R., VAN DEN MOOTER G. *Int. J. Pharm.* v. 213, p. 163-73, 2001.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

SPINDLER, K. R.; FANG, L.; MOORE, M. L.; HIRSCH, G. N.; BROWN, C. C.; KAJON, A. SJL/J mice are highly susceptible to infection by mouse adenovirus type 1. *J. of Virology*, v. 75, n. 24, p. 12039–12046, 2001.

STEVENS, D. A. Miconazole in the treatment of coccidioidomycosis. *Drugs*, v. 26, p. 347-354, 1983.

STEVENS, D.A. Miconazole in the treatment of systemic fungal infections. *Am. Rev. Resp. Dis.* v. 116, p. 801-806, 1997.

SWERDLOFF, J. N.; FILLER, S. G.; EDWARDS, J. E. JR. Severe candidal infections in neutropenic patients. *Clin. Infect. Dis.*, v. 17, p. 457-467, 1993.

TAVARES, W. Azóis antifúngicos. In: Tavares W, editor. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. São Paulo: Athene, p. 869-86, 2001.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Submicrom cationic emulsions as a new delivery system for oligonucleotides. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 16, p. 30-36, 1999.

TORCHILIN, V. P. Drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 11, suppl.2, p. 81–91, 2000.

TROWELL, O. A. The sensitivity of lymphocytes to ionizing radiation. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 64, n.4, p.687-704, 1952.

VELPANDIAN, T.; NARAYANAN, K.; NAG, T. C.; RAVI, A. K.; GUPTA, S. K. Retinal toxicity of intravitreally injected plain and liposome formulation of Fluconazole in rabbit eye. *Indian journal of ophthalmology*, v. 54, p. 237-240, 2006.

VAN GOOL, R. The cost of treating systemic fungal infections. *Drugs*, v. 61(1), p. 49-56, 2001.

VASQUEZ, J. A. Options for the management of mucosal candidiasis in patients with AIDS and HIV infections. *Pharmacotherapy*, v. 19, n. 1, p. 76-87, 1999.

VASQUEZ, J. A.; LYNCH, M.; BOIKOV, D. *In vitro* activity of a new pneumocandin antifungal, L-743,872, against azole susceptible and resistant *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, n. 41, p.1612-1614, 1997.

VISCOLI, C.; CASTAGNOLA, E. Emerging fungal pathogens, drug resistance and role of lipid formulations of amphotericin B in the treatment of fungal infections in cancer patients: a review. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 3, n. 2, p.109-118, 1999.

ZILI, Z.; SOUAD, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, p. 261-267, 2005.

WENZEL, R. P. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, p. 1531-1534, 1995.

**ANEXOS**

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A ESSA DISSERTAÇÃO

### ARTIGOS COMPLETOS

SPÓSITO, P. A.; ANDRADE, M. S.; VILELA, J. M. C.; MOSQUEIRA, V. C. F. Formulation study of fluconazole nanoemulsions and PCL nanocapsules: physico-chemical and morphological characterization, stability and release properties. (Submetido)

SPÓSITO, P. A.; VILELA, J. M. C.; VIRGENS, A. P.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Formulation study nanoemulsions and PCL nanocapsules of miconazole and ketoconazole: physico-chemical and morphological characterization. (Em preparação).

SPÓSITO, P. A.; CARNEIRO, C. M.; TEIXEIRA, L. F. M.; CALIGIORNE, R.; CHIODI, A.; FERREIRA, T. C.; MOSQUEIRA, V. C. F. Efficacy of fluconazole polymeric carriers against systemic candidiasis in immunocompromised mice (Em preparação).

### RESUMOS APRESENTADOS EM EVENTOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

SPÓSITO P. A.; TEIXEIRA, L. F. M.; CHIODI, A.; MOSQUEIRA, V. C. F. Fluconazole-nanocapsules efficacy against disseminated *Candida albicans* in immunocompromised mice. 6° Congresso Mundial de Farmácia, Biofarmácia e Tecnologia Farmacêutica. Barcelona – Espanha, 2008.

SPÓSITO, P. A.; TEIXEIRA, L. F. M.; MOSQUEIRA, V. C. F.: Fluconazole-nanocapsules efficacy against disseminated *Candida albicans* in leukopenic mice. CIFARP- 6° Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto – SP, 2007.

SPÓSITO, P. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.: Development of nanoemulsions and nanocapsules containing fluconazole. CIFARP- 6° Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto – SP, 2007.

SPÓSITO, P. A.; DAS VIRGENS, A. P.; BRITO, E. O. D.; RESENDE, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; TEIXEIRA, L. F. M.: Formulações nanoestruturadas contendo miconazol: atividade *in vitro* em isolados de *candida spp.* IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004. v.4. p. 121.



SPÓSITO, P. A.; DAS VIRGENS, A. P.; LYON, J. P.; RESENDE, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; TEIXEIRA, L. F. M.: Nanoestruturas contendo cetoconazol e fluconazol: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da atividade *in vitro* em isolados de *candida spp.* IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004. v.4. p. 86.

SPÓSITO, P. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; TEIXEIRA, L. F. M.: Comparative biological activity *in vitro* of azole derivative nanostructures formulations against *Candida spp.* isolates. IV Reunião da Rede de Nanobiotecnologia, 2005, Campinas - SP, 2005.

SPÓSITO, P. A.; VILELA, J. M.C.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanoemulsions and nanocapsules containing fluconazole: morphological characterization by atomic force microscopy. II Simpósio Mineiro de Ciências dos Materiais, Ouro Preto-MG, 2007.

SPÓSITO, P. A.; DAS VIRGENS, A. P.; MOSQUEIRA, V. C. F.; TEIXEIRA, L. F. M.: Desenvolvimento e caracterização de vetores coloidais nanométricos contendo derivados azólicos. XII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Ouro Preto, 2004, Ouro Preto. Anais do XII SIC UFOP, 2004. v. 12.

SPÓSITO, P. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; TEIXEIRA, L. F. M.: Caracterização físico – química e avaliação *in vitro* de vetores nanométricos contendo antifúngicos azólicos. XIII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Ouro Preto, 2005, Ouro Preto. Anais do XIII SIC UFOP, 2005. v. 13.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)