UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS DE FLUCONAZOL CONTRA *Candida* spp.

Autora: Eliana Camargo de Sousa
Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
Co-Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Biologia Molecular.

Ouro Preto, 10 de maio de 2007.

S725a **Sousa, Eliana Camargo de.**

Avaliação da atividade in vitro de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol contra *Candida* spp [manuscrito] / Eliana Camargo de Sousa. - 2007.

v, 140f.: il., color; graf.; tabs.

Orientadora: Profª Drª Vanessa Carla Furtado Mosqueira.
Co-orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia molecular.

1. *Candida albicans* - Teses. 2. Nanotecnologia - Teses. 3. Nanoestrutura - Teses. 4. Atividade antifúngica - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.934

Catalogação: sisbin@sisbin.ufop.br

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanobiotecnologia da Escola de Farmácia e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Agradecimentos:

- Especialmente ao Adilson, Raphael, Thiago e Eponina, pela compreensão nas ausências e pelo estímulo durante esta etapa;
- À Profa.Vanessa e ao Prof. Rogelio, meus orientadores;
- Aos alunos que já tive;
- Aos Professores do NUPEB, especialmente aos Professores Ieso M. Castro , Luís Carlos G. Affonso, Luís Fernando M. Teixeira, Simone Resende, Maurício Coutrim e Marcelo Silva pela disponibilização de materiais, equipamentos e conhecimentos;
- À minha colega Zezé, muito sábia e sempre disposta a ajudar;
- Às minhas colegas Luísa, colegas do LDGN Pollyanna e Carina, e colegas do LIP
- À Luciana, Rosilene, Aline, Viviane, Amanda, e Felipe, que com seu apoio me permitiram dedicar mais tempo a este trabalho;
- À Cida;
- Enfim, agradeço a todos que colaboraram neste trabalho.

O nível a que chegaram as especializações nas várias áreas do conhecimento revela ser imprescindível o trabalho pluri, trans e interdisciplinar.

(vários autores)

RESUMO

Com o número crescente de pacientes sob imunossupressão induzida por doenças ou fármacos, as infecções fúngicas disseminadas estão se tornando problemas sérios de saúde, principalmente em ambiente hospitalar, e novas abordagens para a terapia antifúngica precisam ser investigadas. Grande parte das infecções disseminadas é provocada pela espécie *Candida albicans* sendo o fluconazol o fármaco de escolha, mas o surgimento de fenômenos de resistência fúngica tem sido relatado. Com o intuito de investigar o efeito do fluconazol associado a nanoestruturas sobre espécies de *Candida*, neste trabalho foram desenvolvidas nanoemulsões e nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo fluconazol. Análises morfológicas e físico-químicas das nanoestruturas foram realizadas revelando formato esférico e tamanho médio variando de 136,5 a 180,2 nm para as nanoemulsões (NE) e de 203,6 a 213,6 nm para as nanocápsulas (NC). Ambas as dispersões apresentaram características homogêneas e demonstraram estruturas monodispersas. O percentual de encapsulação do fluconazol nas NE e NC foi de 49,2 ± 0,65 e 45,6 ± 0,52, respectivamente. Procedimentos de purificação por diálise direta foram efetuados e as nanoestruturas foram testadas contra suspensões celulares de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* e seus efeitos avaliados por turbidimetria, contagem de células, teste de viabilidade celular por colorimetria com o reativo Brometo de 3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) e por quantificação de ergosterol utilizando fármaco livre, nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol submetidas ou não aos procedimentos de purificação. Os resultados demonstraram diferentes efeitos ocasionados pela presença das nanoestruturas contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* quando comparados aos efeitos do fármaco livre. As nanoestruturas purificadas por diálise apresentaram um efeito com perfil de dose dependência frente à inibição do crescimento de *Candida*. Os resultados variaram segundo os métodos e as análises estatísticas não demonstraram correlação entre as diferentes metodologias. As duas espécies de *Candida* parecem se comportar de forma diferente quando expostas às nanoestruturas de fluconazol ou à presença de nanoestruturas livres de fármaco. Entretanto, muitos estudos ainda são necessários para

se evidenciar o efeito das nanopartículas sobre o fenômeno de resistência das espécies de Candida testadas frente às nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol.

ABSTRACT

Nosocomial fungal infections are becoming serious health problems due to the growing number of patients under natural or induced immunossupression and there is a need for new approaches on antifungal therapy. The great part of disseminated fungal infections is related to *Candida* spp. and in many cases the drug of choice is fluconazole, which broad use has been related to fungal resistance emergence. Little is known about the activity of antifungal drugs associated to drug delivery systems in resistance phenomena. In this work we developed fluconazole nanoemulsions and poly-ε-caprolacton nanocapsules by polymer interfacial deposition followed by solvent displacement in order to investigate the effect of fluconazole associated to nanostructures against *Candida spp*. The nanostructures were tested against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* cells suspensions and their effect was evaluated by turbidimetric, colorimetric and ergosterol quantification assays. Morphological and physical-chemical analysis of the nanostructures revealed spherical shape and mean size varying from 136,5 to 180,2 nm for nanoemulsions (NE) and from 203,6 to 213,6 nm for nanocapsules (NC). Both dispersions have presented homogeneous and monodisperse. The drug loading for fluconazole in NE and NC was 49,2 ± 0,65 and 45,6 ± 0,52, respectively. The susceptibility assays were carried out with the free drug, the nanoemulsions and the nanocapsules underwent or not to dialysis purification. The results showed different effects caused by the presence of nanostructures against *C. albicans* and *C. parapsilosis* when compared to the free drug. The dialyzed nanostructures showed results of dose dependent profile in *Candida* growing inhibition. Comparisons between the results obtained using the different methods were made and they revealed variations. The two species seem to behave differently when exposed to fluconazole-loaded or unloaded nanostructures. Further studies are necessary in order to elucidate the effect of nanostructures in *Candida* fluconazole-resistance phenomena.

ÍNDICE ANALÍTICO

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO..... 1

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Infecções Fúngicas por *Candida* spp. 5

II.2. O Ergosterol 6

II.3. Terapia Antifúngica 7

II.4. Avaliação as Susceptibilidade de Leveduras a Antifúngicos 10

II.5. Mecanismos de Resistência a Antifúngicos 13

II.6. Vetorização de Fármacos 15

II.7. Vetorização de drogas através do uso de sistemas nanométricos 23

II.7.1. Associação de derivados azólicos a sistemas nanoestruturados 25

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivos Gerais 29

III.2. Objetivos Específicos 29

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Preparo e Caracterização das Nanoestruturas 31

IV.1.1. Preparo das Nanocápsulas e Nanoemulsões 31

IV.1.2. Caracterização físico-química das nanoestruturas 31

IV.1.2.1. Determinação do percentual de encapsulação do fluconazol nas nanoestruturas 32

IV.1.2.1.1. Determinação do fármaco total 33

IV.1.2.1.2. Determinação do fármaco não encapsulado 33

IV.1.2.1.3. Determinação da eficiência da encapsulação 33

IV.1.2.2 Análise do tamanho e do potencial zeta 34

IV. 1. 3. Análise morfológica das nanocápsulas 35

IV. 1.4. Purificação de Nanoestruturas para retirada do fluconazol não encapsulado 36

IV. 1. 4.1. Purificação por ultrafiltração..... 36

IV. 1.4.2. Purificação por diálise..... 37
IV. 1.5. Estudo de Estabilidade da Nanoemulsões e Nanocápsulas 38
IV.2. Preparo de Meios de Culturas e Cultivo de *Candida* spp. 39
IV.2.1. Meios de cultura 39
IV. 2.1.1- Meio RPMI 1640 39
IV. 2.1.2- Meio YPD 2% 39
IV. 2.1.3- Meio Sabouraud-2% Dextrose líquido (SBD) e Meio Sabouraud-2% Dextrose Agar (SDBA) 40
IV.2.2. Culturas de *Candida* spp. 40
IV.2.3. Preparo das células para os ensaios..... 40
IV.2.4. Curvas de Crescimento 41
IV.2.5. Avaliação da susceptibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos 41
IV.2.5.1. Preparo das soluções de antifúngicos 41
IV.2.5.2. Avaliação da susceptibilidade por turbidimetria a 600 nm 42
IV.2.5.2.1. Avaliação da susceptibilidade em microdiluição 43
IV.2.5.2.2. Avaliação da susceptibilidade em macrodiluição 44
IV.2.5.3. Determinação da viabilidade celular por colorimetria com MTT..... 45
IV.2.5.4. Quantificação de ergosterol em culturas de *Candida* spp..... 46
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO
Parte 1. Preparo e caracterização das Nanoestruturas 48
V.1. Preparo das Nanoestruturas 49
V..2. Caracterização físico-química de nanoemulsões e nanocápsulas de poli-ε-caprolactona brancas ou contendo fluconazol associado 50
V. 2.1. Distribuição do Tamanho por Espectroscopia de Correlação de Fótons e Determinação do Potencial Zeta 50
V.2.2. Determinação da Porcentagem de encapsulação das Nanoemulsões e nanocápsulas de Fluconazol 52
V.2.3. Purificação de Nanoemulsões e Nanocápsulas de fluconazol 53
V.2.3.1. Otimização do processo de Purificação de Nanoemulsões e Nanocápsulas de fluconazol por Ultrafiltração/Centrifugação 54

V.2.3.2. Otimização da Purificação de Nanoemulsões e Nanocápsulas por Diálise Direta 56
V.2.4. Avaliação Morfológica das nanoemulsões e nanocápsulas 59
V.2.5. Estudo de estabilidade de nanoemulsões e nanocápsulas 63
Parte 2. Estudos de susceptibilidade de *Cândida* spp. em microdiluição
V.3. Estudos de susceptibilidade de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* ao fluconazol em microdiluição 68
V.3.1. Estudos de susceptibilidade ao fluconazol livre 63
V.3.2. Influência da turbidez das Nanocápsulas e nanoemulsões sobre a precisão do método de microdiluição 72
V.3.3. Estudo da susceptibilidade de *Candida* às nanoemulsões e nanocápsulas.em microdiluição..... 76
Parte 3. Estudos de susceptibilidade de *Candida albicans* em macrodiluição
V.4. Determinação da susceptibilidade de *Candida albicans* ao fluconazol livre em macrodiluição 91
V.4.1. Determinação da susceptibilidade às nanoemulsões de fluconazol em macrodiluição 93
Parte 4. Estudos de viabilidade celular por reação colorimétrica com MTT...
V.5. Determinação da viabilidade celular por colorimetria com MTT 98
Parte 5. Quantificação de ergosterol em culturas de *Cândida* spp.
V.6. Quantificação de ergosterol em culturas de *Candida* spp..... 111
V.6.1. Avaliação da influência de nanocápsulas e nanoemulsões na quantificação de ergosterol em culturas de *Candida* spp. 112
V.6.2. Quantificação de ergosterol em culturas de *C. albicans* submetidas a formulações nanoestruturadas contendo ou não fluconazol associado 113
Parte 6. Comparação entre métodos .....
V.7. Comparação entre métodos 119
VI. CONCLUSÕES 122
VII. ANEXOS 126
VIII. BIBLIOGRAFIA 130

LISTA DE FIGURAS

Número	Descrição	Página
Figura 1	Desenho esquemático da Biossíntese de Ergosterol mostrando o alvo do fármaco fluconazol	**7**
Figura 2	Fórmula Estrutural do Fluconazol	**8**
Figura 3	Via de biossíntese do ergosterol e fármacos antifúngicos	**9**
Figura 4	Desenho esquemático da Produção de Nanocápsulas e Nanoemulsões pelo método de deslocamento de solvente	**17**
Figura 5	Desenho esquemático da nanocápsula	**18**
Figura 6	Desenho esquemático da nanoemulsão	**19**
Figura 7	Desenho esquemático e Princípio de Funcionamento do Microscópio de Força Atômica	**22**
Figura 8	Dispersões de Nanoestruturas contendo fluconazol associado	**49**
Figura 9	Curva de Calibração do fluconazol	**52**
Figura 10	Imagens de nanoemulsões obtidas por microscopia de força atômica	**60**
Figura 11	Imagens de Nanocápsulas obtidas por microscopia de força atômica	**61**
Figura 12	Avaliação do Crescimento de *C. parapsilosis* ATCC 22019 em RPMI e YPD2%	**68**
Figura 13	Avaliação do Crescimento de *C. albicans* ATCC 18804 em RPMI e YPD2%	**68**
Figura 14	Teste de susceptibilidade de *C.parapsilosis* ATCC 22019 ao fluconazol livre nas concentrações 2,4,8,16,32,64 μg/mL pelo método de microdiluição em meio RPMI e YPD2%	**70**
Figura 15	Teste de susceptibilidade de *C. albicans* ATCC 18804 ao fluconazol livre nas concentrações 2,4,8,16,32,64 μg/mL pelo método de microdiluição em meio RPMI e YPD2%	**71**
Figura 16	Avaliação da turbidez dos meios de cultura em função das concentrações de nanoemulsões	**72**
Figura 17	Avaliação da turbidez dos meios de cultura em função das concentrações de nanocápsulas	**74**
Figura 18	Percentual de crescimento de *C. parapsilosis* em YPD2% em função da concentração de nanocápsulas de fluconazol	**77**
Figura 19	Percentual de crescimento de *C. parapsilosis* em YPD2% em função da concentração de nanoemulsões de fluconazol	**79**
Figura 20	Percentual de crescimento de *C. parapsilosis* em YPD2% em função da concentração de nanocápsulas ou nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise	**82**

Figura 21	Verificação da susceptibilidade de *C. parapsilosis* por contagem de células em Câmara de Neubauer	**82**
Figura 22	Percentual de crescimento de *C. albicans* em YPD2% em função da concentração de nanoemulsões de fluconazol	**84**
Figura 23	Percentual de crescimento de *C. albicans* em YPD2% em função da concentração de nanocápsulas de fluconazol	**86**
Figura 24	Percentual de crescimento de *C. albicans* em YPD2% em função da concentração de nanocápsulas ou nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise	**87**
Figura 25	Verificação da susceptibilidade de *C. albicans* às formas nanoestruturadas por contagem de células em Câmara de Neubauer	**88**
Figura 26	Curva de Crescimento Padrão de *Candida albicans* ATCC 18804 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em YPD 2% em macrodiluição	**91**
Figura 27	Avaliação da susceptibilidade de *C.albicans* ATCC 18804 ao Fluconazol em YPD2% por turbidimetria	**92**
Figura 28	Determinação da Curva de calibração em função da concentração de nanoemulsões e nanocápsulas em YPD2% por turbidimetria a 600nm	**93**
Figura 29	Influência das Nanoemulsões de fluconazol no Percentual de Crescimento de *C. albicans* em YPD2%	**94**
Figura 30	Influência das Nanocápsulas e Nanoemulsões de fluconazol no Percentual de Crescimento de *C. albicans* em YPD2% após incubação por 48 horas	**95**
Figura 31	Influência das Nanoestruturas por Contagem em Câmara de Neubauer	**96**
Figura 32	Avaliação da densidade óptica resultante da reação com MTT em suspensões celulares de *C. albicans* e *C. parapsilosis.*	**99**
Figura 33	Avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* em presença de nanoemulsões ou nanocápsulas de fluconazol ou nanoemulsões determinada por colorimetria com MTT	**102**
Figura 34	Avaliação da viabilidade celular de *C. albicans* em presença de nanocápsulas livres de fármaco ou nanoemulsões livres de fármaco determinada por colorimetria com MTT	**104**
Figura 35	Avaliação da viabilidade celular de *C. parapsilosis* em presença de nanoemulsões ou nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise determinada por colorimetria com MTT	**106**
Figura 36	Avaliação da viabilidade celular de *C. parapsilosis* em presença de nanocápsulas livres de fármaco ou nanoemulsões livres de fármaco determinada por colorimetria com MTT	**107**
Figura 37	Curva Padrão de Ergosterol obtida por espectrofotometria em λ = 240 - 300 nm	**111**
Figura 38	Avaliação da influência de nanocápsulas e nanoemulsões na verificação da concentração de ergosterol por espectrofotometria em λ = 240 - 300 nm.	**112**

Figura 39	Verificação da presença de ergosterol em extratos celulares de *C. albicans* tratados com nanocápsulas livres de fármaco, nanocápsulas contendo fluconazol associado ou nanocápsulas contendo fluconazol associado purificadas por diálise	**113**
Figura 40	Avaliação do efeito de nanoemulsões de fluconazol e nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise sobre a quantidade de ergosterol em extratos celulares de *C. albicans* comparados ao fluconazol livre	**114**
Figura 41	Avaliação do efeito de nanoemulsões de fluconazol ou nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise sobre a quantidade de ergosterol em extratos celulares de *C. parapsilosis*	**116**
Figura 42	Análise de correlação entre os resultados obtidos frente aos diferentes métodos contra *C. parapsilosis*	**120**
Figura 43	Análise de correlação entre os resultados obtidos frente aos diferentes métodos contra *C. albicans*	**121**

LISTA DE TABELAS

Número	Descrição	Página
Tabela 1	Caracterização de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta de nanoemulsões e nanocápsulas	**50**
Tabela 2	Determinação do Percentual de Encapsulação e Eficiência de Encapsulação das nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol	**53**
Tabela 3	Avaliação da Purificação de Nanoemulsões e Nanocápsulas de Fluconazol por Ultrafiltração	**55**
Tabela 4	Determinação da Concentração de Fluconazol em Nanoemulsões e Nanocápsulas Purificadas por Ultrafiltração/Centrifugação	**55**
Tabela 5	Avaliação da Purificação de Nanoemulsões e Nanocápsulas de Fluconazol por Diálise Direta	**56**
Tabela 6	Determinação da Concentração de Fluconazol em Nanoemulsões e Nanocápsulas Purificadas por Diálise Direta	**57**
Tabela 7	Resultados da Análise de tamanho de nanoemulsões por Microscopia de Força Atômica	**62**
Tabela 8	Avaliação de pH e estabilidade microbiológica de nanocápsulas e nanoemulsões em função do tempo de armazenamento	**64**
Tabela 9	Comparação das Características Físico-Químicas de Nanocápsulas e Nanoemulsões frente ao armazenamento	**65**
Tabela 10	Verificação da influência das nanoestruturas na intensidade colorimétrica da reação com MTT	**100**
Tabela 11	Comparação da influência do fluconazol livre (FLU) e das formas nanoestruturadas na viabilidade celular de *C. albicans* ATCC 18804	**104**
Tabela 12	Comparação da influência do fluconazol livre (FLU) e das formas nanoestruturadas na viabilidade celular de *C. parapsilosis* ATCC 22019	**108**
Tabela 13	Determinação do peso dos pellets de células de *C. albicans* e *C. parapsilosis* frente à ação do fluconazol livre ou de formas nanoestruturadas	**115**
Tabela 14	Análise estatística da diferença entre as médias para as formulações utilizadas contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*	**117**
Tabela 15	Comparação entre resultados obtidos nos experimentos com avaliação turbidimétrica, por colorimetria com MTT e por quantificação do ergosterol (MQE) contra *C. albicans*	**119**
Tabela 16	Comparação entre resultados obtidos nos experimentos com avaliação turbidimétrica, por colorimetria com MTT e por quantificação do ergosterol (MQE) contra *C. parapsilosis*	**120**

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM_{50} – Concentração Inibitória Mínima que inibe 50% do crescimento

CIM_{80} – Concentração Inibitória Mínima que inibe 80% do crescimento

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade óptica

FLU - Fluconazol

MFA – Microscopia de Força Atômica

MOPS – Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

MP – Membrana plasmática

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NC – Nanocápsulas sem fármaco associado

NCF – Nanocápsulas contendo fluconazol associado.

NCFF - Nanocápsulas contendo fluconazol associado purificadas por ultrafiltração

NCFD – Nanocápsulas contendo fluconazol associado purificadas por diálise

NE – Nanoemulsões sem fármaco associado

NEF – Nanoemulsões contendo fluconazol associado

NEFF - Nanoemulsões contendo fluconazol associado purificadas por ultrafiltração

NEFD – Nanoemulsões contendo fluconazol associado purificadas por diálise

PCR – Reação de polimerização em cadeia

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio de crescimento

RTPCR – Reação de Polimerização em cadeia em tempo real

SDB – Meio Sabouraud-2% Dextrose líquido

SDBA -- Meio Sabouraud-2% Dextrose Agar

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

YPD2% – Meio YP contendo 2% de glicose

INTRODUÇÃO

Nas três últimas décadas a incidência de infecções fúngicas tem aumentado dramaticamente. A necessidade de terapias antifúngicas mais efetivas têm sido maior desde a pandemia de SIDA e das patologias a ela relacionadas, as quais estão quase sempre associadas a infecções fúngicas oportunísticas. Estudos sobre prevalência e susceptibilidade de *Candida* spp. e a epidemiologia das infecções por estes agentes têm sido realizados em vários países, incluindo o Brasil (Sugizaki, 1998; Colombo, 2003; Galle, 2004). Com a expansão da aplicação de terapias imunossupressivas as micoses estão se tornando problemas sérios e novas abordagens para a terapia antifúngica têm sido investigadas (Georgiev, 2000).

Os fármacos de primeira escolha na terapia de infecções fúngicas têm sido os polienos e os derivados azólicos, tendo como alvo a membrana celular dos fungos. Os polienos ligam-se a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais, resultando em aumento na permeabilidade da membrana, extravasamento de diversas pequenas moléculas e levando à morte celular. A anfotericina B é um antibiótico fungicida de largo espectro e potente, mas seu uso é associado a efeitos adversos significantes, como nefrotoxicidade e febre com calafrios, como reação aguda à infusão intravenosa, já que a farmacocinética deste fármaco não permite a administração oral (Goodman; Gilman, 1996). Novas formulações da anfotericina B, na forma de lipossomas e de dispersão coloidal, produzem menos efeitos colaterais, como resultado da redistribuição do fármaco nos tecidos e da seletividade de liberação (Bergold & Georgiadis, 2004).

Os derivados azólicos são compostos totalmente sintéticos e exercem seu efeito através da via de biossíntese de ergosterol. Qualquer desajuste na síntese dos esteróis de membrana levará a uma diminuição no crescimento do fungo (Georgiev, 2000). Os derivados azólicos têm sido amplamente utilizados na terapêutica e seu modo de ação tem sido invariavelmente por inibição da enzima C-14-α-desmetilase, um sistema enzimático microssomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14-α-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 (GOODMAN; GILMAN, 1996; Bergold & Georgiadis, 2004).

Dentre os derivados azólicos utilizados na terapêutica, o fluconazol é um dos agentes mais efetivos para o tratamento de candidíase (Andriole, 1999). O uso repetido de fluconazol em pacientes HIV positivos com infecção mucosa por fungos no período precedente à introdução de terapia anti-retroviral de alta atividade tem favorecido a aquisição de resistência em vários fungos patogênicos, na grande maioria espécies de *Candida* (Sanglard, 2002; Lupetti *et al.*, 2002; Casalinuovo *et al.*, 2004, Charlier *et al.*, 2006). Estudos bioquímicos extensivos revelaram uma diversidade significativa nos mecanismos conferindo resistência de *Candida* spp. aos derivados azólicos, a grande maioria das conclusões apontando para níveis aumentados de efluxo de drogas como o principal mecanismo de resistência (Sanglard, 2002).

Recentemente, apareceram os primeiros inibidores destes transportadores para as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*. Estes agentes não têm atividade antifúngica alguma e se caracterizam por aumentar a suscetibilidade dos fungos por agentes antifúngicos conhecidamente substratos destes transportadores (azóis, terbinafina). Um representante natural desta classe, a milbemicina α-9 (MC-510,027), mostrou reduzir drasticamente a CIM90 de uma ampla variedade de espécies de *Candida* (CHAMBERLAND *et al*., 1999; Bergold & Georgiadis, 2004). Outro representante, o MC-005, 172, foi usado em ensaio farmacodinâmico para testar o potencial destes agentes em aumentar a atividade do fluconazol *in vivo*. Este agente foi capaz de diminuir a CIM do fluconazol de 128 para 5 μg/mL(Bergold & Georgiadis, 2004).

Estudos sobre resistência a drogas antifúngicas sugerem que novos sistemas de liberação de fármacos podem ter lugar no tratamento de infecções fúngicas resistentes a drogas, sendo possível que diferentes sistemas de liberação de drogas alterem a maneira como uma célula fúngica interage com um fármaco, podendo ter um efeito negativo ou positivo no desenvolvimento da resistência aos azóis (White *et al.*, 1998). Uma forma de modificar a biodistribuição de fármacos é envolucrá-los em carreadores submicroscópicos (Allemann *et al.*, 1993). A utilização de nanoestruturas representa um

avanço significativo sobre os métodos tradicionais de administração por via oral e intravenosa em termos de eficiência e eficácia. As vantagens da utilização deste tipo de estruturas na liberação de fármacos são muitas, dentre elas o aumento da estabilidade de agentes farmacêuticos voláteis e o fato de serem facilmente produzidas por uma variedade de métodos. A escolha do polímero e a habilidade de modificar a liberação do fármaco a partir de nanoestruturas poliméricas tornaram-nas candidatas ideais para a terapia do câncer, liberação de vacinas, contraceptivos e antibióticos (Tadros *et al.*, 2004; Kayser, 2005).

Os testes *in vitro* para avaliar a susceptibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos em meio líquido utilizam diferentes metodologias, dentre elas estão a determinação visual, por espectrofotometria, por colorimetria por reação com MTT e por quantificação de ergosterol em suspensões celulares (M27-A2/NCCLS, 2005; Cuenca-Estrella *et al.*, 2001; Levitz & Diamond, 1985; Arthington-Skaggs *et al.*, 1999).

A determinação da atividade do fluconazol associado a estruturas nanométricas poderá elucidar a utilidade destas formulações visando à obtenção de maiores concentrações intracelulares do fármaco e à maior eficiência no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, as quais levam ao desenvolvimento de lesões irreversíveis no paciente acometido por períodos mais prolongados.

O presente trabalho apresenta uma avaliação *in vitro* da susceptibilidade de *Candida* spp. a nanoestruturas do tipo nanoemulsão e nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo ou não fluconazol.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Infecções Fúngicas por Candida spp.

Embora as espécies de *Candida* spp. façam parte da flora microbiana normal da pele, boca, trato intestinal e vagina, eles são os agentes etiológicos de várias infecções fúngicas, incluindo candidíase, onicomicose e vaginites. *Candida albicans* é o agente etiológico mais freqüente, capaz de causar qualquer tipo de micose (Georgiev, 2000) sendo também comum a *Candida parapsilosis* (Kuhn *et al.*, 2004). O gênero *Candida* consiste de fungos leveduriformes que estão amplamente distribuídos na natureza. A principal espécie do gênero, *C. albicans*, é um fungo dicotômico que é ordinariamente encontrado como parte da flora normal do trato gastrointestinal humano. Ela pode se tornar patogênica em humanos como resultado de distúrbios no balanço da flora intestinal ou após enfraquecimento da resposta imune causando micose superficial ou sistêmica. Uma vez que *C. albicans* pode se ligar avidamente às superfícies mucosas e catéteres, este fungo normalmente benigno pode rapidamente se tornar invasivo, especialmente em pacientes imunossuprimidos (Georgiev, 2000). Morfologicamente, *C. albicans* pode crescer tanto como levedura ou na forma de pseudo-micélio. Em adição ao seu dimorfismo, *C. albicans* possui um sistema bem organizado de mudança fenotípica que provavelmente auxilia o patógeno a escapar da defesa imune do hospedeiro (Georgiev, 2000).

Com base em estudos patológicos foram reconhecidas três formas distintas de candidíase humana: superficial, invasiva e sistêmica. Os casos de candidíase superficial são mais comumente observados na pele, orofaringe, trato gastrintestinal e trato respiratório superior e inferior. A candidíase sistêmica é manifestação mais séria da doença e que pode afetar qualquer órgão, mas mais freqüentemente o coração, rins, fígado, baço, pulmões e o cérebro. As manifestações mais severas da candidíase sistêmica têm sido observadas em pacientes leucêmicos ou em pacientes submetidos a transplantes de órgãos e recebendo terapia imunossupressiva (Georgiev, 2000). A ocorrência de candidíase hematogênica pode levar à disseminação da infecção para múltiplos órgãos. Endoftalmites podem ocorrer em cerca de 10 a 30% dos casos. As anormalidades oftalmológicas são caracterizadas por lesões algodonosas na retina e no vítreo, múltiplas hemorragias retinianas, manchas de Roth e uveíte. Todas as estruturas

oculares podem ser afetadas, porém, quando ocorre endoftalmite, a terapia é difícil e a incidência de seqüelas é alta. Pacientes com sepse por *Candida* que evoluem a óbito apresentam lesões fúngicas no sistema nervoso central em até 20% dos casos e a endocardite por *Candida* ocorre geralmente como complicação de pós-operatório de troca valvar. A candidíase hepatoesplênica é uma forma incomum de infecção pelo gênero *Candida* que envolve primariamente o fígado e o baço e, menos freqüentemente, os rins, os pulmões e os ossos. Esta síndrome ocorre habitualmente em pacientes imunocomprometidos e de difícil tratamento devido a neutropenia coexistente nesta população. Há formação de abscessos no fígado, baço e eventualmente nos rins. De forma geral, 40 a 60% dos pacientes que desenvolvem candidemia morrem durante a internação hospitalar na qual houve a fungemia, sendo a alta mortalidade decorrência particularmente do diagnóstico tardio e à gravidade das comorbidades (Colombo, 2003).

II.2. O Ergosterol

O ergosterol é o principal esterol componente da membrana celular dos fungos e tem um papel importante no controle da fluidez e integridade da membrana, bem como na regulação do crescimento e da proliferação celular. Contribui para a adequada função de enzimas ligadas à membrana, como as proteínas associadas ao transporte de nutrientes e à síntese de quitina; exercendo também papel na respiração mitocondrial (Georgiev, 2000; Sturley, 2000; Lupetti, 2002).

Alvo dos antifúngicos azólicos, a primeira etapa na síntese de ergosterol é a desmetilação do lanosterol e as enzimas necessárias estão associadas ao Citocromo P450. Esta proteína, associada ao retículo endoplasmático é codificada pelo gene *ERG11* (ou *CYP51)* em leveduras e alguns estudos apontam para níveis aumentados da enzima alvo ou alterações em sua regulação como causa da resistência aos derivados azólicos (Georgiev, 2000; Sturley, 2000; Lupetti, 2002).

II.3. Terapia Antifúngica

Os primeiros compostos azólicos utilizados foram os imidazóis clotrimazol, miconazol e cetoconazol, seguidos pelos triazóis fluconazol e itraconazol. O modo de ação dos antimicóticos azólicos tem sido invariavelmente por inibição da enzima C-14-α-demetilase. A desmetilação oxidativa em 14-α nos esteróis é um processo dependente do citocromo P 450. Sua supressão por antimicóticos azólicos resulta da ligação do nitrogênio da porção heterocíclica da molécula do azol ao ferro heme do citocromo P-450. Em concentrações terapêuticas, os derivados azólicos têm demonstrado maior afinidade pela 14-α-demetilase fúngica do que de mamíferos, resultando no acúmulo de esteróis 14-α-metilados, principalmente lanosterol e 14-α-metil-3,6-diol. É este efeito seletivo que, dependendo da espécie de fungo, leva à ação fungistática e/ou fungicida dos antimicóticos azólicos. Resultados de estudos espectrofotométricos e enzimáticos mostraram que os antifúngicos azólicos se ligam à 14-α-demetilase em proporção estequiométrica de 1:1. Entretanto, pouco se sabe sobre a estrutura do complexo enzima-azol (Georgiev, 2000).

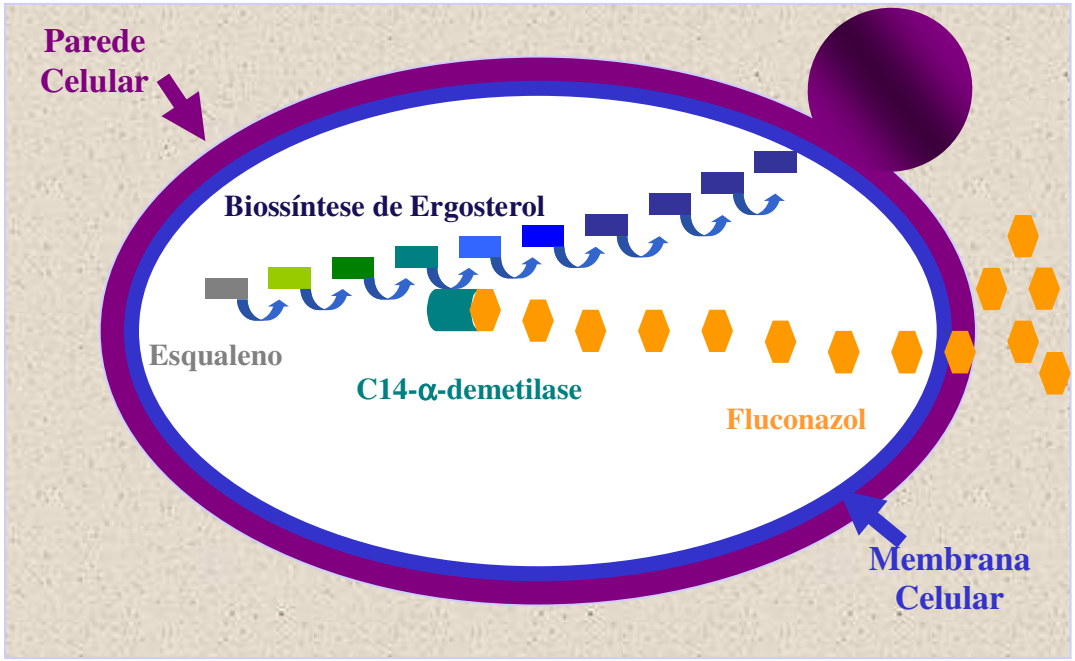


Figura 1: Desenho esquemático da Biossíntese de Ergosterol mostrando o alvo do fluconazol (adaptado de www.HIVwebstudy.org).

O fluconazol foi formulado em 1981. Ele é um bistriazol, é metabolicamente estável e tem baixa lipofilia e ligação às proteínas plasmáticas. Ele é ativo pelas vias oral e intravenosa, em uma dose diária, atinge altas concentrações sanguíneas e rápido equilíbrio no corpo com boa distribuição nos tecidos, incluindo penetração no fluido cérebro-espinhal. O fluconazol é bem tolerado e apresenta baixa incidência de efeitos colaterais e amplo espectro de atividade antifúngica (Bailey *et al.*, 1990; Debruyne & Ryckelynck, 1994; Andriole, V.T. *1999*). O Fluconazol é um pó cristalino, de cor branca e levemente solúvel em água (8mg/mL). Seu ponto de fusão encontra-se entre 138°C e 140°C. A fórmula molecular é C13 H12 F2 N60 e o Peso Molecular é 306.27 g/mol. (The Index Merck, 2002).

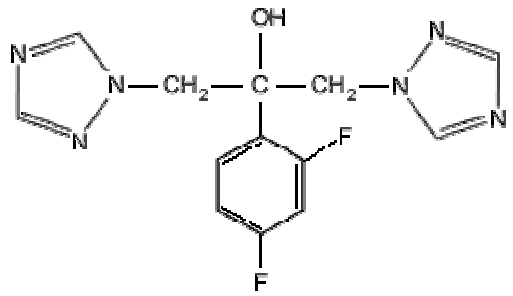


Figura 2: Fórmula Estrutural do Fluconazol

O fluconazol encontra-se disponível para a administração por via oral na forma de cápsulas e solução oral, bem como em solução salina para administração intravascular. Todas as formulações exibem farmacocinética previsível. Quando administrado por via oral, o fluconazol é rapidamente absorvido, com pico de níveis plasmáticos ocorrendo 1-3 h após a administração. A absorção não é afetada por alimentos ou acidez gástrica, e os picos de concentração plasmática são proporcionais à dose em uma faixa ampla (25-400mg). Seu tempo de meia-vida de eliminação

plasmática é de cerca de 30 h. A biodisponibilidade é consistentemente alta (aproximadamente 90%) e a distribuição aos tecidos e órgãos é ampla e rápida. Este perfil farmacocinético do fluconazol permite a conveniência da administração de uma única dose diária para o tratamento de infecções sistêmicas e localizadas (Grant & Clissold, 1990; Martin, 1999).

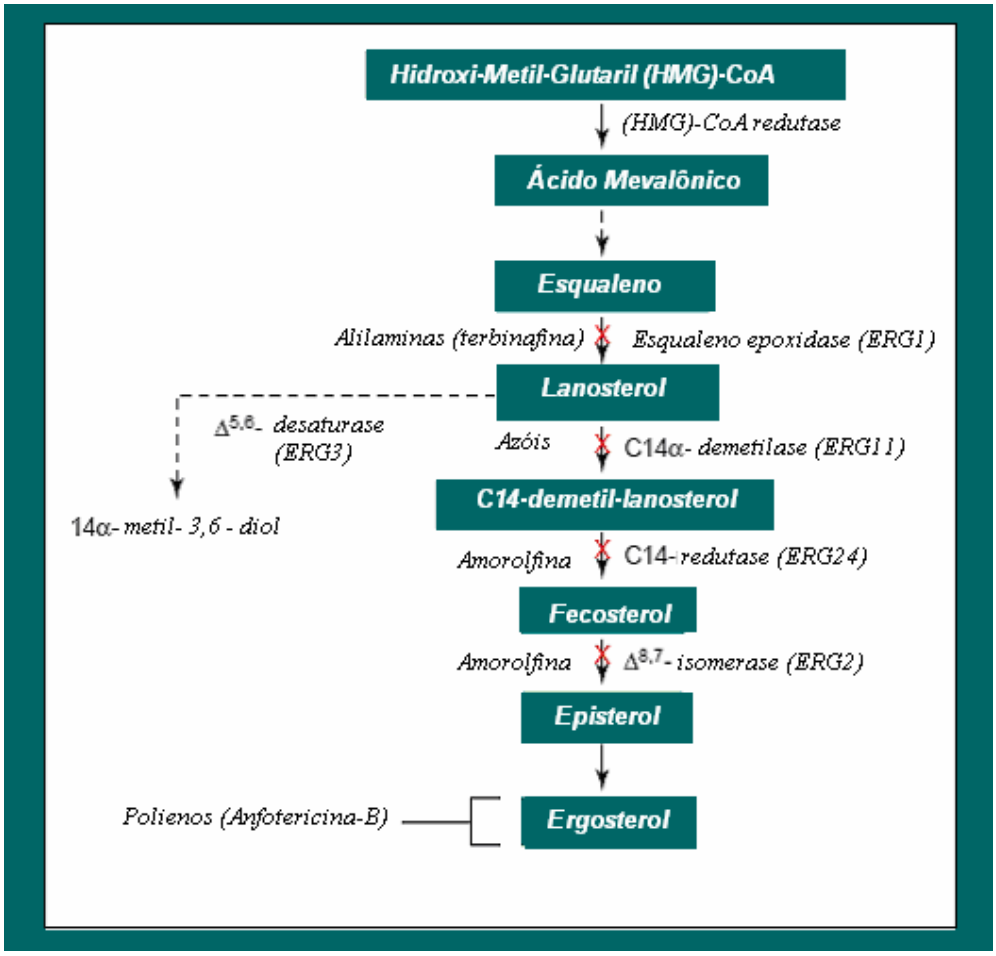


Figura 3. Via de biossíntese do ergosterol e atuação dos fármacos antifúngicos. As enzimas alvo e seus genes codificadores são citados à direita, os fármacos com ação antifúngica nesta via são citados à esquerda, com setas indicando seus alvos na inibição da biossíntese de ergosterol (adaptado de Lupetti, 2002).

II.4. Avaliação de Susceptibilidade de Leveduras a Antifúngicos

O NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA) publicou em 1997 um Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica que inclui espécies de *Candida* spp. (M27-A; 1997). Após vários esforços colaborativos interlaboratoriais o NCCLS, atualmente denominado CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), publicou uma revisão deste método (M27-A2; 2005). A Norma publicada fornece orientações para a realização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos em caldo em macrodiluição e em microdiluição para *Candida* spp. Para os procedimentos em macrodiluição são utilizados tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo volume total de 1 mL composto pelo fármaco a ser testado nas diferentes concentrações desejadas, inóculo e meio de crescimento. Para os procedimentos em microdiluição são utilizadas microplacas de 96 poços em formato de U, sendo os poços preenchidos com um volume total de 200 μL composto pelo fármaco a ser testado nas diferentes concentrações desejadas, inóculo e meio de crescimento, com as devidas correções em função do volume final quando comparado aos procedimentos em macrodiluição (M27-A2; 2005). A microdiluição se tornou o método de escolha por ser de mais fácil execução. Placas de microdiluição podem ser facilmente preparadas e congeladas bem antes do uso (M27-A2, 2005; Rex *et al.*, 2001). Para ambas as técnicas, macro ou microdiluição, são especificados o preparo e o tamanho do inóculo, sendo que o inóculo inicial em experimentos de macrodiluição varia entre 5 x 10^2 e 2,5 x 10^3 CFU/mL e, em experimentos em microdiluição, varia entre 0,5 x 10^3 e 2,5 x 10^3 CFU/mL. O meio de teste sugerido é o RPMI 1640[*], a temperatura de incubação é de 35°C, sendo realizadas leituras após 24 e 48 horas do inóculo. São especificados também os pontos de corte para testes de susceptibilidade à flucitosina, anfotericina B, fluconazol, e itraconazol, sendo o ponto final definido como a mais baixa concentração na qual é observada uma diminuição proeminente da turbidez em comparação ao crescimento de cepas na ausência de fármaco. Uma das vantagens relatadas na utilização desta metodologia é a

[*] A composição do meio RPMI é mostrada em Anexo, na página 127.

alta reprodutibilidade interlaboratorial (M27-A2, 2005; Rex *et al.*, 2001, Arthington-Skaggs *et al.*, 2002).

Mesmo sendo resultado de vários trabalhos colaborativos, a M27-A2 ainda apresenta imperfeições e há relatos de deficiências relacionadas à norma publicada. Uma das deficiências refere-se à avaliação visual da inibição de crescimento, que possibilita variações de interpretação dos resultados de concentração inibitória mínima (CIM) dependendo do observador e do fenômeno de crescimento indefinido das espécies de *Candida* (Clancy & Nguyen, 1997). Estima-se que o crescimento indefinido ocorra em 5% dos isolados e que pode ser suficientemente grande ao ponto de fazer um isolado que parece susceptível após 24 h parecer resistente após 48 h de incubação. Dois estudos *in vivo* deste fenômeno empregando o modelo murino de candidíase invasiva demonstraram que o resultado em 24 horas de incubação foi consistente com a resposta ao tratamento *in vivo* (Arthington-Skaggs *et al.*, 2002). Para o procedimento em macrodiluição, o ponto de corte é a mais baixa concentração na qual o crescimento é reduzido a 20% do crescimento controle, entretanto tornou-se evidente que o decréscimo na turbidez especificado no teste em microdiluição corresponde melhor a uma redução de 50% no crescimento quando avaliado por espectrofotometria (Arthington-Skaggs *et al.*, 2002). Artigos recentes discutiram os avanços técnicos e as aplicações clínicas potenciais do método de avaliação de susceptibilidade e o desenvolvimento de pontos interpretativos visando à redução da variabilidade de resultados interlaboratoriais (Rex *et al.*, 2001).

Avaliações da influência da suplementação do meio de crescimento com glicose a 2% e da influência da modificação do tamanho do inóculo para 10^5 UFC/mL sobre os testes de susceptibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos revelaram que estas modificações da técnica M27-A2 permitem reduzir o tempo de incubação para obter resultados em 24 horas. Os resultados indicaram que suplementação com glicose e que a utilização de inóculos maiores têm efeito aditivo no ciclo de crescimento de *Candida* spp. por simplificarem a determinação do ponto final e por não causarem efeitos significativos na determinação das CIM. A comparação entre a CIM por determinação visual e pelo método espectrofotométrico foi realizada e os resultados sugeriram que a

determinação por espectrofotometria oferece vantagem por permitir uma determinação mais objetiva e automática. As modificações sugeridas resultaram numa técnica reprodutível e confiável, capaz de produzir resultados em acordo com os obtidos pela M27-A2 (Cuenca-Estrella *et al.*, 2001).

Vários pesquisadores incorporaram ensaios espectrofotométricos aos testes de susceptibilidade na perspectiva de superar as dificuldades encontradas na utilização da M27-A2. Um dos ensaios quantifica a respiração mitocondrial de fungos viáveis através da redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) a formazan. O ensaio colorimétrico utilizando o MTT foi introduzido por Mosmann (1983) como medida quantitativa da viabilidade celular de mamíferos e foi subseqüentemente usado para detectar a viabilidade de bactérias sob diferentes condições adversas. O MTT é um sal de tetrazólio amarelo que é convertido a azul de formazan por desidrogenases das células vivas. O ensaio é baseado no princípio de que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células vivas. O mesmo princípio é verdadeiro para células de levedura e o ensaio foi relatado em estudos de susceptibilidade de fungos patogênicos (Clancy & Nguyen, 1997; Freimoser *et al.*, 1999; Meletiadis *et al.*, 2000). As CIM determinadas pelo método MTT foram comparáveis às determinadas com o método padrão para a macrodiluição em testes com pequeno número de isolados. Testes com número maior de isolados foram realizados e os resultados demonstraram boa correlação entre os dois métodos de avaliação, sendo que o método MTT foi qualificado como superior por ser de simples execução, permitir fácil interpretação dos pontos de corte, por necessitar de apenas 24 horas para a obtenção de resultados correspondentes aos obtidos em 48 horas de avaliação pela metodologia M27-A2, e por apresentar menor variabilidade nos resultados. Além desses fatores, o teste MTT apresenta bom potencial de adaptabilidade de automação (Mosmann, 1983; Levitz & Diamond, 1985; Clancy & Nguyen, 1997; Yang, 1998; Freimoser *et al.*, 1999; Meletiadis *et al.*, 2000).

Com o intuito de aprimorar a correlação entre resultados de teste de susceptibilidade *in vitro* com resposta terapêutica *in vivo*, Arthington-Skaggs *et al* (1999) desenvolveram um teste *in vitro* que envolve a quantificação dos esteróis da

membrana celular fúngica para determinar a CIM de fluconazol em cepas clínicas de *Candida albicans* denominado Método da Quantificação de Ergosterol (MQE). Esse método mede a sensibilidade da biossíntese de ergosterol em isolados de *C. albicans* aos efeitos do fluconazol através da quantificação do ergosterol utilizando o padrão de absorção espectral entre 240 e 300 nm, indicativo do conteúdo em ergosterol e em 24(28) dehidroergosterol (DHE), um intermediário na via de biossíntese de ergosterol. Ambos ergosterol e 24(28)DHE absorvem a 281,5 nm, enquanto somente o 24(28)DHE mostra absorção espectral intensa a 230 nm. A quantidade do ergosterol pode ser determinada calculando o conteúdo total de ergosterol somado ao 24(28)DHE e posteriormente subtraindo a quantidade de 24(28)DHE determinada isoladamente. O conteúdo determinado por esta técnica é uma medida absoluta, eliminando a necessidade de determinação subjetiva da inibição do crescimento celular (Arthington-Skaggs *et al.*, 1999). Comparações entre resultados de testes de susceptibilidade ao fluconazol obtidos pelo método de microdiluição (M27-A2) e pelo método de quantificação de ergosterol foram realizadas e apresentaram boa correlação entre os métodos. O MQE apresentou a vantagem de melhorar a discriminação entre isolado resistente e susceptível dose-dependente (Arthington-Skaggs *et al.*, 1999).

II.5. Mecanismos de Resistência aos Antifúngicos

Quando em contato com drogas antifúngicas, os fungos patogênicos têm, a princípio, a capacidade de superar a ação inibitória através de mecanismos de resistência específicos. Estas respostas biológicas, refletidas *in vitro* pela habilidade de selecionar mutantes resistentes, têm sido utilizadas em várias ocasiões para identificar alvos celulares para drogas antifúngicas. A ocorrência de resistência dependerá do tipo de fungo a ser tratado e do agente antifúngico a ser utilizado. Os mecanismos de resistência aos derivados azólicos têm sido mais intensamente investigados nos últimos anos e estão relacionados a várias espécies de *Candida spp* (Sanglard, 2002; Lupetti *et al.*, 2002; Casalinuovo *et al.*, 2004, Charlier *et al.*, 2006).

Um primeiro método que os fungos patogênicos têm de se sobrepor à ação inibitória de derivados azólicos é aumentar o conteúdo das moléculas da enzima alvo, seja por amplificação gênica ou por *upregulation* do gen correspondente. Um pré-requisito para a ação inibitória dos derivados azólicos é atingir níveis de concentração intracelular capazes de bloquear a função de cada molécula de Erg11p presente na membrana do retículo endoplasmático. O transporte de derivados azólicos para as células fúngicas ainda não é totalmente compreendido. Modelos correntes suportam a idéia de transporte passivo através da parede celular e da membrana celular dado que a modificação das estruturas da parede celular pela alteração na glicosilação de proteínas de superfície leva à modificação no sítio do P450 e da susceptibilidade aos derivados azólicos e que um mutante em uma etapa específica da via de biossíntese do ergosterol (ERG6, esterol metiltransferase) mostra permeabilidade aumentada a diferentes inibidores de crescimento, incluindo aos derivados azólicos (Sanglard, 2002).

A crescente importância médica das infecções fúngicas sistêmicas causadas por *C. albicans* associada à falta de drogas antifúngicas potentes e à emergência de cepas resistentes, especialmente em pacientes recebendo terapia antifúngica de longa duração, levou à necessidade de uma melhor compreensão da genética molecular desta levedura patogênica (Georgiev, 2000). A resistência aos derivados azólicos tem posição de liderança dentre os relatos publicados. Especialmente o uso repetido de fluconazol em pacientes HIV positivos com infecção mucosa por fungos no período precedente à introdução de terapia anti-retroviral de alta atividade tem favorecido a aquisição de resistência em vários fungos patogênicos, na grande maioria espécies de C*andida*, sendo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C.* krusei, *C.* lusitaniae e C. *dublienensis* as de maior importância (Sanglard, 2002; Rex *et al.*, 2004). A resistência ao fluconazol tem sido relatada para *C. krusei* e *C. glabrata* devido à profilaxia de candidíase com fluconazol. Algumas espécies não-albicans podem apresentar resistência primária ou secundária ao fluconazol sendo que 75% dos isolados de *C. krusei*, 35% dos isolados de *C. glabrata*, e de 10-25% dos isolados de *C. tropicalis* e *C. lusitaniae* podem apresentar um destes tipos de resistência (Krcmery & Barnes, 2002).

Uma vez que a resistência às drogas pode ser desenvolvida como um processo gradativo com o tempo, esses mecanismos podem se combinar. O acúmulo intracelular de derivados azólicos pode ser reduzido pela falta de penetração da droga devido aos baixos níveis de ergosterol ou à taxa possivelmente reduzida entre fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina na membrana plasmática, que pode mudar a função de barreira da membrana. Entretanto, a grande maioria das conclusões aponta para níveis aumentados de efluxo de drogas como sendo o principal mecanismo de resistência (Sanglard, 2002).

II.6. Vetorização de Fármacos

Uma forma de modificar a biodistribuição de fármacos é associá-los a carreadores submicroscópicos (Allemann *et al.*, 1993). Nanopartículas são partículas coloidais sólidas de tamanho variando entre 10 e 1000 nm. Elas são em geral constituídas de materiais macromoleculares e podem ser usadas como carreadores de fármacos. Nanopartícula é uma denominação coletiva para nanoesferas e nanocápsulas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). A produção de nanopartículas poliméricas tem sido investigada desde o final da década de 1970 (Allémann *et al.*, 1993; Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Nas três últimas décadas foi feito um grande investimento no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos para o tratamento de doenças. Estes sistemas funcionam como estratégias eficientes para transportar o fármaco a seu local de ação através da escolha de um carreador e da rota adequada. As vantagens potenciais destes sistemas são a manutenção de níveis constantes de fármaco na faixa desejada e por períodos prolongados; a redução da toxicidade de fármacos e diminuição de efeitos adversos quando destinados a alvos específicos em órgãos ou tecidos; a facilitação da administração e proteção de moléculas biologicamente ativas da degradação; e a utilização de quantidades menores de fármaco e diminuição do número de doses (Allemann *et al.*, 1993; Kreuter, 1994). A escolha de um sistema de vetorização de fármaco depende principalmente do seu alvo e da estrutura química do fármaco a ser vetorizado. De uma maneira geral, os carreadores foram subdivididos em três classes: os do tipo partícula, os solúveis, e os carreadores celulares. Os carreadores

do tipo partícula incluem lipossomas, partículas lipídicas, microesferas, nanopartículas, micelas poliméricas e sistemas poliméricos que se complexam com DNA (Kreuter, 1994). Os carreadores do tipo partícula representam a classe mais variada e têm grande potencial de atingir a meta de vetorização. Além disso, a habilidade de carreadores do tipo partícula de incorporar o fármaco dentro do sistema de liberação melhora tanto sua estabilidade quanto sua eficiência (Garg & Kokkoli 2005).

Nanopartículas poliméricas (NPPs) representam um avanço significativo sobre os métodos tradicionais de administração de drogas por via oral e intravenosa em termos de eficiência e eficácia. As vantagens da utilização de NPPs na liberação de fármacos são muitas, dentre elas o aumento da estabilidade de agentes farmacêuticos voláteis e o fato de serem facilmente produzidas por uma grande variedade de métodos. A habilidade de modificar a liberação do fármaco a partir de NPPs tornou-as candidatas ideais para a terapia do câncer, para liberação de antígenos, contraceptivos e antibióticos (Kayser, 2005).

As nanopartículas coloidais podem ser obtidas por uma ampla variedade de métodos. Qualquer que seja o processo, precipitação, dispersão, suspensão ou emulsificação, eles permitem a elaboração eficiente de uma grande variedade de colóides com aplicações na terapêutica. Para a indústria farmacêutica a condição para o uso de um polímero *in vivo* é a ausência de toxicidade da macromolécula sintética como um todo, bem como dos componentes utilizados durante os processos de elaboração e/ou formulação, como os solventes e a capacidade de biodegradação (Delair, 2003). A elaboração de uma dispersão coloidal de partículas de um polímero pré-formado em uma fase aquosa contínua requer, a um dado momento, que as interações água-polímero sejam minimizadas para permitir a formação das partículas desejadas. Isto pode ser alcançado usando macromoléculas não-hidrossolúveis ou por favorecimento de interações de cadeia intra ou inter-polímero em vez de interações com as moléculas da fase contínua. Dependendo da estratégia de escolha está o uso de um solvente orgânico, sua natureza e o método de eliminação antes de qualquer aplicação *in vivo* (Delair, 2003).

Dois métodos principais são utilizados para obtenção de dispersões de nanopartículas a partir da solução de um polímero pré-formado. A formação dessas partículas pode depender de uma etapa de emulsificação da fase orgânica em meio aquoso, sendo que a eliminação do solvente da emulsão estabilizada é responsável pela precipitação do polímero para formar partículas. Em uma segunda forma, a emulsificação não é necessária. O solvente é miscível na fase aquosa ou dialisado através de uma membrana e substituído por água. Em ambos os casos, a formação da partícula é concomitante à modificação da natureza química da fase contínua (Delair, 2003). Fessi *et al.* patentearam em 1987 um método de preparo de nanocápsulas a partir de polímeros pré-formados (Allemann *et al.*, 1993). Esta técnica não requer a formação anterior de uma emulsão para a obtenção de uma dispersão de partículas coloidais em uma fase aquosa. Ela se baseia na emulsificação espontânea de uma solução de polímero em um solvente semipolar como acetona ou etanol. Esta solução é colocada ou injetada, sob agitação moderada, em um meio aquoso contendo um estabilizante e as partículas são formadas instantaneamente por rápida difusão do solvente na água. Em seguida o solvente é removido sob pressão reduzida (Figura 4) (Fessi, 1988; Allemann *et al.*, 1993; Quintanar-Guerrero, 1998; Delair, 2003). Drogas lipofílicas e, eventualmente, fosfolípides, agindo como estabilizantes, podem ser adicionados à fase orgânica. Diferentes ésteres, tais como o ácido poli-DL-lático ou poli-ε-caprolactona podem ser usados para obter partículas e os estabilizantes mais utilizados na fase aquosa são *tensoativo*s derivados dos polioxietileno-polioxipropilenos ou o álcool polivinílico (PVA). Neste sistema, instabilidades superficiais das interfaces são suficientes para permitir a emulsificação (Allemann *et al.*, 1993; Delair, 2003). Tanto nanocápsulas quanto nanoemulsões podem ser obtidas pelo método de deslocamento de solvente.

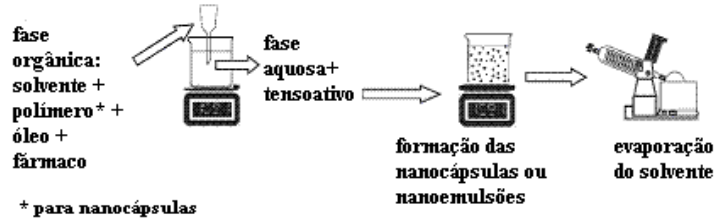


Figura 4: Desenho esquemático da preparação de Nanocápsulas e Nanoemulsões pelo método de deslocamento de solvente (adaptado de Shaffazick, 2003).

Nanocápsulas

As nanocápsulas possuem um envoltório polimérico e um núcleo líquido. Neste caso, a substância ativa está geralmente dissolvida no núcleo, mas pode também estar adsorvida à superfície da partícula (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Nanocápsulas são tecnicamente atraentes devido às suas cavidades centrais oleosas, que permitem altos rendimentos de encapsulação de substâncias lipofílicas. De acordo com a solubilidade das moléculas no núcleo lipídico é possível evitar a precipitação do fármaco durante a preparação, bem como os problemas de estabilidade subseqüentes causados pela presença do fármaco na superfície das nanopartículas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

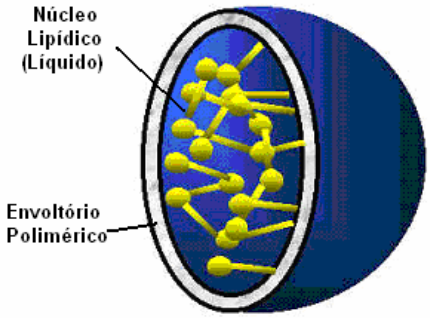


Figura 5: Desenho esquemático da nanocápsula representando o envoltório polimérico envolvendo o núcleo oleoso.
(adaptado de www.library.thinkquest.org/nanocapsules.html)

Nanoemulsões

As nanoemulsões possuem um núcleo oleoso líquido envolvido por camada de tensoativos e são sistemas semitransparentes, transparentes ou translúcidos, freqüentemente de tamanho entre 50-200 nm, também designadas por microemulsões. São formulações termodinamicamente estáveis e muitas vezes se formam espontaneamente. Possuem boa estabilidade física a longo prazo, sem floculação ou coalescência aparente (Tadros *et al.*, 2004; Garg & Kokkoli, 2005). O método de preparo da nanoemulsões deve ser adequado de forma a controlar a distribuição de tamanho das partículas e para estabilizá-la contra a maturação de Ostwald – que ocorre quando o óleo tem alguma solubilidade finita na fase contínua, levando à formação de

partículas maiores (Tadros *et al.*, 2004). A atratividade das nanoemulsões para aplicação em produtos farmacêuticos deve-se a algumas vantagens específicas. A presença de movimento browniano inerente aos sistemas submicrométricos reduz a tendência a sedimentação e à cremagem, típicas dos sistemas micrométricos. As nanoemulsões são adequadas para liberação eficiente de ingredientes ativos por diferentes vias de administração e são particularmente adequados para aplicação tópica (Tadros *et al.*, 2004).

Figura 6 : Desenho esquemático de nanoemulsão mostrando o núcleo lipídico envolvido por uma monocamada de tensoativos (adaptado de www.azonano.com).

Purificação de Nanopartículas

Dependendo do método de preparo, impurezas tóxicas podem estar presentes na suspensão de nanopartículas, tornando necessária a utilização de métodos de purificação. A purificação também é comumente necessária para separar o fármaco livre do fármaco associado às nanopartículas, quando a eficiência do processo é inferior a 99%. Os métodos mais utilizados são filtração em coluna de exclusão em gel, diálise, ultrafiltração e ultracentrifugação. Procedimentos de filtração tangencial também têm sido investigados (Limayen, 2004).

Caracterização dos sistemas nanométricos de liberação de fármacos

Para um desenvolvimento efetivo de um sistema de liberação de fármaco é essencial caracterizá-lo como partícula. A caracterização físico-química das

nanopartículas é geralmente realizada para determinar sua morfologia, distribuição de tamanho das partículas, determinação do potencial zeta (ζ), determinação do pH, determinação da concentração do fármaco associado às nanopartículas e cinética de liberação do fármaco a partir das nanopartículas (Legrand *et al.*, 1999; Schaffazick et al, 2003). Várias técnicas podem ser utilizadas para a caracterização das nanopartículas. A espectroscopia de correlação de fótons tem sido utilizada para avaliar a distribuição de tamanho médio das partículas. O potencial zeta é determinado pela técnica de laser doppler anemometria acoplada à microeletroforese (Le Roy Boehm & Fessi, 2000). O percentual de encapsulação tem sido usualmente avaliado em condições "sink" onde as partículas são separadas do meio de liberação através de diferentes técnicas, tais como a ultrafiltração/centrifugação e a separação em membrana de diálise, os quais possibilitam a determinação da cinética de liberação do fármaco a partir das nanopartículas. Análises morfológicas têm sido realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (MFA).

Uma das características físico-químicas mais importantes das suspensões coloidais é a distribuição do diâmetro das partículas, tendo em vista a tendência das partículas contendo o fármaco à agregação. A avaliação de mudanças na distribuição do diâmetro das partículas também permite monitorar a estabilidade coloidal das mesmas (Magenheim,1991). O método mais comumente utilizado para a determinação da distribuição de tamanho e do índice de polidispersão das amostras é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS). 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 por elas espalhada forme um padrão de movimento. Através da dispersão da luz torna-se possível determinar o diâmetro médio das partículas.

A medida de potencial zeta é o método mais utilizado para estimar a carga superficial de nanopartículas (Washington, 1996). O potencial zeta (ζ) pode ser definido como o potencial existente entre uma partícula individual e seus íons associados. Este parâmetro reflete o potencial de superfície das partículas, que é influenciado por

mudanças na interface com o meio externo, decorrente da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies iônicas do meio de dispersão. Forças repulsivas entre as partículas são originadas devido à interação de duplas camadas elétricas nas partículas adjacentes. Pode-se, portanto, determinar a grandeza da carga elétrica através de medidas de mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um campo elétrico (Florence & Attwood, 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.

Uma das grandes dificuldades na caracterização de partículas é determinar sua forma e a sua organização estrutural. Os métodos mais utilizados para a caracterização morfológica e de tamanho das partículas são a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo que atualmente a técnica considerada mais adequada é a microscopia de varredura por sonda mecânica, também conhecida como microscopia de força atômica (MFA) (Legrand *et al.*, 1999; Leite *et al.*, 2005). O microscópico de força atômica (MFA) é um dos sistemas de processamento de imagens mais comumente utilizados. Sua habilidade em fornecer imagens tridimensionais da superfície topográfica com resolução nanométrica independente da condutividade da amostra, tornando-o uma importante ferramenta para análise de superfícies de forma rotineira. O preparo da amostra é fácil, as quais não precisam ser recobertas, coradas ou congeladas e as medições podem ser realizadas em ar, líquido ou atmosfera controlada. Normalmente ocorre a deposição das partículas sobre uma superfície como a mica recentemente clivada e a varredura da amostra no modo contato intermitente através de uma sonda mecânica. Trata-se de uma técnica não-destrutiva que permite produzir imagens repetitivas de aspectos topográficos de uma mesma amostra, permitindo observação detalhada *in situ* das características da superfície da amostra. O princípio do MFA é relativamente simples. Uma ponta fina no final de uma alavanca promove uma varredura mecânica da superfície da amostra mantendo uma pequena força constante entre a ponta e a amostra. Um scanner piezoelétrico acoplado à sonda determina a interação entre a sonda e a amostra que é monitorada medindo-se a deflexão da alavanca usando um raio laser refletido da parte de trás da alavanca sobre um

detector. De acordo com a movimentação da ponta sobre a amostra, é obtida uma imagem topográfica tridimensional. A figura 7 apresenta um desenho esquemático e o princípio de funcionamento do MFA.

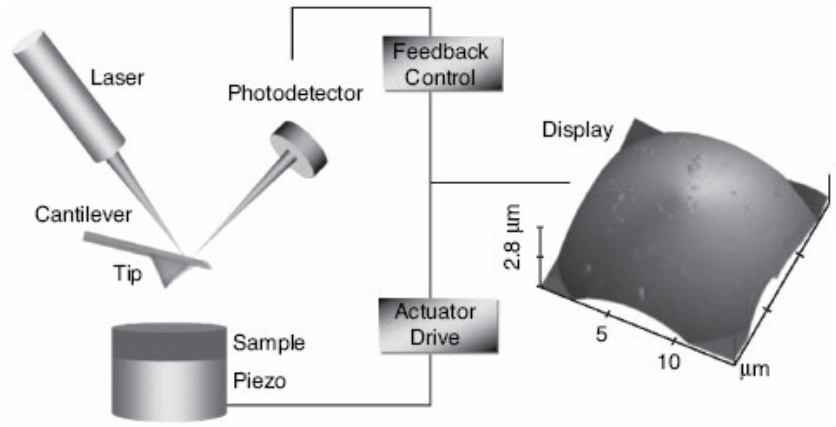


Figura 7. Desenho esquemático e Princípio de Funcionamento do MFA (Garg, 2005).

II.7. Vetorização de drogas através do uso de sistemas nanométricos

Nanopartículas podem ser facilmente captadas por células fagocitárias e se acumularem no sistema retículo-endotelial. Kreuter e colaboradores (1991) qualificaram como promissora a utilização de liposomas e nanopartículas na vetorização de antimicrobianos para o tratamento de infecções intracelulares, incluindo *Candida albicans*. Em uma revisão sobre resistência a drogas antifúngicas, White (1998) sugeriu que novos sistemas de liberação de fármacos como formulações lipídicas de anfotericina B poderiam ter lugar no tratamento de infecções fúngicas multiresistentes à drogas, e que seria possível que os sistemas de liberação alterassem a maneira como uma célula fúngica interage com o fármaco e que isso poderia ter um efeito negativo ou positivo no desenvolvimento da resistência aos compostos azólicos.

Publicações envolvendo a produção de nanopartículas biodegradáveis associadas a drogas antifúngicas são, em maioria, relacionadas à anfotericina-B. Espuelas e colaboradores (2002) estudaram o efeito na atividade *in vitro* de anfotericina-B associada à nanoesferas de poli-ε-caprolactona recobertas com diferentes quantidades do *tensoativo* poloxamer 188 sobre *Leishmania donovani*. Venier-Juliene e colaboradores, (1995, 1996) prepararam nanopartículas de PLGA associadas à anfotericina-B. As nanopartículas foram submetidas à caracterização físico-química e morfológica e diferentes métodos de purificação foram estudados. Testes realizados *in vitro* com promastigotas de *Leishmania* mostraram que as nanopartículas sem fármaco associado também apresentaram atividade e que a incorporação da anfotericina-B às nanopartículas não aumentou este efeito.

Um método de produção de nanoemulsões livre de solventes misturando o fármaco e a emulsão parenteral pré-formada Lipofundin® seguido de homogeneização a alta pressão foi desenvolvido. Os fármacos utilizados como modelo foram anfotericina B e carbamazepina. As emulsões obtidas foram caracterizadas em relação ao tamanho de partícula e estabilidade física por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), difratometria a laser (LD) e medidas de potencial zeta. A incorporação de fármaco foi estudada por microscopia óptica, microscopia eletrônica e por um teste de centrifugação para separar o fármaco não dissolvido. Os resultados demonstraram que as partículas

formadas eram estáveis e que havia diferenças na capacidade de associação do fármaco dependendo da sua estrutura e de sua capacidade de interagir com as moléculas de lecitina adicionada, bem como de sua capacidade de ser incorporado na camada interfacial (Muller *et al.*, 2004).

A produção de nanopartículas biodegradáveis de ciclosporina associadas à poli-ε-caprolactona foi estudada por Molpeceres e colaboradores (2000). Antes da realização de estudos *in vivo* o carreador foi otimizado e submetido à caracterização físico-quimica. O estudo permitiu a obtenção de uma formulação de fácil produção e adequada à administração de doses terapêuticas para a realização de experimento em animais. Mosqueira *et al.* (2000) estudaram a influência da composição utilizada no preparo de nanocápsulas de ácido poli-láctico (PLA) em suas características físico-químicas. A natureza na fase oleosa, o peso molecular do polímero, o tipo e a concentração de diferentes *tensoativo*s foram investigados para otimizar a formulação e obter nanocápsulas adequadas à administração intravenosa. Um estudo examinou os efeitos de nanopartículas de polipropil-cianoacrilato sobre a aderência de blastósporos de *C. albicans* às células do epitélio bucal humano *in vitro*. As nanopartículas foram produzidas por polimerização de emulsão usando vários tipos de *tensoativo*s e seu tamanho e potencial zeta foram dependentes do tipo de *tensoativo* utilizado na preparação. Após a adsorção das nanopartículas foi observado aumento no diâmetro, aumento da hidrofobia da superfície celular dos blastósporos e diminuição em 73% da aderência às células epiteliais *in vitro* comparando aos blastósporos não tratados. Este estudo sugere que as nanopartículas poliméricas podem ser úteis na profilaxia da candidíase na cavidade oral (McCarron *et al.*, 2004).

Testes com várias formulações de nanoemulsões para carrear o sal hidrossolúvel inulina foram realizados para verificar a facilidade destas nanoemulsões em transportar o fármaco através da pele de ratos. Os resultados demonstraram uma excelente capacidade destas nanoemulsões em transportar a inulina quando comparados aos controles em água ou dispersão micelar (de 5 a 15 vezes maior). As nanoemulsões com HLB menor exibiram os melhores resultados e o transporte mediado pelas nanoemulsões foi independente do tamanho da molécula do sal hidrossolúvel, da natureza da fase aquosa e

da espessura do estrato córneo da pele dos animais. Os autores sugeriram que as nanoemulsões O/A que são compatíveis com o meio lipofílico do sebo do folículo piloso facilitam o transporte dos solutos hidrossolúveis a elas incorporados (Wu, 2001).

Até o momento, vários estudos envolvendo nanoemulsões têm sido realizados para avaliação da ação antimicrobiana. Duas nanoemulsões antimicrobianas e não-tóxicas foram desenvolvidas por Hamouda e colaboradores (1999, 2000, 2001). Estas emulsões apresentaram atividade contra esporos de *Bacillus anthracis* e outras espécies de Bacillus *in vitro* e *in vivo*. A atividade de diferentes concentrações de uma nanoemulsão foi testada em preparações do vírus *Ebola* (cepa Zaire) obtidas de culturas de células Vero e de sangue de macacos infectados. Os resultados obtidos indicaram que a nanoemulsão agiu como um eficiente desinfetante para o vírus *Ebola*. Os estudos de biocompatibilidade abriram uma perspectiva para a produção e teste de uma vacina contra o vírus (Chepurnov, 2003). Do mesmo modo, Maestreli e colaboradores (2004) produziram uma emulsão submicrônica de triclosan através do método de deslocamento de solvente e nanocápsulas recobertas com quitosana. Os autores compararam as propriedades mucoadesivas das nanoestruturas e concluíram que as nanocápsulas apresentaram melhor perfil para carrear o triclosan do que a emulsão por permitirem uma liberação controlada deste fármaco.

II.7.1. Associação de derivados azólicos aos sistemas nanoestruturados

A incorporação de itraconazol a emulsões parenterais através da tecnologia SolEmuls® foi realizada utilizando diferentes concentrações do fármaco, obtendo-se capacidade máxima de associação na concentração de 10 mg/mL. A incorporação do fármaco na camada de lecitina aumentou o efeito de dispersão. A formulação permaneceu estável por 3 meses à temperatura ambiente. (Akkar *et al.,* 2003). Chasteigner e colaboradores (1996) também avaliaram a estabilidade físico-química de nanoesferas de poli-ε-caprolactona contendo itraconazol submetidas à liofilização.

Uma série de lipogéis de cutina e um gel-microemulsão de fluconazol foram preparados e testados *in vitro* contra *Candida albicans* para avaliar a influência do veículo na liberação do fluconazol dissolvido em óleo de jojoba. Os resultados

demonstraram melhores efeitos na formulação de gel-microemulsão e os autores classificam esta forma farmacêutica como um excelente veículo para administração tópica de fluconazol. (El Laithy, 2002). A viabilidade do uso de um implante escleral polimérico biodegradável contendo fluconazol como sistema de liberação controlada intra-vitreal foi também avaliada. O copolímero dos ácidos poli(*DL*-lático-co-glicólico) foi utilizado para encapsular 10, 20, 30 e 50% de fluconazol e avaliar suas taxas de liberação *in vitro* e *in vivo* em coelhos. O estudo sugeriu que o implante polimérico contendo fluconazol pode ser promissor no tratamento de endoftalmite fúngica. (Miyamoto, 1997).

A eficiência do fluconazol e de lipossomas de fluconazol sobre *C. albicans* em endoftalmite micótica induzida em olhos de coelho foi também avaliada. Os resultados obtidos demonstraram que a ação dos lipossomas de fluconazol foi inferior à do fluconazol livre no modelo utilizado (Gupta *et al.*, 2000). A toxicidade retinal do fluconazol livre comparada à de uma formulação de lipossomas de fluconazol em várias doses foi avaliada após a injeção intravitreal em coelhos albinos. Os resultados demonstraram que a formulação em lipossomas diminuiu a toxicidade retinal do fluconazol até a concentração de 200 µg/0.1 ml (Velpandian *et al.*, 2006).

A elaboração de sistemas vetorizados contendo drogas antifúngicas tem levado à obtenção de patentes de formas nanoestruturadas associadas ou que possam ser associadas a esta categoria de antifúngicos, sendo registradas na Europa e nos Estados Unidos (Jira & Jirathitikal, 2003; Gehlsen, 2004; Goldshtein *et al.*, 2005; Windsor *et al.,* 2006). Estes registros estão relacionados a formas nanométricas do tipo nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas de diferentes composições e obtidas por diferentes métodos, prevendo a associação de antifúngicos.

Embora o fluconazol tenha sido utilizado associado a diferentes sistemas de liberação de drogas, até o momento não encontramos na literatura estudos referentes ao uso de sistemas nanoestruturados de fluconazol para reversão da resistência ao fluconazol em *Candida* spp. A hipótese de reversão da resistência pelo uso de sistemas carreadores de fármacos merece ser avaliada diante do uso indiscriminado de antifúngicos pela população e pela grande incidência de candidíase disseminada em

pacientes hospitalizados. Portanto, no presente trabalho o uso de fluconazol associado a dois tipos de sistemas nanométricos, um de emulsões submicrométricas e outro capsular, do tipo nanocápsulas, foram avaliados *in vitro* em duas espécies de *Candida*.

OBJETIVOS

III. 1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a influência da vetorização do fluconazol na forma de nanocápsulas e nanoemulsões sobre a viabilidade de *Candida* spp.

III. 2. Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar as nanoemulsões e nanocápsulas contendo fluconazol;
- Desenvolver metodologia de purificação das nanoestruturas preparadas visando eliminar o fármaco não encapsulado para realização dos estudos *in vitro*;
- Comparar diferentes metodologias de estudo da atividade *in vitro* contra *Candida* visando estimar a influência da presença das nanoemulsões e nanocápsulas sobre a precisão dos métodos testados: turbidimetria em macro e microdiluição, reação com o MTT e quantificação de ergosterol;
- Avaliar o potencial desses sistemas em reduzir a resistência ao fluconazol sobre suspensões celulares de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida albicans* ATCC 18804 por turbidimetria em macro e microdiluição, reação com o MTT e quantificação de ergosterol.

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Preparo e Caracterização das Nanoestruturas

IV.1.1. Preparo das nanocápsulas e nanoemulsões

As nanocápsulas contendo 1mg/mL de fluconazol (DEG Imp. Prod. Químicos Ltda, Brasil) foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado, método também conhecido como nanoprecipitação, descrito por Fessi *et al* (1989). Inicialmente o polímero poli-ε-caprolactona (Sigma-Aldrich) foi dissolvido na concentração de 0,6% p/v em uma solução de acetona contendo 0,75% p/v de lecitina (Epikuron® 170, Cargil Bioactives) e 2,5% v/v de óleo (Miglyol® 810, Hüls, Alemanha) por mL. A dissolução ocorreu por meio de agitação com auxílio de agitador magnético sob aquecimento a 40°C. O fluconazol a ser nanoencapsulado (1mg/mL) foi dissolvido nesta solução orgânica. Em seguida foi produzida uma solução aquosa contendo 0,75% p/v de Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich, Brasil) também sob agitação com auxílio de agitador magnético, à temperatura ambiente A água utilizada foi purificada por osmose reversa (Simplicity 185, Millipore). A solução contendo o polímero e o fármaco foi vertida sobre a solução aquosa mantendo-se a agitação por 10 minutos. A suspensão obtida foi levada ao rotavapor (Laborota 4000, Heidolph Instruments, Alemanha), mantendo-se a temperatura do banho a 50°C para evaporação do solvente sob pressão reduzida. A preparação das nanoemulsões seguiu as mesmas etapas sendo que o polímero poli-ε-caprolactona não foi adicionado à solução orgânica da formulação. A cada lote foram preparados 10 mL de cada formulação. Após a evaporação do solvente a 50°C as formulações foram deixadas à temperatura ambiente até resfriamento total. Foram retiradas alíquotas para as etapas preliminares de caracterização físico-química das partículas, e as formulações foram então submetidas à filtração (0,45μm) e armazenadas em frascos estéreis, devidamente protegidas da luz, identificadas e armazenadas em refrigerador a 4°C até sua utilização.

IV.1.2. Caracterização físico-química das nanoestruturas

A caracterização do tamanho e da distribuição de tamanho das nanoemulsões e das nanocápsulas preparadas foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons

(PCS); a determinação de potencial zeta (ζ) foi realizada pela técnica de laser doppler anemometria associada à microeletroforese; a determinação da concentração de fármaco associado às nanoestruturas foi realizada por espectrometria no ultravioleta e o cálculo de eficiência e do percentual de encapsulação realizados de acordo com as equações descritas em IV.1.2.1. A avaliação morfológica foi realizada por microscopia de força atômica, como descrito em IV.1.3.

IV.1.2.1. Determinação do percentual de encapsulação do fluconazol nas nanoestruturas

A concentração de fármaco associado nas nanoestruturas foi determinada através do doseamento do fluconazol total na suspensão de nanocápsulas ou nanoemulsões e da concentração de fluconazol presente na fase aquosa externa da suspensão. A fase aquosa externa da suspensão foi separada pela técnica de ultrafiltração/centrifugação utilizando unidades Microcon® da Millipore com membrana de 100.000Da. O doseamento do fluconazol foi realizado por espectrofotometria no ultravioleta a 260 nm (Hélios Alpha, ThermoSpectronic, USA), onde a concentração na amostra foi determinada a partir da equação da reta obtida de uma curva de calibração do fluconazol nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, e 1000 μg/mL. A porcentagem de fluconazol que permaneceu encapsulado nas nanoestruturas foi determinada pela seguinte equação, onde **A** representa a quantidade de fármaco/mL:

$$\% \text{ de fluconazol encapsulado} = \frac{A^{\text{total na suspensão pronta}}\,(\text{mL}) - A^{\text{ultrafiltrado}}\,(\text{mL})}{A^{\text{total na suspensão pronta}}\,(\text{mL})} \times 100$$

Para a realização do teste de porcentagem de encapsulação as nanoestruturas foram preparadas conforme descrito em IV.1.1. e mantidas sob refrigeração por 48 horas. Para a determinação, 400 μL da suspensão de nanocápsulas ou nanoemulsões foram adicionados aos filtros Microcon® da Millipore com membrana de 100.000 Da e

centrifugados por 15 minutos a 500 × *g* (Centrifuge 5415D, Eppendorf). As nanocápsulas e nanoemulsões ficam retidas na membrana e o fluconazol livre é ultrafiltrado. Em seguida foram retiradas alíquotas para a determinação do fármaco total na suspensão final e do fármaco não encapsulado no ultrafiltrado.

IV.1.2.1.1. Determinação do fármaco total

Para a determinação do fármaco total, 25 µL da suspensão final das nanoemulsões ou nanocápsulas foram solubilizados em 2475 µL de acetonitrila, homogeneizados em vortex e centrifugados a 1800 × *g* por 3 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi levada para leitura em espectrofotômetro a 260 nm, e a concentração foi determinada a partir da equação da reta obtida de uma curva de calibração do fluconazol em acetonitrila.

IV.1.2.1.2. Determinação do fármaco não encapsulado:

Para a determinação do fármaco não-encapsulado, 50 µL de filtrado obtido como descrito em IV.1.2.1. foram solubilizados em 450 µL de acetonitrila, a mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 1800 × *g* por 3 minutos. O sobrenadante foi levado para leitura a 260 nm em espectrofotômetro, e a concentração foi determinada a partir da equação da reta obtida a partir de uma curva de calibração do fluconazol em acetonitrila.

IV.1.2.1.3. Determinação da eficiência da encapsulação:

A eficiência de encapsulação foi calculada utilizando a seguinte equação, onde A representa a quantidade de fármaco/mL:

$$\% \text{ Eficiência de Encapsulação} = \frac{A^{\text{efetivamente associado as nanoestruturas}}\,(mL)}{A^{\text{total pesado}}\,(mL)} \times 100$$

Todas as etapas foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média ± desvio padrão.

IV.1.2.2 Análise do tamanho e do potencial zeta

A análise de tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons utilizando um equipamento Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, UK). A análise é realizada em meio líquido e mede o volume hidrodinâmico das partículas atribuindo-se teoricamente a elas um formato esférico. Para realização das medidas de tamanho foram utilizados 20 µL das dispersões de nanocápsulas ou das nanoemulsões diluídas em 4980µL de solução de NaCl 1 mM previamente filtrada em filtros Millex 0,45µm (Millipore®), para obtenção da concentração adequada de partículas para realização das medidas. As leituras foram efetuadas à temperatura ambiente e o ângulo de incidência do laser em relação à amostra foi de 90°. As determinações foram realizadas em triplicata e os valores obtidos correspondem à média ± desvio padrão de dez medidas de cada formulação de nanoestruturas. Foram analisados todos os tipos de nanoestruturas utilizados neste trabalho: nanoemulsões livres de fármaco (NE), nanoemulsões contendo fluconazol em 1mg/mL submetidas (NEFD) ou não (NEF) à purificação por diálise direta; nanocápsulas livres de fármaco (NC), nanocápsulas contendo fluconazol em 1mg/mL submetidas (NCFD) ou não (NCF) à purificação por diálise direta O procedimento de purificação da nanoemulsões contendo fluconazol associado foi realizado como descrito em IV.1.4.2. A determinação de tamanho das partículas nas amostras foi realizada em triplicata e os valores de média e desvio-padrão posteriormente calculados (n = 30).

O índice de polidispersão, que também pode ser obtido nestas análises, refere-se à distribuição de tamanho das nanoestruturas. Índices de polidispersão menores que 0,7 indicam homogeneidade no tamanho das partículas (Dubes *et al.*, 2003) e índices de polidispersão menores que 0,3 indicam amostras monodispersas (especificações do fabricante Malvern, UK). Nas determinações de potencial zeta foi utilizada a técnica de microeletroforese associada à anemometria do laser doppler. Para a determinação, 7,5 μL das nanocápsulas ou nanoemulsões foram diluídos em 9990 μL de água recém destilada e previamente passada em filtro Millipore® 0,45μm, com o objetivo de obter suspensões com número de partículas adequado para as medidas. Os valores obtidos foram apresentados como a média ± desvio padrão de três diferentes análises de cada formulação de nanoestruturas.

IV. 1. 3. Análise morfológica das nanocápsulas

A análise da morfologia das nanocápsulas foi realizada por microscopia de força atômica, utilizando os equipamentos Multimode e Dimension 300, ambos monitorados por controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, EUA), no Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC-MG). As amostras analisadas foram nanocápsulas e nanoemulsões, contendo ou não o fluconazol associado. As imagens foram obtidas no modo contato intermitente utilizando sondas de silício de 122 μm e 228 μm de comprimento com freqüência de ressonância de 297-380 Khz e 75-98 Khz respectivamente. Aproximadamente 10μL das amostras foram depositadas em mica clivada no momento do uso. As amostras foram secas utilizando jatos de argônio, logo após sua deposição na superfície da mica. A mica é um mineral com superfície atomicamente plana e com plano basal de clivagem muito baixo, permitindo sua fácil utilização. A varredura foi realizada com velocidade de 1Hz e resolução de 512 x 512 pixels. A análise das imagens foi efetuada utilizando o programa de análise do sistema. O índice de polidispersão foi calculado através da determinação do tamanho de 30 partículas nas imagens obtidas por MFA. As medidas do diâmetro das partículas visualizadas em

função de sua distribuição no campo analisado foram determinadas e o cálculo do índice de polidispersão foi efetuado utilizando a seguinte equação:

$$\textbf{Índice de Polidispersão} = \frac{\textbf{D90\% - D50\%}}{\textbf{D90\%}}$$

onde D90% corresponde ao diâmetro de 90% e D50% corresponde ao diâmetro de 50% das partículas avaliadas por campo de observação. Para esta determinação, os diâmetros das partículas foram medidos utilizando o programa de análise de imagens Quantikov. Em cada campo avaliado foram medidas 30 partículas. As medições foram realizadas em 3 imagens e os resultados expressos em média ± desvio-padrão.

Utilizando esta técnica foi possível obter imagens de todos os tipos de nanoestruturas utilizadas neste trabalho. As imagens obtidas permitiram comparar diferenças morfológicas entre nanoemulsões e nanocápsulas, bem como avaliar o tamanho das nanoestruturas e comparar os resultados aos obtidos por espectroscopia de correlação de fótons.

IV. 1.4. Purificação de Nanoestruturas para retirada do fluconazol não encapsulado

IV. 1. 4.1. Purificação por ultrafiltração

Foram preparados 10mL de nanoemulsões e de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo fluconazol associado. As dispersões recém-preparadas foram deixadas em geladeira a 4°C por 24 horas. Nesta técnica foram colocados 200 µL da formulação em um ultrafiltro com membrana de 100.000Da (Unidades Microcon®, Millipore) acoplado a um tubo eppendorf de 2 mL. Em seguida foram adicionados 200µL de água purificada por osmose reversa (Simplicity 185, Millipore) e os tubos foram levados à centrífuga a 500 × *g* (Centrifuge 5415D, Eppendorf) por 45 minutos, tempo suficiente para obter 200µL de filtrado. Desprezamos o filtrado e recuperamos o

retido vertendo o filtro invertido em outro tubo eppendorf e centrifugando por 5 minutos a 500 × g. Utilizando este procedimento sucessivamente o fármaco livre em 200μL de nanoemulsões foi retirado. A constatação da ausência de fármaco na fase externa das nanoemulsões foi realizada utilizando o procedimento de determinação de percentual de encapsulação como descrito em IV. 1.21.1.

O doseamento do fluconazol foi realizado por espectrofotometria no ultravioleta e os cálculos da concentração utilizando a equação da curva de calibração de fluconazol em acetonitrila a 260 nm.

IV. 1.4.2. Purificação por diálise

Foram preparados 10mL de nanoemulsões e de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo 1mg/mL de fluconazol associado. As dispersões recém-preparadas foram deixadas em geladeira a 4°C por 24 horas. Para o procedimento de purificação por diálise foi utilizada uma membrana de celulose (12.000-14.000 MWCO) previamente hidratada em água MilliQ por 4 horas. As membranas foram preenchidas com nanoemulsões ou nanocápsulas e, depois de firmemente fechadas, foram colocadas em béqueres separados contendo 60 mL de água MilliQ para cada mL de formulação a ser purificada. O conteúdo líquido total foi mantido sob agitação a 60rpm por tempo pré-determinado. A determinação do tempo necessário de diálise foi antecedida pelos testes de percentual de encapsulação que permitiram definir a concentração de fármaco que caracterizava o final do procedimento de purificação.

Durante este procedimento a concentração do fármaco no meio de diálise foi determinada em intervalos de 30 minutos por 3 horas, seguidas por intervalos de 15 minutos durante 1 hora, totalizando 4 horas de avaliação. A cada intervalo foram retirados 500 μL do meio de diálise, colocados em tubo eppendorf e homogeneizados com 500 μL de acetonitrila sob agitação em vórtex. Após a retirada de cada alíquota foram adicionados ao meio de diálise 500 μL de água purificada, de modo a recompor seu volume total. A concentração de fluconazol que determinaria o final do

procedimento de purificação no meio de diálise foi calculada dividindo-se a quantidade de fármaco a ser retirada (em μg) pelo volume total de meio utilizado na diálise (em mL). A cada intervalo de coleta foi verificada a absorbância da amostra por espectrofotometria a 260 nm e os cálculos da concentração foram realizados utilizando a equação da curva de calibração de fluconazol em acetonitrila a 260 nm, deste modo foi possível detectar o final do processo de purificação por diálise. Foi realizado um teste controle para verificar a concentração de fármaco encapsulado na formulação após a diálise. Os resultados foram apresentados como média de leituras de triplicatas ± desvio-padrão.

IV. 1.5. Estudo de Estabilidade da Nanoemulsões e Nanocápsulas

Foi realizado um estudo de estabilidade da nanoemulsões e nanocápsulas de poli-ε-caprolactona utilizadas neste experimento durante um período de 12 meses de armazenamento a 4°C. Neste estudo foram feitas avaliações de alterações macroscópicas, medidas de tamanho médio, pH, percentual de encapsulação das amostras e de conservação microbiológica.

A avaliação macroscópica foi realizada acompanhando visualmente as amostras armazenadas e anotando mensalmente eventuais alterações. A avaliação de pH foi realizada mensalmente utilizando pHmetro (Modelo 720A/ORION). O percentual de encapsulação foi verificado em triplicata aos 3, 6, 9 e 12 meses após a produção conforme descrito em IV.1.2.1.1. A avaliação de conservação microbiológica foi realizada em tubos de ensaio estéreis com tampa rosqueada preenchidos com diluições a 5% de nanoemulsões ou nanocápsulas em 4 mL de meio YPD2% e incubando a 35°C por 48 h sob agitação a 100 rpm. Os resultados foram apresentados como positivo (+) ou (-) negativo para o crescimento microbiano.

IV.2. Preparo de Meios de Culturas e Cultivo de *Candida* spp.

IV.2.1. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram preparados como descrito a seguir:

IV. 2.1.1- Meio RPMI 1640

Foi utilizado o meio autoclavável (Sigma-Aldrich) sem bicarbonato de sódio, suplementado com 0,3g/L de glutamina e 1,8g/L de glicose e tamponado com MOPS 0,0165M. O meio foi dissolvido em 700 mL de água destilada e levado à autoclave por 25 min a 120°C tendo o pH corrigido para 7,0 antes da esterilização. Uma solução de glicose a 40% e outra de glutamina 3% foram preparadas e autoclavadas da mesma forma. Após o resfriamento à temperatura ambiente foi efetuada a mistura da glutamina ao meio RPMI de forma a conter 0,3g/L. Uma solução tampão de ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS) 0,165M foi produzida, filtrada estéril (0,22μ) e adicionada ao meio a uma concentração 0,0165M. O antibiótico ampicilina foi adicionado ao meio em uma concentração de 100 UI/mL e desta forma o meio pôde ser estocado a 4°C e utilização nos experimentos sem risco de contaminação bacteriana. A adição de glicose foi efetuada de acordo com a utilização do meio.

IV. 2.1.2- Meio YPD 2%:

O meio YPD2% foi preparado dissolvendo-se 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona em 700 mL de água destilada, sendo em seguida levado à autoclave por 25 min a 120°C, tendo o pH corrigido para 7,0 antes da esterilização. Uma solução de glicose a 40% foi preparada e autoclavada da mesma forma. O antibiótico ampicilina foi adicionado ao meio em uma concentração de 100 UI/mL e desta forma o meio pode ser estocado a 4°C para utilização nos experimentos. A adição de glicose foi efetuada de acordo com a utilização do meio.

IV. 2.1.3- Meio Sabouraud-2% Dextrose líquido (SBD) e Meio Sabouraud-2% Dextrose Agar (SDBA)

Os meios SBD e SBDA (Synth) foram preparados conforme orientações do fabricante. Os meios foram autoclavados e mantidos a 4°C para sua conservação.

IV. 2.2. Culturas de *Candida* spp.

As cepas utilizadas neste trabalho foram *Candida albicans* ATCC 18804 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 gentilmente cedidas pelo Prof. Luiz Fernando Medeiros Teixeira do Laboratório de Microbiologia e Micologia Clínica da Escola de Farmácia da UFOP obtidas pela Prof.ª Érica O. D. Brito, do ICB/UFMG. Cada cepa foi estriada em uma placa contendo SBDA. Após 24 horas de incubação a 30°C foram estriadas novamente para a obtenção de colônias isoladas. Após 24h de incubação a 30°C uma colônia de cada cepa foi coletada, inoculada em SBD e levada ao shaker a 30°C, 100 rpm, por 24 horas. O inóculo resultante foi adicionado de 30% de glicerol e dividido em amostras de 1 mL. As amostras foram mergulhadas em nitrogênio líquido por 30 segundos e levadas ao freezer – 80°C para sua conservação.

IV.2.3. Preparo das células para os ensaios

Para cada etapa do trabalho uma amostra de cada cepa foi retirada do freezer, estriada em placa contendo SBDA e mantida por 24 horas a 30°C. Para a produção do pré-inóculo dos experimentos de susceptibilidade com cada cepa em estudo, de três a cinco colônias de cerca de 1 mm de diâmetro foram coletadas e transferidas para 5 mL de solução salina 0,85% estéril. A mistura foi então homogeneizada em vórtex por 15 segundos e a suspensão teve sua turbidez acertada para 0,5 na escala de McFarland, resultando em $1{,}0\times10^6$ a $5{,}0\times10^6$ UFC/mL. Para os experimentos em macrodiluição a suspensão de células foi diluída 1:100 e em seguida 1:20 com meio de cultura (concentração final 5×10^2 a $2{,}5\times10^3$ UFC/mL). Para os experimentos em microdiluição a suspensão foi diluída 1:50 e depois 1:20 e inoculada 1:1 no meio de cultura em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, de 96 poços em formato de U (microplacas).

IV.2.4. Curvas de Crescimento

As curvas-padrão de crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram realizadas em macro e microdiluição em meio YPD2% e em microdiluição em meio RPMI 1640 preparados como descrito em IV.2.1. O crescimento foi avaliado por um período de 48 horas sendo que na macrodiluição as amostras foram coletadas a cada 3 horas para leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 600 nm. No procedimento em microdiluição o crescimento foi avaliado em 24 e 48 horas a 570 nm em leitor de microplacas (EMax, Molecular Device Co.).

IV.2.5. Avaliação da susceptibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos

A determinação da susceptibilidade das cepas de *Candida* ao fluconazol foi realizada primeiramente em meio RPMI. Para comparação e continuidade dos experimentos foi determinada também a susceptibilidade ao fluconazol em meio YPD2%.

IV.2.5.1. Preparo das soluções de antifúngicos

Foi preparada uma solução estoque de fluconazol (DEG Imp. Prod. Químicos Ltda, Brasil) em DMSO (Tedia, Brasil) na concentração de 100 mg/mL. O preparo da solução foi seguido de diluições subseqüentes para cada experimento. Todas as diluições foram filtradas em membrana 0,45 μm estéril (0,45 μm). As nanoemulsões e as nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo fluconazol foram preparadas na concentração de 1mg/mL. Para servirem de controle no acompanhamento dos experimentos foram preparadas nanoemulsões e nanocápsulas de poli-ε-caprolactona sem fluconazol, mas diluídas na mesma proporção das nanosuspensões contendo fármaco. Após o preparo das nanoestruturas procedeu-se a filtração das mesmas em membrana de 0,45 μm (Millipore) para evitar contaminação nos experimentos *in vitro*.

As diluições de fármaco livre ou associado às nanoestruturas utilizadas nos testes em macro e microdiluição foram preparadas de forma que o meio de cultura contivesse 2, 4, 8, 16, 32 ou 64 μg/mL de fluconazol. Foram também preparadas diluições nas mesmas concentrações para a nanoemulsões e as nanocápsulas de poli-ε-caprolactona sem fármaco para servirem de comparação na avaliação dos resultados.

IV.2.1.5.2. Avaliação da susceptibilidade por turbidimetria a 600 nm

A avaliação da susceptibilidade das cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* ao fármaco livre ou associado às nanoemulsões e nanocápsulas por densidade óptica foi realizada utilizando a espectrofotometria a 600 nm para macrodiluição e 570 nm para a microdiluição em leitor de microplacas. Nas duas formas de avaliação os meios de crescimento foram preparados contendo diluições de fármaco livre, nanoemulsões sem fármaco (NE) ou contendo fluconazol associado (NEF), nanoemulsões contendo fluconazol associado purificadas por ultrafiltração (NEFF) ou nanoemulsões contendo fluconazol associado purificadas por diálise direta (NEFD). Da mesma forma foram preparadas diluições de nanocápsulas sem fármaco (NC) ou contendo fluconazol associado (NCF), nanocápsulas contendo fluconazol associado purificadas por ultrafiltração (NCFF) ou nanocápsulas contendo fluconazol associado purificadas por diálise direta (NCFD). O crescimento das cepas em meio livre de fármaco ou nanoestruturas foi utilizado como controle em todos os experimentos. Em uma primeira etapa as concentrações de fármaco livre ou de nanoestruturas utilizadas foram: 2,4,8,16,32 e 64 μg/mL. Experimentos subseqüentes foram realizados utilizando as concentrações 2,4 e 8 μg/mL.

IV.2.1.5.2.1. Avaliação da susceptibilidade em microdiluição

Antes das avaliações de susceptibilidade ao fármaco livre ou associado às nanoestruturas nos testes em microdiluição, foram realizadas curvas de crescimento das cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. albicans* ATCC 18804 em meio livre de fármaco de forma a reconhecer seus padrões de crescimento. As curvas de crescimento foram realizadas em meio YPD2% e também em meio RPMI sem bicarbonato, suplementado com 1,8% de glicose e 0,3g/L de glutamina, tamponado com MOPS 0,165M (pH=7,0). O crescimento celular foi determinado por leitura de densidade óptica (DO) a 570 nm em leitor de microplacas (EMax, Molecular Device Co.).

A montagem dos experimentos em microdiluição foi realizada como sugerido na norma M27-A2 (NCCLS, 2005). Foram utilizadas placas estéreis, descartáveis, de 96 poços em formato de U (microplacas). Em cada poço foram colocados 200 µL de meio de cultura, preparado como descrito em **IV.2.1**., contendo as diferentes concentrações de fármaco a serem testadas. Os resultados obtidos para eficiência e percentual de encapsulação das formas nanoestruturadas foram levados em conta no momento da adição destas formas aos meios de cultura, de modo que a concentração final de fármaco fosse igual para todas as formulações. As soluções contendo fluconazol livre ou associado às nanoestruturas foram filtradas estéreis (0,45µ) antes de serem adicionadas ao meio. A adição do inóculo foi realizada como descrito em IV.2.1.3. e as microplacas foram levadas à estufa a 35°C por 48 horas. Para a avaliação da susceptibilidade por turbidimetria, as placas foram retiradas da estufa e levadas para leitura da densidade óptica em leitor de microplacas a 570 nm. Para controle foram utilizadas placas contendo poços com meio sem inóculo, poços inoculados com as espécies em estudo em meio sem adição de fármaco, e poços contendo as várias concentrações das formas nanoestruturadas sem inóculo. Foram produzidas curvas de calibração para verificar a influência das diferentes concentrações das formas nanoestruturadas na turbidez do meio sem inóculo. A avaliação da estabilidade das nanoestruturas no meio utilizado foi também verificada por leitura da densidade óptica em

leitor de microplacas (EMax, Molecular Device Co.) a 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em média ± desvio padrão foram plotados em curvas de Densidade óptica X Concentração de fármaco.

IV.2.5.2.2. Avaliação da susceptibilidade em macrodiluição

A montagem dos experimentos em macrodiluição foi realizada como sugerido na norma M27-A2 (NCCLS, 2005), com algumas modificações. Foram utilizados erlenmeyers de 125 mL estéreis aos quais foram adicionados 10 mL de meio de cultura, preparado como descrito em **IV.2.1**., contendo as diferentes concentrações de fármaco a serem testadas. Os resultados obtidos para eficiência e percentual de encapsulação das formas nanoestruturadas foram levados em conta no momento da adição destas formas aos meios de cultura, de modo que a concentração final de fármaco fosse igual em todos os frascos. As soluções contendo fluconazol livre ou associado às nanoestruturas foram filtradas estéreis (0,45μ) antes de serem adicionadas ao meio. A adição do inóculo foi realizada como descrito em IV.2.1.3. e os frascos foram mantidos a 35°C, 100 rpm, por 48 horas. Para a avaliação da susceptibilidade por turbidimetria, uma alíquota do meio de teste foi retirada a cada 12 h e a densidade óptica verificada em espectrofotômetro a 600 nm, realizando-se a diluição necessária da amostra para obtenção de valores de DO inferiores a 1,0. Para controle foram utilizados frascos contendo meio sem inóculo e uma curva padrão de crescimento da cepa em estudo no mesmo meio sem adição de fármaco. Foram produzidas curvas de calibração para verificar a influência das diferentes concentrações das formas nanoestruturadas na turbidez do meio sem inóculo. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em média ± desvio padrão foram plotados em curvas de logDO *versus* concentração de fármaco.

IV.2.5.3. Determinação da viabilidade celular por colorimetria com MTT

O ensaio MTT no estudo de susceptibilidade de células de *Candida* em suspensão aos fármacos nanoparticulados foi otimizado durante o desenvolvimento desse trabalho. A realização dos testes foi antecedida por duas etapas. A primeira etapa correspondeu à verificação da intensidade colorimétrica da reação com MTT em função do número de células de *C. albicans* ou *C. parapsilosis* utilizando suspensões celulares de diferentes contagens de UFC/mL. A segunda etapa correspondeu à verificação da influência das nanoestruturas na intensidade colorimétrica da reação com MTT utilizando as formas e concentrações a serem testadas em meio YPD2% sem adição de inóculo.

A determinação da viabilidade celular por colorimetria com MTT foi realizada em microdiluição utilizando microplacas estéreis descartáveis de 96 poços trabalhadas em condições de esterilidade sob fluxo laminar. Nas microplacas os poços foram montados em triplicata, contendo o meio YPD2% adicionado de diferentes concentrações do fármaco livre ou associado às nanoestruturas conforme descrito em IV.3.2. Após 24 h de incubação a 35°C o crescimento foi interrompido. As microplacas foram submetidas à centrifugação por 5 min, 1500 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com auxílio de pipetas Pasteur estéreis. Para eliminar a interferência ocasionada pela presença de nanoestruturas na determinação da viabilidade por colorimetria com MTT, os poços foram lavados com 200 µL de PBS estéril contendo Ca e Mg, de forma a promover a retirada das nanoestruturas do meio. A cada lavagem as placas foram centrifugadas por 5 min a 1500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi aspirado. Em seguida foram adicionados 200 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) a cada poço da microplaca. Deixou-se incubar em estufa a 35°C por 3 h. As microplacas foram retiradas da estufa e o sobrenadante foi aspirado. As placas tampadas foram levadas ao microscópio para verificação da formação de cristais violeta. A cada poço foram adicionados 200 µL de um reagente de extração constituído de 10g de SDS, 50 mL de dimetilformamida (DMF) e 50 mL de água destilada estéril, ajustada para pH 4,7 com solução de ácido acético. As microplacas

foram levadas para a estufa a 35°C por 15 minutos e em seguida agitadas por 5 a 10 minutos para completar a dissolução dos cristais de formazan. Levou-se para leitura em leitor de microplacas (EMax, Molecular Device Co.) a 570 nm, sendo o "branco" um poço contendo somente a solução de extração e utilizando como referência os poços inoculados com *Candida*, mas sem fármaco.

Os cálculos foram realizados utilizando a seguinte equação:

$$\frac{\text{DO da amostra X 100}}{\text{Do 100 \%}} = \% \text{ de viabilidade}$$

A DO 100% correspondeu ao valor lido para a concentração zero, neste caso representado pelo crescimento de *Candida* sem fármaco. Foi traçada uma curva de % de Viabilidade X Concentração de fármaco nas diferentes formas utilizadas no experimento.

IV.2..5.4. Quantificação de ergosterol em culturas de *Candida* spp.

Os esteróis intracelulares totais foram extraídos como descrito por Arthington-Skaggs *et al* (1999) com algumas modificações. Uma colônia *C. albicans* retirada de uma cultura *overnight* em ágar Sabouraud dextrose (SDBA) foi utilizada para inocular 50 mL de meio líquido YPD 2% livre de fármaco ou contendo 8μg/mL de fluconazol livre ou volumes correspondentes de NC, NCF, NCFD, NE, NEF, NEFD. As culturas foram incubadas sob agitação a 35°C até DO entre 0,6 e 0,8 e recolhidas por centrifugação a 2.700rpm (Centrífuga TJ-6; Beckman Instruments) por 5 minutos, lavadas uma vez com água destilada estéril e novamente centrifugadas sob as mesmas condições. O peso líquido do pellet de células foi determinado. Uma solução alcoólica (3 mL) de Hidróxido de Potássio a 25% (25g de KOH e 35mL de água destilada estéril, completando para 100mL com etanol grau HPLC) foram adicionados a cada pellet sendo a suspensão misturada em vortex por 1 minuto. As suspensões de células foram

transferidas para tubos de vidro com tampa rosqueada estéreis e foram incubadas a 85°C em banho-maria por 1 hora. Após a incubação, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente. Os esteróis foram então extraídos adicionando à mistura 1 mL de água destilada estéril e 3mL de *n*-heptano seguido de mistura vigorosa em vortex por 3 min. A camada de heptano foi transferida para um tubo de vidro com tampa rosqueada e estocada a -20°C por até 24h. Antes da análise, uma alíquota de 20µL de extrato de ergosterol foi diluída 20 vezes em etanol grau HPLC e submetida à varredura entre 240 e 300nm em espectrofotômetro (Helios α ThermoSpectronic, EUA). A presença de ergosterol e de seu intermediário 24(28) DHE na amostra extraída resultou em uma curva característica de 4 picos.

O conteúdo em ergosterol foi calculado como porcentagem do peso líquido das células pelas equações seguintes:

$$\% \text{ ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE} = [(A_{281.5}/290) \times F] / \text{peso do pellet}$$

$$\% \text{ 24(28) DHE} = [(A_{230}/518) \times F] / \text{peso do pellet}$$

$$\% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE}] - \% \text{ 24(28) DHE}$$

onde F é o fator de diluição em etanol e 290 e 518 são os coeficientes de extinção (*E*), em porcentagem por centímetro determinados para ergosterol cristalino e 24(28) DHE, respectivamente. O procedimento de extração foi realizado para um preparado contendo apenas as formulações e meio sem inóculo, de forma a avaliar possíveis interferências dos componentes lipídicos das formulações nos resultados da quantificação de ergosterol.

Análise dos resultados. Os resultados foram comparados aos obtidos através dos outros métodos de avaliação de susceptibilidade a antifúngicos utilizados neste trabalho.

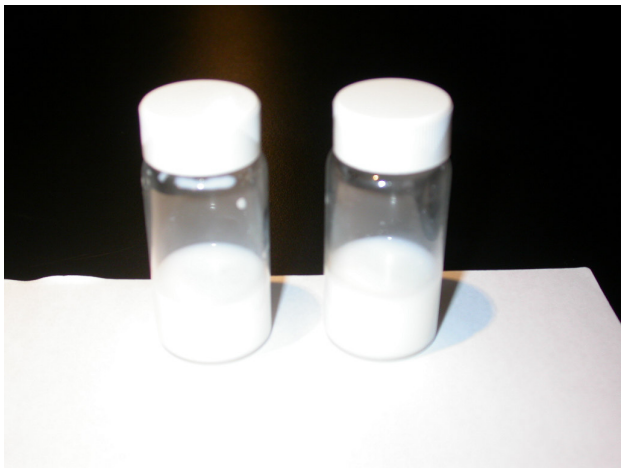
Análise Estatística. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste *t* de Student e valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 1:
PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS

V. 1. PREPARO DAS NANOESTRUTURAS.

As formulações finais obtidas apresentaram coloração branca leitosa, sendo que as nanoemulsões se apresentaram levemente mais translúcidas do que as dispersões de nanocápsulas.



(A) (B)

Figura 8: Dispersões de Nanoestruturas contendo fluconazol.
(A) Nanocápsulas e (B) Nanoemulsões.

V.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS DE POLI-ε-CAPROLACTONA BRANCAS OU CONTENDO FLUCONAZOL ASSOCIADO.

V..2.1. DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO POR ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO DE FÓTONS E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA

A tabela 1 apresenta os resultados da distribuição de tamanho e de determinação do potencial zeta das nanoemulsões e nanocápsulas preparadas e utilizadas neste trabalho.

Tabela 1: Caracterização de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta de nanoemulsões e nanocápsulas

Amostra	50% das partículas menores que (nm) (média ± DP)	99 % das partículas menores que (nm) (média ± DP)	Tamanho médio das partículas (nm) (média ± DP)	Índice de Polidispersão (média ± DP)	Potencial Zeta (ζ) (média ± DP)
NE	159,0 ± 2,0	454,7 ± 20,8	178,1 ± 2,1	0,150 ± 0,01	- 61,0 ± 2,3
NEF	135,2 ± 1,2	294,9 ± 15,2	139,8 ± 0,4	0,109 ± 0,01	- 61,7 ± 0,7
NEFD	134,1 ± 1,5	336,0 ± 46,9	138,1 ± 1,5	0,149 ± 0,01	- 59,5 ± 2,2
NC	204,3 ± 2,4	541,2 ± 43,1	210,8 ± 2,8	0,139 ± 0,02	- 58,8 ± 4,7
NCF	201,3 ± 0,5	482,8 ± 34,9	207,3 ± 0,5	0,137 ± 0,003	- 60,6 ± 1,8
NCFD	198,5 ± 0,7	500,6 ± 39,9	204,4 ± 0,8	0,138 ± 0,009	- 47,4 ± 1,2

Distribuição do Tamanho obtida por Espectroscopia de Correlação de Fótons e Determinação do Potencial Zeta realizada pela técnica de laser doppler anemometria associada à microeletroforese (n= 30). **NE** = nanoemulsões livres de fármaco; **NEF** = nanoemulsões contendo fluconazol associado; **NEFD** = nanoemulsões contendo fluconazol associado purificadas por diálise; **NC** = nanocápsulas livres de fármaco; **NCF** = nanocápsulas contendo fluconazol associado; **NCFD** = nanocápsulas contendo fluconazol associado purificadas por diálise. Foram utilizados 20 µL das dispersões de nanocápsulas ou das nanoemulsões diluídas em 4980µL de solução de NaCl 1 mM passada em filtro Millipore® 0,45µm. As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente e o ângulo de incidência do laser em relação à amostra foi de 90°. Foram analisadas 3 amostras de cada formulação, submetidas a 10 leituras a cada aplicação. Durante a análise a condutividade se manteve em 0,124 ± 0,0028 mS/ cm². A Kcps se manteve entre 100 e 1000. O pH se manteve em 5,71.

Os resultados mostraram que o tamanho médio das nanoemulsões foi de 136,5 até 180,2 nm para nanoemulsões obtidas pela técnica de nanoprecipitação. Embora a análise tenha demonstrado que as nanoemulsões livres de fármaco (NE) apresentavam algumas partículas de tamanho superior a 450 nm, este percentual foi menor que 1%. As nanoemulsões contendo fluconazol associado apresentaram tamanho médio 21% menor que as nanoemulsões livres de fármaco. A análise de diferença entre as médias demonstrou haver diferença significativa entre o tamanho médio das nanoemulsões

livres de fármaco ou contendo fármaco associado ($P < 0,05$). A presença do fluconazol nas nanoemulsões não influenciou o potencial zeta das nanoestruturas, não havendo diferença significativa entre os valores de potencial zeta nas diferentes preparações de nanoemulsões ($P > 0.05$). Entretanto, a associação do fluconazol alterou o tamanho médio das nanoemulsões, uma vez que as gotículas se apresentaram menores na presença de fluconazol. O índice de polidispersão para as nanoemulsões variou de 0,109 a 0,151. De acordo com a literatura estes resultados indicam que as nanoemulsões apresentaram homogeneidade no tamanho de partículas e que as partículas se apresentaram monodispersas (Dubes *et al.*, 2003).

O tamanho médio das nanocápsulas obtidas pela técnica de nanoprecipitação foi de 203,6 até 213,6 nm. A análise de diferença entre as médias demonstrou não haver diferença significativa no tamanho médio das nanocápsulas livres de fármaco ou contendo fluconazol associado($P < 0,05$). A comparação entre o potencial zeta das nanocápsulas livres de fármaco e das nanocápsulas de fluconazol revelou não haver diferença significativa entre as amostras. Entretanto, a purificação das nanocápsulas de fluconazol promoveu um aumento do potencial zeta destas nanoestruturas, havendo diferença significativa entre as nanocápsulas de fluconazol e as nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise. Esta variação pode estar relacionada à retirada de tensoativo das dispersões, uma vez que o procedimento de purificação permite retirar fármaco não associado e também excessos de polímeros presentes. A diminuição na quantidade de tensoativo poderia ter provocado aumento no potencial zeta destas dispersões. O índice de polidispersão para as nanocápsulas variou de 0,137 a 0,139, indicando que as nanocápsulas apresentaram homogeneidade no tamanho de partículas e que as partículas se apresentaram monodispersas (Dubes *et al.*, 2003).

Três fatores são essenciais na determinação do tamanho das nanoestruturas; a concentração do polímero na fase orgânica; a polaridade dos solventes, e a relação entre fase interna e externa (Fessi, 1987; Mosqueira at al., 2000; Zili *et al.*, 2005). O tamanho usual das nanocápsulas varia de 100 a 500 nm e os resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula das dispersões de nanocápsulas preparadas neste trabalho demonstraram ser possível obter nanoestruturas contendo fluconazol associado utilizando as proporções indicadas na formulação e estão de acordo com a literatura (Legrand *et al.*, 1999).

V.2.2. DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ENCAPSULAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS DE FLUCONAZOL

A avaliação do percentual de encapsulação foi realizada como descrito em IV.1.2. A equação da reta obtida na curva de calibração do fluconazol em acetonitrila foi utilizada para a verificação da concentração de fármaco livre ou associado às nanoemulsões.

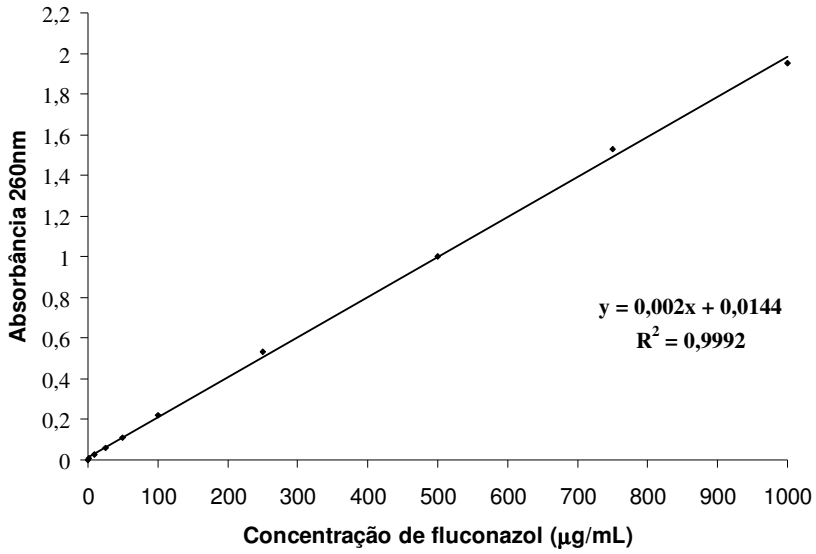


Figura 9: Curva de Calibração do fluconazol em acetonitrila determinada por espectrofotometria no ultravioleta a 260 nm. As concentrações de fluconazol utilizadas para a elaboração da curva de calibração foram 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, e 1000 µg/mL.

Os resultados das avaliações da concentração de fármaco não associado às nanoemulsões preparadas com 1mg/mL de fluconazol demonstraram que 503,2 µg/mL do fármaco estavam na fase externa das nanoemulsões. Para as nanocápsulas, os resultados das avaliações da concentração de fármaco não encapsulado demonstraram que 517,2 µg/mL de fluconazol estavam do lado de fora destas nanoestruturas. O percentual de encapsulação e a eficiência de encapsulação para as nanoemulsões e nanocápsulas foram calculados como descrito em IV.1.2. e foram apresentados na tabela 2 expressos em média de testes realizados em triplicata ± desvio-padrão (DP).

Tabela 2: Determinação do Percentual de Encapsulação e Eficiência de Encapsulação de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol. (*n*=3)

Nanoestrutura	Percentual de Encapsulação(%) *Média ± DP*	Eficiência de Encapsulação(%) *Média ± DP*
NEF	48,9 ± 0,4	48,4 ± 0,6
NCF	44,9 ± 0,2	44,4 ± 0,5

Relatos na literatura referentes aos percentuais de encapsulação obtidos para fármacos vetorizados em nanocápsulas ou em nanoemulsões apresentam variações em função das formulações e dos fármacos utilizados. Há relatos vinculando o percentual de encapsulação em nanocápsulas à solubilidade do fármaco no óleo presente na formulação (Zili *et al.*, 2005). A encapsulação de fármacos hidrofílicos utilizando o método de nanoprecipitação em cápsulas poliméricas é difícil devido à baixa afinidade destes fármacos pelo polímero. Além disso, as interações entre polímero e fármaco são fracas e o fármaco tende a se mover da fase orgânica para a fase aquosa externa e não nas nanopartículas em precipitação (Peltonen *et al*, 2004). Sendo a solubilidade do fluconazol em água 8 mg/mL e seu coeficiente de partição octanol/água logP= 0,6 (Index Merck, 2002), isto explicaria a tendência do fármaco a se repartir entre as fases aquosa e oleosa das nanoestruturas nas proporções obtidas.

V.2.3. PURIFICAÇÃO DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS DE FLUCONAZOL

A determinação da quantidade de fármaco livre na fase externa das suspensões coloidais de nanoestruturas foi realizada pela técnica de ultrafiltração/centrifugação como descrito em IV.1.2.1. , resultando em concentrações de 503,2 e 517,2 μg/mL de fluconazol na fase externa das suspensões de nanoemulsões e nanocápsulas respectivamente. Estes resultados demonstraram que é necessária a aplicação de métodos de purificação para a separação do fármaco livre do fármaco associado para ambas as formulações. Para purificar as nanoestruturas preparadas foram utilizados procedimentos de purificação por ultrafiltração/centrifugação e por diálise direta, havendo relatos de aplicação destas técnicas na literatura (Allemann *et al.*, 1993). Os procedimentos foram realizados visando a otimização do processo. Desta forma foi

possível selecionar um deles para a utilização na purificação das nanoestruturas a serem usadas na determinação da atividade *in vitro* contra *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*.

V.2.3.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS DE FLUCONAZOL POR ULTRAFILTRAÇÃO/CENTRIFUGAÇÃO

Foram realizados procedimentos de purificação das suspensões de nanoemulsões e nanocápsulas utilizando a técnica de ultrafiltração/centrifugação em unidades Microcon de 100.000Da (Millipore®), como descrito em IV.1.4.1. Utilizando este procedimento o fluconazol livre foi retirado em 6 etapas consecutivas, ou seja, a suspensão purificada na etapa 1 foi submetida à etapa 2 e assim sucessivamente até a etapa 6. Para determinação da eficiência de purificação na retirada do fármaco não associado, a concentração de fármaco livre na fase externa das suspensões coloidais foi medida após cada etapa de purificação, como descrito em IV.1.2.1. A tabela 3 fornece os resultados obtidos, apresentados como concentração de fluconazol em μg/mL de suspensão purificada.

Tabela 3: Avaliação da Purificação de Nanoemulsões e Nanocápsulas contendo 1 mg/mL de Fluconazol por Ultrafiltração/Centrifugação (*n*=3).

Etapas	**Duração** (minutos)	**Concentração de Fluconazol na Fase Externa das Nanoestruturas após cada etapa de purificação**(μg/mL)	
		Nanoemulsões	**Nanocápsulas**
Antes da Ultrafiltração/Centrifugação	0	503,2	517,2
1	50	410,2	424,0
2	50	317,0	330,4
3	50	224,4	237,1
4	50	130,4	143,3
5	50	37,2	49,3
6	20* //26**	0,0	0,0
Total	270* //276**	0,0	0,0

* duração em minutos da etapa 6 para nanoemulsões
** duração em minutos da etapa 6 para nanocápsulas

Para ambas as formulações foram necessárias 6 etapas, perfazendo um total de 270 minutos para as nanoemulsões e 276 minutos para as nanocápsulas de fluconazol. A verificação da concentração de fluconazol associado nas nanoemulsões e nanocápsulas após o procedimento de purificação por ultrafiltração foi realizada pelo teste de fármaco total, como descrito em IV.1.2. Os resultados de testes em triplicata são apresentados na tabela 4, expressos em média ± desvio-padrão.

Tabela 4: Determinação da Concentração de Fluconazol associado às Nanoemulsões e Nanocápsulas após purificação por Ultrafiltração/Centrifugação (*n*=3).

Purificação por Ultrafiltração/Centrifugação	**Concentração de Fluconazol associado às NE e NC (μg/mL)**
Nanoemulsões (NE)	478 ± 19,2
Nanocápsulas (NC)	463 ± 20,0

A verificação da concentração de fármaco associado após o procedimento de purificação é necessária, pois mesmo o fármaco associado pode ser retirado durante a purificação e isto vai depender da forma na qual o fármaco está associado às

nanoestruturas. Neste caso foi possível parar o processo e obter resultados na verificação do fármaco que estavam próximos ao percentual de encapsulação obtido na formulação não purificada.

V.2.3.2. OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS DE FLUCONAZOL POR DIÁLISE DIRETA

O procedimento foi realizado como descrito em IV.1.4.2. Resumidamente, tubos de diálise (12.000-14.000MWCO) contendo 1 mL de suspensão de nanoemulsões ou nanocápsulas de fluconazol foram colocados frascos contendo 60 mL de água purificada por osmose reversa (meio de diálise). A concentração de fluconazol no meio de diálise foi determinada por espectrofotometria a 260 nm a cada etapa. A tabela 5 fornece os resultados obtidos em cada etapa deste procedimento de purificação para as nanoemulsões e nanocápsulas, apresentados como concentração de fluconazol (μg) presente em 60 mL de meio de diálise. Os resultados foram expressos como média de leituras de triplicatas ± desvio-padrão.

Tabela 5: Avaliação da Purificação de Nanoemulsões e Nanocápsulas preparadas com 1mg/mL de Fluconazol por Diálise Direta (*n*=3).

Etapas	**Duração** (minutos)	**Concentração de Fluconazol no Meio de Diálise** (μg/ 60 mL)	
		Nanoemulsões	**Nanocápsulas**
Antes da Diálise	0	0	0
1	30	91,2 ± 4,8	91,8 ± 6,6
2	30	183,0 ± 6,6	183,0 ± 9,0
3	30	276,0 ± 7,8	277,8 ± 15,6
4	30	366,0 ± 7,8	366,0 ± 10,8
5	30	456,6 ± 10,8	465,0 ± 22,8
6	15* //20**	502,8 ± 32,4	516,6 ± 37,2
Total	165* //170**	502,8 ± 32,4	516,6 ± 37,2

* duração da etapa 6 para nanoemulsões
** duração em minutos da etapa 6 para nanocápsulas

Foram necessários 165 minutos para retirar o fármaco não associado às nanoemulsões utilizando esta técnica de purificação e a concentração final de fluconazol no meio de diálise foi 502,8 ± 32,4 μg/ 60mL. Para as nanocápsulas foram necessários 170 minutos para retirar o fármaco não associado e a concentração final de fluconazol no meio de diálise foi 516,6 ± 37,2 μg/ 60mL. A verificação da concentração de fluconazol associado nas nanoemulsões ou nanocápsulas após o procedimento de purificação por diálise direta foi realizada pelo teste de fármaco total, como descrito em IV.1.2. Os resultados de testes em triplicata são apresentados na tabela 6 expressos em média ± desvio-padrão.

Tabela 6: Determinação da Concentração de Fluconazol em Nanoemulsões e Nanocápsulas Purificadas por Diálise Direta (*n*=3).

Purificação por diálise direta	Concentração de Fluconazol (μg/mL)
Nanoemulsões	472 ± 28,4
Nanocápsulas	430,4 ± 14,4

A comparação dos resultados obtidos frente aos dois procedimentos utilizados para a purificação de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol revelou que os dois métodos se revelaram equivalentes na eliminação do fluconazol livre, pois os resultados finais não diferem significativamente. Entretanto, a diálise direta apresentou um rendimento maior em função do tempo e a facilidade de adaptação do procedimento de purificação por diálise para volumes maiores de dispersões de nanoestruturas, desde que mantida a mesma relação entre volume de nanoestruturas e meio de diálise, favoreceram sua escolha e utilização na purificação das dispersões de nanoestruturas a serem testadas contra *C. parapsilosis* e *C. albicans*.

Michalowski *et al.* (2004) utilizaram uma técnica de microdiálise na determinação da eficiência de encapsulação e em estudos de liberação do diclofenaco a partir de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões e a avaliação demonstrou que os resultados foram diferentes dos obtidos por ultrafiltração/centrifugação. A microdiálise é uma técnica baseada na difusão passiva de substâncias através de membranas semipermeáveis em um gradiente de concentração. A amostra é mantida em condições *sink* com uma solução sem a substância em análise. Desta forma, o equilíbrio entre a

concentração interna e externa da amostra nunca é atingido. Portanto, uma taxa constante de extração é alcançada e denominada de "recuperação relativa". Este parâmetro depende de diferentes fatores como fluxo de perfusão, intervalos de amostragem, coeficiente de difusão do analito, e, para altas taxas de fluxo, da concentração do analito. O conhecimento da "recuperação relativa" permite calcular a verdadeira concentração do analito no meio externo, e pode ser determinada pela razão entre a concentração do analito no dialisado e no meio externo. No trabalho em questão, os autores atribuem as diferenças obtidas frente aos dois métodos de avaliação citando como principal desvantagem da ultrafiltração/centrifugação o fato de não permitir a diferenciação entre nanoestruturas e nanocristais de fármaco do mesmo tamanho que podem estar presentes na fase externa das dispersões. Devido ao fato da microdiálise ser realizada em condições *sink*, esta técnica poderia promover a dissolução destes nanocristais apresentando resultados menores para a eficiência, mas que, segundo os autores, seriam mais confiáveis. No entanto, os autores relatam que nas condições utilizadas em seu experimento, a microdiálise apresentou uma desvantagem em relação à ultrafiltração/centrifugação, uma vez que a recuperação do fármaco no meio de diálise foi dependente da concentração, uma estimativa prévia da concentração de fármaco livre esperada nas dispersões coloidais seria necessária para pré-determinar a recuperação da amostra em condições adequadas.

A técnica utilizada em nosso trabalho foi a diálise direta, e ela difere da microdiálise no fato de não haver um fluxo contínuo de meio de diálise banhando a amostra contida na membrana semipermeável. Em nosso caso o meio de diálise adicionado ao início do procedimento foi mantido sob agitação e não foi substituído durante toda a avaliação sendo que o procedimento foi antecedido por uma determinação do fármaco livre que deveria ser retirado, fornecendo condições de estabelecer a concentração de fluconazol que representaria o final da purificação por diálise. Em nosso caso, mesmo utilizando a diálise direta, os resultados obtidos nos procedimentos de purificação foram semelhantes aos obtidos por ultrafiltração/centrifugação, diferindo apenas no tempo necessário para a retirada do fármaco não-associado às nanoestruturas.

V.2.4. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS

A análise morfológica por microscopia de força atômica revelou que as nanoestruturas são esféricas e que as nanoemulsões são menores do que as nanocápsulas (tabela 7), diferença que pode ser atribuída à presença do envoltório polimérico nas nanocápsulas. Para ambas as formulações foram possíveis em algumas imagens observar a existência de duas fases diferentes presentes nas nanoestruturas (fig.11 e 12), que poderiam estar correlacionadas ao núcleo oleoso fluido e à presença de envoltório polimérico ao redor de um núcleo no caso das nanocápsulas, ou mesmo de camadas de tensoativos no caso das emulsões (fig.13 e 14). As imagens de nanocápsulas de fluconazol permitiram visualizar estruturas esféricas e em forma de vesícula, sendo perceptível uma boa diferenciação entre envoltório e núcleo destas nanoestruturas nas imagens de fase. O formato esférico e o envoltório capsular foram, portanto, também observados a partir da técnica de MFA, estando de acordo com os resultados obtidos por Leite *et al*., (2005) para nanocápsulas.

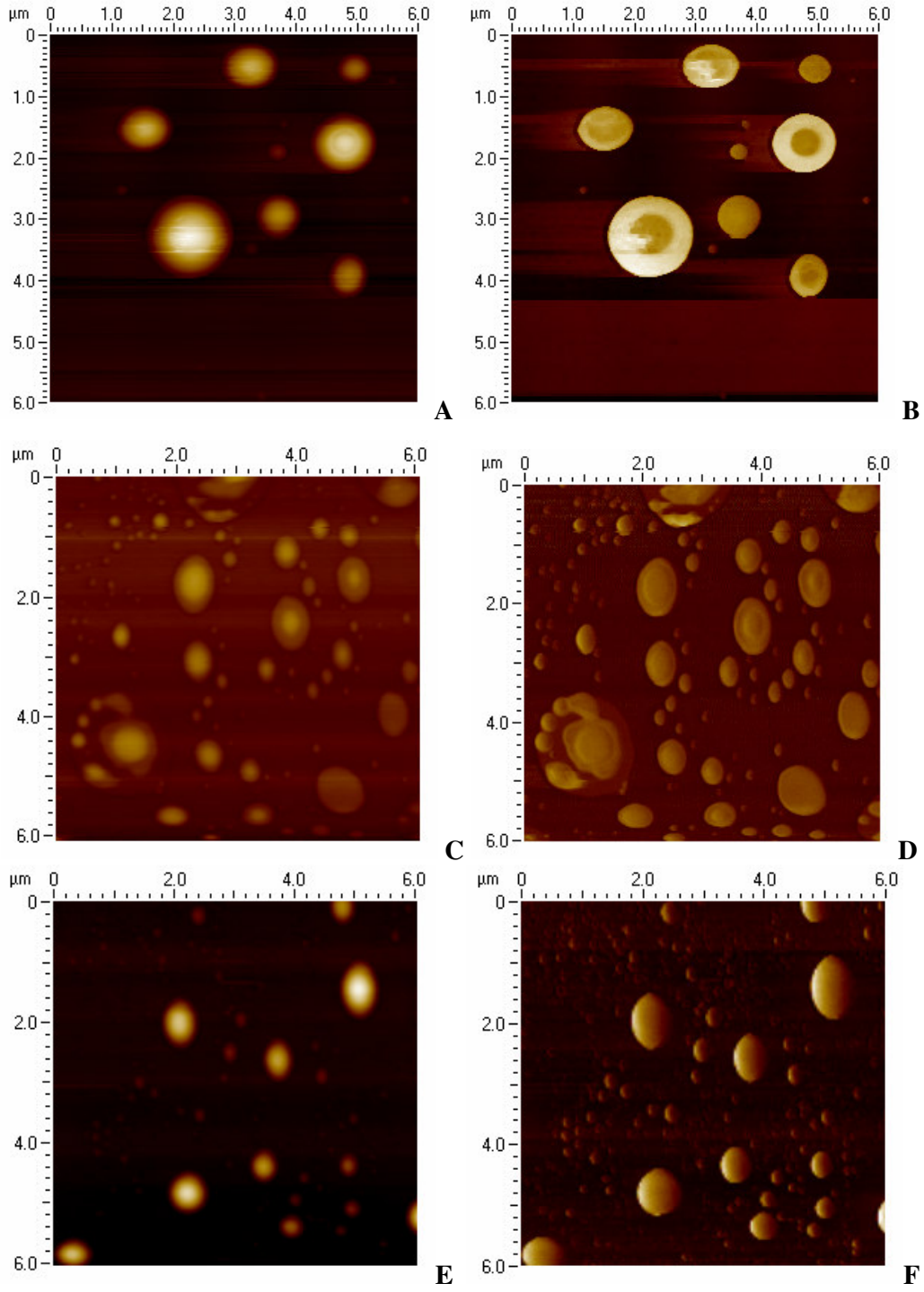


Figura 10: Imagens de nanoemulsões obtidas por varredura por sonda mecânica (MFA). Imagens de altura (A) e de fase (B) de nanoemulsões livres de fármaco*;* imagens de altura (C) e de fase (D) de nanoemulsões contendo fluconazol; imagens de altura (E) e de fase (F) de nanoemulsões contendo fluconazol purificadas por diálise.

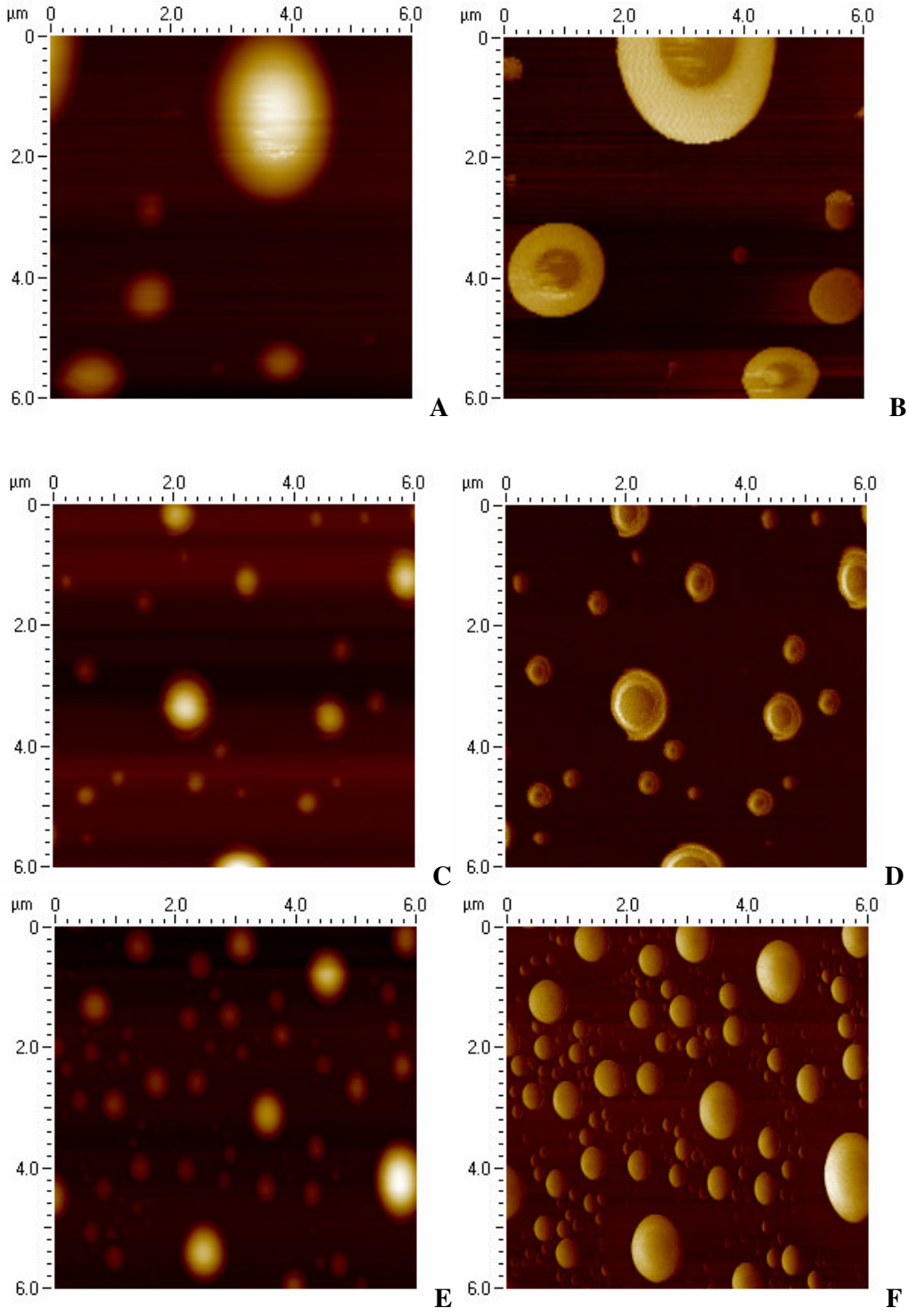


Figura 11: Imagens de nanocápsulas obtidas por microscopia de varredura por sonda mecânica (MFA). Imagens de altura (A) e de fase (B) de nanocápsulas livres de fármaco; imagens de altura (C) e de fase (D) de nanocápsulas contendo fluconazol e

imagens de altura (E) e de fase (F) de nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

Os diâmetros das partículas foram também avaliados a partir as imagens obtidas por MFA. As medições foram realizadas em triplicata e em cada campo avaliado foram medidas 30 partículas. O cálculo do índice de polidispersão foi efetuado utilizando a equação descrita em IV.1.3. Os resultados foram expressos em média ± desvio-padrão e são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Resultados da análise de distribuição de tamanho de nanoemulsões por Microscopia de Força Atômica utilizando o programa de análise de imagens Quantikov®

Amostra	Tamanho médio das partículas (nm) (média ± DP)	Indice de Polidispersão (média ± DP)
NE	256,8 ± 8,9	0,93 ± 0,002
NEF	224,3 ± 13,8	1,48 ± 0,001
NEFD	212,5 ± 6,9	1,18 ± 0,03
NC	315,2 ± 16,1	1,08 ± 0,09
NCF	303,5 ± 8,1	0,67 ± 0,02
NCFD	301,8 ± 12,5	0,94 ± 0,08

NE = nanoemulsões livres de fármaco; **NEF** = nanoemulsões contendo fluconazol associado; **NEFD** = nanoemulsões contendo fluconazol associado purificadas por diálise;**NC** = nanocápsulas livres de fármaco; **NCF** = nanocápsulas contendo fluconazol associado;**NCFD** = nanocápsulas contendo fluconazol associado purificadas por diálise. (n=30).

Quando comparados aos resultados obtidos utilizando a técnica de PCS percebemos que os tamanhos médios obtidos utilizando as imagens por MFA foram maiores. O índice de polidispersão também foi maior indicando amostras heterogêneas e polidispersas. Como descrito em IV.1.3, para a avaliação morfológica das estruturas por microscopia de força atômica foi necessário secar as amostras depositadas sobre a mica utilizando jato de Argônio e este procedimento pode promover o achatamento de algumas estruturas, fazendo com que pareçam maiores. Avaliações morfológicas de nanoestruturas foram realizadas por Fessi *et al*. (2005) e Leite *et al*. (2005), e os autores relataram que tanto as nanoemulsões quanto as nanocápsulas apresentaram uma razão diâmetro/ altura muito superior a 1, o que indica a capacidade de achatamento destas nanoestruturas sobre a mica utilizada nas análises por MFA. As determinações de tamanho de partículas por PCS fornecem como resultado os raios hidrodinâmicos das

partículas, e há relatos na literatura sugerindo que estes resultados correspondam melhor ao tamanho real das partículas (Zili *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos em nossas avaliações fornecem evidências da maleabilidade das membranas de tensoativos ou poliméricas que revestem as nanoemulsões e nanocápsulas respectivamente. Este é um aspecto relevante, considerando a importância da capacidade de deformação das nanoestruturas para atravessarem poros quando em contato com sistemas vivos.

V.2.5. ESTUDO DE ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS

As dispersões de nanoestruturas foram armazenadas por 12 meses e submetidas a avaliações de estabilidade quanto a alterações macroscópicas, que poderiam ocorrer por precipitação do fármaco e/ou das nanoestruturas ou por coalescência das partículas. Outras avaliações incluíram teste de contaminação microbiológica, caracterização de tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, pH e percentual de encapsulação.

Durante o período analisado não foram detectadas alterações nas características macroscópicas. Entretanto, mesmo armazenadas após filtração em filtro 0,45 μm (Millipore), algumas nanoestruturas apresentaram contaminação microbiológica após 3 meses de armazenamento a 4°C. As nanoestruturas que não apresentaram contaminação microbiológica foram submetidas a análises de estabilidade como descrito em IV.1.6. e os resultados foram apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Avaliação de pH e estabilidade microbiológica de nanocápsulas e nanoemulsões em função do tempo de armazenamento

Tempo de armazenamento	*Tipo de Análise*	*Tipos de Nanoestruturas*					
		NE	**NEF**	**NEFD**	**NC**	**NCF**	**NCFD**
3 meses	Contaminação microbiológica	-	-	+	-	-	+
	pH	5,2	5,3	5,0	5,2	5,3	5,0
6 meses	Contaminação microbiológica	-	-	nd	-	-	nd
	pH	5,1	5,1	nd	5,1	5,1	nd
9 meses	Contaminação microbiológica	-	-	nd	+	+	nd
	pH	5,0	4,9	nd	4,7	4,7	nd
12 meses	Contaminação microbiológica	+	-	nd	nd	nd	nd
	pH	4,0	4,8	nd	nd	nd	nd

NE = nanoemulsões livres de fármaco; **NEF** = nanoemulsões de fluconazol; **NEFD** = nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise; **NC** = nanocápsulas livres de fármaco; **NCF** = nanocápsulas de fluconazol; **NCFD** = nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise. **nd=** as determinações nas amostras de nanoestruturas positivas para contaminação microbiológica não foram realizadas (n=3).

As nanoestruturas purificadas por diálise foram as que apresentaram menor estabilidade microbiológica, enquanto as nanoemulsões de fluconazol se apresentaram como as mais estáveis. A retirada do fármaco da fase externa das formulações submetidas à purificação por diálise tornou-as mais susceptíveis ao crescimento microbiano, evidenciando, portanto, a influência do fluconazol como conservante da formulação, sendo a contaminação fúngica mais freqüente.

Alterações do pH das formulações podem ser devidas à degradação do polímero, como relatado por Schaffazick *et al* (2003). Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram a ocorrência de alteração do pH durante o armazenamento sugerindo a ocorrência de fenômenos de degradação.

Os resultados da avaliação de tamanho médio e índice de polidispersão foram apresentados na tabela 9, como média ± desvio-padrão.

Tabela 9: Comparação das Características Físico-Químicas de Nanocápsulas e Nanoemulsões ao preparo e após 3 meses de armazenamento

Tipo de Nanoestruturas	*Tempo de armazenamento*	*Tipos de Análise*		
		Tamanho médio (nm)	**Índice de Polidispersão**	**Encapsulação (%)**
NE	**48 horas**	178,1 ± 2,1	0,150 ± 0,01	-
	3 meses	192,9 ± 1,4	0,114 ± 0,02	-
NEF	**48 horas**	139,8 ± 0,4	0,109 ± 0,01	48,9 ± 0,4
	3 meses	171,6 ± 1,5	0,111 ± 0,02	36,6 ± 1,5
NEFD	**48 horas**	138,1 ± 1,5	0,149 ± 0,01	47,2 ± 2,8
	3 meses	157,7 ± 0,7	0,152 ± 0,01	nd
NC	**48 horas**	210,8 ± 2,8	0,139 ± 0,02	-
	3 meses	214,8 ± 1,7	0,102 ± 0,01	-
NCF	**48 horas**	207,3 ± 0,5	0,137 ± 0,01	44,9 ± 0,2
	3 meses	208,0 ± 1,1	0,103 ± 0,01	28,0 ± 1,4
NCFD	**48 horas**	204,4 ± 0,8	0,138 ± 0,01	43,0 ± 1,4
	3 meses	210,5 ± 1,1	0,097 ± 0,01	nd

nd = as determinações nas amostras de nanoestruturas positivas para contaminação microbiológica não foram realizadas; (*n*=3).

A comparação dos tamanhos médios das nanoestruturas após 48 horas ou após 3 meses de armazenamento a 4°C demonstrou aumento de tamanho significativo para as nanoemulsões, enquanto que os tamanhos médios das nanocápsulas não apresentaram diferença significativa. As variações nos índices de polidispersão apresentaram diferença significativa para nanoemulsões livres de fármaco e para todos os tipos de nanocápsulas, sendo que os valores reduziram com o tempo. Os percentuais de encapsulação das nanoemulsões e das nanocápsulas de fluconazol sofreram alterações e em ambos os casos as alterações foram significativas ($P < 0,05$), sugerindo a ocorrência de redução do fármaco associado às nanoestruturas armazenadas sob as condições relatadas neste trabalho.

Muller *et* al (2004) estudaram a degradação e a estabilização de diclofenaco em suspensões de nanocápsulas de poli-caprolactona produzidas pelo método de nanoprecipitação, submetidas ou não à secagem total por evaporação. Os autores avaliaram a influência da composição do sistema de tensoativos, empregados para a

formulação dos produtos, com vista ao aumento da estabilidade dos sistemas. Das seis formulações testadas, duas permaneceram estáveis quimicamente durante os 14 meses de estudo. A análise dos resultados demonstrou que a estabilidade dos colóides foi afetada pelo tipo e concentração dos tensoativos, sendo que as suspensões mostraram-se mais instáveis que os seus produtos secos correspondentes. Também foi verificado, tanto para as formas líquidas como para as sólidas, que a presença de Epikuron 170® acima da concentração de 3,06 mg/mL, na preparação das suspensões, impediu a diminuição do teor de diclofenaco, evitando a agregação do fármaco e/ou exercendo um efeito protetor contra uma possível degradação do diclofenaco.

Akkar *et al.* (2003) prepararam nanoemulsões de itraconazol que permaneceu estável por 3 meses à temperatura ambiente, sem apresentar alterações significativas de tamanho ou de índice de polidispersão, entretanto, as nanoemulsões foram preparadas por esses autores utilizando a técnica SolEmuls®, diferente da nanoprecipitação.

Chasteigner *et al*. (1996) avaliaram a estabilidade físico-química de nanoesferas de poli-ε-caprolactona contendo itraconazol, entretanto não obtiveram suspensões estáveis, pois houve diminuição do teor de fármaco associado às nanoestruturas com o passar do tempo. Os resultados sugeriram que o itraconazol foi associado à matriz polimérica e adsorvido à superfície das partículas e isto poderia explicar a instabilidade destas nanoesferas com o tempo devido à contínua liberação do fármaco a partir das nanoestruturas, embora não tenha sido observada modificação no tamanho das partículas. Apesar de diferentes, as formulações preparadas em nosso trabalho também utilizaram o polímero poli-ε-caprolactona e apresentaram diminuição no teor de fármaco associado às nanoestruturas após 3 meses de armazenamento a 4°C, sugerindo que o fármaco possa estar também associado às nanoestruturas de diferentes maneiras .

RESULTADOS E DISCUSSÃO
PARTE 2:
ESTUDOS DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Candida* spp. EM MICRODILUIÇÃO

V.3. ESTUDOS DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* AO FLUCONAZOL EM MICRODILUIÇÃO

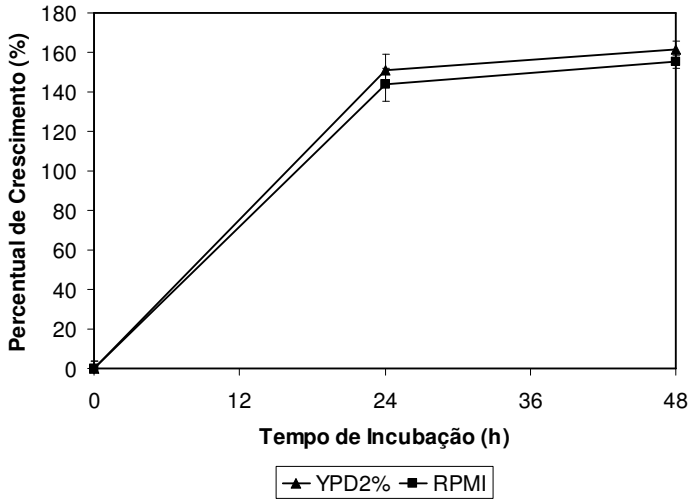


Figura 12: Avaliação do crescimento de *C. parapsilosis* ATCC 22019 em RPMI e YPD2% determinada por espectrofotometria em 570nm após 24 e 48h de incubação (*n*=9).

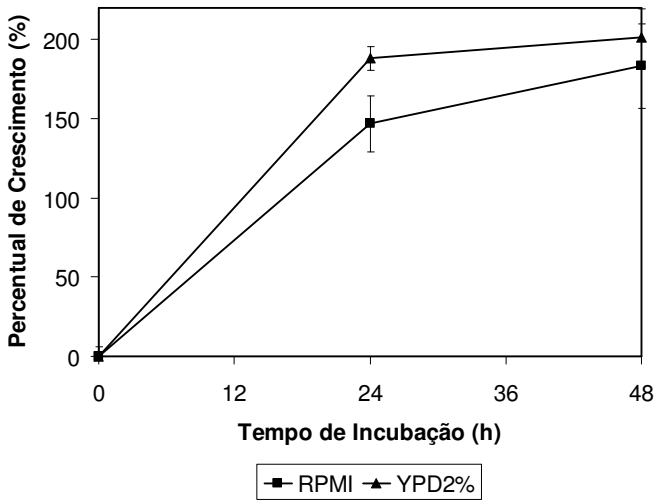
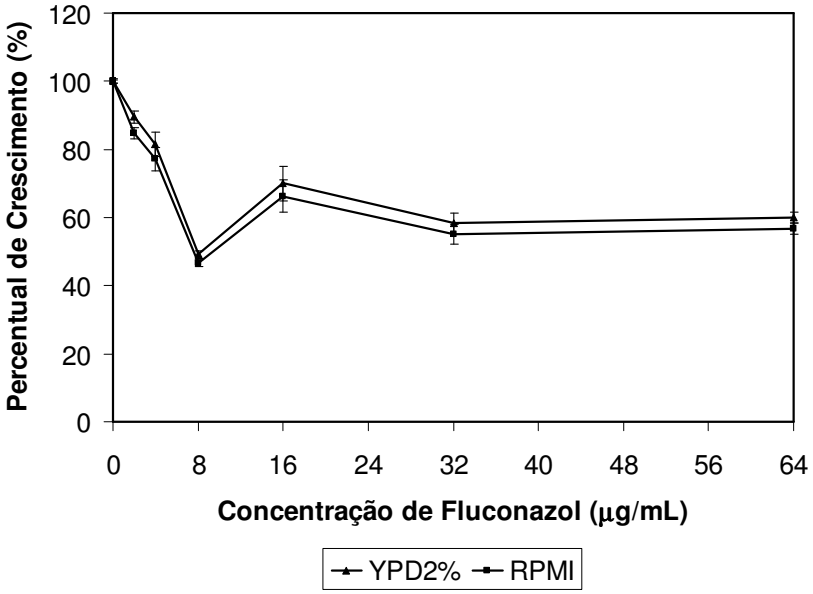


Figura 13: Avaliação do crescimento de *C. albicans* ATCC 18804 em RPMI e YPD2% determinada por espectrofotometria em Leitor de microplacas após 24 e 48h de incubação (*n*=9).

A avaliação em diferentes meios objetivou verificar possíveis diferenças no comportamento da cepa em função do meio de crescimento. Apesar da diferença na composição dos meios, em ambos a concentração de glicose foi 2%. Para *C. albicans* ATCC 18804 houve diferença significativa no crescimento em 24 horas de incubação, mas em ambos os meios, as curvas apresentarem um perfil semelhante. No meio RPMI a *Candida albicans* atinge mais rapidamente a fase estacionária de crescimento. Para *C. parapsilosis* os resultados obtidos não demonstraram haver diferença significativa no crescimento. A cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 é uma das cepas listadas para controle de qualidade em testes de susceptibilidade a antifúngicos realizados de acordo com a M27-A2 (Pfaller, 1994; Barry, 2000; NCCLS/CLSI, 2005).

V.3.1. ESTUDOS DE SUSCEPTIBILIDADE AO FLUCONAZOL LIVRE

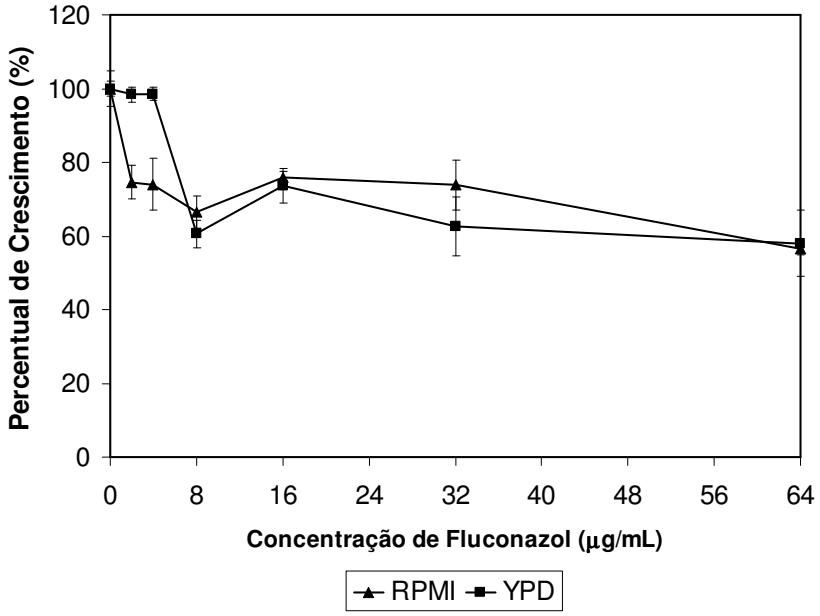
O meio RPMI é um meio sintético indicado para a realização de testes de susceptibilidade de leveduras aos antifúngicos segundo a norma M27-A2 do NCCLS/CLSI. A comparação do comportamento das cepas frente aos meios RPMI e YPD2% foi realizada para avaliar a viabilidade de utilização do meio YPD2% para os testes posteriores. A avaliação pelo método visual, como sugerido na M27-A2 do NCCLS/CLSI, resultou em redução da turbidez na concentração 8 μg/mL após 24 horas em ambos os meios de crescimento. Os resultados estão apresentados nas figuras 16 e 17.



Concentração de Fluconazol (µg/mL)	YPD2% (média ± DP)	RPMI* (média ± DP)
0	100 ± 0,61	100 ± 0,58
2	89,53 ± 1,69	84,78 ± 1,60
4	81,53 ± 3,57	77,21 ± 3,38
8	49,17 ± 1,11	46,56 ± 1,05
16	70,03 ± 4,98	66,32 ± 4,72
32	58,3 ± 3,11	55,21 ± 2,95
64	59,87 ± 1,65	56,70 ± 1,56

Figura 14: Resultados do teste de susceptibilidade de *C.parapsilosis* ATCC 22019 ao fluconazol livre nas concentrações 2,4,8,16,32,64 µg/mL pelo método de microdiluição em meio RPMI* e YPD2%. As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas sem agitação. *Meio RPMI suplementado com glicose 1,8 g/L. Os valores representam o percentual médio de crescimento ± desvio-padrão de triplicatas (n=9). Para ambos os meios o inóculo na ausência de fármaco foi utilizado como controle 100%.

Os resultados obtidos para *C. parapsilosis* ATCC 22019 demonstraram não haver diferença significativa na susceptibilidade da cepa ao fluconazol frente aos diferentes meios ($P < 0.05$). A CIM_{50} encontrada em nossos experimentos foi de 8µg/mL. Valores de CIM_{50} semelhantes para a mesma cepa estão relatados na literatura (Barry, 2000; Pfaller, 1994; NCCLS/CLSI, 2005).



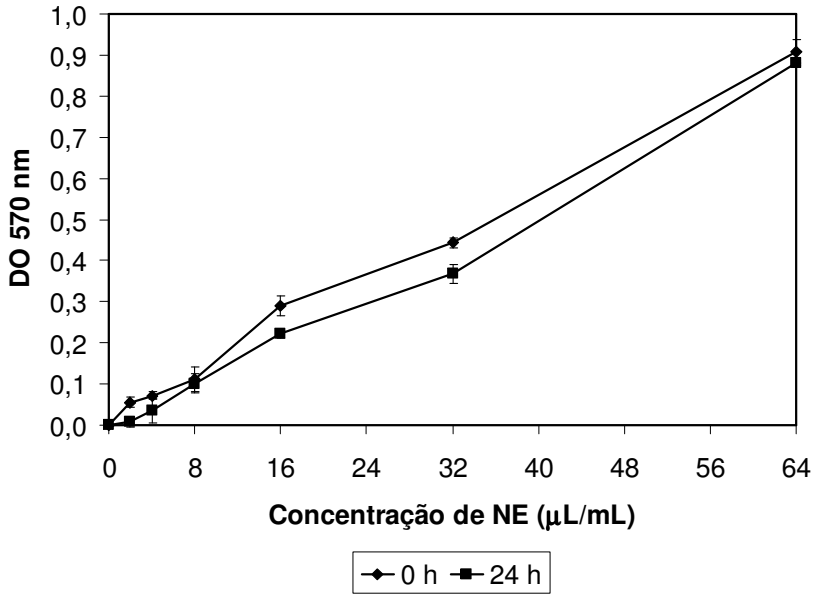
Concentração de Fluconazol (µg/mL)	YPD2% (média ± DP)	RPMI* (média ± DP)
0	100 ± 2,15	100 ± 4,95
2	98,40 ± 4,46	74,61 ± 2,07
4	98,60 ± 4,06	74,04 ± 1,88
8	60,56 ± 4,43	66,40 ± 3,71
16	73,63 ± 1,78	74,84 ± 4,71
32	62,67 ± 6,85	73,82 ± 7,98
64	57,98 ± 1,79	56,63 ± 8,98

Figura 15: Resultados do teste de susceptibilidade de *C. albicans* ATCC 18804 ao fluconazol livre pelo método de microdiluição em meio RPMI e YPD2%. As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas sem agitação. ***** Meio RPMI suplementado com glicose 1,8 g/L. Os valores representam o percentual médio de crescimento ± desvio-padrão (*n*=9). A cepa inoculada em cada um dos meios na ausência de fármaco foi utilizada como controle 100%.

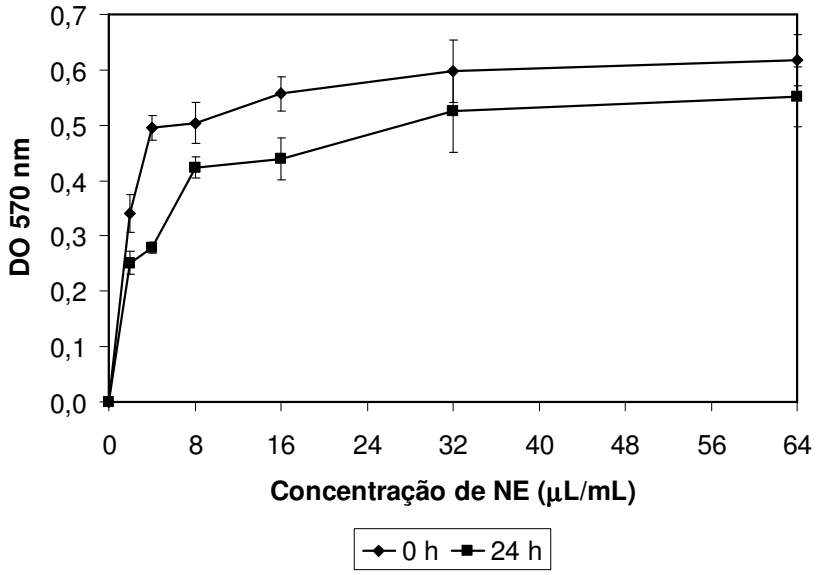
Para *C. albicans* ATCC 18804 houve diminuição proeminente do crescimento frente à concentração 8 µg/mL de fluconazol, havendo boa correlação entre os resultados nos meios utilizados. Não foram encontrados na literatura consultada relatos sobre a susceptibilidade desta cepa ao fluconazol.

Frente aos resultados obtidos nesta avaliação optou-se pela utilização do meio YPD2% .

V.3.2. INFLUÊNCIA DA TURBIDEZ DAS NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES SOBRE A PRECISÃO DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO



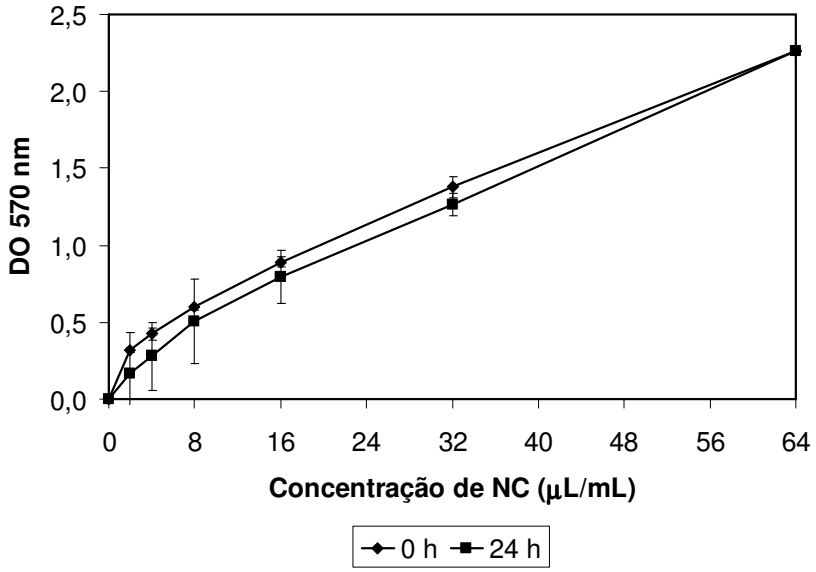
(A)



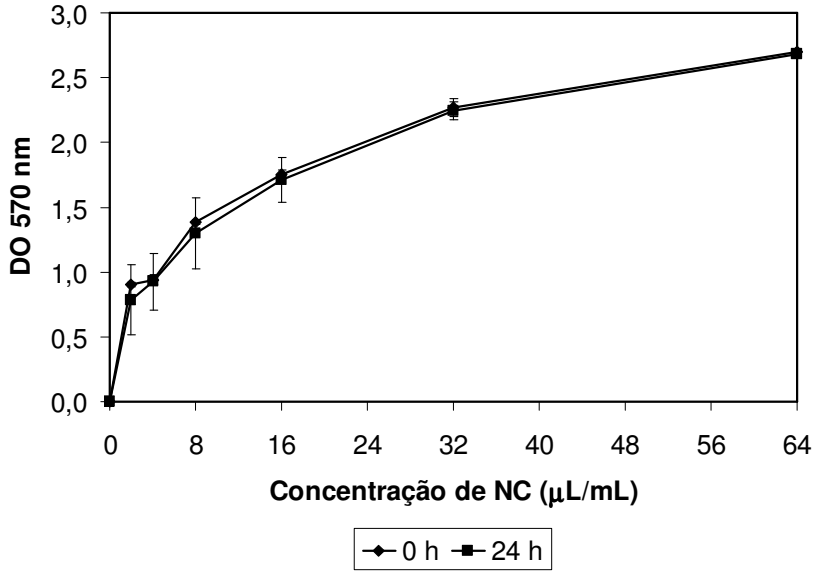
(B)

Figura 16: Avaliação da turbidez dos meios RPMI (A) e YPD2% (B) em função das concentrações de nanoemulsões (NE) por 24 horas. As nanoestruturas foram adicionadas em volumes correspondentes à presença de 2,4,8,16,32 e 64 µg/mL de fluconazol. A determinação da densidade óptica foi realizada por espectrofotometria a 570 nm em leitor de microplacas (*n*=9).

As formas nanoestruturadas preparadas neste trabalho apresentaram coloração branca leitosa e foi necessária uma avaliação dos efeitos de sua adição na densidade óptica do meio de cultura. Esta verificação foi realizada antes da avaliação de susceptibilidade das cepas de *Candida* spp. frente às formulações nanoestruturadas. O teste para a verificação da influência da turbidez ocasionada pela adição das nanocápsulas (NC) e nanoemulsões (NE) sobre a precisão do método de microdiluição foi realizado em microplacas de 96 poços em formato de U. Os poços das microplacas foram preenchidos com meio YPD2% ou RPMI e as nanoestruturas foram adicionadas nas várias concentrações a serem testadas na ausência de inóculo. Observou-se que a turbidez das nanoemulsões interfere bastante nos valores de densidade ótica nas concentrações das partículas utilizadas e que a influência é praticamente linear em relação à concentração no meio RPMI e que no meio YPD2% observa-se na concentração equivalente a 4 μg/mL ocorre uma saturação do meio e a DO não varia mais linearmente acima deste valor (DO=0,65). Outra observação interessante é a provável degradação do sistema nos diferentes meios após 24 horas de incubação, uma vez que a turbidez do meio diminui indicando uma instabilidade e degradação parcial do sistema durante este período.



(A)



(B)

Figura 17: Avaliação da turbidez dos meio RPMI (A) e YPD2% (B) em função das concentrações de nanocápsulas (NC) por 24 horas. As nanoestruturas foram adicionadas em volumes correspondentes à presença de 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL de fluconazol. A determinação da densidade óptica foi realizada por espectrofotometria a 570 nm em leitor de microplacas (*n*=9).

A adição das formas nanoestruturadas promoveu um aumento na densidade óptica (DO) do meio de cultura. Houve uma linearidade no aumento da DO para as nanoemulsões em RPMI em função do aumento da concentração e foi possível perceber uma redução desta DO em função do tempo para nanoemulsões. A comparação de influência das partículas frente aos diferentes meios de cultura em função do tempo demonstrou que no RPMI há diferença significativa na DO_{570} nm em 0 e 24 horas em algumas concentrações, principalmente para as nanoemulsões. Entretanto para as nanocápsulas a diferença de turbidez no meio foi muito pequena durante 24 horas no meio RPMI. Para o meio YPD2% não houve diferença significativa, sugerindo uma maior estabilidade das nanocápsulas neste meio de cultura. Em RPMI observa-se que para concentrações de nanocápsulas equivalentes a 32μg/mL ocorre a saturação do meio com perda de linearidade em densidades óticas acima de 1,5 enquanto que em YPD2% a saturação ocorre a 8μg/mL em valores de DO de aproximadamente 1,5. Portanto, as nanoestruturas parecem interferir mais na turbidez do meio YPD2% do que no meio RPMI.

Em experimentos posteriores duas opções de metodologia foram utilizadas para se evitar essas interferências: uma delas seria eliminar o efeito de turbidez das nanoestruturas utilizando-se experimentos paralelos em microplacas "controle". Outra opção foi a realização de contagem de células em microscópio em câmara de Neubauer, pois as nanopartículas não podem ser observadas em microscópios óticos e não interferem na contagem de células. Sendo assim, na expectativa de eliminar a influência das nanoestruturas na turbidez do meio de cultura, para cada experimento realizado para determinação de susceptibilidade em microdiluição por turbidimetria a 570 nm, foram preparadas microplacas "controle" sem inóculo e contendo as nanoestruturas em YPD2% nos mesmos volumes a serem testados contra as suspensões de células. Os resultados da verificação da DO_{570} nm em Leitor de microplacas foram utilizados como "branco" na leitura da DO_{570} nm das microplacas inoculadas, e as figuras 20 a 22 e 24 a 26 referem-se às leituras de placas inoculadas utilizando este método para a determinação da susceptibilidade das *Candida* às nanoestruturas utilizadas.

V.3.3. Estudo da SUSCEPTIBILIDADE de *Candida* ÀS NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS

Para cada cepa foram apresentados os resultados dos testes de susceptibilidade em percentual de crescimento após 24 horas de incubação comparativamente aos inóculos iniciais. As nanoestruturas foram utilizadas sem purificação ou purificadas por diálise. Os inóculos iniciais foram preparados de acordo com a Norma M27-2A para microdiluição, como descrito em IV.2.1.3., estando a DO_{570} nm inicial entre 0,05 e 0,1. O percentual de crescimento foi avaliado para cada concentração de fármaco e para os volumes correspondentes em nanoestruturas aos quais as cepas foram submetidas, estabelecendo comparações entre a ação do fármaco livre ou na forma de nanoestruturas e utilizando como controle a curva de crescimento das cepas em meio sem adição de fármaco. Para cada experimento foram preparadas as microplacas "controle" com as nanoestruturas em YPD2% nas mesmas concentrações a serem testadas contra as suspensões de células, servindo de "branco" para as placas inoculadas. Para a concentração 8 μg/mL a contagem de células em Câmara de Neubauer foi efetuada para a certificação dos resultados.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Candida parapsilosis* EM PRESENÇA DE NANOCÁPSULAS PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO COM DETERMINAÇÃO TURBIDIMÉTRICA A 570 nm

Para a realização dos testes as nanocápsulas de fluconazol (NCF) foram adicionadas ao meio de crescimento em volumes correspondentes à presença de 2, 4, 8, 16, 32, ou 64 μg/mL de fluconazol livre (FLU) utilizando fatores de correção aplicados a cada formulação em função dos percentuais de encapsulação e dos procedimentos de purificação. As nanocápsulas livres de fármaco foram adicionadas em volumes iguais aos utilizados para as nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise, ambas representando os volumes máximos de nanoestruturas testados em suspensão. As curvas de crescimento de *C. parapsilosis* em presença de fluconazol (FLU) nas mesmas concentrações em μg/mL e também na ausência de fármaco (*C. parapsilosis*) foram utilizadas como controles.

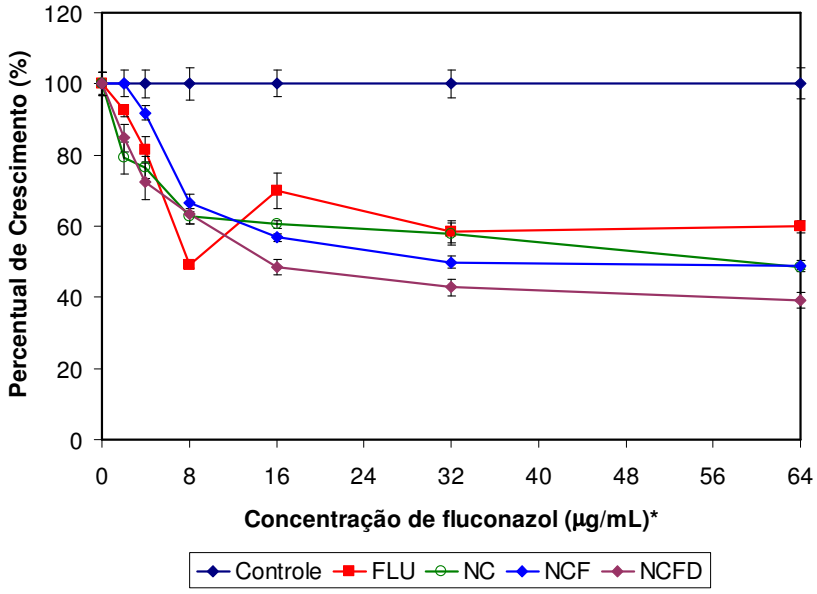


Figura 18: Percentual de crescimento de *C. parapsilosis* em YPD2% em função da concentração de fluconazol livre ou de nanocápsulas em 24 horas de incubação (*n*=9).
C. parapsilosis: curva controle; FLU: fluconazol livre; NC : nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

Comparando os resultados percebemos que as formulações de nanocápsulas (NCF) promoveram um efeito menor nos volumes correspondentes a 2, 4 e 8 µg/mL quando comparados aos ocasionados pela presença do fármaco livre (FLU) e que para os volumes correspondentes a 16, 32 e 64 µg/mL de fluconazol livre as nanocápsulas apresentaram efeitos semelhantes ou superiores aos do fármaco livre. Entretanto, as concentrações de formulações para inibição de 50% do crescimento celular foram de aproximadamente 8µg/mL para o fluconazol livre, 16µg/mL para as nanocápsulas de fluconazol dialisadas, 32µg/mL para as nanocápsulas de fluconazol sem purificação e de aproximadamente 54µg/mL para as nanocápsulas livres de fármaco. O efeito das nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise (NCFD) foi significativamente maior que o obtido em presença de fluconazol livre nas concentrações acima de 16 µg/mL. A presença de NCFD no meio de crescimento promoveu redução da turbidez em função do aumento da concentração, sugerindo uma ação efetiva destas nanoestruturas quando comparada às nanocápsulas de fluconazol sem purificação.

Vários mecanismos podem estar envolvidos na ação de formas nanoestruturadas sobre a susceptibilidade celular de parasitas. As nanoestruturas podem ficar adsorvidas à superfície das células modificando o perfil de trocas através da membrana celular, o fármaco pode ser liberado na superfície das células, ou ser liberado intracelularmente quando as partículas são internalizadas por algum mecanismo específico (Schaffazick, 2003).

Mesmo na ausência de fármaco, foi possível verificar ação significativa das nanoemulsões e nanocápsulas sobre o percentual de crescimento das cepas, podendo ser devida à presença do tensoativo Poloxamer na composição das formulações. Há relatos na literatura sobre a ação antimicrobiana do tensoativo Poloxamer 188 contra *Leishmania donovani*, sendo capaz de reduzir em 30% o número de promastigotas quando presente na concentração 125 mg/mL (Espuelas *et al.*, 2000). O poloxamer 188 poderia atuar como inibidor da glicoproteína P, responsável por fenômenos de resistência e aumentar a absorção do fármaco, como revisado por Kwon & Okano (1999). Há também na literatura relatos de efeitos inibitórios da presença de nanocápsulas poliméricas *brancas* contra *Candida spp,* a diferença em relação ao nosso trabalho é que foram realizados testes em células epiteliais. Os resultados relatados pelos autores revelam um mecanismo de diminuição da capacidade de adesão destas células em função da presença de nanoestruturas poliméricas (McCarron *et al.*, 2004). Por outro lado, a literatura sugere que os tensoativos não-iônicos podem inibir o transporte de efluxo de drogas através do aumento da fluidez da membrana, o que induz a mudanças conformacionais na atividade de PgP e de ATPases (Batrakova *et al.*, 2001).

É importante ressaltar que os volumes utilizados das nanoestruturas livres de fármaco foram correspondentes aos maiores volumes de nanoestruturas testados para cada concentração e que estas nanoestruturas não foram submetidas ao procedimento de purificação tendo, portanto, maiores percentuais de tensoativo do que todas as outras formulações. Os relatos na literatura sugerem que a presença do Poloxamer 188® nas nanoestruturas utilizadas em nosso trabalho poderia ocasionar um efeito antimicrobiano sobre *Candida spp*.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Candida parapsilosis* EM PRESENÇA DE NANOEMULSÕES PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO COM DETERMINAÇÃO TURBIDIMÉTRICA A 570 NM

Para a realização dos testes, as nanoemulsões de fluconazol foram adicionadas ao meio de crescimento em volumes correspondentes à presença de 2, 4, 8, 16, 32, ou 64 µg/mL de fluconazol livre (FLU) utilizando fatores de correção aplicados a cada formulação em função dos percentuais de encapsulação e dos procedimentos de purificação. As nanoemulsões livres de fármaco foram adicionadas em volumes iguais aos utilizados para as nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise, ambas representando os volumes máximos de nanoestruturas testados em suspensão. As curvas de crescimento de *C. parapsilosis* em presença de fluconazol (FLU) nas mesmas concentrações em µg/mL e também na ausência de fármaco foram utilizadas como controles. Os resultados foram apresentados na figura 19.

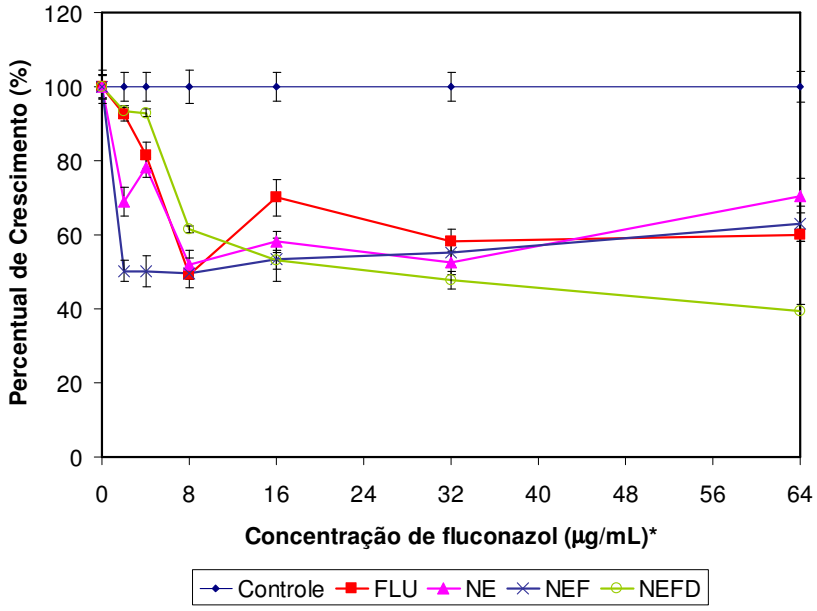


Figura 19: Percentual de crescimento de *C. parapsilosis* em YPD2% em função da concentração de nanoemulsões em 24 horas de incubação (*n*=9). NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise.

As concentrações de formulações para inibição de 50% do crescimento celular foram de aproximadamente 8μg/mL para o fluconazol livre, 22μg/mL para as nanoemulsões de fluconazol dialisadas, 2μg/mL para as nanoemulsões de fluconazol sem purificar e de aproximadamente 8μg/mL para as nanoemulsões livres de fármaco. Analisando-se os resultados percebemos que as formulações de nanoemulsões de fluconazol (NEF) foram as mais ativas em concentrações inferiores a 8μg/mL ($P < 0,05$). As nanoemulsões livres de fármaco foram tão ativas quanto o fluconazol livre na concentração de 8μg/mL, o que indica que o sistema possui um efeito na redução do crescimento de *C. parapsilosis*, por uma mecanismo ainda não identificado. Para todas as formulações a redução do crescimento de *C. parapsilosis* não é dose dependente a partir de aproximadamente 8μg/mL, o que indica que esse microorganismo exprime algum mecanismo de resistência a partir desse limiar de concentração. Isso pode também ser observado na figura 16, onde o mesmo perfil de crescimento acontece de forma dose independente a partir de 8μg/mL, em dois diferentes meios de cultivo. Provavelmente o estímulo devido à presença do fármaco em concentrações maiores, desencadeia uma resposta celular que resulta em uma inibição limitada do crescimento acima desses valores. As nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise (NEFD) inibiram o crescimento dessa espécie de *Candida* de forma diferenciada na concentração de 64μg/mL ($P < 0,05$), como acontece com as nanocápsulas de fluconazol dialisadas (NCFD) a partir de 16μg/mL ($P < 0,05$). De fato, como pode ser observado na figura 19, não há diferença ($P > 0,05$) entre as duas formulações acima de 8μg/mL.

A diferença entre as nanoestruturas dialisadas das não dialisadas se refere à ausência de fluconazol livre no meio externo e ao menor teor de tensoativos na fase externa da suspensão coloidal. Algum mecanismo específico de adsorção dessas formulações à superfície da *Candida* poderia explicar esse fato, o que aumentaria a transferência do fármaco para o microorganismo de forma diferenciada. Os resultados observados indicam que isso poderia acontecer em baixos teores de tensoativos, uma vez que a presença dos poloxamers confere às nanoestruturas uma estabilização estérica que impediria, ou mesmo reduziria o contato das nanoestruturas com a superfície celular.

A presença de nanoemulsões livres de fármaco no meio de cultura foi também capaz de promover redução no crescimento da cepa, apesar de ser inferior à ação do fármaco na maioria das concentrações. Há relatos na literatura do desenvolvimento e utilização de nanoemulsões antimicrobianas *brancas* contra *Candida* spp. (Hamouda *et al.*, 1999; Hamouda & Baker, 2000; Hamouda *et al.*, 2001; Myc, 2003) e os resultados apresentaram efeitos inibitórios a partir da concentração 0,1% v/v. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostraram que as células tratadas com as nanoemulsões supracitadas perderam sua forma arredondada e sua integridade devido à sua coalescência com as gotículas de emulsão presentes no meio.

As formulações relatadas por Hamouda *et al.* eram diferentes das formulações utilizadas em nossos experimentos por serem nanoemulsões de fase interna aquosa e fase externa oleosa (A/O), e em nosso caso as nanoemulsões são O/A, ou seja, de fase interna oleosa e fase externa aquosa. Em nosso trabalho foram utilizados volumes de 0,41 a 13% (v/v) no meio de crescimento e também foram observados efeitos inibitórios devidos à presença das nanoemulsões livres de fármaco. Como no caso das nanocápsulas livres de fármaco (NC), as nanoemulsões livres de fármaco (NE) não foram submetidas à purificação por diálise e foram adicionadas ao meio de crescimento em volumes iguais aos utilizados para as nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise, de forma a representarem o maior volume de nanoestruturas testado e possibilitar comparações posteriores.

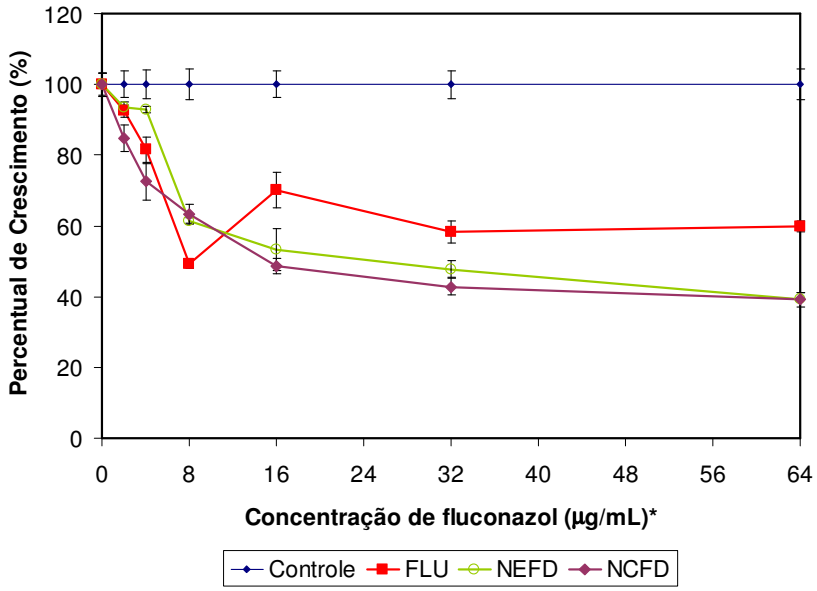


Figura 20: Percentual de crescimento de *C. parapsilosis* em YPD2% em função da concentração de nanocápsulas ou nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise em 24 horas de incubação (*n*=9). NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

Os resultados mostraram que os efeitos ocasionados pelas nanocápsulas (NCFD) foram superiores aos obtidos frente às nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise (NEFD) no volume correspondente a 2 µg/mL de fluconazol livre. Para os volumes restantes os efeitos não foram significativamente diferentes, embora para ambas as formulações os efeitos tenham sido significativamente superiores aos ocasionados pela presença do fluconazol livre.

Posteriormente, realizamos a certificação dos resultados obtidos nos testes em microdiluição com determinação turbidimétrica a 570 nm por contagem de células em Câmara de Neubauer utilizando alíquotas de 5 µL das suspensões celulares submetidas ao tratamento com as nanoestruturas no volume correspondente à presença de 8 µg/mL de fluconazol livre sendo esta a Concentração Inibitória Mínima verificada para exercer inibição do crescimento da cepa *C. parapsilosis* utilizada nestes experimentos. Os resultados são apresentados na figura 21.

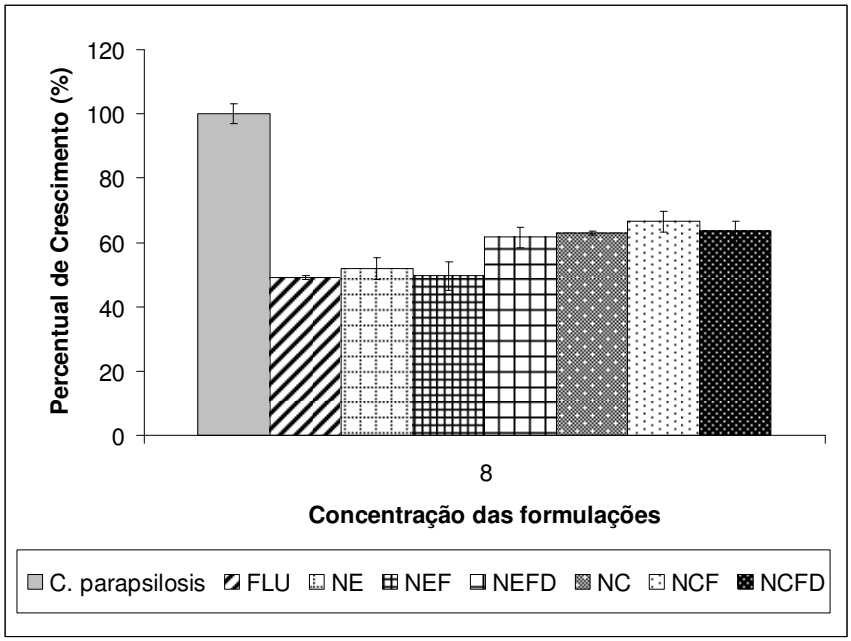


Figura 21: Comparação dos resultados obtidos por contagem de células em Câmara de Neubauer referentes ao crescimento de *C. parapsilosis* em YPD2% após 24h de incubação na ausência de fármaco ou em presença de 8μg/mL de fluconazol livre (FLU) ou de volumes correspondentes das formas nanoestruturadas (n=9). NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise. NC: nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

Para a concentração analisada, os resultados demonstraram que a ação do fluconazol livre foi superior ação de todas as formas nanoestruturadas, excetuando as nanoemulsões de fluconazol sem purificação e as nanoemulsões livres de fármaco onde não há diferença significativa quando comparada à presença do fármaco livre. Para as demais formulações a inibição do crescimento foi menor que o fluconazol livre. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por determinação turbidimétrica da susceptibilidade de *C. parapsilosis* em microdiluição, sendo que o método turbidimétrico utilizado com os controles adequados pareceu ser confiável para o uso de formulações turvas nanoestruturadas. A correlação entre os valores de inibição obtidos a 8 μg/mL pelos dois métodos (turbidez e contagem de células) para as diferentes formulações foi de r = 0,9867.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Candida albicans* EM PRESENÇA DE NANOCÁPSULAS PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO COM DETERMINAÇÃO TURBIDIMÉTRICA A 570 nm

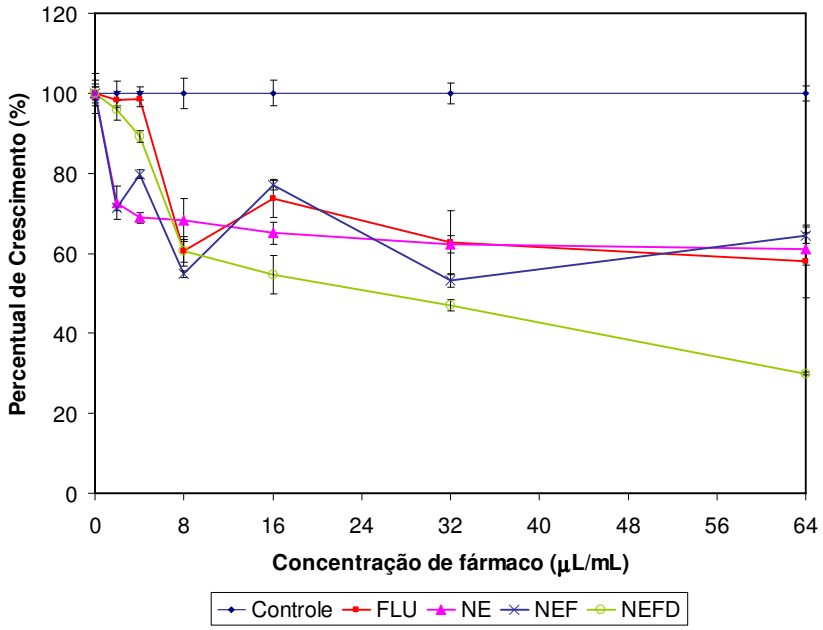


Figura 22: Percentual de crescimento de *C. albicans* em YPD2% em função da concentração de nanoemulsões de fluconazol em 24 horas de incubação. As nanoemulsões de fluconazol foram adicionadas ao meio de crescimento em volumes correspondentes à presença de 2, 4, 8, 16, 32, ou 64 µg/mL de fluconazol livre (FLU) de acordo com os percentuais de encapsulação. As nanoemulsões livres de fármaco foram adicionadas em volumes iguais aos utilizados para as nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise, ambas representando os volumes máximos de nanoestruturas testados em suspensão. As curvas de crescimento de *C. albicans* em presença de fluconazol (FLU) nas mesmas concentrações em µg/mL e também na ausência de fármaco foram utilizadas como controle (*n*=9). NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise.

As concentrações de formulações para inibição de 50% do crescimento de *C. albicans* foram de aproximadamente 6µg/mL para o fluconazol livre, 24µg/mL para as nanoemulsões de fluconazol dialisadas, 32µg/mL para as nanoemulsões de fluconazol sem purificação e indeterminadas para as nanoemulsões livres de fármaco. Analisando-se os resultados percebemos que as formulações de nanoemulsões de fluconazol foram as mais ativas em concentrações inferiores a 8µg/mL ($P< 0,05$). Somente as NEFD inibiram o crescimento de *C. albicans* de forma dose dependente, as demais formulações propostas

não apresentaram perfil de dose-dependência em concentrações superiores a 8μg/mL. Observou-se que apenas o efeito inibidor do crescimento das NEFD em volumes correspondentes a 16 e 64 μg/mL foram significativamente superiores ao do fármaco livre. Como esta cepa apresentou o fenômeno indefinido de crescimento frente às diferentes concentrações de fluconazol livre; os resultados obtidos com NEFD sugerem ser possível melhorar a eficiência do fármaco quando associado e estas nanoestruturas.

A presença de nanoemulsões livres de fármaco no meio de cultura foi também capaz de promover redução no crescimento da cepa e apenas para o volume correspondente a 2μg/mL de fluconazol o efeito inibidor chegou a ser maior que o fluconazol livre ($P < 0,05$). Mais uma vez observamos que *C. albicans* desenvolve um mecanismo de resistência ao fluconazol a partir de doses acima de 6μg/mL. Entretanto, somente as NEFD, que possuem quantidade reduzida de tensoativos não-iônicos em sua composição são capazes de reduzir o crescimento da levedura de forma dose dependente, o que reforça a hipótese de adsorção de NE na superfície do fungo, o que, por um mecanismo ainda desconhecido, reduz sua proliferação nas condições experimentais descritas em nossos experimentos.

Quando comparados aos resultados obtidos para *C. parapsilosis* percebemos que os relatos na literatura também se aplicam para esta cepa de *C. albicans*, sendo válidos os mesmos tipos de observações relatadas para *C. parapsilosis* (pág.78, 79).

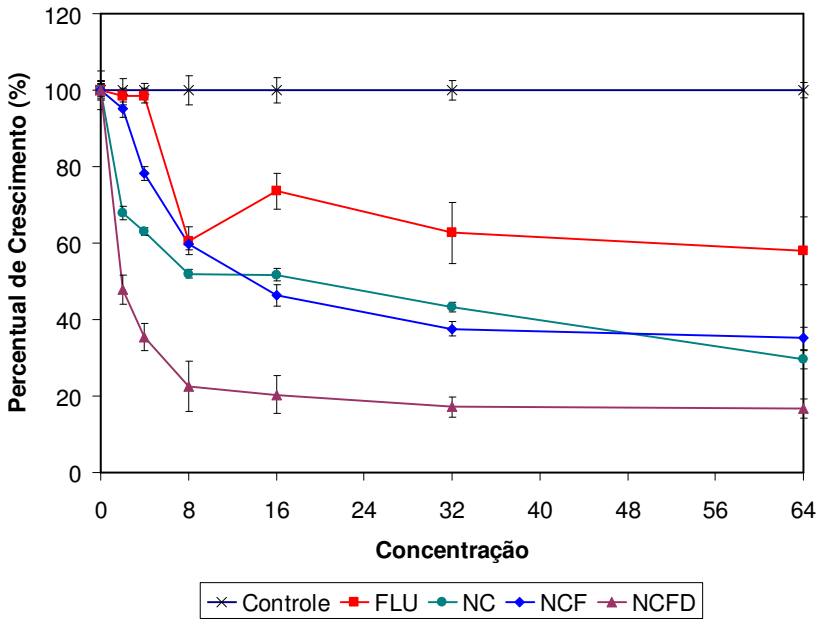


Figura 23: Percentual de crescimento de *C. albicans* em YPD2% em função da concentração de nanocápsulas de fluconazol em 24 horas de incubação. As nanocápsulas de fluconazol foram adicionadas ao meio de crescimento em volumes correspondentes à presença de 2, 4, 8, 16, 32, ou 64 µg/mL de fluconazol livre (FLU) corrigidos para cada formulação em função dos percentuais de encapsulação. As nanocápsulas livres de fármaco foram adicionadas em volumes iguais aos utilizados para as nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise, ambas representando os volumes máximos de nanoestruturas testados em suspensão. As curvas de crescimento de *C. albicans* em presença de fluconazol (FLU) nas mesmas concentrações em µg/mL ou na ausência de fármaco foram utilizadas como controles (*n*=9). NC: nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

As concentrações de formulações para inibição de 50% do crescimento de *C. albicans* foram de aproximadamente 6µg/mL para o fluconazol livre, 2µg/mL para as nanocápsulas de fluconazol dialisadas, 13µg/mL para as nanocápsulas de fluconazol sem purificação e de 18µg/mL para as nanocápsulas livres de fármaco. As NCF induziu um efeito inibidor do crescimento de *C. albicans* inferior ao do fármaco livre até a concentração de 8µg/mL, entretanto, acima de 16µg/mL as NCF foram mais efetivas. Em concordância com o que foi observado anteriormente, mas aqui evidenciado de forma mais clara, as NCFD induziram um maior efeito inibidor do crescimento das leveduras que parece ser dose dependente até a concentração de 32µg/mL, a partir da qual parece ocorrer um fenômeno de saturação. Entretanto, os valores de inibição de NCFD são muito maiores

que os do fármaco livre após 16µg/mL. Como pode ser observado na figura 23, as nanocápsulas foram mais efetivas na inibição do crescimento de *C. albicans*, ao passo que com *C. parapsilosis* essa diferença não é significativa em determinadas concentrações (Figura 18).

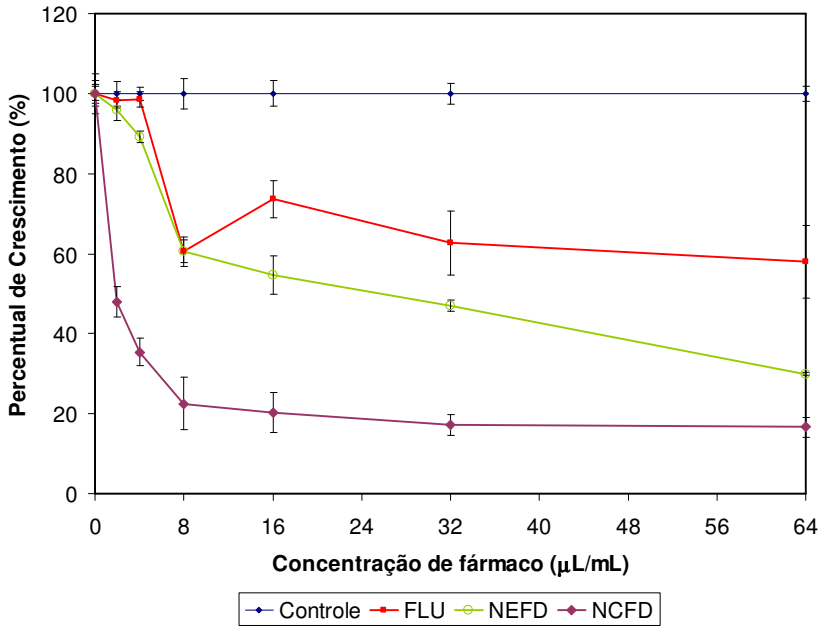


Figura 24: Comparação do crescimento de *C. albicans* em YPD2% em função da concentração de nanocápsulas ou nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise em 24 horas de incubação (*n*=9).

As NC e NE diferem apenas quanto à presença de polímero hidrofófico de poli-epsilon-caprolactona nas nanocápsulas. Portanto, a hidrofobia da superfície das nanocápsulas, em concentrações reduzidas de tensoativos (NCFD), parece exercer um efeito inibidor mais efetivo sobre o crescimento das leveduras. Essas observações também sugerem que a hidrofobia da superfície das NC seja um fator importante na interação partícula-levedura, que se mostrou mais evidente em *C. albicans* que em *C. parapsilosis*. Embora não tenham sido encontrados na literatura estudos específicos referentes à interação/adsorção entre partículas nanométricas e leveduras, existem alguns trabalhos que indicam que as partículas mais hidrofóbicas sejam elas lipossomas ou nanopartículas poliméricas, são mais rapidamente reconhecidas e captadas pelas células de defesa do sistema imune. Isso se deve principalmente à adsorção preferencial de

proteínas sobre superfícies hidrofóbicas que sinalizam a existência de "corpos estranhos" para os fagócitos (Juliano, 1988).

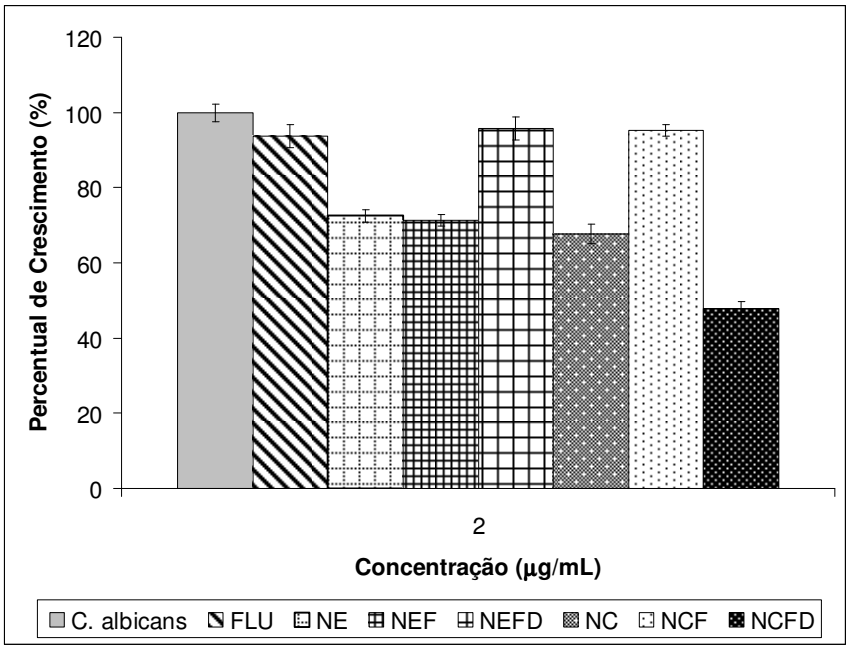


Figura 25: Comparação do crescimento controle de *C. albicans* em YPD2% na ausência de fármaco aos resultados obtidos em presença de 8µg/mL de fluconazol livre (FLU) ou de volumes correspondentes das formas nanoestruturadas, em 24h de incubação por contagem de células em Câmara de Neubauer (*n*=9). NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise. NC : nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

A verificação dos resultados obtidos nos testes em microdiluição com determinação turbidimétrica a 570 nm foi realizada por contagem de células em câmara de Neubauer utilizando alíquotas de 5 µL das suspensões celulares submetidas ao tratamento com as nanoestruturas na concentração correspondente à presença de 8 µg/mL de fluconazol livre sendo esta a Concentração Inibitória Mínima verificada para exercer inibição do crescimento da cepa *C. albicans* utilizada nestes experimentos. Para a concentração de 8µg/mL analisada, os resultados demonstraram que a ação das nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise apresentou diferença significativa e foi superior à ação de todas as outras formas utilizadas nesta avaliação. Os resultados estão mostrados na figura 27.

Para estes experimentos a correlação entre os dois métodos foi muito baixa, (r=-0,2931), indicando que o método turbidimétrico não foi adequado para avaliação dos resultados de inibição do crescimento de *C. albicans*. A correlação entre as porcentagens de inibição para as diferentes formulações pelos dois métodos entre *C. parapsilosis* e *C. albicans* também foi muito baixa, r=0,2769 e r=-0,1008, para os métodos turbidimétricos e de contagem respectivamente. Na literatura existe uma grande controvérsia entre os diferentes métodos de avaliação da susceptibilidade a drogas para fungos do gênero *Candida.* Há também relatos que as cepas de *Candida spp* podem apresentar um fenômeno indefinido de crescimento frente a diferentes concentrações de fluconazol (fenômeno *trailing)*, bem como apresentarem transcrição aumentada do gen ERG11, envolvido na síntese de ergosterol, a partir de 2 horas após exposição a este fármaco (Sanglard, 2002).

Entretanto, as diferenças provavelmente não são atribuídas a turbidez das nanoestruturas no meio e sim a diferenças particulares no padrão de crescimento das duas cepas e à capacidade que ambas têm de reagirem à pressão de drogas. *C. parapsilosis* ATCC 22019 parece responder aos estímulos de forma muito mais padronizada, sendo este um provável motivo para seu uso como referência na aferição de métodos de quantificação da susceptibilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO
PARTE 3:
ESTUDOS DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Candida albicans* EM MACRODILUIÇÃO

V.4. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *C. albicans* AO FLUCONAZOL LIVRE EM MACRODILUIÇÃO

No presente trabalho os experimentos em macrodiluição foram realizados em frascos erlenmeyer contendo 10 mL de meio YPD2%. Como primeira etapa antes dos testes em macrodiluição foi realizada uma curva de crescimento da cepa *C. albicans* e *C. parapsilosis* em meio de cultura na ausência de fármaco de forma a reconhecer seu padrão de crescimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a curva apresentada na figura 26 representa a média das triplicatas ± desvio padrão.

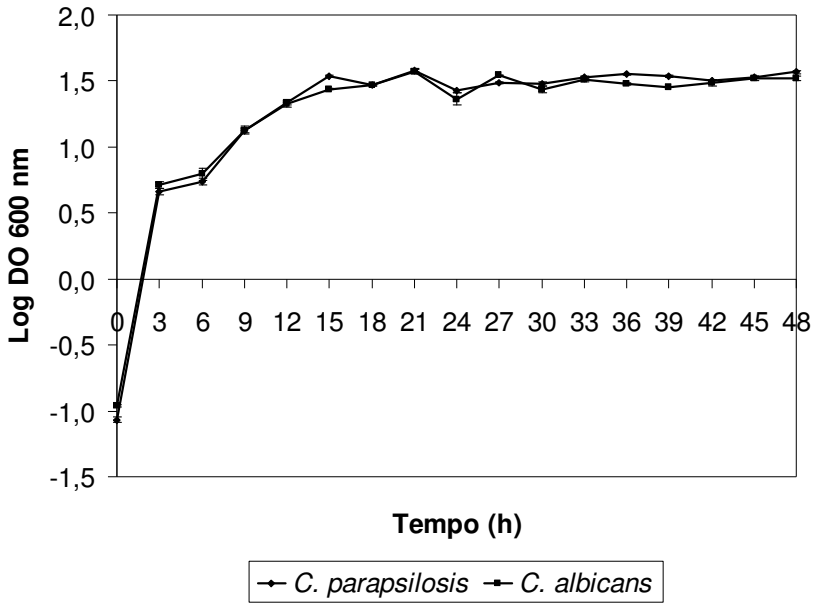


Figura 26: Curva de Crescimento Padrão de *Candida albicans* ATCC 18804 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em YPD 2% em macrodiluição avaliada por densidade óptica a 600 nm em função do tempo por 48 h de incubação* (*n*=3). *As leituras da DO inicial, em 3 e em 6 horas foram diretas, as leituras subseqüentes foram superiores a 0,8 e foram realizadas utilizando diluições 1:50 das suspensões celulares homogeneizadas.Os resultados foram expressos em logaritmo decimal da densidade óptica (DO), sendo que os valores de DO foram hipotéticos, pois as leituras foram realizadas em diluições diferentes para ser possível a quantificação da turbidez dentro da linearidade.

As espécies apresentaram comportamento semelhante quanto ao crescimento em macrodiluição em meio YPD2% e foi escolhida a *Candida albicans* para a continuação dos testes em macrodiluição. Após a realização da curva-padrão de crescimento foram realizados testes de susceptibilidade ao fluconazol livre. Os experimentos foram realizados em YPD2% como descrito em IV.2.1.5.2.1. Foram testadas as concentrações

2, 4, 8, 16, 32 e 64 μg/mL. Os resultados sobre o crescimento *Candida albicans* em YPD2% em 24 e 48 horas são apresentados na figura 27.

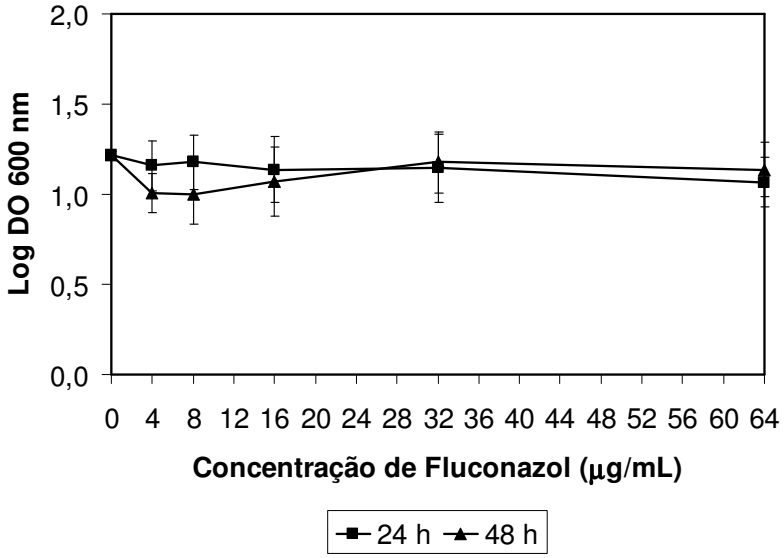
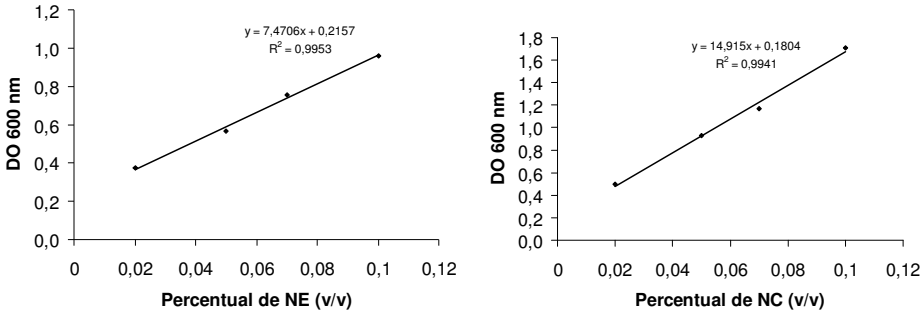


Figura 27: Avaliação da susceptibilidade de *C.albicans* ATCC 18804 a diferentes concentrações de Fluconazol em YPD2% por 24 e 48 horas por turbidimetria a 600 nm. O crescimento da cepa em meio livre de fármaco foi utilizado como padrão 100% (n=9). *As leituras da DO inicial, em 3 e em 6 horas foram diretas, as leituras subseqüentes foram superiores a 0,8 e foram realizadas utilizando diluições 1:50 das suspensões celulares homogeneizadas.Os resultados foram expressos em logaritmo decimal da densidade óptica (DO), sendo que os valores de DO foram hipotéticos, pois as leituras foram realizadas em diluições diferentes para ser possível a quantificação da turbidez dentro da linearidade.

A Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) foi de 8 μg/mL de fluconazol após 48 horas de incubação. Nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de reduzir em 80% o crescimento desta cepa, demonstrando característica de resistência ao fluconazol. Os resultados demonstram a ocorrência do fenômeno *trailing* de crescimento, citado na página 87.

Antes da avaliação frente às nanoestruturas em macrodiluição, foi verificada a influência da turbidez pelos experimentos de adição de concentrações crescentes de nanoestruturas aos meios de cultura, como pode ser observado na figura 28. Os experimentos foram realizados em meio YPD2% ao qual foram adicionados volumes de NC e NE correspondentes à concentração mais alta de polímeros ou lipídeos utilizados nos experimentos em microdiluição. A diferença na densidade óptica do meio logo após

a adição das nanocápsulas ou nanoemulsões foi medida em espectrofotômetro a 600 nm e as curvas de calibração elaboradas para NE e NC em YPD2% são apresentadas na figura 28.



(A) (B)

Figura 28: Determinação das curvas de calibração de Densidade Óptica a 600nm (DO_{600nm}) em função da concentração de nanoemulsões (A) e nanocápsulas (B) em YPD2% por turbidimetria (*n*=3). Foram utilizadas diluições 1/20; 1/15; 1/10 e 1/5 das nanoestruturas.

V.4.1. DETERMINAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE ÀS NANOEMULSÕES e NANOCÁPSULAS DE FLUCONAZOL EM MACRODILUIÇÃO

Após a realização do teste de susceptibilidade ao fluconazol livre foram realizados testes em macrodiluição para avaliar a ação das nanoestruturas contendo fluconazol associado sem purificação e das nanoestruturas livres de fármaco. Os experimentos foram realizados como descrito em IV.2.1.5.2.1. Para as formas de nanoemulsões e de nanocápsulas foram utilizados volumes correspondentes à presença de fluconazol nas concentrações 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL. Os padrões de crescimento em meio contendo fluconazol livre nas concentrações indicadas acima ou em meio livre de fármaco foram utilizados como controles. As equações das retas obtidas nas curvas de calibração com nanoestruturas foram utilizadas na avaliação dos resultados que são apresentados nas figuras 29 e 30.

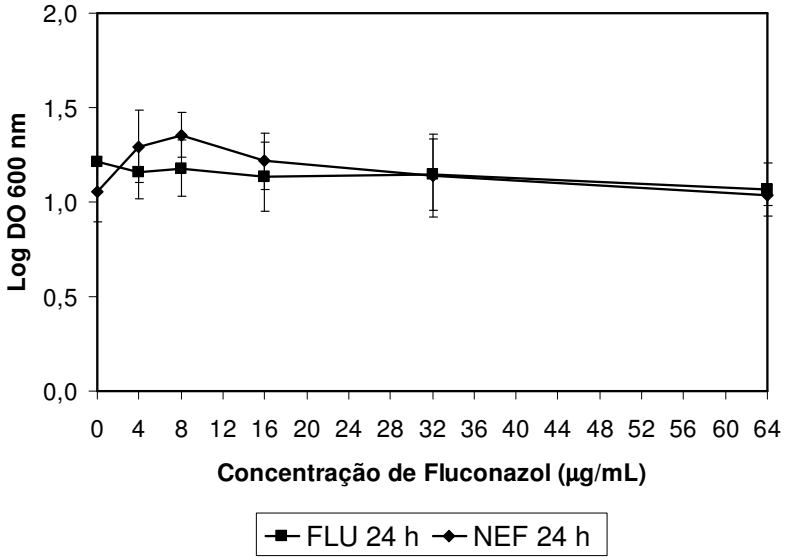
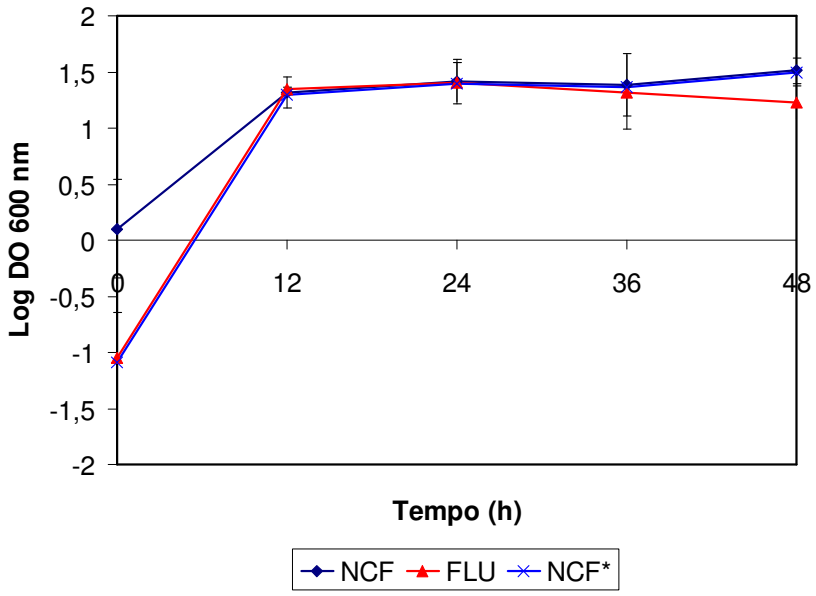


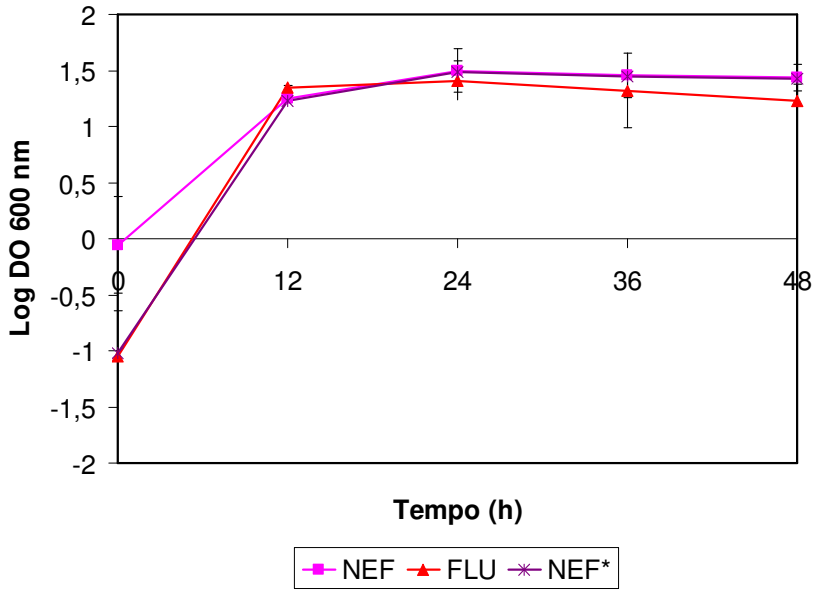
Figura 29: Avaliação da ação de diferentes concentrações do fármaco fluconazol na forma de nanoemulsões (1mg/mL) sobre o crescimento *Candida albicans ATCC 18804* em YPD2% por 24h, descontada a turbidez dos tubos controle contendo as nanoemulsões utilizando os valores obtidos através da equação da curva de calibração de NE em YPD2%. O crescimento de *C. albicans* em presença de fluconazol foi utilizado como controle (n=3). *As leituras da DO inicial, em 3 e em 6 horas foram diretas, as leituras subseqüentes foram superiores a 0,8 e foram realizadas utilizando diluições 1:50 das suspensões celulares homogeneizadas.Os resultados foram expressos em logaritmo decimal da densidade óptica (DO), sendo que os valores de DO foram hipotéticos, pois as leituras foram realizadas em diluições diferentes para ser possível a quantificação da turbidez dentro da linearidade.

De acordo com a figura 30, em 24 horas a *Candida albicans* respondeu a de modo semelhante à inibição pelo fluconazol livre ou por nanoemulsões de fluconazol.

Para se avaliar o efeito do tempo de contato frente fluconazol livre ou nanoestruturado foram realizados experimentos do efeito do fluconazol na concentração 64 µg/mL, a maior concentração utilizada em todas as formas testadas sobre o crescimento de *Candida albicans* (Figura 30).



(A)



(B)

Figura 30: Crescimento de *C. albicans* em YPD2% em função do tempo em presença de nanocápsulas (A) e nanoemulsões (B) em concentrações equivalentes a 64 µg/mL de fluconazol livre (*n*=9). A curva de crescimento em presença de fluconazol livre foi utilizada como controle. *As leituras da DO inicial, em 3 e em 6 horas foram diretas, as leituras subseqüentes foram superiores a 0,8 e foram realizadas utilizando diluições 1:50 das suspensões celulares homogeneizadas.Os resultados foram expressos em logaritmo decimal da densidade óptica (DO), sendo que os valores de DO foram hipotéticos, pois as leituras foram realizadas em diluições diferentes para ser possível a quantificação da turbidez dentro da linearidade.

Os resultados mostraram que após 12 horas de incubação não há diferença significativa ($P > 0,05$) entre a atividade do fluconazol livre e vetorizado. Entretanto a turbidez provocada pela adição das formas vetorizadas influenciou muito na análise da resposta das cepas pelo método de macrodiluição. Sendo assim, a avaliação da susceptibilidade por contagem de UFC/mL para certificação dos resultados obtidos foi utilizada como alternativa à determinação turbidimétrica.

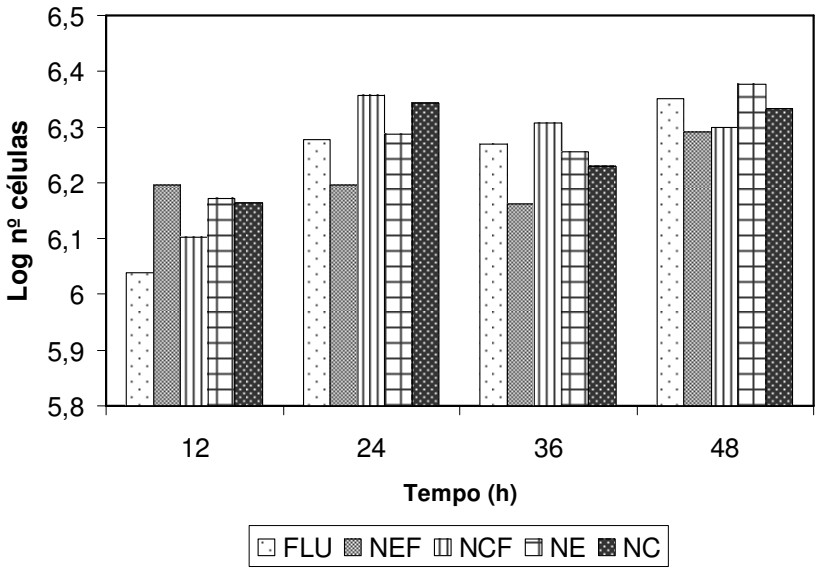


Figura 31: Influência das nanoestruturas em concentrações correspondentes a 64 μg/mL de fluconazol sobre o crescimento de *C. albicans* em YPD 2% por contagem em Câmara de Neubauer.

Os resultados obtidos, mesmo descontando a turbidez através da elaboração das curvas de calibração, confirmaram a influência das nanoestruturas sobre a turbidez do meio mostrando um aumento linear da DO_{600} nm em função do aumento da concentração das nanoestruturas. Deste modo, os experimentos em macrodiluição não foram considerados adequados para análise das respostas induzidas pela presença de fluconazol livre ou vetorizado nas formulações utilizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO
PARTE 4:
ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR POR REAÇÃO COLORIMÉTRICA COM MTT

V.5. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR COLORIMETRIA COM MTT

A utilização do método colorimétrico com o reativo MTT na avaliação de susceptibilidade de *Candida spp* a antifúngicos tem sido relatada na literatura (Wardle *et al.,* 1995; Clancy & Nguyen, 1997; Freimoser *et al.*, 1999, De Logui *et al.*, 2005).

A avaliação da viabilidade celular de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* frente às diferentes nanoestruturas pelo método colorimétrico com MTT, foi realizada como descrito em IV.2.1.5.3. Para a verificação da intensidade colorimétrica na reação com MTT em função do número de células de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, suspensões celulares das cepas foram preparadas em solução salina estéril na turbidez padrão 0,5 da escala McFarland, como descrito em III.2.1.3. As suspensões foram diluídas em YPD2% para obter padrões de turbidez com contagens de 0,5 a 2,5 x 10^3; 1 a 5,0 x 10^3; 0,2 a 1 x 10^4; 0,4 a 2 x 10^4; 0,8 a 4 x 10^4 e 1,6 a 8 x 10^4 UFC/mL e utilizadas para preencher os poços das microplacas, sendo em seguida submetidas ao protocolo de determinação de viabilidade celular por colorimetria com MTT (Figura 34). A análise dos resultados demonstrou haver diferença entre os valores obtidos para as cepas *C. albicans* e *C. parapsilosis* submetidas a procedimentos iguais. Diferenças de comportamento entre cepas de *Candida spp* são relatadas na literatura e relacionadas à variabilidade genética entre as espécies. Entretanto, ambas as suspensões celulares apresentaram linearidade no aumento da intensidade colorimétrica verificada através da DO_{570} nm em função do número de células presentes e estes resultados foram importantes para constatar um perfil de linearidade na reação com MTT.

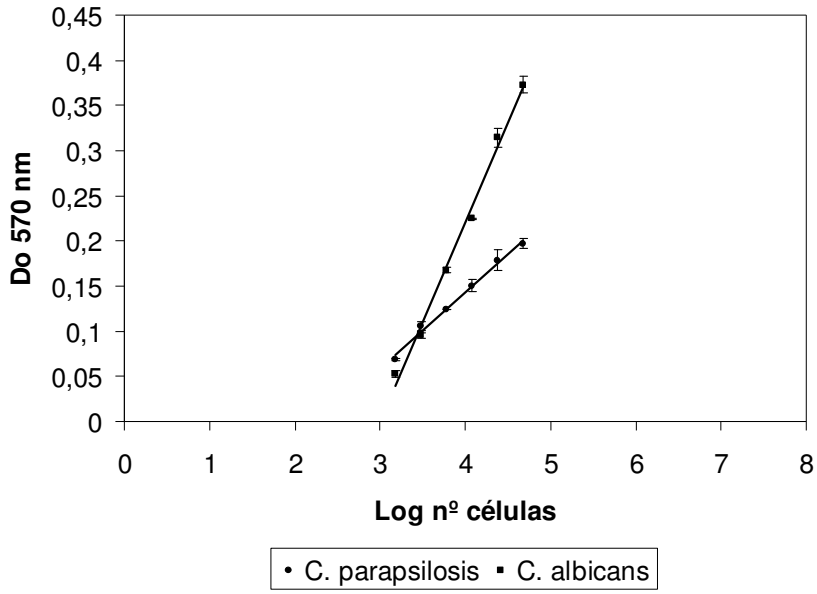


Figura 32: Densidade óptica resultante da reação com MTT em suspensões celulares de *C. albicans* e *C. parapsilosis.* Foram utilizadas suspensões contendo de 0,5 x 10^3 a 8 x 10^4 UFC/mL.

A análise dos resultados demonstrou haver diferença entre os valores obtidos para as cepas *C. albicans* e *C. parapsilosis* submetidas a procedimentos iguais. Diferenças de comportamento entre cepas de *Candida* spp. são relatadas na literatura e relacionadas à variabilidade genética entre as espécies. Estudos sobre os usos e limitações do ensaio colorimétrico com sais de tetrazólio com diferentes isolados de *Candida* spp. concluíram que, embora estes sais sejam úteis para quantificação de uma cepa, não se pode estabelecer comparações intra-cepas na ausência de padronização detalhada, uma vez que cepas diferentes metabolizam o substrato com diferentes capacidades. A relação entre a concentração de reativo usada e o sinal colorimétrico resultante não é necessariamente proporcional e quantificações válidas somente podem ser feitas após a criação de curvas-padrão para cada quantidade de tetrazólio usada e para as diferentes cepas a serem testadas (Kuhn *et al.*, 2003).

A verificação da intensidade colorimétrica na reação com MTT na concentração 0,5 mg/mL em ambas as suspensões celulares apresentou linearidade no aumento da intensidade colorimétrica verificada através da DO_{570} nm em função do número de

células presentes e estes resultados foram importantes para constatar um perfil de linearidade na reação com MTT.

Para a verificação da influência das nanoestruturas na intensidade colorimétrica na reação com MTT, diluições de nanocápsulas e nanoemulsões contendo volumes correspondentes à maior concentração de cada forma utilizada no experimento foram preparadas em YPD 2%. Os resultados foram apresentados na tabela 10.

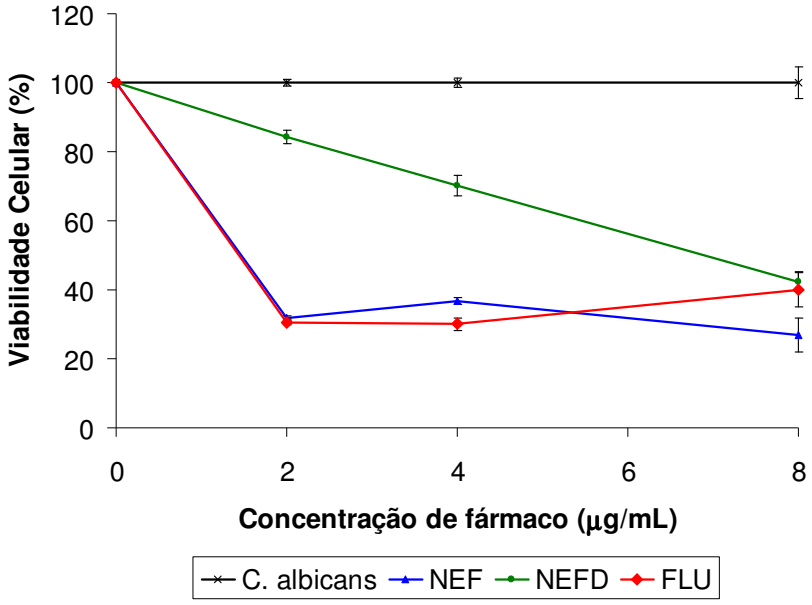
AMOSTRAS	DO $_{570}$ nm (média ± DP)
CONTROLE	0,205 ± 0,010
FLU	0,259 ± 0,014
NE	3,161 ± 0,239
NEF	2,575 ± 0,204
NEFD	2,313 ± 0,274
NC	2,674 ± 0,255
NCF	2,760 ± 0,244
NCFD	2,424 ± 0,187

Tabela 10: Influência das nanoestruturas na intensidade colorimétrica da reação com MTT por densidade óptica a 570 nm obtida de diluições de nanoestruturas em YPD2% em volumes correspondentes à presença de 8 μg/mL de fluconazol e que foram submetidas à reação com MTT (*n*=9). Controle= solução de extração; FLU= fluconazol; NE= nanoemulsões livres de fármaco; NEF= nanoemulsões de fluconazol; NEFD= nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise; NC= nanocápsulas livres de fármaco; NCF= nanocápsulas de fluconazol; NCFD= nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

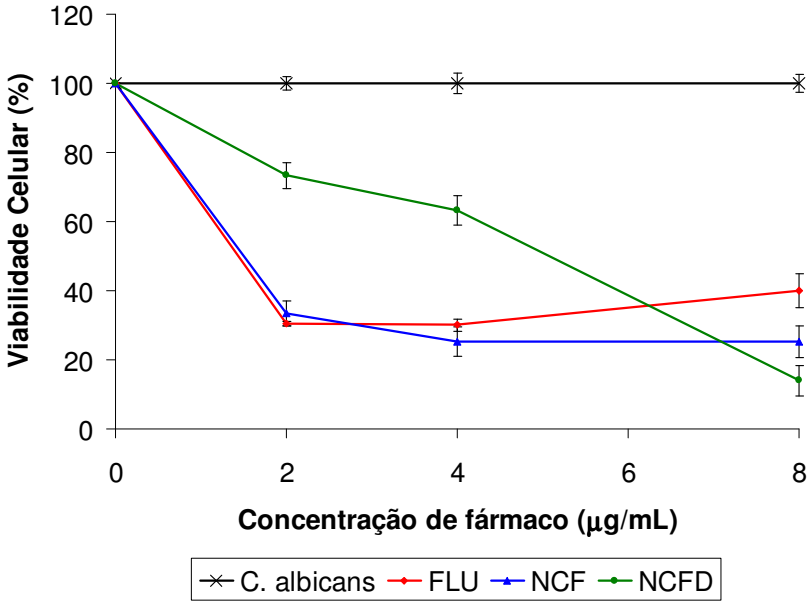
A análise dos resultados confirmou que a simples presença de nanoestruturas é capaz de promover alteração na DO_{570} nm verificada após reação com MTT, provavelmente devido também à turbidez das mesmas. A utilização da reação com o MTT na determinação da viabilidade celular de macrófagos (J774A1) frente a concentrações crescentes de nanocápsulas está descrita na literatura (Mosqueira *et al*., 1999). Para eliminação da possível interferência das NC, as células foram previamente lavadas e as nanopartículas retiradas do meio antes da incubação das células com o reativo MTT. Desta forma, também no presente trabalho, as suspensões de leveduras foram tratadas de modo similar para determinação da viabilidade celular pelo método do MTT. O procedimento foi detalhado em IV.2.1.5.3.

Para a avaliação do efeito das formulações sobre a viabilidade celular das cepas foram utilizados volumes de nanoestruturas correspondentes às concentrações 2, 4 e 8

μg/mL de fluconazol, calculados proporcionalmente em função do percentual de encapsulação e dos procedimentos de purificação. Foram testadas nanoemulsões e nanocápsulas livres de fármaco (NE e NC), contendo fluconazol (NEF e NCF) e NEFD e NCFD após purificação por diálise, como descrito em III.2.1.5.2.2. A viabilidade celular foi determinada utilizando a fórmula descrita em III.2.1.5.3. Os resultados foram apresentados nas figuras (35 e 36) e representam a média de triplicatas ± desvio padrão. A análise estatística de diferença entre as médias obtidas frente às diferentes concentrações e formas utilizadas contra *C. albicans* foi realizada pelo teste ***t*** de Student para amostras pareadas (n=9).



(**A**)



(**B**)

Figura 33: Viabilidade celular de *C. albicans* após 24 horas de incubação em meio YPD2% contendo nanoemulsões (A) e nanocápsulas (B) de fluconazol (NEF, NCF), nanoestruturas de fluconazol purificadas por diálise (NEFD, NCFD) em volumes correspondentes às concentrações 2, 4 e 8 µg/mL de fluconazol. A viabilidade celular de *C albicans* em meio livre de fármaco ou frente ao fluconazol livre nas concentrações 2, 4 e 8 µg/mL foram utilizadas como controle (*n*=9).

As nanoemulsões de fluconazol (NEF) promoveram uma ação muito semelhante à do fármaco livre (FLU) sobre a viabilidade celular de *C. albicans*. Entretanto, no caso das NEFD o efeito observado nas concentrações correspondentes a 2 e 4 μg/mL de fluconazol foram inferiores aos ocasionados pela presença do fármaco livre enquanto que na concentração 8 μg/mL os efeitos foram semelhantes. As CI_{50} para o FLU e NEF foram inferiores a 2μg/mL, enquanto que para o NEFD foi superior a 6μg/mL, indicando a menor atividade dessas últimas formulações sobre a viabilidade celular segundo esse método. Segundo esses resultados a associação do fluconazol às NE não reduz sua atividade, mas o processo de diálise interfere de alguma forma na formulação reduzindo seu efeito. Duas situações nesse caso podem ser sugeridas para explicar tal efeito. A presença do fluconazol no meio externo é importante para a atividade da NEF ou a alteração na concentração de tensoativos após a diálise seria o fator preponderante na redução da atividade das NEFD.

Os resultados do efeito das nanocápsulas são muito semelhantes aos das nanoemulsões de fluconazol (NCF). Os valores de CI_{50} para o FLU e NCF foram inferiores a 2μg/mL, enquanto que para o NCFD foi próxima de 5μg/mL, indicando uma menor atividade dessas últimas formulações sobre a viabilidade celular, também muito similares aos das nanoemulsões. Para as nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise (NCFD) o efeito observado nas concentrações correspondentes a 2 e 4 μg/mL de fluconazol foram inferiores aos ocasionados pela presença do fármaco livre. A atividade das NE e NC brancas foi inferior as demais formulações contendo fluconazol e os valores de IC_{50} foram respectivamente de 6μg/mL e >8 μg/mL.

Para o fluconazol livre (FLU) e para as nanoestruturas contendo fluconazol (NEF e NCF) o efeito sobre a viabilidade celular não é dose dependente a partir de 2μg/mL, sendo que para as nanoestruturas sem fármaco e para as formulações dialisadas o efeito é dose dependente. Este fato está em acordo com os resultados obtidos por microdiluição, embora os efeitos inibitórios das formulações sejam bastante diferentes pelos dois métodos.

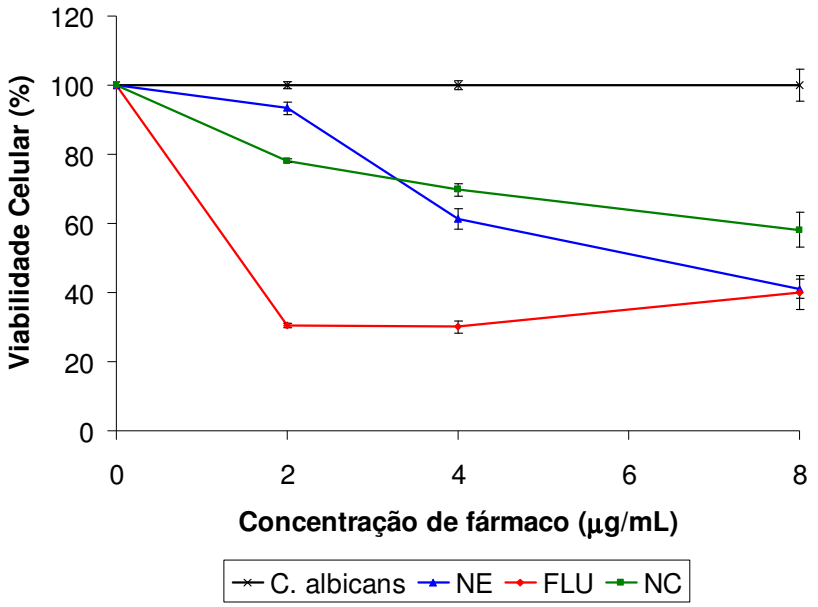


Figura 34: Viabilidade celular de *C. albicans* após 24 horas de incubação em meio YPD2% contendo nanocápsulas livres de fármaco (NC) ou nanoemulsões livres de fármaco (NE) em volumes correspondentes às concentrações 2, 4 e 8 µg/mL de fluconazol. A viabilidade celular de *C albicans* em meio livre de fármaco ou frente ao fluconazol livre nas concentrações 2, 4 e 8 µg/mL foram utilizadas como controle.

Tabela 11: Comparação da influência do fluconazol livre (FLU) e das formas nanoestruturadas na viabilidade celular de *C. albicans* ATCC 18804

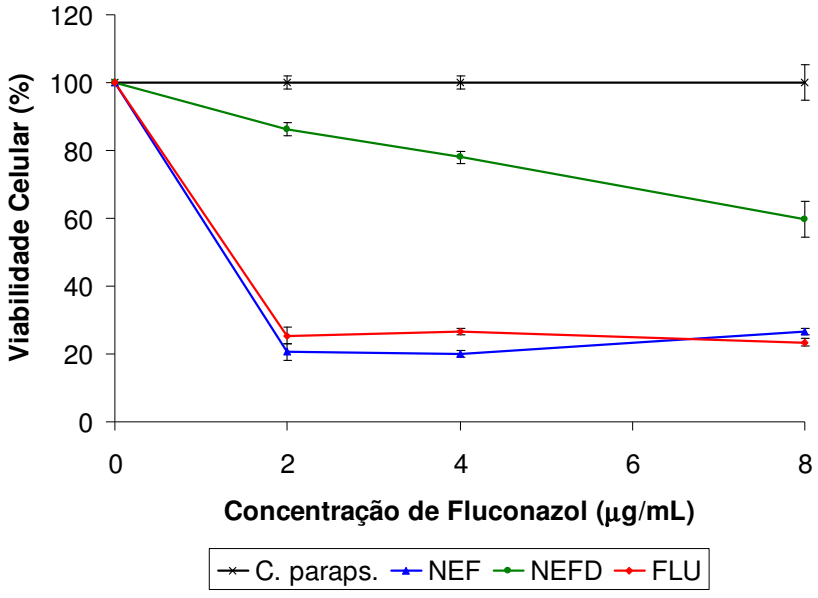
Comparações entre formas	***Resultados do teste t por concentração***		
	(2µg/mL)	**(4µg/mL)**	**(8µg/mL)**
	P	*P*	*P*
FLU x NEF	0,007	0,154	0,001
FLU x NCF	0,067	0,007	0,001
FLU x NEFD	0,001	0,000	0,034
FLU x NCFD	0,001	0,001	0,000
NE x NC	0,001	0,006	0,056
NEF x NCF	0,115	0,128	0,101
NEFD x NCFD	0,041	0,130	0,002

A viabilidade celular foi determinada através da equação do protocolo de MTT. As análises estatíticas foram realizadas utilizando o teste ***t*** de Student para amostras pareadas (n=9).

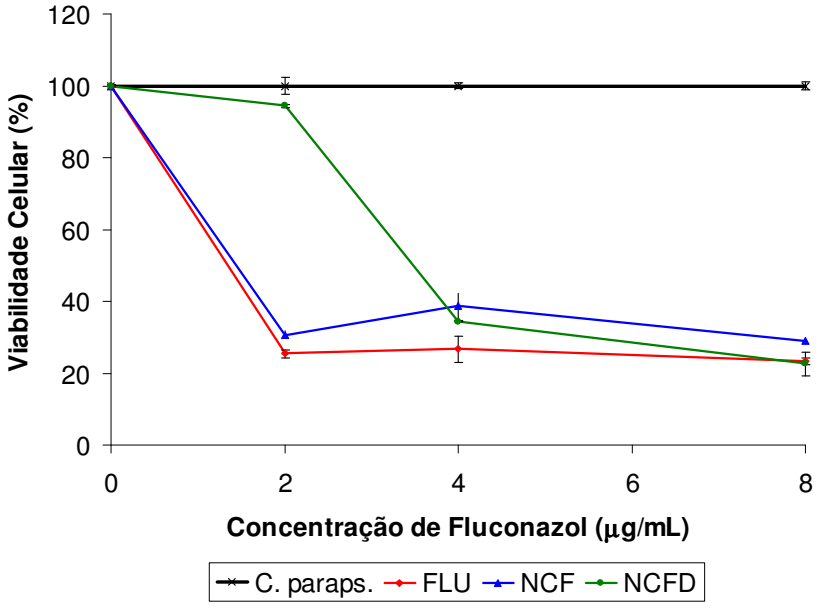
Os resultados das análises estatísticas demonstraram haver diferença significativa ($P < 0,05$) entre o efeito ocasionado pelo fluconazol livre (FLU) e nanoemulsões de fluconazol (NEF) nas concentrações correspondentes a 2 e 8 µg/mL livre, sendo que NEF

ocasionou efeitos significativamente maiores do que os do fluconazol livre na concentração 8 μg/mL. As nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise (NEFD) ocasionaram efeitos levemente maiores do que o fluconazol livre na concentração correspondente a 8 μg/mL e a diferença foi estatisticamente significativa. As nanocápsulas de fluconazol (NCF) ocasionaram efeitos significativamente maiores do que o fármaco livre nas concentrações correspondentes a 4 e 8 μg/mL e as nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise (NEFD) ocasionaram efeitos significativamente maiores do que o fluconazol livre na concentração correspondente a 8 μg/mL. As comparações entre formas nanoestruturadas demonstraram que as nanoemulsões (NEF) e nanocápsulas de fluconazol (NCF) não apresentaram diferença significativa nos efeitos ocasionados frente às diferentes concentrações correspondentes à presença do fármaco livre. Para as nanoestruturas purificadas por diálise (NEFD e NCFD) as diferenças foram significativas para as concentrações correspondentes a 2 e 8 μg/mL de fluconazol livre. Na concentração correspondente a 4 μg/mL de fluconazol livre não houve diferença significativa entre efeito destas nanoestruturas.

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DAS NANOESTRUTURAS CONTRA *C. parapsilosis*



A



B

Figura 35: Viabilidade celular de *C. parapsilosis* após 24 horas de incubação em meio YPD2% contendo nanoestruturas de fluconazol. Em A nanoemulsões e em B, nanocápsulas. Todas as nanoestruturas foram utilizadas em volumes correspondentes às concentrações 2, 4 e 8 µg/mL de fluconazol. A viabilidade celular de *C parapsilosis* em meio livre de fármaco ou frente ao fluconazol livre nas concentrações 2, 4 e 8 µg/mL foram utilizadas como controle (*n*=9).

Os resultados demonstraram que as nanoemulsões de fluconazol (NEF) na concentrações correspondentes a 2 e 8 µg/mL de fluconazol livre promoveram uma ação semelhante à do fármaco livre (FLU) em *Candida parapsilosis* enquanto que na concentração 4 µg/mL as nanoemulsões de fluconazol promoveram efeito um pouco maior quando comparado ao ocasionado pela presença do fármaco livre. Para nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise (NEFD) o efeito observado em todas as concentrações foram inferiores aos ocasionados pela presença do fármaco livre. As nanocápsulas de fluconazol (NCF) em todas as concentrações promoveram um efeito semelhante ao ocasionado pela presença do fármaco livre (FLU). Para as nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise (NCFD) o efeito observado nos volumes correspondentes a 2 e 4 µg/mL de fluconazol foram inferiores aos ocasionados pela presença do fármaco livre enquanto que na concentração 8 µg/mL os efeitos de NCFD foram semelhantes.

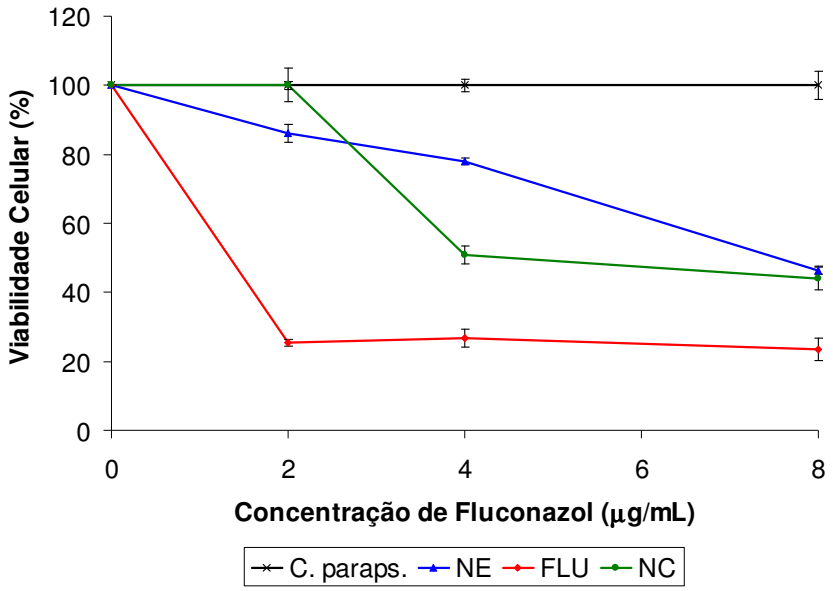


Figura 36: Viabilidade celular de *C. parapsilosis* após 24 horas de incubação em meio YPD2% contendo nanocápsulas livres de fármaco (NC) ou nanoemulsões livres de fármaco (NE) em volumes correspondentes às concentrações 2, 4 e 8 µg/mL de fluconazol. A viabilidade celular de *C parapsilosis* em meio livre de fármaco ou frente ao fluconazol livre nas concentrações 2, 4 e 8 µg/mL foram utilizadas como controle (*n*=9).

Para as nanoemulsões livres de fármaco (NE) o efeito observado no volume correspondente a 2 µg/mL de fluconazol foi superior ao ocasionado pela presença de

nanocápsulas livres de fármaco (NCF). No volume correspondente a 4 μg/mL de fluconazol o efeito das nanocápsulas livres de fármaco (NCF) foi superior ao observado com as nanoemulsões livres de fármaco (NE), enquanto que na concentração 8 μg/mL os efeitos foram semelhantes para ambas as nanoestruturas. Em todas as concentrações utilizadas o efeito das nanoestruturas livres de fármaco foi inferior ao ocasionado pela presença do fármaco livre.

Tabela 12: Resultados das análises estatísticas de comparação da influência do fluconazol livre (FLU) e das formas nanoestruturadas na viabilidade celular de *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Comparações entre formas	***Resultados do teste t por concentração***		
	(2μg/mL)	**(4μg/mL)**	**(8μg/mL)**
	P	***P***	***P***
FLU x NEF	0,368	0,103	0,074
FLU x NCF	0,040	0,004	0,029
FLU x NEFD	0,002	0,002	0,019
FLU x NCFD	0,000	0,006	0,394
NE x NC	0,011	0,001	0,246
NEF x NCF	0,047	0,002	0,002
NEFD x NCFD	0,038	0,002	0,007

A viabilidade celular foi determinada através da equação do protocolo de MTT. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste ***t*** de Student para amostras pareadas (n=9).

Os resultados das análises estatísticas demonstraram não haver diferença significativa ($P > 0,05$) entre o efeito ocasionado pelo fluconazol livre (FLU) e nanoemulsões de fluconazol (NEF) em todas as concentrações utilizadas. As nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise (NEFD) e as nanocápsulas de fluconazol (NCF) ocasionaram efeitos inferiores aos obtidos pela presença do fluconazol livre em todas as concentrações utilizadas. As nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise (NEFD) ocasionaram efeitos menores do que o fluconazol livre nas concentrações correspondentes a 2 e 4 μg/mL e para a concentração 8 μg/mL os efeitos não foram significativamente diferentes.

As comparações entre formas nanoestruturadas demonstraram que as nanoemulsões (NEF) e nanocápsulas de fluconazol (NCF) não apresentaram diferença significativa nos efeitos ocasionados frente às diferentes concentrações utilizadas e o

mesmo resultado foi obtido nas comparações do efeito entre as nanoestruturas purificadas por diálise (NEFD e NCFD).

As comparações entre as nanoemulsões (NE) e nanocápsulas livres de fármaco (NC) demonstraram que ambas ocasionaram efeitos de diminuição da viabilidade celular de *C. parapsilosis.* No entanto, em ambos os casos os efeitos foram inferiores aos ocasionados pela presença de fluconazol livre.

Os resultados do método baseado na determinação da viabilidade celular pelo MTT foram muito semelhantes e coerentes para as duas espécies de *Candida* estudadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO
PARTE 5:
QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL EM CULTURAS DE *Candida* spp.

V.6. QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL EM CULTURAS DE *Candida* spp.

Os estudos realizados se basearam no trabalho de Arthington Skaggs *et al (1999),* que utilizaram o doseamento do ergosterol para determinar a susceptibilidade de espécies de *Candida* frente a drogas antifúngicas.

As culturas de *Candida* spp. foram crescidas em YPD2% expostas à concentração 8 μg/mL de fluconazol livre ou a volumes correspondentes de nanoemulsões ou nanocápsulas livres de fármaco, a volumes correspondentes de nanoemulsões ou nanocápsulas contendo fluconazol associado submetidas ou não à purificação por diálise. Os procedimentos para a obtenção dos extratos de ergosterol das culturas de *Candida* spp. e para a verificação da presença de ergosterol foram realizados como descrito em IV.2.1.5.4**.** Uma curva de ergosterol padrão (Sigma) obtida por espectrofotometria no ultravioleta entre comprimentos de onda (λ) de 240 a 300 nm foi utilizada como controle. A determinação do conteúdo em 24(28) DHE nos extratos foi realizada por espectrofotometria em λ = 230 nm.

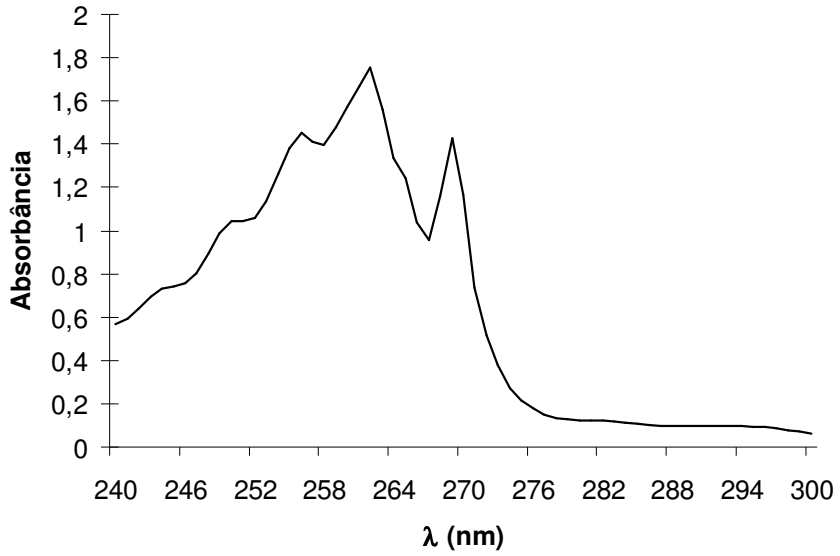


Figura 37: Curva Padrão de Ergosterol obtida por espectrofotometria em λ = 240 - 300 nm utilizando uma solução 2,5 μg/mL de ergosterol (Sigma) em etanol 96 °GL.

Extratos obtidos a partir de meio YPD2% contendo as diferentes concentrações de nanoestruturas utilizadas neste experimento foram preparados para a avaliação da interferência das nanoestruturas na verificação da presença do ergosterol.

V.6.1.AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES NA QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL EM CULTURAS DE *Candida* spp.

Para esta avaliação foram obtidos extratos de ergosterol em etanol a partir de dispersões a 2% (v/v) de NC ou NE em YPD2%, concentrações máximas de nanoestruturas utilizadas no experimento. Os extratos foram obtidos como descrito em IV.2.1.5.4.

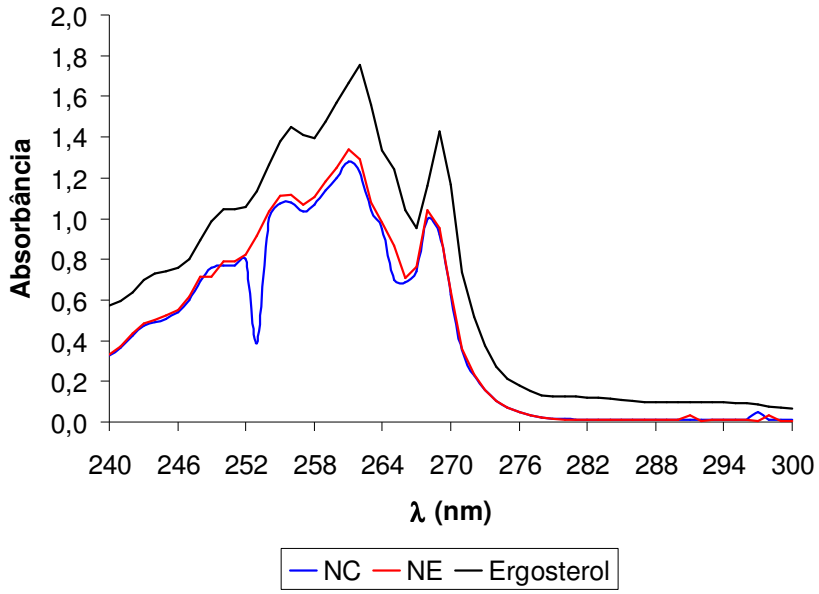


Figura 38: Avaliação da influência de nanocápsulas (NC) e nanoemulsões (NE) na verificação da concentração de ergosterol por espectrofotometria em λ = 240 - 300 nm. Foram obtidos extratos de ergosterol em etanol a partir de dispersões a 2% (v/v) de NC ou NE em YPD2%, concentrações máximas de nanoestruturas utilizadas no experimento (*n*=3). A curva-padrão de ergosterol em etanol foi mostrada como controle. NC= nanocápsulas sem fármaco associado, NE= nanoemulsões sem fármaco associado.

A análise por espectrofotometria em λ = 240-300 nm demonstrou coincidência entre 3 dos 4 picos característicos do ergosterol com as formas nanoestruturadas, sendo possível verificar ausência de interferência apenas no comprimento de onda λ = 281,5 nm. A verificação da presença de ergosterol nas amostras foi registrada em gráficos utilizando os valores de absorbância obtidos a partir das análises dos extratos por espectrofotometria no ultravioleta entre comprimentos de onda (λ) de 240 a 300 nm. Os resultados foram apresentados separadamente com relação ao efeito de nanocápsulas ou nanoemulsões contra as cepas *C. parapsilosis* e *C. albicans*.

V.6.2. QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL EM CULTURAS DE *C. albicans* SUBMETIDAS A FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS CONTENDO OU NÃO FLUCONAZOL ASSOCIADO

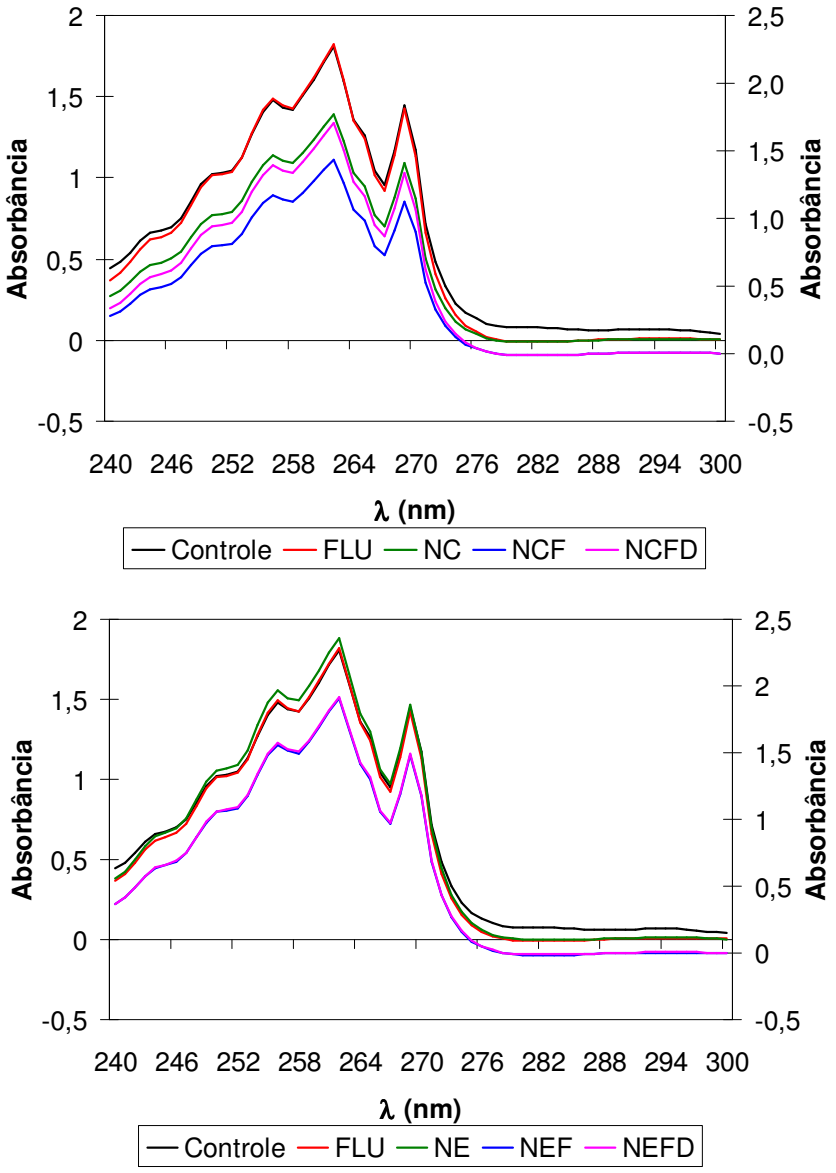
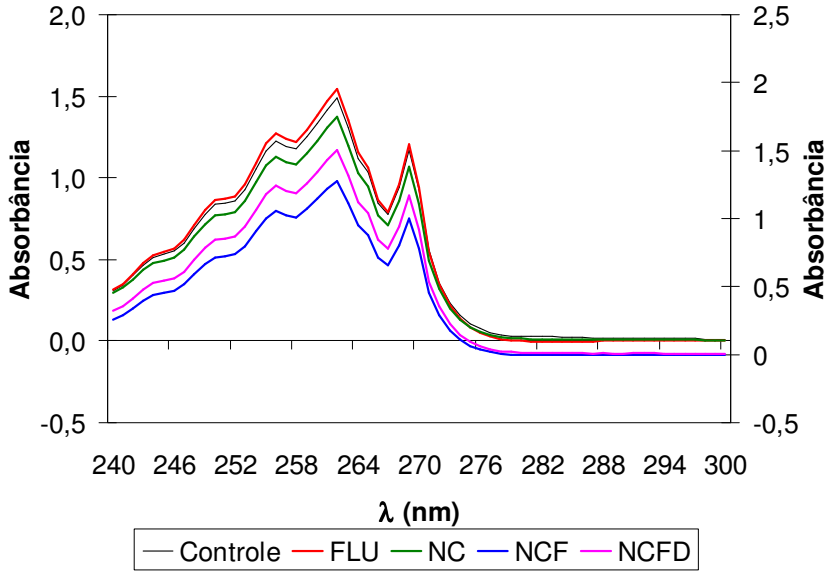
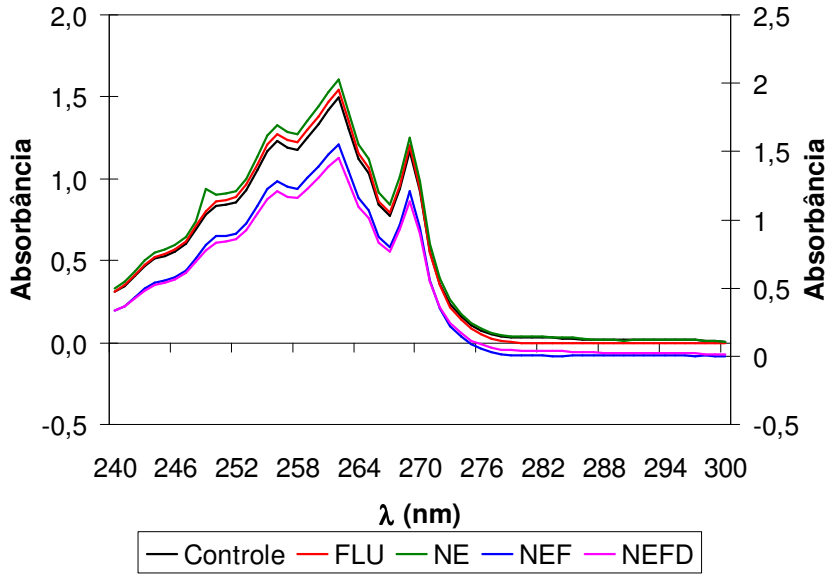


Figura 39: Verificação da presença do ergosterol em extratos celulares de *C. albicans* crescida em meio YPD2% frente a diferentes formulações nanoestruturadas. Os resultados referem-se a extratos de ergosterol obtidos a partir de culturas crescidas até DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8 em meio YPD2% contendo concentrações correspondentes a 8 µg/mL de fluconazol de cada forma utilizada (n=3). A curva de ergosterol em *C. albicans* não tratada é mostrada como controle.



A



B

Figura 40: Efeito de formulações de fluconazol sobre a quantidade de ergosterol em extratos celulares de *C. parapsilosis*. Os resultados referem-se a extratos de ergosterol obtidos a partir de culturas crescidas até DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8 em meio YPD2% contendo 8 µg/mL de fluconazol (FLU) ou das formas nanoestruturadas (*n*=3). A curva de ergosterol em *C. parapsilosis* não tratada é mostrada como controle.

Foi constatada a presença de ergosterol em todos os extratos celulares, entretanto não foi possível determinar diferenças entre os resultados para cada amostra individualmente utilizando apenas a representação gráfica devido à interferência dos

componentes das NC e NE nos mesmos comprimentos de onda de determinação do ergosterol. Portanto, procedeu-se a quantificação do ergosterol em culturas de *Candida* submetidas a formulações nanoestruturadas brancas ou contendo fluconazol associado. A metodologia utilizada para a quantificação de ergosterol nos extratos obtidos baseou-se na subtração dos valores de absorbância obtidos em $\lambda = 281,5$ nm, representativo do conteúdo em ergosterol somado ao conteúdo em 24(28) DHE, e em $\lambda = 230$ nm, representativo do conteúdo em 24(28) DHE isoladamente, como descrito em IV.2.1.5.4**.** Os valores obtidos para as culturas crescidas em meio livre de fármaco foram utilizados como controle.

Tabela 13: Determinação do peso dos pellets de células de *C. albicans* e *C. parapsilosis* frente à ação de 8μg/mL do fluconazol livre ou associado as formas nanoestruturadas.

Amostras	**Peso Úmido *C. parapsilosis* (g)**	**Peso Úmido *C. albicans* (g)**
Controle	0,1545	0,1198
FLU	0,0422	0,0571
NE	0,1433	0,0952
NEF	0,0434	0,0504
NEFD	0,0471	0,0798
NC	0,1000	0,1097
NCF	0,0593	0,0553
NCFD	0,0438	0,0717

As células foram crescidas em meio YPD2% contendo 8 μg/mL de fluconazol livre ou volumes correspondentes das diferentes formulações nanoestruturadas (n=3). NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise; NC: nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

Para *C. albicans* as diferenças entre as médias foram significativas nas comparações entre o efeito ocasionado pelo fluconazol livre e quase todas as formulações nanoestruturadas ($P < 0,05$), excetuando apenas as nanoemulsões de fluconazol sem purificação. Comparações de resultados obtidos entre as nanoestruturas contendo fluconazol utilizadas contra *C. albicans* demonstraram haver diferença significativa entre nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol. Utilizando esta

metodologia foi possível verificar que as nanoestruturas livres de fármaco também exerceram efeitos sobre o percentual de ergosterol e que houve diferença significativa entre os efeitos de nanoemulsões e nanocápsulas livres de fármaco para *C. parapsilosis*. Os resultados da quantificação de ergosterol foram apresentados na figura 41 para ilustrar os diferentes efeitos ocasionados pela presença de fluconazol livre ou associado às nanoestruturas, bem como o efeito das nanoestruturas livres de fármaco contra as espécies de *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

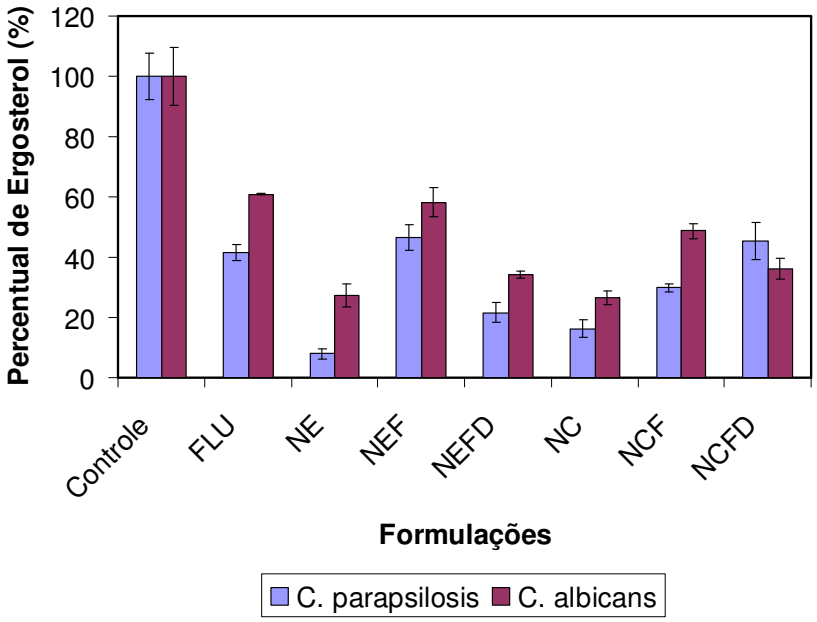


Figura 41: Comparação da quantidade percentual de ergosterol em extratos celulares de *C. albicans* e *C. parapsilosis* crescidas em YPD2% livre de fármaco, em presença de fluconazol livre e de formulações nanoestruturadas em concentrações correspondentes 8 µg/mL de fluconazol livre comparados ao controle (*n*=3). NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise; NC: nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

Tabela 14: Análise estatística da diferença entre as médias sobre o peso do pellet de células para as formulações utilizadas contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*

Formulações comparadas	C. albicans P	C. parapsilosis P
FLU x NEF	0,2162	0,0136
FLU X NCF	0,0067	0,0082
FLU X NEFD	0,0004	0,0000
FLU X NCFD	0,0033	0,1788
NE X NC	0,4004	0,0412
NEF X NCF	0,0115	0,0090
NEFD X NCFD	0,1356	0,0102

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste **t** de Student unicaudal de amostras pareadas (n=3). NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise; NC: nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

Para *C. parapsilosis* as diferenças entre as médias do peso dos pellets foram significativas ($P < 0,05$) nas comparações entre fluconazol livre e todas as formulações nanoestruturadas, excetuando as nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise. Comparações dos resultados obtidos entre as nanoestruturas utilizadas contra *C. parapsilosis* demonstraram diferença significativa para nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol submetidas ou não à purificação por diálise, bem como entre nanoemulsões e nanocápsulas livres de fármaco.

Kohli *et al.* (2002), em estudos sobre a resistência de *C. albicans* ao fluconazol sugerem que a composição e o estado da matriz lipídica da membrana celular em *Candida* pode ser determinante no desenvolvimento deste fenômeno. Tendo em vista que as nanoestruturas foram capazes de promover diminuição na quantidade de ergosterol nas células tratadas em nosso trabalho, pode-se sugerir a existência de algum mecanismo ainda não evidenciado de alteração do equilíbrio bioquímico deste componente essencial da membrana celular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO
PARTE 6:
COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

V.7. COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

A análise de correlação entre os resultados obtidos com as duas espécies frente aos métodos de determinação da susceptibilidade por turbidimetria, por colorimetria com MTT ou por quantificação do ergosterol foi realizada para o volume correspondente a 8 μg/mL. Os resultados obtidos frente aos diferentes métodos são apresentados nas tabelas 17 e 18 para *C. albicans* e *C. parapsilosis* respectivamente.

Tabela 15: Comparação entre resultados obtidos em percentual de crescimento (%) nos experimentos com avaliação turbidimétrica, por colorimetria com MTT e por quantificação do ergosterol (MQE) contra *C. albicans*

AMOSTRAS	TURBIDIMETRIA MICRODILUIÇÃO (DO_{570nm}; n=9) (%)	MTT (DO_{570nm}; n=9) (%)	MQE (n=3) (%)
C. albicans	100,0 ± 7,1	100,0 ± 3,4	100,00 ± 9,7
FLU	60,6 ± 3,7	40,0 ± 2,8	60,9 ± 0,1
NE	68,3 ± 5,3	41,0 ± 4,7	27,2 ± 3,9
NEF	54,8 ± 0,9	26,9 ± 2,4	58,2 ± 4,7
NEFD	60,6 ± 2,8	42,4 ± 4,9	34,2 ± 1,2
NC	52,0 ± 1,2	58,2 ± 5,1	26,4 ± 2,3
NCF	59,9 ± 1,5	25,2 ± 4,4	48,7 ± 2,4
NCFD	22,5 ± 4,9	14,0 ± 4,5	36,2 ± 3,4

FLU: fluconazol; NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise; NC: nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

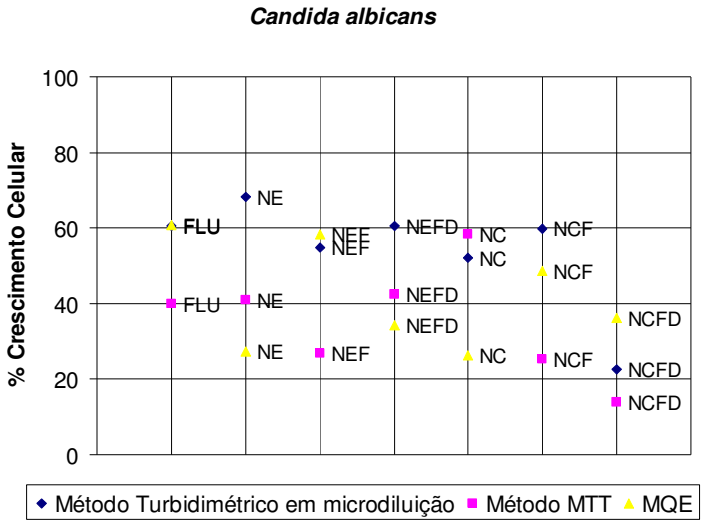


Figura 42: Análise de correlação entre os resultados obtidos frente aos diferentes métodos contra *C. albicans*.

Tabela 16: Comparação entre resultados obtidos nos experimentos com avaliação turbidimétrica, por colorimetria com MTT e por quantificação do ergosterol (MQE) contra *C. parapsilosis*

AMOSTRAS	TURBIDIMETRIA MICRODILUIÇÃO (DO_{570nm}; *n*=9) (%)	MTT (DO_{570nm}; *n*=9) (%)	MQE (*n*=3) (%)
C. paraps.	100 ± 4,5	100 ± 6,2	100,00 ± 7,7
FLU	49,2 ± 1,1	46,4 ± 5,2	41,38 ± 2,68
NE	51,9 ± 1,8	26,5 ± 4,0	7,92 ± 1,78
NEF	49,7 ± 4,0	59,6 ± 5,2	46,46 ± 4,16
NEFD	61,5 ± 2,5	23,4 ± 1,1	21,72 ± 3,41
NC	62,8 ± 2,2	43,9 ± 3,3	16,27 ± 2,97
NCF	66,5 ± 3,7	29,0 ± 0,9	29,84 ± 1,17
NCFD	36,0 ± 4,1	22,5 ± 3,3	45,43 ± 6,26

FLU: fluconazol; NE: nanoemulsões livres de fármaco; NEF: nanoemulsões de fluconazol; NEFD: nanoemulsões de fluconazol purificadas por diálise; NC: nanocápsulas livres de fármaco; NCF: nanocápsulas de fluconazol; NCFD: nanocápsulas de fluconazol purificadas por diálise.

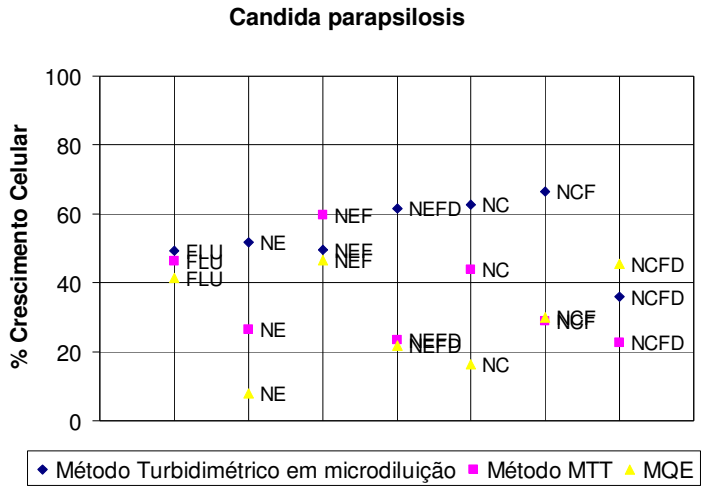


Figura 43: Análise de correlação entre os resultados obtidos frente aos diferentes métodos contra *C. parapsilosis*.

As análises de correlação entre os resultados obtidos para a concentração 8 µg/mL contra *C. albicans* revelaram baixa correlação entre todos os métodos para as nanoestruturas utilizadas, sendo que o maior índice foi para a correlação entre o método de microdiluição comparado ao método colorimétrico com MTT (r = 0,55). Os resultados obtidos contra *C. parapsilosis* também revelaram baixa correlação entre todos os métodos para as nanoestruturas utilizadas, sendo que o maior índice foi para a correlação entre o método colorimétrico com MTT comparado ao método de quantificação do ergosterol (r = 0,39).

A falta de correlação entre os métodos utilizados pode estar relacionada às dificuldades encontradas na eliminação da interferência das nanoestruturas no caso das determinações de susceptibilidade por turbidimetria ou por quantificação do ergosterol. As características de turbidez das nanoestruturas e sua composição lipídica não permitiram uma avaliação adequada da ação destas nanoestruturas contra *Candida* utilizando estas metodologias.

CONCLUSÕES

Este estudo revelou ser viável obter nanoestruturas do tipo nanoemulsões e nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo fluconazol associado utilizando o método de deposição interfacial de polímero seguida de deslocamento do solvente. Quanto à morfologia, as nanoestruturas se apresentaram esféricas e com distribuição de tamanho homogênea. Apesar da eficiência de encapsulação do fluconazol ser em torno de 45% após a preparação, ao longo de três meses este valor foi reduzido pela metade, indicando uma instabilidade das nanoestruturas.

Foi possível também desenvolver metodologias de purificação das nanoestruturas preparadas, visando eliminar o fármaco não encapsulado para realização dos estudos *in vitro*, utilizando os procedimentos de ultrafiltração/centrifugação ou de diálise direta, sendo o segundo método mais adequado do ponto de vista de rendimento de partículas purificadas e de tempo.

A avaliação do potencial desses sistemas em reduzir a resistência ao fluconazol sobre suspensões celulares de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida albicans* ATCC 18804 demonstrou que a ação das nanoestruturas não foi melhor do que a do fármaco livre. Embora para outros fármacos existam estudos mostrando que a encapsulação melhora os efeitos *in vitro* (Zili *et al.*, 2005), neste trabalho este efeito não foi observado claramente. Portanto são necessários ainda estudos mais aprofundados no sentido de adequar melhor os métodos *in* vitro visando o *screening* de novas drogas antifúngicas e de novas formulações ativas contra *Candida* spp.

ANEXOS

COMPOSIÇÃO DO MEIO RPMI 1640*

SAIS INORGÂNICOS	mg/L
Ca(NO3)2.4H2O	100,00
KCL	400,00
MgSO4.7H2O	100,00
NaCl	6.000,00
NaHCO3	2.000,00
Na2HPO4	800,00

AMINOÁCIDOS	mg/L
L-arginina.HCL	200,00
L-asparigina.H2O	50,00
L-ácido aspártico	20,00
L-cistina	50,00
L-ácidoglutâmico	20,00
L-glutamina	300,00
glicina	10,00
L-histidina.HCL.H2O	15,00
L-hidroxiprolina	20,00
L-isoleucina	50,00
L-leucina	50,00
L-lisina.HCL	40,00
L-metionina	15,00
L-fenilalanina	15,00
L-triptofano	5,00
L-prolina	20,00
L-tirosina	28,00
L-serina	30,00
L-valina	20,00
L-treonina	20,00

VITAMINAS	mg/L
biotina	0,200
pantotenato de cálcio	0,250
cloreto de colina	3,000
ácido fólico	1,000
inositol	35,000
nicotinamida	1,000
ácido p-aminobenzóico	1,000
piridoxina.HCL	1,000
riboflavina	0,200
tiamina.HCL	1,000
vitaminaB12	0,005

OUTROS COMPONENTES	mg/L
glicose	2.000,00
glutatione	1,00
vermelho de fenol	5,00

*(Sigma-Aldrich)

PROTOCOLO DE CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA EM CÂMARA DE NEUBAUER

Equipamentos e utensílios necessários para a contagem de células: Microscópio, Câmara de Neubauer com lamínula específica, pipeta, ponteira, tubo de ensaio.

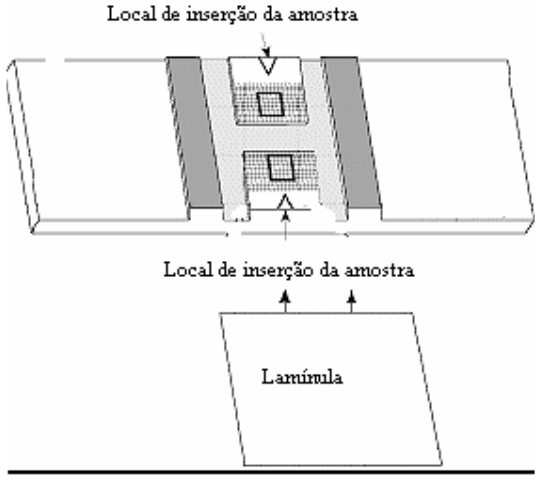


Figura 1: Desenho esquemático da Câmara de Neubauer

Procedimento:

- Coletar uma amostra da cultura em crescimento e colocar no tubo de ensaio. Agitar a amostra para garantir a homogeneidade da suspensão de células e a ausência de agrupamentos celulares.

- Colocar a lamínula sobre a área de contagem da câmara de Neubauer devidamente higienizada e seca. Coletar 200 μL da amostra e desprezar a 3 primeiras gotículas.

- Posicionar a ponta da ponteira sobre a ranhura em V e preencher a área de contagem sob a lamínula sem deslocá-la; uma ou duas gotas serão suficientes. A câmara de contagem deverá estar completamente preenchida, mas sem excesso. A amostra não deve correr para os canais e bordas da câmara.

- Levar a câmara de Neubauer ao microscópio e, com a objetiva de 10X focalizar uma das câmaras de contagem. Visualizar os 25 quadrantes, cada um contendo 16 quadrados. Podem-se contar as células dos 25 quadrantes ou, quando há grande número de células, pode-se contar as células dos quadrantes dos quatro cantos da câmara e o quadrante do centro, multiplicando o total por 5.

- Para contar as células em uma área, mudar para a objetiva de 40X, focalizar a área de um dos 25 quadrantes e contar as células.

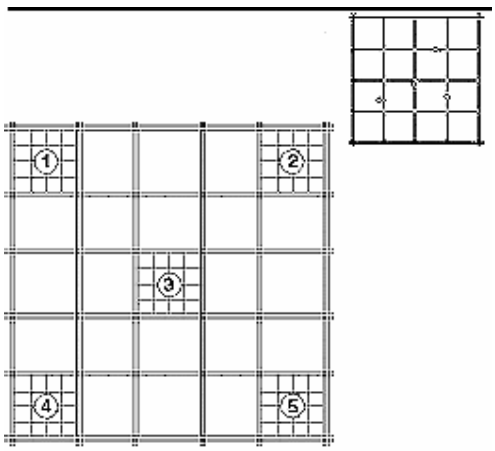
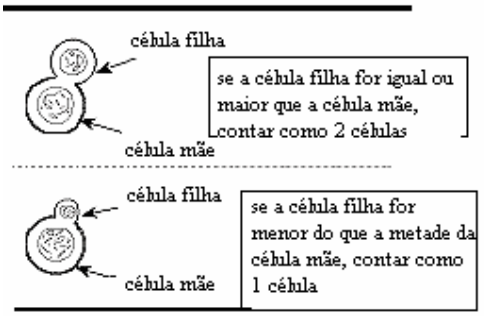
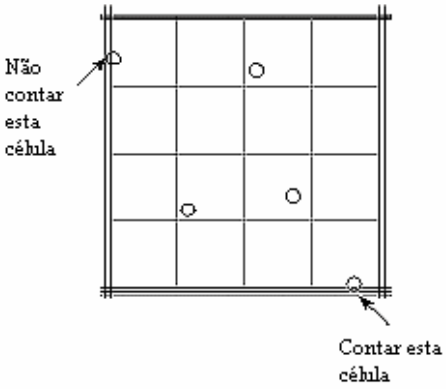


Figura 2: Imagem da câmara de contagem ao microscópio

- Para eliminar a chance de contar mais de uma vez o mesmo quadrado ou a mesma célula, adotar um procedimento padrão de contagem. Contar sempre em uma única direção (baixo p/ cima, esquerda p/ direita, por ex.). Células tocando o topo ou as laterais direitas não devem ser contadas, células tocando a borda de baixo e as laterais esquerdas devem ser contadas. Células que estão de dividindo devem ser contadas como uma célula, a não ser que a célula-filha seja igual ou maior que a metade da célula-mãe quando se conta como duas células.





- Se houver mais que 50 células por quadrante, deve-se diluir a amostra a ser contada. O fator de diluição deve ser usado no cálculo final do número de células. É importante diluir e contar as células o mais rápido possível quando se retira a amostra para que não haja erro na contagem devido à multiplicação das células. Na dúvida, repetir a contagem.

- **Cálculo:** usar os seguintes cálculos para chegar à contagem final: o nº de cels. contadas (multiplicado por 5 se contarmos somente 5 quadrantes) **X** fator de diluição da amostra **X** 10^4 = nº de céls. por mL.

Por ex. se contarmos 300 céls em 5 quadrantes (os 4 dos cantos e o central), o cálculo será: (300X5) X 10^4 = 15.000.000 cels/mL.
Se tivemos que diluir 1mL da amostra com 9mL de água e então contamos 30 cels. em 5 quadrantes, o cálculo seria: (30X5) X 10 X 10^4 = 15.000.000 cels/mL

- Após terminar a contagem, descontaminar com solução de chlorexidine a 2%, lavar, secar e acondicionar a câmara e a lamínula na embalagem original.

PROTOCOLO
PURIFICAÇÃO POR FILTRAÇÃO

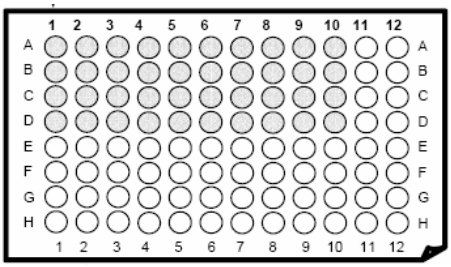
1. Preparar as nanopartículas (10mL)
2. Deixar na geladeira por 48h
3. Adicionar 200 μL de água miliQ e 200 μL da nanopartícula no eppendorf (filtro de 100.000 Da – azul);
4. Centrifugar a 500 rcf (0,5 x 100) ou 2300 rpm (2,3 x 1000) até obter 200 μL de filtrado (água);
5. Recuperar o retido virando o filtro dentro de um novo eppendorf e centrifugando a 500 rcf (0,5 x 100) ou 2300 rpm (2,3 x 1000) por 5 minutos
6. Repetir os passos de 3-5 por 4 vezes
7. Realizar os testes para fármaco livre e fármaco total e verificar resultados da purificação.

PROTOCOLO
PURIFICAÇÃO DE NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES
POR DIÁLISE DIRETA

1. Preparo da membrana:
   Hidratação: cortar 8,5cm de membrana, colocar em um béquer e adicionar água suficiente para cobri-la. Deixar em hidratação por 4 horas.
   Prender firmemente uma das extremidades.
   Colocar 1 mL de nanoemulsão ou nanocápsulas e prender firmemente a outra extremidade.
2. Diálise:
   a. Colocar a membrana preenchida em um béquer contendo 60mL de água miliQ de maneira que a água cubra toda a membrana.
   b. Colocar em agitação magnética a 60 rpm por tempo pré-determinado.
   c. A determinação do tempo necessário de diálise deve ser antecedida pelos testes de percentual de encapsulação e de fármaco total, que permitirão definir a concentração de fármaco que caracterizará o final do processo de purificação.

3. Seguir o Protocolo de Purificação por diálise direta por 170 minutos para as nanocápsulas e 165 minutos para as nanoemulsões .
4. Confirmar a concentração no meio de diálise após o final da purificação utilizando a curva de calibração de fluconazol.
5. Realizar um teste controle para verificar a concentração de fármaco na formulação após a diálise (Determinação do Percentual de Encapsulação e de Fármaco Total).

ESQUEMA DE MONTAGEM DE MICROPLACAS
PARA EXPERIMENTOS EM MICRODILUIÇÃO



PLACA **PFLU** _ Descrição: ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE DE Candida spp AO FLUCONAZOL em diferentes concentrações em µg/mL EM MEIO RPMI 1640 (COM GLUTAMINA, SEM BICARBONATO, ADICIONADO DE MOPS A 0,165 mol/L e pH corrigido para 7,04 com NaOH) –INÓCULO 0,5 Mc Farland diluído em meio 1:100 e 1:20. Soluções estoque do fármaco 10X a concentração do poço. Em cada poço: 20µL de solução estoque do fármaco em RPMI + 180µL de meio inoculado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M C. alb.	M C. alb.	M C. alb.		M C. alb.	M C. alb.	M C. alb.		M C. alb.	M C. alb.	M C. alb.	
B	M FLU 64 C.alb	M FLU 64 C.alb	M FLU 64 C.alb		M NCF64 C. alb	M NCF64 C. alb	M NCF64 C. alb		M NEF64 C. alb	M NEF64 C. alb	M NEF64 C. alb	
C	M FLU 32 C.alb	M FLU 32 C.alb	M FLU 32 C.alb		M NCF32 C.alb	M NCF32 C.alb	M NCF32 C.alb		M NEF32 C. alb	M NEF32 C. alb	M NEF32 C. alb	
D	M FLU 16 C. alb	M FLU 16 C. alb	M FLU 16 C. alb		M NCF16 C. alb	M NCF16 C. alb	M NCF16 C. alb		M NEF16 C. alb	M NEF16 C. alb	M NEF16 C. alb	
E	M FLU 8 C. alb	M FLU 8 C. alb	M FLU 8 C. alb		M NCF8 C. alb	M NCF8 C. alb	M NCF8 C. alb		M NEF8 C. alb	M NEF8 C. alb	M NEF8 C. alb	
F	M FLU 4 C. alb	M FLU 4 C. alb	M FLU 4 C. alb		M NCF4 C. alb	M NCF4 C. alb	M NCF4 C. alb		M NEF4 C. alb	M NEF4 C. alb	M NEF4 C. alb	
G	M FLU 2 C. alb.	M FLU 2 C. alb.	M FLU 2 C. alb.		M NCF2 C. alb.	M NCF2 C. alb.	M NCF2 C. alb.		M NEF2 C. alb.	M NEF2 C. alb.	M NEF2 C. alb.	
H	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	Meio (M) Controle	

Figura: Modelo de montagem das microplacas

BIBLIOGRAFIA

AKKAR, A.; NAMSOLLECK, P.; BLAUT, M. and MULLER, R. H.. Solubilizing Poorly Soluble Antimycotic Agents by Emulsification via a Solvent-Free Process. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology* 5 (1):E24, 2004.

AKKAR, A. and MÜLLER, R.H. Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls® technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56: 29-36, 2003.

ALLEMANN, E.; GURNY, R. and DOELKER; E. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 39 (5):173-191, 1993.

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:151-162, 1999.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.; JRADI, H.; DESAI, T. and MORRISON, C. J. Quantitation of Ergosterol Content: Novel Method for Determination of Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (10):3332-3337, 1999.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.; WARNOCK, D. W. and MORRISON, C. J. Quantitation of *Candida albicans* Ergosterol Content Improves the Correlation between In Vitro Antifungal Susceptibility Test Results and In Vivo Outcome after Fluconazole Treatment in a Murine Model of Invasive Candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (8):2081-2085, 2000.

BAILEY, E. M.; KRAKOVSKY, D. J. and M. J. RYBAK. The triazole antifungal agents: a review of itraconazole and fluconazole. *Pharmacotherapy* 10 (2):146-153, 1990.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences,* 60 (1):21-37, 2003.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharmaceutical. Science & Technology Today* 3(5): 163-171. 2, 2000.

BARRY, A. L.; PFALLER, M. A.; BROWN, S. D.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; KNAPP, C.; RENNIE, R. P.; REX, J. H. and RINALDI; M. G. Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents. *American Society for Microbiology*. 2000.

BATRAKOVA, E.V.; LI, SHU; VINOGRADOV, S. V.; ALAKHOV, V. Y.; MILLER, D. W. AND KABANOV, A. V. Mechanism of Pluronic Effect on P-Glycoprotein Efflux System in Blood-Brain Barrier: Contributions of Energy Depletion and Membrane Fluidization. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeuthics, 299* (2): 483-493, 2001.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. New antifunfungic drugs: a review. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159 -172, Jul.- Dez./2004

CASALINUOVO, I. A.; DI FRANCESCO, P. and GARACI, E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 8 (2):69-77, 2004.

CHAMBERLAND, S.; BLAIS, J.; COTTER, D.P. *et al.* - In: ABSTR OF THE 39TH INTERSCI CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTERAPY. n.1270. 1999.

CHARLIER, C.; HART, E.; LEFORT, A.; RIBAUD, P.; DROMER, F.; DENNING, D. W. and LORTHOLARY, O. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (3):384, 2006.

CHEPURNOV, A. A.; BAKULINA, L. F.; DADAEVA, A. A.; USTINOVA, E. N.; CHEPURNOVA, T. S. and BAKER Jr, J. R. Inactivation of Ebola virus with a surfactant nanoemulsion. *Acta Tropica* 87: 315-320, 2003.

CLANCY, C. J. and NGUYEN, M. H. Comparison of a photometric method with standardized methods of antifungal susceptibility testing of yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (11): 2878-2882, 1997.

COLOMBO, A.L. e GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36:599-607, 2003.

CUENCA-ESTRELLA, M.; VAZ-GUERRA, T. M.; MELLADO, E. and RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Influence of Glucose Supplementation and Inoculum Size on Growth Kinetics and Antifungal Susceptibility Testing of Candida spp. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2):525-532, 2001.

CUENCA-ESTRELLA, M.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MELLADO, E.; WARNOCK, D. W. and RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of Candida Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11): 3644-3647, 2002.

DE CHASTEIGNER, S.; CAVE, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P.and PUISIEUX, F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: A feasibility study. *Drug Development Research,* 38 (2): 116-128, 1996.

DE LOGUI, A.; SADDI, M; CARDIA, M.C.; BORGNA, R; SANNA, C.; SADDI, B. and MACCIONI, E. In vitro activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of Candida spp. and fluconazole-resistant Candida albicans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 55, 692–698, 2005.

DEBRUYNE, D. and RYCKELYNCK, J. P. Clinical pharmacokinetics of fluconazole. *Clinical Pharmacokinetics* 24 (1):10-27, 1993.

DELAIR, T. Colloidal particles: Elaboration from preformed polymers. *Surfactant Science Series* 116:329-347, 2003.

DONELLI, G.; FRANCOLINI, I.; RUGGERI, V.; GUAGLIANONE, E.; D'ILARIO, L. and PIOZZI, A. Pore formers promoted release of an antifungal drug from functionalized polyurethanes to inhibit Candida colonization. *Journal of Applied Microbiology*, 100(3):615-22; 2006.

EL LAITHY, H. M. and EL-SHABOURY, K. M. The development of Cutina lipogels and gel microemulsion for topical administration of fluconazole. *AAPS PharmSciTech* 3 (4):E35, 2002.

ESPUELAS, M. S. ; LEGRAND, P. ; LOISEAU, P. M. ; BORIES, C. ; BARRATT, G. and IRACHE, J. M. In Vitro Antileishmanial Activity of Amphotericin B Loaded in Poly (e-Caprolactone) Nanospheres. *Journal of Drug Targeting* 10 (8):593-599, 2002.

ESPUELAS, S. ; LEGRAND, P. ; LOISEAU, P. M. ; BORIES, C. ; BARRATT, G. and IRACHE, J. M. In Vitro Reversion of Amphotericin B Resistance in Leishmania donovani by Poloxamer 188. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 44(8): 2190–2192; 2000.

FESSI, H,; PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. *European Patent*, 0274961, 1988.

FLORENCE, A.T. and ATTWOOD, D. Emulsões, Suspensões e Dispersões. *In: Princípios Físico-Químicos em Farmácia*, cap. 7, 345-411, EDUSP, 2003.

FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M. and TUOR, U. The MTT [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8):3727-3729, 1999.

GALLE, L.C.; GIANINNI, M.J.S.M. Prevalência e Susceptibilidade de Leveduras Vaginais. *J. Bras. Patol. Med. Lab***.** 40 (4): 229-236, 2004.

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

GEHLSEN, K.R. and HELLSTRAND, K. Compositions for the treatment of infectious diseases. European Patent EP1448127, 2004.

GEORGIEV, V. S. Membrane transporters and antifungal drug resistance. *Current Drug Targeting* 1 (3):261-284, 2000.

GOLDSHTEIN,R.; KAMBURG,R.; RATNER,G.; KOPYLOV,M.; ZELKIND,I.; GOLDSHTEIN,V.; SKYLARSKY,O.; TULBOVICH,B.; STERN,E. Water soluble nanoparticles and method for their production. UNITED STATES PATENT nº 20050191359.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *et al*. (eds) - As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª Edição. Rio de Janeiro – MacGraw Hill, 1996.

GRANT, S. M. and CLISSOLD, S. P. Fluconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs* 39 (6):877-916, 1990.

GRAYBILL, J.R. The future of antifungal therapy. *Clin Infect Dis.* 1996, May; 22 Suppl 2:S166-78.

GUPTA, S. K.; DHINGRA, N.; VELPANDIAN, T. and JAISWAL, J. Efficacy of fluconazole and liposome entrapped fluconazole for *C. albicans* induced experimental mycotic endophthalmitis in rabbit eyes. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 78 (4):448-450, 2000.

HAMOUDA, T.; HAYES, M. M.; CAO, Z.; TONDA, R.; JOHNSON, K.; WRIGHT, D. C.; BRISKER, J. and BAKER Jr, J. R. A Novel Surfactant Nanoemulsion with Broad-Spectrum Sporicidal Activity against Bacillus Species. *Journal of Infectious Diseases* 180 (6):1939-1949, 1999.

HAMOUDA, T. and BAKER, J. R. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *Journal of Applied Microbiology* 89 (3):397-403, 2000.

HAMOUDA, T.; MYC, A.; DONOVAN, B.; SHIH, A. Y.; REUTER, J. D. and BAKER Jr, J. R. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiological Research* 156 (1):1-7, 2001.

HARSTE, S. & BOLARD, J. - Amphotericin B: new life for an old drug. Trends Pharmac Sci. n.17, p. 445-449. 1996.

HENRY, K.W.; NICKELS, J.T. and EDLINDI, T.D. Upregulation of *ERG* Genes in *Candida* Species by Azoles and Other Sterol Biosynthesis Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 44, No. 10, p. 2693–2700; 2000.

JIRA,V.; JIRATHITIKAL,V. Anti-fungal composition**.** UNITED STATES PATENT nº 20030039667, 2003.

JULIANO, R.L. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 2: 31-54, 1988.

KAYSER, O. The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems Pp. 3-5. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 6 (1), 2005.

KOHLI, A.; MUKHOPADHYAY, S. K; RATTAN, A. AND PRASAD, R. In Vitro Low-Level Resistance to Azoles in *Candida albicans* is Associated with Changes in Membrane Lipid Fluidity and Asymmetry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 46 (4): 1046–1052, 2002.

KREUTER, J. Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics. *Infection***,** 19:224-228, 1991.

KREUTER, J. E. *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, 1994.

KRCMERY, V. and BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection,* 50(4): 243-260, 2002.

KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; CLARK, T. A.; PUJOL, C.; CHANDRA, J.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D. W.; SOLL, D. R. and GHANNOUM, M. A. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerging Infectious Diseases,* 10 (6):1074-1081, 2004.

KWON, G. S. and OKANO, T**.** Soluble self assembled block copolymers for drug delivery. *Pharmaceutical Research* **16:**597–600; 1999.

LE ROY BOEHM, A. L. and FESSI, H. Pharmaceutical applications of the zeta potential--use in characterization of colloidal drug carriers. *J. Pharm Belg***.** 55 (2):40-48, 2000.

LEITE, E. A.; VILELA, J. M. C.; MOSQUEIRA, V. C. F. and SPANGLER ANDRADE, M. Poly-Caprolactone Nanocapsules Morphological Features by Atomic Force Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* ,11: 48-51, 2005.

LEVITZ, S. M. and DIAMOND, R. D. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *Journal of Infectious Diseases* 152 (5):938-945, 1985.

LIMAYEM, I., CHARCOSSET, C. and FESSI, H. Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process. *Separation and Purification Technology,* 38: 1-9, 2004.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M. and KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine* 8 (2):76-81, 2002.

MAESTRELLI, F.; MURA, P. and ALONSO, M. J. Formulation and characterization of triclosan sub-micron emulsions and nanocapsules. *Journal of Microencapsulation* 21 (8):857-864, 2004.

MAGENHEIM, B. and BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. S.T.P. Pharma Sciences, 1 (4):221-241, 1991.

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

MCCARRON, P. A.; DONNELLY, R. F.; CANNING, P. E.; MCGOVERN, J. G. and JONES, D. S. Bioadhesive, non-drug-loaded nanoparticles as modulators of candidal adherence to buccal epithelial cells: a potentially novel prophylaxis for candidosis. *Biomaterials* 25 (12):2399-2407, 2004.

MELETIADIS, J.; MEIS, J. F. G. M.; MOUTON, J. W.; DONNELLY, J. P. and VERWEIJ, P. E. Comparison of NCCLS and 3-(4, 5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2, 5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) Methods of In Vitro Susceptibility Testing of Filamentous Fungi and Development of a New Simplified Method. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (8):2949-2954, 2000.

MICHALOWSKI, C. B. ; GUTERRES, S. S. and LA COSTA, T. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (5):1093-1100, 2004.

MIYAMOTO, H.; OGURA, Y.; HASHIZOE, M.; KUNOU, N.; HONDA, Y. and IKADA, Y. Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole. *Current Eye Research* 16 (9):930-935, 1997.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. and MURRAY, J. C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmacological Reviews* 53 (2):283-318, 2001.

MOLPECERES, J. Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. *Journal of Microencapsulation* 17 (5):599-614, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2):55-63, 1983.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY; PUISIEUX, H., F. and BARRATT, G. Poly (D, L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89 (5):614-626, 2000.

MÜLLER, C.R.; HAAS, S.R.; BASSANI, V.L.; GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; PERALHA, M.C.R. e POHLMANN, A.R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Química Nova,* Vol. 27, No. 4, 555-560, 2004.

MULLER, R. H.; SCHMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT, J. and BROMER, S. SolEmuls-novel technology for the formulation of iv emulsions with poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 269 (2):293-302, 2004.

MYC, A.; VANHECKE, T. and LANDERS, J. J. The fungicidal activity of novel nanoemulsion (X8W60PC) against clinically important yeast and filamentous fungi. *Mycopathologia* 155 (4):195-201, 2003.

MYC, A.; HORN, R.B.; HAMOUDA, T. and BAKER, J.R. Fungicidal effect of a "hybrid" surfactant lipid preparation (SLP) on Candida spp. *Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol* 99:138, 1999.

PEREA, S.; LOPEZ-RIBBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.;. MCATEE, R. K; SANTILLAN, R. A.; MARTINEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D. and

PATTERSON, T. F. Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (10):2676-2684, 2001.

PFALLER, M. A.; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; LANCASTER, M.; ESPINEL-INGROFF, A.; REX, J. H. and RINALDI, M. G. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for in vitro susceptibility testing of yeast isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard methods. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (7):1650-1653, 1994.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. and SHEEHAN, D. J. Interpretive Breakpoints for Fluconazole and Candida Revisited: a Blueprint for the Future of Antifungal Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2):435-447, 2006.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E. and FESSI, H. Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. *Pharmaceutical Research* 15 (7):1056-1062, 1998.

RANGEL-YAGUI, C.; PESSOA Jr, A.; TAVARES, L.C. Micellar Solubilization of Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 8 (2):147-163, 2005.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G. and SHEEHAN, D. J. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. *Clinical Microbiology Reviews* 14 (4):643-658, 2001.

REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D.; FILLER, S.G.; PAPPAS, P.G.; DISMUKES, W.E. and EDWARDS, J.E. Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*; 2000;30:662-678.

REX, J. H. and PFALLER, M. A. Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age? *Clinical Infectious Diseases* 35 (8):982-989, 2002.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr.Opin.Microbiol* 5:379-385, 2002.

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

Sturley SL (2000) Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* **1529**: 155–163

SUGIZAKI, M.F.; RHODEN, C.R.; BOMBONATTI, D.M.; MONTELLI, A.C.; MARTINSON, M.E. and LOPES, C.A.M. Prevalence and *in vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from clinical specimens in São Paulo, Brazil. *Rev. Iberoamericana de Micologia* (15): 16-18, 1998.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J. and SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108 (109):303-318, 2004.

VELPANDIAN, T.; NARAYANAN, K.; NAG, T. C.; RAVI, A. K.; and GUPTA, S. K. Retinal toxicity of intravitreally injected plain and liposome formulation of fluconazole in rabbit eye. *Indian Journal of Ophthalmology* 54 (4):237-240, 2006.

VENIER-JULIENNE, M. C. ; VOULDOUKIS, I. ; MONJOUR, L. and BENOIT, J. P. In vitro study of the anti-leishmanial activity of biodegradable nanoparticles. *Journal of Drug Targeting* 3 (1):23-29, 1995.

VENIER-JULIENNE; M. C. and BENOIT, J. P. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharmaceutical Acta Helvetica* 71 (2):121-128, 1996.

WARDLE, H. M.; LAW, D.; MOORE, C. B.; MASON, C. and DENNING, D.W. In Vitro Activity of D0870 Compared with Those of Other Azoles against Fluconazole-Resistant *Candida* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (4): 868–871, 1995.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 20: 131-145, 1996.

WHITE, T. C.; MARR, K. A. and BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 11 (2):382-402, 1998.

WINDSOR, J.B.; ROUX, S.J.; LLOYD, A.M. and THOMAS, C.E. Methods and compositions for increasing the efficacy of biologically-active ingredients**.**UNITED STATES PATENT nº 20060276339, 2006.

WU, H.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N. D. and ROESSLER, B. J. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 220 (1-2):63-75, 2001.

YANG, H. C.; MIKAMI, Y.; YAZAWA, K.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; BRANCHINI, M. L.; AOKI, F. H. and YAMAMOTO, K. Colorimetric MTT assessment of antifungal activity of D0870 against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Mycoses* 41 (11-12):477-480, 1998.

ZERVOS, M. and MEUNIER, F. Fluconazole (Diflucan): A review. *International Journal of Antimicrobial Agents* 3 (3):147-170, 1993.