

Estudo da Eficiência de Nanocarreador de Anfotericina B Frente a *Cryptococcus Neoformans*

Aline C. O. Silva, Thainara A. Gouvea, Jéssica A. R. Ambrósio, Priscila M. S. C. M. Leite, Flávia V. Moraes & Erika P. Gonçalves

O *Cryptococcus neoformans* foi descrito em 1905 e sua infecção desenvolve lesões cutâneas, respiratória e disseminada nos pacientes. Para o tratamento alguns antifúngicos podem ser utilizados, a escolha do fármaco se dá pelo grau da doença, porém a mais difundida é a Anfotericina B devido o mecanismo de ação e interação com a membrana do fungo, promovendo assim sua destruição. Na mesma proporção de destruição dos fungos a Anfotericina B também interage com a parede das células, tornando-se também um fármaco com alto poder de toxicidade. As nanopartículas de gelatina foram processadas pelo método de dessolvatação em dois passos, o que garantiu a obtenção das partículas com tamanho e formas adequados para a aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos, foram caracterizadas por Microscopia de Varredura (MEV) e espalhamento de luz dinâmico (DLS) onde foi confirmado a morfologia esférica das partículas com tamanho médio de 175,1 nm e 176,3 nm respectivamente para o sistema livre e encapsulado respectivamente. Por fim, a eficácia do sistema de liberação frente a leveduras de *Cryptococcus neoformans* por Teste de Difusão de Disco nas seguintes concentrações: 0,5 mg.mL⁻¹; 1,0 mg.mL⁻¹; 1,5 mg.mL⁻¹; 2,0 mg.mL⁻¹ o que apresentou resultados positivos indicando que mais baixas concentrações de Anfotericina B podem ser administradas com eficiência se utilizado o sistema nanoestruturado de entrega de fármacos.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*; Anfotericina B; Nanopartícula de Gelatina.

Cryptococcus neoformans was described in 1905 and its infection develops skin, respiratory and disseminated lesions in patients. For treatment, some antifungals can be used, the choice of drug is based on the degree of the disease, but the most widespread is Amphotericin B due to the mechanism of action and interaction with the fungal membrane, thus promoting its destruction. In the same proportion of fungal destruction, Amphotericin B also interacts with the cell wall, also becoming a drug with high toxicity power. The gelatin nanoparticles were processed by the two-step desolvation method, which ensured the obtaining of particles with suitable size and shapes for application in controlled drug delivery systems, characterized by Scanning Microscopy (SEM) and light scattering dynamics (DLS) where the spherical morphology of the particles with average size of 1751.1 nm and 176.3 nm respectively for the free and encapsulated system was confirmed. Finally, the efficiency of the delivery system against *Cryptococcus neoformans* yeasts by Disc Diffusion Test at the following concentrations: 0.5 mg.mL⁻¹; 1.0 mg.mL⁻¹; 1.5 mg.mL⁻¹; 2.0 mg.mL⁻¹ which showed positive results indicating that lower concentrations of Amphotericin B can be efficiently administered if the nanostructured drug delivery system is used.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; Amphotericin B; Gelatin Nanoparticles

Introdução

Os processos de nanoencapsulamento de fármacos resultam dos avanços recentes na nanobiotecnologia, a utilização de carreadores na escala nanométrica proporciona ao sistemas de liberação melhorias na entrega dos bioativos devido a elevada área superficial.^{1,2} Os materiais poliméricos tem sido escolhidos para a preparação de nanocarreadores devido à facilidade de preparação, possibilidade de modificação de sua superfície, excelente estabilidade e boa escalabilidade para a produção industrial.^{3,4}

A gelatina é um polímero promissor para aplicação como nanocarreadores de fármacos^{5,6} por ser uma material polimérico hidrofílico natural, portanto biodegradável, apresentando características não imunogênicas e atóxico.^{7,8}

O *Cryptococcus neoformans* pode infectar indivíduos saudáveis, mas a maior proporção é de humanos imunodeprimidos. O primeiro estágio da doença é a infecção do trato respiratório caracterizando forma aguda, subaguda ou crônica. A infecção secundária se dá no Sistema Nervoso Central (SNC) pela afinidade do fungo com o tecido, podendo causar meningite, encefalite ou meningoencefalite.⁹ A criptococose não apresenta preferência por sexo ou raça, entretanto a contaminação é dada muito mais em adultos e raramente em crianças. A prevalência da levedura ocorre em ambientes isolados e é adquirida pela inalação das estruturas fúngicas de fezes de aves.¹⁰

Vários antifúngicos são utilizados no tratamento da criptococose, dentre eles a Anfotericina B está entre as mais eficientes. Os tratamentos são longos e o paciente deve ser monitorado, pois esta droga tem afinidade ao colesterol, que está diretamente relacionado a membrana celular do ser humano, tornando-a nefrotóxica. Ademais possui baixa solubilidade em vários solventes e fluidos corporais o que dificulta a administração sendo necessária a realização endovenosa.¹¹

Neste trabalho, relatamos a eficácia do sistema de liberação de fármacos formado por nanocarreadores de gelatina produzidas via dessolvatação em dois passos encapsuladas com Anfotericina B na inibição do crescimento de *Cryptococcus neoformans*.

Materiais e Métodos

MATERIAIS

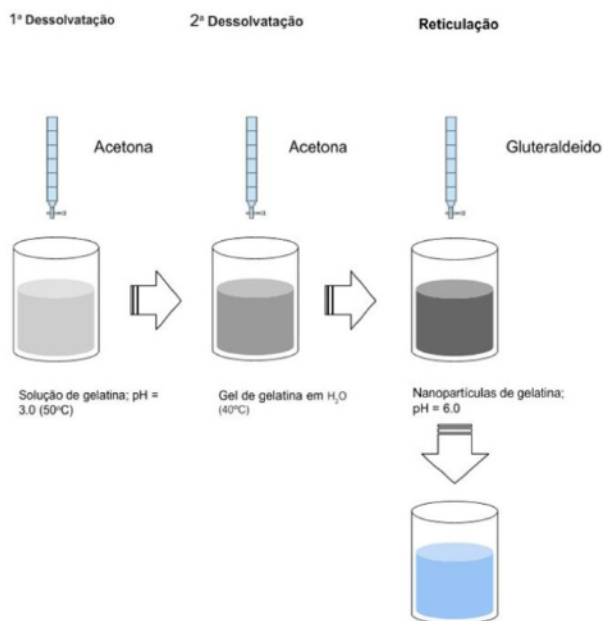
Gelatina de Pele Suína tipo A Bloom 300, Anfotericina B foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis). Solventes orgânicos de grau analítico foram comprado da Synth (Brasil) e usado como recebido.

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE GELATINA

As nanopartículas de gelatina (NPG) foram preparadas pelo método de dessolvatação em dois passos, conforme descrito por Carvalho *et al.*¹² Acetona (25 mL) foi rapidamente adicionada a 25 mL de gelatina aquosa (0,05 g.mL⁻¹), aquecida a 50 °C e agitada lentamente. Após 2 minutos, o sobrenadante foi descartado. O gel precipitado foi redissolvido em 25 mL de água a 50°C e o pH ajustado com ácido clorídrico para 3,0. Em agitação constante a 40 °C, 75 mL de acetona foi adicionada lentamente durante 25 minutos. Imediatamente após a adição de acetona, 0,2 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído (25%) foi adicionado à mistura e agitado por 1 hora. A solução foi então incubada durante a noite à temperatura ambiente. A solução foi particionado e centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804R) a 5000 rpm por 20 minutos e lavada três vezes com solução aquosa de acetona (75%). Subseqüentemente, o resíduo da centrifugação foi diluído com 2,5 mL da solução de acetona (75%).

Este procedimento produziu as nanopartículas em branco (NPG). Uma representação esquemática da síntese das NPG's está apresentado na Figura 1.

Figura 1: Representação esquemática das etapas de síntese das NPG's. Fonte: Os autores



Para o carregamento de Anfotericina B (AB) em NPG, a solução de NPG foi centrifugada e o sólido foi seco em temperatura ambiente (25 °C) por 5 h para remoção do solvente, e 1mL de Anfotericina 5,0 mg.mL⁻¹ foi incubado na nanopartícula por 48 horas em álcool etílico sob agitação magnética. A solução foi dividida e centrifugada a 5.000 rpm por 20 minutos e lavar três vezes com acetona solução (75%). Posteriormente, o sólido foi diluído com 2,5mL da acetona solução (75%) e armazenada a 4 °C. A quantidade de fármaco adsorvido nas nanopartículas foi determinado por espectroscopia de absorção UV-Visível após a determinação da curva analítica usando o mesmo procedimento descrito anteriormente por Ambrósio *et al.*¹³

A morfologia das partículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), pelo método de elétrons secundários em um microscópio EVO-MA10 (Zeiss) com filamento de tungstênio, o tamanho médio das partículas foi avaliado por espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada no ZetaSizer Nano - ZS90 (Malvern).

Os testes de difusão em disco foram realizados em *Cryptococcus neoformans*. Paratanto células leveduriformes foram mantidas em placas de petri, contendo meio YPD sólido, a 4 °C. A cultura de leveduras foi obtida a partir do espalhamento de leveduras em meio sólido YPD (0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona, 0,5% de dextrose, esterilizado por autoclavagem) e incubação por 24 horas, à 30 °C. Para o início dos experimentos, duas alçadas do crescimento de leveduras foram recolhidas e ressuspensas em 10 mL solução salina (0,9% NaCl, esterilizada por autoclavagem). A concentração celular foi obtida por espectrofotometria em comprimento de onda de 530 nm, e ajustada com a mesma solução para 1x10⁶ células/mL. Um mililitro de cultura contendo 1x10⁶ células leveduriformes de *Cryptococcus neoformans* foram inoculadas em placas de petri contendo 20 mL. As células foram espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Sobre as leveduras inoculadas foram adicionados papeis de filtro estéreis de 6 mm de diâmetro, sobre os quais foram adicionados 10 µL de diferentes concentrações de anfotericina B e com anfotericina B nanoencapsulada.

O tratamento com anfotericina B e com NPG-AB sobre as leveduras foi realizado em diferentes concentrações das substâncias, a saber: 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2,0 mg/mL, bem como na sua ausência (NPG). Sobre os papéis de filtro estéreis, em contato com as leveduras inoculadas nas placas de petri, foram adicionados 10 µL das diferentes concentrações de anfotericina B e de NPG-AB. Como controles negativos foram utilizados: 10 µL de água destilada (placa anfotericina B) e 10 µL de NPG (placa anfotericina B nanoencapsulada). As leveduras plaqueadas e na presença das substâncias foram incubadas a 30°C por 2 dias e tiveram os halos de inibição medidos e fotodocumentados.

Resultados e Discussão

A metodologia de dessolvatação envolve a adição de um agente dessolvante à uma solução aquosa de gelatina visando desidratar as moléculas de gelatina. Este processo causa a mudança da conformação esticada para enrolada^{14,15} A realização da segunda etapa de dessolvatação aumenta a eficiência na formação de e nanopartículas uniformes.¹⁶

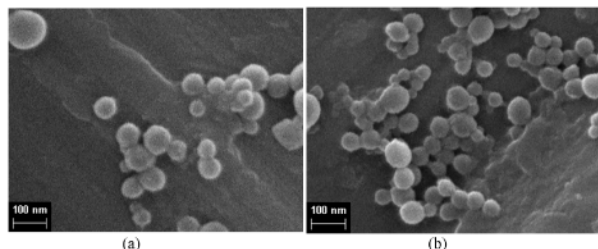
Neste trabalho a acetona foi utilizada como agente de dessolvatação. No processo de dessolvatação as moléculas de gelatina de alto peso molecular foram precipitadas na primeira etapa de dessolvatação. A remoção das moléculas de gelatina de baixo peso molecular suspensas em solução é primordial para a formação das partículas esféricas. Então, as nanopartículas esféricas são produzidas a partir das moléculas de gelatina de alto peso molecular redissolvidas.¹⁷

O Glutaraldeído age como agente reticulante, dando estabilidade à forma das partículas pela formação das ligações cruzadas. A reticulação de tecidos colagenosos produz partículas com características não trombogênicas além de reduzir a biodegradação, mantendo as características biocompatíveis da gelatina, preservando a resistência e flexibilidade.^{18,19} Com a utilização da técnica de dessolvatação em duas etapas, foi possível a síntese de nanopartículas com tamanho e forma adequadas, estas características foram observadas por ensaios de MEV, que avaliaram a forma e tamanho relativo das partículas.

Nas imagens apresentadas na Figura 2, observa-se que as partículas formadas possuem formatos esféricos conforme previsto por AMBROSIO *et al*¹³ evidenciando que o processo de dessolvatação em dois passos mostrou-se eficiente para a obtenção das NPG's. A utilização do glutaraldeído como agente estabilizador das ligações cruzadas das nanopartículas de gelatina mostrou-se eficiente, segundo LEO, *et al*²⁰ os grupos amina presentes na estrutura da gelatina são os responsáveis pela interação com as moléculas de glutaraldeído resultando na reticulação das partículas de gelatina no formato esférico.

A mais alta concentração inicial de gelatina no processo de dessolvatação favorece a desnaturação facilitando o processo de quebra da tripla hélice. A reorganização estrutural da gelatina formando as nano esferas é dependente da concentração, deste modo a maior concentração inicial de gelatina, baixa concentração de propanona, e baixa concentração de glutaraldeído na etapa de reticulação são indicados para preservar a estrutura da gelatina durante processo de síntese de nanopartículas para aplicações específicas.¹⁹

Figura 2: Micrografias das amostras de nanopartículas. (a)NPG, (b) NPG-AB. Fonte: Os autores



O diâmetro médio das partículas foi determinado por DLS apresentando diâmetro médio de 175,1 nm e 176,3 nm, para as NPG e NPG-AB respectivamente. A uniformidade da partícula/homogeneidade também foi confirmada pelo índice de polidispersividade (faixas de PDI de 0,0 para uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho da partícula; a 1,0 para uma amostra altamente polidispersa com vários tamanhos de partícula populações). A análise das NPG's sintetizadas encontrou-se um PDI de 0,16 e para as NPG-AB encontrou-se um PDI de 0,19 que mostra índices de polidispersividade monomodais e homogeneidade do sistema. Em aplicações de entrega de drogas usando nanoformulações, um PDI de 0,3 e abaixo é considerado aceitável e indica uma população homogênea.²¹

Tabela 1: Análise dos tamanhos de partículas obtidos por DLS. Fonte: Os autores

TAMANHO (nm)	NPG	NPG-AB
	INTENSIDADE (%)	INTENSIDADE (%)
130	0	0
135	0	0
140	0	0
145	1,6	2,2
150	3,6	3,2
155	7,6	7,8
160	8,6	8,6
165	10,6	12,6
170	11,2	13,2
175	20,8	24,8

Tabela 1: Análise dos tamanhos de partículas obtidos por DLS - continuação

180	29,6	32,2
185	20,8	23,6
190	14,8	21,8
195	0,8	5,4
200	0	0
205	0	0

O potencial de superfície das NPG foi encontrado em um valor de +30,1 mV e para as NPG-AB +31,4 mV. Em ambos os casos o potencial manteve-se estável por 90 dias. O fármaco foi carregado na superfície das NPG's por adsorção e a eficiência de encapsulamento (EE) foi de 74% apresentando-se satisfatória.

Leveduras de *Cryptococcus neoformans* expostas a fungicidas estão sob pressão seletiva para evoluir. A baixa solubilidade da AB implica na administração endovenosa, e a sua afinidade ao colesterol causa reações adversas dentre elas a nefrotoxicidade. O desenvolvimento de sistemas capazes de inibir a ação das leveduras reduzindo as reações adversas.²² O uso de nanopartículas surge como uma nova tecnologia para o desenvolvimento destes sistemas, portanto, é necessário testar a eficácia destas formulações de AB nanoestruturadas contra as leveduras.

Os resultados dos testes de difusão em disco apresentam a sensibilidade da difusão das formulações e determinam as propriedades destas perante às leveduras estudadas.²³ Analisando-se as imagens apresentadas na Figura 3, observa-se que tanto as formulações de anfotericina nanoestruturadas quanto as formulações com fármaco livre, apresentaram efetividade de inibição do crescimento microbiano. Os resultados, valores médios aferidos, dos ensaios realizados para a determinação da atividade antifúngica das preparações de Anfotericina B avaliadas estão apresentados na Tabela 2. Somente os controles negativos localizados nos centros das placas Figura 3 não apresentaram zona de inibição nessas condições.

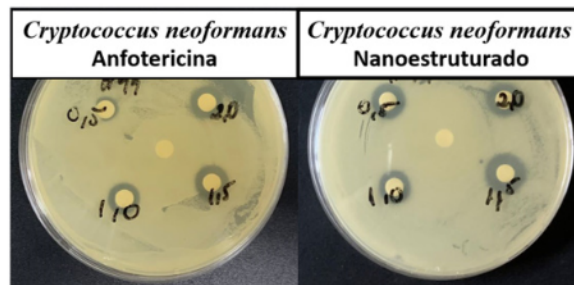
Tabela 2: Halos de inibição do crescimento fúngico formados utilizando 10 µL das formulações estudadas (NPG e NPG-AB) em diferentes concentrações sobre os isolados de *Cryptococcus neoformans*. Fonte: Os autores

Concentração	NPG	NPG-AB
0,5 mg/mL	9 mm	13 mm
1,0 mg/mL	12 mm	13 mm
1,5 mg/mL	14 mm	17 mm
2,0 mg/mL	14 mm	14 mm

Observa-se que, sobre leveduras de *Cryptococcus neoformans* todas as preparações AB e NPG-AB apresentaram efetividade de inibição a partir da concentração de 0,5 mg.mL⁻¹, caracterizada pela formação de halos de inibição do crescimento fúngico igual ou superior a 9 mm.²⁴

A melhor eficácia na atividade antifúngica das formulações nanoestruturadas indicam que a utilização desta tecnologia possibilita a redução na dosagem de fármaco para o combate à infecções por *Cryptococcus neoformans*. Este resultado é promissor na redução das reações adversas e nefrotoxicidade causada pela administração de Anfotericina B.

Figura 3: Atividade antifúngica de diferentes concentrações de eugenol sobre os isolados de *Cryptococcus neoformans*. Fonte: Os autores



* Teste de difusão em disco de diferentes concentrações de Anfotericina B Pura ou Nanoestruturada (aplicação de 10 µL de NPG e NPG-AB em cada uma das seguintes concentrações: 0,5 mg.mL⁻¹, 1,0 mg.mL⁻¹, 1,5 mg.mL⁻¹ e 2,0 mg.mL⁻¹) sobre as leveduras de *C. neoformans*. Como controle negativo de AB, aplicação de 10 µL de água esterilizada e como controle negativo de NPG-AB, aplicação de 10 µL de NPG.

Conclusão

Os avanços em nanotecnologia e o conhecimento sobre as DDS facilitaram o tratamento e a diminuição das doses da AB, o fato de utilizar um sistema relativamente simples e com custo reduzido como a gelatina contribui para ampla pesquisa e a diminuição dos custos de tratamento. A metodologia aplicada permitiu a produção de nanopartículas esféricas de gelatina conforme confirmado pelos ensaios realizados.

O sistema nanoestruturado atuou como esperado, apresentando formação de halos de inibição mais proeminentes em concentrações mais baixas quando comparados aos formados com a inibição causada pela administração de mais elevadas concentrações de AB livre. Este resultado é promissor para a aplicação de sistemas de liberação controlada baseados em gelatina para o carreamento de Anfotericina B endovenosa, pois a eficiência do sistema com menores concentrações indica que ocorrerá menores efeitos causados pelas reações adversas desta droga no sistema renal do paciente.

Referências

- MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCÍA-VIGUERA C. *et al.* Nanoparticles and Controlled Delivery for Bioactive Compounds: Outlining Challenges for New “Smart-Foods”. *Health. Foods.* 7: 72-101 (2018)
- RIZVI, S.A.A.; SALEH, A.M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal* 26(1): 64–70. (2018)
- FRATES K, MARKIEWICZ T, GALLO P *et al.* Protein Polymer-Based Nanoparticles: Fabrication and Medical Applications. *International Journal of Molecular Sciences.* 19(6), 1717-1737. (2018)
- MAHESH AG, NARSIREDDY A, RAO NM *et al.* Designing nanostructured materials for photodynamic therapy: An update. *Science Advances Today.* 3: 25267-25280. (2017)
- SINGH K, MISHRA A. Gelatin nanoparticle: preparation, characterization and application in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5:2149–2157. (2019)
- ZWIOREK K, KLOECKNER J, WAGNER E, *et al.* Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 7:22–28. (2005)
- XU Y, ZHANG J, LIU X, *et al.* MMP-2-responsive gelatin nanoparticles for synergistic tumour therapy. *Pharmaceutical Development and Technology* 24(8):1002–1013. (2019)
- JAHANSHAHI M, SANATI MH, HAJIZADEH S, *et al.* Gelatin nanoparticles fabrication and optimization of the particle size. *Physica Status Solidi A.* 205:1–5. (2008)
- OLIVEIRA, A. B. S.; Tratamento da criptococose e resistência antifúngica ao *Cryptococcus sp.*, Governador Valadares, MG, (2012).
- MEDEIROS, C. S. Q.; Criptococose experimental e efeito de drogas antifúngicas, Recife, PE, (2010).
- SALDANHA, C. A. Avaliação da Atividade Antifúngica da Anfotericina B Conjugada com Nanopartículas Magnéticas Estabilizadas com Bicamada de Ácido Laurico no Tratamento da Paracoccidiodomicose. 2012. 103 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Brasília, (2012).
- CARVALHO, J. A.; DA SILVA A. A.; TEDESCO, A. C.; JUNIOR, M.B.; SIMIONI, ANDREZA R. . Functionalized Photosensitive Gelatin Nanoparticles for Drug Delivery Application. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, v. 30, p. 1-14, (2019).
- AMBROSIO, J. A. R.; PINTO, B. C. S.; GODOY, D. S.; CARVALHO, J. A.; ABREU, A.S.; DA SILVA, B.G. M.; LEONEL, L. C.; COSTA, M. S.; BELTRAME JUNIOR, M.; SIMIONI, A. R.. Gelatin nanoparticles loaded methylene blue as a candidate for photodynamic antimicrobial chemotherapy applications in *Candida albicans* growth. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, v. 30, p. 1-15, (2019).
- ELZOGHBY AO, ELGOHARY MM, KAMEL NM. Implications of protein- and peptide-based nanoparticles as potential vehicles for anticancer drugs. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* 98:169–221. (2015)
- FARRUGIA CA, GROVES MJ. Gelatin behaviour in dilute aqueous solution: designing a nanoparticulate formulation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 51:643–649. (1999)
- COESTER CJ, LANGER K, BRIESEN HV, *et al.* Gelatin nanoparticles by two-step desolvation: a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*; 17:187–193. (2000)
- AMBROSIO, J. A. R.; PINTO, B. C. S.; GODOY, D. S.; CARVALHO, J. A.; ABREU, A.S.; DA SILVA, B.G. M.; LEONEL, L. C.; COSTA, M. S.; BELTRAME JUNIOR, M.; SIMIONI, A. R.. Gelatin nanoparticles loaded methylene blue as a candidate for photodynamic antimicrobial chemotherapy applications in *Candida albicans* growth. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, v. 30, p. 1-15, (2019).
- BAJPAI AK, CHOUBEY J. Release study of sulphamethoxazole controlled by swelling of gelatin nanoparticles and drug-biopolymer interaction. *Journal of Polymer Science.* 42: 253–275. (2005)
- AHSAN, S. M.; Rao, C. M. Structural studies on aqueous gelatin solutions: Implications in designing a thermo-responsive nanoparticulate formulation. *International Journal of Biological Macromolecules* 95, 1126–1134. (2017)

20. LEO, E.; VANDELLI, M.A.; Cameroni, R.; Forni, F. Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process. *International Journal of Pharmaceutics* 155, 75–82(1997)
 21. VAGHASIYA, K.; RAY E.; SINGH, R.; JADHAV K.; SHARMA A.; KHAN, R.; KATARE, O.P.; VERMA, R. K. Efficient, enzyme responsive and tumor receptor targeting gelatin nanoparticles decorated with concanavalin-A for site-specific and controlled drug delivery for cancer therapy. *Materials Science & Engineering C* 123 (2021)
 22. BERTO, C., e DALZUCHIO, T. Nefrotoxicidade e resistência fúngica associadas à Anfotericina B: uma revisão comentada. *Saúde E Meio Ambiente: Revista Interdisciplinar*, 10, 141–157.(2021)
 23. HOSEINZADEH, E; MAKHDOUMI, P; TAHA, P; HOSSINI, H.; PIRSAHEB, M.; RASTEGAR, O. S. E STELLING, J. . A review of available techniques for determination of nano-antimicrobials activity, *Toxin Reviews*, (2016)
 24. CARLSON, T.; LUPINACCI, E.; MOSELEY, K.; CHANDRASEKARAN, S. Effects of environmental factors on sensitivity of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole and amphotericin B, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 368, Issue 7, (2021)
-

Aline C. de O. Silva, Thainara A. Gouvea, Jéssica A. R. Ambrósio, Priscila M. S. C. M. Leite, Flávia V. Moraes, Erika P. Gonçalves*

Laboratório de Tecnologia de Híbridos e Compósitos, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Av. Shishima Hifumi, nº2911, CEP 12244-000, Brasil. O

*E-mail: erika@univap.br