

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
MESTRADO PROFISSIONAL EM PROCESSAMENTO DE MATERIAIS

Aline Cristiane de Oliveira Silva

Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos para tratamento de patologias causadas por *Paraccocidioides brasiliensis*, *Criptococcus neoformans* e *Criptococcus gatti*

São José dos Campos
2022

Aline Cristiane de Oliveira Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de
Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do
Vale do Paraíba como requisito parcial para a
obtenção do grau Mestre em Processamento de
Materiais

Área de concentração: Materiais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Erika Peterson Gonçalves

São José dos Campos
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Silva, Aline Cristiane de Oliveira
Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos para tratamento de patologias causadas por Paracoccidioides brasiliensis, Criptococcus neoformans e Criptococcus gatti / Aline Cristiane de Oliveira Silva; orientadora, Erika Peterson Gonçalves. - São José dos Campos, SP, 2022.

52 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais.

Inclui referências


1. Processamento de Materiais. 2. Paracoccidioides brasiliensis. 3. Cryptococcus neoformans. 4. Cryptococcus gatti. 5. Anfotericina B, Sistema de liberação de fármacos. I. Gonçalves, Erika Peterson, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais. III. Título.

Eu, Aline Cristiane de Oliveira Silva, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.


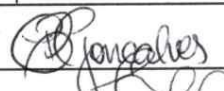
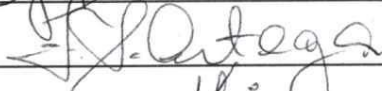


São José dos Campos, 1 de Agosto de 2022.



Autor(a) da Obra

ALINE CRISTIANE DE OLIVEIRA SILVA

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª ANDREZA RIBEIRO SIMIONI 
PROF.^ª DR.^ª ERIKA PETERSON GONÇALVES 
PROF. DR. FERNANDO DOS SANTOS ORTEGA 
PROF.^ª DR.^ª ANDRÉA DOS SANTOS LIU - IFSP 
DR. RICARDO MARIN RODRIGUES – Cirurgião Dentista/Odontologia Alto Padrão 

Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 05 de maio 2022.

Dedicatória

Todas as conquistas começam com o ato de acreditar que elas são possíveis, aos meus pais, meu filho, família e amigos, que sempre me deram esse voto.

AGRADECIMENTOS

Nesse momento que é tão especial para mim, não posso deixar de agradecer a Deus por me dar forças em dias que pensei que não tivesse, ânimo e coragem para completar essa jornada.

Deixo um agradecimento especial para a Universidade que me recebeu e me trouxe toda essa nova bagagem de conhecimento, para minha orientadora e aos professores que me deram recursos, ferramentas e exemplos para evoluir um pouco a cada dia dessa jornada.

Não poderia deixar de agradecer minha família, meus amigos e as pessoas que passaram pela minha vida ao longo dessa jornada, saibam que cada palavra de incentivo me entusiasmou e me deu forças para concluir essa excepcional fase de conhecimento e aprendizado.

RESUMO

A *Paraccocideoides brasiliensis* (Pb) foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1908 por Adolf Lutz, em sua descrição sobre a Pb ele cita as graves lesões causadas na boca em forma de ulcerações que destroem a gengiva, palato, repercutindo no sistema imune formando gânglios extremamente dolorosos, já o *Cryptococcus neoformans* (Cn)/*Cryptococcus gatti* (Cg) foram descritos em 1905 e se apresentam em lesões cutâneas, respiratória e disseminada. Para o tratamento da Paracoccidiodomicose (PMC) e Criptococose 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 (AB) também interage com a parede das células, tornando-se também um fármaco com alto poder de toxicidade. A incidência de nefrotoxicidade é próximo dos 60% dos casos, quanto maior os níveis séricos maior seu poder de destruição do tecido renal. Com todo esse histórico de toxicidade surge a necessidade de tornar os níveis séricos mais baixos, fizemos utilização de nanopartículas de gelatina e sistemas de liberação modificada, dessa forma a ação no tecido renal da Anfotericina B seria muito menor, podendo assim agir de forma mais concentrada no fungo, pois a quantidade de droga seria muito menor possibilitando pouca droga circulante. A escolha das nanopartículas de gelatina se deu pelo baixo custo da matéria prima e na facilidade de sua síntese, podendo ser aplicada em escala industrial. A gelatina permite a adsorção da AB em sua superfície e conforme o aumento da temperatura essa gelatina vai “abrindo” suas cadeias de forma lenta, liberando também o fármaco de forma lenta e posteriormente absorvida pelo organismo e não causando efeitos indesejados por se tratar de uma proteína natural. Neste trabalho 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 modificada de fármacos que foram caracterizadas por Microscopia de Varredura (MEV) e espalhamento de dinâmico de luz (DLS) onde foi confirmado a morfologia esférica das partículas com tamanho médio de 169,4 nm e 172,0 nm respectivamente para o sistema livre e encapsulado respectivamente. Por fim, a eficácia do sistema de liberação foi avaliado diante leveduras de *Paraccocideoides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* 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: *Paraccocideoides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatti*, Anfotericina B, Sistema de liberação de fármacos

Development of modified drug delivery systems for the treatment of pathologies caused by *Paraccocidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatti*

ABSTRACT

Paraccocideoides brasiliensis (Pb) was first described in Brazil in 1908 by Adolf Lutz, in his description of Pb he cites the severe lesions caused in the mouth in the form of ulcerations that destroy the gum, palate, reflecting on the immune system forming extremely painful ganglia, while *Cryptococcus neoformans* (Cn)/*Cryptococcus gatti* (Cg) were described in 1905 and present in skin lesions, respiratory and disseminated. For the treatment of Paraccocidioidomycosis (PMC) and Cryptococcosis some antifungals can be used, the choice of the drug is due to the degree of the disease, but the most widespread is Amphotericin B due to the mechanism of action and interaction with the fungus membrane, thus promoting its destruction. In the same proportion of fungal destruction, Amphotericin B (AB) also interacts with the cell wall, also becoming a drug with high toxicity power. The incidence of nephrotoxicity is close to 60% of cases, the higher serum levels, the greater their power of destruction of renal tissue. With all this history of toxicity arises the need to make the serum levels lower, we made use of gelatin nanoparticles and controlled release systems (DDS), so the action on the renal tissue of Amphotericin B would be much lower, thus being able to act more concentrated on the fungus, because the amount of drug would be much lower allowing little circulating drug. The choice of gelatin nanoparticles was given by the low cost of the raw material and the ease of its synthesis and can be applied on an industrial scale. Gelatin allows the adsorption of AB on its surface and as the temperature increases this gelatin "opens" its chains slowly, also releasing the drug slowly and subsequently absorbed by the body and not causing unwanted effects because it is a natural protein. In this work, gelatin nanoparticles were processed by the two-step desolvation method, which ensured the obtaining of particles with adequate size and shapes for application in controlled drug delivery systems that were characterized by Scanning Microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS) where the spherical morphology of particles with an average size of 169.4 nm and 172.0 nm respectively for the free and encapsulated system was confirmed respectively. Finally, the efficacy of the release system was evaluated against yeasts of *Paraccocideoides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatti* by Disk 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: *Paraccocideoides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatti*, Amphotericin B, Drug delivery system

ABREVIATURAS

FDA Food Drug Administration
IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry
NP Nanopartículas Poliméricas
Pb *Paraccoccideoides brasilienses*
Cn *Criptococcus neoformans*
Cg *Criptococcus gatti*
PMC Paracoccidioidomicoses
SNC Sistema Nervoso Central
AB Anfotericina B
NPG Nanopartícula de Gelatina
NPG-AB Nanopartícula de Gelatina com AB adsorvida
MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
DLS Espalhamento de Luz Dinâmico
PCR Reação em Cadeia da Polimerase
GTA Glutaraldeído
UV-Vis Espectrometria de Absorção
YPD Meio de crescimento levedura/peptona/dextrose
DR Droga Liberada
PDI Índice de Polidispersividade
EE Eficiência de Encapsulamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Paraccocidioides brasilienses	14
3.2 Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gatti	16
3.3 Anfotericina B	17
3.4 Sistema de distribuição modificada	21
3.5 Gelatina.....	25
3.6 Glutaraldeído	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Materiais	32
4.2 Métodos	32
4.2.1 Síntese das NPG e NPG-AB.....	32
4.2.2 Espectrometria de Absorção UV-Vis	34
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura: MEV	34
4.2.4 Espalhamento de Luz Dinâmico: DLS	35
4.2.5 Teste de Difusão em disco.....	35
4.2.5.1 Leveduras de Paracoccidioides brasiliensis.....	35
4.2.5.2 Leveduras de Cryptococcus spp.	36
4.2.5.3 Tratamento das leveduras de P. brasiliensis e Cryptococcus spp. com anfotericina B	36
4.2.6 Liberação de drogas in vitro	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Caracterização da morfologia das NPG e NPG-AB por MEV.....	38
5.2 Determinação do tamanho das NPG e NPG-AB por DLS	40
5.3 Estudo da efetividade da NPG-AB sobre as leveduras de Pb, Cn e Cg	43
5.4 Liberação de drogas in vitro	46
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A origem da nanociência e da nanotecnologia remonta meados do século XX, entre os diversos cientistas e estudiosos ligados à nanotecnologia nos tempos modernos pode ser citado o físico norte americano Richard Feynman, americano ganhador do prêmio Nobel de física, que já na década de 50 anunciava a importância do manuseio dos materiais em nível atômico ao sugerir que, em um futuro não muito distante, toda a enciclopédia britânica poderia ser armazenada na cabeça de um alfinete (BECHTOLD, 2011).

Já o conceito da nanotecnologia surgiu na década de 70 através de um pesquisador, Taniguchi (1974) dizia que a nanotecnologia consiste em processos de separação, consolidação e deformação de materiais a nível atômico ou molecular, onde as propriedades diferem significativamente daquelas em maior escala. A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar com potenciais e aplicações em quase todos os ramos da ciência e das tecnologias atuais (BECHTOLD, 2011).

Segundo a *Food Drug Administration* (FDA) e a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) “nano” é qualquer produto com propriedades ou fenômenos atribuíveis às suas dimensões nanométricas mesmo que essas dimensões saiam da faixa nanométrica de 1 a 100 nm (BATISTA; PEPE, 2014).

As Nanopartículas Poliméricas (NP) são essencialmente compostas por polímeros naturais ou sintéticos e de acordo com o método de obtenção elas adquirem estruturas distintas. As nanocápsulas que são constituídas por um núcleo líquido, do tipo reservatório, podendo ser oleoso ou aquoso, envolto por uma parede polimérica. Nesta estrutura a molécula a ser transportada pode estar enclausurada no núcleo ou adsorvida à parede polimérica. As nanoesferas possuem a matriz sólida composta por polímero, onde a substância carregada encontra-se molecularmente dispersa na matriz ou adsorvida nela (CARRARO, 2013).

O sistema utilizado nesse trabalho são as nanoesferas que terão o fármaco (AB) adsorvida nessa matriz polimérica de gelatina, produzindo assim um sistema de liberação modificada de fármacos, pode-se destacar o aumento do tempo de circulação do fármaco no sangue, permitindo o acúmulo em áreas patológicas com vascularização comprometida ou inflamadas, e o aumento da especificidade quanto ao local da ação, nesse caso fígado e rins (GARCIA, 2014).

Deste modo, a utilização de nanocarreadores para o tratamento de patologias causadas por infecções fúngicas tais como *Paracoccidoides brasiliensis* (Pb), *Cryptococcus neoformans* (Cn) e *Cryptococcus gatti* (Cg) são promissoras.

No que tange a infecção por Pb, o ser humano é um hospedeiro acidental, acreditava-se que a contaminação pela Pb se dava através da mucosa bucal devido a traumas causados pelo uso de fragmentos vegetais comumente usados na higiene bucal em zonas rurais, levando ao aparecimento de ulcerações na boca, mas com experimentos em animais comprovou-se que não é verdadeira essa possibilidade (PALMEIRO *et al.*, 2005).

A contaminação acontece na infância ou adolescência em zonas predominantemente rurais, com o pico entre 10 e 20 anos de idade com a apresentação dos sintomas na idade adulta entre 30 e 50 anos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017), a Paracoccidiodomicose (PMC), assim como outras doenças fúngicas, depende da interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro para evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando granulomatose crônica bucal e pulmonar (PALMEIRO *et al.*, 2005).

No caso de contaminação por Cn/Cg está associada as fezes de uma ave a *Columba sp*, esse fungo está disseminado em diversos ambientes e a taxa de morbidade e mortalidade é bastante alta em pessoas imunodeprimidas (NEVES *et al.*, 2019).

A criptococose acontece por inalação, infectando primeiro os pulmões, porém o fungo tem afinidade ao Sistema Nervoso Central (SNC) causando meningoencefalite em 70 a 90% dos casos, mas também acomete os pulmões, pele, ossos e gânglios linfáticos (DOS SANTOS; FIGUEIREDO, 2021).

A Anfotericina B (AB) foi descoberta em 1953, sendo comumente utilizada no tratamento de doenças fúngicas sistêmicas até os dias de hoje, mesmo sendo conhecida a sua toxicidade e o desenvolvimento e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos na década de 1980, a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica asseguram a efetividade da AB tanto para o tratamento das infecções fúngicas quanto para a profilaxia fúngica sistêmica (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Comumente sua administração deve ser por via endovenosa, por ser mal absorvida pelo trato gastrointestinal, é um medicamento muito eficaz; porém deve ser usado com muito cuidado devido a seus efeitos colaterais, principalmente pela sua nefrotoxicidade (GONÇALVEZ, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver as NPG/AB, caracterizar e avaliar a atividade antifúngica em Pb e Cn/Cg *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as NP com AB pelo método de dessolvatação em dois passos;
- Caracterizar a viabilidade das NPG/AB em formato por MEV;
- Caracterizar a viabilidade das NPG/AB em tamanho por DLS;
- Caracterizar a liberação de AB *in vitro*;
- Determinar a eficiência da formulação através de Teste de Difusão em disco.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PARACCOCIDIOIDES BRASILIENSES

A Pb se encontra no Reino Funghi, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onigenaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis*. A Pb é o agente etiológico da PCM que é uma micose muito comum na América latina (MOREIRA, 2008).

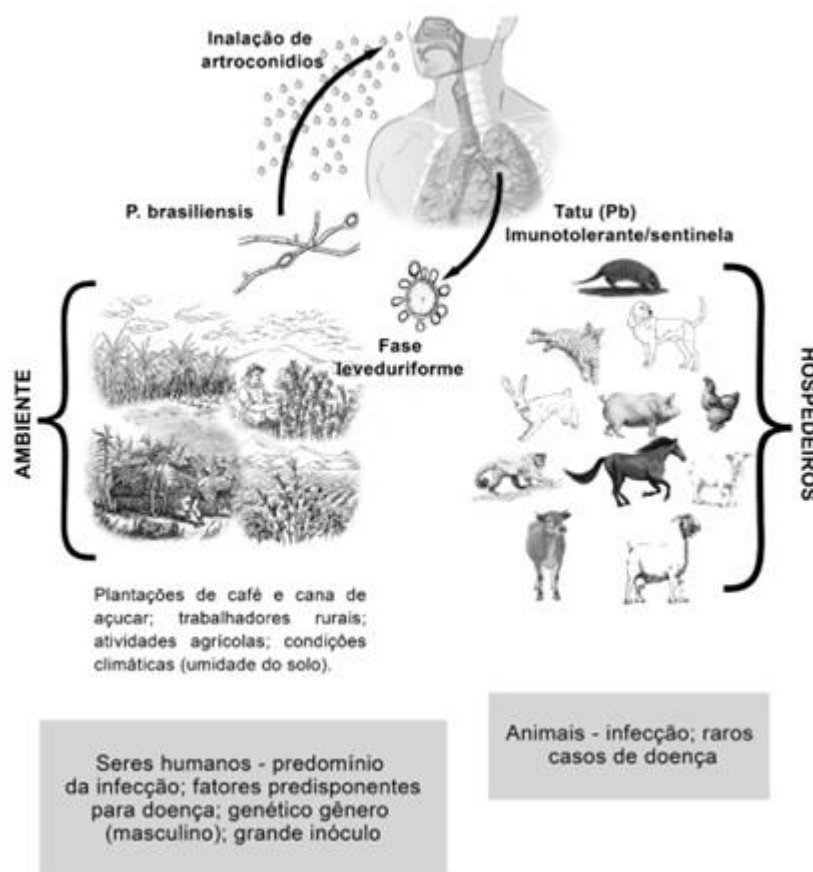
A Pb é um fungo assexuado que se comporta de forma diferente em temperaturas de 37 °C como leveduras de parede dupla e brotamentos, já no meio ambiente em torno de 25 °C encontra-se em formato de hifas septadas como fungos saprofíticos (PALMEIRO, *et al*, 2005). As áreas endêmicas situam-se em regiões de florestas tropicais ou subtropicais, com temperaturas médias entre 14 e 20 °C, precipitações pluviométricas entre 800 e 2.000 mm e umidade do ar relativamente alta. O Brasil possui o maior número de casos descritos de PCM, seguido da Colômbia, Venezuela e Guatemala, sua distribuição regional é heterogênea, com maior prevalência nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Amazônia, observando um aumento crescente de registros de casos nos estados da região Centro-Oeste e Norte associados ao avanço da fronteira agrícola nos limites da floresta amazônica (GOES *et al.*, 2014).

A maior incidência de Pb se dá em indivíduos do sexo masculino com idades médias entre 25 e 50 anos e que possuem histórico de trabalho agropecuário, etilistas, fumantes crônicos e com situação de higiene e socioeconômicas baixas. As condições de desenvolvimento da Pb não são claras por se tratar de um fungo saprofítico com características de crescimento no meio ambiente e em umidade com temperaturas entre 18 e 24 °C (PALMEIRO *et al.*, 2005), na Figura 1 está apresentado um esquema de como se dá a contaminação pela inalação de artoconídios e o ciclo da Pb.

Nas regiões onde a Pb predomina, acredita-se que mais de 10 milhões de pessoas já foram infectadas, no entanto muitos não apresentam sintomas clínicos da doença. Devido à dificuldade do isolamento do fungo, a literatura tem relatado o sucesso obtido no isolamento de Pb a partir de vísceras (fígado, baço, linfonodos e pulmões) do tatu de nove bandas (*Dasyus novemcinctus*), tem se utilizado, além das técnicas micológicas tradicionais (cultivo e isolamento de células leveduriformes), métodos moleculares, como a técnica de reação de

polimerase em cadeia (PCR), visando à amplificação do DNA empregando-se *primers* (MOREIRA, 2008).

Figura 1: Esquema ilustrativo da propagação da *P. brasiliensis*



Fonte: Fonte: Adaptado Shikanai-Yasuda *et al.* (2017).

De acordo com o trabalho de revisão *Scientia Médica* (PALMEIRO *et al.*, 2005) vários trabalhos foram realizados para saber a forma de contaminação e ao princípio cogitou-se a possibilidade de a porta de entrada ser a boca, pois uma das características são as lesões orais, mas como também acomete os pulmões essa hipótese foi descartada.

O boletim Paulista (MOREIRA, 2008) menciona uma descoberta de Gonzáles-Ochoa é que a contaminação das PCM se dá através do trato respiratório pela inalação das formas fúngicas chamadas de conídios, como observado na figura 1, com a temperatura corpórea e a umidade essas formas evoluem para um tipo parasitário pulmonar, e devido a uma disseminação hematolinfocitária as lesões cutâneas e mucosas seriam uma manifestação secundárias da doença.

Assim, a contaminação se dá na primeira idade, o organismo pode eliminar o fungo por fagocitose ou desenvolver a doença aguda, caso o fungo se hospede nos linfonodos e se manifeste de forma crônica isso se dará em idade adulta causando as lesões granulomatosas na mucosa oral ou na pele, tão características da contaminação pela Pb (GOES *et al*, 2014).

Em idade juvenil ela pode ocorrer em ambos os sexos na forma aguda, já a forma crônica da doença observa-se maior incidência em pacientes do sexo masculino maiores de 30 anos. Nestes casos ocorre a patologia em um órgão ou vários, além das manifestações granulomatosas. Os pacientes tendem a se queixar de insônia, debilidade, inapetência, disfagia, dispnéia, tosse, hemoptise, febre, perda de peso, prurido e ardor. As lesões da boca têm aspecto granular, eritematoso e ulcerado com pequenos pontos hemorrágicos como na estomatite, acometendo também os lábios, bochecha, assoalho bucal e acometendo os dentes causando perdas. Com a inalação as fossas e septo nasal são acometidos, porém a manifestação pulmonar é bastante inespecífica com sintomas de tosse e expectoração, levando também a doença pulmonar obstrutiva e até fibrose do tecido pulmonar (MARTINEZ, 2017).

Seu isolamento foi em meados de 1955 e inicialmente isolada do actinomiceto *Streptomyces nodosus*, e poucos medicamentos para doenças sistêmicas foram descobertos. Data de 1965 o primeiro medicamento aprovado pelo FDA utilizados em doenças fúngicas, essas enfermidades podem ser classificadas como superficiais e sistêmicas, e no caso a AB, tem sido a melhor escolha no tratamento de infecções sistêmicas (FILIPPIN *et al*, 2006).

3.2 CRIPTOCOCCUS NEOFORMANS E CRYPTOCOCCUS GATTI

O gênero *Cryptococcus* possui mais de 70 espécies de leveduras, a identificação do Cn/Cg se dá pela diferenciação morfológica, sua fase reprodutiva perfeita e pelas diferenças bioquímicas, apesar de serem duas espécies diferentes a fase leveduriforme não apresenta diferenças marcantes. As duas espécies só podem ser diferenciadas através de um teste canavanina-glicina-azul de bromotimol, o Cg terá o teste positivo devido a mudança de pH e pela coloração azul cobalto e o Cn teste negativo e sem coloração (SANTOS, 2018).

O *Cryptococcus* 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 (OLIVEIRA, 2012).

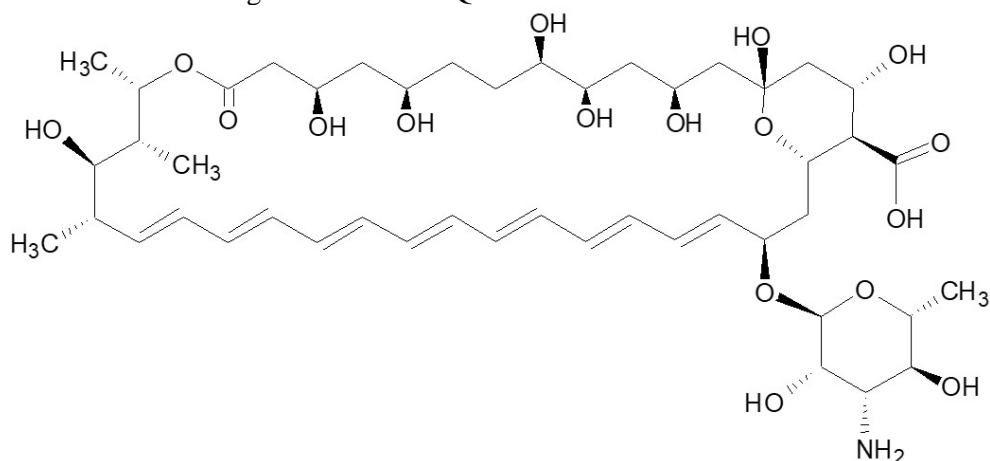
A criptococose não apresenta preferência por sexo ou raça, entretanto a contaminação é dada muito mais em adultos e raramente em crianças. A prevalência da levedura ocorre em ambientes isolados e muito rara a transição homem para homem e animal para animal, ou seja, ela é adquirida em fonte ambiente do fungo pela inalação das estruturas fúngicas de fezes de aves. A criptococose atualmente é considerada uma doença oportunista com alta mortalidade e morbidades em pacientes HIV positivo, a meningite criptocócica é a infecção por fungos mais comum no SNC e a terceira em casos de complicações neurológicas em pacientes HIV positivo (MEDEIROS, 2010).

Vários antifúngicos são utilizados no tratamento da Pb, Cn e Cg, a escolha se dá pelo estado do paciente pois o tratamento é longo e deve ser monitorado quanto a eficácia e resistência à droga utilizada, sendo as mais eficientes Itraconazol e a AB no caso da Pb e AB e fluconazol no caso de Cn/Cg (SALDANHA, 2012).

3.3 ANFOTERICINA B

Segundo Filippin *et al.* (2006), a AB é um composto de 37 átomos de carbono formando um anel macrocíclico fechado por lactonização, possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas não-substituídas (hepteno) e, na porção oposta, uma cadeia poli-hidroxilada com sete grupos hidroxila livres, o que lhe confere característica anfipática. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um grupo amino livre, formando uma cadeia lateral. A molécula tem aproximadamente 24 Å de comprimento, ou seja, o equivalente a meia camada de fosfolípídeo e sua massa molecular é da ordem de 924,1 g/mol⁻¹. A estrutura química da AB está apresentada na Figura 2.

Figura 2: Estrutura Química da Anfotericina B

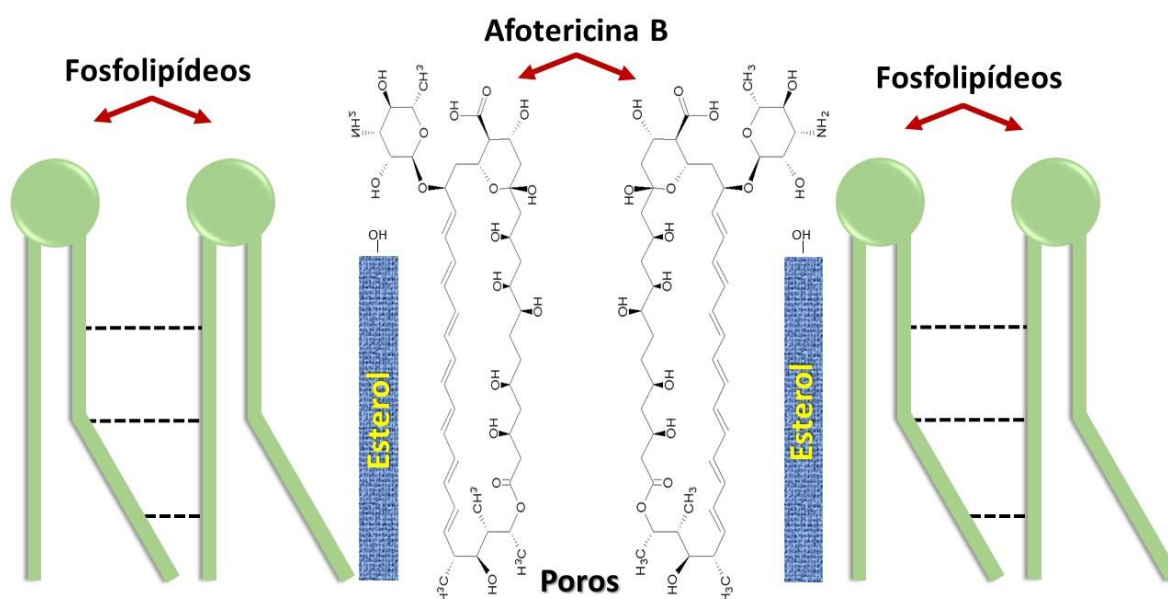


Fonte: A autora

O nome Anfotericina é derivado de sua característica e estrutura molecular anfotérica, conferindo a ela a capacidade de formar sais solúveis tanto em meio básico quanto em meio ácido, tem também a característica de ser pouco solúvel em vários solventes, como a água por exemplo. A AB tem melhor solubilidade em solventes apróticos (não possui átomo de hidrogênio), como dimetilsulfóxido e dimetilformamida.

O mecanismo de ação da AB está relacionado com a interação do ergosterol (componente da membrana celular dos fungos como colesterol nos humanos), dessa forma a AB formará pequenos furos na membrana do fungo aumentando sua permeabilidade e fazendo com que ocorram escape de íons e metabólitos, principalmente íons de potássio. Segundo Arruda *et al*, (2016), ligações intermoleculares de hidrogênio com grupos carboxila, amina primária e hidroxila, estabilizam o canal na forma aberta, e assim, o conteúdo plasmático pode ser liberado, levando à perda da atividade celular e eventualmente à morte celular, conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Representação esquemática da interação da AB com o ergosterol na bicamada lipídica da membrana celular do fungo.

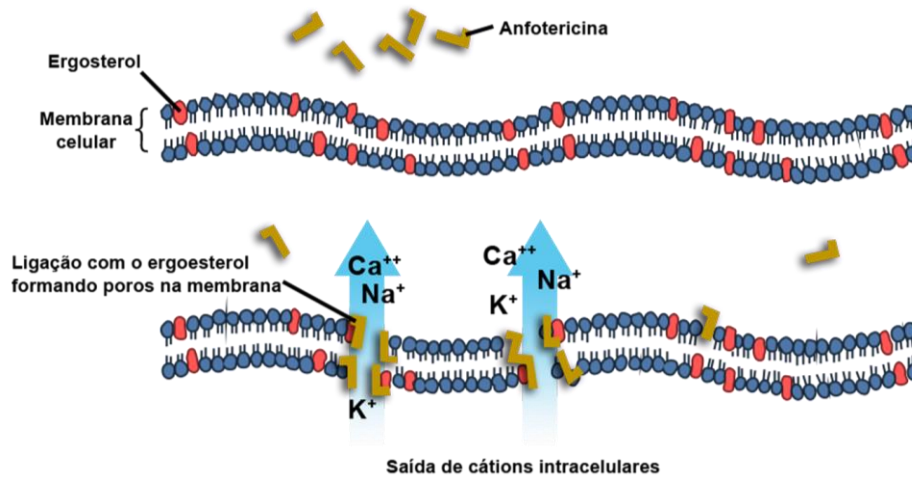


Fonte: A autora

Devido a afinidade da AB com o ergosterol, representado na Figura 4, o efeito tóxico que ela produz devido a sua afinidade ao colesterol, que está diretamente relacionado a membrana celular do ser humano, tornando-a extremamente nefrotóxica. Sua baixa solubilidade faz com que a sua administração tenha que ser via endovenosa, a atividade antifúngica é máxima na faixa de pH entre 6,0 e 7,5 podendo ter ação fungistática ou fungicida, dependendo da concentração plasmática e tecidual do antifúngico e da suscetibilidade do fungo.

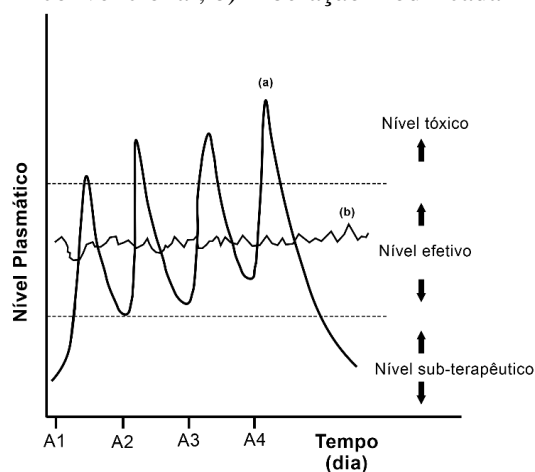
Segundo Filippin *et al.*, (2013), a AB possui amplo espectro de ação em relação fungos filamentosos, incluindo a Pb, Cn/Cg.

Figura 4: Mecanismo de entrada da anfotericina B na membrana do fungo e formação dos poros



As reações adversas da administração da AB são, febres, calafrios, tremores, náusea, vômitos e dor de cabeça, logo após sua administração e hipotensão, hipertensão e arritmia, hipocalcemia, hipernatremia, hipomagnesemia levando a disfunções renais e efeito tóxico na medula óssea. A forma conhecida de administração convencional dos fármacos libera muito rapidamente o princípio ativo ou terapêutico, para manter a concentração da droga normalmente são utilizados sistemas diluentes solúveis. Como pode ser observado na Figura 5, nos tratamentos convencionais a concentração da droga tem seu pico e posteriormente cai tendo a necessidade de nova administração para manter a concentração terapêutica na corrente sanguínea, o que ocorre é que altas concentrações podem ser tóxicas e baixas concentrações ineficazes e podem causar resistência ao medicamento.

Figura 5: Comparação das variações de concentração por diferentes métodos: a) Liberação convencional; b) Liberação modificada



Fonte: Adaptado de Bizerra *et al.* (2016).

3.4 SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO MODIFICADA

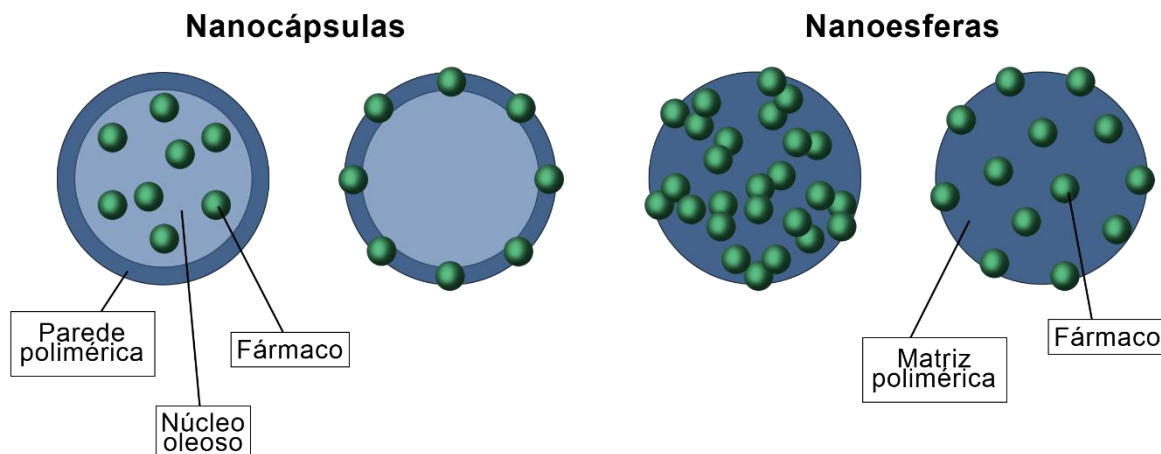
A nanotecnologia é promissora para mitigar problemas causados pelo uso de algumas drogas, e através da utilização de sistemas de liberação modificada ou DDS (Drug Delivery System), o que permite manter a faixa terapêutica por períodos prolongados (BIZERRA *et al.*, 2016).

Fahning e Lobão (2011) classificam os sistemas de liberação de fármacos em liberação retardada onde a liberação é feita em tempo diferente da sua administração, contendo duas doses do medicamento, uma para liberação imediata e outra com liberação modificada responsável por manter constante a concentração terapêutica em nível plasmático, por longo período, acima de 8 a 12 horas.

Segundo Silva (2019) os DDS trazem inúmeras vantagens se comparado aos sistemas convencionais de administração de fármacos, entre elas o melhor aproveitamento do fármaco, aumento de sua eficiência, bem como diminuição da toxicidade nos órgãos.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm , as nanopartículas poliméricas são classificadas em dois tipos de estruturas diferentes: nanocápsulas e nanoesferas, como mostra a Figura 6 (BIZERRA *et al.* 2016).

Figura 6: Representação de nanocapsula e nanofesfera polimérica



Fonte: Adaptado de Carraro (2013).

O termo NP aplicado à DDS refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, de acordo com a Figura 6, nanoesferas que são sistemas em que o fármaco se encontra disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica e nanocápsulas são sistemas do tipo reservatórios, onde é possível identificar um núcleo líquido ou sólido (FAHNING; LOBÃO, 2011).

Na Tabela 1 estão apresentadas as vantagens potenciais dos sistemas de liberação de fármacos e as formas convencionais de administração.

Tabela 1: Vantagens da liberação modificada de fármaco e administração convencional.

VANTAGENS	EXPLICAÇÃO
Menor flutuação dos níveis plasmáticos do fármaco	Velocidade de liberação modificada elimina os picos e valores dos níveis sanguíneos
Redução da frequência de administração	Produtos de liberação prolongada frequentemente liberam mais do que uma única dose e, portanto, podem ser tomados menos vezes do que as formas convencionais
Maior conveniência e adesão	Com menor frequência de administração, o paciente está menos susceptível a esquecer uma dose; também há maior conveniência em relação à administração diurna e noturna.
Redução nos efeitos colaterais	Devido ao aparecimento de picos de concentração sanguínea acima dos níveis terapêuticos e em níveis tóxicos, os efeitos colaterais são menos frequentes.
Redução nos custos globais com a saúde	Embora o custo inicial das formas farmacêuticas de liberação modificada possa ser maior do que o das formas convencionais, o custo global do tratamento pode ser menor devido a melhoria da eficácia terapêutica, redução de efeitos colaterais e redução do tempo requerido pelos profissionais de saúde para dispensar e administrar o medicamento e monitorar o paciente.

Fonte: A autora.

Na Tabela 2 vê-se as vantagens e desvantagens da utilização de DDS na administração de fármacos. Além das listadas na tabela 2 pode-se incluir como vantagem a adesão do paciente na terapêutica devido à redução no número e na frequência de doses necessárias para manter a resposta terapêutica desejada trazendo conforto ao paciente. Com a adesão correta os resultados no controle ou cura da patologia são mais promissores, minimizando e até eliminando sintomas indesejados. Além disso esta prática terapêutica gera economia nos custos do tratamento, apesar dos sistemas de liberação possam encarecer no início, o fato do tratamento ser mais curto e a quantidade da droga ativa administrada é menor e se levarmos em consideração uma menor hospitalização a economia é ainda maior (FAHNING; LOBÃO, 2011).

Tabela 2: Vantagens e Desvantagens das DDS e da administração convencional da AB

	VANTAGENS	DESvantagens
Anfotericina B	Amplo espectro antifúngico Baixo custo	Alta toxicidade
Anfotericina NPG	Amplo espectro antifúngico Menor toxicidade	Alto custo 10% de toxicidade

Fonte: A autora

Os polímeros eram escolhidos de maneira a provocar a mínima reação possível no tecido corpóreo. Dessa forma, o conceito de biocompatibilidade estava ligado à ideia de inerticidade, ou seja, o material não poderia interagir com as estruturas biológicas. Atualmente, uma nova visão aponta para sistemas capazes de se comunicarem com os tecidos, sem perda de viabilidade (RAMOS, 2018).

Na literatura se discute o uso de sistemas ditos biodegradáveis e não biodegradáveis, a biodegradabilidade não pode ser considerada necessariamente como uma exigência para a utilização do material, pois, uma vez que o polímero apresente biocompatibilidade, ou seja, não cause danos aos tecidos e células do organismo, sua utilização como um biomaterial pode ser plenamente justificada (RAMOS, 2018).

NP's são uma classe ampla de nanocarreadores, a mais importante classificação dessas NP's consiste em separá-las em dois grandes grupos: os sistemas vesiculares (nanocápsulas) e os matriciais (nanoesferas). Na tabela 3 observa-se os diversos polímeros naturais como gelatina, alginato e albumina que são utilizados para preparar as NP's, no entanto, eles têm desvantagens, como a difícil reprodutibilidade (DIMER *et al.*, 2013).

As principais técnicas de preparação das nanopartículas poliméricas são: polimerização *in situ*, polimerização interfacial, nanoprecipitação, deposição interfacial de polímero, emulsificação-difusão, emulsificação-evaporação de solvente, *salting out*, cocervação complexa e a utilizada nesse trabalho a dessolvatação em dois passos no caso de desenvolvimento das NPG (DIMER *et al.*, 2013).

Tabela 3: Polímeros utilizados em sistemas de liberação

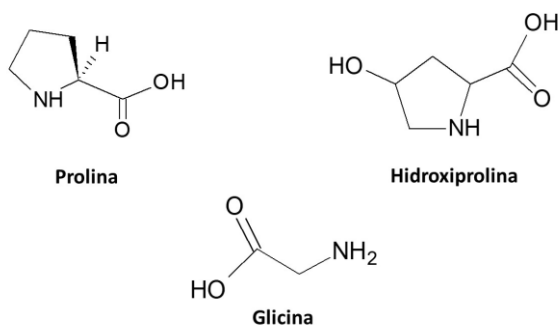
CLASSIFICAÇÃO	POLÍMEROS
Polímeros Naturais Polímeros a base de proteínas	Colágeno, albumina, gelatina.
Polissacarídeo	Agarose, alginato, carregenina, ácido hialurônico, dextran, quitosana, ciclodextrinas.
Polímeros Sintéticos Biodegradáveis Poliésteres	Poli(ácido lático), poli(ácido glicólico), poli(hidroxiubutirato), poli(e-caprolactona), poli(ácido β -málico), poli(dioxanonas)
Polianidridos	Poli(ácido sebático), poli(ácido adípico), poli(ácido tereftálico) e vários copolímeros.
Poliamidas	Poli(imino carbonatos), poliaminoácidos
Polímeros sintéticos não biodegradáveis	Carboximetil celulose, etilcelulose, celulose e acetato, celulose acetato propionato, hidroxipropil metil celulose
Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal
Polímeros Acrílicos	Polimetacrilatos, poli(metilmecacrilato), poli hidro(etilmecacriato)
Outros	Poli(ciano acrílicos), poliuretanos, éster poliorto, poli dihidropirans, policetais

Fonte: A autora

3.5 GELATINA

Dentre os polímeros citados na Tabela 3 a gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno, que é o principal constituinte de peles de animais, ossos, tendões e tecido conjuntivo, dependendo de como ela é produzida (proveniente de suínos, bovinos, aves ou peixes) essa gelatina é classificada em tipo A (ácido) e tipo B (básico). Como o colágeno, a gelatina é composta por 18 aminoácidos diferentes que estão unidos por ligações peptídicas na formação da molécula de gelatina, cujo peso molecular médio varia entre 20.000 a 250.000, dependendo do grau de hidrólise do colágeno. Uma gelatina típica contém 14 % de umidade, 84 % proteína e 2 % de cinzas, essa proteína consiste em uma mistura de aminoácidos, dos quais glicina, prolina e hidroxiprolina, estão presentes em maior abundância. Na Figura 7 estão representados esquematicamente esses aminoácidos.

Figura 7: Estrutura química dos aminoácidos Glicina, Hidroxiprolina e Prolina

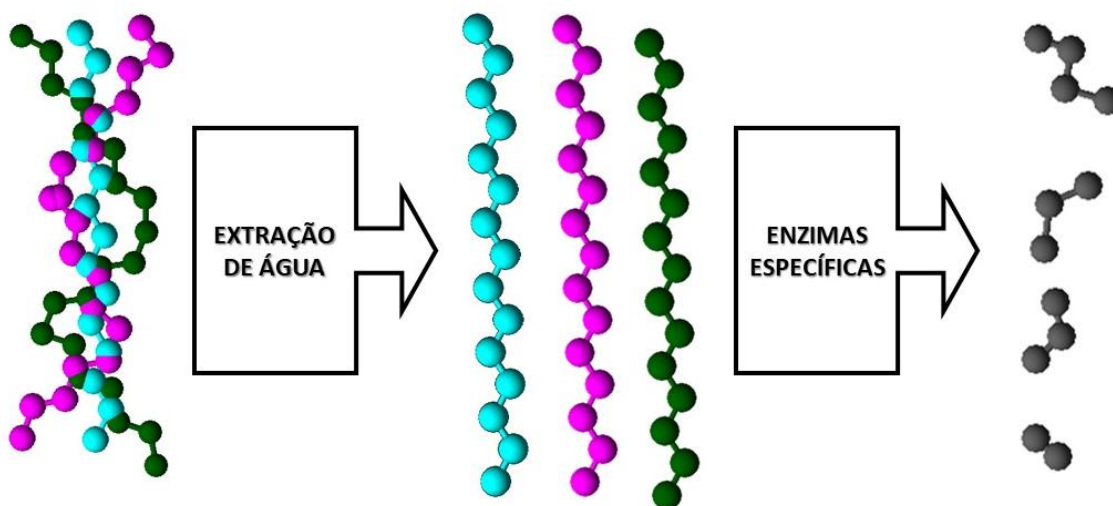


Fonte: A autora

As moléculas de gelatina contêm repetidas sequências de glicina-X-Y, onde X e Y são frequentemente os aminoácidos prolina e hidroxiprolina (MARFIL, 2010). Essas sequências são responsáveis pela tripla estrutura helicoidal da gelatina e pela sua capacidade de formar géis físicos (CARVALHO, 2017).

Por meio de um tratamento químico que resulta na quebra de ligações não covalentes gerando uma desorganização da estrutura da proteína que torna o colágeno solúvel são obtidas moléculas de gelatina. Tratamento térmico subsequente cliva as ligações covalentes e de hidrogênio para desestabilizar a estrutura em tripla hélice, como pode ser visto na Figura 8, resultando na conversão do colágeno em gelatina, cuja conformação será uma espiral aleatória (CARVALHO, 2017).

Figura 8: Formação da tripla hélice



Fonte: A autora

O grau de conversão do colágeno em gelatina está relacionado ao rigor do pré-tratamento e ao processo de extração com água morna, parâmetros como o valor do pH do meio, a temperatura e o tempo de extração também influenciam (GRAZIOLA, 2013).

As principais funções da gelatina são: texturização, formação de gel, ligação de água e como agente de efeitos de superfície, como emulsionante e formadora de espumas.

O comportamento físico e químico da gelatina é determinado, por um lado, pela sequência de aminoácidos das moléculas e pela estrutura espacial resultante e, por outro lado, pelas condições do ambiente, como pH, força iônica e reações com outras moléculas.

Muitos problemas podem ser solucionados com o uso da gelatina, tais como formação de géis termo reversíveis e elásticos; ajuste da propriedade de fluidez de emulsões; prevenção de coalescência e separação de fases em diferentes sistemas de emulsão, em que estão dispersos óleos e glóbulos de gorduras; prevenção da separação de fases em emulsões congeladas ou esterilizadas; prevenção da recristalização; formação de filmes e revestimentos; manutenção da aeração em emulsões e cremes; prevenção de sinérese; fornecimento de consistência e textura em produtos de baixo teor calórico; aprimoramento da aglutinação de gorduras em emulsões de carne e de massas; aumento da absorção de água em emulsões de carne; melhoramento das propriedades de batimento e de fusão em sorvetes; agente aglutinante de pós comprimidos e pastilhas (FERREIRA, 2013); e como no caso desse trabalho como sistema de liberação de fármaco.

Especialmente na área da saúde e da cosmética, a nanotecnologia encontra aplicações bastante importantes tais como o gerenciamento de ciclos de vida dos produtos através de tecnologias de liberação modificada. Durante as últimas décadas houve considerável interesse em desenvolver nanopartículas biodegradáveis para atuarem como vetores de medicamento e cosméticos. A liberação modificada de fármacos em um sítio específico de ação em dose terapêutica tem sido o maior objetivo no desenvolvimento de tais partículas (TRIERWEILER, 2009).

As propriedades das NP irão depender da sua aplicação em particular, a fim de alcançar um melhor desempenho o método de preparação é fundamental segundo Sahoo *et al.* (2015).

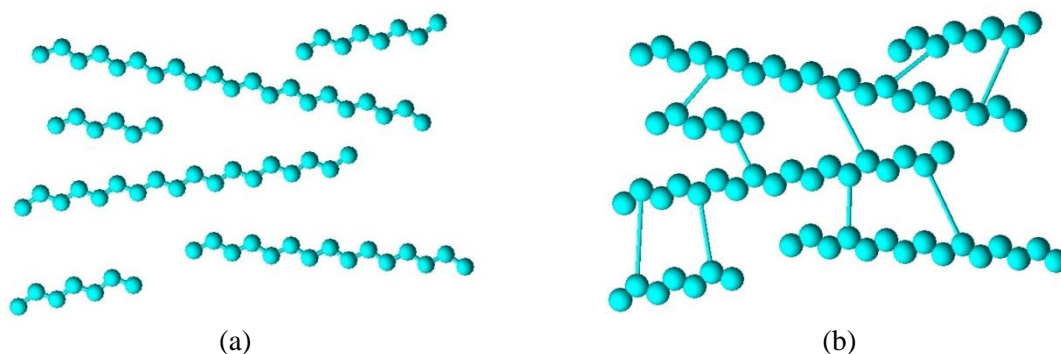
O processo de obtenção por dessolvatação em duas etapas tem sido a técnica mais utilizada na obtenção das NP, sendo esta técnica baseada na adição de um agente dessolvatante à solução aquosa de gelatina a fim de desidratar as moléculas de gelatina, resultando na mudança conformacional da hélice tripla (SAHOO, *et al.*, 2015).

Existe ainda os processos por automontagem onde por modificação química, a gelatina hidrofílica é quimicamente conjugada com moléculas hidrofóbicas para formar um polímero anfifílico. A gelatina modificada hidrofobicamente é capaz de sofrer mudança conformacional em meio aquoso para formar micelas como nanoesferas pela montagem, ou seja, onde os segmentos hidrofóbicos se agregarão para dentro formando um núcleo com uma camada externa hidrofílica. Já na automontagem por mistura simples, a droga e a gelatina são misturadas para formar as NP onde as ligações de hidrogênio são as responsáveis por fazer essa automontagem (SAHOO *et al.*, 2015).

A gelatina é um material bastante hidrofílico e, portanto, muito solúvel em água. Dessa forma, ao entrar em contato com os fluidos corporais, a gelatina funcionaria apenas como uma barreira física, sendo por isso, prontamente dissolvida e o fármaco liberado quase que instantaneamente. Isso não seria de forma alguma vantajoso, uma vez que a aplicação desejada exige a liberação da droga. Assim sendo, a reticulação das cadeias de gelatina faz-se necessária para aplicação na liberação de medicamentos já que uma vez reticulada, a gelatina carregada com o fármaco irá inchar, porém não dissolver, visto na Figura 10, permitindo a liberação gradual de sua carga (WAY, 2013).

Os mecanismos de reticulação podem ser classificados em intrahélice e interhélice. Nos mecanismos intrahélice os retículos são formados por ligações entre cadeias polipeptídicas nas mesmas hélices, influenciando a temperatura de desnaturação e estabilizando as regiões de tripla hélice. Já no mecanismo interhélice, os retículos são formados entre cadeia peptídicas de duas hélices adjacentes aumentando o peso molecular da gelatina afetando a flexibilidade, ainda vale salientar que a distância entre as moléculas de gelatina determinará o tipo de ligação que deve ocorrer (GRAZIOLA, 2013).

Figura 10: Esquema das reações de reticulação de um polímero, a) não reticulada, b) reticulada

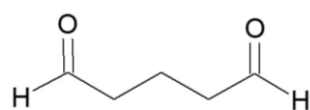


Fonte: A autora

3.6 GLUTARALDEÍDO

Hoje em dia o agente reticulante mais utilizado é o Glutaraldeído (GTA), Figura 11, sendo um dialdeído linear, líquido, de odor pungente, incolor ou levemente colorido, solúvel em água e solventes orgânicos, com baixo custo e facilmente encontrado em soluções ácidas com concentrações de 2 a 70% (GRAZIOLA, 2013). O mais aceito na literatura é que o GTA promove a reticulação da gelatina por meio de ligações entre seus grupamentos hidroxila e os grupamentos amina na gelatina (SCOPEL *et al.*, 2018), e formam uma base de Schiff com o meio em pH superior ao ponto isoelétrico da gelatina, sugerindo portanto, que quando o pH do meio é ácido (inferior ao ponto isoelétrico) as ligações covalentes se formam entre os grupos hidroxila da hidroxilisina e/ou hidroxiprolina e o GTA, dessa forma fica evidente a importância do pH na reticulação da gelatina quando aldeído, em especial GTA é utilizado (WAY, 2013).

Figura 11: Forma estrutural do Glutaraldeído (GTA)



Glutaraldeído

Fonte: A autora

O tamanho da NP é de grande impacto para sua absorção pelo organismo, quanto menores se apresentarem maior sua superfície de contato, maior poder de absorção e biodisponibilidade (PIAZZA, 2018).

Sendo a ordem de absorção da NP 2,5 superior quando comparada à uma micropartícula. Do mesmo modo, as NP permanecem circulantes por muito mais tempo quando comparado a uma partícula maior, sendo essa uma relação diretamente proporcional com a efetividade, ou seja,

com o aumento no tempo de circulação maior a efetividade da entrega direcionada e liberação sustentada. O tamanho do NPG depende dos efeitos de vários parâmetros de produção, como temperatura, pH, força iônica, concentração do agente de reticulação, velocidade de agitação, quantidade de agente de dessolvatação e natureza da gelatina usada, entre outros (SAHOO *et al.*, 2015).

O efeito da concentração do reticulador é fornecer estabilidade ao sistema, garantindo a manutenção da forma esférica, o tempo de circulação em comparação com partículas não reticuladas é muito maior, isso devido a abertura lenta das cadeias em temperatura corpórea. As NP não reticuladas são muito instáveis tendendo a agregar durante o armazenamento, levando a diminuição ou perda de eficácia até mesmo deteriorando o sistema (ASSIS, 2018).

O GTA é um reticulador não tóxico comparado a outros reticuladores, muito menos dispendioso e solúvel em soluções aquosas. A reticulação tem como habilidade modificar a propriedade dos polímeros, como estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência de quelação e capacidade de imobilização proteica e celular, ou ainda ligar suas cadeias às de outro polímero formando redes poliméricas (OLIVEIRA, 2013).

Os efeitos da temperatura nas NPG são bastante específicos, em temperatura de 25°C em meio líquido forma-se uma substância altamente viscosa, à medida que a temperatura é elevada a estrutura helicoidal começa a se desenrolar e a viscosidade da solução diminui formando um precipitado de NPG, porém o aquecimento não pode passar dos 40 °C, pois acima desta temperatura inicia-se o rompimento das cadeias poliméricas e das ligações de hidrogênio (SAHOO *et al.*, 2015).

A adição de agente dessolvante na solução de gelatina diminui a quantidade das moléculas de água que cercam as cadeias de gelatina e, conseqüentemente, reduz as ligações intermoleculares de hidrogênio, em um determinado ponto, a hidratação fica muito baixa e a gelatina é empacotada em cadeias e precipitam como nanopartículas. Agentes dessolvantes como o etanol e a propanona produzem bons efeitos em gelatina extraída de bovinos. As partículas dessolvadas com propanona tendem a serem menores quando comparadas às dessolvadas com etanol. Isso é devido a polaridade e a capacidade na formação das pontes de hidrogênio, quanto maior a polaridade do agente de dessolvatação é favorecida a produção de partículas cada vez menores. A propanona é um agente dessolvador polar aprótico e atua apenas com um hidrogênio aceitador de ligação, quanto menor o número de ligações menor será o tamanho da NPG (SAHOO *et al.*, 2015).

O pH afeta diretamente na solução, a gelatina é um biopolímero anfotérico e possui cargas positivas e negativas devida a classificação em A ou B, aumentando ou diminuindo o pH haverá aumento ou diminuição das cargas na solução de gelatina devido a ionização dos grupos carboxila (COOH) e amina (NH₂), sendo reportado na literatura que as soluções devem manter-se em pH 3 para a classificação A e pH 11 para classificação B (SAHOO *et al.*, 2015).

Outra característica das NPG é a alta capacidade de carreamento de drogas, vacinas entre outras substâncias, o que é resultado da incorporação da droga na matriz durante a preparação, ou a adsorção na superfície da NP preparadas. Essa capacidade leva para outra característica que é interessante para os sistemas de liberação de fármacos tendo efeito de liberação imediata da droga livre associada à superfície da partícula que ocorre sem controle do carreador e a outra forma é a liberação modificada e sustentada com difusão lenta da droga, o primeiro atrelado à fracas ligações covalentes e o outro com maior energia de ligação da reticulação controlando a liberação do fármaco (SAHOO *et al.*, 2015)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento do sistema de liberação modificada de Anfotericina B baseado em gelatina, assim como as análises realizadas para a caracterização do mesmo.

4.1 MATERIAIS

Para síntese das NPG utilizou-se, gelatina suína tipo A Bloom 300, água deionizada, propanona PA (Synth), caso necessário ácido clorídrico (HCl) 0,1M (mol/L) Synth para correção de pH e GTA, Anfotericina B (Sigma Aldrich).

Para o teste de difusão utilizou-se extrato de levedura, peptona, dextrose, ágar, papel filtro cortado em discos, placas de Petri, Becker, balão volumétrico, agulhas e seringas, azul de metileno (Sigma-Aldrich), água deionizada, as leveduras de Pb, Cn e Cg além de AB.

4.2 MÉTODOS

Os métodos aplicados para o desenvolvimento do sistema de liberação modificada baseado em gelatina para o tratamento de patologias geradas pelas PMC citadas nesse trabalho, e estão apresentados nos subcapítulos a seguir.

4.2.1 Síntese das NPG e NPG-AB

Nanopartículas de gelatina (NPG) foram preparadas por um método de dessolvatação em duas etapas relatado por Carvalho, *et al.* (2019), ambrósio, *et al.* (2019), Souza, *et al.* (2021) e Trindade *et al.* (2022), o método utilizado foi escolhido para a remoção ao máximo do agente reticulante (OLIVEIRA, 2015).

Brevemente, 200 mg de gelatina foram dissolvidos em 25 mL de água destilada sob aquecimento constante a $40^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após a total solubilização, adicionou-se rapidamente 25 mL de acetona como agente de dessolvatação, ocasionando a precipitação das moléculas de gelatina de alto peso molecular, que é utilizado devido as fortes ligações propiciadas pela reticulação (DUBIELA *et al.*, 2018). O sobrenadante foi descartado e as moléculas com mais

alto peso molecular de gelatina foram redissolvidas pela adição de 25 mL água destilada sob aquecimento e agitação magnética constantes.

AB dissolvido em 500 μL de DMSO foi adicionado na solução aquosa da fase polimérica, seguido de adição gota a gota de 75 mL de acetona para formar NP's. Imediatamente após o término do gotejamento da acetona adicionou-se 1,0 μL de uma solução aquosa de glutaraldeído (25% v/v) como agente de reticulação. O meio reacional foi mantido sob agitação por 60 minutos a temperatura ambiente.

A solução foi então incubada durante a noite em temperatura ambiente, a AB na concentração de 1 mg/mL. A AB não encapsulada foi removida por centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804 R) a 5000 rpm por 20 minutos e

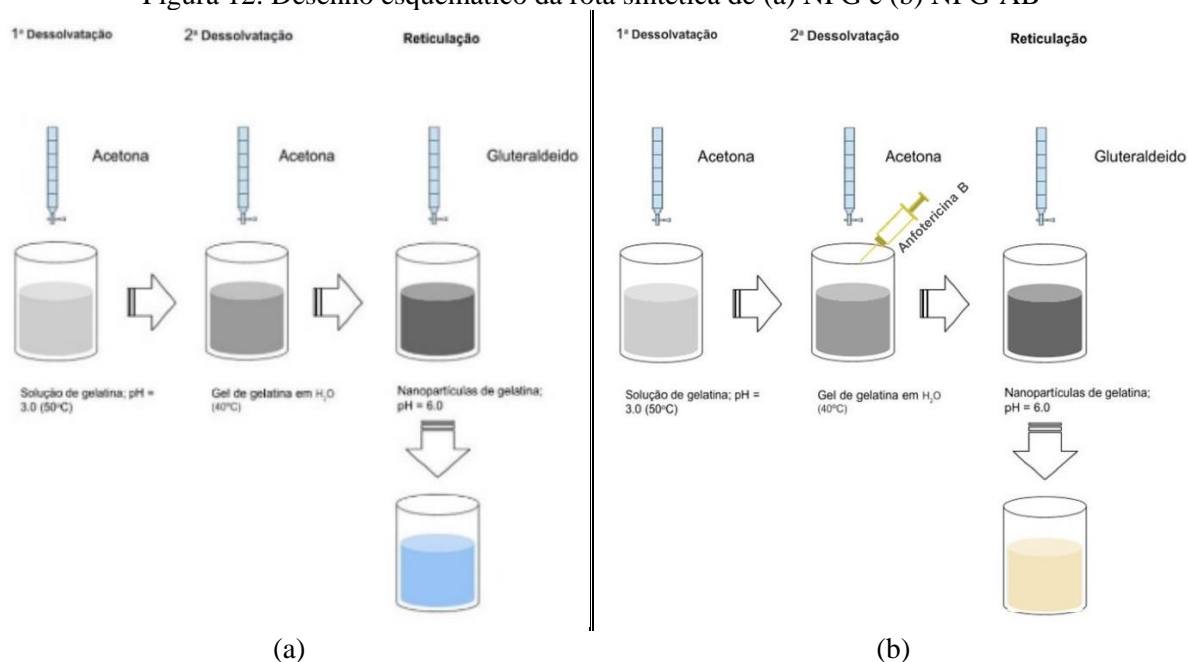
lavado três vezes com solução de acetona (75%). Posteriormente, o *pellet* foi suspenso com 2,5mL da solução de acetona (75%) e armazenado a 4°C. Este procedimento produziu as nanopartículas de gelatina encapsuladas com AB (NPG-AB).

A obtenção das nanopartículas de gelatina vazias (NPG) seguiu o protocolo descrito acima, excetuando-se o passo de adição da solução de AB no meio reacional.

Esquemáticamente, as rotas de obtenção estão apresentadas na Figura 12 (a) NPG e Figura 12 (b) NPG-AB.

A Figura 12 mostra esquematicamente a rota de síntese de nanopartículas de gelatina.

Figura 12: Desenho esquemático da rota sintética de (a) NPG e (b) NPG-AB



Fonte: A autora

A quantidade de AB nas partículas foi determinado por espectroscopia de absorção UV-Visível após o registro uma curva analítica usando o mesmo procedimento descrito por Siqueira-Moura, Lira e Santos-Magalhães (2010).

4.2.2 Espectrometria de Absorção UV-Vis

Para a determinação da curva analítica da Anfotericina B preparou-se uma solução estoque com concentração de 1mM a partir da qual foram preparadas soluções nas concentrações de 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ à 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, com intervalos de 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os ensaios foram realizados no espectrofotômetro Cary 50. Utilizando-se do software Origin 8.5 plotou-se as curvas obtidas no ensaio e calculou-se o coeficiente de correlação da reta. O coeficiente de Absortividade foi obtido plicando-se a Lei de Lambert-Beer, Equação 1.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Equação 1

Onde;

A: absorção do pico

ε : coeficiente de absortividade

b: caminho da cubeta

c: concentração da solução

Para a determinação da concentração de fármaco encapsulado nas nanopartículas realizou-se o ensaio de espectrometria de UV-Vis e aplicou-se a lei de Lambert-Beer.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura: MEV

O tamanho e a morfologia externa NPG e NPG-AB foi examinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pelo método de elétrons secundários em um microscópio EVO-MA10 (Zeiss) com filamento de tungstênio. Preparou-se a amostra para o ensaio em um porta amostras onde depositou-se de uma gota de solução dispersa sob ultrassom em quantidade mínima de água. Realizou-se a secagem pela evaporação do porta amostras sob temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida depositou-se a plasma fina película de ouro.

4.2.4 Espalhamento de Luz Dinâmico: DLS

Determinou-se a distribuição de tamanhos de partículas das NPG e NPG-AB pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizada no ZetaSizer Nano - ZS90 (Malvern). Para o ensaio preparou-se concentrações de 10 μM de cada uma das NPG's. Os dados obtidos foram plotados utilizando-se o Software Origin 8.5.

Com base na técnica de DLS foi possível determinar o tamanho médio da NPG de $169,4 \pm 39,8$ nm e nas NPG-AB de $172,0 \pm 37,7$ nm no ensaio, o índice de polidispersividade determinou a homogeneidade do sistema e o potencial Zeta demonstrando a estabilidade.

4.2.5 Teste de Difusão em disco

Os testes de difusão em disco foram realizados em Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* e em Leveduras de *Cryptococcus* spp. Os procedimentos experimentais estão descritos nos itens a seguir.

4.2.5.1 Leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*

Células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado 18, (Pb18) foram mantidas em tubos de vidro contendo meio YPD sólido, a 4°C. A cultura de leveduras foi obtida a partir da inoculação, de duas alçadas de leveduras, em 20 mL de meio líquido YPD (0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona, 0,5% de dextrose, esterilizado por autoclavação) e incubação por 4 dias, em agitação, à 36 °C. Para o início dos experimentos, as leveduras foram recolhidas por centrifugação (12.000 rpm, 10 minutos), lavadas 2 vezes em solução salina (0,9% NaCl, esterilizada por autoclavação). Para que as leveduras fossem desagrupadas, após lavagem as mesmas foram submetidas a duas passagens sucessivas por agulhas de diferentes calibres, 25x8 e 25x7 e a suspensão celular foi coletada após repouso de 5 a 10 min. A concentração celular foi obtida por contagem em câmara de Neubauer, na presença do corante vital azul de metileno, e foi ajustada com a mesma solução para 1×10^6 células/mL. Um mililitro de cultura contendo 1×10^6 células leveduriformes de Pb18 foi inoculado em placas de petri contendo 20 mL. As células foram espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Sobre as leveduras inoculadas foram

adicionados papéis 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.

4.2.5.2 Leveduras de *Cryptococcus* spp.

Células leveduriformes de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* 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 autoclavação) 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 autoclavação). A concentração celular foi obtida por espectrofotometria em comprimento de onda de 530 nm, e ajustada com a mesma solução para 1×10^6 células/mL. Um mililitro de cultura contendo 1×10^6 células leveduriformes de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* foram inoculados, individualmente, em placas de petri contendo 20 mL. As células foram espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Sobre as leveduras inoculadas foram adicionados papéis 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.

4.2.5.3 Tratamento das leveduras de *P. brasiliensis* e *Cryptococcus* spp. com anfotericina B

O tratamento com anfotericina B e com NPG-AB sobre as leveduras de *P. brasiliensis* e de (1×10^6 células/mL) foi realizado em diferentes concentrações das substâncias, a saber: 0,5 mg.mL⁻¹, 1,0 mg.mL⁻¹, 1,5 mg.mL⁻¹ e 2,0 mg.mL⁻¹, 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 36 °C (*P. brasiliensis*) ou 30°C (*Cryptococcus* spp.), por 4 e 2 dias respectivamente, tiveram os halos de inibição medidos e fotodocumentados.

4.2.6 Liberação de drogas *in vitro*

Para a liberação do fármaco *in vitro*, brevemente, 50 mg de partículas contendo AB foram dispersas em 50mL de solução salina tamponada com SDS 2%, pH 7,4, a 37°C. e em intervalos de tempo pré-determinados, uma alíquota (1,5mL) foi retirada, substituída pela nova e analisada por espectrofotômetro UV-Vis a 419 nm. A quantidade de droga liberada (DR) foi determinada pela equação:

$$DR (\%) = \frac{D_t}{D_0} \cdot 100$$

onde D_t (mg) representa a quantidade de droga liberada no tempo t , e D_0 (mg) a quantidade de droga carregada. Todos os estudos foram conduzidos em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados nas etapas:

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NPG E NPG-AB POR MEV

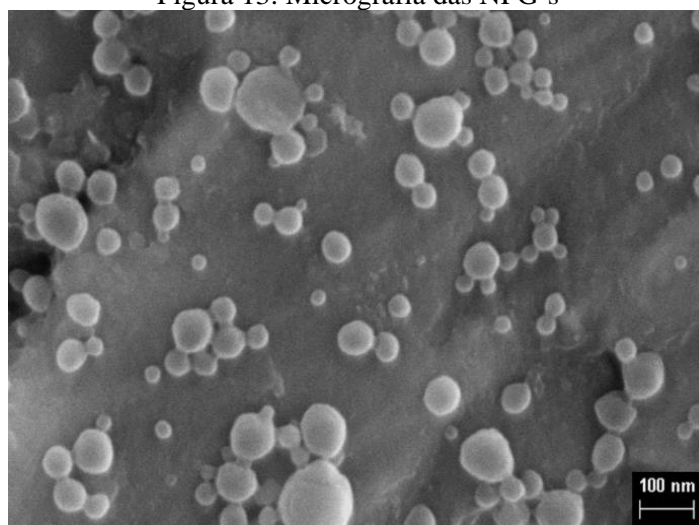
A utilização da gelatina suína na produção das NPG's apesar de sua baixa reprodutibilidade, foi definida devido às suas características de biocompatibilidade, elevado poder de absorção e interessante comportamento dos DDS no organismo, e baixo custo de produção. Acredita-se que o desenvolvimento destas partículas em larga escala possa ser promissor considerando-se os parâmetros definidos neste trabalho.

O procedimento experimental foi realizado no laboratório de Sistemas Micro e Nanoparticulados localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

Segundo estudos de Ahsan e Rao (2017) a desnaturação da gelatina é um fenômeno reversível e que a solubilização da mesma após a primeira etapa de dessolvatação confirma a capacidade da gelatina de se re-solubilizar após a remoção do agente de dessolvatação. O uso de menores quantidade de propanona na segunda etapa de dessolvatação é importante quando é necessário preservar a estrutura de trila hélice. Porém para a produção de nanopartículas de gelatina pelo processo de dessolvatação torna-se viável em níveis mais altos de acetonação.

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. A Figura 13 mostra a visão geral das amostras de NPG.

Figura 13: Micrografia das NPG's



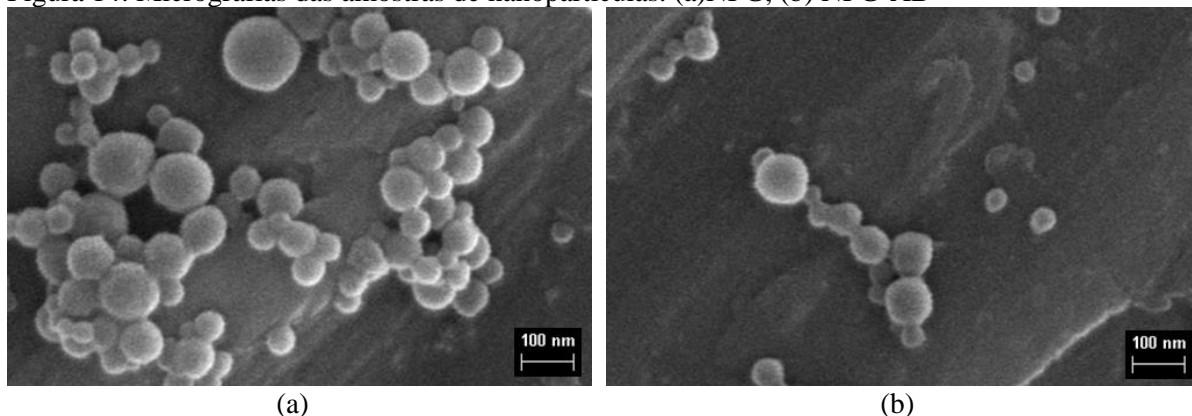
Fonte: a autora

Na imagem observa-se que as partículas formadas possuem formatos esféricos conforme previsto por Ambrosio *et al.* (2019) 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 Scopel, *et al.* (2018), 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 por meio de ligações entre seus grupamentos hidroxila e amina, conferindo 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 nanoesferas é dependente da concentração, deste modo a maior concentração inicial de gelatina, baixa concentração de acetona, 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. (AHSAN; RAO; 2017).

Observa-se que na Figura 14 detalhe das amostras de nanopartículas de gelatina (a) e as nanopartículas de gelatina encapsuladas com anfotericina B (b). Nesta imagem, assim como na Figura 13, observa-se que no processo de obtenção das formou-se partículas com ampla e monomodal distribuição de tamanhos o que pode ser confirmado pelo ensaio realizado por espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Figura 14: Micrografias das amostras de nanopartículas. (a)NPG, (b) NPG-AB



Fonte: A autora

5.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS NPG E NPG-AB POR DLS

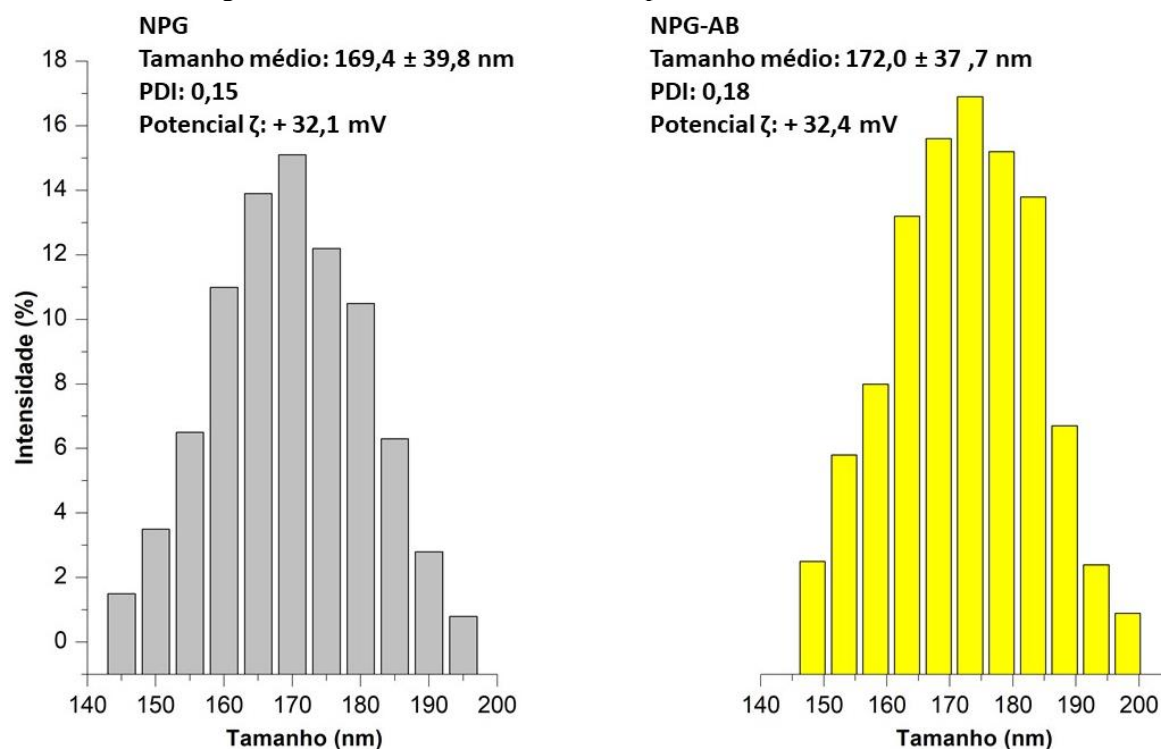
Os resultados das medições DLS mostram um pico monomodal e amplo de distribuição de tamanho de partícula para ambas as amostras apresentando diâmetro médio de $169,4 \pm 39,8$ e $172,0 \pm 37,7$ nm, para as NPG e NPG-AB respectivamente, o que mostra a uniformidade das partículas.

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 $0,15 \pm 0,01$ e para as NPG-AB encontrou-se um PDI de $0,18 \pm 0,02$ que mostra índices de polidispersividade monomodais e homogeneidade do sistema, Figura 15.

Em aplicações de entrega de drogas usando nanoformulações, um PDI de 0,3 e abaixo é considerado aceitável e indica uma população homogênea (VAGHASIYA et al., 2021).

A variação no tamanho e PDI dos sistemas carreadores nanoparticulados podem afetar o encapsulamento e liberação de fármacos (MUKHERJEE *et al*, 2008). A utilização da metodologia de dessolvatação em dois passos, as cadeias de gelatina com baixo peso molecular foram descartadas na primeira etapa de dessolvatação e, posteriormente, as moléculas de gelatina com elevado e uniforme peso molecular foram utilizadas para a produção das nanopartículas, o que garantiu o menor PDI, indicando que a dessolvatação em dois passos é recomendável para a obtenção de sistemas baseados em gelatina encapsulada com AB.

Figura 15: Resultados do ensaio de Espalhamento dinâmico da luz.



Fonte: A autora

O potencial de superfície das NPG foi encontrado em um valor de +32,1 mV e para as NPG-AB +32,4 mV, a carga positiva do potencial Zeta confere maior estabilidade na NPG (SALAZAR, 2015). Em ambos os casos o potencial manteve-se estável por 90 dias.

A quantidade de fármaco adsorvido nas partículas foi determinada por espectrometria de UV-Visível, a Figura 16 apresenta a curva analítica.

Detectou-se uma linearidade satisfatória para o método espectrofotométrico na faixa de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Análise da regressão de mínimos quadrados apresentou-se ótima com coeficiente de correlação ($r^2 = 0,99827$) e a equação da reta está apresentada na Equação 2.

$$y = 0,06165 \cdot x - 0,00629$$

Equação 2

A linearidade de um procedimento analítico é sua capacidade de obter resultados de testes que são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra. A correlação descreve o grau de associação entre duas variáveis, enquanto a regressão expressa a forma da relação entre as variáveis independentes e dependentes.

Quando ambas as variáveis são contínuas aleatórias, a correlação de amostra o coeficiente de Pearson, r , é a estatística usada para verificar apenas a correlação. A correlação coeficiente derivado de uma ausência de falta de ajuste deve ser superior a 0,9404 (GONZALES *et al.* 2006).

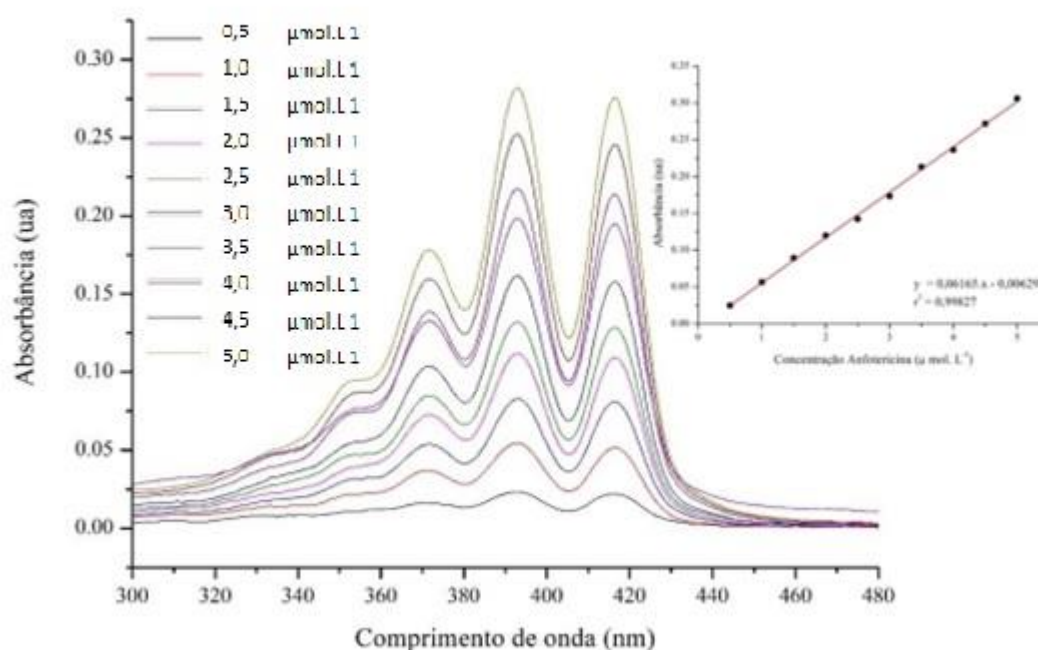
Com base no apresentado, o sistema nanoparticulado analisado pelo método espectrofotométrico mostrou excelente coeficiente de correlação ($r^2 = 0,99827$).

As NPG-AB foram caracterizados inicialmente no estado estacionário por espectroscopia de absorvância.

A cor característica do AB é causada por fortes bandas de absorção na região de 371 - 416 nm, sendo este último o pico característico para as análises.

O fármaco foi carregado na superfície das NPG's por adsorção e a eficiência de encapsulamento (EE) foi de 76% apresentando-se satisfatória.

Figura 16: Curva Analítica de Anfotericina

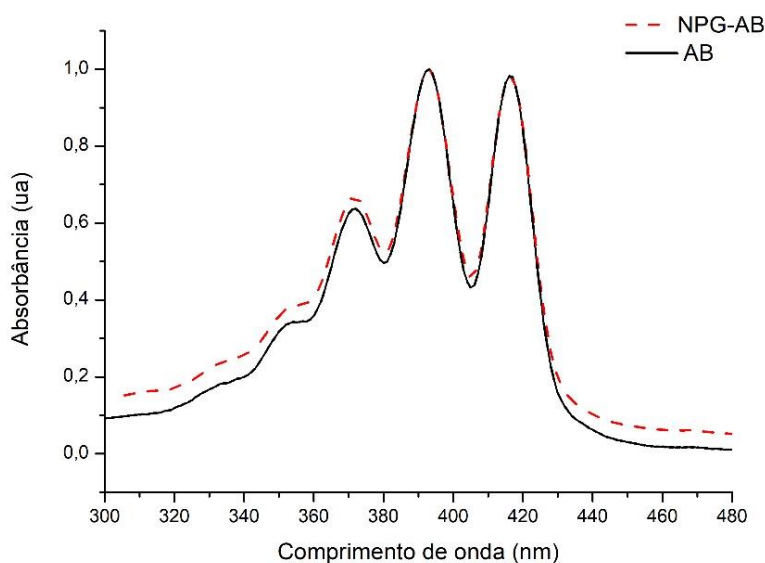


Fonte: A autora

Os espectros de absorção de NPG e NPG-AB ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) são mostrados na Figura 17.

A anfotericina B é um fármaco amplamente utilizado para o tratamento de patologias provenientes de leveduras de *P. brasiliensis* e *Cryptococcus spp.*

Figura 17: Espectro de Absorção das NPG-AB comparado ao espectro de absorção da AB



Fonte: A autora

Analisando o espectro da AB observamos que não houve alteração no comportamento físico-químico do fármaco, mantendo o espectro de absorção de 416 nm.

5.3 ESTUDO DA EFETIVIDADE DA NPG-AB SOBRE AS LEVEDURAS DE PB, CN E CG

Leveduras de *P. brasiliensis* e *Cryptococcus spp* 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. (BERTO *et al.*, 2021). 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.

No teste de difusão de disco, a difusão das formulações através de meios sólidos é usada para triagem de compostos antibacterianos. As formulações são colocadas em de fungos com alta produção de esporos, o efeito antimicrobiano, é reconhecido quando uma zona de inibição (halo) é exibida após 72 horas de incubação. O tamanho da zona de inibição indica as propriedades fungicidas das formulações, quanto maior o halo de inibição mais eficaz a ação da formulação estudada. Os ensaios *in vitro* realizados pela metodologia de difusão em disco

foram capazes de identificar a eficiência das formulações nanoestruturadas frente a eficácia já conhecida da AB livre.

Os resultados dos testes de difusão em disco estão apresentados na Figura 18 e na Tabela 4 apresentam a sensibilidade da difusão das formulações e determinam as propriedades destas perante as leveduras estudadas (HOSEINZADEH *et al.*, 2017).

As culturas dos fungos usadas para avaliar a eficácia das formulações apresentaram alta produção de esporos, sendo, assim, adequadas para o preparo dos inóculos.

No experimento com disco, conseguiu-se avaliar a influência da concentração de AB livre frente às concentrações iguais das formulações nanoestruturadas, os resultados foram avaliados através da aferição do halo de inibição das amostras.

Analisando-se as imagens apresentadas na Figura 18, 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 4. Somente os controles negativos localizados nos centros das placas (Figura 18) não apresentaram zona de inibição nessas condições.

Observa-se que, sobre leveduras de *Cryptococcus spp* todas as preparações AB e NPG-AB apresentaram efetividade de inibição a partir da concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, caracterizada pela formação de halos de inibição do crescimento fúngico igual ou superior a 9 mm. [CARLSON *et al.*, 2021] Porém, as leveduras de *Cryptococcus gattii* mostraram ser mais sensíveis aos dois tipos de preparações de Anfotericina B, exibindo halos maiores de inibição, quando comparados com as leveduras de *Cryptococcus neoformans*, para as concentrações de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Na concentração de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ as leveduras de *Cryptococcus neoformans* apresentaram a mesma sensibilidade para as duas preparações de Anfotericina B.

Tabela 4 – Halos de inibição do crescimento fúngico formados utilizando 10 μL de Anfotericina B Nanoestruturada (NPG-AB) e Anfotericina B Pura (AB) em diferentes concentrações sobre leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* (isolado 18), *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

	Concentração	AB	NPG-AB
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	0,5 mg/mL	7 mm	18 mm
	1,0 mg/mL	18 mm	19 mm
	1,5 mg/mL	17 mm	17 mm
	2,0 mg/mL	17 mm	20 mm
<i>Cryptococcus neoformans</i>	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
<i>Cryptococcus gattii</i>	0,5 mg/mL	13 mm	20 mm
	1,0 mg/mL	14 mm	19 mm
	1,5 mg/mL	15 mm	20 mm
	2,0 mg/mL	11 mm	15mm

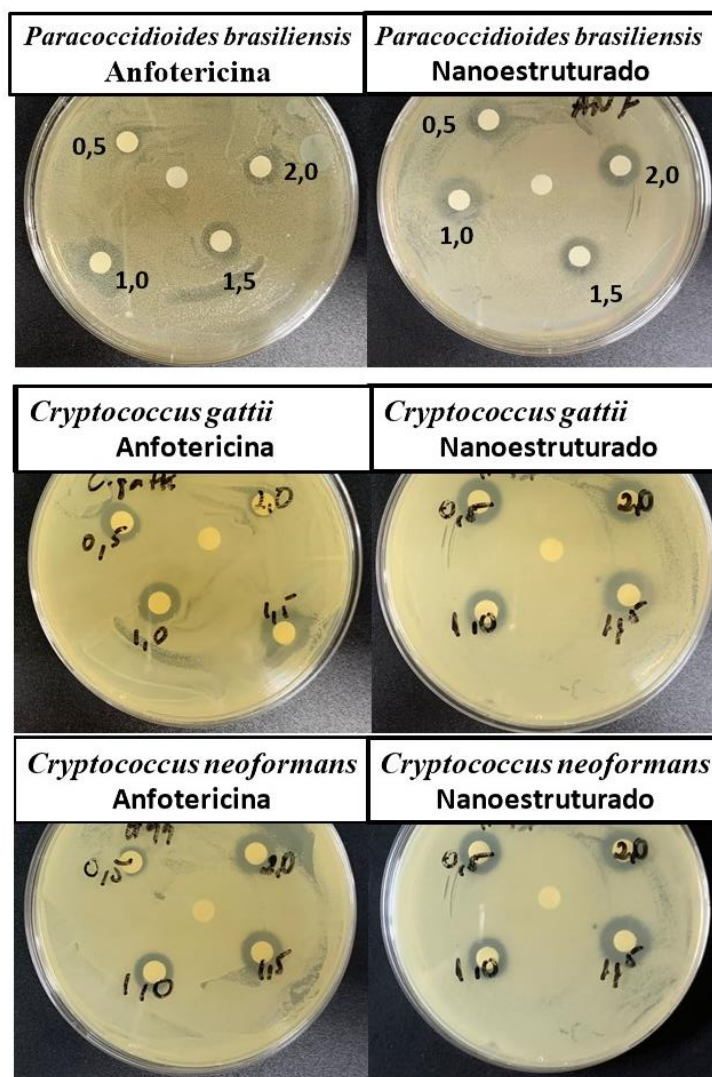
Fonte: A autora

Em relação as leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18 (Pb18), a atividade antifúngica das preparações de Anfotericina B foram semelhantes nas concentrações de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Porém, a Anfotericina B Nanoestruturada apresentou atividade antifúngica mais eficaz na concentração de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (18 mm de halo) quando comparada com a Anfotericina B pura (7 mm de halo) a qual não atingiu o tamanho de halo considerado efetivo pela literatura (RENZI *et al.*, 2021). Na concentração de $2,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Anfotericina B Nanoestruturada, também, apresentou diferença importante na mensuração do halo, quando comparada com a Anfotericina B pura sobre as leveduras de Pb18, 20 mm e 17 mm, respectivamente.

A comparação entre os dados da Tabela 4 e a Figura 18 mostra que os halos formados no ensaio utilizando a Anfotericina B Nanoestruturada apresentaram um diâmetro maior se comparado com os halos formados pela Anfotericina B Pura, ou seja, a concentração de $0,5 \text{ mg/mL}$ da NPG-AB se demonstrou mais efetiva comparado ao ensaio com a AB.

Com isso os efeitos tóxicos do fármaco serão menores com a utilização da AB nanoestruturada.

Figura 18 – Formação dos halos de inibição* de diferentes concentrações de Anfotericina B Nanoestruturada (NPG-AB) e Anfotericina B pura (NPG) sobre leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* (isolado 18), *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.



Legenda: * Teste de difusão em disco de diferentes concentrações de Anfotericina B Pura ou Nanoestruturada (aplicação de 10 μ L 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 *P. brasiliensis*, isolado 18, *C. neoformans* e *C. gattii*. Como controle negativo de AB, aplicação de 10 μ L de água esterilizada e como controle negativo de NPG-AB, aplicação de 10 μ L de NPG.

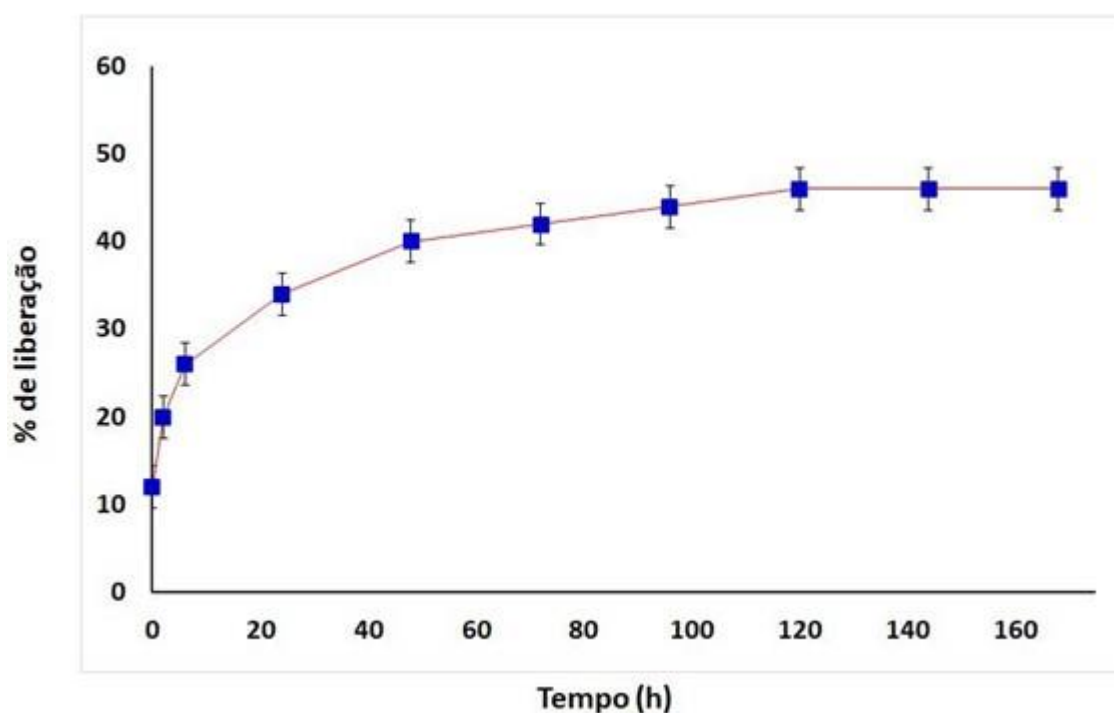
Fonte: A autora

5.4 LIBERAÇÃO DE DROGAS IN VITRO

O comportamento de liberação *in vitro* de AB no sistema nanoparticulado foi investigado. A formulação produziu um perfil de liberação de AB bifásico com efeito de explosão inicial em que a liberação de AB variou entre 34% no primeiro tempo de amostragem (24 h) para NPG-AB. Esta rápida liberação está relacionada à AB adsorvida na superfície das nanopartículas (MUSSARA, 2020) e/ou à liberação do fármaco encapsulado próximo à superfície das

nanopartículas. Após esta fase, uma baixa liberação constante de AB até 45% para NPG-AB, até 168 h, mostra uma típica liberação sustentada e prolongada do fármaco que depende da difusão do fármaco e dos mecanismos de erosão da matriz (VITORINO *et al*, 2018).

Figura 19 – Comportamento de liberação *in vitro* da Anfotericina B no Sistema Nanoparticulado.



Fonte: A autora

Ghosh *et al* (2017) sintetizaram nanopartículas de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, carregadas de anfotericina B para o tratamento da leishmaniose visceral. Os autores realizaram o estudo da liberação cumulativa da droga *in vitro* por 360 h e verificaram que $63,48\% \pm 1,08\%$ de anfotericina B foi liberado da formulação.

Saqib *et al* (2020) desenvolveram nanopartículas poliméricas carregadas de anfotericina B para o tratamento de infecções por Leishmania. Os autores relatam que houve liberação persistente do fármaco da nanoformulação em $\text{pH} = 7,4$ e aproximadamente 78% do fármaco encapsulado foi liberado em 48 h.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como proposta a síntese de nanopartículas de gelatina carregadas com anfotericina B para o tratamento das paracoccidiodomicoses, esperando assim o mínimo de efeito tóxico para o fígado e rins.

Visando o cumprimento dos objetivos específicos desse trabalho, a síntese das nanopartículas pelo método de dessolvatação em dois passos foi o método escolhido para obtenção destas e foi adsorvida a anfotericina B nessa nanopartícula.

Para caracterizar a viabilidade do formato dessas nanopartículas utilizamos a microscopia eletrônica de varredura, dessa maneira foi possível visualizar essas nanopartículas com e sem anfotericina B e confirmar a reticulação da gelatina.

Para avaliar o tamanho médio das nanopartículas utilizamos o DLS e assim verificamos que o tamanho de $169,4 \pm 39,8$ nm na nanopartícula sem anfotericina B e $172,0 \pm 37,7$ nm na nanopartícula com a anfotericina, e pudemos comprovar o tamanho do sistema e a uniformidade das partículas, a eficiência de encapsulamento foi de 76% apresentando-se satisfatória.

Já no estudo do comportamento da liberação da anfotericina B a formulação demonstrou o rápido início de liberação do fármaco, comprovando que a anfotericina está adsorvida na superfície da nanopartícula e que houve sua constante liberação ao longo de 168 horas.

No teste de difusão em disco, a concentração de 0,5 mg/mL da NPG-AB se demonstrou mais efetiva comparado ao ensaio com a AB, ou seja, os efeitos tóxicos do fármaco serão menores com a utilização da AB nanoestruturada.

Este resultado é promissor para a aplicação de sistemas de liberação modificados baseados em gelatina para o carregamento de Anfotericina B, pois a eficiência do sistema com menores concentrações indica que ocorrerá menores efeitos causados pelas reações adversas desta droga no sistema renal e hepático.

REFERÊNCIAS

- 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**, v. 95, p. 1126-1134, 2017.
- ALVES, S. M. M. **Desempenho e segurança da anfotericina B lipossomal (Ambisome) no tratamento de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana: Uma Série de Casos**. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.
- AMBROSIO, J. A. R. *et al.* 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, n. 14, p. 1356-1373, 2019.
- ARRUDA, Gustavo Julio Borges *et al.* Estratégias tecnológicas para formulações de anfotericina B em sistemas lipídicos disponíveis no mercado farmacêutico e outros promissores sistemas de administração. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 2, p. 59-67, 2016.
- ASSIS, Beatriz Alves. **Nanocosmetologia: Principais Nanoestruturas e suas Aplicações**. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em farmácia) Universidade Plesbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2018.
- BATISTA, Ariane de Jesus Sousa; PEPE, Vera Lúcia Edais. Os desafios da nanotecnologia para a vigilância sanitária de medicamentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, p. 2105-2114, 2014. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014197.02462013>
- BECHTOLD, M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poliuretânica hidrossolúvel**. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- BERTO, C.; DALZUCHIO, T. Nephrotoxicity and fungal resistance associated with Amphotericin B: a commented review. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 10, p. 141-157, 2021.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: mecanismos e aplicações. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.
- CARLSON, T. *et al.* Effects of environmental factors on sensitivity of cryptococcus neoformans to fluconazole and amphotericin B. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 7, p. fnab040, 2021.
- CARRARO, T. C. M. M. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B**. 2013. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UNICENTRO – PR, Guarapuava, 2013.

CARVALHO, F. C. *et al.* Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos: propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 24, n. 2, p. 203-213, 2014.

CARVALHO, Isadora Cota. **Hidrogéis Híbridos Poliméricos de Quitosana Funcionalizada e Gelatina Fotoreticulados como Matrizes Porosas Tridimensionais para Potencial Reparo de Tecido Epitelial**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2017.

CARVALHO, J. A. *et al.* Preparation of gelatin nanoparticles by two step desolvation method for application in photodynamic therapy. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 29, n. 11, p. 1287-1301, 2018.

CARVALHO, J. A. *et al.* Functionalized photosensitive gelatin nanoparticles for drug delivery application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 30, n. 7, p. 508-525, 2019.

CARVALHO, J. A. *et al.* Síntese de nanopartículas de gelatina por dessolvatação em dois passos para aplicação em terapia fotodinâmica. **Revista UNIVAP**, São José dos Campos, v. 22, n. 40, p. 165, 2016.

CORRÊA, E. A. Identificação, resistência e sensibilidade de cepas de *Cryptococcus neoformans* e de *Candida sp*, presentes em excretas de pombos no Município de Porto Velho, RO, Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, Rio Branco, v. 6, n. 1, p. 652-661, 2019.

DE SOUZA, C. *et al.* Polyelectrolytic gelatin nanoparticles as a drug delivery system for the promastigote form of leishmania amazonensis treatment. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 32, n. 1, p. 1-21, 2021.

DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, p. 1520-1526, 2013.

DIMER, Frantiescoli A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, p. 1520-1526, 2013.

DOS SANTOS, E. F.; FIGUEIREDO, E. F. G. Criptococose: consequência da infecção por *Cryptococcus neoformans* em pacientes com AIDS no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e150101522591, 2021.

DUBIELA, P., *et al.* Síntese e Estabilização de Nanopartículas de Ouro Utilizando Gelatina tipo A e B. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 27., ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA JÚNIOR, 7., 2018, Maringá. **Anais [...]**. Maringá: UEM, 2018. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2018/anais/artigos/2638.pdf>

FAHNING, Bárbara Mathias; LOBÃO, Elyomar Brambati **Nanotecnologia Aplicada a Fármacos**. 2011. Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia), Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, ES, 2011.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical Biomedical Research**, Porto Alegre, v. 35. p. 65-82, 2015.

- FERREIRA, Carina Torres Garruth. **Nanopartículas Poliméricas para Inclusão de Compostos de Origem Natural**. 2013 Monografia (Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia), Instituto Federal do Rio de Janeiro, Campus Realengo, Rio de Janeiro, 2013.
- FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v. 42, p. 167-194, 2006.
- GARCIA, F. M. Nanomedicina e terapia de doenças pulmonares. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, p. 531-533, 2014.
- GHOSH, S. *et al.* Amphotericin b-loaded mannose modified poly(D, L, lactide-co-glycolide) polymeric nanoparticles for the treatment of visceral leishmaniasis: *In vitro* and *in vivo* approaches. **Royal Society of Chemistry**. p. 29575-29590. 2017
- GOES, A. M. *et al.* Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): etiologia, epidemiologia e patogênese. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 24. p. 61-66, 2014.
- GONÇALVES, A. H. **Mecanismo de ação e toxicidade da anfotericina b no tratamento de micoses**. 2011. 29 f. Monografia (Curso de especialização em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, Belo Horizonte, 2011.
- GONZÁLEZ, A. G. *et al.* The correlation coefficient attacks again. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, n. 5, p. 256-258, 2006.
- GRAZIOLA, Fabiana. **Obtenção e caracterização de microesferas de gelatina reticuladas com flavonoide para aplicação em fotoprotetores**. 2014. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/D.9.2014.tde-03112014-083806. Acesso em: 2022-09-12.
- HOSEINZADEH, Edris *et al.* A review of available techniques for determination of nano-antimicrobials activity. **Toxin Reviews**, v. 36, n. 1, p. 18-32, 2017. DOI:10.1080/15569543.2016.1237527
- IOCCA, D. C. **Síntese, caracterização, estabilidade e efeitos biológicos *in vitro* de nanopartícula magnética associada a anfotericina b**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- LEO, E. *et al.* Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: involvement of the drug in the cross-linking process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 155, n. 1, p. 75-82, 1997.
- LOPES, C. M. ; LOBO, J. M. S. ; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 143-154, 2005.
- MARFIL, Paulo Henrique Mariano. **Estudo reológico de sistemas gelatina/colágeno/amido para obtenção de géis e aplicação dietéticas de gelatina**. 2010. 126 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2010.

MARQUES, S. A. Paracoccidiodomicose: centenário do primeiro relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 271-273, 2008.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidiodomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MEDEIROS, C. S. Q. **Criptococose experimental e efeito de drogas antifúngicas**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

MENDES, R. P. *et al.* Paracoccidiodomycosis: current perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224, 2017.

MOREIRA, A. P. V. Paracoccidiodomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, p. 11-24, 2008.

MUDASSARA, S. *et al.* Amphotericin b loaded polymeric nanoparticles for treatment of leishmania infections. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 1152, 2020.

MUKHERJEE, B. *et al.* Preparation, characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 4, p. 487, 2008.

NOGUEIRA, A. L. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata para aplicação no desenvolvimento de membranas de poli (L-ácido-lático) com propriedades antibacterianas. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS DA UNIVILLE**, 22., 2016, Joinville, SC. **Anais [...]**. Joinville: UNIVILLE, 2016. p. 2679-2690.

OLIVEIRA, A. B. S. **Tratamento da criptococose e resistência antifúngica ao *criptococcus sp.*** 2012. 31f. Monografia (Especialização em Análise Clínica), Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2012.

OLIVEIRA, Camila Areias de. **Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina**. 2015. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/T.9.2016.tde-22122015-091834. Acesso em: 2022-09-13.

PALMEIRO, M. *et al.* Paracoccidiodomicose: revisão da literatura. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 274-278, 2005.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-33, 2018.

PIAZZA, Rodolfo Debone. **Click Hidrogéis de Gelatina e Nanopartícula Polimérica como Plataforma de Liberação Simultânea de Fármacos Hidrofílico e Hidrofóbico**. 2018. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2018.

PINTO, B. C. S.; AMBROSIO, J. A. R. **Síntese e caracterização fotofísica de nanopartículas de gelatina incorporadas com azul de metileno para aplicação em terapia fotodinâmica**. 2019. Monografia (Graduação em Química) – UNIVAP, São José dos Campos, 2019.

RAMOS, I. M. F. C. **Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central**. 2018. 241 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

RENZI, D. F. *et al.* Nanoparticles as a tool for broadening antifungal activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1841-1873, 2021.

SAHOO, N. *et al.* Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 317-331, 2015.

SALAZAR, M. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**. 2015. 85f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2015.

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.

SANTOS, Fábio Brito dos. **Estudo ambiental, caracterização molecular e estratégia de vigilância dos agentes da criptococose na microrregião do Rio Negro no estado do Amazonas**. 2018. 138 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

SAQIB, Mudassara *et al.* Amphotericin b loaded polymeric nanoparticles for treatment of leishmania infections. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 1152, 2020.

SCOPEL, Bianca Santinon *et al.* Reticulação de filmes poliméricos de gelatina e amido pela adição de glutaraldeído: efeito das diferentes condições de secagem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 22., 2018, São Paulo. **Anais [...]**. São Paulo: Blucher chemical engineering proceedings, 2018. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/196899/001089749.pdf?sequence=1>

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

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidiodomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.]. v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>. Doi: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>.

SILVA, Alaine Maria dos Santos. **Nanopartículas biodegradáveis e biocompatíveis para liberação modificada de benzimidazol**. 2019. 102f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

SIQUEIRA-MOURA, Marigilson Pontes de; LIRA, Mariane Cajubá Britto; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 621-628, 2008.

SOUZA, R. M. **Utilização da nanoemulsão lipídica no tratamento experimental da leishmaniose cutânea**. 2019. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências de Doenças Infecciosas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

TRIERWEILER, Luciane Ferreira. **Nanopartículas: Como produzi-las em uma Escala Industrial**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

TRINDADE, A. C. *et al.* Gelatin nanoparticles via template polymerization for drug delivery system to photoprocess application in cells. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 33, p. 551-568, 2022.

VAGHASIYA, K. *et al.* 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 and Engineering C**, v. 123, p. 112027, 2021.

VITORINO, L. **Novos fotodispositivos para a liberação de anfotericina B**. In: Reunião Anual da SBPC, 70 – UFAL – Maceió, AL, 2018.

WAY, D. V.; **Estudo da reação de produção de partículas de gelatina para aplicação na liberação controlada de doxiciclina**. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.