

**DANIELLE NOGUEIRA DE ASSIS**

**BIODISTRIBUIÇÃO DO FLUCONAZOL  
MARCADO COM <sup>99m</sup>TECNÉCIO, LIVRE E  
ENCAPSULADO EM NANOCÁPSULAS, EM UM  
MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO COM  
*Candida albicans***

**FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFMG  
BELO HORIZONTE**

**2007**

**DANIELLE NOGUEIRA DE ASSIS**

**BIODISTRIBUIÇÃO DO FLUCONAZOL  
MARCADO COM <sup>99m</sup>TECNÉCIO, LIVRE E  
ENCAPSULADO EM NANOCÁPSULAS, EM UM  
MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO COM  
*Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla F. Mosqueira.

**FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFMG**

**BELO HORIZONTE**

**2007**

**Locais de realização do projeto**

Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG

Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG

Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia da Escola de Farmácia da UFOP

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

Dr. José Mário Carneiro Vilela

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

Dra. Margareth Spangler de Andrade

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

Prof. Dr. Alfredo José Afonso Barbosa

**Faculdade de Medicina da UFMG**

*Aos meus queridos pais, Nilton e Líbia,  
exemplo de caráter, honestidade e união.  
Obrigada por iluminarem meu caminho,  
dando condições para que eu continuasse  
nessa longa caminhada profissional.  
Obrigada pelo companheirismo e amizade  
até mesmo nas horas mais difíceis em  
que os objetivos pareciam  
distante demais.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a oportunidade dessa experiência maravilhosa de aprendizagem e de amadurecimento profissional e a coragem e força necessárias nas horas difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, um exemplo de otimismo e paixão pelo trabalho acadêmico, obrigada pelo conhecimento transmitido, pelos ensinamentos de vida, pela força e, principalmente, por acreditar no meu potencial e no meu trabalho.

À Prof. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira, por me receber de braços abertos em seu laboratório, dando uma importante colaboração neste trabalho. Obrigada pela amizade, dedicação e apoio.

À Prof. Simone Odília Fernandes Diniz, pela amizade, pelo apoio e por proporcionar condições para que o laboratório de Radioisótopos seja um ambiente agradável de se trabalhar, tanto do ponto de vista de organização como também de união da equipe.

À Margareth Spangler, por oferecer condições de realização dos experimentos de microscopia de força atômica (MFA) no Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC).

Ao Vilela, pela importante colaboração na execução das imagens por MFA, obrigada pela disponibilidade, interesse e entusiasmo no trabalho desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Alfredo José Afonso Barbosa, pela disponibilidade e atenção para a realização das análises histológicas.

Ao pesquisador Mick Welling da Universidade de Leiden, Holanda, pela atenção e pelas informações de extrema valia para o procedimento de marcação do fluconazol.

Ao Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), por possibilitar o trabalho de irradiação dos animais. Em especial, agradeço a funcionária Maria Aparecida que me acompanhou durante todo o trabalho, pela sua simpatia e receptividade.

À Adelaide e ao Batista pela importante colaboração no fornecimento dos animais.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

Aos estagiários do laboratório de Radioisótopos, Tatiane, Luciane, Rafael, Beatriz e Luiz Paulo, pela ajuda fundamental nos experimentos com animais.

Aos colegas do laboratório de Farmacotécnica que disponibilizaram equipamentos necessários para a realização dos experimentos. Agradeço também o carinho e amizade de todos.

Aos amigos, Maira, Luciene e Paulo, por tornarem meus dias mais fáceis com a amizade e apoio incondicional. Obrigada por dividirem comigo o peso das dificuldades e multiplicarem a alegria das vitórias alcançadas.

Ao Glauco, pelo amor, paciência e apoio em todos os momentos. Sua presença foi muito importante no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos irmãos Fabrício e Fernanda, pelo incentivo e amizade.

A todos os meus amigos e parentes que mesmo não acompanhando de perto o meu trabalho, torceram para mais uma conquista em minha vida.

*Antes do compromisso, há hesitação, a oportunidade de recuar, uma ineficácia permanente. Em todo ato de iniciativa (e de criação), há uma verdade elementar cujo desconhecimento destrói muitas idéias e planos esplêndidos. No momento em que nos comprometemos de fato, a providência também age. Ocorre toda espécie de coisas para nos ajudar, coisas que de outro modo nunca ocorreriam. Toda uma cadeia de eventos emana da decisão, fazendo vir em nosso favor todo tipo de encontros, de incidentes e de apoio material imprevistos, que ninguém poderia sonhar que surgiriam em seu caminho. Começa tudo o que possas fazer, ou que sonhas fazer. A ousadia traz em si o gênio, o poder e a magia.*

**GOETHE**



## **RESUMO**

---

## RESUMO

---

Diversas classes de antifúngicos têm sido utilizadas no tratamento das candidíases, porém, pacientes que apresentam imunodeficiência avançada podem apresentar resultados insatisfatórios após a terapia. Nestes casos, muitas vezes utilizam-se altas doses dos fármacos ou administração de múltiplos agentes, aumentando o risco de efeitos adversos graves. Considerando estas dificuldades, a encapsulação de agentes antifúngicos em carreadores nanoparticulados tem sido utilizada com o objetivo de alterar a farmacocinética dos fármacos, possibilitando tratamentos mais eficazes e com menor incidência de efeitos colaterais. A proposta deste trabalho foi avaliar a biodistribuição do fluconazol marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ , livre e encapsulado em nanocápsulas convencionais e furtivas, em um modelo de infecção por *Candida albicans*. A marcação do fluconazol com  $^{99m}\text{Tc}$  foi avaliada por cromatografia de camada delgada. A estabilidade de marcação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol foi investigada em meio plasmático. O tamanho, a homogeneidade e o potencial zeta das preparações de NCs foram determinados no equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK). A morfologia e a organização estrutural foram avaliadas por microscopia de força atômica (MFA). O estudo de liberação *in vitro* das NCs foi avaliado em NaCl 0,9% e em meio contendo plasma de camundongo a 70%. Camundongos Swiss machos, pesando entre 20 a 25g, foram utilizados para o desenvolvimento do foco infeccioso induzido por *Candida albicans* e para os estudos de biodistribuição. A marcação do fluconazol com  $^{99m}\text{Tc}$  apresentou uma eficiência de 94% e mostrou-se estável por até 24 horas. O percentual de encapsulação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em NCs convencionais e furtivas foi de aproximadamente 30%. O diâmetro médio calculado por espectroscopia de correlação de fótons (ECF) variou de 236 a 356 nm, enquanto que o diâmetro médio determinado por MFA variou de 238 a 411 nm. A relação diâmetro/altura diminuiu significativamente quando se utilizou glutaraldeído 25% para fixação das NCs. O potencial zeta variou de -55 a -69 mV e as NCs furtivas apresentaram valores absolutos menores quando comparadas às NCs convencionais. A liberação *in vitro* do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol de NCs convencionais e furtivas, em meio plasmático, foi maior que no meio

contendo NaCl 0,9%. No meio plasmático, a liberação do fármaco de NCs convencionais foi mais rápida quando comparada com as NCs furtivas. Os estudos histológicos e de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol mostraram que o foco infeccioso induzido por  $10^8$  UFC/mL de *C. albicans*, em um período de 48 horas apresentou resposta inflamatória mais intensa que o foco de 24 horas, induzido por  $10^6$  UFC/mL. Os estudos de biodistribuição mostraram que o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre foi mais rapidamente eliminado pelo sistema renal quando comparado com o fármaco encapsulado em NCs. Transcorridos 240 minutos da injeção das formulações estudadas, os resultados mostraram níveis reduzidos de  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole livre no sangue, enquanto que o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole encapsulado em NCs permaneceu circulando em níveis significativamente maiores ( $p < 0,05$ ). As NCs convencionais foram mais captadas pelo sistema monocítico fagocitário do que as NCs furtivas. Além disso, as formulações de NCs permaneceram mais tempo retidas no foco infeccioso quando comparadas ao  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos sugerem que as NCs podem contribuir para retenção do fármaco no foco infeccioso por um período mais prolongado.

# **ABSTRACT**

---

**ABSTRACT**

---

Several classes of antifungal agents have been used in the treatment of candidiasis, but patients with advanced immunodeficiency may present unsatisfactory results after therapy. In these cases, high doses of drugs or the multiple agents may sometimes be used, increasing the risk of serious side effects. Considering these difficulties, the encapsulation of antifungal agents in nanoparticulate carriers has been used with the objective of modify the pharmacokinetic parameters of drugs, became the treatments more efficient and with less side effects. The purpose of this work was to evaluate the biodistribution of free  $^{99m}\text{Tc}$  labeled fluconazole and of that encapsulated in conventional and furtive nanocapsules, using *Candida albicans* as an infection model. The labeling of fluconazole with  $^{99m}\text{Tc}$  was evaluated by thin layer chromatography. The labeling stability of  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole was investigated in plasmatic medium. The size, homogeneity and zeta potential of NC preparations were determined with a Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK). The morphology and the structural organization were evaluated by atomic force microscopy (AFM). The *in vitro* release study of NCs was evaluated in 0,9% NaCl and in 70% mice plasma. Male Swiss mice weighing between 20 and 25 g were used for the development of infectious foci induced by *Candida albicans* and for biodistribution studies. The labeling yield of fluconazole with  $^{99m}\text{Tc}$  was 94% and the radiolabeled drug was stable for up 24 hours. The percentage of encapsulation of  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole in conventional and furtive NCs was approximately 30%. The average diameter calculated by photon correlation spectroscopy (PCS) varied from 236 to 356 nm, while the average diameter determined by AFM varied from 238 to 411 nm. The diameter/height ratio decreased significantly when glutaraldehyde (25%) was used for fixation of NCs. The zeta potential varied from -55 to -69 nm and furtive NCs presented lower absolute values than conventional NCs. The *in vitro* release of  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole by the conventional and furtive NCs was greater in plasma medium than in 0,9% NaCl. The drug release from conventional NCs in plasma medium was faster than for furtive NCs. The histological and  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole uptake studies showed that infectious foci induced by  $10^8$  UFC/mL

of *C. albicans* at 48 hours presented a more intense inflammatory process than the foci at 24 hours, which were induced by  $10^6$  UFC/mL. The biodistribution studies showed that free  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole was more rapidly eliminated by renal systems than the drug encapsulated in NCs. There were reduced levels of free  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole at blood, 240 minutes after injection, while that the  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole encapsulated in NCs remained in circulation at significantly higher levels ( $P < 0,05$ ). The uptake of conventional NCs by the mononuclear phagocyte system was greater than that for furtive nanocapsules. The nanocapsules remained in the infectious foci for a longer time than free  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazole. The results obtained suggesting that the nanocapsules could contribute for a longer retention of the drug in the infectious foci.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural do fluconazol .....	08
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de nanocápsula constituída por um núcleo oleoso envolvido por uma membrana polimérica e nanoesfera constituída por uma matriz polimérica. ....	13
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática de uma partícula de superfície positiva com uma camada de íons negativos adsorvidos na camada de “Stern”. ....	20
<b>Figura 4.</b> (a) Desenho esquemático do princípio de funcionamento da técnica da MFA. (b) Curva esquemática mostrando a dependência da força de interação sonda-amostra em função da separação entre elas. ....	23
<b>Figura 5.</b> Desenho esquemático das etapas de preparação das nanocápsulas. ....	35
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da metodologia para separação do <sup>99m</sup> Tc-fluconazol encapsulado nas NCs do <sup>99m</sup> Tc-fluconazol não encapsulado e determinação do teor de encapsulação. ....	36
<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico do <sup>99m</sup> Tc-fluconazol em sílica gel 60, utilizando metiletilcetona como eluente. ....	45
<b>Figura 8.</b> Gráfico do perfil cromatográfico do fluconazol e fluconazol radiomarcado em gel sephadex G-150. ....	46
<b>Figura 9.</b> Imagens de NCs PLA-POLOX. Em (A) vista do topo e em (B) visão tridimensional das partículas. ....	52
<b>Figura 10.</b> Imagens de NCs PLA-PEG, com visualização do halo ao redor das partículas. Em (A) imagem topográfica e em (B) imagem de contraste de fase. ....	52
<b>Figura 11.</b> Imagem topográfica de NCs PLA-POLOX- <sup>99m</sup> Tc-fluconazol .....	53
<b>Figura 12.</b> Imagens de NCs PLA-PEG- <sup>99m</sup> Tc-fluconazol. Em (A) imagem topográfica e em (B) imagem de contraste de fase. ....	54
<b>Figura 13.</b> NCs PLA-POLOX- <sup>99m</sup> Tc-fluconazol 24 horas (A) e 48 horas (B) após a deposição da amostra na superfície da mica. ....	56
<b>Figura 14.</b> Imagens topográficas de NCs PLA-PEG- <sup>99m</sup> Tc-fluconazol, apresentando a relação diâmetro/altura das partículas. Em (A) NCs sem a fixação pelo glutaraldeído e em (B) NCs fixadas pelo glutaraldeído. ....	57
<b>Figura 15.</b> Imagens topográficas de NCs PLA-POLOX- <sup>99m</sup> Tc-fluconazol fixadas pelo glutaraldeído, 24 horas (A) e 48 horas (B) após a deposição da amostra sobre a mica.....	58
<b>Figura 16.</b> Imagem topográfica de glutaraldeído, mostrando camadas com altura entre 1.5 e 1.7 nm. ....	58

---

<b>Figura 17.</b> Cinética de liberação in vitro do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol de NCs PLA-POLOX e NCs PLA-PEG a 37°C, em NaCl 0,9% e plasma de camundongo a 70%. .....	59
<b>Figura 18.</b> Corte histológico de tecido muscular da coxa de camundongo não infectado (controle). .....	63
<b>Figura 19.</b> Cortes histológicos do músculo da coxa de camundongos infectados com <i>C. albicans</i> . .....	64
<b>Figura 20.</b> Camundongo infectado com suspensão de <i>C. albicans</i> contendo $10^8$ UFC/mL no músculo da coxa direita. ....	64
<b>Figura 21.</b> Estudo de captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em camundongos infectados com suspensão contendo $10^6$ UFC/mL de <i>C. albicans</i> , 24 horas após a infecção e em camundongos não infectados (controles).....	65
<b>Figura 22.</b> Estudo de captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em camundongos infectados com suspensão contendo $10^8$ UFC/mL de <i>C. albicans</i> , 48 horas após a infecção e em camundongos não infectados (controles).....	65
<b>Figura 23.</b> Percentual de captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, no sangue após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos (n = 5 por grupo). .....	68
<b>Figura 24.</b> Percentual de captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, na bexiga e nos rins, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos (n = 5 por grupo). .....	68
<b>Figura 25.</b> Percentual de captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, no fígado e baço, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos (n = 5 por grupo). .....	70
<b>Figura 26.</b> Percentual de captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, nos pulmões, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos (n = 5 por grupo). .....	71
<b>Figura 27.</b> Captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, nas coxas infectadas com <i>C. albicans</i> e controles. ....	73
<b>Figura 28.</b> Relação de captação de radioatividade na coxa infectada com <i>C. albicans</i> e na coxa controle. ....	74



---

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Percentual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ liberado após incubação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol com plasma de camundongo a 37°C.....	47
<b>Tabela 2.</b> Percentual de encapsulação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nas nanocápsulas. ....	48
<b>Tabela 3.</b> Características físico-químicas das NCs.....	49
<b>Tabela 4.</b> Relação diâmetro/ altura das nanocápsulas medidas por MFA. ....	54
<b>Tabela 5.</b> Contagem global de leucócitos e percentual de linfócitos e neutrófilos em camundongos Swiss. ....	62
<b>Tabela 6.</b> Captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs PLA-POLOX e PLA-PEG na tireóide. ....	72

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ζ	potencial zeta
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
Da	dalton
DI	dose injetada
Bq	bequerel
cpm	contagem por minuto
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
FDA	Food and Drug Administration
Gy	gray
HIV	vírus da imunodeficiência humana
LCR	líquido cefalorraquidiano
NC	nanocápsulas
nm	nanômetro
NS	nanoesfera
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MFA	microscopia de força atômica
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
PCL	poli-ε-caprolactona
IP	Índice de polidispersidade
ECF	espectroscopia de correlação de fótons
PEG	polietilenoglicol
PLA	ácido poli ( <i>D, L</i> -lático)
PLAGA	ácido poli (lático-co-glicólico)

PLG	ácido poliglicólico
PM	peso molecular
PMNs	polimorfonucleares
POLOX	poloxamer
RNA	ácido ribonucleico
SFM	sistema fagocítico mononuclear
SDA	ágar sabouraud dextrosado
UFC	unidade formadora de colônia

---

**SUMÁRIO****RESUMO****ABSTRACT****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Candidíases .....	4
2.1.1 Medicamentos utilizados no tratamento das candidíases .....	5
2.2 Fluconazol .....	8
2.3 Sistemas nanoestruturados para a vetorização de fármacos .....	11
2.4 Nanocápsulas .....	16
2.4.1 Características físico-químicas das nanocápsulas .....	17
2.4.1.1 Distribuição do tamanho das nanocápsulas .....	18
2.4.1.2 Potencial zeta ( $\zeta$ ) das nanocápsulas .....	19
2.4.1.3 Avaliação morfológica .....	22
2.4.1.4 Teor de encapsulação .....	24
2.4.1.5 Cinética de liberação do fármaco .....	25
2.5 Tecnécio .....	25
3. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	28
1. OBJETIVO GERAL .....	29
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
1. MATERIAL .....	31
2. EQUIPAMENTOS .....	31

---

3. ANIMAIS.....	31
4. MICRORGANISMO .....	32
5. MÉTODOS .....	32
5.1 Marcação do fluconazol com $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio .....	32
5.2 Purificação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol .....	32
5.3 Determinação do rendimento de marcação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol .....	33
5.4 Determinação do perfil do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol por cromatografia de permeação em gel sephadex G-150 .....	33
5.5 Estudo de estabilidade do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol .....	34
5.6 Preparação e caracterização físico-química das nanocápsulas .....	34
5.6.1 Preparação das nanocápsulas .....	34
5.6.2 Determinação da porcentagem de encapsulação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol .....	35
5.6.3 Caracterização das nanocápsulas por Espectroscopia de Correlação de Fótons.....	36
5.6.4 Caracterização das nanocápsulas por Microscopia de Força Atômica (MFA).....	37
5.6.5 Estudo de liberação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol .....	38
5.7 Imunossupressão dos animais .....	39
5.8 Infecção dos animais.....	39
5.8.1 Cultivo da <i>Candida albicans</i> .....	39
5.8.2 Desenvolvimento do foco infeccioso por <i>Candida albicans</i> .....	40
5.9 Avaliação da influência da concentração de <i>Candida albicans</i> no desenvolvimento do foco infeccioso .....	40
5.9.1 Análise histológica .....	40
5.9.2 Estudo de captação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol pelo foco infeccioso .....	41
5.10 Estudos de biodistribuição .....	41
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
1. Rendimento de marcação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol .....	45
2. Perfil do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em gel sephadex G-150 .....	46

---

---

3. Estabilidade do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol .....	47
4. Percentual de encapsulação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nas nanocápsulas .....	48
5. Caracterização das nanocápsulas por Espectrometria de Correlação de Fótons .....	49
6. Caracterização das nanocápsulas por Microscopia de Força Atômica (MFA) .....	51
7. Estudo de liberação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol .....	59
8. Efeito da radiação gama na contagem global de leucócitos .....	61
9. Influência da concentração de <i>Candida albicans</i> no desenvolvimento do foco infeccioso .....	62
10. Estudos de biodistribuição .....	67
<b>CONCLUSÃO</b> .....	76
<b>PERSPETIVAS</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80
<b>ANEXOS</b> .....	90

# **INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

O gênero *Candida* spp é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar, sendo a quarta causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, nos Estados Unidos, com índice de mortalidade da ordem de 40 a 60% no caso de fungemias (Colombo & Guimarães, 2003). Existem várias espécies descritas, sendo a *Candida albicans* a que mais freqüentemente causa doença em humanos e a mais virulenta. Esta espécie é comensal, tornando-se patogênica caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas decorrente de queimaduras ou por procedimentos invasivos. As candidíases podem manifestar-se em vários sítios, sendo as candidíases mucosas, orofaríngeas e esofagianas, as mais comuns em pacientes imunocomprometidos (Sobel, 2002).

Várias classes de antifúngicos têm sido utilizadas no tratamento das candidíases, entretanto, a eficácia da terapia é diretamente dependente do diagnóstico precoce, bem como do estado imunológico do paciente (Mahfouz & Anaissie, 2003). Portanto, pacientes com depressão do sistema imunológico podem não responder satisfatoriamente ao tratamento, uma vez que o processo de cura depende não só da ação medicamentosa como também da resposta imunológica do organismo. Além disso, casos de resistência, principalmente aos medicamentos azólicos têm sido reportados (Warnock, 1992, Odds, 1993), sendo atribuídos ao uso indiscriminado dos antifúngicos, principalmente em tratamentos profiláticos prolongados com baixas doses. Diante destas situações, muitas vezes são necessárias altas doses dos fármacos, assim como a associação de agentes antifúngicos, aumentando o risco de toxicidade da terapia.

Considerando as dificuldades terapêuticas mencionadas, torna-se importante o desenvolvimento de formulações que possam aumentar a eficácia do tratamento, de modo que as doses efetivas sejam diminuídas e o risco de toxicidade minimizado. Uma das estratégias utilizada com esta finalidade é modificar o perfil de biodistribuição do fármaco por meio de um vetor nanométrico (Barrat, 2000). Vários trabalhos avaliaram o uso de antifúngicos



associados a vetores coloidais, mostrando resultados promissores (Lopez-Berestein *et al.*, 1985; Metha *et al.*, 1987; Van Etten, 1995; Otsubo, 1999; Gupta *et al.*, 2000a, Agarwal & Katare, 2002; Nasti *et al.*, 2005).

As nanocápsulas (NCs) fazem parte dos dispositivos nanométricos capazes de controlar e modificar a distribuição de uma substância ativa para locais específicos do organismo, protegendo órgãos vitais de efeitos tóxicos (Lasic, 1998). Estes nanossistemas apresentam um núcleo oleoso, no qual fármacos com baixa solubilidade em água podem estar dissolvidos ou dispersos, sendo este envolvido por um filme de polímero biodegradável.

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar a biodistribuição do fluconazol, um agente antifúngico triazólico, marcado com <sup>99m</sup>tecnécio, na sua forma livre e encapsulado em nanocápsulas convencionais e furtivas, utilizando camundongos infectados com *Candida albicans*. Além disso, este estudo também abrangeu a caracterização físico-química e morfológica das duas formulações de nanocápsulas.

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 CANDIDÍASES

Os microrganismos do gênero *Candida* caracteristicamente constituem-se de células ovais, sem cápsula, que medem de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possuem a capacidade de produzir pseudo-hifas, apresentam reprodução assexuada por brotamento e capacidade de assimilação e fermentação de diferentes açúcares. São descritas mais de 150 espécies, porém apenas algumas destas são de importância clínica, por causarem doença em seres humanos: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. rugosa* e outras.

A *Candida albicans* é a espécie que mais frequentemente causa doença em humanos sendo a mais virulenta. Faz parte da flora normal do trato gastrointestinal, vagina e cavidade oral. É o principal agente de infecções oportunistas no homem, podendo causar diferentes manifestações clínicas como: candidíase mucocutânea, vaginites, infecções de pele e unha, doença pulmonar, enterites, esofagites, endocardites, meningites, abscessos cerebrais, artrites, pielonefrites, cistites, septicemias, doença mucocutânea crônica e muitas outras manifestações (Klein *et al.*, 1972; Rinaldi, 1993). A candidíase oral ou esofágica pode ser a primeira manifestação clínica de AIDS.

A maioria das doenças invasivas com patógenos do gênero *Candida* ocorre a partir da colonização endógena ( Pfaller, 1994; Reef & Mayer, 1995). Infecções de pele e mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações de resposta do hospedeiro no sítio da infecção por *Candida*. Já em pacientes portadores de doenças neoplásicas ou degenerativas e indivíduos com imunodeficiências congênitas ou adquiridas apresentam maior risco de infecções superficiais ou sistêmicas. Alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro fazem com que a flora fúngica colonizante transforme-se em agente de infecções em vários sítios, com diferentes graus de gravidade (Armstrong, 1989; Levitz, 1992). As seguintes situações predispõem à candidíase: prematuridade, envelhecimento, gravidez, hipovitaminose A, desnutrição, anemia ferropriva, diabetes mellitus, endocrinopatias, doenças degenerativas, neoplásicas, antibioticoterapia,

terapia imunossupressora, uso de anticoncepcionais orais, nutrição parenteral, cirurgias, transplantes de órgãos, próteses dentárias, uso de cateteres centrais e urinários, tabagismo, AIDS.

Nos anos 80 houve um grande aumento das infecções hospitalares causadas por *Candida* (Pfaller, 1996). Beck-Sagué & Jarvis (1993), analisando os dados do National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS) nos Estados Unidos, de janeiro de 1980 a dezembro de 1990, mostraram um aumento nas taxas de patologias fúngicas de 2,0 para 3,8 por 1000 altas hospitalares, sendo 78% delas causadas por leveduras do gênero *Candida*. Ainda nos Estados Unidos da América, este patógeno apresenta-se como a quarta causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, com índices de mortalidade geral de 60% e mortalidade atribuída de 40% (Colombo & Guimarães, 2003). Isto representa um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes.

### **2.1.1 MEDICAMENTOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DAS CANDIDÍASES**

Os principais grupos de agentes antifúngicos com ação sobre espécies de *Candida* compreendem os antibióticos poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os derivados azólicos, que possuem dois ou três átomos de nitrogênio no anel azólico e são denominados imidazólicos (cetoconazol, miconazol e fenticonazol) ou triazólicos (itraconazol, fluconazol e voriconazol). Além destes fármacos, cabe ressaltar ainda dentro do elenco de fármacos disponíveis ao tratamento de candidíases as drogas pirimidínicas, representadas pela 5-fluorocitosina. A caspofungina (acetato de caspofungina) é um fármaco mais recente no mercado e é ativa contra os isolados de *C. albicans* tanto resistentes quanto sensíveis ao fluconazol (Sobel, 2002).

Os **antibióticos poliênicos**, produzidos por espécies de *Streptomyces*, são agentes antifúngicos que têm amplo espectro de ação. Atuam sobre o ergosterol (principal esteroide da membrana plasmática do fungo). O ergosterol está envolvido em várias funções celulares como a fluidez e integridade da membrana e no funcionamento de várias enzimas que se ligam à membrana da

---

célula do fungo, como a quitina sintetase, enzima importante para o crescimento e divisão celular. Inserem-se no interior da membrana formando um canal através do qual componentes celulares, principalmente íons potássio são perdidos, destruindo o gradiente de prótons da membrana fúngica e levando à morte celular (Georgopapadakou, 1996). A **anfotericina B** é altamente efetiva, no entanto, sua formulação endovenosa tem limitado o seu uso devido à alta toxicidade hepática, freqüentemente associada com disfunção renal. Efeitos colaterais crônicos e agudos da anfotericina B tem sido reduzidos com o uso de novas formulações, tais como lipossomas (Lopez-Berestein *et al.*, 1985; Ringden *et al.*, 1991), complexos lipídicos (Clark *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 1998) e dispersões coloidais (Fielding *et al.*, 1991, Bowden *et al.*, 2002). A **nistatina** tem seu uso limitado ao tratamento de infecções da pele e mucosas causadas por todas as espécies do gênero *Candida*, é tóxica demais para uso parenteral.

As **drogas azólicas**, descobertas no final da década de 60, são totalmente sintéticas e atuam interagindo com a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, um citocromo P-450, com uma molécula heme como sítio ativo, envolvida na biossíntese do ergosterol. Estes fármacos ligam-se ao átomo de ferro do heme da lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase inibindo a demetilação do lanosterol. A inativação da enzima ocasiona o acúmulo de esteróis metilados, precursores do ergosterol, resultando na formação de uma membrana fúngica com estrutura e funções alteradas, prejudicando as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e enzimas do sistema de transporte de elétrons. Conseqüentemente, ocorre a inibição do crescimento do fungo.

Os antifúngicos azólicos, geralmente, não apresentam toxicidade severa, mas alguns efeitos adversos de maior gravidade como hepatotoxicidade fatal tem sido relatados, particularmente com o cetoconazol e fluconazol (Knight *et al.*, 1991; Jacobson *et al.*, 1994). Devido à capacidade dos azólicos de inibir enzimas dependentes do citocromo P-450 envolvidas na biossíntese de hormônios esteróides, estes agentes podem produzir efeitos adversos relacionados à produção endócrina, tais como depleção de testosterona e glicocorticóides, resultando em ginecomastia e insuficiência adrenal, respectivamente. (Barrett-Bee *et al.*, 1988; Hanger *et al.*, 1988). Os triazólicos

---

sistêmicos são mais lentamente biotransformados e exercem menos efeito sobre a síntese dos esteróis humanos do que os imidazólicos.

A **5-fluorcitosina** é metabolizada em fluorouracil e monofosfato de fluorodesoxiuridina. O fluorouracil é incorporado no RNA do fungo e inibe a síntese protéica, causando a morte da célula fúngica. O monofosfato de fluorodesoxiuridina inibe a síntese de DNA. Observa-se resistência rapidamente desenvolvida pelos fungos a 5-fluorcitosina, o que tem levado a uma associação habitual deste antifúngico a anfotericina B para o tratamento de casos de meningite criptocócica e candidíases sistêmicas (Francis *et al.*, 1992). Este antifúngico pode levar a depressão da medula óssea, que é dependente da dose e mais freqüente quando se associa a 5-fluorcitosina à anfotericina B (Ribeiro *et al.*, 2004).

A **caspofungina** é um composto lipopeptídico semi-sintético obtido a partir da fermentação do *Glarea lozoyensis*. Tem-se mostrado eficaz no tratamento de pacientes com candidíase orofaríngea e esofagiana. Pertence ao grupo das equinocandinas e age mediante inibição da síntese da  $\beta$  (1, 3) D-glucana sintetase, impedindo a formação de polímeros de glucana, um componente essencial da parede de muitos fungos filamentosos e leveduriformes (Korolkovas *et al.*, 2004). A caspofungina está disponível apenas para uso parenteral e é um medicamento de alto custo.

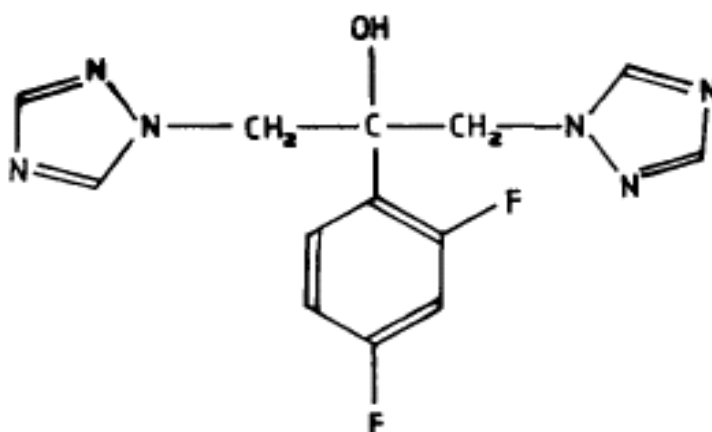
A resistência aos fármacos antifúngicos constitui um sério problema na terapêutica das infecções fúngicas, principalmente nos pacientes portadores de patologias nosocomiais por leveduras, especialmente *Candida*. O uso indiscriminado dos azólicos na profilaxia de infecções fúngicas, especialmente sistêmicas, em pacientes portadores do vírus HIV induziu à seleção de cepas resistentes (Warnock, 1992; Odds, 1993). O rápido desenvolvimento de resistência pelos fungos tem sido um problema com a 5-fluorcitosina, sendo comumente ineficiente quando utilizada isoladamente, justificando a terapêutica associada a outros fármacos antifúngicos como a anfotericina B (Vander Bossche *et al.*, 1994). Casos de resistência também têm sido relatados durante a terapêutica com drogas poliênicas. Esta resistência tem sido vinculada às leveduras de *Candida*, sendo as espécies *não-albicans* as mais envolvidas (Macura, 1991; Dubé *et al.*, 1994).

Em decorrência das características inerentes aos seres eucariotas, presenciadas tanto nos fungos como no hospedeiro humano, os fármacos antifúngicos detêm, em sua maioria, baixa toxicidade seletiva. Isto ocasiona uma considerável redução do arsenal terapêutico antifúngico. A eficácia da terapêutica antifúngica depende diretamente da precocidade do diagnóstico, assim como do estado imunológico do paciente. Portanto, pacientes com depressão do sistema imunológico podem não responder satisfatoriamente ao tratamento. Muitas vezes, altas doses dos fármacos são requeridas, bem como a associação de antifúngicos, com o objetivo de aumentar a eficácia da terapêutica. Porém, estas medidas aumentam o risco de toxicidade do tratamento, particularmente em pacientes já debilitados, portadores de doenças de base mais severas (Mahfouz & Anaissie, 2003).

## 2.2 FLUCONAZOL

O fluconazol foi o primeiro antifúngico de uma nova subclasse de antifúngicos triazóis sintéticos. Ele foi desenvolvido pelo laboratório Pfizer, em Sandwich, Inglaterra, em 1970 e foi aprovado pelo FDA e introduzido nos Estados Unidos em 1990 com o nome de Diflucan®.

É um agente antifúngico bis-triazólico (Figura 1) cuja denominação química é 2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis (1H- 1, 2, 4-triazol-1-ilmetil)-2-propanol.



**FIGURA 1** – Fórmula estrutural do fluconazol.

---

O fluconazol apresenta-se como um pó branco cristalino, levemente solúvel em água (8mg/mL a 37°C) e solúvel em etanol (25mg/mL a 25° C) (McEvoy, 2003). O fármaco possui um coeficiente de partição octanol/PBS pH 7,4 igual a 1,0 (Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 2006).

O fluconazol apresenta ótima atividade *in vitro* contra *Candida albicans* e também é efetivo contra algumas espécies *não-albicans* tais como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, embora altas doses do fármaco sejam requeridas para estas espécies.

O fluconazol é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de candidíases orofaríngeas e esofagianas, comuns em pacientes imunossuprimidos. No primeiro caso a terapia consiste de uma dose de 100 a 200 mg diariamente por 7 a 14 dias dependendo do sítio e da severidade da infecção. Já nas candidíases esofagianas, a dose usual é de 100 a 200 mg diariamente, podendo chegar a 400 mg nos casos mais graves. O período de tratamento é de 14 a 30 dias. Doses diárias de 400 mg são usadas para diminuir a incidência de candidíase profunda em receptores de transplantes alogênicos de medula óssea e tem utilidade para o tratamento da candidemia em pacientes não neutropênicos. A anfotericina B tem sido considerada o “padrão ouro” para o tratamento de candidíases invasivas em pacientes imunocomprometidos, sendo o fluconazol considerado o fármaco de segunda escolha para esta terapia, usualmente na dose de 400 mg diariamente. Esquemas de manutenção de terapia, particularmente com baixas doses de fluconazol, não são recomendados devido à indução de resistência. Esquemas terapêuticos prolongados são prescritos apenas na presença de candidíases frequentemente recorrentes e geralmente nas formas mais severas da doença, comumente ocorrentes em pacientes com AIDS. Uma dose única de 150 mg é eficaz na candidíase vaginal. (Zervos & Meunier, 1993; Bennet, 1996; Burgess *et al.*, 1999; Martin, 1999, Sobel, 2002, Vensel, 2002).

O fluconazol pode ser administrado oralmente ou intravenosamente. Ele é quase completamente absorvido no trato gastrointestinal. As concentrações plasmáticas são essencialmente idênticas, seja o fármaco administrado por via oral ou intravenosa e a biodisponibilidade não é alterada por alimentos ou pela acidez gástrica. Os máximos de concentração plasmática após doses repetidas

---

de 100 mg são de 4 a 8 µg/mL e são alcançados dentro de 1 a 2 horas após administração oral.

A excreção renal é responsável por mais de 90% da eliminação, sendo que um percentual de 80% é eliminado inalterado na urina e o restante na forma de metabólitos. A meia-vida de eliminação é de 25 a 30 horas. A ligação às proteínas plasmáticas é baixa, de 11 a 12%. O fluconazol difunde-se rapidamente para os líquidos corporais, inclusive para o escarro e saliva. As concentrações no líquido cefalorraquidiano correspondem a 50 a 90% dos valores plasmáticos simultâneos, mesmo na ausência de meningites (Zervos & Meunier, 1993; Bennet, 1996).

A maior parte dos efeitos adversos observados com o fluconazol afeta o trato gastrointestinal. Podem ser observados náuseas e vômitos com doses superiores a 200 mg diários. Pacientes que recebem 800 mg diariamente requerem o uso de antieméticos que reduzem a biodisponibilidade do fármaco (Bennet, 1996). Ocasionalmente, é observada alopecia, principalmente em tratamentos prolongados com 400 mg diários de fluconazol (Weinroth & Tuazon, 1993; Pappas *et al.*, 1995). Foram relatados raros casos de óbito por insuficiência hepática (Jacobson *et al.*, 1994) e por síndrome de Stevens-Johnson, uma síndrome esfoliativa da pele (Zervos & Meunier, 1993). Em alguns pacientes, particularmente aqueles com enfermidades de base graves, tais como AIDS e câncer, foram observadas alterações nos resultados dos testes das funções hematológica e renal e, também, anormalidades hepáticas durante o tratamento com fluconazol (Muñoz, *et al.*, 1991; Wells & Lever, 1992; Collazos *et al.*, 1994). Outros efeitos adversos como anafilaxia e angioedema têm sido raramente observados.

Na década de 1990, o fluconazol foi largamente utilizado no tratamento de todas as formas de candidíases, tornando-se o fármaco de primeira escolha no tratamento de pacientes HIV-positivos e HIV-negativos (Pons *et al.*, 1997; Laine *et al.*, 1992). Entretanto, algumas limitações na terapia com fluconazol começaram a surgir, particularmente em pacientes com candidíases orofaríngeas nos quais embora houvesse a resolução de todos os sintomas, os microrganismos não eram completamente erradicados e a mucosa permanecia colonizada. Esforços foram feitos através de terapia de manutenção prolongada do fármaco, usando-se esquemas profiláticos de fluconazol na



---

tentativa de prevenir doenças recorrentes (Stevens *et al.*, 1991). Muitos esquemas terapêuticos basearam-se no uso de doses mínimas efetivas, de 50 mg de fluconazol administrados diariamente. Dentro de um curto período de tempo, surgiram casos de resistência ao fluconazol e candidíases mucosas refratárias, predominantemente orofaríngea e esofagiana (Rex *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 1997; Maenza *et al.*, 1997; Fichtenbaum *et al.*, 2000). Estratégias foram desenvolvidas para pacientes com candidíases refratárias usando-se doses extremamente altas de fluconazol ou a associação de outros triazólicos como o itraconazol (Vasquez, 1999). Porém, estes esquemas terapêuticos apresentam a desvantagem do aumento do risco da toxicidade do tratamento, principalmente em se tratando de pacientes com sistema imunológico debilitado.

O desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas tais como os nanocarreadores que possibilitam uma ação direcionada do fármaco no seu alvo, proporcionando um tratamento mais eficaz e com menor probabilidade de ocorrência de efeitos adversos, torna-se um importante aliado na resolução das dificuldades terapêuticas mencionadas.

### **2.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA A VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS**

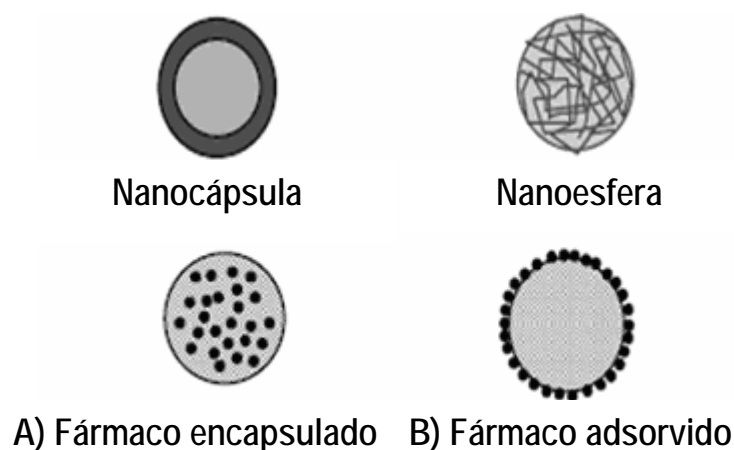
A vetorização de fármacos em nanossistemas consiste na associação de moléculas a vetores sintéticos específicos objetivando o direcionamento de fármacos para o seu alvo de ação. Estas formulações oferecem numerosas vantagens comparadas aos sistemas convencionais de administração de fármacos.

Para a maioria dos fármacos utilizados atualmente, a atividade contra certas doenças ou sítios patológicos não é baseada na sua capacidade de acumular-se seletivamente no órgão patológico, tecido ou célula. Usualmente, o agente farmacológico é uniformemente distribuído pelo organismo. Além disso, para alcançar o sítio de ação, o fármaco precisa atravessar muitas barreiras biológicas, tais como outros órgãos, células e compartimentos intracelulares, onde o referido fármaco pode ser inativado ou induzir efeitos indesejados nos órgãos e tecidos que não envolvem processos patológicos.

Portanto, para alcançar a concentração terapêutica requerida do fármaco em certo compartimento do organismo, deve-se administrá-lo em grandes quantidades, sendo que a maior parte do conteúdo distribui-se em tecidos normais. O processo de vetorização possibilita o acúmulo do fármaco no sítio alvo, seletivamente e quantitativamente, independentemente do sítio e da rota de administração (Torchilin, 2000). Sob estas condições, a concentração do fármaco no sítio patológico é maior, enquanto que a sua concentração em outros órgãos e tecidos diminui, evitando ações inespecíficas do fármaco. Diante destas considerações, as possíveis vantagens dos sistemas nanoestruturados são: aumento da eficácia do tratamento, redução das dosagens de fármaco empregadas, bem como da frequência de administração e, conseqüentemente, redução do custo da terapia; diminuição da toxicidade geral, proteção do fármaco contra inativação química ou enzimática.

Os nanocarreadores podem ser classificados em microparticulados quando possuem diâmetro superior a 1  $\mu\text{m}$  ou nanoparticulados se apresentarem diâmetro da ordem nanométrica (entre 10 e 1000 nm) (Couvreur *et al.*, 2002). Dentre os principais sistemas nanoestruturados encontram-se os lipossomas e as nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas).

As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade tanto nos fluidos biológicos quanto durante o processo de armazenamento (Shaffazick *et al.*, 2003). As nanopartículas poliméricas diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 2). As nanocápsulas são constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Delie & Blanco-Príeto, 2005).



**FIGURA 2** – Representação esquemática de nanocápsula constituída por um núcleo oleoso envolvido por uma membrana polimérica e nanoesfera constituída por uma matriz polimérica; A e B representam as diferentes formas de associação do fármaco às nanopartículas, encapsulado e adsorvido, respectivamente.

A rápida captura dos carreadores coloidais pelo sistema fagocítico mononuclear após administração intravenosa é a maior dificuldade para o uso destes nanossistemas. Cadeias de polietilenoglicol (PEG) têm sido utilizadas com sucesso para modificar a superfície de nanopartículas, aumentando significativamente a sua meia vida de circulação. Os nanocarreadores furtivos, como são chamados, atuam como reservatórios circulantes do fármaco, liberando-o progressivamente e aumentando a sua disponibilidade em outras células e tecidos, tais como tumores e sítios inflamatórios (Mosqueira *et al.*, 2001a). As cadeias de PEG são hidrofílicas e flexíveis e ligam-se covalentemente à superfície do polímero, reduzindo a opsonização dos carreadores por estabilização estérica. O PEG não é tóxico e cadeias mais curtas que 30 kDa são rapidamente eliminadas do organismo por filtração renal; portanto, esta molécula pode ser considerada completamente biocompatível (Mosqueira *et al.*, 2001a).

A biodegradabilidade dos polímeros utilizados na encapsulação é muito importante, especialmente para sistemas injetáveis, pois evita o risco do acúmulo do polímero no organismo, garantindo a sua completa eliminação. Os poliésteres são particularmente atrativos devido à sua disponibilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade. Dentre estes se destacam o poli-

---

$\epsilon$ -caprolactona (PCL), poli (ácido-lático) (PLA), poli (ácido glicólico) (PLG) e seus co-polímeros (Picos *et al.*, 2000).

Os nanossistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva e aumento do índice terapêutico do fármaco. Além disso, são estudados para administração oral, destacando-se os antiinflamatórios não-esteróides, visando a diminuição da irritação da mucosa intestinal e proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídeos, proteínas e hormônios. Outro interesse das nanopartículas é a sua administração oftálmica, tendo como objetivo o controle da liberação do fármaco, aumentando a biodisponibilidade ocular e/ou diminuição de efeitos sistêmicos de certos fármacos. (Shaffazick *et al.*, 2003)

Alguns estudos mostraram a utilização de vetores coloidais como carreadores de fármacos antifúngicos. Algumas formulações já estão disponíveis comercialmente tais como a anfotericina B lipossomal (Ambisome®), como complexo lipídico (Abelcet®) e como dispersão coloidal (Amphocil®). Embora a atividade antifúngica destas formulações apresenta-se reduzida em alguma extensão, a possibilidade de utilização de doses mais altas proporciona um aumento do índice terapêutico comparado ao da anfotericina B convencional. Estas formulações apresentam diminuição significativa da nefrotoxicidade (Maesaki, 2002). Lipossomas 34A-PEG-L que são lipossomas de anfotericina B ligados a cadeias de polietilenoglicol e conjugados com anticorpo monoclonal 34A, específico para o epitélio pulmonar de ratos, foram estudados em modelos experimentais de aspergilose em ratos. O 34A-PEG-L apresentou maiores concentrações no tecido alvo e eficácia comparável à anfotericina B (Van Etten, 1995). A anfotericina B também foi associada à nanoesferas (NS-718) e testada *in vitro* contra cepas de *Aspergillus fumigatus*, mostrando atividade similar à forma convencional da anfotericina B (anfotericina B desoxicolato), porém atividade superior à anfotericina B lipossomal. Estes resultados foram confirmados em estudos *in vivo*, utilizando modelo de aspergilose pulmonar em ratos. Porém, em doses mais altas, a anfotericina B em nanoesferas mostrou-se mais eficaz que a forma convencional e a lipossomal, com maior sobrevida dos animais (Otsubo, 1999).

---

A nistatina, embora tenha uma ação semelhante à anfotericina B, é extremamente tóxica para uso parenteral, podendo ser usada somente como preparação tópica. A incorporação da nistatina em lipossomas multi-lamelares manteve a sua atividade antifúngica *in vitro* e diminuiu a toxicidade nos eritrócitos humanos (Metha *et al.*, 1987a). A formulação lipossomal da nistatina foi bem tolerada e aumentou a sobrevida em doses equivalentes à nistatina livre, além disso, em doses mais altas, mostrou um aumento significativo da atividade antifúngica no tratamento de camundongos com candidíase sistêmica (Metha *et al.*, 1987b). Estudos clínicos têm sido desenvolvidos para avaliar a eficácia e aplicação clínica da nistatina lipossomal. Estudo recente em ratos infectados com *Cryptococcus neoformans* demonstraram o aumento da eficácia da nistatina encapsulada em lipossomas pH-sensíveis, comparativamente à nistatina livre e lipossomal (Nasti *et al.*, 2005).

Alguns antifúngicos azólicos também foram encapsulados em nanocarreadores e testados em modelos animais. Um estudo realizado por Gupta *et al.* (2000b) em coelhos, mostrou que a encapsulação do fluconazol em lipossomas aumentou significativamente a meia vida do fluconazol na cavidade vítrea destes animais. Em outro estudo do mesmo autor, utilizando modelo de endoftalmite induzida por *C. albicans* em coelhos, observou-se que o fluconazol encapsulado em lipossomas apresentou atividade inferior ao fluconazol livre (Gupta *et al.*, 2000a). Agarwal & Katare (2002) testaram o miconazol em lipossomas para uso tópico e observaram uma retenção maior desta formulação na pele de camundongos, em comparação com o creme comercial de miconazol. Em estudos *in vitro*, tanto o miconazol quanto o cetoconazol encapsulados em lipossomas mostraram menor atividade do que os respectivos fármacos livres em cultura de *C. albicans* (De Logu *et al.*, 1997; De Logu *et al.*, 2000). Chasteigner *et al.* (1998) testaram a encapsulação do itraconazol em carreadores coloidais como nanoesferas, complexos de colesterol e lipossomas. Verificaram que a maior eficiência de encapsulação foi observada em nanoesferas, sendo que 40% do fármaco ficam retidos na matriz e 60% associados à superfície.

As nanocápsulas foram os vetores utilizados na realização do presente estudo já que o coeficiente de partição ( $\log p$  octanol/PBS = 1,0) (Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 2006) do fluconazol, favorece a solubilização

---

do fármaco no núcleo oleoso da nanocápsula. Além disso, não há relatos descritos na literatura referentes a estudos com fluconazol encapsulado neste tipo de nanocarreador.

## 2.4 NANOCÁPSULAS

As nanocápsulas são sistemas carreadores coloidais compostos de um núcleo oleoso envolto por uma membrana polimérica (Couvreux *et al.*, 2002). Os polímeros podem ser de diferentes origens: naturais, semissintéticos ou mais comumente, sintéticos. Eles devem ser estáveis, ter baixa toxicidade e capacidade de degradação no organismo, no caso de administração intravenosa. A parede polimérica permite que as nanocápsulas sejam mais estáveis que as nanoemulsões (Legrand *et al.*, 1999; Mosqueira *et al.*, 2001a). Os critérios de seleção dos óleos são a ausência de toxicidade, ausência de degradação do polímero e capacidade de dissolver o fármaco em questão. Para a preparação das nanocápsulas podem ser utilizados tensoativos lipofílicos e hidrofílicos. Geralmente o tensoativo lipofílico é uma lecitina natural de conteúdo relativamente baixo de fosfatidilcolina, enquanto que o tensoativo hidrofílico é sintético podendo ser aniônico (lauril sulfato), catiônico (quaternário de amônio) ou mais comumente, não iônico (polioxietileno-polioxipropilenoglicol).

Consideradas vetores de segunda geração, as NCs possibilitam a aplicação sistêmica de injeções intravenosas *in bolus*, sem diluição prévia, direcionando o fármaco de forma passiva para células definidas do organismo. Podem ser classificadas como convencionais ou furtivas. As NCs convencionais concentram os fármacos encapsulados nos órgãos e células do sistema fagocítico mononuclear (Juliano, 1988). Por outro lado, as NCs furtivas representam um tipo especial de partículas com cadeias de polietilenoglicol (PEG) ligadas covalentemente à superfície. Esta modificação permite que as partículas quando injetadas por via intravenosa, escapem do reconhecimento e da captura rápida pelas células do SFM (Gref *et al.*, 1994), devido à estabilização estérica proporcionada pelas cadeias de PEG. Assim, ocorre o prolongamento do tempo de circulação sanguínea, liberando lentamente, no compartimento plasmático, os princípios ativos encapsulados (Mosqueira *et al.*,

---

1999). As NCs, em especial as furtivas, são potencialmente capazes de restringir a captação de fármacos por certos tecidos ou órgãos, preservando-os da toxicidade do fármaco.

Segundo Couvreur *et al.* (2002), duas tecnologias podem ser utilizadas para a obtenção das nanocápsulas: a polimerização interfacial de monômeros ou a deposição interfacial de polímeros pré-formados, sendo também conhecida como nanoprecipitação (Fessi *et al.*, 1989).

As formulações do presente estudo foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, visto que é uma técnica de fácil execução, reprodutível e facilmente transponível para a escala industrial. Esse método é baseado na precipitação e formação, cineticamente controlada, de vesículas de tamanho coloidal constituídas por uma fase oleosa na qual o fármaco encontra-se disperso e revestidas por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso. A técnica consiste na mistura de uma fase orgânica (contendo um solvente orgânico, óleo, tensoativo hidrofóbico e o polímero insolúvel no óleo e na água) miscível em uma fase aquosa (contendo água e tensoativos hidrofílicos). Após a mistura da fase orgânica com a fase aquosa, o polímero precipita na interface pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para a formação de nanogotas de óleo que servem como núcleo para a precipitação do polímero. Observa-se, imediatamente, o surgimento de uma suspensão leitosa, com elevada opalescência, resultado da formação espontânea das nanocápsulas. Em seguida, o solvente é removido sob pressão reduzida e a suspensão concentrada através da evaporação de água (Fessi *et al.*, 1989).

#### **2.4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOCÁPSULAS**

Em função de sua natureza coloidal, dificuldades técnicas são encontradas na caracterização físico-química das nanopartículas. Geralmente, a avaliação físico química envolve: análise morfológica, distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial zeta ( $\zeta$ ) e determinação do pH das suspensões, determinação da concentração de fármaco associado às nanoestruturas, cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da

---

estabilidade em função do tempo de armazenamento (Legrand *et al.*, 1999); Schaffazick *et al.*, 2003).

#### 2.4.1.1 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS

A distribuição do tamanho das partículas é uma das características físico-químicas mais importantes das suspensões coloidais porque determina a tendência à sedimentação e agregação das partículas, conseqüentemente, é importante para a avaliação da estabilidade do sistema (Magenheim & Benita, 1991).

Geralmente, o diâmetro das NCs preparadas pela técnica de nanoprecipitação varia entre 100 e 500 nm, sendo influenciado por diversos fatores tais como: natureza e concentração do polímero e do fármaco, concentração de surfactantes, proporção entre solvente orgânico e água, concentração e natureza do óleo, além da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (Legrand *et al.*, 1999; Mosqueira *et al.*, 2000; Shaffazick *et al.*, 2003).

Os métodos mais comumente utilizados para determinar a distribuição de tamanho e o índice de polidispersão das amostras são espectroscopia de correlação de fótons (ECF), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo que as últimas permitem também analisar a morfologia das nanoestruturas (Legrand *et al.*, 1999). As desvantagens na utilização de MEV ou MET, para a determinação de tamanho médio e índice de polidispersão, é a necessidade de contagem de um grande número de partículas para se obter uma estatística confiável e, além disso, modificações nas partículas durante a secagem e na produção de contraste podem alterar as medidas de tamanho. A ECF apresenta a vantagem de fornecer medidas rápidas e acuradas, sendo assim, o método mais indicado para as medidas de tamanho. Recentemente, a microscopia de força atômica (MFA) também vem sendo utilizada para a avaliação do tamanho e estudo da morfologia das nanopartículas.

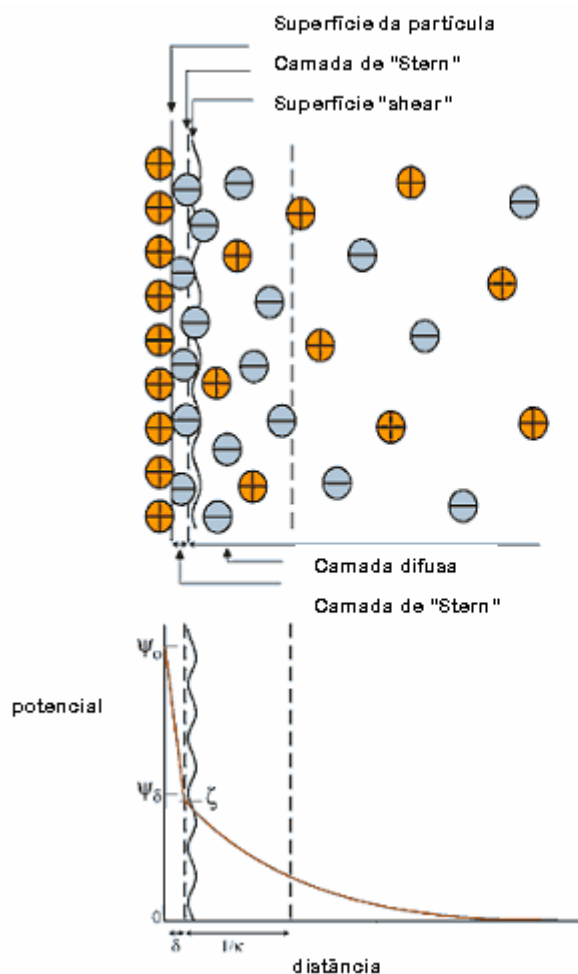
No presente estudo, as técnicas utilizadas para avaliar a distribuição de tamanho foram a ECF e a MFA. A ECF, também chamada de espalhamento dinâmico de luz, baseia-se na análise do movimento browniano das partículas,



ou seja, na capacidade de deslocamento constante das partículas presentes num determinado sistema fazendo com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento. Partículas grandes movem-se mais lentamente que as pequenas de forma que a taxa de flutuação da luz espalhada por elas também é mais lenta. Utiliza-se a medida dessas flutuações da luz para determinar a distribuição do tamanho das partículas. A MFA permite a visualização das partículas tridimensionalmente, possibilitando a avaliação do diâmetro e também de outros parâmetros como altura, morfologia e organização estrutural das nanopartículas.

#### **2.4.1.2 POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ ) DAS NANOCÁPSULAS**

O potencial  $\zeta$  pode ser definido como o potencial de superfície das partículas, o qual 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 (Shaffazick *et al.*, 2003). O potencial zeta geralmente é determinado por medidas de mobilidade eletroforética que correspondem à velocidade das partículas em suspensão, quando submetidas a um campo elétrico. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta, sendo esta velocidade medida através da técnica de espalhamento de luz. A superfície que separa a camada de cargas da superfície da partícula da camada difusa em torno dela é chamada de superfície “shear” ou “slip”. O potencial eletrostático nessa superfície é chamado de potencial zeta (Figura 3).



**FIGURA 3** – Representação esquemática de uma partícula de superfície positiva com uma camada de íons negativos adsorvidos na camada de "Stern". São apresentados o potencial de superfície  $\Psi_0$  e o potencial na camada de "Stern"  $\Psi_\zeta$ . Na camada "Shear" está localizado o potencial zeta  $\zeta$ .

Adaptada de: [www.bic.com/whatiszetapotential.html](http://www.bic.com/whatiszetapotential.html)

As lecitinas, o poloxamer e os polímeros são os principais componentes que podem afetar o potencial  $\zeta$  das nanocápsulas, por estarem envolvidos na formação da cápsula ou adsorvidos a ela. Especialmente os poliésteres, como o PLA e as lecitinas favorecem um potencial negativo à interface; o poloxamer, um surfactante não-iônico, tende a reduzir, em valor absoluto, o potencial  $\zeta$  (Legrand *et al.*, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003). NCs ligadas a cadeias de PEG de densidade maior, principalmente na presença de baixo conteúdo de lecitinas, também apresentam diminuição do potencial  $\zeta$  (Mosqueira *et al.*, 2001a; Mosqueira *et al.*, 2001b).

Legrand *et al.* (1999) afirmam que as formulações constituídas por partículas com altos valores absolutos de potencial  $\zeta$  (acima de 30 mV)

---

apresentam maior estabilidade, visto que grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação entre as partículas. As características de superfície também podem influenciar a resposta biológica do fármaco associado, sendo que as partículas convencionais administradas intravenosamente são rapidamente capturadas pelas células do SFM quando o tamanho e a carga superficial são aumentados (Juliano, 1988), dificultando a chegada do fármaco ao sítio de ação.

Alterações do potencial  $\zeta$  permitem elucidar mecanismos de associação fármaco-vetor, avaliando-se, por exemplo, se o fármaco está encapsulado ou adsorvido na superfície da partícula. Além disso, grandes alterações no potencial  $\zeta$  de NCs convencionais, após incubação com plasma, indicam a adsorção de proteínas à superfície das nanopartículas, sendo este efeito reduzido com as NCs furtivas, devido à presença de PEG na superfície que inibe a ligação das proteínas do plasma às NCs (Mosqueira *et al.*, 2001b). Calvo *et al.* (1996) observaram os efeitos da composição de diferentes carreadores nanoestruturados sobre os valores do potencial zeta e verificaram que a fase oleosa das nanocápsulas e nanoemulsões conferiu um potencial mais negativo ( $\zeta = -41,94$  mV e  $\zeta = -42,32$ , respectivamente) quando comparado às nanoesferas ( $\zeta = -16,33$  mV). Tendo em vista a semelhança do potencial de nanocápsulas e nanoemulsões, os autores sugeriram que a camada polimérica ao redor da gotícula de óleo seria um filme delgado. Por outro lado, Mosqueira *et al.* (2000) não observaram alteração do potencial  $\zeta$  em função da natureza do núcleo oleoso (triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico, succinato de diglicerila dos ácidos cáprico e caprílico, dicaprilato/dicaprato de propilenoglicol, oleato de etila, óleo mineral, dodecano, óleo de soja) utilizado para a preparação de nanocápsulas de PLA, concluindo que o óleo deveria estar completamente encapsulado pelo polímero.

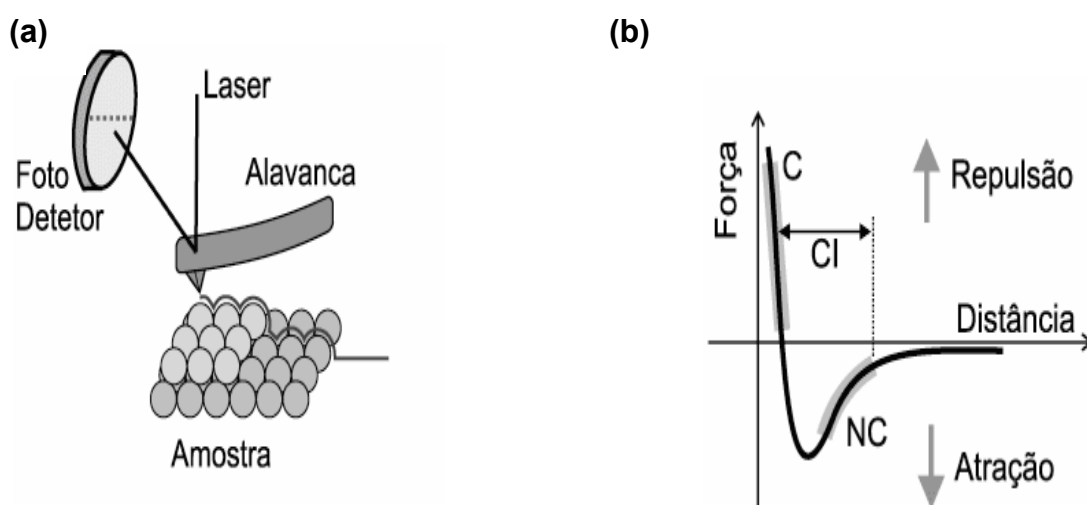
### 2.4.1.3 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

A microscopia de força atômica apresenta numerosas vantagens em relação às microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) para a caracterização de nanopartículas. As imagens obtidas pela MFA são representadas em três dimensões, sendo possível realizar medidas com alta resolução, em escala nanométrica e ainda resolver detalhes de superfície em nível atômico (Neves *et al.*, 1998) Com a utilização da MET ou da MEV, as imagens são apenas bidimensionais. Além disso, o tempo gasto entre a preparação da amostra, aquisição da imagem e análise da imagem, é consideravelmente menor na MFA, sendo esta considerada uma técnica de operação relativamente simples. Diante dessas vantagens, a MFA tem sido muito empregada para caracterizar a morfologia de nanopartículas, principalmente de lipossomas (Jass, *et al.*, 2000, Palmer *et al.*, 2003; Quist *et al.*, 2005) e nanoesferas (Feng *et al.*, 2001; Ravi Kumar *et al.*, 2004). A associação das técnicas de microscopia à criofatura tem fornecido informações úteis sobre a estrutura das NCs (Shaffazick *et al.*, 2003), inclusive a determinação da espessura da parede destes nanocarreadores. Estudo realizado por Rube *et al.* (2005) mostrou que a espessura da parede polimérica de NCs de PLA mede cerca de 9,8 nm, sendo esta medida realizada pela técnica de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo.

No presente trabalho, avaliou-se a morfologia das NCs pela técnica de MFA, na qual uma sonda mecânica percorre a superfície de uma amostra, interagindo com a mesma e fornecendo imagens tridimensionais, a partir das quais se podem extrair diversas informações tais como organização estrutural, distribuição de tamanho, dentre outras. À medida que uma sonda extremamente fina ( $\sim 100$  Å de diâmetro), montada sob a extremidade de uma alavanca, aproxima-se da superfície de uma determinada amostra, surgem forças de interação sonda-amostra as quais fazem a alavanca defletir. Essa deflexão é detectada por um sistema laser-fotodetector e todo o sistema monitorado digitalmente, convertendo os dados em um mapa topográfico da superfície da amostra (Neves *et al.*, 1998).

As forças de interação sonda-amostra podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da distância sonda-amostra. A longas distâncias ( $d > 1\mu\text{m}$ ), esta

interação praticamente não existe. À medida que a sonda aproxima-se da amostra ( $d \leq 50\text{nm}$ ), forças atrativas passam a atuar (tipicamente forças de Van der Waals) e aumentam até que a separação seja da ordem da separação inter-atômica ( $d \approx 0,5\text{ nm}$ ). Nesse ponto, surgem forças eletrostáticas repulsivas sugerindo contato físico entre a sonda e a superfície da amostra (Neves *et al.*, 1998). A interação real entre a sonda e amostra tem caráter mais complexo; porém, as características básicas da interação são as mesmas: atração à longa distância e repulsão em distâncias menores, conforme proposto por Lennard-Jones (Jean *et al.*, 1999).



**FIGURA 4** – (a) Desenho esquemático do princípio de funcionamento da técnica da MFA. O fotodetetor monitora a deflexão da alavanca durante a varredura através da mudança na reflexão de um feixe de laser incidente; (b) Curva esquemática mostrando a dependência da força de interação sonda-amostra em função da separação entre elas.

Baseando nestas forças interativas, podem-se definir alguns modos de operação na técnica de MFA. São eles: 1) **contato**, onde a interação por forças repulsivas permite obter imagens com alta resolução, a nível atômico. Neste modo, o atrito sonda-amostra pode danificar a superfície, produzindo imagem distorcida; 2) **não contato** que apresenta a vantagem de não danificar a amostra, porém a resolução é limitada; 3) **contato intermitente**, com regime alternando em atrativo e repulsivo; reúne vantagens dos dois modos, conseguindo altas resoluções sem deformação da amostra, já que a movimentação é feita com a sonda no ar (Neves *et al.*, 1998).

Portanto, a MFA apresenta numerosas vantagens que permitem a sua ampla aplicação, como por exemplo, a obtenção de informações quantitativas

---

nas três dimensões espaciais, a possibilidade de utilização de amostras condutoras e/ou isolantes, além da simplicidade de preparo das amostras, sendo apenas necessário que a superfície que contenha a amostra seja suficientemente limpa e relativamente plana, como é o caso da mica (Neves *et al.*, 1998).

#### 2.4.1.4 TEOR DE ENCAPSULAÇÃO

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada. As técnicas mais utilizadas para a separação são a ultracentrifugação (Marchal-Heussler *et al.*, 1990; Alonso *et al.*, 1991; Santos-Magalhães *et al.*, 2000) e a ultrafiltração-centrifugação (Losa *et al.*, 1993; Guterres *et al.*, 1995; Shaffazick *et al.*, 2002), sendo a última utilizada no presente estudo. Esta técnica emprega uma membrana (10kDa) para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração do fármaco livre é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanopartículas é calculada pela subtração das concentrações total e livre (Shaffazick *et al.*, 2003).

Diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características de superfície das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a natureza do óleo utilizado (no caso das NCs) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (Shaffazick *et al.*, 2003).

Nas nanocápsulas, as quais foram desenvolvidas para aumentar a eficiência de associação de fármacos lipofílicos, estes deveriam estar encapsulados pela membrana polimérica, ou seja, dissolvidos no núcleo oleoso. Entretanto, alguns estudos relatam a possibilidade de adsorção do fármaco à parede polimérica (Vauthier-Holtzschler *et al.*, 1991; Allémann *et al.*, 1993; Legrand *et al.*, 1999; Montasser *et al.*, 2000).

#### 2.4.1.5 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

Para se conhecer o processo de liberação do fármaco do nanocarreador, experimentos *in vitro* podem ser realizados em diferentes meios, em condições sink (isto é, em meio de dissolução com concentração do fármaco equivalente a até 10% da concentração de saturação), conforme a via de administração pretendida (Legrand *et al.*, 1999). Métodos como a difusão em sacos de diálise e a separação baseada na ultracentrifugação, na filtração a baixa pressão ou na ultrafiltração-centrifugação têm sido utilizados para este fim.

A liberação do fármaco de sistemas coloidais é dependente tanto do tipo de carreador quanto do tipo de mecanismo envolvido na interação fármaco-veículo. Nas NCs, a liberação do fármaco está relacionada ao seu coeficiente de partição entre o óleo e o meio aquoso externo e ao volume destas duas fases (Legrand *et al.*, 1999). Isto significa que a quantidade de fármaco liberado é diretamente proporcional à diluição do carreador e que a liberação é praticamente instantânea quando existem condições “sink”, ou seja, quando o fármaco está diluído em quantidade de solvente dez vezes maior do que a sua solubilidade. A difusão do fármaco através da parede polimérica não é um passo limitante no processo de liberação (Losa *et al.* 1993). Além disso, a natureza do polímero também parece não influenciar o perfil de liberação. Já, em alguns casos, a presença de lecitina na interface pode diminuir a taxa de liberação do fármaco de NCs (Legrand *et al.*, 1999).

No caso das NCs, o fármaco, teoricamente dissolvido no núcleo oleoso, seria liberado desta estrutura vesicular mediante a sua difusão através da parede polimérica, geralmente apresentando cinética de ordem zero (Soppimath *et al.*, 2003). Entretanto, a rápida liberação inicial dos fármacos poderia ser atribuída a uma pequena quantidade destes adsorvida à superfície das partículas (Shaffazick *et al.*, 2003).

### 2.5 <sup>99m</sup>TECNÉCIO

Como elemento de número atômico 43, o tecnécio é um metal de transição e, portanto, apresenta como característica diferentes estados de oxidação (de -1 a +7). Deste modo, é capaz de formar complexos metais-

---

doadores que são compostos formados pela ligação entre o metal deficiente de elétrons com átomos ou grupos funcionais (aminas, amidas, tióis, fosfinas, oximas e isonitrilas) capazes de doar pares de elétrons (Araújo, 1998). O amplo uso deste marcador é resultado da alta disponibilidade, baixo custo e, ainda, por apresentar características nucleares e físicas extremamente favoráveis: emissão gama de baixa energia (140 keV) e meia-vida curta (6 horas), oferecendo um baixo risco de exposição à radiação.

No meio aquoso, o  $^{99m}\text{Tc}$  é quimicamente estável, na forma de pertecnetato,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Quando injetado no organismo, o pertecnetato é captado pela glândula tireóide devido à sua similaridade com o iodeto, em relação ao seu raio atômico e à carga negativa. Para alcançar outros sítios no organismo, o  $^{99m}\text{Tc}$  precisa ligar-se a um carreador, usualmente um agente quelante. Para isso, é necessário que o  $^{99m}\text{Tc}$  seja reduzido, tornando-se capaz de se ligar a grupos ou átomos doadores de elétrons, sendo que a estabilidade do complexo aumenta com o aumento do número de ligações com o  $^{99m}\text{Tc}$ . Muitos agentes quelantes complexam-se com o  $^{99m}\text{Tc}$  e têm afinidade por certos tecidos, sendo assim, muito utilizados para imagens cintilográficas (Hjelstuen, 1995). Na ausência de ligantes, o  $^{99m}\text{Tc}$  reduzido apresenta-se na forma de  $^{99m}\text{TcO}_2$ , um colóide que se injetado no organismo é captado pelas células do SMF.

Diante das vantagens descritas, o  $^{99m}\text{Tc}$  foi o radiotraçador escolhido para a marcação do fluconazol e realização dos estudos de biodistribuição.



---

### **3. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO**

---

Os nanocarreadores são potencialmente capazes de se concentrarem em focos infecciosos e/ou inflamatórios devido ao aumento da permeabilidade vascular que permite que partículas de 10 a 500 nm possam extravasar e acumular-se no espaço intersticial (Torchilin, 2000). Além disto, os carreadores coloidais nanoparticulados são capazes de alterar o perfil de biodistribuição de fármacos, reduzindo a toxicidade e também a dose eficaz destes. Sabe-se pela literatura que o tratamento das candidíases em pacientes imunocomprometidos exige, muitas vezes, altas doses ou até mesmo a associação de agentes antifúngicos, contribuindo para maior incidência de efeitos colaterais. Portanto, a vetorização do fluconazol por meio de nanocápsulas tem por objetivo a obtenção de um perfil farmacocinético mais adequado ao tratamento destes casos. Para tanto, como primeiro passo, torna-se imprescindível avaliar a biodistribuição do fluconazol livre e encapsulado em nanocápsulas, em um modelo de infecção por *Candida albicans*. Neste contexto, o emprego de fármacos radiomarcados tem sido largamente utilizado para estudos de biodistribuição. Assim, este trabalho teve como proposta investigar a biodistribuição do fluconazol marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio, livre e encapsulado em nanocápsulas convencionais e furtivas. Os resultados deste estudo poderão ser úteis para avaliar a viabilidade de preparação de novas formulações capazes de otimizar o tratamento de candidíases com fluconazol, contribuindo para o aumento da eficácia do tratamento e diminuição da ocorrência de efeitos colaterais.

# **OBJETIVOS**

---

## **1. OBJETIVO GERAL**

---

Avaliar a biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol, livre e encapsulado em nanocápsulas convencionais e furtivas, em um modelo experimental de infecção por *Candida albicans* em camundongos imunossuprimidos.

## **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

---

- Marcar o fluconazol com  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio;
- Purificar o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol;
- Determinar o rendimento de marcação do fluconazol com  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio;
- Determinar o perfil cromatográfico do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em gel sephadex G -150;
- Avaliar a estabilidade do fluconazol marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio;
- Preparar as nanocápsulas convencionais e furtivas contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol;
- Determinar o teor de encapsulação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol;
- Caracterizar as nanocápsulas convencionais e furtivas por espectroscopia de correlação de fótons (ECF);
- Caracterizar as nanocápsulas convencionais e furtivas por microscopia de força atômica (MFA);
- Avaliar a liberação *in vitro* do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol das nanocápsulas convencionais e furtivas;
- Avaliar e comparar a biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol, livre e encapsulado em nanocápsulas convencionais e furtivas, em camundongos previamente imunossuprimidos e infectados com *Candida albicans*.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 1. MATERIAL

---

No presente trabalho, foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes: fluconazol (Galena, Índia), cloreto estanoso diidratado, boridreto de sódio e pirofosfato de sódio (Sigma, EUA),  $^{99m}\text{Tc}$  (na forma de pertecnetato) obtido de um gerador de  $^{99}\text{Mo}$  (IPEN, Brasil), fosfolípide de soja (Epikuron 170<sup>®</sup>) (lecitina com fosfatidilcolina ~70%) (Lucas Meyer, França), Miglyol 810 N (triglicéride cáprico/caprílico) (Hulls, Alemanha), ácido poli (*D, L* - láctico) PM 75.000 Da e poloxamer 188 PM 8500 KDa (Synperonic F68<sup>®</sup>) (Aldrich, EUA), PLA-PEG (PM 49.000 Da e 20% de PEG 5.000 Da) (Alkermes, EUA), xilasina (Dopaser<sup>®</sup>) (Calier, Espanha), ketamina (Dopalen<sup>®</sup>) (Sespo, Brasil), ágar sabouraud dextrosado (Biobrás, Brasil), EDTA (New Química, Brasil), glutaraldeído 25% (All Chemistry, Brasil), acetona, metanol, cloreto de sódio, ácido acético, hidróxido de sódio, metiletilcetona (Synth, Brasil). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico e a água foi purificada por destilação. Foram também utilizados os seguintes materiais: sephadex G150 (Pharmacia, Suécia), colunas Maxi Clean (Alltech Associates, EUA), membranas de celulose regenerada Microcon<sup>®</sup> 10.000 Da e membranas durapore Ultrafree-CL<sup>®</sup> 0,1 $\mu\text{m}$  (Millipore, EUA).

---

## 2. EQUIPAMENTOS

---

Contador gama ANSR (ABBOT, EUA), calibrador de dose (CAPINTEC, EUA), Zetasizer 3000Hs (Malvern Instruments, Inglaterra), irradiador gama Gamacell 220 (AECL, Canadá), microscópio de AMF Dimension 3000 (Digital Instruments, USA), rotavapor (Fisatom, Brasil), espectrofotômetro UV-160 A (Shimadzu, Japão).

---

## 3. ANIMAIS

---

Foram utilizados camundongos machos, da linhagem Swiss, pesando de 20 a 25 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Todos os procedimentos relativos à manutenção dos animais e à

experimentação foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA).

#### **4. MICRORGANISMO**

---

Utilizou-se cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, gentilmente fornecida pelo laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

#### **5. MÉTODOS**

---

##### **5.1 MARCAÇÃO DO FLUCONAZOL COM <sup>99m</sup>TECNÉCIO**

O processo de marcação e purificação do fluconazol, após a marcação com <sup>99m</sup>Tc, foi realizado de acordo com método descrito por Lupetti (2002), com algumas modificações. Para uma alíquota de 50 µL de uma solução de fluconazol 2 mg/mL foram adicionados 4 µL de uma solução contendo cloreto estanoso (2 mg/mL) e pirofosfato de sódio (2 mg/mL), sendo esta solução preparada em HCL 0,25N. A esta preparação foram adicionados 4 µL de uma solução de boridreto de sódio (10 mg/mL, NaOH 0,1N). Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de pertecnetato de sódio (NaTcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) contendo uma atividade de 74 MBq. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 120 min e então, foi diluída com ácido acético 0,01 mol/L, para um volume final de 1 mL.

##### **5.2 PURIFICAÇÃO DO <sup>99m</sup>Tc-FLUCONAZOL**

Após a marcação, 1 mL do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol foi injetado em uma coluna Maxi Clean C18 (Millipore, EUA) pré ativada com 2 mL de metanol e 20 mL de ácido acético 0,01 mol/L. Este procedimento teve como finalidade retirar todo o <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> formado durante o processo de marcação. A coluna foi então lavada com 20 mL de ácido acético 0,01 mol/L para retirar o <sup>99m</sup>Tc que não se ligou ao fármaco (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>). Posteriormente, o <sup>99m</sup>Tc-fluconazol foi eluído com 2 mL de metanol. O metanol foi eliminado por ejeção de ar quente e o <sup>99m</sup>Tc-fluconazol foi ressuspenso em 1 mL de ácido acético 0,01 mol/L. Este procedimento foi

repetido por mais duas vezes. Finalmente, o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol purificado foi ressuspenso em NaCl (0,9%) para a avaliação do rendimento de marcação e para os estudos de biodistribuição do fármaco livre. Para os estudos de encapsulação, o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol purificado foi ressuspenso em uma mistura de metanol:acetona (1:3).

### 5.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE MARCAÇÃO DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL

O rendimento de marcação do fluconazol foi determinado por cromatografia de camada delgada em sílica gel 60, usando-se metiletilcetona como eluente. Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  da amostra foi aplicada em uma tira de sílica gel 60 (1 x 10 cm) e posteriormente eluída com metiletilcetona. Após a eluição, a tira foi subdividida em segmentos de um centímetro, determinando-se a radioatividade de cada segmento. O  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol permanece no ponto de aplicação da amostra ( $R_f = 0$ ) enquanto que o ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) migra através da fita de cromatografia ( $R_f = 1.0$ ). Esta observação foi realizada após uma corrida cromatográfica do fármaco e do tecnécio livre, separadamente, em metiletilcetona. Fez-se a revelação do fluconazol em atmosfera de iodo e incidência de luz ultravioleta e a detecção do tecnécio livre através da medida de radioatividade. Desta forma, o rendimento de marcação foi calculado pela seguinte equação:

$$\% \text{ marcação do fluconazol} = \frac{\text{cpm parte inferior}}{\Sigma \text{ cpm (parte inferior + superior)}} \times 100$$

\* cpm = contagem por minuto

### 5.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL POR CROMATOLOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-150

O perfil do fluconazol radiomarcado foi determinado por cromatografia de filtração em gel, em coluna de gel sephadex G-150 (20 x 0,6 cm). Para a realização desta técnica, 2 mL do fármaco radiomarcado foram injetados na

coluna, pré lavada com 20 mL de tampão fosfato (pH 7,3) que foi utilizado como fase móvel. Em seguida, 15 frações de 1 mL foram recolhidas para a contagem da radioatividade. O mesmo procedimento foi realizado com uma solução contendo 2 mg/mL de fluconazol não marcado, sendo as frações colhidas analisadas através de medidas de absorbância a 220 nm em espectrofotômetro UV-160 A (Shimadzu, Japão). Os perfis cromatográficos obtidos para o fluconazol marcado e não marcado foram comparados.

## **5.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL**

Para avaliar a estabilidade da ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  com o fluconazol, 500  $\mu\text{L}$  do fármaco radiomarcado foram incubados com 500  $\mu\text{L}$  de plasma humano, em banho maria a 37°C. Nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 360 e 1440 minutos após a incubação, determinou-se o percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  liberado na amostra, utilizando cromatografia de camada delgada, como descrito anteriormente. Neste estudo, os testes foram analisados em quadruplicatas.

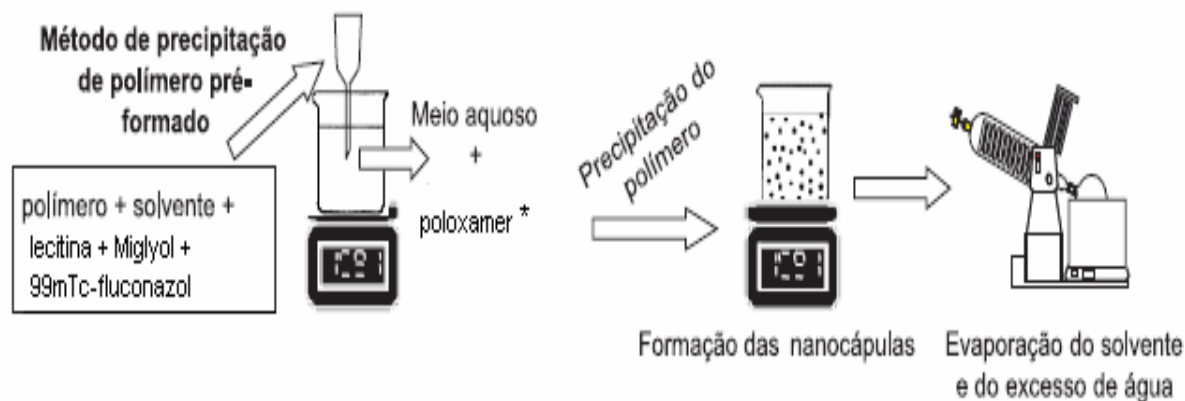
## **5.6 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS**

### **5.6.1 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS**

A preparação das nanocápsulas foi realizada pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado, método também conhecido como nanoprecipitação, descrito por Fessi *et al.* (1989). Para o preparo das NCs convencionais, foram dissolvidos 12 mg de polímero PLA em 2 mL de uma mistura metanol : acetona (1:3) contendo 0,75% p/v de lecitina de soja (Epikuron ®) e 2,5% p/v de Miglyol 810 N. Esta preparação foi agitada com o auxílio de um agitador magnético e aquecimento até 40°C. Em seguida, a solução orgânica foi vertida em uma solução externa aquosa (4 mL) contendo 0,75% p/v de Poloxamer 188 (Synperonic F68®), mantendo a mesma agitação por 10 minutos, a fim de promover a formação das nanocápsulas. Posteriormente, esta suspensão foi levada ao rotavapor, mantendo-se a temperatura do banho em torno de 50°C para evaporação do solvente à pressão reduzida, até um volume final de 2 mL. Para a preparação das



nanocápsulas furtivas foram seguidas as mesmas etapas, diferindo-se somente no polímero utilizado que foi o copolímero PLA-PEG e na fase aquosa não se adicionou o tensoativo (poloxamer). Além disso, a temperatura do banho no rotavapor não ultrapassou 40°C. As formulações de NCs convencionais e furtivas contendo o fármaco foram preparadas nas mesmas condições descritas acima, sendo o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol, obtido após purificação, dissolvido no solvente orgânico metanol : acetona (1:3).



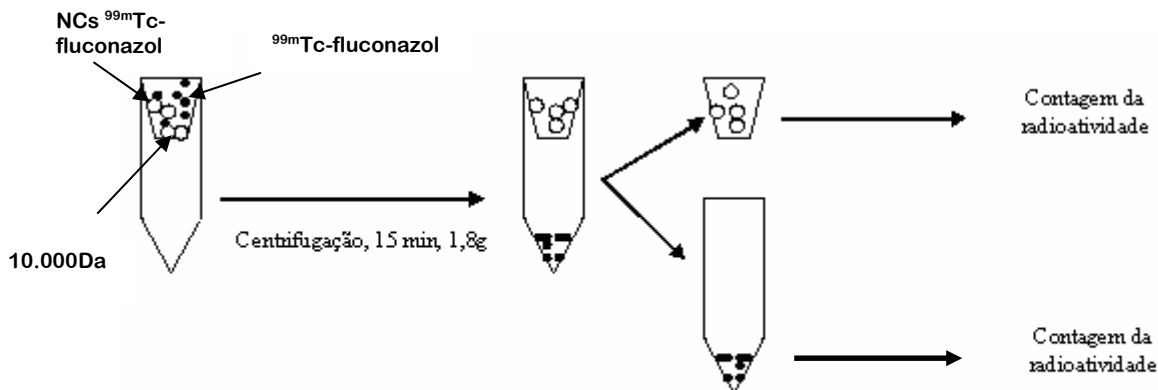
\* componente empregado somente na preparação das NCs convencionais.

**FIGURA 5** – Desenho esquemático das etapas da preparação das nanocápsulas.

### 5.6.2 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ENCAPSULAÇÃO DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL

A porcentagem de encapsulação tem como objetivo determinar o teor de fármaco presente no núcleo oleoso da nanopartícula. O percentual de encapsulação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol foi determinado em NCs convencionais e furtivas, pelo método de ultrafiltração/centrifugação em membranas Microcon<sup>®</sup> de 10.000 Da (Millipore, EUA). Em cada membrana, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da formulação e, posteriormente, foram centrifugados por 15 minutos a 1800 x g. A radioatividade do ultrafiltrado e do retentato foi determinada em um contador de radiação gama, sendo a radioatividade do filtrado corrigida pelo volume total de fase externa presente na formulação (95,5% para as NCs convencionais e 96,3% para as NCs furtivas). O percentual de encapsulação do fármaco foi determinado segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ encapsulação} = \frac{\text{(radioatividade da membrana)}}{\text{[radioatividade (ultrafiltrado + membrana)]}} \times 100$$



**FIGURA 6** - Representação esquemática da metodologia para separação do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol encapsulado nas NCs do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol não encapsulado e determinação do teor de encapsulação.

Este método foi utilizado para separar as NCs contendo o <sup>99m</sup>Tc-fluconazol do fármaco livre. As NCs-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol foram ressuspensas em NaCl 0,9% e utilizadas no estudo de liberação do fármaco e nos estudos de biodistribuição.

### 5.6.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POR ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO DE FÓTONS

A análise do tamanho das partículas, o índice de polidispersão das amostras e o potencial zeta foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando um equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Inglaterra).

Para a realização das medidas, 20 µL das amostras foram diluídos em 20 mL de NaCl 1mM com o objetivo de se obter suspensões com condutividades constantes ( $1,2 \pm 0,2$  mS/cm<sup>2</sup>) e resultados comparativos em relação às modificações de potencial introduzidas pelo fármaco encapsulado. As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente, utilizando-se um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 90°. As medidas de tamanho e potencial zeta foram realizadas na mesma amostra. As análises foram feitas em diferentes formulações, a saber, NCs convencionais e furtivas vazias, NCs

---

convencionais e furtivas contendo fluconazol radiomarcado e NCs convencionais e furtivas contendo fluconazol não marcado (preparadas com 2mg/mL do fármaco na fase oleosa). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (n=10).

O índice de polidispersão, calculado pelo equipamento, reflete o perfil de homogeneidade no tamanho das partículas. Amostras que apresentaram índice de polidispersão inferior a 0,3 foram consideradas monodispersas.

#### **5.6.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)**

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada pela técnica de microscopia de varredura por sonda mecânica, utilizando a técnica de força atômica.

Para a realização destes experimentos, foram utilizados os equipamentos Multimode e Dimension 3000, ambos monitorados por controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, EUA), do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC-MG). As imagens foram obtidas no modo intermitente (*tapping mode*) utilizando sondas de silício de comprimento de 228  $\mu\text{m}$ , com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 29-61 N/m e raio de curvatura de 5 nm a 10 nm. Aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  das amostras foram depositados em placas de mica, clivadas no momento do uso. A mica foi utilizada como suporte para as amostras, uma vez que se trata de um mineral com plano basal e clivagem fácil, apresentando superfície atômica plana. A superfície exposta é hidrofílica e apresenta cargas negativas. Após a deposição das amostras na superfície da mica, aguardou-se aproximadamente 3 minutos e a superfície foi seca, utilizando-se jato de argônio. Testou-se também a fixação das amostras através da deposição de uma gota ( $\approx 10 \mu\text{L}$ ) de glutaraldeído 25% sobre a superfície da mica, previamente à aplicação da amostra. Após homogeneização da mistura, secou-se a superfície com jato de argônio. As amostras foram posicionadas e efetuou-se a varredura com velocidade de 1 Hz e resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras foi realizada pelo programa de análise do sistema (Section Analysis). Os

---

resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de aproximadamente 40 partículas analisadas.

### 5.6.5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL

A cinética de liberação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol foi avaliada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, em dois meios diferentes: plasma de camundongo a 70% em solução salina e NaCl 0,9%. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada meio foi incubada, em banho maria a 37°C, com 125  $\mu\text{L}$  da suspensão de NCs- $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol (separadas anteriormente do fármaco não encapsulado, pelo método de ultrafiltração/centrifugação em membrana de 10.000 Da). Após os tempos de 15, 60, 120 e 240 minutos, 400  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram transferidos para unidade Ultrafree<sup>®</sup> de 0,1  $\mu\text{m}$  (Millipore, EUA) e centrifugados a 1800 x g durante 10 minutos. Determinou-se, então, a radioatividade de 100  $\mu\text{L}$  do ultrafiltrado em um contador de radiação gama. Utilizou-se um padrão de dose para a determinação da radioatividade total (100%), sendo este equivalente à radioatividade de 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra, determinada em cada tempo selecionado. Desta forma, é possível eliminar a interferência do decaimento radioativo.

Portanto, a porcentagem de liberação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol foi determinada conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ liberação do fármaco} = \frac{\text{radioatividade do ultrafiltrado}}{\text{radioatividade do padrão de dose}} \times 100$$

---

## 5.7 IMUNOSSUPRESSÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram irradiados com radiação gama no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), com o objetivo de indução do processo de imunossupressão. Este procedimento foi realizado no equipamento Gamacell 220 (Atomic Energy of Canadá Limited, Canadá), cuja fonte de radiação gama é o  $\text{Co}^{60}$ . Os animais receberam uma dose de 6 Gray, durante aproximadamente 25 minutos. Após 24 horas deste procedimento, os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina e xilasina (40 mg/Kg e 8mg/Kg, respectivamente) e ketamina (. Em seguida, para avaliar o efeito da radiação na contagem global dos leucócitos, retirou-se 1 mL de sangue dos camundongos para a realização do leucograma. O sangue foi coletado em tubos com EDTA (1,8mg/mL de sangue). O material foi encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, onde foi realizado o leucograma das amostras. Para efeito comparativo, o mesmo procedimento foi realizado com camundongos não irradiados. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão das contagens globais de leucócitos (n=8).

## 5.8 INFECÇÃO DOS ANIMAIS

### 5.8.1 CULTIVO DA *Candida albicans*

A cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 foi cultivada em ágar sabouraud dextrosado (SDA) inclinado. Duas culturas foram preparadas, sendo uma cultura estoque (“mãe”), repicada a cada 30 dias e uma cultura para uso (“filha”). Para o crescimento do fungo, o meio foi incubado a 37°C por 24 horas e, posteriormente, as culturas foram armazenadas na temperatura de 2 a 8°C. A partir da cultura “filha” preparou-se duas suspensões do fungo em 10 mL de salina estéril, nas concentrações de  $10^6$  UFC/mL e  $10^8$  UFC/mL, para serem inoculadas nos animais.

---

### **5.8.2 DESENVOLVIMENTO DO FOCO INFECCIOSO POR *Candida albicans***

Os camundongos foram infectados com *Candida albicans*, 24 horas após a irradiação dos animais. O procedimento adotado para a indução do foco baseou-se no trabalho descrito por Ruiz-Cabello *et al.* (1999). Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão foi injetada no músculo da coxa direita dos animais, previamente anestesiados. Com a proposta de confirmar as concentrações injetadas nos animais, alíquotas contendo o mesmo volume (100µL) foram submetidas a diluições seriadas, conforme descrito a seguir.

De cada suspensão recém-preparada foi retirado 0,1 mL e adicionado a 9,9 mL de salina estéril. Foram preparadas diluições seriadas (1/100) das suspensões testadas, sendo inoculado 1 mL das diluições de  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-4}$  em placas de petri contendo SDA, em duplicatas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e realizou-se a contagem das colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator da diluição.

### **5.9 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE *Candida albicans* NO DESENVOLVIMENTO DO FOCO INFECCIOSO**

#### **5.9.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Com o objetivo de avaliar o estágio de desenvolvimento do foco infeccioso induzido pelas diferentes concentrações de *C. albicans* ( $10^6$  e  $10^8$  UFC/mL), foi realizado o estudo histológico do tecido muscular da coxa dos animais. Após 24 horas da infecção com 100 µL da suspensão de  $10^6$  UFC/mL, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e retirou-se a coxa infectada e a contralateral (controle). O mesmo procedimento foi realizado após 48 horas da infecção com 100 µL da suspensão de  $10^8$  UFC/mL. Após a remoção dos pêlos das coxas, foram feitos cortes delgados do tecido muscular, longitudinalmente. Este material foi armazenado em éter etílico e encaminhado para a Faculdade de Medicina da UFMG, onde foi feita a análise histológica. Para garantir a reprodutibilidade das análises, foram avaliados no mínimo quatro animais de cada grupo.

### 5.9.2 ESTUDO DE CAPTAÇÃO DO <sup>99m</sup>Tc-FLUCONAZOL PELO FOCO INFECCIOSO

A captação do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol pelo foco infeccioso por *C. albicans* foi também um indicador utilizado para avaliar o estágio de desenvolvimento da infecção. Este estudo foi realizado 24 e 48 horas após a infecção dos animais com 100 µL das suspensões 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup> UFC/mL, respectivamente. Foi injetado 100 µL (37 MBq) do fármaco radiomarcado purificado na veia da cauda dos camundongos e após os tempos de 15, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos, os animais foram anestesiados e sacrificados. As coxas, infectada e controle, foram retiradas e pesadas para a contagem da radioatividade em um contador de radiação gama. A radioatividade presente em cada coxa foi expressa como porcentagem da dose injetada por grama de tecido (%DI/g). Para o cálculo do percentual de radioatividade presente em cada coxa utilizou-se um padrão de dose do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol. Este padrão continha a mesma dose de radioatividade administrada nos animais. O cálculo do percentual de dose foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$\%DI/g = \frac{\text{cpm coxa (cpm/g)} \times 100}{\text{cpm padrão}}$$

\* cpm = contagem por minuto.

Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão dos valores de %DI/g obtidos para cada tempo estudado, sendo utilizados para este estudo quatro animais por tempo.

### 5.10 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO

Os estudos de biodistribuição foram realizados em animais imunossuprimidos, infectados com 10<sup>8</sup> UFC/mL de *C. albicans* no músculo da coxa direita, 48 horas antes do experimento. Para estes estudos foram utilizadas três formulações distintas: <sup>99m</sup>Tc-fluconazol, NCs convencionais contendo <sup>99m</sup>Tc-fluconazol e NCs furtivas contendo <sup>99m</sup>Tc-fluconazol. O objetivo

destes experimentos foi avaliar comparativamente o perfil farmacocinético das formulações e a capacidade de captação pelo foco infeccioso.

No primeiro grupo de animais, foi injetado 100 µL (37MBq) do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol purificado na veia da cauda. Nos intervalos de tempo de 15, 30, 60, 90, 120 e 240 min após a injeção, os camundongos foram anestesiados e sacrificados. Posteriormente, retirou-se o sangue e os seguintes órgãos: fígado, baço, rins, bexiga e tireóide. Estes órgãos foram pesados e a radioatividade foi determinada em um contador gama. A radioatividade presente em cada órgão foi expressa como porcentagem da dose injetada por grama de tecido (%DI/g). Este procedimento teve como finalidade a padronização dos experimentos, de modo que seja retirada a interferência dos diferentes pesos dos órgãos. Para o cálculo do percentual de radioatividade presente em cada órgão utilizou-se um padrão de dose do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol, sendo que este continha a mesma dose de radioatividade administrada nos animais. O cálculo do percentual de dose foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$\%DI/g = \frac{\text{cpm/g órgão} \times 100}{\text{cpm padrão}}$$

\* cpm = contagem por minuto.

Para os estudos com o fármaco encapsulado, inicialmente procedeu-se ao processo de separação das NCs-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol do fármaco que não se associou às nanoestruturas. Esta separação foi feita pelo método de ultrafiltração/centrifugação, como descrito anteriormente no item 5.5.2. Após serem separadas e ressuspendidas em NaCl 0,9%, as NCs convencionais (NCs PLA-POLOX-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol) e furtivas (NCs PLA-PEG-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol) foram injetadas intravenosamente na cauda dos animais, sendo administrados 100 µL das suspensões com uma atividade de 37MBq. Os tempos estudados e as etapas do estudo de biodistribuição foram equivalentes ao primeiro grupo no qual se avaliou a biodistribuição do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol livre.

Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão da %DI/g, sendo n = 5 animais para cada tempo investigado.



## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O diâmetro médio e o potencial zeta das NCs vazias e contendo o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol foram comparados utilizando-se a análise de variância (ANOVA).

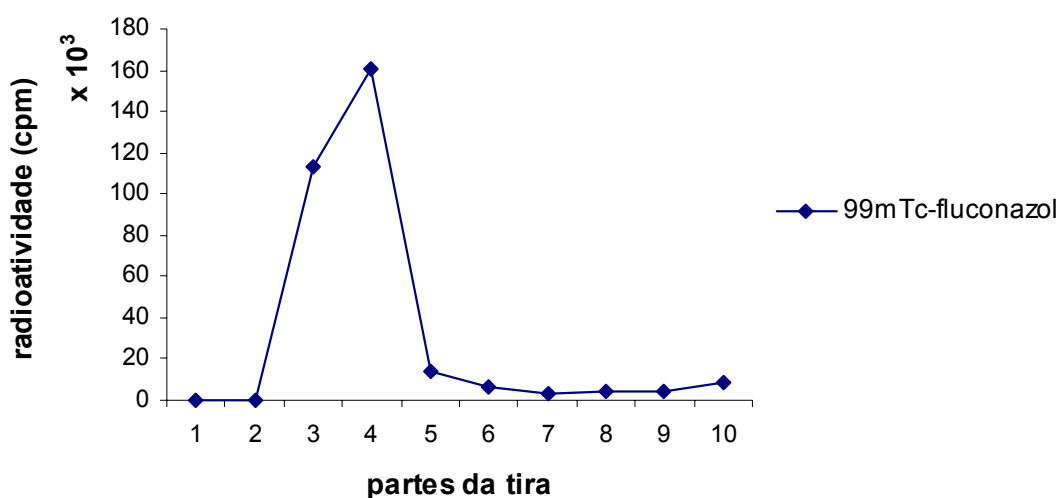
Os resultados de biodistribuição foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tuckey do programa de análise Graphpad Prism versão 4.0.

Para todas as análises adotou-se intervalo de confiança de 95%, sendo os valores de  $p \leq 0,05$  aceitos como estatisticamente significativos.

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 1. RENDIMENTO DE MARCAÇÃO DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL

A marcação do fluconazol com  $^{99m}\text{Tc}$ , após o processo de purificação, mostrou um rendimento de  $93,9 \pm 1,7\%$  ( $n=10$ ). Isto significa que apenas 6,1% da radioatividade presente na preparação correspondem ao  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , ou seja, ao  $^{99m}\text{Tc}$  que não se incorporou à molécula do fármaco. Esta determinação foi realizada por cromatografia em sílica gel 60, utilizando como eluente metiletilcetona, como apresentado na figura 7.



**FIGURA 7** – Perfil cromatográfico do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em sílica gel 60, utilizando metiletilcetona como eluente.

Conforme descrito no item 5.3, o valor do  $R_f$  do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  em sílica gel 60 quando eluído com metiletilcetona é igual a 1. Observa-se pela figura 7 a ausência de pico de radioatividade nos segmentos compreendidos entre 8 e 10. Isto significa que após a marcação do fluconazol com  $^{99m}\text{Tc}$ , praticamente não existem átomos de  $^{99m}\text{Tc}$  livres, sendo esta observação confirmada pelo cálculo do percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  presente na preparação. Além disso, observa-se que o pico de radioatividade está situado entre os segmentos 3 e 4 da tira de cromatografia. Considerando que a amostra é aplicada no terceiro segmento da tira de sílica gel, conclui-se que o pico é representativo do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol cujo  $R_f$  é igual a 0, nas condições descritas.

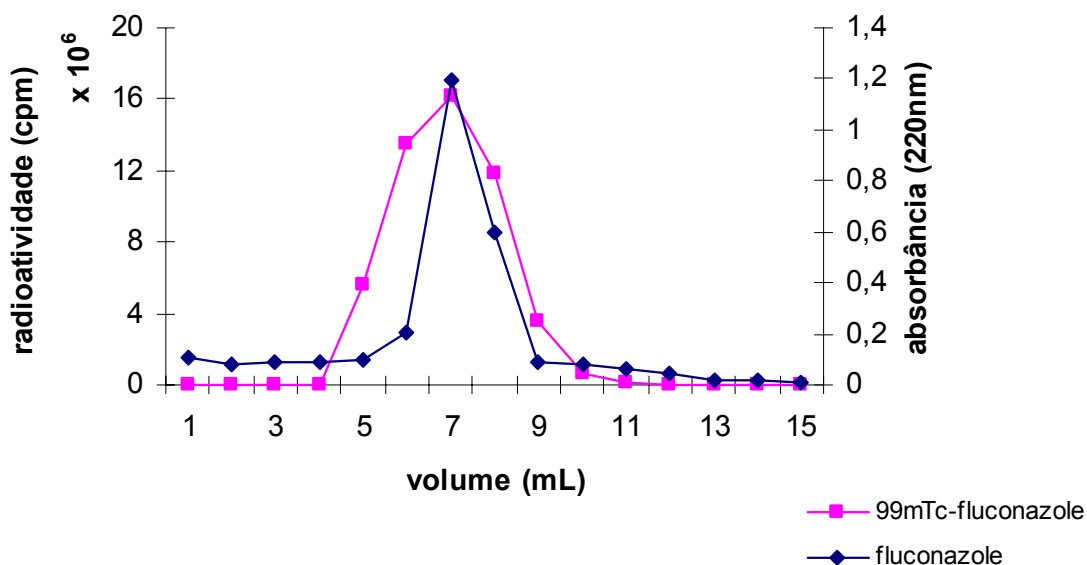
Ressalta-se que, a impureza radioativa coloidal ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) tinha sido previamente retirada pelo sistema de filtração na coluna Maxi Clean. Esta fração representou  $31,3 \pm 5,6\%$  ( $n=10$ ) da radioatividade total. Este processo

de filtração foi repetido por três vezes para assegurar a total remoção do  $^{99m}\text{TcO}_2$ .

O rendimento de marcação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol encontrado nesse trabalho (93,9%) está de acordo com os resultados mostrados por Luppeti *et al.* (2002) que obtiveram um rendimento de marcação do fármaco acima de 90%.

## 2. PERFIL DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL EM GEL SEPHADEX G-150

O perfil cromatográfico do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em gel sephadex G-150 foi comparado ao perfil do fluconazol não marcado conforme demonstrado pela figura 8.



**FIGURA 8** – Gráfico do perfil cromatográfico do fluconazol e fluconazol radiomarcado em gel sephadex G-150.

De acordo com a figura 8, observa-se que o fluconazol não marcado apresentou um pico de eluição (220nm) na fração correspondente a 7 mL. O fármaco radiomarcado apresentou um pico de eluição que coincidiu com o pico observado pela leitura de absorbância. Este resultado sugere que o processo de marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  manteve a integridade química da molécula do fármaco. Lupetti *et al.* (2002) realizou um estudo semelhante, utilizando HPLC de troca iônica equipado com detector UV ( $\lambda = 220\text{nm}$ ) e cristal de iodeto de

sódio para detecção de radiação gama. Neste estudo, foi observado que o tempo de retenção do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol foi também coincidente ao do fármaco não marcado (entre 9 e 10 min ). Conforme mostrado na figura 8, o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol começa a ser eluído mais rapidamente do que o fármaco não marcado. Isto pode ser explicado pelo possível aumento de tamanho da molécula do fluconazol após a marcação com os átomos de  $^{99m}\text{tecnécio}$ . Desta forma, as moléculas maiores penetram menos nos poros do gel sephadex sendo eluídas mais rapidamente. Entretanto, cumpre ressaltar que os picos de radioatividade e absorbância foram coincidentes.

### 3. ESTABILIDADE DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL

Este estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade da ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  à molécula do fármaco, ao longo do tempo. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1** - Percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  liberado após incubação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol com plasma de camundongo a 37°C

TEMPO (minutos)	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$ *
0	5,54 ± 1,20
15	5,83 ± 1,17
30	5,72 ± 0,70
60	6,62 ± 1,36
90	6,07 ± 1,23
120	7,15 ± 1,64
360	6,28 ± 1,26
1440	5,91 ± 1,42

\* Valores determinados por cromatografia de camada delgada em sílica gel 60. Os valores representam a média ± desvio padrão (n= 4) para cada tempo investigado; p > 0,05 (ANOVA).

De acordo com os dados apresentados na tabela 1, observa-se que o percentual de  $^{99m}\text{Tc}$  livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), presente no meio após incubação à 37°C, não sofreu variação estatisticamente significativa no decorrer do experimento ( $p>0,05$ ). Este resultado indica que a ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  com o fluconazol apresentou-se estável por até 24 horas. Este resultado é muito importante pois possibilitou a realização dos estudos de biodistribuição com este radiotraçador. Lupetti *et al.* (2002) avaliando a estabilidade do fluconazol marcado com  $^{99m}$ tecnécio, em meio plasmático, verificaram uma liberação de  $^{99m}$ tecnécio da ordem de 5%. Portanto, os resultados do presente trabalho encontram-se respaldados pela literatura.

#### 4. PERCENTUAL DE ENCAPSULAÇÃO DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL NAS NANOCÁPSULAS

Os valores do percentual de encapsulação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nas NCs PLA-POLOX e PLA-PEG estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2.** Percentual de encapsulação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nas nanocápsulas

	% encapsulação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nas NCs PLA-POLOX	% encapsulação do $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nas NCs PLA-PEG
Experimento 1	26,3	29,9
Experimento 2	27,3	31,8
Experimento 3	33,5	34,9
Média $\pm$ desvio padrão	29,0 $\pm$ 3,5	32,2 $\pm$ 2,3

Os valores de cada experimento correspondem à média de duas medidas (duplicatas).

De acordo com a tabela 2, o teor de encapsulação obtido foi de 29,0  $\pm$  3,5% e 32,2  $\pm$  2,3% para as NCs PLA-POLOX e PLA-PEG, respectivamente ( $n=3$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados ( $p>0,05$ ), indicando que os diferentes polímeros utilizados não influenciaram no percentual de encapsulação do fármaco radiomarcado. Segundo Legrand *et al.* (1999) a porcentagem de encapsulação é geralmente relacionada à

solubilidade do fármaco no núcleo oleoso da nanocápsula, portanto, a baixa taxa de associação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol às NCs provavelmente está relacionada à natureza físico química do fármaco. Embora o fluconazol tenha um coeficiente de partição favorável à fase oleosa, ( $\log P$  octanol/PBS = 1.0) (McEvoy, 2003), os dados obtidos sugerem que esta lipofilicidade não foi suficiente para uma boa retenção do fármaco no núcleo oleoso do nanocarreador. Devido ao baixo teor de encapsulação encontrado foi necessário separar o fármaco encapsulado do fármaco livre. Este procedimento foi realizado pela técnica de ultrafiltração/centrifugação, sendo de fundamental importância para a os estudos de biodistribuição e de liberação.

## 5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POR ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO DE FÓTONS

Os dados obtidos para o diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das NCs convencionais e furtivas estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** - Características físico-químicas das NCs

Formulações de Nanocápsulas	Diâmetro médio ± DP (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial $\zeta$ ± DP (mV)
NC PLA-POLOX	282 ± 24 <sup>a</sup>	0,340	-69,6 ± 8,4 <sup>c</sup>
NC PLA-PEG	236 ± 40 <sup>a</sup>	0,340	-57,9 ± 3,7 <sup>d,e</sup>
NCPLA-POLOX- $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL	356 ± 45 <sup>b</sup>	0,375	-66,2 ± 6,7 <sup>c</sup>
NC PLA-PEG- $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL	351 ± 24 <sup>b</sup>	0,418	-55,4 ± 7,8 <sup>d,e</sup>
NC PLA-POLOX-FLUCONAZOL	347 ± 15 <sup>b</sup>	0,116	-62,3 ± 1,6 <sup>c,e</sup>
NC PLA-PEG-FLUCONAZOL	330 ± 20 <sup>b</sup>	0,272	-58,1 ± 6,2 <sup>c,e</sup>

Os valores representam a média ± desvio padrão (n=10). Letras iguais indicam que os resultados foram comparados entre si e não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

---

Como apresentado na tabela 3, o diâmetro médio das NCs brancas (sem fármaco) foi significativamente menor do que o das NCs contendo o fluconazol seja este radiomarcado ou não ( $p < 0,05$ ). O índice de polidispersão (IP) mostrou que apenas as NCs contendo o fluconazol não marcado apresentaram-se como um sistema monodisperso ( $IP < 0,3$ ), enquanto que as demais formulações foram consideradas como amostras homogêneas ( $IP \leq 0,7$ ). Os tamanhos das NCs convencionais e furtivas encontrados neste estudo estão de acordo com dados da literatura que mostram que as nanocápsulas geralmente apresentam diâmetro médio compreendido entre 200 e 300 nm (Couvreur *et al.*, 2002; Mosqueira *et al.*, 2006). Entretanto, Torchilin (2000) mostrou que em focos inflamatórios e infecciosos, nanopartículas com tamanhos entre 10 e 500 nm são capazes de extravasarem e acumularem no espaço intersticial. Portanto, as NCs produzidas no presente trabalho (236 a 356 nm) apresentaram tamanho adequado para serem captadas em tais sítios, constituindo em importantes vetores para a liberação direcionada do fluconazol.

O potencial zeta das NCs furtivas, com exceção daquelas contendo fluconazol não marcado, apresentou-se significativamente menor, em valor absoluto, quando comparado ao valor encontrado para as NCs convencionais. Na literatura, existem trabalhos mostrando que as nanopartículas pegladas apresentam valores absolutos de potencial  $\zeta$  menores do que aqueles descritos para nanopartículas convencionais (Fresta *et al.*, 2001; Mosqueira *et al.*, 2001b; Ameller *et al.*, 2004, Faria *et al.*, 2005). De acordo com Mosqueira *et al.* (2001b), a presença de cadeias de PEG ligadas à superfície da partícula juntamente com a camada de hidratação que as envolve possivelmente mascara as cargas presentes na interface da partícula, reduzindo, assim os valores do potencial zeta. Embora as NCs PLA-PEG tenham apresentado redução no potencial zeta, os valores absolutos ainda são altos quando comparados com potenciais zeta de nanoesferas PLA-PEG (Gref *et al.*, 1994). Isto pode ser explicado pela presença de lecitina na formulação das nanocápsulas que contribui para a manutenção de cargas negativas mais altas na superfície da partícula (Mosqueira *et al.* 2001b; Mosqueira *et al.*, 2006). Entretanto, estudos *in vivo* mostraram que as cadeias de PEG, na mesma quantidade utilizada neste trabalho, foram capazes de aumentar oito vezes a área sobre a curva obtida em plasma de camundongos (Mosqueira *et al.*



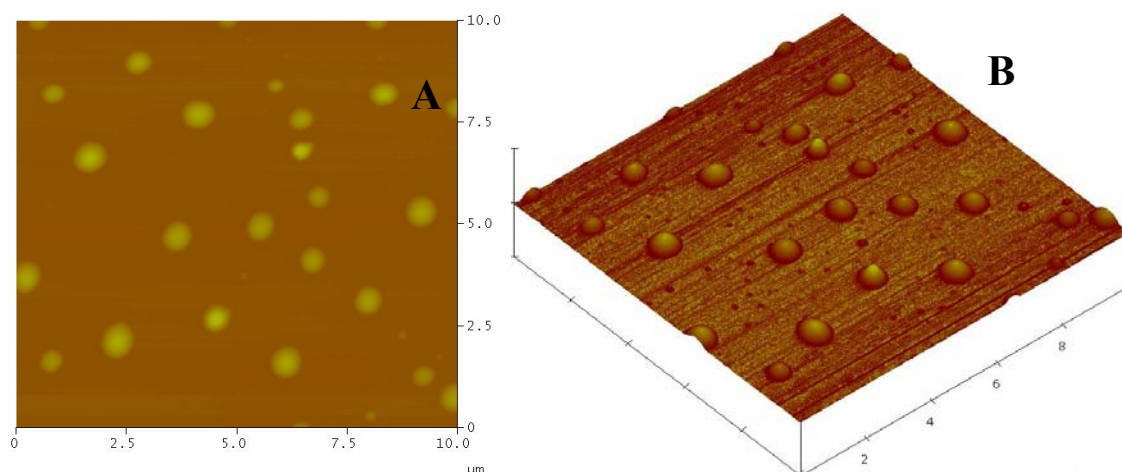
2001b). Os valores negativos do potencial  $\zeta$  das NCs são atribuídos principalmente aos grupos carboxila presentes na estrutura do PLA os quais se dissociam no meio dispersante e também aos fosfolipídios utilizados. Portanto, os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos descritos na literatura.

Quando se compara o tamanho e o potencial zeta das NCs convencionais contendo o fluconazol marcado e não marcado observa-se que não existem diferenças significativas. Para as NCs furtivas, este resultado também foi observado (Tabela 3). Estes dados sugerem que a presença do elemento radioativo ( $^{99m}\text{Tc}$ ) não altera as propriedades físico-químicas (tamanho e potencial zeta) das nanocápsulas contendo o fármaco.

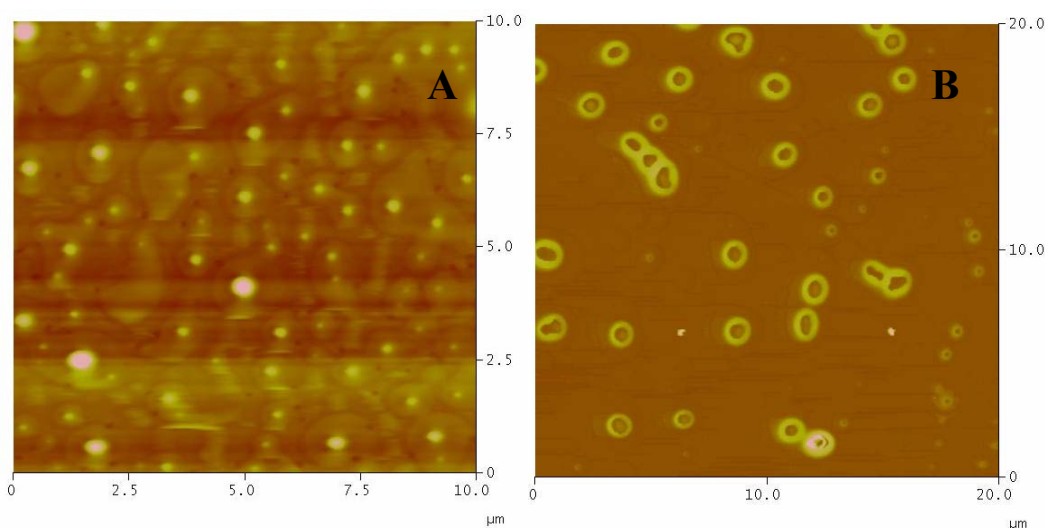
## **6. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA**

A análise morfológica das NCs foi realizada por microscopia de força atômica (MFA). Foram analisadas formulações de NCs convencionais e furtivas, brancas e contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol.

As NCs brancas PLA-POLOX e PLA-PEG apresentaram morfologias semelhantes, com formatos regulares e esféricos, como pode ser observado nas figuras 9 e 10. Porém, nas NCs PLA-PEG foi observado um halo ao redor das estruturas (figura 10) que possivelmente representa uma camada de hidratação proporcionada pelas cadeias de PEG. Estas cadeias são bastante hidrofílicas devido à presença de grupos polares como hidroxilas que formam ligações de hidrogênio com a água, promovendo a hidratação da superfície das NCs.



**FIGURA 9** – *Imagens de NCs PLA-POLOX. Em (A) vista do topo e em (B) visão tridimensional das partículas.*

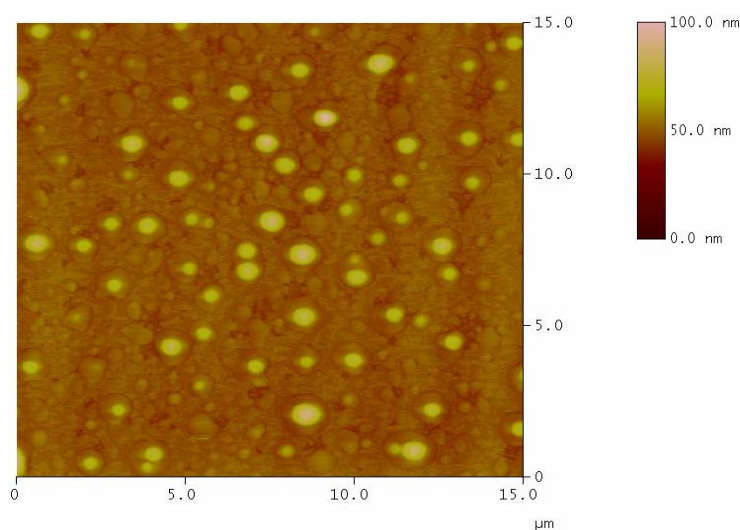


**FIGURA 10** – *Imagens de NCs PLA-PEG, com visualização do halo ao redor das partículas. Em (A) imagem topográfica e em (B) imagem de fase.*

As NCs brancas, PLA-POLOX, apresentaram diâmetro médio de  $411 \pm 128$  nm, enquanto que nas NCs brancas PLA-PEG, o diâmetro médio encontrado foi de  $238 \pm 124$  nm. De acordo com estes resultados, observa-se que na MFA há uma maior variação de tamanho das NCs em comparação com os valores encontrados por ECF (tabela 3), conforme avaliado pelo desvio padrão das medidas. Esta diferença pode ser atribuída a vários fatores, entre eles a agregação ou achatamento das NCs quando depositadas sobre a superfície da mica, dando origem à populações heterogêneas de partículas. Além disso, o processo de secagem das amostras com jato de argônio leva a

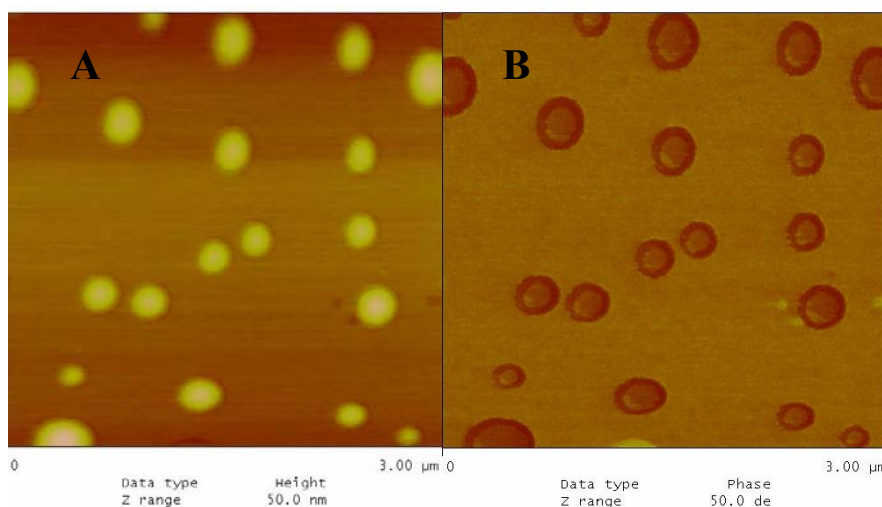
uma alteração das “condições naturais” das partículas, resultando num possível fenômeno de agregação.

Experimentos realizados com nanocápsulas contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol mostraram que a associação do fármaco não altera a estrutura arredondada das partículas (figuras 11 e 12) e não foi observada diferença significativa de tamanho em relação às nanocápsulas brancas. Entretanto, no resultado apresentado pela técnica de ECF mostrou-se que a incorporação do fármaco levou ao aumento do tamanho da partícula (tabela 3) o que pode indicar que há associação do fármaco com a nanocápsula também por adsorção superficial. As diferenças de tamanho entre as NCs, contendo ou não o fármaco, provavelmente não são tão evidentes por MFA devido ao fenômeno de achatamento sobre a mica que aumenta a variação de tamanho das mesmas. O diâmetro médio obtido por MFA foi de  $298 \pm 151$  nm para as NCs convencionais contendo o fármaco e de  $264 \pm 95$  nm para as NCs furtivas contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol.



**FIGURA 11** – Imagem topográfica de NCs PLA-POLOX- $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol

As NCs furtivas contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol apresentaram um halo ao redor das partículas (figura 12) como foi visualizado nas NCs furtivas sem o fármaco (figura 10). A presença de textura diferenciada entre a estrutura das NCs PLA-POLOX e PLA-PEG nas imagens de fase pode indicar a presença de camada superficial distinta nos dois tipos de NCs.



**FIGURA 12** – Imagens de NCs PLA-PEG-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol. Em (A) imagem topográfica e em (B) imagem de contraste de fase.

A relação diâmetro/altura das partículas foi determinada e comparada com as medidas realizadas após a fixação das amostras na mica, utilizando glutaraldeído 25%. Estes dados encontram-se relacionados na tabela 4.

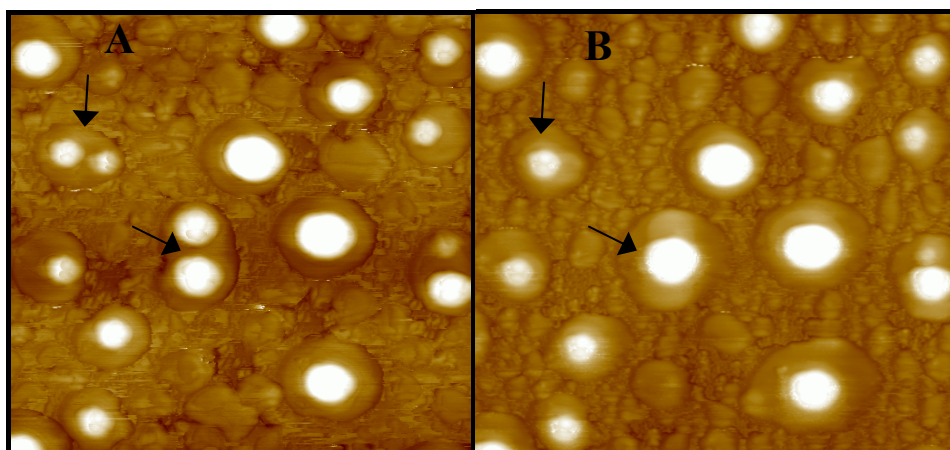
**Tabela 4** - Relação diâmetro/ altura das nanocápsulas medidas por MFA

Formulações de Nanocápsulas	Relação diâmetro/altura $\pm$ DP <sup>b</sup>
NCs PLA-POLOX	11,1 $\pm$ 1,1
NCs PLA-PEG	11,0 $\pm$ 2,6
NCs PLA-POLOX- <sup>99m</sup> Tc-Fluconazol	16,6 $\pm$ 3,6
NCs PLA-PEG- <sup>99m</sup> Tc-Fluconazol	15,4 $\pm$ 3,0
NCs PLA-POLOX- <sup>99m</sup> Tc-Fluconazol <sup>a</sup>	2,2 $\pm$ 0,6
NCs PLA-PEG- <sup>99m</sup> Tc-Fluconazol <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 1,6

<sup>a</sup> Formulações fixadas com glutaraldeído 25%, na superfície da mica; <sup>b</sup> desvio padrão de n = 40 medidas.

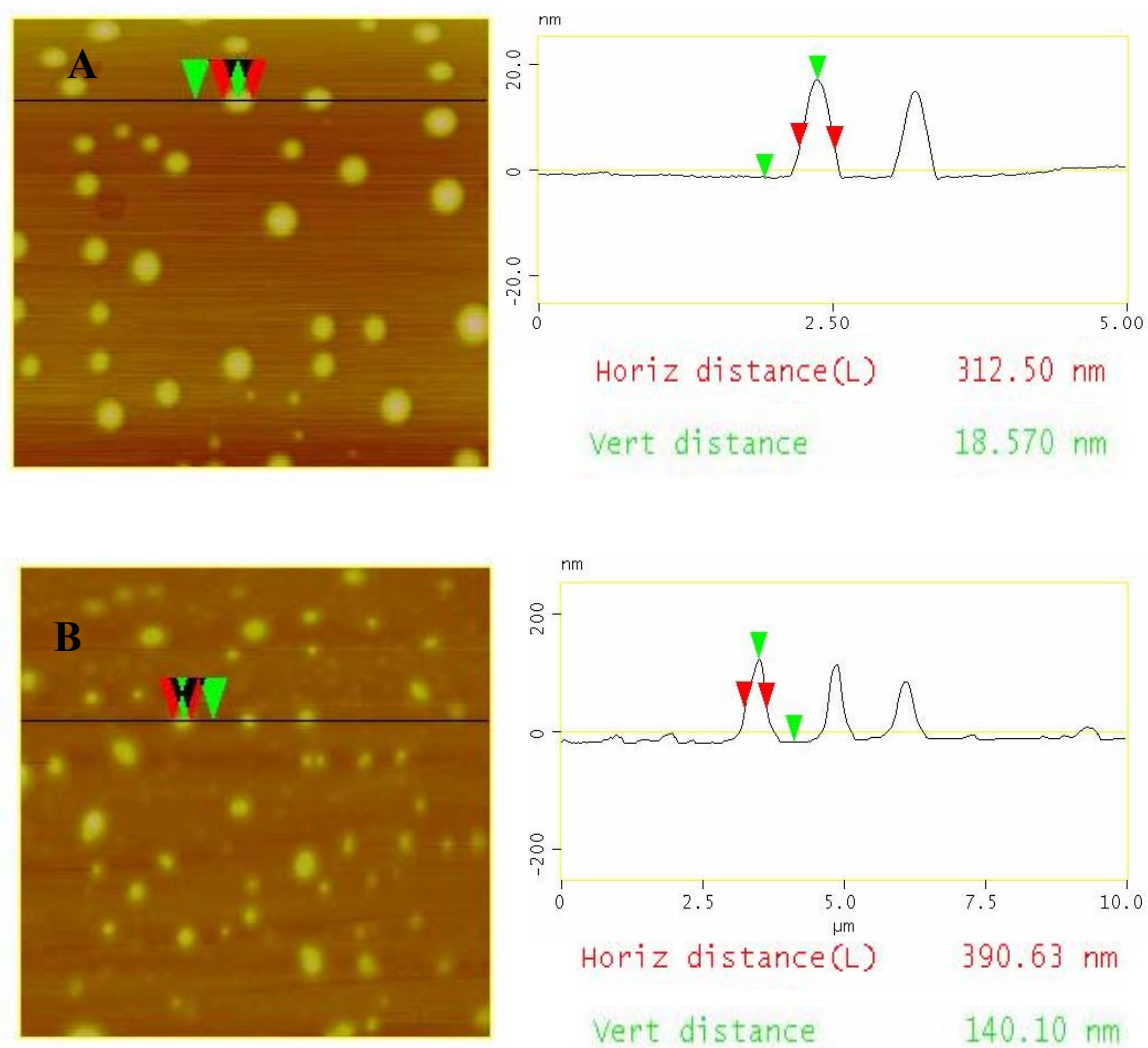
De acordo com a tabela 4, a relação diâmetro/altura obtida para as NCs sugere a existência de formas mais achatadas ou partículas em forma de disco, provavelmente devido à estrutura interna das NCs ser preenchida de óleo e envolvida por uma membrana polimérica flexível. Montasser *et al.* (2002)

demonstraram uma relação diâmetro/altura de 12 para as nanocápsulas preparadas com um co-polímero, dicloroftaloil-co-dietilenotriamina. Leite *et al.* (2005) demonstraram uma relação de aproximadamente 10 para NCs de poli- $\epsilon$ -caprolactona. Estes dados sugerem que os resultados encontrados para as NCs brancas encontram-se em acordo com esses autores. As NCs contendo o fármaco, convencionais e furtivas, apresentaram uma relação diâmetro/altura aumentada, em comparação às NCs brancas, indicando estruturas mais achatadas. Essas NCs foram observadas 24 e 48 horas após a deposição da amostra na superfície da mica, como demonstrado pela figura 13. Observa-se que o contato das nanocápsulas com a superfície da mica leva à agregação e fusão das partículas, dando origem a partículas de tamanho maior. Este fenômeno é diretamente dependente do tempo de contato da amostra com a mica, sendo que em tempos prolongados pode haver alteração significativa das medidas de tamanho das nanocápsulas. Além disso, observa-se na figura 13, a presença de uma camada em volta das NCs PLA-POLOX-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol cuja relação diâmetro/altura apresenta-se bastante aumentada (aproximadamente 20), sugerindo que essa camada pode representar o conteúdo oleoso da NC, liberado após 24 e 48 horas da deposição da amostra na superfície da mica, fazendo com que a partícula torne-se bastante achatada. Há também a possibilidade de gelificação do conteúdo após maior tempo de deposição da amostra, o que induziria a maior organização dos tensoativos com a formação dessas camadas de textura diferenciada ao redor das NCs. Essas alterações que acontecem em função do tempo também podem contribuir para uma maior variação de tamanho das NCs e de valores da razão diâmetro/altura.



**FIGURA 13** – NCs PLA-POLOX-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol 24 horas (A) e 48 horas (B) após a deposição da amostra na superfície da mica. As setas em negrito mostram áreas de agregação de nanocápsulas.

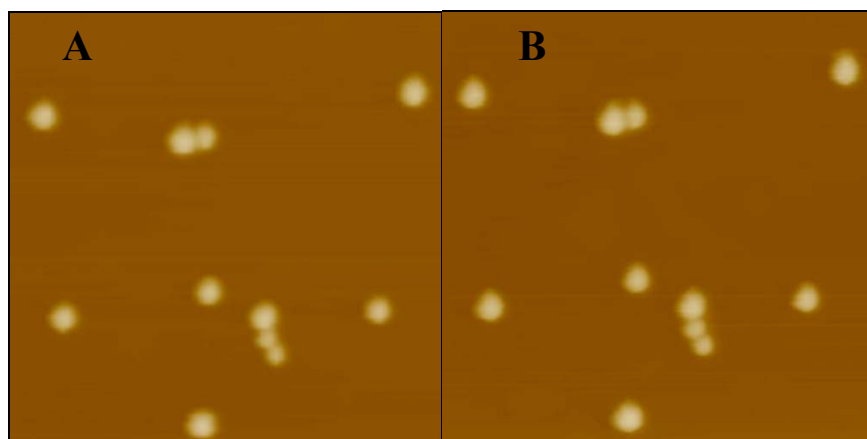
As NCs convencionais e furtivas contendo <sup>99m</sup>Tc-fluconazol, quando fixadas com glutaraldeído 25% na superfície da mica, apresentaram uma redução significativa da relação diâmetro/altura, indicando que o enrijecimento da parede da NC provocado pela reticulação do glutaraldeído contribui para uma maior fixação das NCs sobre a mica e para o endurecimento da parede das NCs, o que reduz a possibilidade de achatamento, mantendo uma estrutura mais arredondada. A figura 14 mostra a relação diâmetro/ altura de nanocápsulas, sem e com a fixação pelo glutaraldeído, respectivamente.



**FIGURA 14** - *Imagens topográficas de NCs PLA-PEG-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol, apresentando a relação diâmetro/altura das partículas. Em (A) NCs sem a fixação pelo glutaraldeído e em (B) NCs fixadas pelo glutaraldeído.*

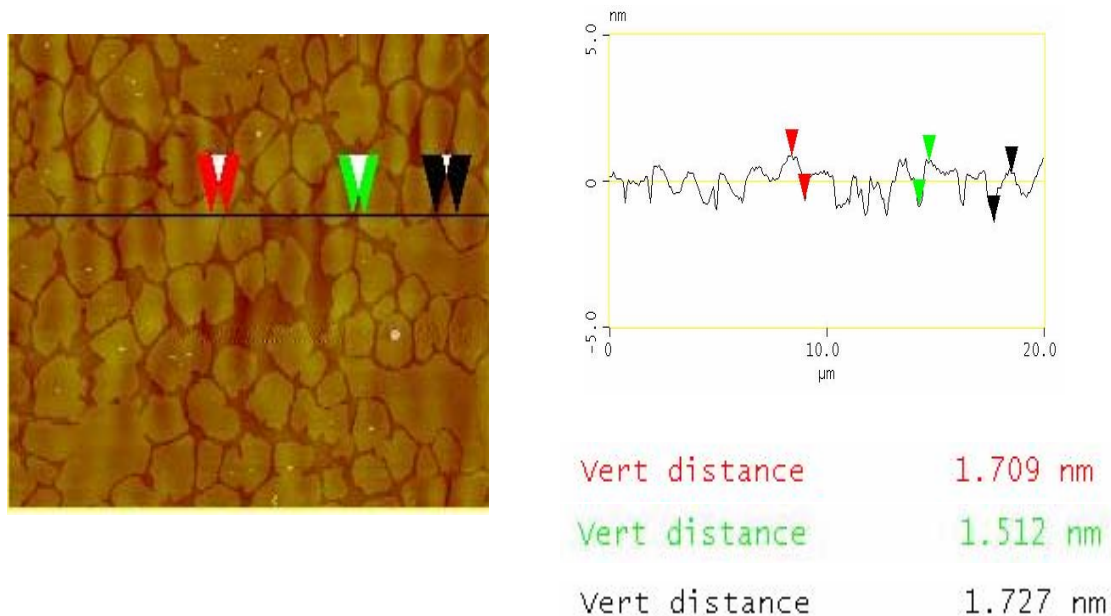
Observou-se ainda que as NCs fixadas com glutaraldeído, não se fundem entre si, mesmo após 48 horas da deposição da amostra sobre a mica. (figura 15). De acordo com estas observações, sugere-se que o glutaraldeído é capaz de reduzir o processo de achatamento das nanocápsulas pelo endurecimento da parede destas, mantendo intacta a forma das partículas.





**FIGURA 15** – *Imagens topográficas de NCs PLA-POLOX-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol fixadas pelo glutaraldeído, 24 horas (A) e 48 horas (B) após a deposição da amostra sobre a mica.*

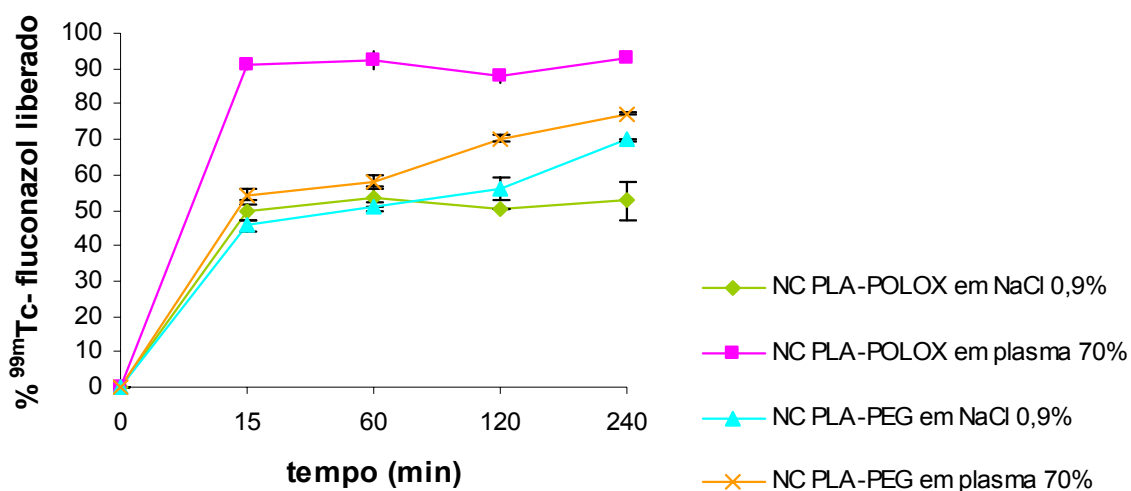
Diante dos resultados apresentados, observa-se que a fixação das NCs pelo glutaraldeído pode ser considerada um método importante para a obtenção de informações relativas à morfologia e estrutura das partículas por MFA. As imagens obtidas após o processo de fixação fornecem resultados mais próximos dos valores reais, uma vez que as alterações das partículas decorrentes das interações com a superfície da mica são significativamente minimizadas.



**FIGURA 16** - *Imagem topográfica de glutaraldeído, mostrando camadas com altura entre 1.5 e 1.7 nm.*



## 7. ESTUDO DE LIBERAÇÃO DO $^{99m}\text{Tc}$ -FLUCONAZOL



**FIGURA 17** – Cinética de liberação *in vitro* do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol de NCs PLA-POLOX e NCs PLA-PEG a 37°C, em NaCl 0,9% e plasma de camundongo a 70%.

De acordo com a figura 17 observa-se uma liberação rápida, nos 15 minutos iniciais, de aproximadamente 90% do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol a partir das NCs PLA-POLOX, em plasma 70%. A partir deste ponto, pode-se observar uma estabilização da liberação do fármaco. O perfil de liberação desta formulação em NaCl 0,9% foi semelhante, porém uma quantidade significativamente menor do fármaco foi liberada para o meio, sendo esta diferença observada em todos os tempos estudados ( $p < 0,05$ ). Observa-se também pela figura 17 que as NCs PLA-PEG apresentaram um perfil de liberação, em plasma 70%, caracterizado por uma liberação inicial de aproximadamente 50% do fármaco, seguido por um aumento gradativo da sua liberação, atingindo aproximadamente 75% após 240 minutos da incubação com o meio. Em NaCl 0,9%, a liberação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol a partir das NCs furtivas também foi significativamente menor em comparação à liberação em plasma 70%, para todos os tempos estudados ( $p < 0,05$ ), mostrando também um perfil de liberação controlada do fármaco.

Para todas as formulações investigadas observou-se maior liberação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nos primeiros 15 minutos. Isto, provavelmente deveu-se ao fármaco que se encontrava adsorvido à superfície das nanocápsulas. De

---

acordo com Shaffazick *et al.* (2003), a rápida liberação inicial dos fármacos segue uma cinética de primeira ordem que poderia ser atribuída à adsorção de destes à superfície das nanocápsulas. De forma semelhante, Mosqueira *et al.* (2006) sugeriram que a rápida liberação inicial (“efeito burst”) do halofantrino a partir de NCs convencionais e furtivas, foi devida ao fármaco adsorvido à superfície das partículas. Calvo *et al.* (1996) sugeriram que a parede polimérica das NCs não influencia o processo de liberação, sendo este afetado somente pela partição do fármaco entre as gotículas de óleo e o meio aquoso externo, que seria o passo limitante do processo de liberação. Portanto, de acordo com a figura 17, a fase que se segue à liberação rápida do fármaco corresponde à liberação do fármaco efetivamente encapsulado, sendo esta fase caracterizada por uma liberação lenta. Após os 15 minutos iniciais, para as NCs PLA-POLOX, observou-se um platô caracterizando uma cinética de liberação de ordem zero, ou seja, a liberação do fármaco praticamente não variou entre 15 a 240 minutos. As NCs PLA-PEG mostraram um perfil um pouco diferenciado, tanto em plasma 70% quanto em NaCl 0,9%, sendo que a liberação do fármaco aumentou gradativamente ao longo do tempo, porém de uma forma lenta, caracterizando um sistema de liberação controlada do fármaco encapsulado. Neste experimento não foi observada a liberação completa do fármaco a partir de NCs convencionais ou furtivas, devido ao curto intervalo de tempo avaliado.

Outro aspecto importante que também deve ser considerado é que a liberação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol, quando se utilizou o plasma como meio, foi maior tanto para as nanocápsulas convencionais (PLA-POLOX) quanto para as furtivas (PLA-PEG) quando comparado com a salina. Estudos anteriores mostraram que a capacidade de ligação às proteínas plasmáticas contribui de forma significativa na liberação de fármacos de nanossistemas. Ammoury *et al.* (1990) demonstraram que a inclusão de albumina no meio de liberação aumentou a liberação de indometacina de NCs PLA. Mosqueira *et al.* (2006) observaram que a liberação do halofantrino de NCs PLA-POLOX em PBS contendo 5% de plasma humano foi 80% maior que a liberação em PBS contendo Tween ® 80, indicando que a alta ligação às proteínas plasmáticas deste fármaco (83%) foi o fator responsável pelo maior percentual de liberação. O fluconazol liga-se 11 a 12% às proteínas plasmáticas podendo

---

assim, alterar o coeficiente de partição do fármaco em favor do meio externo, levando a um maior percentual de liberação no meio plasmático.

Pode-se observar também que o percentual de liberação, no plasma, do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol pelas NCs PLA-POLOX foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o observado pelas NCs PLA-PEG, em todos os tempos investigados. O menor percentual de liberação do fármaco das NCs furtivas, em meio plasmático, pode ser explicado pela presença de cadeias de PEG ligadas covalentemente à superfície da NC, reduzindo a ligação das partículas às proteínas plasmáticas (Gref *et al.*, 1995) e consequentemente, reduzindo a transferência do fármaco às estas proteínas. Por outro lado, a presença do poloxamer 188 nas NCs convencionais (PLA-POLOX) pode também ter contribuído para a liberação rápida do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol. Em um estudo desenvolvido por Mosqueira *et al.* (2006) foi observado que quando o poloxamer 188 foi adicionado ao meio contendo plasma, a liberação do halofantrino das NCs PLA-PEG foi rápida e completa, sugerindo que este tensoativo poderia aumentar a quantidade de fármaco liberado.

Em NaCl 0,9%, não foi observada diferença no percentual de liberação do fármaco das duas formulações estudadas, nos tempos de 15, 60 e 120 minutos após incubação ( $p > 0,05$ ). Neste meio, a presença de PEG na superfície das NCs parece não influenciar a liberação do fármaco. Este resultado está de acordo com alguns trabalhos que mostraram a obtenção de perfis similares de liberação de fármacos de nanossistemas convencionais e furtivos, em meios não plasmáticos (Gref *et al.*, 2001, Mosqueira *et al.*, 2006).

## **8. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NA CONTAGEM GLOBAL DE LEUCÓCITOS**

Com o objetivo de desenvolver o foco infeccioso de *Candida albicans*, inicialmente, os animais foram submetidos a uma dose de 6 Gy de radiação gama para imunossupressão. A definição da dose de radiação utilizada teve como parâmetros alguns trabalhos descritos na literatura (Sieck *et al.*, 1993, Sechler *et al.*, 1999, Spindler *et al.*, 2001). Esta dose está bem abaixo da  $DL_{50}$  que é aproximadamente 10 Gy, de acordo dados da Animal Care and Use

Committee (Berkeley, 2006). O leucograma dos animais foi realizado 24 horas após a exposição à radiação. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5** - Contagem global de leucócitos e percentual de linfócitos e neutrófilos em camundongos Swiss

<b>Grupo</b>	<b>Contagem global de leucócitos ± DP*</b>	<b>% Linfócitos ± DP*</b>	<b>% Neutrófilos segmentados ± DP*</b>
CONTROLE	2038 ± 400	84,67 ± 4,97	14,33 ± 5,36
IRRADIADO	1420 ± 349*	60,69 ± 11,20*	38,15 ± 10,56*

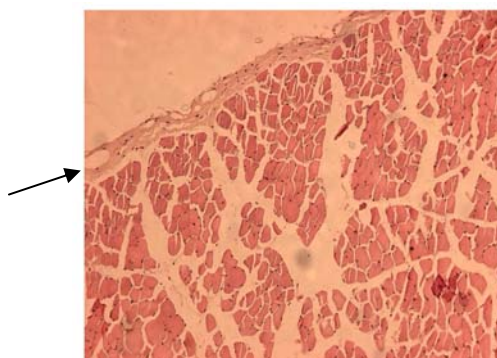
\* Desvio padrão de n=8 camundongos por grupo; \*\* valores obtidos 24 horas após a irradiação dos animais com radiação gama.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, observa-se que houve uma diminuição significativa na contagem global de leucócitos do grupo irradiado em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Além disso, houve uma alteração da contagem diferencial de leucócitos, com diminuição do percentual de linfócitos e um aumento do percentual de neutrófilos segmentados, sendo esta diferença de aproximadamente 24%. Esta alteração é decorrente da maior radiosensibilidade dos linfócitos que são as primeiras células a desaparecerem da circulação (Trowell, 1952). Deste modo, a eliminação dos linfócitos leva ao aumento proporcional do percentual de neutrófilos segmentados. Conforme os resultados apresentados na tabela 5, o processo de imunossupressão dos animais foi considerado satisfatório, portanto, a infecção dos camundongos com *C. albicans* foi realizada 24 horas após a irradiação dos animais com 6 Gy de radiação gama.

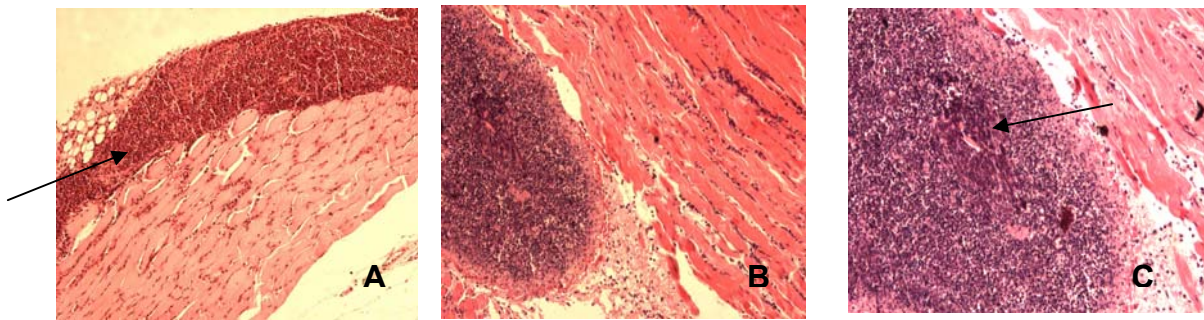
## 9. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE *CANDIDA ALBICANS* NO DESENVOLVIMENTO DO FOCO INFECCIOSO

De acordo com os estudos histológicos dos cortes de tecido muscular (figuras 18 e 19), observou-se que o foco infeccioso obtido com a concentração de  $10^8$  UFC/mL de *C. albicans*, após 48 horas da inoculação, apresentou um

infiltrado inflamatório de PMNs mais intenso, quando comparado ao foco infeccioso obtido com a concentração de  $10^6$  UFC/mL, 24 horas após a inoculação do fungo. Além disso, observou-se a presença de microabscessos (figura 19 C) e edema mais pronunciado (figura 20), quando a maior concentração do microrganismo foi utilizada. Outro aspecto importante que deve ser mencionado é o tempo transcorrido, após a inoculação do fungo, como fator determinante na intensidade da resposta inflamatória. Ruiz-Cabello *et al.* (1999) trabalhando com o mesmo modelo utilizado neste trabalho, injetando  $10^8$  UFC de *C. albicans* no músculo da coxa de camundongos, relataram que, nas primeiras horas (4 a 9 h) após a inoculação do fungo, já se observava a presença de processo inflamatório. Observaram que a extensão da área afetada aumentou progressivamente durante a fase aguda da infecção (0 a 72 horas) e que, 72 horas após a inoculação do fungo, havia um processo inflamatório mais intenso, caracterizado por regiões de necrose, presença de hifas de *C. albicans* e a presença abundante de neutrófilos e macrófagos.



**FIGURA 18** – Corte histológico de tecido muscular da coxa de camundongo não infectado (controle). Presença de tecido gorduroso e pequenos focos de tecido fibroso, com presença de perímio (seta).



**FIGURA 19** – Cortes histológicas do músculo da coxa de camundongos. (A) tecido muscular infectado com suspensão contendo  $10^6$  UFC/mL de *C. albicans*, após 24 horas, mostrando intenso infiltrado inflamatório de PMNs no perimísio (seta) e focos de infiltrado inflamatório no tecido muscular; B) tecido muscular infectado com suspensão contendo  $10^8$  UFC/ml de *C. albicans*, após 48 horas, mostrando intenso infiltrado inflamatório de PMNs no perimísio e tecido muscular, presença de áreas de formação de microabscesso, visto em maior aumento em C) (seta).

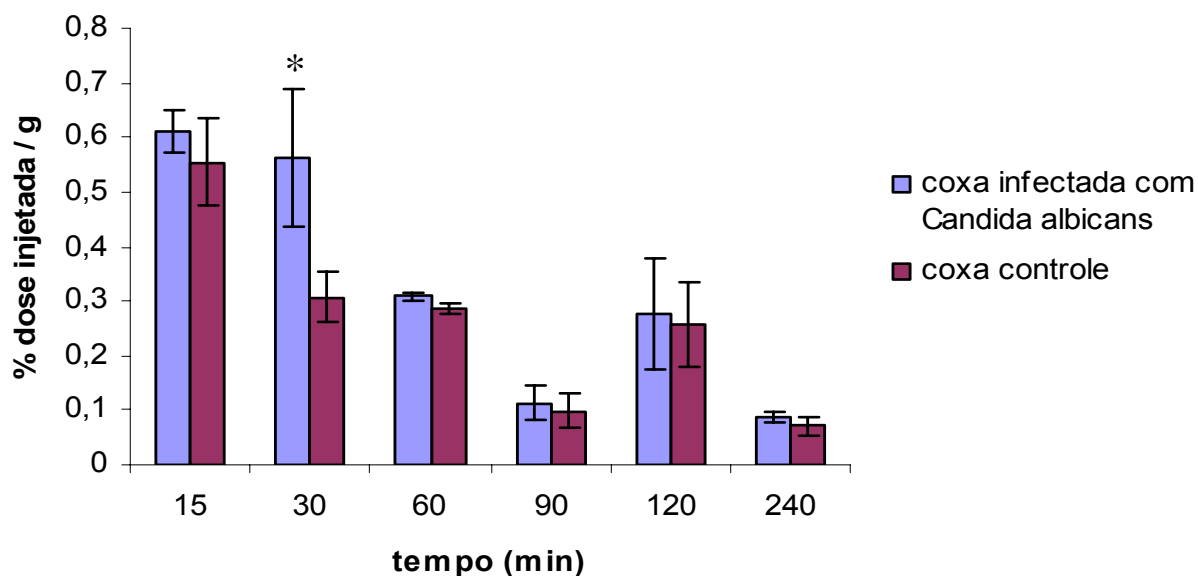


**FIGURA 20** – Camundongo infectado com suspensão de *C. albicans* contendo  $10^8$  UFC/mL no músculo da coxa direita. A seta indica o foco infeccioso, 48 após a infecção, mostrando área edemaciada.

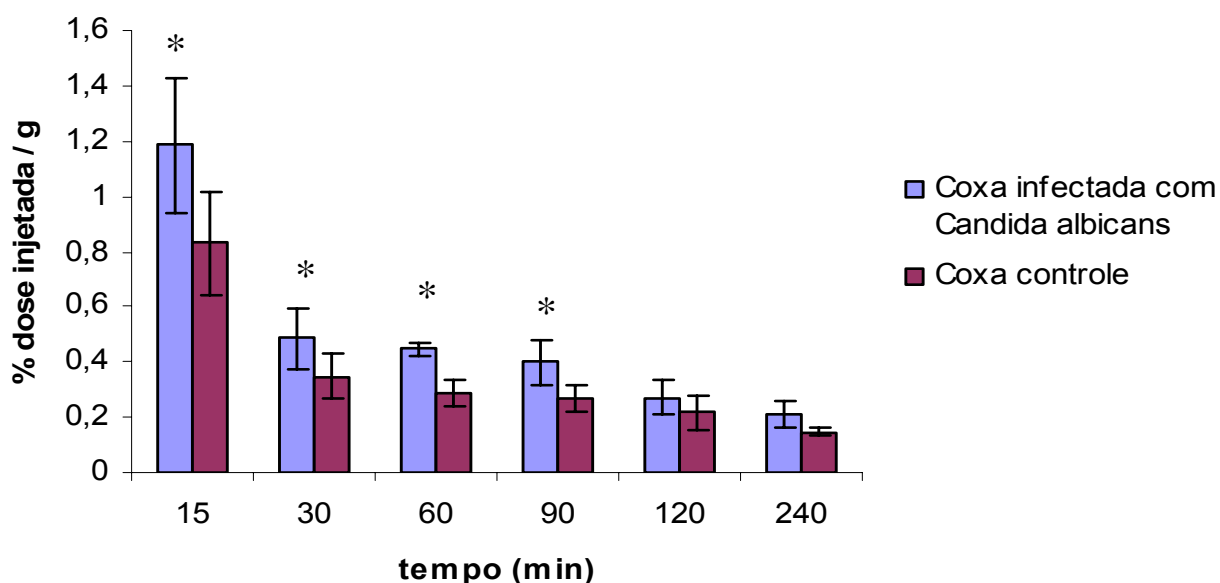
---

A figura 21 mostra que o foco infeccioso induzido pela concentração de  $10^6$  UFC/mL de *C. albicans*, após 24 horas, apresentou uma captação significativamente maior do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em relação à coxa controle somente no tempo de 30 minutos após a injeção do fármaco ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, no foco infeccioso induzido pela concentração de  $10^8$  UFC/mL do fungo, após 48 horas, observou-se uma maior captação do fármaco radiomarcado nos tempos de 15 a 90 minutos após a injeção ( $p < 0,05$ ) (Figura 22). Desta forma, pode-se afirmar que a concentração de  $10^8$  UFC/mL promove um processo inflamatório mais intenso em relação ao foco obtido com  $10^6$  UFC/mL. Nestas condições, a presença de maior fluxo sanguíneo permite o acesso de maior concentração do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol no local da infecção. Sabe-se pela literatura que o mecanismo de ação do fluconazol baseia-se na sua capacidade de inibir a enzima lanosterol  $14\alpha$ -demetilase, um citocromo P-450 da *Candida*, envolvido na biossíntese do ergosterol (Bennet, 1996). Portanto, a maior concentração do fungo provavelmente disponibiliza maior número de sítios de ação para o fármaco, facilitando maior captação e retenção prolongada do mesmo conforme observado na figura 22. Segundo Lupetti *et al.* (2002), este seria o principal mecanismo responsável pela maior captação e permanência do fluconazol no sítio infectado pela *C. albicans*. Estes autores trabalhando com  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol mostraram que este não apresentou captação significativa em sítio inflamatório estéril e em sítio infeccioso bacteriano, confirmando a especificidade do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol para a *C. albicans*.

Diante dos resultados encontrados nas análises histológicas e nos estudos de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol pelo foco infeccioso induzido pela *Candida albicans*, escolheu-se trabalhar com o modelo de infecção de 48 horas para a realização dos estudos de biodistribuição do fluconazol livre e encapsulado em nanocápsulas.



**FIGURA 21** – Captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nas coxas infectadas com suspensão contendo  $10^6$  UFC/mL de *C. albicans* e nas coxas controles, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos ( $n = 4$ ); \* $p < 0,05$ .



**FIGURA 22** - Captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol nas coxas infectadas com suspensão contendo  $10^8$  UFC/mL de *C. albicans* e nas coxas controles, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos ( $n = 4$ ); \* $p < 0,05$ .



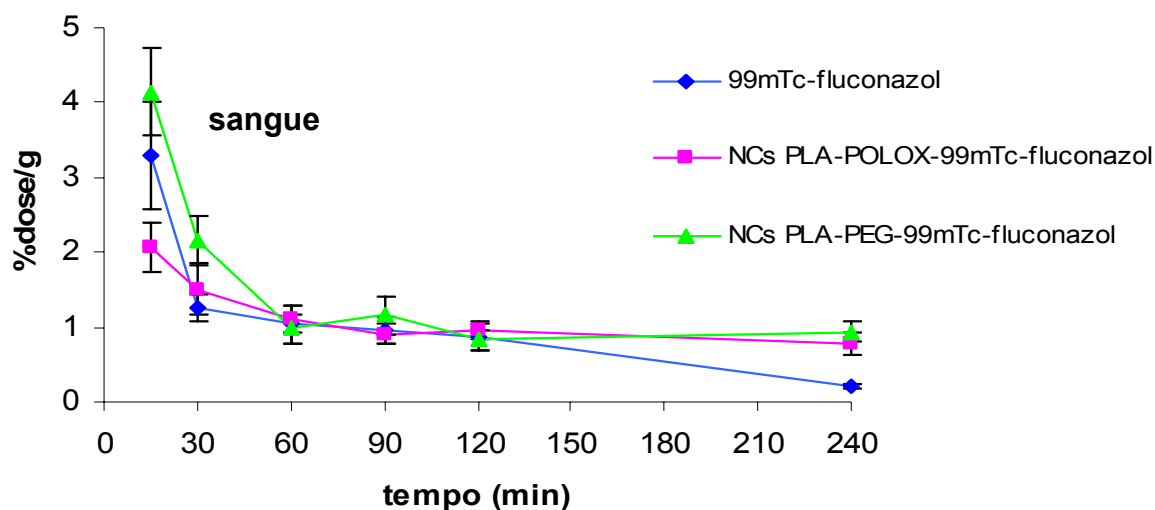
---

## 10. ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO

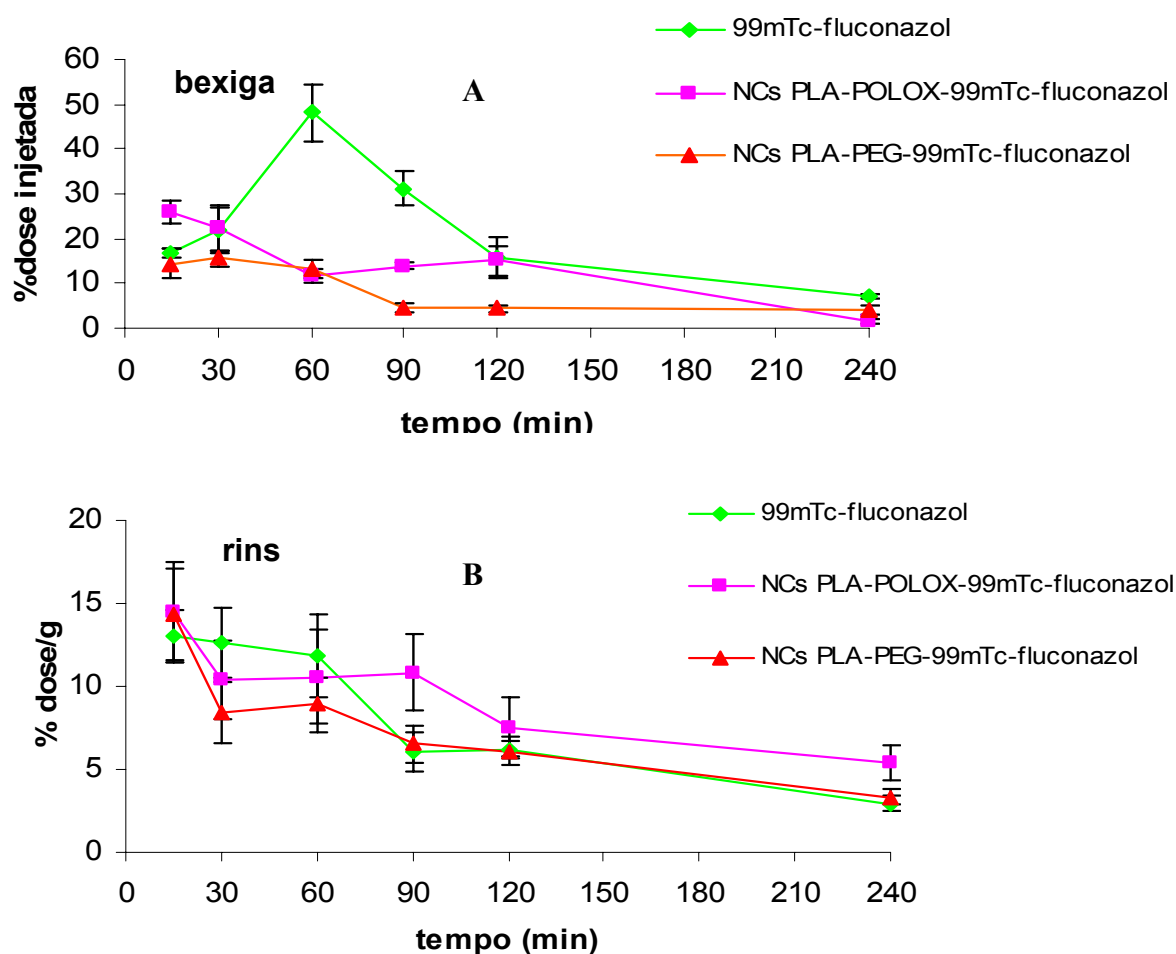
Observa-se pela figura 23 que nos tempos de 15 e 30 minutos após a injeção, a concentração das NCs PLA-PEG contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol no sangue foi significativamente maior que as concentrações do fármaco livre e encapsulado em NCs PLA-POLOX ( $p < 0,05$ ). Isto, provavelmente pode ser explicado pela redução da fagocitose destas nanoestruturas pelo SMF devido à presença das cadeias de PEG que reduzem o processo de opsonização pelas proteínas do plasma (Mosqueira *et al.*, 2001a), contribuindo para níveis mais altos no sangue.

Os níveis sanguíneos reduzidos de nanocápsulas convencionais observados entre 15 e 30 minutos encontram-se respaldados pela literatura. Mosqueira *et al.* (2001) mostraram que as nanocápsulas PLA-POLOX são rapidamente fagocitadas, 5 min após a injeção intravenosa, pelas células do sistema monocítico fagocitário propiciando níveis reduzidos destas no plasma.

Após 30 minutos, observou-se um período de manutenção dos níveis de radioatividade sanguínea referentes às do fármaco encapsulado em NCs convencionais e furtivas, compreendido entre 60 a 240 minutos. O mesmo não ocorreu com o fármaco livre ( $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol), já que após 120 minutos observou-se uma queda acentuada destes níveis. Observou-se também que, transcorridos 240 minutos da injeção, praticamente não havia na circulação a presença do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol, ao contrário do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol encapsulado em nanocápsulas, convencionais ou furtivas ( $p < 0,05$ ) que permanecem circulando em pequena quantidade, mesmo após tempos mais longos. Este resultado sugere que estes sistemas podem funcionar como um reservatório do fármaco, liberando-o lentamente para atingir o foco infeccioso.

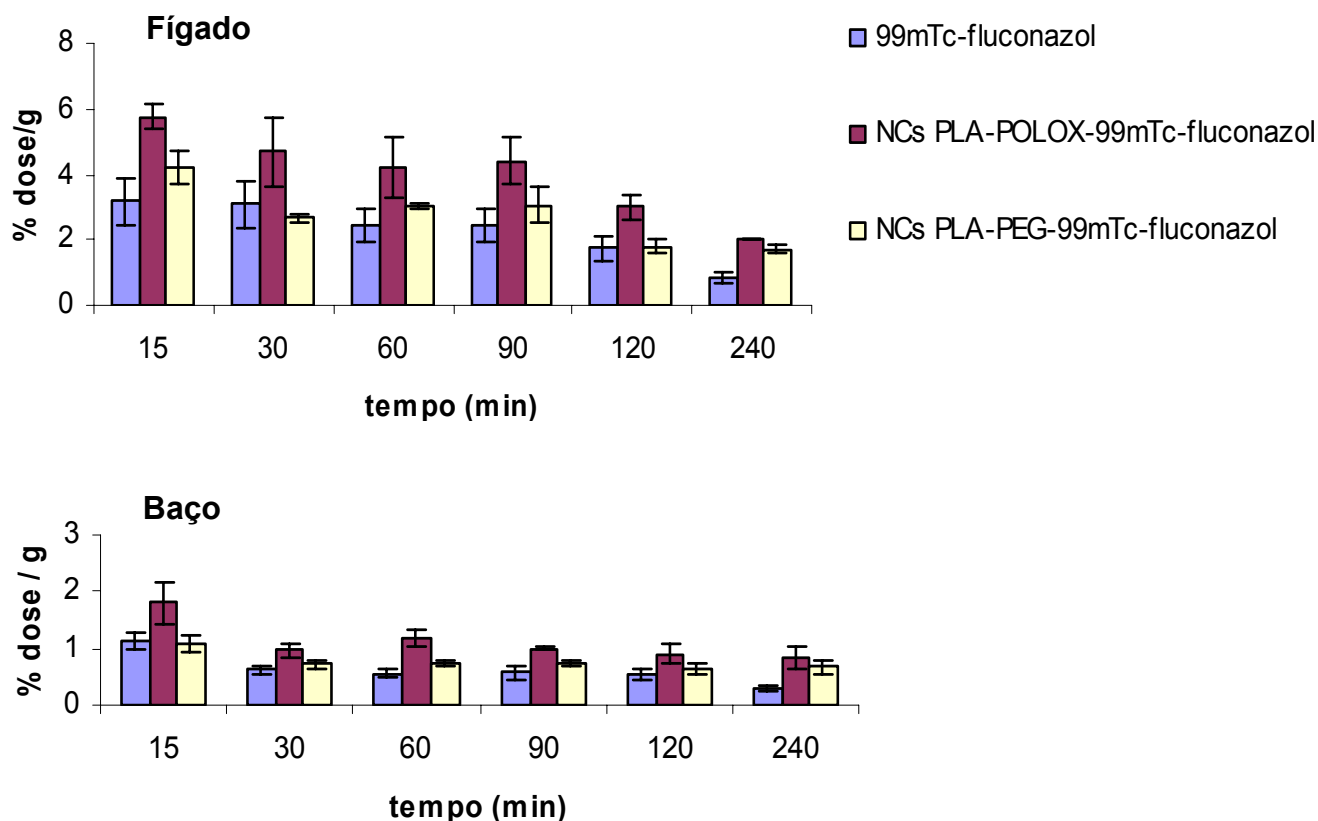


**FIGURA 23** – Percentual de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, no sangue, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos ( $n = 5$  por grupo).



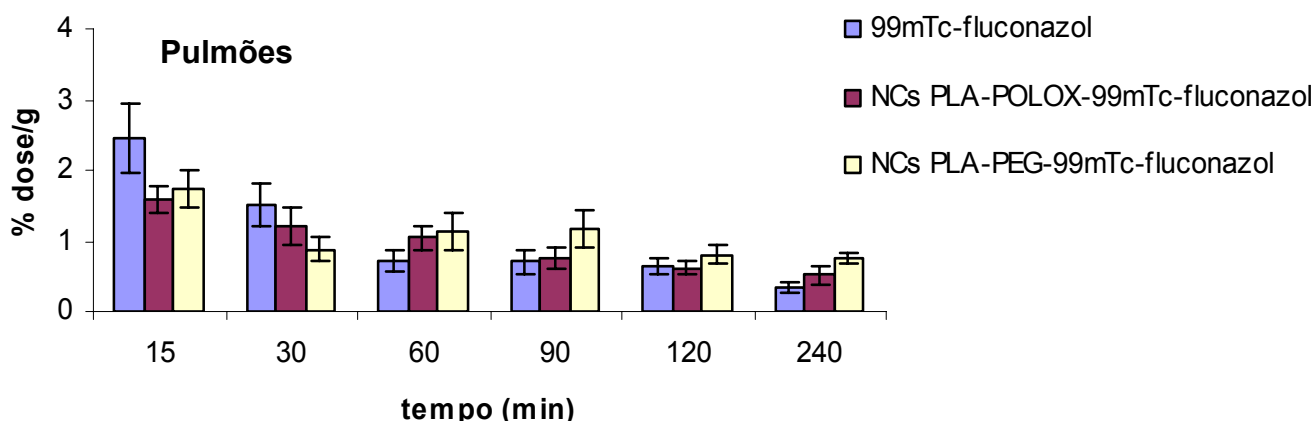
**FIGURA 24** – Percentual de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, na bexiga e nos rins, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos ( $n = 5$  por grupo).

Os dados observados na figura 24 A corroboram para o alto nível de eliminação de  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol encontrado na bexiga 60 min após a injeção. Estes resultados sugerem rápida eliminação do fármaco pelo sistema urinário o que, aliás, está de acordo com o padrão farmacocinético do fluconazol cuja excreção renal é responsável por cerca de 90% da eliminação do fármaco (Bennet, 1996; Martin, 1999; Vensel, 2002). As NCs não são filtradas pelo glomérulo renal devido ao alto peso molecular que ultrapassa o limiar renal (aproximadamente 70.000 Da), portanto, a captação de radioatividade na bexiga referente a estas formulações é, na verdade, correspondente ao fármaco liberado destes nanocarreadores. Com relação às nanocápsulas PLA-POLOX, o nível mais baixo de radioatividade encontrado na bexiga (tempo de 60 e 90 minutos), quando comparado ao fármaco livre, pode ser explicado pela rápida fagocitose destas pelo SMF, propiciando reduzidos níveis sanguíneos e conseqüentemente, menor excreção pelo sistema urinário. Como mencionado anteriormente, Mosqueira et al. (2001) mostraram que 5 minutos após a injeção intravenosa, aproximadamente 40% das nanocápsulas PLA-POLOX já haviam sido fagocitadas pelas células do fígado e baço. De uma maneira geral, observou-se um nível mais baixo de excreção da radioatividade referente às NCs PLA PEG quando comparado com as outras formulações estudadas (figura 24 A e B). Os dados da literatura corroboram este fato, já que mostram que a presença do PEG permite maior estabilização das NCs diminuindo a taxa de liberação do fármaco encapsulado (Gref *et al.*, 1995). Isto foi verificado pelos estudos de liberação *in vitro* realizados neste trabalho. Portanto, deduz-se que menor quantidade de  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol liberado pelas NCs PLA PEG, resulta em menor excreção pela bexiga. Os dados da figura 24 B mostram maior captação de radioatividade pelos rins referente às NCs PLA POLOX, após 60 minutos da injeção, em relação ao fármaco livre ( $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol) e às NCs furtivas ( $p < 0,05$ ). Este resultado pode ser explicado pela liberação mais tardia das nanocápsulas convencionais já que estas se encontravam retidas, em maior nível, no sistema monocítico fagocitário nos tempos iniciais.



**FIGURA 25** – Percentual de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, no fígado e baço, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos ( $n = 5$  por grupo).

Os estudos de biodistribuição no fígado (Figura 25), com exceção do tempo de 240 minutos, mostraram que a captação das NCs PLA-POLOX contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol foi significativamente maior em todos os tempos estudados, quando comparado com as demais formulações ( $p < 0,05$ ). Um perfil de captação semelhante foi observado também para o baço (Figura 25). Entretanto, neste caso observou-se diferença estatisticamente significativa para todos os tempos investigados ( $p < 0,05$ ). Estes dados sugerem que as nanocápsulas furtivas, ou seja, contendo as cadeias de PEG foram menos captadas pelo sistema monocítico fagocitário, justificando maiores níveis sanguíneos ( $p < 0,05$ ) nos tempos iniciais (15 a 30 minutos) em relação ao  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol e  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol encapsulado em NCs PLA-POLOX, como mencionado anteriormente (figura 23). Os dados encontrados estão em conformidade com aqueles descritos na literatura (Mosqueira *et al.*, 2001a)



**FIGURA 26** – Percentual de captação do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, nos pulmões, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos (n = 5 por grupo).

O estudo de biodistribuição nos pulmões (figura 26) mostrou que inicialmente há uma captação mais alta do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol livre neste órgão, sendo que no tempo de 15 minutos, a captação do fármaco livre foi significativamente maior que a captação do fármaco encapsulado nos dois tipos de NCs (p<0,05). No tempo de 30 minutos a captação do fármaco livre foi maior em relação às NCs PLA-PEG-<sup>99m</sup>Tc-fluconazol (p<0,05). Segundo Juliano (1988), o pulmão apresenta entropia por partículas positivas, portanto, as NCs estudadas são pouco captadas nos primeiros minutos pelo fato de apresentarem potencial  $\zeta$  negativo. A partir do tempo de 90 minutos, observou-se que a captação das NCs furtivas foi significativamente maior em relação às demais formulações (p<0,05). Isto indica que devido ao maior tempo de circulação, estas NCs são captadas após tempos mais longos. A captação do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol livre mostrou-se significativamente mais baixa após 60 minutos da injeção, sugerindo excreção mais rápida do fármaco o que está de acordo com os resultados mostrados na figura 24.

Para avaliar a estabilidade *in vivo* do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol, determinou-se o percentual de radioatividade captada pela tireóide. O íon pertecnetato (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) tem afinidade pela tireóide por apresentar propriedades físico-químicas semelhantes ao íon iodeto que é metabolizado pela glândula. O <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> é um íon monovalente negativo, de peso molecular similar ao do

iodo, e desta forma, pode ser captado pela tireóide, utilizando o mesmo transportador do íon iodeto (Zuckier *et al.*, 2004). A tabela 6 mostra a radioatividade captada pela tireóide nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos após a injeção do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs PLA-POLOX e PLA-PEG.

**Tabela 6** - Captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre e encapsulado em NCs PLA-POLOX e PLA-PEG na tireóide.

FORMULAÇÕES	% DI/g $\pm$ DP*					
	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	240 min
$^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol	2,36 $\pm$ 0,41	2,78 $\pm$ 0,53	2,33 $\pm$ 0,42	2,41 $\pm$ 0,81	2,78 $\pm$ 0,51	1,56 $\pm$ 0,24
NCs PLA -POLOX-						
$^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol	1,75 $\pm$ 0,36	1,67 $\pm$ 0,40	1,89 $\pm$ 0,90	1,79 $\pm$ 0,21	1,59 $\pm$ 0,55	1,69 $\pm$ 0,43
NCs PLA-PEG-						
$^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol	2,15 $\pm$ 0,69	1,85 $\pm$ 1,39	1,69 $\pm$ 0,43	1,70 $\pm$ 0,50	1,45 $\pm$ 0,12	1,53 $\pm$ 0,46

\* Média  $\pm$  desvio padrão (n = 5 camundongos por tempo).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 6, considerando-se individualmente cada formulação, observou-se que não há um aumento significativo de captação de radioatividade pela tireóide ao longo do tempo avaliado ( $p > 0,05$ ). Este resultado indica que a ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  ao fluconazol está sendo satisfatoriamente estável nos tempos estudados, já que a ruptura da ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  com a molécula do fluconazol aumentaria a captação de radioatividade pela tireóide. Este resultado é compatível com os resultados do estudo de estabilidade *in vitro*, discutido no item 3. Observou-se ainda que o percentual de captação de radioatividade na tireóide foi significativamente mais baixo para as formulações de NCs contendo o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol em relação ao fármaco livre. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  livre, presente nas formulações, foi removido durante o processo de separação do fármaco não encapsulado daquele encapsulado por um sistema de ultrafiltração. Há também a possibilidade da encapsulação estar protegendo a molécula de  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol, reduzindo a dissociação dos átomos de  $^{99m}$ tecnécio.

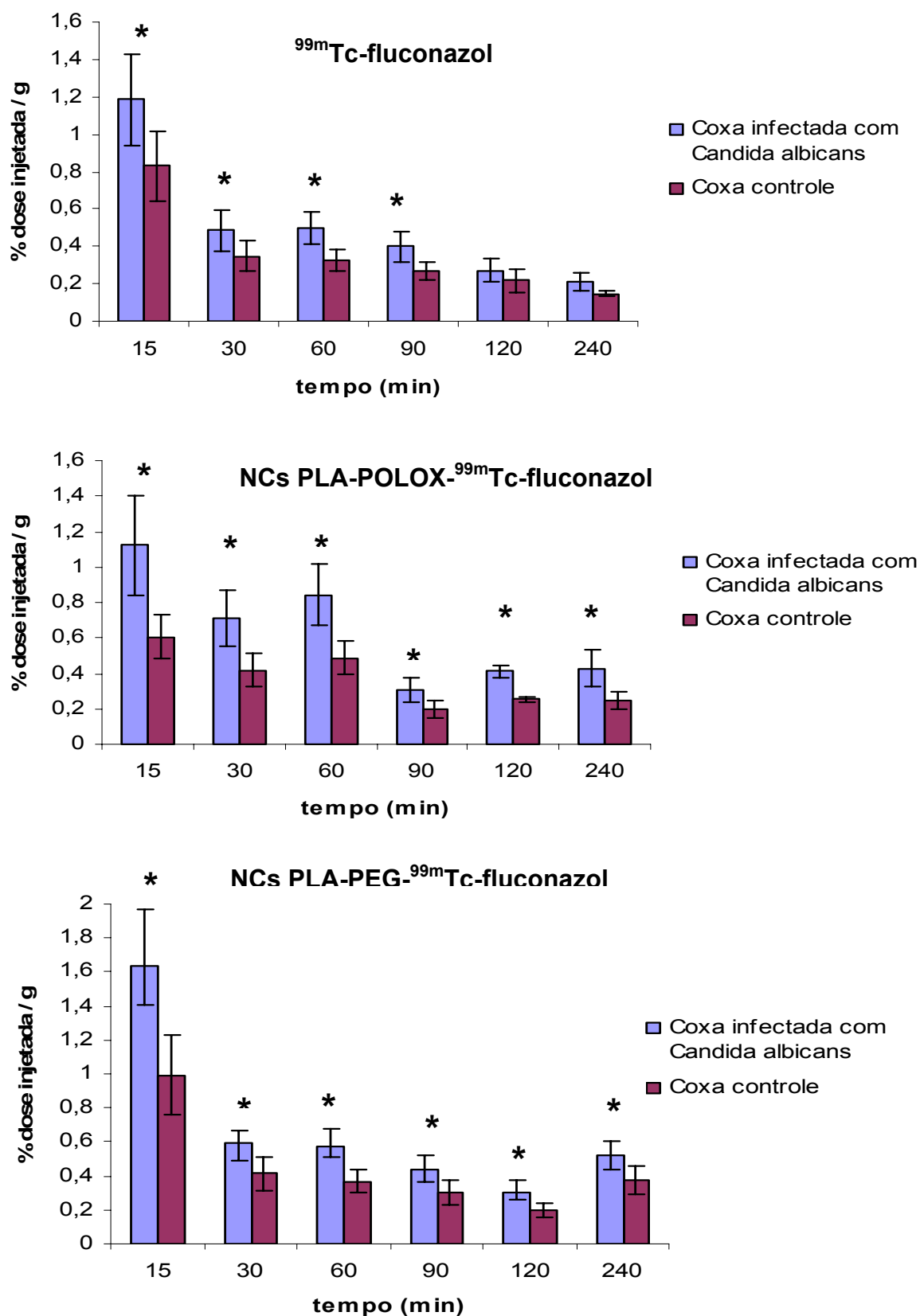
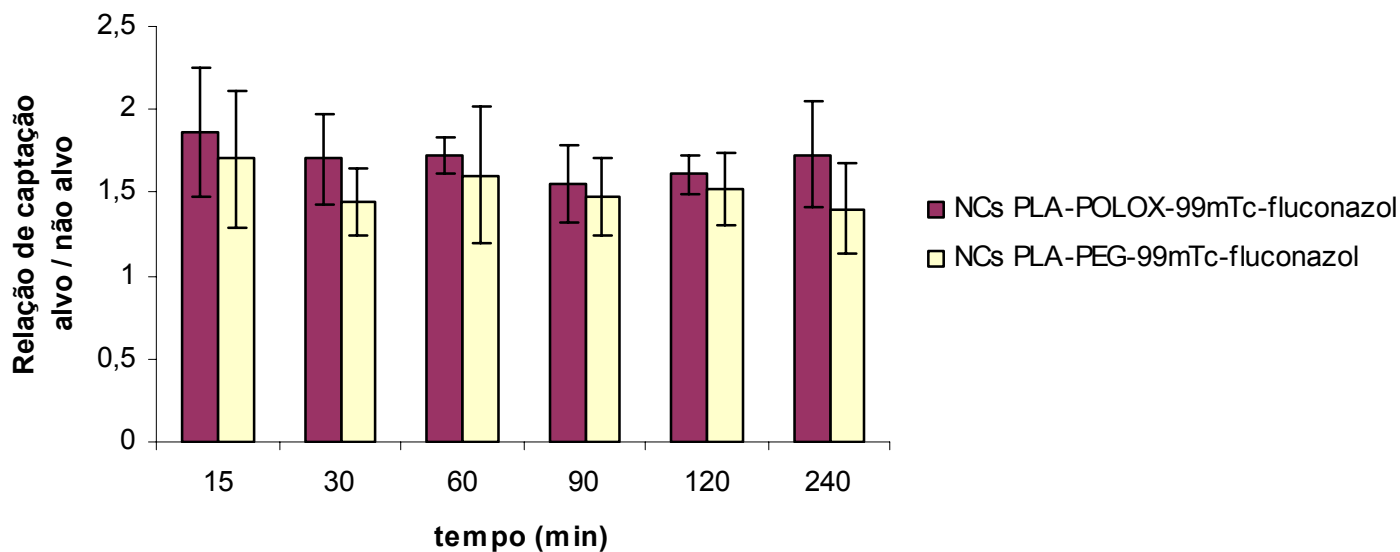


FIGURA 27 – Captação do <sup>99m</sup>Tc-fluconazol livre e encapsulado em NCs convencionais e furtivas, nas coxas infectadas com *C. albicans* e controles, após injeção intravenosa (37MBq) em camundongos (n = 5 por grupo); \*p<0,05.



**FIGURA 28** – Relação de captação de radioatividade na coxa infectada com *C. albicans* e na coxa controle.

Observa-se pela figura 27 que o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol livre mostrou maior captação pelo foco infeccioso, induzido pela *C. albicans*, nos tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos, quando comparado com a coxa controle ( $p < 0,05$ ). Conforme descrito no item 7.2, a resposta inflamatória promove vasodilatação, maior fluxo sanguíneo local o que explica a maior captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol na coxa infectada. Entretanto, quando se utilizou o fármaco encapsulado em nanocápsulas (furtivas e convencionais) a diferença de captação entre as coxas infectada e controle foi estatisticamente significativa para todos os tempos investigados, inclusive os tempos mais tardios de 120 e 240 min. Este resultado sugere que as NCs permanecem mais tempo na região infectada, possivelmente devido ao processo de fagocitose exercido pelos macrófagos presentes no foco infeccioso. As análises histológicas (item 9) mostraram a presença de intenso infiltrado polimorfonuclear nesta região, justificando a hipótese considerada.

O comportamento de captação das nanocápsulas furtivas e convencionais pelo foco infeccioso (figura 28), determinado pela comparação entre as relações alvo/não alvo, foi estatisticamente igual para todos os tempos investigados ( $p > 0,05$ ). Isto sugere que a presença das cadeias de PEG não contribuiu para uma melhor captação das nanocápsulas furtivas, ao contrário do que se esperava. Este resultado provavelmente pode ser explicado pela



intensa resposta inflamatória local, promovendo alta taxa de fagocitose, indiferente ao tipo de formulação empregada. Por outro lado, outra hipótese a ser considerada é o curto intervalo de tempo do experimento (240 minutos) que talvez não tenha sido suficiente para a observação de maior captação das nanocápsulas furtivas no foco infeccioso. Tempos longos não foram contemplados neste trabalho devido a limitações técnicas relacionadas ao reduzido nível de radioatividade, obtido após as diversas etapas envolvidas na parte experimental.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o emprego de formulações de nanocápsulas contendo fluconazol pode representar uma vantagem terapêutica no tratamento de pacientes com candidíases, uma vez que as NCs permanecem mais tempo na região infectada possibilitando a liberação deste antifúngico diretamente no seu sítio de ação. Desta forma, pode-se pensar na possibilidade de aumentar o intervalo entre as doses administradas do fármaco, sem prejuízo da eficácia terapêutica. Outro aspecto também a ser considerado é que o maior espaçamento entre as doses facilita o esquema terapêutico, contribuindo para maior adesão ao tratamento.

# **CONCLUSÃO**

---

## CONCLUSÕES

---

- O fluconazol foi efetivamente marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio, mantendo-se estável por até 24 horas.
- As preparações de nanocápsulas convencionais e furtivas apresentaram percentual de encapsulação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol da ordem de 30%.
- O tamanho das nanocápsulas convencionais e furtivas contendo o  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol mostrou ser adequado para estudos de biodistribuição, visando a identificação de foco infeccioso.
- Os estudos de liberação *in vitro* mostraram que as nanocápsulas furtivas liberaram mais lentamente o fármaco encapsulado, quando comparadas com as nanocápsulas convencionais.
- As análises histológicas e os estudos de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -fluconazol mostraram que o foco induzido por suspensão de *Candida albicans* na concentração de  $10^8$  UFC/mL apresentou uma resposta inflamatória mais eficaz.
- Os estudos de biodistribuição mostraram que as nanocápsulas convencionais e furtivas permaneceram por mais tempo no foco infeccioso quando comparado ao fármaco na forma livre.
- Não houve diferença estatisticamente significativa de captação entre as nanocápsulas convencionais e furtivas pelo foco infeccioso.

# **PERSPECTIVAS**

## ***PERSPECTIVAS***

---

- Simular um tratamento de candidíase, em modelo animal, utilizando fluconazol livre e encapsulado em nanocápsulas para avaliar e comparar a eficácia e toxicidade das formulações.
  
- Testar outros nanocarreadores para veiculação do fluconazol, como nanoesferas e lipossomas, no intuito de melhorar a eficiência de encapsulação do fármaco.

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

AGARWAL, R.; KATARE, O. P. Preparation and In Vitro Evaluation of Miconazole Nitrate–Loaded Topical Liposomes. *Pharm. Tech.*, v. 26, n. 11, p. 48-60, Nov. 2002.

ALONSO M. J. *et al.* Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Phar.*, v. 68, n. 1-3, p. 69-76, 1991.

AMELLER, T. *et al.* Pure antiestrogen RU 58668-loaded nanospheres: Morphology, cell activity and toxicity studies. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 21, n. 2-3, p. 361-370, 2004.

AMMOURY, N. *et al.* In vitro release kinetic pattern of indomethacin from poly (D, L-lactide) nanocápsulas. *J. Phar. Sci.*, v. 79, n. 9, p. 763-767, Set. 1990.

ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE. Guidelines for the use of rodents in experimental neoplasia and production of polyclonal and monoclonal ascites. Berkeley, 2004. Disponível em: <<http://www.acuc.berkeley.edu/assets/guidelines/ascites.pdf>> Acesso em: 04 jan. 2005.

ARAÚJO, J. G. V. C. *Estudos biológicos em hamsters infectados com Leishmania amazonensis empregando anticorpos (anti-amastigotas) marcados com <sup>99m</sup>Tecnécio*. 1998. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ARMSTRONG, D. Problems in management of opportunistic fungal diseases. *Rev. Infect. Dis.*, v. 11, n. 7, p. S1591-1599, Dez. 1989.

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

BENNET, J. E. Fármacos antimicrobianos (continuação): Fármacos antifúngicos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. L. (Ed). *Goodman & Gilman – as bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. Cap. 49, p. 864-875.

BARRETT-BEE, K. *et al.* Biochemical studies with a novel antifungal agent, ICI 195739. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 544, p. 231-244, Jan. 1988.

BECK-SAGUÉ, C. M.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J. Infect. Dis.*, v. 167, n. 5, p. 1247-1251, Mai. 1993.

---

BOWDEN, R. *et al.* A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.*, v. 35, n. 4, p. 359-66, Ago. 2002.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, n. 5, p. 530-536, Mai. 1996.

CHASTEIGNER, S. *et al.* Comparative study of the association of itraconazole with colloidal drug carriers. *Drug Dev. Res.*, v. 38, n. 2, p. 125-133, Dez. 1998.

CLARK, J. *et al.* Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, n. 4, p. 615-621, Abr. 1991.

CLARKE'S ANALYSIS OF DRUGS AND POISONS. Fluconazole, 2006. Disponível em <http://www.medicinescomplete.com> Acesso em: 15 mar. 2006.

COLLAZOS, J. *et al.* Unusual liver toxicity. due to the new antifungal agents fluconazole and itraconazole. *Int. Hepatol. Commun.*, v. 3, n. 1995, p. 112-115, Jul. 1994.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, n. 5, p. 599-607, Set. 2003.

COUVREUR, P. *et al.* Nanocapsule technology: a review. *Cri. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

DELIE, F.; BLANCO-PRÍETO, M. J. Polymeric Particulates to Improve Oral Bioavailability of Peptide Drugs. *Molecules*, v. 10, p. 65-80, Jan. 2005.

DE LOGU, A. *et al.* Effects of in-vitro activity of miconazole and ketoconazole in phospholipid formulations. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 40, n. 6, p. 889-893, 1997.

DE LOGU, A. *et al.* Prevention by L-alpha-phosphatidylcholine of antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated imidazoles determined by using time-killing curves. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 15, n. 1, p. 43-48, Jun. 2000.

DUBE, M. P. *et al.* Fungemia and colonization with nystatin-resistant *Candida rugosa* in a burn unit. *Clin. Infect. Dis.*, v. 18, n. 1, p. 77-82, Jan. 1994.

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



FENG, S.; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J. Control. Release*, v. 71, n. 12, p. 53-69, Mar. 2001.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FICHTENBAUM, C. J. *et al.* Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.*, v. 30, n. 5, p. 749-756, Mai. 2000.

FIELDING, R. M. *et al.* Comparative pharmacokinetics of amphotericin B after administration of a novel colloidal delivery system, ABCD, and a conventional formulation to rats. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, n. 6, p. 1208-1213, Jun. 1991.

FRANCIS, P.; WALSH, T. J. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin. Infect. Dis.*, v. 15, n. 6, p. 1003-1018, Dez. 1992.

FRESTA, M. *et al.* Ocular tolerability and *in vivo* bioavailability of poly(ethylene glycol) (PEG)-coated polyethyl-2-cyanoacrylate nanosphere-encapsulated acyclovir. *J. Phar. Sci.*, v. 90, n. 3, p. 288-297, Jan. 2001.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH, T. Antifungal Agents: Chemotherapeutic Targets and Immunologic Strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 40, n. 2, p. 279-291, Fev. 1996.

GRAF, R. *et al.* The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 16, n. 2, p. 215-133, Set. 1995.

GRAF, R. *et al.* Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, v. 263, n. 5153, p. 1600-1603, Mar. 1994.

GRAF, R. *et al.* Development and characterization of CyA-loaded poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) PEG micro and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *Eur. J. Phar. Biopharm.*, v. 51, n. 2, p. 111-118, Mar. 2001.

GUPTA, S. K. *et al.* Efficacy of fluconazole and liposome entrapped fluconazole for *C. albicans* induced experimental mycotic endophthalmitis in rabbit eyes. *Acta Ophthalmol. Scand.*, v. 78, n. 4, p. 448, Ago. 2000 a.

GUPTA, S. K. *et al.* Intravitreal pharmacokinetics of plain and liposome entrapped fluconazole in rabbit eyes. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, v. 16, n. 6, p. 511-518, Dez. 2000 b.

GUTERRES, S. S. *et al.* Poly (D, L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: part 1 formulation and stability. *Int. J. Phar.*, v. 113, p. 57-63, Jan. 1995.

---

HANGER, D. P.; JEVONS, S.; SHAW, J. T. Fluconazole and testosterone: *in vivo* and *in vitro* studies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 32, n. 5, p. 646-648, Mar. 1988.

HORNKE, L. *Colonização fúngicas da cavidade oral de crianças nascidas de mães soropositivas para HIV no primeiro ano de vida*. 2000. 100 f. Tese (Mestrado em Pediatria) – Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

JACOBSON, M. A.; HANKS, D. K.; FERREL, L. D. Fatal acute hepatic necrosis due to fluconazole. *Am. J. Med.*, v. 96, n. 2, p. 188-190, Fev. 1994.

JASS, J.; TJÄRNHAGE, T.; PUU, G. From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophys. J.*, v. 79, n. 6, p. 3153-3163, Dez. 2000.

JEAN, M. S. *et al.* Van der Waals and capacitive forces in atomic microscopies. *J. Appl. Phys.*, v. 86, n. 9, p. 5245-5248, 1999.

JULIANO, R. L. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 2, p. 31-54, 1988.

KLEIN, J.D.; YAMAUCHI, T.; HORLICK, P. Neonatal candidiases, meningitis and arthritis: observations and a review of the literature. *J. Pediatr.*, v. 81, n. 1, p. 31-34, Jul. 1972.

KNIGHT, T. E.; SHIKUMA, C.; KNIGHT, J. Ketoconazole-induced fulminant hepatitis necessitating liver transplantation. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 25, n. 2, p. 398-400, Ago. 1991.

KOROKOLVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. Antiinfeciosos: Outros antifúngicos. In: KOROKOLVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004, cap. 18, p. 18.22-18.23.

LAINÉ L. *et al.* Fluconazole compared with ketoconazole for the treatment of *Candida* esophagitis in AIDS. A randomised trial. *Ann. Intern. Med.*, v. 117, n. 8, p. 655-660, Out. 1992.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.*, v. 16, n. 7, p. 307-321, Jul. 1998.

LEGRAND, P. *et al.* Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *S. T. P. Pharma Sciences*, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LEITE, E. A. *Nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo halofantrino: desenvolvimento, caracterização e estudo da cardiotoxicidade*. 2006. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

---

LEITE, E. A. *et al.* Poly-caprolactona nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. *Microsc. Microanal.*, v. 11, n. 3, p. 48-51, Dez. 2005.

LEVITZ, S. M. Overview of host defenses in fungal infections. *Clin. Infect. Dis.*, v. 14, n. 1, p. S37-42, Mar. 1992.

LOPES-BERESTEIN, G. *et al.* Liposomal amphotericin B for treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. *J. Infect. Dis.*, v. 151, n. 4, p. 704-710, Abr. 1985.

LOSA, C. *et al.* Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metilpranolol. *Pharm. Res.*, v. 10, n. 1, p. 80-87, Jan. 1993.

LUPETTI, A. *et al.* Technetium -99m labeled fluconazole and antimicrobial peptides for imaging of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infections. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 29, n. 5, p. 674-679, Dez. 2002.

McEVOY, G. K. Antifungal antibiotics – Fluconazole. In: McEVOY, G.K. (ed) - *AHFS drug information*. Bethesda, MD: American Society of Health System Pharmacists Inc., p. 101, 2003.

MACURA, A.B. Fungal resistance to antimycotic drugs. A growing problem. *Int. J. Dermatol.*, v. 30, p. 131–183, 1991.

MAENZA, J. R. *et al.* Infection due to fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology. *Clin. Infect. Dis.*, v. 24, n. 1, p. 28-34, Jan. 1997.

MAESAKI, S. Drug Delivery System of Anti-fungal and Parasitic Agents. *Curr. Pharmaceut. Des.*, v. 8, n. 6, p. 433-440, Mar. 2002.

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

MAHFOUZ, T.; ANAISSIE, E. J. Prevention of fungal infections in the immunocompromised host. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, v. 4, n. 8, p. 974-990, Ago. 2003.

MARCHAL-REUSSLER, L. *et al.* Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto different isobutylcyanoacrylate nanoparticle preparation. *Int. J. Phar.*, v. 58, p. 115-122, 1990.

MARTINS, M. D.; LOZANO-CHIU, M.; REX, J. H. Point prevalence of oropharyngeal carriage of fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus infected patients. *Clin. Infect. Dis.*, v. 25, n. 4, p. 843-846, Out. 1997.

---

METHA, R. T. *et al.* Formulation, toxicity, and antifungal activity *in vitro* of liposome-encapsulated nystatin as therapeutic agent for systemic candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 31, n. 12, p. 1897-1900, Dez. 1987a.

MEHTA, R. T. *et al.* Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated nystatin for systemic fungal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 31, n. 12, p. 1901-1903, Dez. 1987b.

MONTASSER, I. *et al.* Methods of obtaining and formation mechanisms of polymer nanoparticles. *J. Pharm. Belg.*, v. 55, n. 6, p. 155-167, Dez. 2000.

MONTASSER, I.; FESSI, H.; COLEMAN, A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 54, n. 3, p. 281-284, Nov. 2002.

MOSQUEIRA, C. F. V.; LEGRAND, P.; BARRAT, G. Surface modified and conventional nanocápsulas as novel formulations for parenteral delivery of halofantrine. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 6, n. 8, p. 1-10, 2006.

MOSQUEIRA, V. C. *et al.* Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D, L-lactide) nanocapsules bearing poly (ethylene glycol). *J. Drug Target*, v. 7, n. 1, p. 65-78, 1999.

MOSQUEIRA, V. C. *et al.* Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocápsulas. *Biomaterials*, v. 22, n. 22, p. 2967-2979, Nov. 2001b.

MOSQUEIRA, V. C. *et al.* Biodistribution of long-circulating PEG-grafeted nanocápsulas in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharm. Res.*, v. 18, n. 10, p. 1411-1419, Out. 2001a.

MOSQUEIRA, V. C. *et al.* Poly (D, L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, v. 89, n. 5, p. 614-626, Mai. 2000.

MUNOZ, P. *et al.* Fluconazole-related hepatotoxicity in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Inter. Med.*, v. 151, n. 5, p. 1020-1021, Mai. 1991.

NASTI, T. H.; KHAN, M. A.; OWAIS, M. Enhanced efficacy of pH-sensitive nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in murine model. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 57, n. 2, p. 349-352, Dez. 2005.

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

ODDS, F. C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 31, n. 4, p. 463-471, Jul. 1992.

---

OTSUBO, T. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of NS-718, a new lipid nanosphere incorporating amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, n. 3, p. 471-475, Mar. 1999.

PALMER, A. F.; WINGERT, P.; NICKELS, J. Atomic Force Microscopy and Light Scattering of Small Unilamellar Actin-Containing Liposomes. *Biophys. J.*, v. 85, p. 1233-1247, 2003.

PAPPAS, P. G. *et al.* Alopecia Associated with Fluconazole Therapy. *Ann. Intern. Méd.*, v. 123, n. 5, p. 354-357, Set. 1995.

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

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, n. 2, p. S89-94, Mai. 1996.

PICOS, D. R. *et al.* Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Rev. Cubana Farm.*, v. 34, n. 1, Abr. 2000.

PONS, V. *et al.* Oropharyngeal candidíases in patients with AIDS: randomized comparison of fluconazole versus nystatin oral suspensions. *Clin. Infect. Dis.*, v. 24, n. 6, p. 1204-1207, Jun. 1997.

QUIST, A. P. *et al.* AFM imaging of 3D conformations and surface energetics of reconstituted ion channels: mimicking lipid bilayer cell membrane. *Microsc. Microanal.*, v. 11, n. 2, p. 1258-1259, Ago. 2005.

RAVI KUMAR, M. N.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C. M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, v. 25, n. 10, p. 1771-1777, Mai. 2004.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* Species to Fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, n. 1, p. 1-8, Jan. 1995.

RIBEIRO, E. L. *et al.* Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. *NewsLab.*, v. 12, n. 64, p. 106-128, 2004.

RINALDI, M. G. Biology and pathogenicity of *Candida* species. In: BODEY, G. P. ed. 2 – *Candidiasis – Pathogenesis, diagnosis and treatment*. 2 ed. New York: Raven Press Ltd., 1993, p 1-20.

RINGDEN, O. *et al.* 1991. Efficacy of amphotericin B encapsulated in liposome (AmBisome) in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 28, n. B, p.73-82, Out. 1991.

RUBE, A. *et al.* J. Core-shell structure of Miglyol/poly (D, L-lactide)/ Poloxamer nanocápsulas studied by small-angle neutron scattering. *J. Control. Release*, v. 107, n. 2, p. 244-252, Out. 2005.

---

RUIZ-CABELLO, J. *et al.* Magnetic resonance imaging in the evaluation of inflammatory infection model induced by *Candida albicans*. *Magn. Reson. Imaging*, v. 17, n. 9, p. 1327-1334, Mai. 1999.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. *et al.* Colloidal carriers for benzathine penicilin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Phar.*, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, Nov. 2000.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 21, n. 2, p. 99-106, Fev. 2002.

SECHLER, J. M. *et al.* Antigen presentation determines the fate of the T memory response *in vivo* after sublethal gamma-irradiation. *J. Immunol.*, v. 63, n. 9, p. 4701-4706, Nov. 1999.

SIECK, T. G. *et al.* Protection against murine disseminated candidíases mediated by *Candida albicans* – specific T-cell line. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 8, p. 3540-3543, Ago. 1993.

SOBEL, J. D. *Candida* infections in patients infected with HIV. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, v. 4, p. 101-107, 2002.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Controlled Release*, v. 70, n. 1, p. 1-20, Jan. 2001.

SPLINDER, K. P. *et al.* SJL/J mice are highly susceptible to infection by mouse adenovirus type 1. *J. Virol.*, v. 75, n. 24, p. 12039-12046, Dez. 2001.

STEVENS, D. A.; GREENE, S. I.; LANG, O. S. Thrush can be prevented in patients with acquired immunodeficiency syndrome and the acquired immunodeficiency syndrome-related complex. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of 100-mg oral fluconazole daily. *Arch. Intern. Med.*, v. 151, n. 12, p. 2458-2464, Dez. 1991.

TORCHILIN, V. P. Drug targeting. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, v. 11, n. 2, p. 81-91, Jul. 2000.

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

VANDEN BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F. C. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.*, v. 2, n. 10, p. 393-400, Out. 1994.

VAN ETTEN, W. M. *et al.* Amphotericin B liposomes prolonged circulation in blood: *in vitro* antifungal activity, toxicity, and efficacy in systemic candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, n. 9, p. 1954-1958, Set. 1995.

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

VAUTHIER-HOLTZSCHERER, C. *et al.* Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems. *S. T. P. Pharma. Sci.*, v. 1, p. 109-116, 1991.

WALSH, T. J. *et al.* Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin. Infect. Dis.*, v. 26, n. 6, p. 1383-1396, Jan. 1998.

WARNOCK, D. W. Azole drug resistance in *Candida* species. *J. Med. Microbiol.*, v. 37, n. 4, p. 225-226, Out. 1992.

WEINROTH, S. E.; TUAZON, C. U. Alopecia associated with fluconazole treatment. *Ann. Intern. Méd.*, v., 119, n. 7, p. 637, Out. 1993.

WELLS, C.; LEVER, A. M. Dose-dependent fluconazole hepatotoxicity proven on biopsy and rechallenge. *J. Infect.*, v. 24, n. 1, p. 111-112, Jan. 1992.

ZERVOS, M.; MEUNIER, F.; Fluconazole (Diflucan): a review. *Int. Antimicrob. Agents.*; v. 3, p. 147-170, 1993.

ZUCKIER, L. S. *et al.* Kinetics of perrhenate uptake and comparative biodistribution of perrhenate, pertechnetate, and iodide by NaI symporter expressing tissues *in vivo*. *J. Nucl. Med.*, v. 45, n. 3, p. 500-507, Mar. 2004.

## **ANEXOS**



**ANEXO 1 – Certificado de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Experimental Animal**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 111/2005**, relativo ao projeto intitulado "**Biodistribuição do fluconazol marcado com 99m-tecnécio em nanocápsulas convencionais e furtivas**", que tem como responsável **Valbert Nascimento Cardoso**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **5/ 04/2006**.

Este certificado expira-se em **5/ 04 / 2011**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 111/2005**, related to the project entitled "**Biodistribution of 99m-technetium labelled fluconazole in conventional and surface-modified nanocapsules**", under the supervision of **Valbert Nascimento Cardoso**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 5, 2006**.

This certificate expires in **April 5, 2011**.

Belo Horizonte, 5 de Abril de 2006.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Presidente do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027  
[www.ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)

**ANEXO 2 – Produção científica associada a esta dissertação**

ASSIS, D. N. *et al.* Release Profiles and Morphological Characterization by Atomic Force Microscopy and Photon Correlation Spectroscopy of <sup>99m</sup>Techetium-fluconazole nanocapsules. (Submetido no International Journal of Pharmaceutics).

ASSIS, D. N. *et al.* Biodistribuição e caracterização do fluconazol marcado com <sup>99m</sup>Tecnécio. In: XXI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental Águas de Lindóia, Minas Gerais. Anais da XX FESBE, 2006.

ASSIS, D. N. *et al.* Improving the stability of polymeric nanostructures on atomic force microscopy analysis. In: Latin American Symposium on Scanning Probe Microscopy (LASPM), 2007.