

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTABILIDADE E EFEITOS  
BIOLÓGICOS *in vitro* DE NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA  
ASSOCIADA A ANFOTERICINA B**

**DIÊGO CESAR IOCCA**

**BRASÍLIA - DF  
2013**

**DIÊGO CESAR IOCCA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTABILIDADE E EFEITOS  
BIOLÓGICOS *in vitro* DE NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA  
ASSOCIADA A ANFOTERICINA B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Pereira Garcia

**Co-orientado:** Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

**BRASÍLIA - DF**

**2013**

*Dedico esta dissertação aos meus pais Luis e Lourdes que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando de maneira incondicional. Eles sempre serão meus exemplos de determinação, dedicação, carinho e amor!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e Nossa Senhora, que iluminam meus passos.

Aos meus pais, que sempre proporcionaram aos seus filhos uma educação baseada em princípios morais e dignos.

Aos meus irmãos Emerson e Victor, por serem grandes companheiros, incentivadores e ouvintes em todos os momentos.

A minha paixão, Aline, por todo amor e companheirismo durante todos esses anos, sempre me recebendo de braços abertos principalmente nos momentos mais nebulosos.

A minha cunhada Gabriela, por todas as risadas que desfrutamos juntos e pela “coisinha” mais linda que é minha afilhada, Iara.

A professora Mônica, por todos os ensinamentos durante os últimos cinco anos. Mais do que orientadora, ela se tornou uma amiga que admiro em demasia. Sinto-me honrado por ser seu primeiro orientando de mestrado.

Aos amigos Ludmilla, José, Michelly e Karen, por todo o suporte, reflexões e ensinamentos. Esse quarteto foi parte fundamental dessa dissertação.

Ao meu amigo Anderson Brito, por toda ajuda nas inúmeras ilustrações.

Aos amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia pelo ambiente de trabalho harmonioso.

Aos amigos da graduação em Ciências Biológicas, por todos os maravilhosos momentos que compartilhamos juntos.

As Professoras Sônia, Emília e Anamélia, por manterem seus laboratórios sempre de portas abertas.

Ao CNPq, à FAP/DF, à CAPES e ao INCT de Nanobiotecnologia, pelo fomento dos estudos em nanotecnologia.

A todos que direta ou indiretamente, ajudaram no desenvolvimento desse estudo e contribuíram no meu crescimento profissional e pessoal.

“Insanidade é ficar fazendo sempre as mesmas coisas e esperar um resultado diferente.”

Albert Einstein

## RESUMO

A nanotecnologia proporcionou o aumento de pesquisas em sistemas de entrega de drogas. Entre eles, os fluidos magnéticos (FM) mostram várias vantagens, tais como biocompatibilidade e biodegradação. FM são constituídos por nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas em suspensão num fluido carreador. Nanopartículas magnéticas (NPMs) de maguemita estão entre as mais utilizadas em aplicações médicas. Anfotericina B (AmB) é o agente antifúngico mais utilizado no tratamento de casos graves da Paracoccidioidomycosis (PCM), a qual é uma micose sistêmica nativa na América Latina, tendo como agente etiológico é o fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Infelizmente, a AmB causa graves efeitos adversos (principalmente nefrotoxicidade) após administração intravenosa, limitando assim seu uso clínico. A fim de reduzir os efeitos adversos da AmB, foram sintetizadas nanopartículas de maguemita estabilizadas com ácido láurico (BCL) e conjugadas com anfotericina B (BCL-AmB). O presente estudo mostra a caracterização, estabilidade e ensaios biológicos de BCL-AmB. A atividade antifúngica de BCL-AmB foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima - MIC (do inglês -*Minimum Inhibitory Concentration*) contra o *P. brasiliensis*. Citotoxicidade, avaliada pelo ensaio MTT, e genotoxicidade, analisada pela fragmentação de DNA em citometro de fluxo e ensaio cometa, foram determinadas em fibroblastos murinos (NIH-3T3) e em células renais de porco (LLC-Pk1). Os ensaios de toxicidade foram realizados em dois tempos experimentais (24 e 48 horas). O diâmetro médio das nanopartículas de maguemita foi estimado por difração de raio-X e por microscopia eletrônica de transmissão, apresentando valores de 13 e 9 nm, respectivamente. Análises por espectroscopia na região do infravermelho mostraram a presença do ácido láurico associado à nanopartícula e confirmaram a presença da AmB. O diâmetro hidrodinâmico (DH) de BCL-AmB e BCL, após a síntese, foi de 62 e 55 nm e o potencial zeta foi de -28 e -42 mV, respectivamente. BCL apresentou alta estabilidade em 240 dias, entretanto o DH de BCL-AmB aumentou neste período. BCL-AmB apresentou atividade antifúngica, com MIC de 1,25 µg/mL, enquanto o MIC da AmB livre foi de 1,0 µg/mL. BCL-AmB apresentou baixa toxicidade em células de mamíferos. Para as células NIH-3T3, a citotoxicidade de BCL-AmB foi menor que a citotoxicidade da AmB livre em 24 horas, com CC<sub>50</sub> de 20 e 6 µg/mL, respectivamente; enquanto que para as células LLC-Pk1, os valores da CC<sub>50</sub> foram

de 267 e 37  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Similarmente, após 48 horas, a citotoxicidade de BCL-AmB ainda foi menor que a citotoxicidade da AmB livre. Nas duas linhagens celulares utilizadas, a  $\text{CC}_{50}$  de BCL-AmB induziu menor fragmentação de DNA que a  $\text{CC}_{50}$  da AmB livre pelo ensaio cometa. Entretanto, pela citometria não ocorreram diferenças significativas entre todos os grupos. Portanto, os resultados observados sugerem que BCL-AmB poderá ser uma nova nanoferramenta no tratamento da PCM, uma vez que a AmB quando conjugada as nanopartículas manteve sua propriedade fungicida e apresentou baixos efeitos citotóxicos e genotóxicos. A nanoformulação BCL-AmB mostrou resultados promissores (*in vitro*), entretanto outros testes ainda serão necessários para verificar a eficiência do fármaco adsorvido e sua toxicidade *in vivo*.

Palavras-chave: nanopartícula magnética; anfotericina B; paracoccidioidomycosis, citotoxicidade; genotoxicidade; nanobiotecnologia.

## ABSTRACT

Nanotechnology has dramatically increased the research on drug delivery systems. Among them, magnetic fluids (MF) have shown several advantages such as its biocompatibility and biodegradability. MF samples, consists of superparamagnetic iron oxide nanoparticles suspended in a carrier fluid. Maghemite is the most used magnetic nanoparticles (MNPs) in biological and medical applications. Amphotericin B (AmB) is still the polyene antifungal agent choice for the treatment of severe Paracoccidioidomycosis (PCM), which is a systemic mycosis native from Latin America. Its etiological agent is the dimorphic human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Unfortunately, AmB causes acute side effects (mainly urinary problems) following intravenous administration, which limits its clinical use. In order to reduce the side effects of AmB, maghemite-based magnetic fluid stabilized with bilayer of lauric acid (BCL) and conjugated with AmB (BCL-AmB) were developed. The present study reports on characterization, stability and biological assays of BCL-AmB. Antifungal activity of BCL-AmB was determined by MIC (Minimum Inhibitory Concentration) assay against *P. brasiliensis*. Citotoxicity, evaluated by MTT assay, and genotoxicity, analysed by DNA fragmentation in flow cytometer and comet assays, were determined against murine fibroblast (NIH-3T3) and pig kidney (LLC-Pk1) cells line. Toxicity assays was evaluated at two different times (24 and 48 hours). The maghemite nanoparticles average size was estimated by X-ray diffraction and transmission electron microscopy showing value of 13 and 9 nm, respectively. Infra Red analysis showed the presence of lauric acid associated to the nanoparticles and confirmed the presence of Amphotericin B. Hydrodynamic diameters (HD) of BCL-AmB and BCL after synthesis was 62 and 55 nm and zeta potential was -28 and -42 mV, respectively. BCL has high stability on 240 days, however the HD of BCL-AmB increased at the same period. BCL-AmB presented antifungal activity, with MIC of 1.25 µg/mL, whereas the free AmB showed MIC of 1.0 µg/mL. BCL-AmB showed not toxicity for mammalian cells. For NIH-3T3 cells, the citotoxicity of BCL-AmB was lower than free AmB after 24h, with CC<sub>50</sub> values of 20 and 6 µg/mL, respectively; whereas for LLC-Pk1 cells, the values were 267 and 37 µg/mL, respectively. Similarly, after 48h, the citotoxicity of BCL-AmB was still lower than free AmB. In both cells line, CC<sub>50</sub> of BCL-AmB induced less DNA fragmentation than the CC<sub>50</sub> of AmB by comet assay. However, by flow citometer assay, there is no

difference between all groups. Hence, the results observed suggest that BCL-AmB may be a new nanotool of treatment for PCM, once the AmB in this nanoformulation is still antifungal and showed lower cytotoxicity and genotoxicity effects. There are promising results in this model (*in vitro*) but tests are still needed to verify their *in vivo* mechanisms of toxicity.

Keywords: magnetic nanoparticles; amphotericin B; paracoccidioidomycosis, cytotoxicity; genotoxicity; nanobiotechnology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

- Figura 1.** Escala nanométrica mostrando em detalhes três exemplos de nanopartículas. 18
- Figura 2.** Estrutura química da Anfotericina B..... 26
- Figura 3.** Variação morfológica do *Paracoccidioides brasiliensis* com a temperatura. A) Micélio multicelular. B) Levedura multinucleada (Adaptado de Sturme et al., 2011). ..... 29
- Figura 4.** Estrutura esquemática da nanopartícula BCL-AmB. .... 31
- Figura 5.** Curva padrão da concentração de ferro realizada por espectroscopia eletrônica, através do método colorimétrico da orto-fenantrolina. .... 39
- Figura 6.** Curva padrão da concentração de anfotericina B (AmB) determinada por HPLC. A) Concentrações mais altas B) Concentrações mais baixas. Nas áreas dos gráficos são apresentadas as funções junto com o respectivo valor de  $R^2$ . .... 42
- Figura 7.** Cromatogramas dos solventes utilizados para extrair a anfotericina B das nanopartículas BCL-AmB. – Fase móvel, – Metanol, – DMSO. .... 43
- Figura 8.** Fotomicrografia celular evidenciando as diferentes classes de dano genético. A) Classe 0. B) Classe 1. C) Classe 2. D) Classe 3. E) Classe 4. .... 49
- Figura 9.** Difratoograma de raio-X obtido pelo método do pó das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL). .... 51
- Figura 10.** Distribuição de frequência dos diâmetros médios determinados por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato - BCL (A) e recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B - BCL-AmB (B). .... 52
- Figura 11.** Fotomicrografia eletrônica das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato – BCL (B e D) e recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B – BCL-AmB (A e C) em diferentes aumentos..... 53
- Figura 12.** Espectro infravermelho das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL) e recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB). A) Região espectral entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ . B) Região espectral entre 2000 e 800  $\text{cm}^{-1}$ . Em “A” é evidenciado o espectro do ácido láurico puro..... 55
- Figura 13.** Distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato - BCL (-) e recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B - BCL-AmB (-). .... 56
- Figura 14.** Cromatogramas da determinação da concentração de anfotericina B (AmB) conjugada as nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB). A) Cromatograma para a determinação da concentração total de AmB. B) Cromatograma para a determinação da concentração de AmB no sobrenadante da amostra após separação magnética. .... 57

**Figura 15.** Estabilidade coloidal das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL) e recobertas com bicamada de laurato e conjugadas com anfotericina B (BCL-AmB) mantidas a 4 °C (A, C e E) e temperatura ambiente (B, D e F). A e B apresentam a variação dos diâmetros hidrodinâmicos. C e D apresentam a variação do índice de polidispersão. E e F apresentam a variação dos potenciais zeta (carga de superfície). .... 59

**Figura 16.** Controle do crescimento do fungo *Paraccoccidioide. brasiliensis* em placas de cultivo com meio BHI sólido. A) Suspensão de leveduras em meio BHI. B) somente meio BHI líquido. C) BCL-AmB com meio BHI. D) Anfotericina B com meio BHI. E) BCL com meio BHI. .... 61

**Figura 17.** Concentração mínima inibitória (MIC) da anfotericina B livre (AmB) e conjugada a nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL-AmB) contra o fungo patogênico *P. brasiliensis*. Nanopartícula sem fungicida (BCL) testada nas mesmas concentrações correspondentes de ferro da amostra BCL-AmB. Na parte superior é demonstrada as concentrações de anfotericina B do tratamento com AmB e BCL-AmB. Na parte inferior são demonstradas as concentrações de ferro dos tratamentos BCL-AmB e BCL. .... 62

**Figura 18.** Concentração citotóxica que diminui em 50% a viabilidade das células (CC50) em fibroblastos (NIH-3T3) tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL), recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB) e com anfotericina B (AmB), por 24 ou 48 horas. (\*) diferença significativa entre BCL-AmB e AmB dentro do mesmo tempo experimental,  $p < 0,05$ . .... 64

**Figura 19.** Porcentagem de fibroblastos (NIH-3T3) viáveis após incubação com nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL), recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB) e com anfotericina B (AmB), por 24 ou 48 h ..... 65

**Figura 20.** Concentração citotóxica que diminui em 50% a viabilidade das células (CC50) em células do túbulo contorcido proximal (LLC Pk1) tratados nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL), recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB) e com anfotericina B (AmB), por 24 ou 48 horas. (\*) diferença significativa entre BCL-AmB e AmB dentro do mesmo tempo experimental,  $p < 0,05$ . .... 66

**Figura 21.** Porcentagem de células do túbulo contorcido proximal (LLC Pk1) viáveis após incubação com nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL), recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB) e com anfotericina (AmB), por 24 ou 48 horas. .... 66

**Figura 22.** Fragmentação de DNA em citômetro de fluxo. A) NIH-3T3. B) LLC-Pk1. Células não tratadas (Ctl) e tratadas com AmB (1 µg/mL) e BCL-AmB (1,25 µg/mL) por diferentes períodos de tratamento. Os dados foram expressos como porcentagem de fragmentação de DNA ± erro padrão de dois experimentos independentes. A.  $p > 0,05$  para Ctl vs AmB e Ctl vs BCL-AmB em ambos 24 h e 48 h. B.  $p > 0,05$  para Ctl vs AmB e Ctl vs BCL-AmB em ambos 24 h e 48 h. .... 68

**Figura 23.** Fragmentação de DNA em células NIH3T3 controle (A, D), tratadas com AmB (B, E) e BCL-AmB (C, F) por 24 h (A, B, C) e 48 h (D, E, F). Os histogramas são representativos de cada grupo experimental e demonstram a intensidade de fluorescência do DNA total. DNA<sub>f</sub> representa a população sub-G1 e foi expressa como porcentagem de fragmentação de DNA em relação ao conteúdo de DNA total. .... 69

**Figura 24.** Fragmentação de DNA em células LLC controle (A, D), tratadas com anfotericina AmB (B, E) e BCL-AmB (C, F) por 24 h (A, B, C) e 48 h (D, E, F). Os histogramas são representativos de cada grupo experimental e demonstram a intensidade de fluorescência do DNA total. DNAf representa a população sub-G1 e foi expressa como porcentagem de fragmentação de DNA em relação ao conteúdo de DNA total. .... 69

**Figura 25.** Fragmentação de DNA pelo ensaio cometa. Porcentagens Dano Elevado (DE) e Dano Moderado (DM) em células LLC-Pk1 após exposição a BCL-AmB e AmB. A) Tempo experimental de 24 horas. B) Tempo experimental de 48 horas. As concentrações de BCL-AmB utilizadas foram 1,25 (MIC), 267 (CC<sub>50</sub> 24 horas) e 64 µg/mL (CC<sub>50</sub> 48 horas). As concentrações de AmB utilizadas foram 1,0 (MIC), 37 (CC<sub>50</sub> 24 horas) e 23 µg/mL (CC<sub>50</sub> 48 horas). Os dados representam a média da % ± Desvio Padrão. Comparando colunas, letras idênticas representam diferenças significativas, p<0,05. .... 70

**Figura 26.** Fragmentação de DNA pelo ensaio cometa. Porcentagens Dano Elevado (DE) e Dano Moderado (DM) em células NIH-3T3 após exposição a BCL-AmB e AmB. A) Tempo experimental de 24 horas. B) Tempo experimental de 48 horas. As concentrações de BCL-AmB utilizadas foram 1,25 (MIC), 19 (CC<sub>50</sub> 24 horas) e 13 µg/mL (CC<sub>50</sub> 48 horas). As concentrações de AmB utilizadas foram 1,0 (MIC), 6 (CC<sub>50</sub> 24 horas) e 5 µg/mL (CC<sub>50</sub> 48 horas). Os dados representam a média da % ± Desvio Padrão. Comparando colunas, letras idênticas representam diferenças significativas, p<0,05. .... 71

**Figura 27.** Proposta de ancoragem da anfotericina B (amphotericin B) a bicamada de ácido láurico (LA-Bilayer) estabilizando nanopartícula de magnetita (NP). Retirado de Santos, 2011. .... 77

**Figura 28.** Representação da agregação das nanopartículas de maguemita antes da estabilização com a bicamada de ácido láurico. A) BCL. B) BCL-AmB. .... 79

**Figura 29.** Representação da agregação de NPMs após estabilização com bicamada de ácido láurico. A) BCL. B) BCL-AmB, agregados formados antes da conjugação com anfotericina B. C) BCL-AmB, agregados formados após conjugação com anfotericina B. . 80

## TABELAS

**Tabela 1.** Lista de reagentes..... 35

**Tabela 2.** Características físico-químicas das nanopartículas magnéticas. .... 58

**Tabela 3.** Correspondência entre as concentrações de anfotericina B (AmB) e de ferro (Fe) em BCL-AmB. .... 63

**Tabela 4.** Concentrações utilizadas na ensaio cometa (µg/mL). .... 70

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Nanotecnologia .....	17
1.2 Nanopartículas magnéticas .....	18
1.3 Aplicações das nanopartículas magnéticas .....	21
1.3.1 Agente de contraste para ressonância magnética .....	21
1.3.2 Hipertermia.....	23
1.3.3 Associação de fármacos e entrega em sítios específicos .....	24
1.4 Anfotericina B.....	25
1.5 Paracoccidiodomicose.....	28
2 OBJETIVOS .....	33
2.1 Objetivo Geral .....	33
2.2 Objetivos Específicos .....	33
3 METODOLOGIA.....	35
3.1 Lista de reagentes.....	35
3.2 Síntese das nanopartículas.....	36
3.2.1 Síntese das nanopartículas de magnetita (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ).....	36
3.2.2 Síntese das nanopartículas de maguemita (γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ).....	36
3.2.3 Estabilização das nanopartículas de maguemita com bicamada de lauráto. ....	36
3.2.4 Funcionalização do BCL com o fármaco anfotericina B.....	37
3.3 Métodos de caracterização das amostras sintetizadas.....	37
3.3.1 Difractometria de raio-X.....	37
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	38
3.3.3 Análise da concentração de ferro.....	38
3.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho.....	40
3.3.5 Medidas do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.....	40
3.3.6. Determinação da concentração de anfotericina B.....	41
3.4 Estudo da estabilidade coloidal do BCL e BCL-AmB.....	44
3.5 Avaliação da atividade antifúngica da anfotericina B conjugada.....	44
3.5.1. Preparação do inóculo do fungo Paracoccidoides brasiliensis.....	44
3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	45

3.6 Avaliação da toxicidade da anfotericina B conjugada (BCL-AmB).....	45
3.6.1 Manutenção dos cultivos celulares.....	45
3.6.2 Ensaio de viabilidade celular – MTT.....	46
3.6.3. Avaliação do efeito genotóxico.....	47
3.7 Análise estatística. ....	49
4 RESULTADOS .....	51
4.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas.....	51
4.1.1 Diâmetro médio por difração de raio-X (DRX) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET). ....	51
4.1.2 Concentração total de ferro e concentração de nanopartículas. ....	53
4.1.3 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-DRIFTS). ....	54
4.1.4 Diâmetro hidrodinâmico e carga de superfície. ....	55
4.1.5 Concentração de anfoterina B.....	56
4.1.6 Características físico-químicas das amostras BCL e BCL-AmB. ....	58
4.2 Estabilidade coloidal das nanopartículas magnéticas. ....	58
4.3 Atividade antifúngica da anfotericina B conjugada. ....	61
4.4 Toxicidade da anfotericina B conjugada.....	63
4.4.1 Citotoxicidade.....	63
4.4.2 Genotoxicidade. ....	67
5 DISCUSSÃO .....	73
5.1 Síntese e caracterização do núcleo metálico das nanopartículas de maguemita. ....	74
5.2 Estabilização das nanopartículas de maguemita com ácido láurico.....	75
5.3 Adsorção da anfotericina B às nanopartículas magnéticas de maguemita estabilizadas com laurato. ....	76
5.4 Caracterização coloidal das amostras BCL-AmB e BCL após a síntese.....	78
5.5 Estabilidade coloidal das amostras BCL-AmB e BCL ao longo do tempo em diferentes condições de temperatura. ....	81
5.6 Atividade fungicida da anfotericina B adsorvida as nanopartículas magnéticas.....	82
5.7 Toxicidade da anfotericina B adsorvida à bicamada de laurato das nanopartículas de maguemita. ....	84
5.7.1 Citotoxicidade.....	84
5.7.2 Genotoxicidade. ....	87

5.8 Perspectivas futuras da nanopartícula BCL-AmB .....	89
5.8 Perspectivas futuras da nanopartícula BCL. ....	90
6 CONCLUSÃO .....	92
7 REFERENCIAS .....	94

## ***INTRODUÇÃO***

# 1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia inicia-se em 29 de dezembro de 1959 no Instituto de Tecnologia da Califórnia, quando o físico Richard Feynman apresentou a palestra "There's plenty of room at the bottom" ("Há muito espaço lá embaixo") na Reunião Anual da Sociedade Americana de Física. Nesse evento, Feynman anuncia a possibilidade de compactar os 24 volumes da Enciclopédia Britânica na cabeça de alfinete, dessa forma, afirmando o advento de várias descobertas a partir da fabricação de materiais em escala atômica e molecular. Entretanto, Feynman conseguiu apoio econômico e científico somente duas décadas depois de sua palestra (Garcia, 2005).

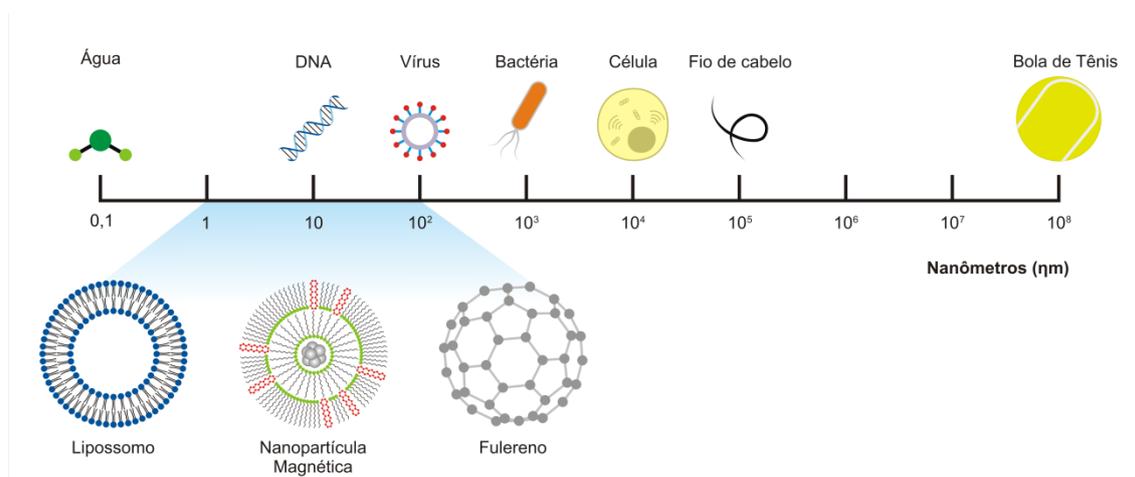
Recentemente a nanobiotecnologia surgiu como uma área da ciência que tem permitido o desenvolvimento de ferramentas importantes no combate de diversas doenças. Dentre estas ferramentas destacam-se as nanopartículas magnéticas que podem ter a associação de moléculas bioativas em sua superfície e assim serem usadas como sistema de carreamento de drogas para sítios específicos.

Esta estratégia pode possibilitar uma melhor eficácia terapêutica de um fármaco com diminuição da sua toxicidade, como apresentado neste trabalho em que foi sintetizado um fluido magnético com a anfotericina B, um antifúngico utilizado no tratamento da paracoccidioidomicose, conjugada a uma nanopartícula magnética de maguemita estabilizada com bicamada de laurato e testado seu efeito tóxico em linhagens celulares.

## 1.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia envolve a criação de materiais funcionais, dispositivos e sistemas por meio do controle da matéria na escala de nanômetros ( $10^{-9}$  m) (Figura 1). Segundo Koo e colaboradores (2005) a nanotecnologia pode ser definida como o entendimento e controle da matéria em dimensões de aproximadamente 1 a 100 nanômetros, onde fenômenos únicos possibilitam novas aplicações. A faixa de tamanho não é necessariamente rígida como nessa definição, entretanto o que mais é apreciado no conceito de nanotecnologia é a mudança das propriedades dos materiais quando comparados na escala macro. Assim, nanotecnologia engloba

sistemas físicos, químicos e biológicos de dimensões atômicas até submicrométricas, bem como sistemas macroscópicos constituídos por nanoestruturas, que apresentam propriedades químicas, térmicas, elétricas, óticas, mecânicas ou magnéticas diferenciadas, devido aos fatores relacionados ao tamanho e à composição (Santos, 2012). Estas novas propriedades explicam o interesse industrial pelos materiais nanoestruturados para serem empregados em cosméticos, na indústria têxtil, eletrônica e farmacêutica (Hillery *et al.*, 2001; Naschie, 2006; Jain, 2008).



**Figura 1.** Escala nanométrica mostrando em detalhes três exemplos de nanopartículas.

Muitos são os avanços das aplicações de nano-objetos no reconhecimento e detecção molecular com diferentes fins, de modo que nanoferramentas, tais como nanocanais, pontos quânticos, dendrímeros, nanobarras de código, nanocapacitores, nano e microesferas e as nanopartículas magnéticas, estão se tornando importantes nas soluções tecnológicas para ambiciosos projetos na nanobiotecnologia (Gao *et al.*, 2009; Ferreira e Rangel, 2009; Kim *et al.*, 2010; Mahmoudi *et al.*, 2011).

## 1.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

De modo geral, nanopartículas vêm sendo intensamente estudadas, onde pesquisas para obtenção de nanopartículas magnéticas (NPMs) representam atualmente um campo de elevado interesse científico e tecnológico, pois as NPMs possuem propriedades únicas como alta relação superfície/volume e a capacidade

de responder a um campo magnético, não retendo magnetismo após a remoção do mesmo (Berry e Curtis, 2003; Tartaj *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010).

NPMs são compostas, por exemplo, por elementos como níquel ou cobalto e mais frequentemente por magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou maguemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (Sun *et al.*, 2004). Dentre estas ferritas, a maguemita é uma opção promissora nas aplicações biomédicas, pois nesse óxido, o ferro encontra-se no seu estado mais oxidado. Isso implica em uma menor toxicidade, uma vez que, não ocorrerão oxidações da maguemita quando aplicadas em sistemas biológicas (Hütten *et al.*, 2004; Gupta e Gupta, 2005). Além disso, nanopartículas de magnetita em estoque, oxidam ao longo do tempo, convertendo-se para maguemita, podendo levar a uma diminuição da estabilidade do complexo nanométrico (Silva, 2008).

NPMs, geralmente com diâmetro variando entre 5 e 15 nm, quando dispersas em solventes carreadores orgânicos ou inorgânicos formando suspensões estáveis em soluções coloidais tem-se os chamados fluidos magnéticos (FMs) (Massart, 1982).

Partículas de tamanhos nanométricos possuem uma alta relação superfície/volume. Essa característica é utilizada nas aplicações biológicas, uma vez que grande quantidade de ligantes, como fármacos ou anticorpos pode ser ligada na superfície das nanopartículas. Essa característica possibilita uma maior disponibilidade desses ligantes no sítio alvo quando comparado com partículas não nanométricas (Gupta e Gupta, 2005; Karini *et al.*, 2012; Maurin *et al.*, 2013)

Para que a energia de um material magnético macroscópico seja mínima, deve haver a formação de domínios magnéticos em seu interior, que são separados e limitados por interfaces denominadas paredes de domínios. Domínio magnético é definido como uma região do material dentro da qual os átomos possuem momentos magnéticos com a mesma orientação (Borba, 2006). Momento magnético de um átomo é a soma vetorial de todos os momentos magnéticos dos elétrons (Smith, 1998). Conforme as dimensões dos materiais são reduzidas, ou seja, caminham-se para as dimensões nanométricas, as paredes que delimitam os domínios magnéticos passam a ter sua estrutura e espessura modificadas. Quando é atingido um diâmetro crítico da partícula ( $D_c$ ), o aumento de energia devido às modificações nas paredes dos domínios magnéticos passa a ser mais significativo que a redução da energia

decorrente da formação dos domínios e, portanto, do ponto de vista energético, a redução das dimensões das partículas não é mais vantajosa. Por isso, abaixo do  $D_c$ , as partículas magnéticas passam a se organizar como monodomínios magnéticos. O valor do  $D_c$  é característico de cada material e, geralmente, possui algumas dezenas de nanômetros (Cullity, 2009).

Com partículas do tamanho do  $D_c$  ou menores, o momento magnético se torna altamente influenciado pela energia térmica. Isto permite que as nanopartículas sejam facilmente magnetizadas pela ação de uma força magnética externa, mas, na ausência desta, o efeito da agitação térmica é suficiente para desmagnetizá-las espontaneamente (Xu, 2007). Assim, partículas com tal comportamento são denominadas superparamagnéticas.

Interações de Van der Waals são a fonte primária de atração entre partículas coloidais. Estas forças estão sempre presentes entre partículas de composição similar. Sendo assim, para preparar dispersões coloidais estáveis, como no caso dos FMs, se torna necessário que as interações repulsivas entre as partículas sejam pelo menos comparáveis em alcance e magnitude às atrações de Van der Waals (Hunter, 1986). Quando isso não acontece, as nanopartículas formarão aglomerados. O conceito de agregados difere-se do de aglomerados, pois nele os componentes individuais estão fortemente associados por ligações químicas (ASTM International Technical Committee E56 on Nanotechnology, 2006). A aglomeração e subsequente sedimentação das nanopartículas dependem da forma, do tamanho, do tempo e da dose utilizada durante sua aplicação biológica (Allouni *et al.*, 2009).

Definir o estado de aglomeração é essencial, pois esse determina de que maneira as nanopartículas circularão e serão eliminadas pelo organismo. A aglomeração afeta a dispersão das nanopartículas (Braz, 2011). Dessa forma, caracterizar o tamanho da partícula primária e dos aglomerados é essencial, pois pode afetar a disponibilidade de possíveis fármacos conjugados, a eliminação e as respostas celulares.

A característica magnética e o diâmetro das nanopartículas proporcionam que elas fiquem em uma suspensão na forma de entidades isoladas, impedindo a aglomeração e precipitação na parede dos vasos sanguíneos ou em tecidos. Interessantemente, nos fluidos magnéticos, as interações nanopartícula-líquido são

fortes o bastante para que o seu comportamento magnético seja transmitido ao líquido como um todo (Rosensweig, 1985). As interações entre as partículas magnéticas e o fluido carreador são tais que se comportam como um sistema homogêneo, onde sob aplicação de um campo magnético a suspensão é deslocada como um todo e não somente as nanopartículas magnéticas (Lacava, 2006; Morais *et al.*, 2006).

Entretanto, para manter a estabilidade do sistema é necessário controlar o diâmetro das nanopartículas, a temperatura, o estado químico e presença de carga na superfície, o equilíbrio entre as forças repulsivas e atrativas, e as interações partícula-partícula e partícula-solvente (Lacava *et al.*, 1999; Tartaj, *et al.*; 2003).

Para impedir a aglomeração das NPMs em pH fisiológico, elas precisam ser recobertas com material biocompatível e biodegradável, ou seja, torná-las, hemocompatíveis e que não sejam tóxicas ao organismo. Assim, NPMs podem ser funcionalizadas, permitindo o acoplamento de fármacos, anticorpos ou outros componentes (Halbreich *et al.*, 1998; Pankhurst *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2008).

### 1.3 APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

O comportamento magnético das NPMs, bem como a variedade de arranjos de sua camada estabilizante possibilita o seu emprego em várias áreas, como, conduzir dentro do organismo, drogas ou fármacos até alvos específicos podendo ser utilizado magnetos externos; melhoramento do contraste de imagens obtidas por ressonância magnética; técnicas de separação celular e hipertermia para tratamento de câncer ou para liberação controlada de fármacos (Mainardes e Silva, 2004; Hao *et al.*, 2010; Lien *et al.*, 2011; Akbarzadeh *et al.*, 2012).

#### 1.3.1 Agente de contraste para ressonância magnética

A ressonância magnética é uma técnica usada em diagnóstico clínico, onde a obtenção de imagens do corpo humano é baseada na diferença de intensidade do sinal que cada tecido humano produz em resposta a um campo magnético aplicado (Liu, 2012). Os quelatos de gadolínio são os compostos mais utilizados como agente de contraste. Entretanto os íons são tóxicos, uma vez livres podem substituir alguns

íons metálicos endógenos como zinco e cálcio (Jedlovszky *et al.*, 2012). Assim, surge a busca por novos agentes contrastantes, como as NPMs que intensificam as imagens obtidas por ressonância magnética, (Na, 2009; Ling *et al.*, 2012), e, que idealmente, não podem manter magnetização remanescente quando o campo magnético externo for retirado (Wang *et al.*, 2001). Por essa razão que nanopartículas de ferrita são amplamente estudadas para esta aplicação.

Algumas dispersões coloidais de NPMs já estão disponíveis para uso clínico. O *ferumoxides* (Feridex® ou Endorem®) consiste de nanopartículas de magnetita estabilizadas com dextran/citrato dispersas em meio aquoso e administrado de forma intravenosa e percebido por células do sistema retículoendotelial. O Resovist®, específico para diagnóstico de lesões hepáticas, é constituído por nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas com carboxidextran (*ferucarbotran*) apresentando diâmetro hidrodinâmico entre 45 e 60 nm. O *ferumoxtran* (Combidex® ou Sinerem®) com composição semelhante à do Feridex®, mas ainda não foi liberado para comercialização, apesar de aprovado nos testes clínicos. Possibilita a detecção tumoral em alguns órgãos como nódulos linfáticos, próstata e cérebro (Harisinghani, 2003; Veiseh, 2010; Santos, 2012).

Além destes agentes de contraste já comercializados, outros sistemas nanoestruturados a base de NPMs estão sendo desenvolvidos e testados em laboratórios, por exemplo, nanopartículas de magnetita funcionalizadas com DMSA com tamanho entre 4 e 12 nm (Jun, 2005) e nanopartículas de ferrita de manganês de 7 nm (Yang, 2010).

Grupta e colaboradores (2012) sintetizaram um complexo magnético a partir de nanopartículas de sílica coencapsuladas com óxido de gadolínio e HRP (peroxidase de *A Armoracia rusticana*, do inglês *horseradish peroxidase*) com tamanho médio de 25 nm. Esse complexo nanoestruturado mostrou potencial como contraste de imagem e tratamento local de cânceres oxidando um pré-fármaco previamente administrado. Esse complexo foi testado em carcinoma de células escamosas e mamárias.

### 1.3.2 Hipertermia

O termo hipertermia é muito utilizado para tratamento baseado na geração de calor em um sítio tumoral alvo, resultando em alterações na fisiologia das células cancerígenas, conduzindo geralmente a apoptose. Esse tratamento é realizado de maneira conjunta com outros tratamentos disponíveis como quimioterapia, radioterapia, cirurgias, terapia genética e imunoterapia. O tratamento por hipertermia pode ser por ablação ou moderado, dependendo do aumento da temperatura (Nagarajan, 2008; Kumar, 2011). A eficiência da hipertermia depende da temperatura gerada no sítio específico, tempo de exposição e características particulares das células-alvo (Wust, 2002; Goldstein, 2003; Santos-Marques, 2006).

Várias NPMs são investigadas devido ao seu potencial para a hipertermia, que vão desde as nanopartículas de óxidos de ferro até nanopartículas metálicas como manganês, cobalto, níquel, zinco e magnésio. Alguns agentes hipertérmicos bem conhecidos são nanopartículas de magnetita estabilizadas com dextran, lipossomas catiônicos, álcool polivinílico, hidrogel, ácido láurico; e nanopartículas de maguemita estabilizadas com dextran (Giri, 2005; Dennis *et al.*, 2008; Lévy *et al.*, 2008; Kawai, 2008; Kappiyoor *et al.*, 2010).

Além de promover o aquecimento de regiões específicas, a utilização de campo magnético alternado em NPMs promoveu uma nova área de estudos: a liberação controlada de moléculas bioativas. Derfus e colaboradores (2007) estudaram o uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com oligonucleotídeos. Para isso, foi examinada a liberação de oligonucleotídeos após a exposição dos camundongos a um campo magnético. Foi observado um aumento considerável na profundidade de penetração dos oligonucleotídeos nas células cancerígenas e nas células vizinhas devido à exposição ao campo magnético. Kim e colaboradores (2010) funcionalizaram nanopartículas de ferrita de manganês com quitosana e as utilizaram com o potencial de geração de calor por hipertermia, como carregador para liberação controlada de moléculas bioativas e agentes de contraste para imagens obtidas por ressonância magnética. Os resultados mostraram que as nanopartículas apresentam aquecimento significativo para aplicações em hipertermia, os grupos funcionais presentes na quitosana permitem a ligação de diferentes moléculas bioativas.

### 1.3.3 Associação de fármacos e entrega em sítios específicos

Os principais problemas relacionados à administração de fármacos hidrofóbicos é sua baixa biodisponibilidade, que pode ser entendida como a quantidade do fármaco que alcança o seu local de ação (Goodman *et al.*, 2003). Com uma baixa biodisponibilidade do fármaco no sítio alvo se torna necessário uma dose mais elevada, fato que pode causar toxicidade além de outros efeitos adversos. A fim de solucionar esse impasse, muitos pesquisadores têm desenvolvido sistemas carregadores de fármacos a sítios específicos no organismo, dos quais se destacam as nanopartículas (Vieira, 2008; Gulloti, 2009; Anand *et al.*, 2010; Beck, 2011; Wilczewska *et al.*, 2012).

Os sistemas de entrega de drogas por meio de nanopartículas possuem vantagens em relação ao convencional como: aumento da eficácia terapêutica com liberação sustentada; diminuição de toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; direcionamento a alvos específicos; menor número de doses; e incorporação de moléculas bioativas hidrofóbicas e hidrofílicas (Camilo, 2006; Wilczewska *et al.*, 2012).

Jain e colaboradores (2005) associaram doxorubicina, um agente antitumoral, às NPMs recobertas com ácido oleico/polietilenoglicol, com cerca de 10 nm de diâmetro e hidrosolúveis. O complexo mostrou retenção intracelular e uma atividade antiproliferativa das células neoplásicas. Yallapu e colaboradores (2010) mostraram que essa mesma formulação apresenta propriedades como agente de contraste. Assim, essa nanopartícula poderia ser utilizada no teranóstico oncológico. Chen e colaboradores (2008) associaram a doxorubicina a nanopartículas de magnetita-sílica, mostrando que a formulação tem eficiência de liberação dependente do pH.

Tong e colaboradores (2011) conjugaram gemcitabina às NPMs mostrando inibição do crescimento tumoral para tratamento *in vivo*. Estevanato e colaboradores (2011) observaram que nanoesferas de albumina magnética apresentavam biocompatibilidade *in vivo* e presença de aglomerados desta nanopartícula no sistema nervoso central, apresentando potencial para sistema de entrega de drogas especialmente para terapias que envolvam o sistema nervoso central.

Chen e colaboradores (2011) conjugaram tPA (ativador do plasminogênio tecidual) em nanopartículas de magnetita recobertas com quitosana mostrando uma otimização em 53% no processo de rompimento de coágulos quando comparados ao tPA livre. Quando as NPMs foram submetidas a um campo magnético, essa porcentagem subiu para 58%, mostrando ser uma alternativa para o tratamento trombolítico.

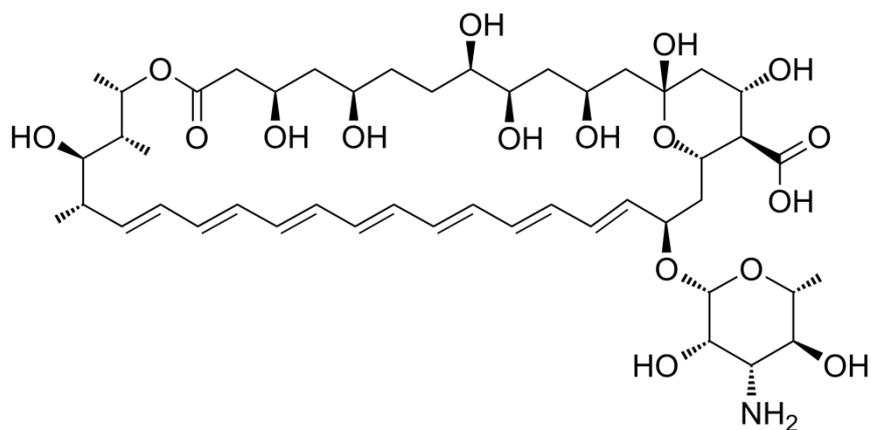
Losic e colaboradores (2010) associaram nanopartículas de magnetita recobertas com dopamina à microcápsulas de sílica proveniente de diatomáceas do gênero *Aulacoseira*. Eles mostraram que o complexo responde a um campo magnético, mostrando potencial para uso terapêutico. Vale ressaltar que a entrega de fármacos mediada por estrutura de diatomáceas ainda não foi experimentalmente demonstrada em sistemas biológicos (Gordon *et al.*, 2009).

Outras moléculas bioativas como ibuprofeno (Sasidharan *et al.*, 2012), paclitaxel (Kulshrestha *et al.*, 2012), temozolomida (Ling *et al.*, 2012) e heparina (Lee *et al.*, 2012) são investigadas no sentido do desenvolvimento de nanoformulações.

#### 1.4 ANFOTERICINA B

A anfotericina B (AmB) é um fármaco pertencente à classe dos antibióticos poliênicos e é produzida pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* (Figura 2). As propriedades fungicidas desta molécula foram identificadas em 1956 por Gold e colaboradores e desde então, ela tem sido a droga de escolha para o tratamento da maioria das micoses sistêmicas (Lemke *et al.*, 2005; Ruijgrok *et al.*, 2006). Características como amplo espectro antifúngico, potente atividade fungicida e raros episódios de resistência, contribuem para o sucesso clínico desta droga (Baginski *et al.*, 2005).

Sua estrutura contém átomos de carbono formando um anel macrocíclico fechado. Possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas e, na porção oposta, uma cadeia com oito grupos hidroxila, o que lhe confere característica anfipática. Em uma das extremidades da molécula, formando uma cadeia lateral, há um resíduo micosamina (lactona) com uma amina (Santos, 2012). O nome anfotericina deriva da característica anfotérica que apresenta, sendo capaz de formar sais solúveis tanto em meio básico quanto em meio ácido (Asher, 1977).



**Figura 2.** Estrutura química da anfotericina B.

O mecanismo de ação em fungos da AmB ocorre pela interação direta com o ergosterol, um esteroide da membrana celular, por meio de ligações hidrofóbicas induzindo a formação de poros aquosos. Esses poros promovem a liberação de componentes essenciais para a célula, resultando na sua morte (Gruszecki *et al.*, 2003; Kleinberg, 2006). Enquanto que em fungos o ergosterol é o esteroide mais abundante nas membranas celulares, em mamíferos o mais abundante é o colesterol (Baginski *et al.*, 2005). A estrutura química da AmB favorece uma ligação preferencial pelo ergosterol em relação ao colesterol (Hsuchen e Feingold, 1973; Yilma *et al.*, 2007), desse modo ela pode ser administrada em humanos.

Entretanto, a AmB em humanos induz efeitos colaterais indesejáveis, sendo considerada um dos antibióticos mais tóxicos. Efeitos adversos frequentes são náuseas, vômito, febre, dor de cabeça, hipotensão, dano hepático e nefrotoxicidade (Guo, 2001; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003; Lemke *et al.*, 2005). A anemia é um efeito colateral adverso que, embora receba pouca importância, acomete em torno de 75% dos pacientes submetidos à terapia com esta droga (Bicanic *et al.*, 2008).

A incidência de nefrotoxicidade induzida pela AmB é alta, variando entre 49 e 65% dos pacientes e é definida pela sua ligação com o colesterol das membranas celulares dos túbulos renais (Wingard, 1999; Deray, 2002). A grande quantidade desses túbulos nos rins resulta em muitas interações com a AmB, levando a nefrotoxicidade (Baley *et al.*, 1990; Fukui *et al.*, 2003). Esse distúrbio renal pode resultar no acúmulo de potássio no sangue (hipercalcemia) induzindo quadros graves

de arritmia cardíaca (Groot *et al.*, 2008). Níveis séricos elevados do fármaco contribuem para o aumento desses efeitos toxicológicos, pois quanto maior a quantidade do fármaco livre circulante, maiores os danos causados aos rins. A nefrotoxicidade é a causa da hospitalização prolongada e dos índices de mortalidade, especialmente em pacientes com necessidade de hemodiálise (Saldanha, 2012).

Devido à sua insolubilidade em meio aquoso, a AmB tem sido administrada na forma de dispersão coloidal com desoxicolato de sódio (conhecido comercialmente como Fungizon®). Entretanto, essa dispersão apresenta alta toxicidade. Com o intuito de reduzir os efeitos colaterais da AmB durante os tratamentos, como da paracoccidiodomicose, novas formulações desse fármaco estão sendo desenvolvidas, como a sua conjugação com fosfolipídeos (lipossomas) ou detergentes (micelas), ou seja, formulações com carreadores de natureza lipídica (Ng *et al.*, 2003) aos quais podem ser conjugadas substâncias com afinidades específicas por determinados sítios e órgãos, conduzindo o fármaco ao sítio de ação desejado. Essa estratégia vantajosa diminui a concentração da AmB livre no plasma sanguíneo e aumentando a sua concentração no local desejado para a terapia (Wills *et al.*, 2000; Kleinberg, 2006).

Atualmente três formulações lipídicas estão disponíveis comercialmente: Ambisome® - lipossomal com tamanho de 45 a 80 nm, fabricado por NeXstar Pharmaceuticals. Constituída por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diestearoilfosfatidilglicerol e anfotericina B. Aprovada nos Estados Unidos em 1997. Utilizada no tratamento de infecções fúngicas disseminadas e leishmaniose visceral. Abelcet® - complexo lipídico com tamanho de 1,6 a 11,1µm, fabricado por Sequus Pharmaceuticals. Constituído pelos lipídeos dimiristoil fosfatidilcolina e dimiristoil fosfatidilglicerol complexados à anfotericina B. Foi aprovada também em 1997 nos Estados Unidos, sendo utilizada no tratamento de infecções fúngicas invasivas. Amphotec® - dispersão coloidal com tamanho de 115 nm, fabricado por The Liposome Company. Consiste em um complexo estável de sulfato de colesterila sódica e anfotericina B, com partículas em forma de disco. Aprovada em 1996 nos Estados Unidos e indicada para o tratamento de aspergilose invasiva em pacientes nos quais a terapia com outras formulações tenham falhado (Tiphine *et al.*, 1999).

Estas formulações são utilizadas como terapia de primeira linha em pacientes afetados pelas micoses sistêmicas cujas funções renais estejam comprometidas. Nesses pacientes foi observada uma considerável redução dos efeitos nefrotóxicos (Bowden *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2004; Alexander e Wingard, 2006). O elevado custo destes medicamentos no Brasil torna relevante o desenvolvimento de formulações alternativas em território nacional. Com esse intuito, NPMs biocompatíveis e com viabilidade de conjugação da AmB passa a ser uma estratégia biológica e economicamente interessante.

Existem poucos estudos sobre NPMs como agente carregador da AmB. Saldanha (2012) estudou a eficiência da anfotericina B conjugada a nanopartículas magnéticas de magnetita estabilizadas com ácido láurico no tratamento da micose paracoccidioidomicose experimental em camundongos Balb/c. A via utilizada foi por instilação nasal e esta formulação mostrou-se eficiente em casos de infecção aguda.

Peixoto e colaboradores (2008) estudaram os efeitos de nanopartículas de maguemita estabilizadas com ácido dimercaptosuccinico (DMSA) e associadas à anfotericina B em camundongos. Mostraram direcionamento preferencial das NPMs para os pulmões e leve diminuição dos efeitos adversos da AmB, apresentando uma formulação biocompatível com potencial no tratamento da paracoccidioidomicose. Carvalho (2011) expõe resultados no tratamento da leishmaniose cutânea em camundongos com nanopartículas de maguemita estabilizadas DMSA e polietilenoglicol e funcionalizadas com AmB, exibindo maior eficiência do que apenas com AmB.

A anfotericina B é empregada na dose de 1mg/kg/dia, principalmente, no tratamento de casos graves de paracoccidioidomicose ou quando ocorre resistência aos outros medicamentos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

## 1.5 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

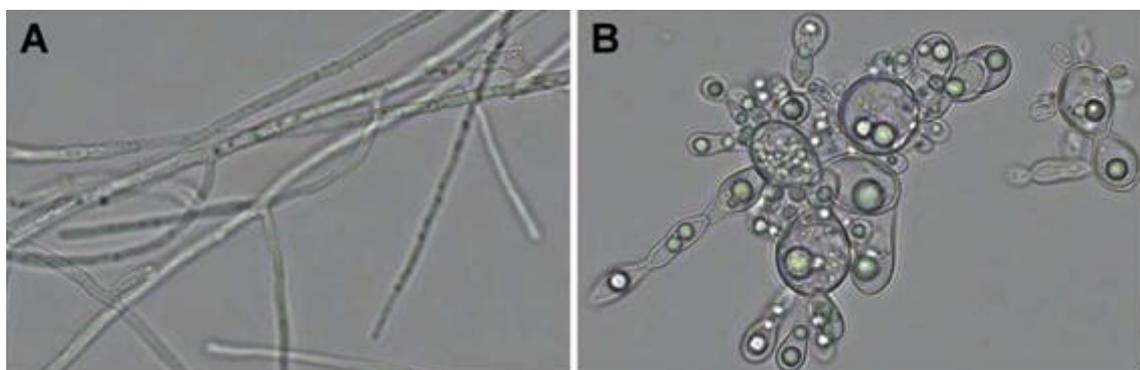
A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica autóctone da América Latina. De caráter endêmico entre as populações de zona rural, porém com distribuição heterogênea. A PCM acomete principalmente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos, sendo rara a incidência abaixo de 14 anos de idade. A razão de acometimento da PCM em adultos varia entre 10-15 homens para cada

mulher, o que não ocorre na infância, onde a incidência da micose é uniforme nos gêneros.

Uma proporção muito pequena de indivíduos de zonas endêmicas expostos ao agente desta micose desenvolve alguma manifestação clínica da doença. A taxa de mortalidade média anual no Brasil por PCM, no período de 1980-1995, foi de 1,45 mortes/milhão de habitantes (Coutinho *et al.*, 2002), confirmando essa doença como um importante agravo de saúde no País. Esse número pode não corresponder à verdade, uma vez que a PCM não faz parte das patologias de notificação compulsória para o Ministério da Saúde.

Sua importância em saúde coletiva também está ligada aos custos sócio-econômicos derivados não apenas da doença em atividade, como hospitalização, mas também por ocorrer em indivíduos, predominantemente do sexo masculino, na sua fase mais produtiva de vida, os quais contribuem com a maior parte no orçamento familiar.

Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo termodimórfico, ou seja, encontra-se na forma de micélio multicelular entre 25 e 30 °C e na forma de levedura multinucleada entre 35 e 37 °C (Figura 3; Brummer *et al.*, 1993, Gomes *et al.*, 2000). Trata-se de um fungo saprobiótico do solo. Na natureza, o fungo apresenta a forma filamentosa, contendo propágulos infectantes chamados conídios. Uma vez inalados, os propágulos dão origem a formas leveduriformes do fungo que constituirão sua forma parasitária nos tecidos do hospedeiro (Ricci *et al.*, 2002; Marques, 2003).



**Figura 3.** Variação morfológica do *Paracoccidioides brasiliensis* com a temperatura. A) Micélio multicelular. B) Levedura multinucleada (Adaptado de Sturme *et al.*, 2011).

O *P. brasiliensis* foi primeiramente descrito por Adolfo Lutz em 1908 utilizando isolados de lesões orais. Ele percebeu que esse fungo se diferenciava de outros espécimes característicos de coccidioidomicose, descrito por Posadas em 1892, pela ausência de esférulas com esporos. Splendore em 1912 denominou o fungo como *Zymonema brasilliensis*, entretanto Floriano de Almeida em 1930 propôs o nome atual, distinguindo do agente *Coccidioides immitis* e a doença foi reconhecida oficialmente como paracoccidioidomicose pela OMS em 1971 (Marques, 1998). Taxonomicamente encontra-se no Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis* (Bialek *et al.*, 2000; San-Blas *et al.*, 2002; Moreira, 2008).

Os humanos eram tidos como os únicos hospedeiros naturalmente infectados por este fungo. Atualmente, alguns animais foram encontrados portadores da infecção, como o tatu e cães (Restrepo *et al.*, 2001; Ricci *et al.*, 2002; Marques, 2003). A via inalatória é considerada a principal porta de entrada da infecção, onde os pequenos propágulos alcançam porções distais dos pulmões e ao penetrarem o parênquima alveolar ocorre a transição para a levedura e se dá a instalação da doença (Cock *et al.*, 2000).

Grande parte das infecções na fase inicial é assintomática, sendo detectada apenas por teste intradérmico ou por achado de necropsia (Silva e Telles Filho, 2006). Se há progressão da infecção, duas formas clínicas são descritas. A forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto) (Montenegro, 1986; Brummer *et al.*, 1993; Marques, 2003).

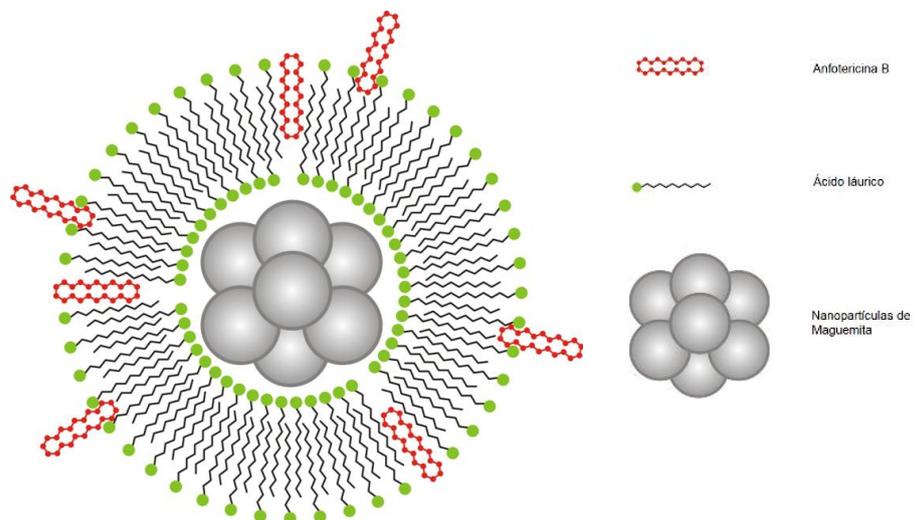
Diferentemente de outros fungos patogênicos, o *P. brasiliensis* é sensível à maioria das drogas antifúngicas, por conseguinte, vários antifúngicos são utilizados no tratamento da PCM (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A escolha da droga a ser utilizada é feita de acordo com o estado do paciente e requer, além de um período de tratamento longo, o monitoramento do paciente de modo a avaliar a eficácia e a tolerância dele ao antifúngico (Hahn *et al.*, 2003).

Os fármacos utilizados na terapêutica da PCM são os das seguintes classes: polienos (anfotericina B), imidazólicos (itraconazol, fluconazol, ketoconazol) e sulfas (sulfadiazina). Destes, os mais utilizados são o itraconazol e a anfotericina B. Apesar da limitação das informações disponíveis em estudos comparativos com diferentes

esquemas terapêuticos, sugere-se o itraconazol como a opção terapêutica que permitiria o controle das formas leves e moderadas da doença em menor período de tempo. Pacientes com formas graves ou resistência a outros medicamentos, necessitando internação hospitalar, devem receber AmB. Esta limitação no seu uso deve-se ao fato de que a AmB produz uma série de efeitos adversos já mencionados.

Foi observado que, de modo geral, o pulmão é um dos órgãos preferencialmente depositário das NPMs para algumas das coberturas estabilizantes (Niven, *et al.*, 1995; Barbosa, 2004; Chaves *et al.*, 2002, 2005 e 2008; Garcia *et al.*, 2005), sugerindo assim, que estas NPMs podem ser utilizadas no tratamento de doenças pulmonares como a paracoccidiodomicose ou a tuberculose, uma vez conjugadas com drogas específicas para o tratamento destas doenças e ainda mais podendo ser direcionadas com um campo magnético externo.

No intuito de reduzir os efeitos colaterais causados pela anfotericina B no tratamento da PCM, neste projeto, foi sintetizada uma nanopartícula magnética a base de maguemita, estabilizada com uma bicamada de lauráto e conjugada com o fármaco anfotericina B (BCL-AmB) (Figura 4).



**Figura 4.** Representação esquemática da nanopartícula de maguemita estabilizada com ácido láurico e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB).

## **OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a estabilidade coloidal, atividade antifúngica e citotoxicidade da anfotericina B conjugada com nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de laurato (BCL-AmB).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de maguemita estabilizadas com bicamada de laurato (BCL);
- Funcionalizar o BCL com o fármaco anfotericina B (BCL-AmB);
- Caracterizar o BCL-AmB por meio da análise da concentração do fármaco adsorvido, da concentração de ferro, do tamanho e da carga de superfície;
- Avaliar a estabilidade do BCL-AmB, pelo tamanho e pela carga de superfície, variando a temperatura e tempo de estocagem;
- Avaliar a atividade antifúngica do BCL-AmB, determinando sua concentração mínima inibitória (MIC – do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) contra o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e compará-la com o MIC do fármaco não nanoparticulado;
- Avaliar a toxicidade do BCL-AmB em células renais e fibroblastos em cultivo, por meio de ensaios de viabilidade celular e por ensaios de danos ao material genético.

## ***METODOLOGIA***

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 LISTA DE REAGENTES

**Tabela 1.** Lista de reagentes.

<b>Reagentes</b>	<b>Fabricantes</b>
Acetonitrila	J. T. Baker, EUA
Ácido clorídrico	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ácido láurico	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Agarose	Sigma-Aldrich Co., EUA
Agarose LMP	Sigma-Aldrich Co., EUA
Anfotericina B	Sigma-Aldrich Co., EUA
Anfotericina B desoxicolidado de sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
BHI Líquido	Acumedia, EUA
BHI Sólido	Acumedia, EUA
Bicarbonato de sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Brometo de etídio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Citrato de sódio	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Cloreto de ferro (II) tetrahidratado	Sigma-Aldrich Co., EUA
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	Sigma-Aldrich Co., EUA
Cloreto de sódio	Vetec Química Fina Ltda., BRA
DMSO	Mallinckrodt Chemical Inc., USA
EDTA	Sigma-Aldrich Co., EUA
Gentamicina	Schering-Plough, EUA
Glicose	Vetec Química Fina Ltda., BRA
Hidróxido de sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Iodeto de propídeo	Invitrogen, EUA
Lauril sarcosinato de sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Meio de cultivo celular DMEM	GIBCO, EUA
Meio de cultivo celular M199	Sigma-Aldrich Co., EUA
Metanol	J. T. Baker, EUA
MTT	Invitrogen, EUA
PBS	Laborclin Produtos para Laboratório Ltda., BRA
Penicilina/estreptomicina	GIBCO, EUA
RNAse A	Promega, EUA
Solução de amônia 27%	Quimibrás, BRA
Soro fetal bovino	GIBCO, EUA
Tripsina/EDTA	GIBCO, EUA
Tris	Invitrogen, EUA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co., EUA

## 3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

### 3.2.1 Síntese das nanopartículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

As nanopartículas de magnetita foram precursoras na síntese das nanopartículas de maguemita. A síntese da magnetita foi obtida pelo método da coprecipitação dos íons Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> em meio aquoso utilizando amônia como precipitante. Para isso, foi preparada uma mistura contendo uma solução de 0,7 mol de Fe(II) e 1,4 mol de Fe(III), em solução de fundo 2,0 molL<sup>-1</sup> de HCl. O HCl foi adicionado para evitar tanto a oxidação dos íons Fe<sup>2+</sup>, quanto a hidrólise dos sais de ferro. A solução foi colocada em um béquer e, sob agitação mecânica e temperatura ambiente, foram adicionados 30 mL de solução de amônia 27%. Instantaneamente, um precipitado negro foi formado e o sistema foi mantido sob agitação por 15 minutos (Kang *et al.*, 1996). Com o auxílio de um ímã, as partículas foram sedimentadas e o sobrenadante retirado e descartado. Em seguida, adicionou-se água destilada às nanopartículas e estas foram lavadas com o auxílio de um bastão de vidro. Este procedimento de lavagem das nanopartículas com água destilada foi realizado cinco vezes para remoção dos contra-íons.

### 3.2.2 Síntese das nanopartículas de maguemita (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

As nanopartículas de maguemita foram obtidas a partir da oxidação da magnetita por borbulhamento de oxigênio (Kang *et al.*, 1996). Aproximadamente 12 gramas do sólido úmido das nanopartículas de magnetita obtidas na síntese anterior foram dispersas em 250 mL de água destilada. O pH foi ajustado para três com HCl 1 M. A dispersão foi agitada magneticamente e aquecida até 97 °C sob um fluxo de oxigênio medicinal (99,5% de O<sub>2</sub>). Esse procedimento teve uma duração de aproximadamente duas horas.

### 3.2.3 Estabilização das nanopartículas de maguemita com bicamada de lauráto

As nanopartículas de maguemita sintetizadas foram dispersas em água e o pH ajustado para 12 com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 molL<sup>-1</sup>. O ácido láurico foi adicionado tendo em vista a proporção 0,1 g de ácido láurico por grama

de sólido úmido de nanopartículas de maguemita. A mistura foi mantida sob sonicação por 10 minutos com pulsação de 2 s/pausa de 1 s e com uma amplitude de 40%, estabelecida no próprio equipamento (Sonics Vibracell VCX 750, Newtown, Estados Unidos). A suspensão coloidal resultante foi centrifugada por 10 minutos a 2400 g (Sigma 2K15, Alemanha). Por fim, a suspensão coloidal aquosa de nanopartículas funcionalizadas com ácido láurico foi lavada com água deionizada para remoção de ácido láurico em excesso utilizando-se um ultrafiltro (Millipore XFUF04701, França) o qual permitia a passagem do ácido láurico não adsorvido. A amostra foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos. Foi retirada uma alíquota desta suspensão para realizar as devidas caracterizações que estão descritas no item 3.3. Este fluido magnético foi rotulado com o código **BCL**.

### **3.2.4 Funcionalização do BCL com o fármaco anfotericina B**

Para adsorver o fármaco no BCL foi utilizada uma proporção de 0,6 mg de fármaco/mg de maguemita úmida. Esta relação fármaco/maguemita foi escolhida decorrente de trabalhos anteriores que demonstraram adsorção de 100% de anfotericina B nas bicamadas de laurato em nanopartículas de magnetita e de maguemita (Silva, 2008). A mistura permaneceu sob agitação mecânica por aproximadamente 24 horas. Foi retirada uma alíquota desta suspensão para realizar as devidas caracterizações que estão descritas no item 3.3. O restante foi estocado em frações a 4 °C. Este fluido magnético foi rotulado com o código **BCL-AmB**. O processo foi realizado dentro de um fluxo laminar devidamente esterilizado. As soluções contendo anfotericina B foram protegidas da luz, evitando assim a fotodegradação do fármaco.

## **3.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS SINTETIZADAS**

### **3.3.1 Difractometria de raio-X**

As nanopartículas de maguemita foram analisadas por difratometria de raio-X (DRX) para a caracterização da estrutura cristalina e para a estimativa do diâmetro médio das nanopartículas. Os difratogramas de raio-X foram obtidos pelo método do pó no equipamento Shimadzu - XRD-6000, equipado com a fonte de radiação Cu-

K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ), voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA (Soler, 2007). As amostras foram secas a 40 °C por 24 horas e trituradas em almofariz. Os dados foram coletados em  $2\theta$  de 25° a 70°, a uma velocidade de 2 graus  $\text{min}^{-1}$  e refinados pelo *software* Basic Process, fornecido pela Shimadzu. O diâmetro médio das nanopartículas foi estimado a partir da largura a meia altura do pico de reflexão mais intenso, por meio da fórmula de Debye-Scherrer (Cullity e Stock, 2001),

$$D = 0,9 \frac{\lambda}{B \cos \theta}$$

onde D é o diâmetro, 0,9 é o fator de correção,  $\lambda$  é o comprimento de onda de raio-X,  $\theta$  é o ângulo de difração do pico mais intenso e B é o valor corrigido de largura de linha à meia altura em relação à amostra padrão  $B = \sqrt{B_{amostra}^2 - B_{padrão}^2}$ . A amostra padrão utilizada foi o silício cristalino.

### 3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

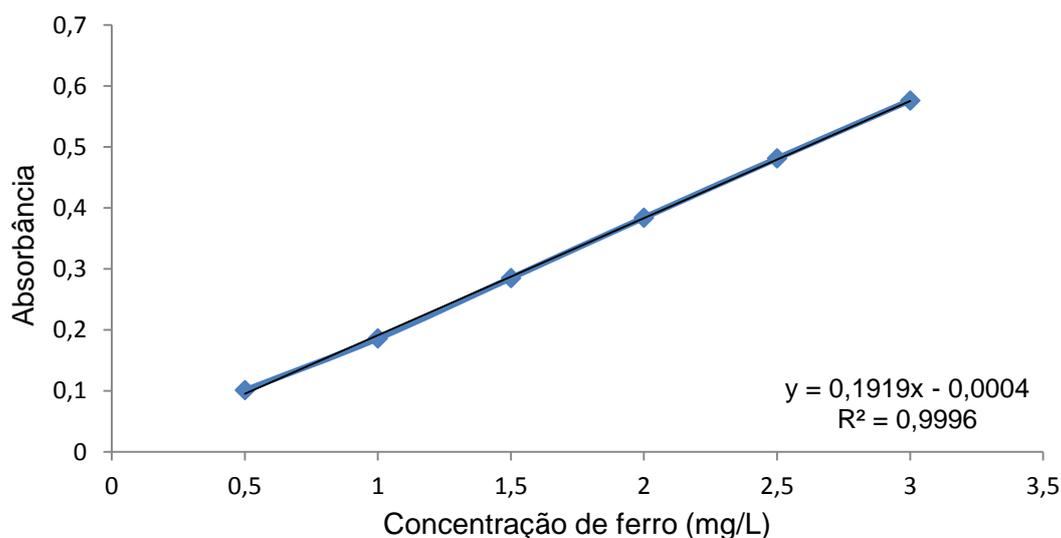
O diâmetro médio das amostras BCL-AmB e BCL foi determinado por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras foram diluídas mil vezes em água deionizada e dispersas em telas de microscopia eletrônica recobertas com Formivar®. Após a secagem por duas horas, as nanopartículas magnéticas foram analisadas e obtidas imagens em *MET JEOL 1011*. A partir das micrografias eletrônicas, foram obtidos os diâmetros de 1000 nanopartículas utilizando o programa de morfometria ImagePro Plus 5.1. Com os resultados foi construído um gráfico da distribuição de frequência dos diâmetros segundo Moraes e colaboradores (2002), determinando assim o diâmetro médio das nanopartículas das duas amostras.

### 3.3.3 Análise da concentração de ferro

A determinação da concentração de ferro presente nas nanopartículas foi realizada por espectroscopia eletrônica, por meio do método colorimétrico da orto-fenantrolina (Jeffery *et al.*, 1992). Nesse método o ferro introduzido em solução é reduzido ao estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por aquecimento com ácido e subsequentemente

o íon metálico reage com a fenantrolina. São necessárias três moléculas de fenantrolina para quelatar cada átomo do íon ferroso, formando assim o composto colorimétrico a ser mensurado.

Nanopartículas de BCL (100 µL) foram dissolvidas com ácido clorídrico concentrado a quente (q.s.p. 100 mL, em frasco volumétrico), promovendo a redução do íon férrico (proveniente da maguemita) para íon ferroso. Em outro frasco volumétrico, 5 mL da solução das NPMs dissolvidas foram reagidos com 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (100 mg/mL) e 5 mL de solução de 1,10-fenantrolina (1mg/mL). O volume foi completado para 100 mL e a absorvância foi medida em 515 nm por espectrofotômetro Biospectro SP-220. Foram realizadas dez medidas de absorvância e considerado o valor médio delas. Para determinar a concentração de ferro foi utilizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de ferro (Figura 5).



**Figura 5.** Curva padrão da concentração de ferro realizada por absorvância de luz, através do método colorimétrico da orto-fenantrolina.

No procedimento de funcionalização do BCL com o fármaco (item 3.2.4), a anfotericina B previamente solubilizada foi adicionada as nanopartículas. Então, a determinação da concentração de ferro do fluido magnético BCL-AmB foi realizada matematicamente utilizando a concentração de ferro do BCL e o volume adicionado do fármaco anfotericina B.

### 3.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho

Com a finalidade de investigar a formação da bicamada de laurato na superfície das nanopartículas e a posterior presença da anfotericina B, as nanopartículas BCL e BCL-AmB foram caracterizadas por espectroscopia infravermelho (FTIR-DRIFTS). Assim foi possível determinar os modos normais de vibração que podem estar relacionados aos grupos funcionais das moléculas de laurato e anfotericina B.

Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro PerkinElmer Spectrum 400, utilizando 32 varreduras, resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e região espectral entre  $4000$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ . Foi utilizada a técnica de transmitância e as amostras foram diluídas em KBr. Para obtenção do pó necessário à análise, as nanopartículas foram secas à temperatura ambiente por 48 horas.

### 3.3.5 Medidas do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

A medida do diâmetro hidrodinâmico foi realizada por espalhamento dinâmico da luz (DLS). O DLS, conhecido também como espectroscopia de fotocorrelação (PCS), determina o movimento Browniano e correlaciona este com o tamanho das partículas. Essa medida é feita a partir de uma iluminação das partículas com um *laser* no comprimento de onda de  $532\text{ nm}$  e analisam-se as flutuações da intensidade da luz espalhada. A equação de Stokes-Einstein relaciona as flutuações da luz espalhada com o tamanho das partículas (Malvern, 2005). No DLS, é medido um valor referente à partícula com uma camada de solvente associada a esta (camada de solvatação), denominado diâmetro hidrodinâmico. Para garantir o espalhamento da luz as amostras BCL-AmB e BCL foram diluídas quarenta vezes em água deionizada, colocadas em cubeta de poliestireno e levadas ao equipamento Zeta-Sizer (Nano ZS90, Malvern). Foram preparadas três cubetas por amostra e de cada cubeta foram determinadas três medidas.

As medidas de potencial zeta (carga de superfície das nanopartículas) das amostras BCL e BCL-AmB foram determinadas no mesmo equipamento Zeta-Sizer. As amostras utilizadas para determinar o diâmetro hidrodinâmico (diluídas quarenta vezes) foram retiradas das cubetas de poliestileno e colocadas nas cubetas

específicas para potencial zeta, levadas ao equipamento e determinando assim a carga de superfície das nanopartículas.

### **3.3.6. Determinação da concentração de anfotericina B**

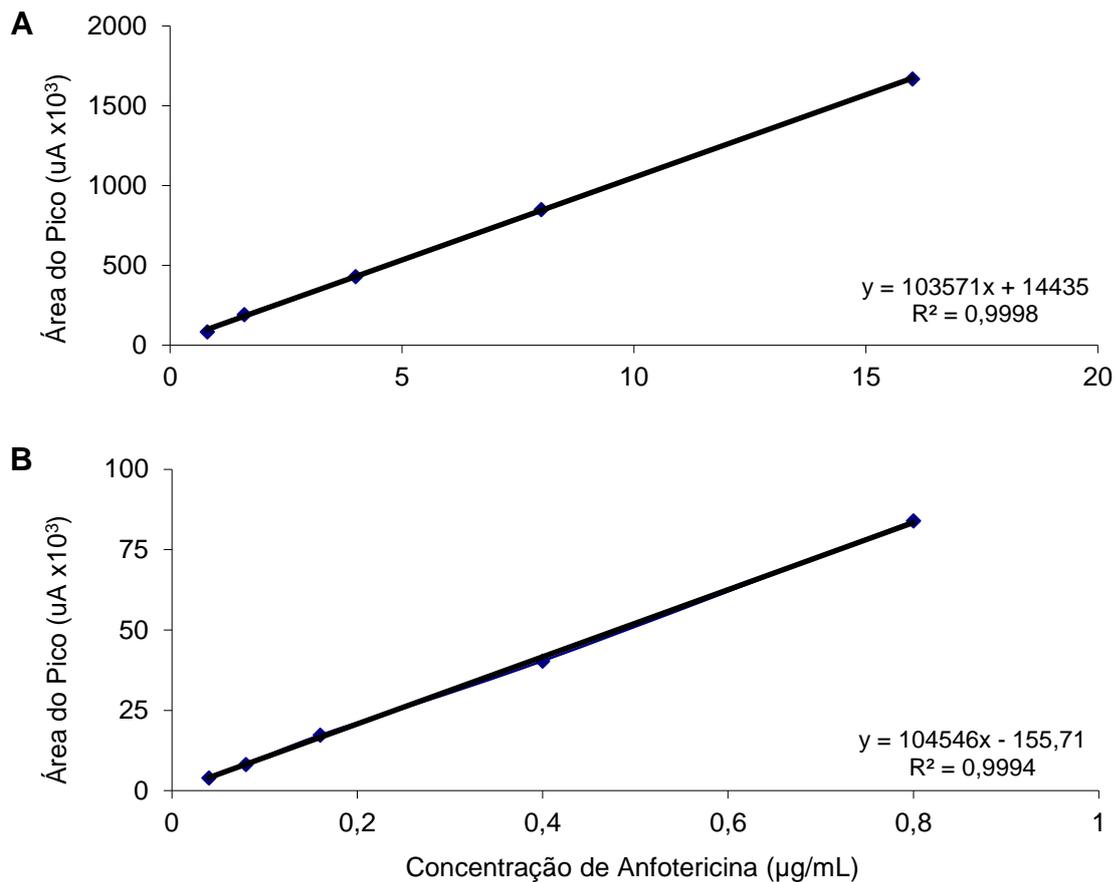
A determinação da concentração do fármaco adsorvido às nanopartículas (BCL-AmB) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (do inglês - High Pressure Liquid Chromatograph). O equipamento cromatográfico é composto por um desgaseificador em linha (Modelo DGU 20A<sub>5</sub>), um módulo de entrega de solvente (Modelo LC-20AT), um autosampler (Modelo SIL-20A<sub>HT</sub>), um forno de coluna (Modelo CTO-20A), um detector de UV (Modelo SPD-20A) e um sistema controlador (Modelo CBM-20A), sendo todos componentes do equipamento Shimadzu *prominence*.

Foi utilizada a coluna analítica de fase reversa ACE-RP 5 C18 (250 x 4,6 mm) (ACE, Escócia) e pré-coluna de mesma composição. A fase móvel foi constituída por acetonitrila:EDTA dissódico 10 mM, pH 4,6 (38:62). O fluxo da eluição isocrática foi de 1 mL/min com uma pressão média de 82 kgf/cm<sup>2</sup>. A eluição foi acompanhada por detecção da absorvância a 405 nm. O volume de solução injetado foi de 20 µL. A coluna foi mantida a 30 °C. Este protocolo foi estabelecido no Laboratório de Nanobiotecnologia pela técnica Karen Rapp Py-Daniel e ainda será submetido a publicação.

#### **3.3.6.1 Determinação da curva padrão da anfotericina B**

Previamente à determinação da concentração de AmB adsorvida as NPMs, foi determinada a curva padrão do fármaco no HPLC. Para tal, uma massa de 10 mg de AmB foi solubilizada em 10 mL de DMSO. A partir dessa solução inicial foram preparadas outras nove diluições: 0,04; 0,08; 0,16; 0,4; 0,8; 1,6; 4; 8 e 16 µg/mL. Essas diluições foram feitas com a fase móvel supracitada. A partir das áreas do pico de cada cromatograma e do tempo de retenção pré-definido para a AmB, foram construídas as curvas padrão do fármaco (Figura 6). Foram construídas duas curvas, pois se trabalhou com um amplo espectro de concentrações e dessa forma foi

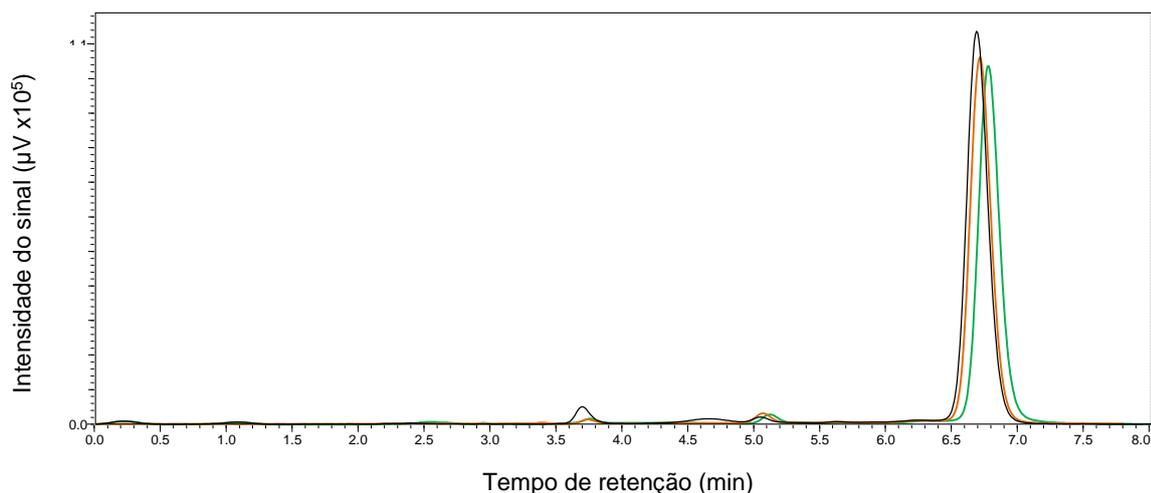
possível ver a linearidade e minimizar os erros principalmente das concentrações mais baixas.



**Figura 6.** Curva padrão da concentração de anfotericina B (AmB) determinada por HPLC. A) Concentrações mais altas B) Concentrações mais baixas. Nas áreas dos gráficos são apresentadas as funções junto com o respectivo valor de  $R^2$ .

### 3.3.6.2. Determinação da concentração de anfotericina B adsorvida as nanopartículas

Primeiramente foram testados os seguintes solventes para a extração da AmB presente nas nanopartículas: metanol, DMSO e fase móvel (acetonitrila:EDTA dissódico 10 mM, 38:62). O solvente que apresentou maior eficiência foi a fase móvel (Figura 7).



**Figura 7.** Cromatogramas dos solventes utilizados para extrair a anfotericina B das nanopartículas BCL-AmB. — Fase móvel, — Metanol, — DMSO.

Para determinar a concentração de AmB adsorvida à bicamada de laurato, primeiramente foi determinada a quantidade total do fármaco no fluido magnético e deste valor foi subtraída a quantidade do fármaco não adsorvida às NPMs.

A concentração total foi determinada a partir de uma alíquota (100 µL) da amostra BCL-AmB, a qual foi dispersa para 50 mL com a fase móvel. Algumas amostras foram sonicadas por 10 minutos, entretanto não apresentou diferença nos resultados obtidos. Dessa forma, optou-se pela não sonicação. A dispersão foi filtrada em filtro de nylon (0,22 µm) e analisada por HPLC conforme descrito no item 3.3.6.

A concentração do sobrenadante foi determinada a partir de alíquota da amostra BCL-AmB que foi submetida à separação magnética com o auxílio de ímã e de lã magnética. A alíquota foi diluída dez vezes em água deionizada e colocada em microtubo de centrifugação tipo *ependorff* contendo a lã magnética e o sistema foi então colocado em contato com o ímã. Passadas 24 horas, todo o sobrenadante foi retirado e o mesmo foi colocado em novo microtubo de centrifugação com outra lã magnética e o sistema colocado novamente em contato com o ímã, entretanto a separação magnética foi por 48 horas. Completada a separação magnética, 100 µL do sobrenadante foi centrifugado por 30 minutos a 24.100 g. Uma alíquota de 80 µL do sobrenadante do centrifugado foi disperso em fase móvel (q.s.p. 2 mL), filtrado

em filtro de nylon (0,22 µm) e analisada por RP-HPLC. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE COLOIDAL DO BCL E BCL-AMB

Para o estudo da estabilidade das nanopartículas das amostras BCL e BCL-AmB, algumas alíquotas foram mantidas a 4 °C e outras a temperatura ambiente. Todas as amostras foram mantidas abrigadas da luz, evitando a degradação do fármaco.

Foram utilizados o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta (item 3.3.5) como parâmetros para avaliação da estabilidade coloidal. Estes parâmetros foram mensurados com 0, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 195 e 240 dias após a síntese. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ANFOTERICINA B CONJUGADA

#### 3.5.1. Preparação do inóculo do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

A cepa do fungo *P. brasiliensis* que foi utilizada é a Pb18, disponível na coleção de fungos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. A cepa Pb18 foi cultivada em meio BHI suplementado (Soro fetal bovino 4%, glicose 4% e gentamicina 40 µg/mL). Esse cultivo ficou em agitador rotatório (150 rpm) e sob uma temperatura de 37 °C. Transcorridos seis dias de cultivo, este foi centrifugado a 600 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (ou *pellet*) foi então lavado repetidas vezes resuspendendo em PBS estéril (pH 7,4) até que o sobrenadante se tornasse límpido como o PBS. Para a determinação da concentração de leveduras viáveis foi utilizado o corante Verde-Janus 0,05% e a contagem foi realizada em uma câmara de Neubauer. Foi utilizada uma concentração de  $6,7 \times 10^6$  leveduras viáveis/mL em meio BHI líquido.

### 3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Na determinação da Concentração Inibitória Mínima - MIC (do inglês - *Minimum Inhibitory Concentration*), definida pela concentração que inibe o crescimento fúngico, foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato. Em cada poço da placa foram adicionados 150 µL da amostra (BCL-AmB, AmB ou BCL) e 150 µL da suspensão de células fúngicas ( $10^5$  leveduras viáveis/poço). Cada poço foi homogeneizado cuidadosamente. As placas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 40 rpm por um período de sete dias. Transcorrida essa etapa, 100 µL de cada poço foi colocado em placas de Petri devidamente preparadas com meio BHI sólido suplementado (Soro fetal bovino 4%, glicose 4% e gentamicina 40 µg/mL) e incubadas por 15 dias a 37 °C. Após a incubação, foi determinada a concentração que inibiu 100% do crescimento do *P. brasiliensis*. Para esses procedimentos foram seguidas as recomendações da NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA*), protocolo M27-2A (NCCLS, 2002).

Foram realizados dois experimentos. No primeiro foram utilizadas concentrações de anfotericina B do BCL-AmB de 0,125 até 512 µg/mL, em diluições seriadas.

Determinado um possível MIC, foi realizado um segundo experimento restringindo o espectro de concentrações, porém incluindo outras concentrações ao experimento. As concentrações de anfotericina B do BCL-AmB utilizadas foram 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2; 4 e 8 µg/mL. Foi determinado o MIC da anfotericina B desoxicolato de sódio e do BCL nas mesmas concentrações de ferro correspondente ao de anfotericina B da amostra de BCL-AmB.

## 3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ANFOTERICINA B CONJUGADA (BCL-AMB)

### 3.6.1 Manutenção dos cultivos celulares

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizados dois tipos celulares, células do túbulo contorcido proximal de porco (LLC-PK1, registro ATCC CL-101) e fibroblastos murino (NIH-3T3, registro ATCC CRL-1658).

A alíquota de NIH-3T3 foi descongelada rapidamente a 37 °C e depositada gentilmente em tubo tipo falcon contendo meio de cultivo DMEM suplementado (soro

fetal bovino 10% e penicilina/estreptomicina 1%) e tamponado com bicarbonato de sódio, sendo centrifugada e o *pellet* transferido para um frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e mantido em estufa a 37 °C e CO<sub>2</sub> 5%. Quando o cultivo atingiu a confluência de 60-70%, as células foram desprendidas do fundo do frasco de cultura pela adição da solução de tripsina-EDTA, centrifugadas, contadas em uma câmara de Neubauer e levadas para outro frasco de cultura. Para a alíquota de LLC-PK1 foi realizado o mesmo procedimento, porém, utilizando o meio de cultivo M199 suplementado (soro fetal bovino 3% e penicilina/estreptomicina 1%) e tamponado com bicarbonato de sódio.

### 3.6.2 Ensaio de viabilidade celular – MTT

O efeito da citotoxicidade da anfotericina B conjugada a nanopartículas foi avaliado pelo teste de viabilidade celular segundo o método de MTT estabelecido por Mosmann (1983). Este é um dos ensaios mais aceitos atualmente, pois a redução de sais de tetrazolium é uma maneira consistente para a avaliação do metabolismo celular. Uma reação de redução do MTT (3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) pelas células metabolicamente ativas por enzimas desidrogenase presente nas mitocôndrias, resulta como produto o formazan, composto de cor roxa, que é então solubilizado e quantificado por espectrofotometria.

Inicialmente foram depositadas 5x10<sup>3</sup> células por poço em placa de 96 poços e mantidas a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas. Após esse período, as células foram incubadas com as amostras BCL-AmB, AmB e BCL. Os tempos experimentais foram de 24 e 48 horas. Transcorrido esse período, o sobrenadante foi removido e adicionou-se a solução de MTT (0,5 mg/mL de MTT em meio de cultivo). Após três horas a 37 °C, a solução de MTT foi removida e foi colocado 100 µL de DMSO por poço para solubilizar o formazan formado. A quantificação do formazan foi realizada pela medida da absorbância no comprimento de onda 595 nm em espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

As concentrações de anfotericina B do BCL-AmB utilizadas foram 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 e 512 µg/mL. O BCL foi utilizado nas

mesmas concentrações de ferro correspondente ao de anfotericina B da amostra de BCL-AmB. Pelo ensaio foi definida a concentração citotóxica que diminuiu a viabilidade em 50% das células (CC<sub>50</sub>).

### **3.6.3. Avaliação do efeito genotóxico**

#### **3.6.3.1 Fragmentação de DNA em citômetro de fluxo**

O citômetro de fluxo fundamenta-se em fontes de laser que incidem sobre uma suspensão de células únicas por meio de um fluxo laminar, cuja câmara de fluxo é altamente controlada. A luz que incide sobre as células pode ser detectada por meio de detectores de luz posicionados paralelamente à célula (Forward Scatter ou FSC) e perpendicularmente (Side Scatter ou SSC), estabelecendo os parâmetros morfológicos necessários para discriminar diferentes tipos celulares. As propriedades fluorescentes das células na suspensão fluida são avaliadas por uma série de filtros e detectores fotomultiplicadores. Dessa forma, o citômetro de fluxo possibilita rapidamente avaliar e quantificar parâmetros morfológicos e fluorescentes de milhares de células (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

As células foram cultivadas conforme item 3.6.1. Foram semeadas 10<sup>5</sup> células em cada poço de uma placa de seis poços de fundo chato. Para adesão celular, as placas foram mantidas a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas. Após esse período, as células foram incubadas com BCL-AmB e AmB nas respectivas concentrações obtidas no ensaio de respectivos MIC (item 3.5.2). Os tempos experimentais foram de 24 e 48 horas. Após esse período os sobrenadantes foram retirados e utilizados a seguir.

As células foram desprendidas do fundo dos poços pela adição de uma solução de tripsina-EDTA e a solução foi neutralizada com o sobrenadante supracitado, de modo a manter, dentro da análise, as células que se desprenderam do fundo da placa no decorrer do experimento. A solução celular foi centrifugada (380 g por 5 minutos) e o *pellet* ressuspenso em PBS. Esse processo foi repetido duas vezes. Em seguida, as células foram incubadas com 50 µg/mL RNase A por 30 minutos a 37 °C e posteriormente incubadas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo em tampão de lise (citrato de sódio 0,1%, Triton X-100 0,1% e iodeto de propídeo 20 µg/mL em PBS, pH 7,4) por 30 minutos a temperatura ambiente (Liu *et al.*, 2011).

Foram quantificados dez mil eventos por amostra em citômetro de fluxo CyFlow® (Partec, Germany) e analisados pelo software Windows™ FlowMax®. O

corante fluorescente iodeto de propídeo foi excitado com o laser diodo azul (488 nm) e detectado no canal FL2 (590 nm a 620 nm). O DNA fragmentado (DNAf) foi identificado como a população sub-G1 (conteúdo de DNA  $<2n$ ) e a porcentagem de fragmentação foi estabelecida considerando-se todo conteúdo de DNA  $<4n$ . Os histogramas foram obtidos no software FlowJo 7.6.3. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

### 3.6.3.2 Fragmentação de DNA pelo Ensaio Cometa

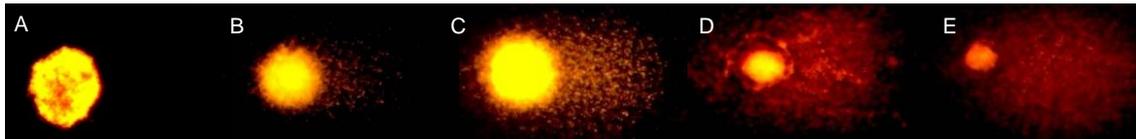
As células foram cultivadas conforme item 3.6.1. Foram semeadas  $10^5$  células em cada poço de uma placa de seis poços de fundo chato. Para adesão celular, as placas foram mantidas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período, as células foram incubadas com BCL-AmB e AmB com os respectivos MICs (item 3.5.2) e CC<sub>50</sub> definidas pelo ensaio MTT (item 3.6.2)

Os tempos experimentais foram de 24 e 48 horas. Após esse período os sobrenadantes foram retirados e utilizados a seguir. As células foram retiradas dos poços com uma solução de tripsina-EDTA e a solução foi neutralizada com o sobrenadante supracitado, de modo a manter, dentro da análise, as células que se desprenderam do fundo da placa no decorrer do experimento. As células foram centrifugadas e diluídas em agarose LMP (do inglês - low melting point agarose) (0,5%) para a confecção das lâminas. Foram utilizadas lâminas previamente cobertas com agarose (1,5% p/v em tampão PBS). Em seguida, as lâminas foram imersas em tampão de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Lauril sarcosinato de sódio 1%, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10) por 1h. Posteriormente as lâminas foram incubadas em tampão de eletroforese (EDTA 10 mM e NaOH 0,3 M) pré-resfriado a 4 °C por 20 minutos. A eletroforese transcorreu a 25 V e 300 mA, por um período de 20 minutos, e posteriormente foi ajustado o pH das lâminas com tampão Tris (0,4 M).

Realizou-se análise cega de diferentes regiões da lâmina para manter a imparcialidade. Foram analisadas três lâminas de cada tratamento ou controle, com 100 nucleóides em cada lâmina, perfazendo 300 cometas.

Para a análise em microscópio de fluorescência (ZEISS Axioskop 2 - HAL 100), as lâminas foram coradas no momento da análise com brometo de etídio (20

$\mu\text{g/mL}$ ). As imagens do cometa foram analisadas visualmente segundo protocolo descrito por Singh (1988) e classificados em quatro classes de dano de acordo com tamanho da cauda e intensidade, denominadas por classes 0, 1, 2, 3 e 4 (Figura 8). Para análise estatística foram somados as classes 1 e 2 e considerados como danos moderados, e as classes 3 e 4 somados foram considerados como danos elevados. A classe 0 é considerada sem danos.



**Figura 8.** Fotomicrografia celular evidenciando as diferentes classes de dano genético. A) Classe 0. B) Classe 1. C) Classe 2. D) Classe 3. E) Classe 4.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5. A análise de variância (ANOVA) uma via com o pós-teste de Tukey ou Bonferroni foi usada para testar as diferenças intergrupos nos ensaios de toxicidade celular e determinação da estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos. Neste último, também foi determinada a correlação pelo teste Spearman. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

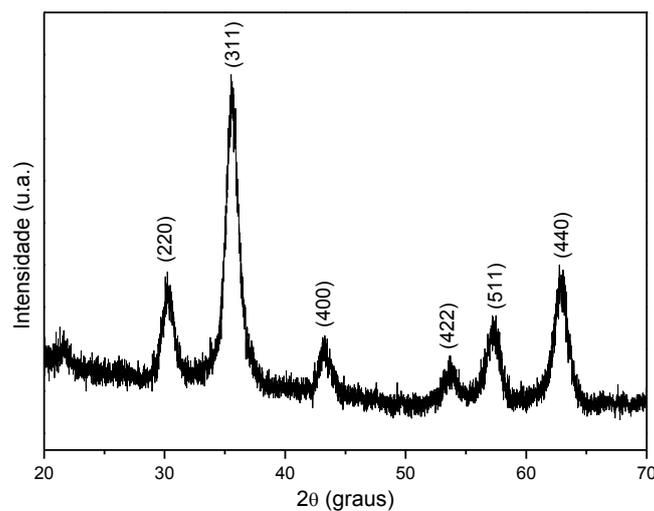
## ***RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

#### 4.1.1 Diâmetro médio obtido por difração de raio-X (DRX) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

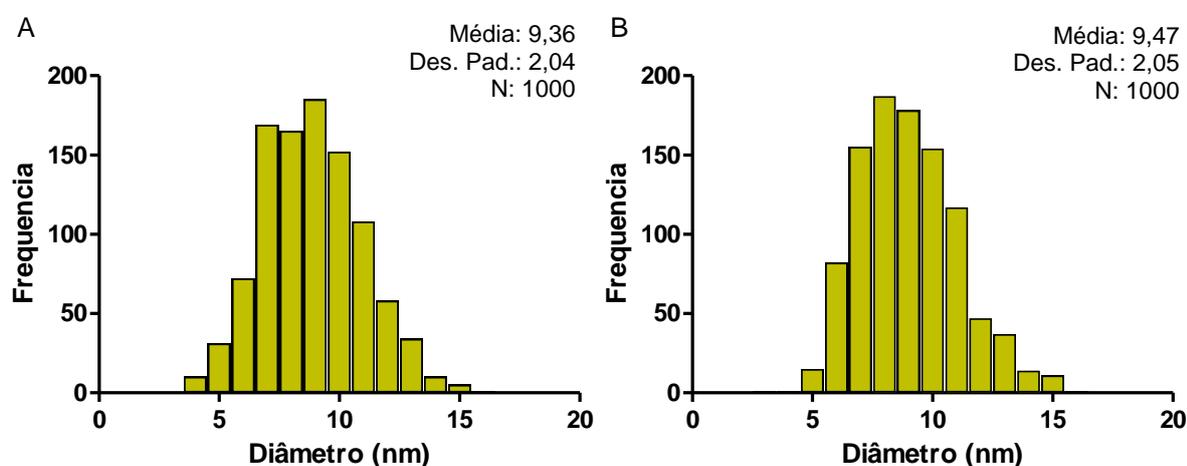
A amostra BCL foi caracterizada por difração de raio-X (DRX). O difratograma (Figura 9) mostra um padrão de DRX referente à formação de um material constituído por uma única fase cristalina cúbica do tipo espinélio com os picos de reflexão (220), (311), (400), (422), (511) e (440).



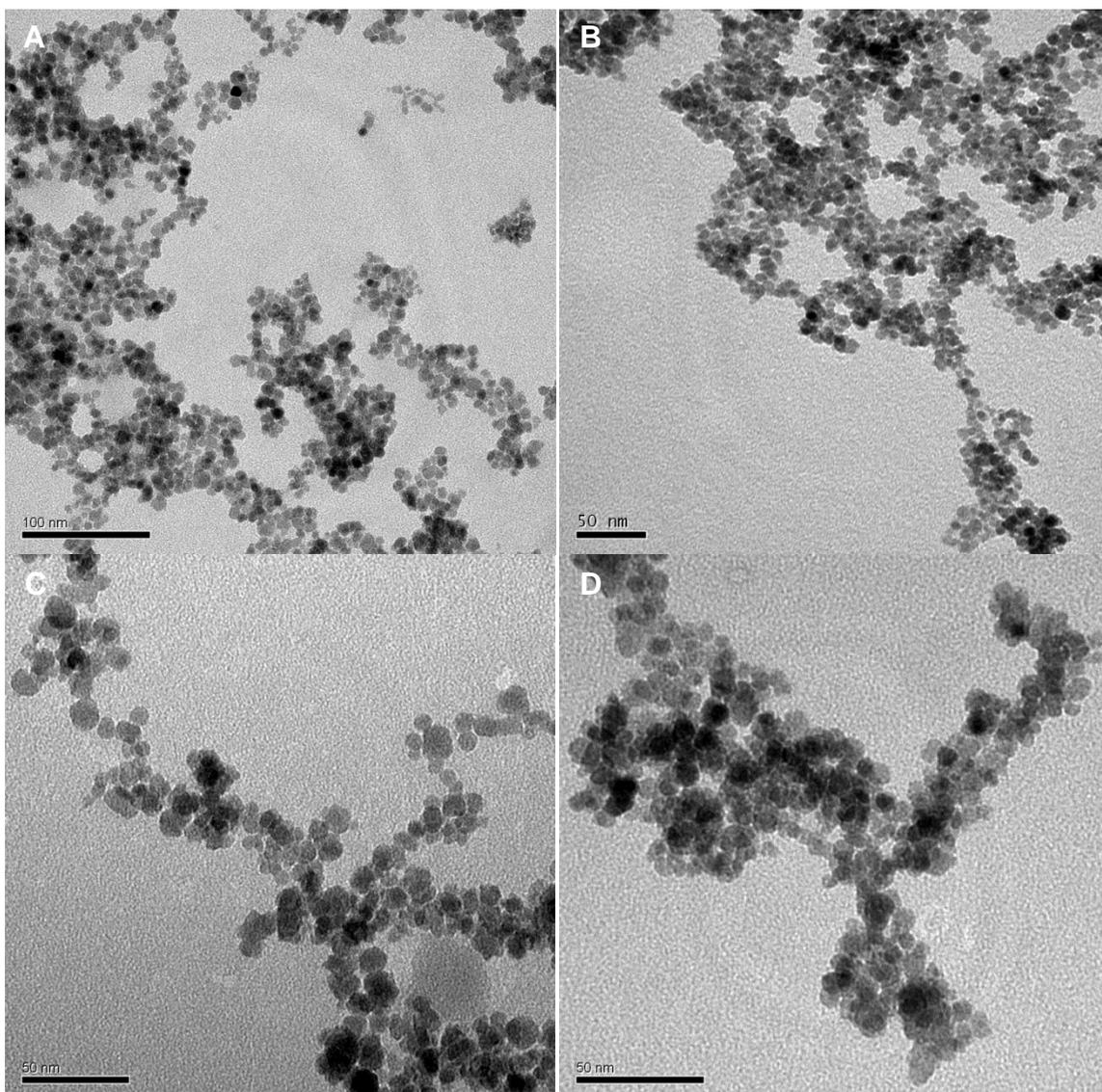
**Figura 9.** Difratograma de raio-X obtido pelo método do pó das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de lauráto (BCL).

O diâmetro médio dos domínios cristalinos foi estimado a partir da largura a meia altura do pico de maior intensidade. A amostra BCL apresentou um diâmetro médio estimado de 13 nm. A amostra BCL-AmB possui o mesmo valor de diâmetro médio por DRX, pois nesse caso o diâmetro determinado é o do óxido de ferro da nanopartícula (maguemita).

O diâmetro médio das NPMs também foi determinado por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram mensurados os diâmetros de mil nanopartículas para cada amostra (BCL e BCL-AmB) (Figura 10). As amostras BCL e BCL-AmB apresentaram um diâmetro médio por MET de  $9,3 \text{ nm} \pm 2$  e  $9,5 \text{ nm} \pm 2$ , respectivamente. A figura 11 apresenta fotomicrografias eletrônicas das duas amostras em diferentes aumentos.



**Figura 10.** Distribuição de frequência dos diâmetros médios determinados por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato - BCL (A) e recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B - BCL-AmB (B).



**Figura 11.** Micrografias eletrônicas das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato – BCL (B e D) e recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B – BCL-AmB (A e C) em duas magnificações.

#### 4.1.2 Concentração total de ferro e concentração de nanopartículas

Pelo método da orto-fenantrolina foi possível determinar a concentração de ferro das NPMs da amostra BCL. Lembrando que a concentração de ferro de BCL-AmB foi determinada matematicamente utilizando a concentração de ferro do BCL e o volume adicionado do fármaco anfotericina B. A concentração de ferro das amostras BCL e BCL-AmB foi de 11,92 e 10,75 mg/mL, respectivamente. Não houve uma mensuração da proporção  $Fe^{2+}:Fe^{3+}$ , pois o óxido deste trabalho é a maguemita, a qual apresenta somente o  $Fe^{3+}$ .

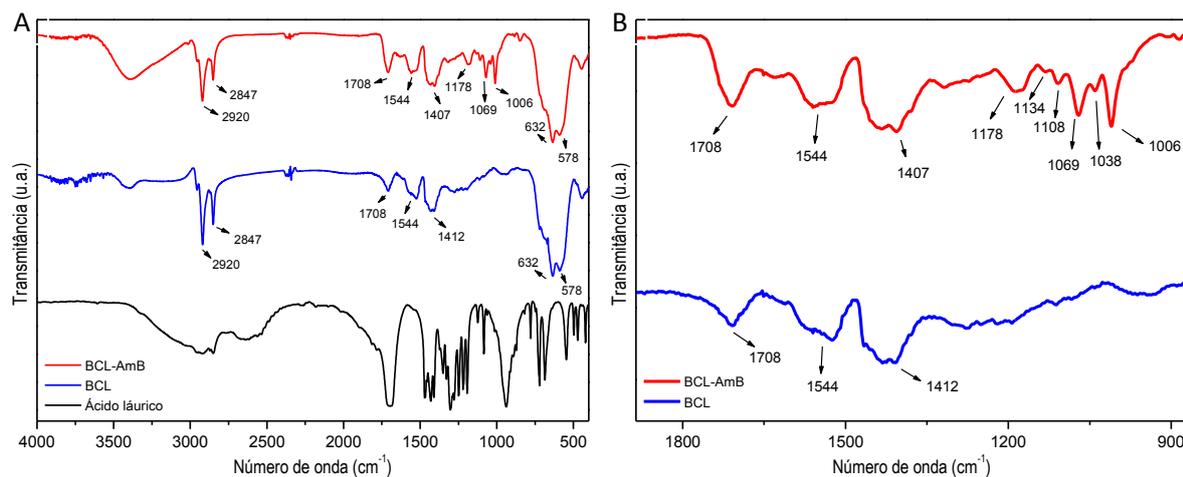
A partir do diâmetro médio estimado pela DRX, da concentração de ferro e da densidade da maguemita ( $5 \text{ g/cm}^3$ ), foi determinado o número de nanopartículas por mililitro. A partir do diâmetro médio, é calculado o volume de uma nanopartícula, considerando que a mesma seja esférica. Pelo volume obtido e pela densidade da maguemita, foi determinado a massa de uma nanopartícula. Por fim, pela massa e pela concentração de ferro foi calculado o número de nanopartículas por mililitro. A concentração de nanopartículas das amostras BCL e BCL-AmB foi de  $3,78 \times 10^{14}$  e  $3,41 \times 10^{14}$  nanopartículas/mL, respectivamente.

#### 4.1.3 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros no infravermelho das amostras BCL e BCL-AmB estão apresentados na figura 12. A funcionalização com laurato sobre a superfície de BCL e BCL-AmB é sugerida pela presença das bandas em  $2920$  e em  $2847 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações de estiramento das ligações C–H nos grupos  $-\text{CH}_2-$  e  $-\text{CH}_3-$ . As bandas em  $1544$ ,  $1412$  e  $1407 \text{ cm}^{-1}$  são provenientes das vibrações assimétricas e simétricas de  $\text{COO}^-$ , sugerindo a presença de grupos carboxilato referentes às bicamadas constituídas por moléculas de ácido láurico desprotonadas (Jain *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010).

No espectro referente à BCL-AmB houve bandas características de ligações entre átomos na molécula de anfotericina B. As bandas em  $1134$  e em  $1108 \text{ cm}^{-1}$  são características de vibrações C–O–C e a banda em  $1069 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída aos estiramentos assimétricos das ligações C–O. Observa-se ainda a existência de bandas em  $1038 \text{ cm}^{-1}$  devido às vibrações fora do plano de N–H<sub>2</sub> e aos estiramentos simétricos de C–O–C, e em  $1006 \text{ cm}^{-1}$  devido às absorções características das ligações C–C–H (Gagós e Arczewska, 2010).

A existência das bandas em  $578$  e em  $632 \text{ cm}^{-1}$  são referentes aos estiramentos da ligação Fe–O (Belin, 2002; Yang *et al.*, 2010). Constata-se a presença do dímero do ácido láurico nos sólidos obtidos devido à presença da banda em  $1708 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída aos estiramentos das ligações C=O de ácido carboxílico em ponte (Capelle *et al.*, 2003; Santos, 2012). Ainda na figura 12 é apresentado o espectro do ácido láurico puro para comparação.

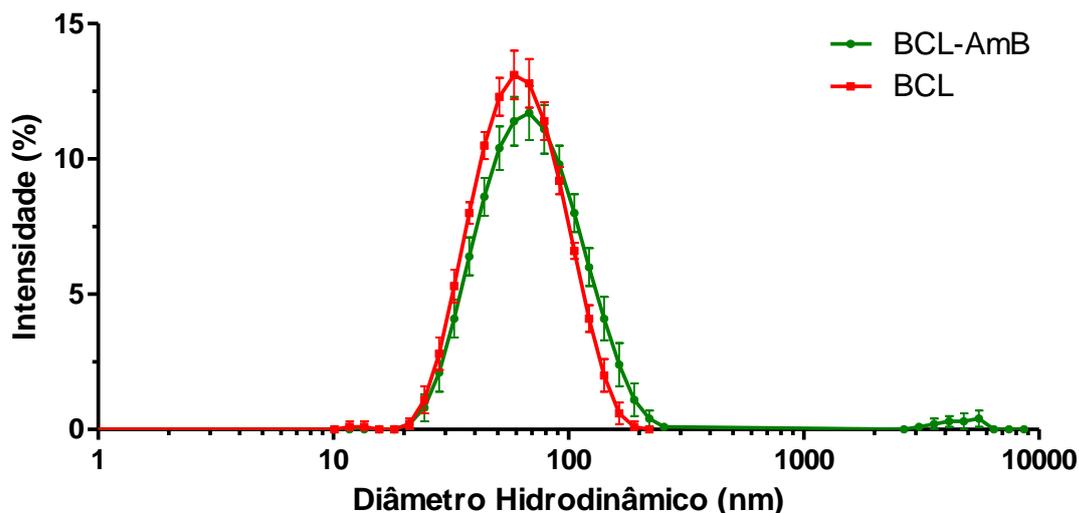


**Figura 12.** Espectro infravermelho das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL) e recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB). A) Região espectral entre 4000 e 400 cm<sup>-1</sup>. B) Região espectral entre 2000 e 800 cm<sup>-1</sup>. Em “A” é evidenciado o espectro do ácido láurico puro.

#### 4.1.4 Diâmetro hidrodinâmico e carga de superfície

O diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das amostras BCL-AmB e BCL foram determinados logo após o término da síntese. As amostras foram diluídas quarenta vezes em água nanopura. O valor do diâmetro hidrodinâmico vem atrelado a um índice, chamado de índice de polidispersão (Pdl), que apresenta o grau de homogeneidade da dispersão coloidal.

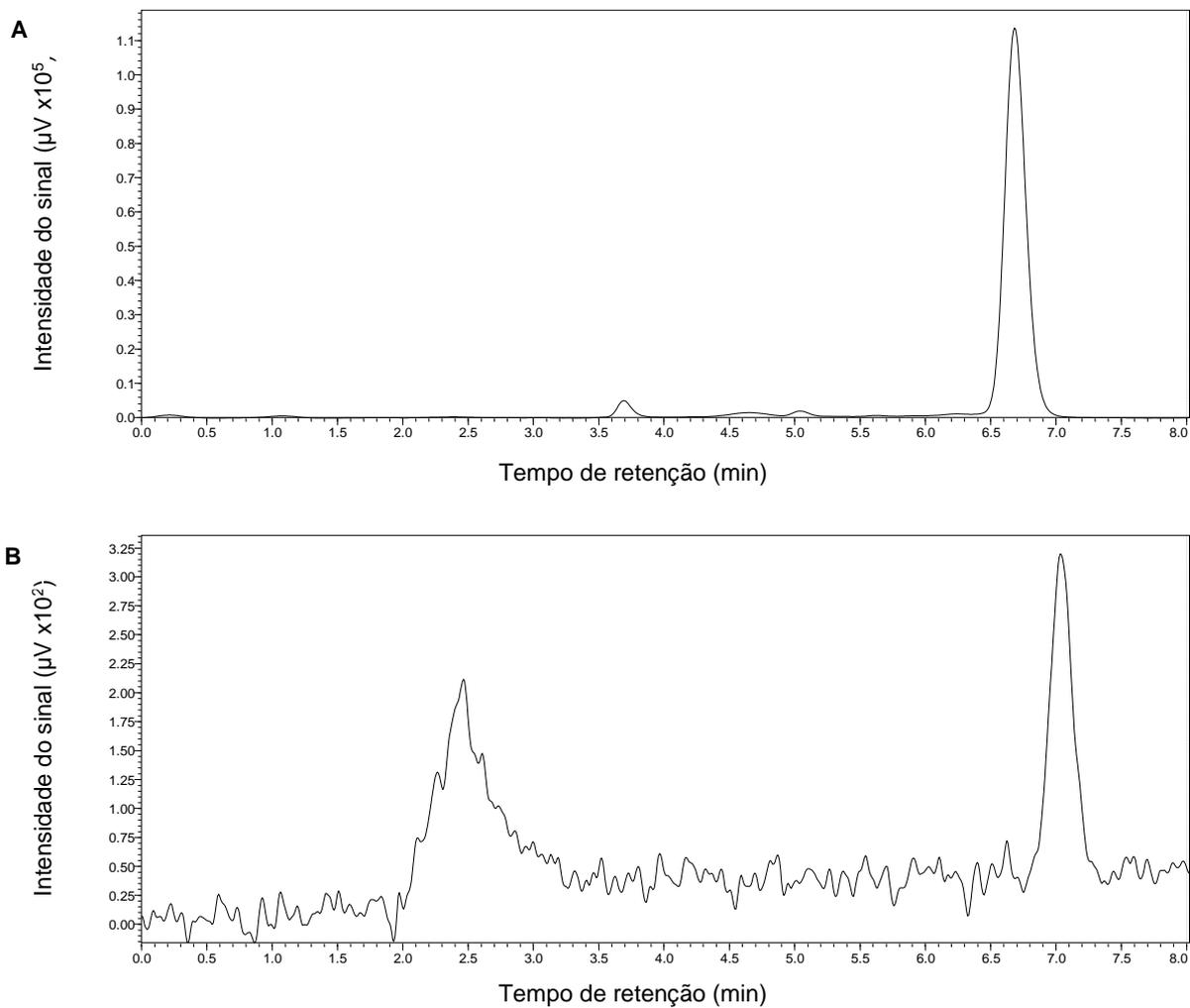
O potencial zeta de BCL-AmB e BCL foi -28,7 e -42,5 mV, respectivamente. O diâmetro hidrodinâmico médio de BCL-AmB e BCL foi 62,54 e 55,27 nm com Pdl de 0,211 e 0,167, respectivamente. Na figura 13 é apresentada a variação de diâmetros nas duas amostras analisadas.



**Figura 13.** Distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de lauráto - BCL (■) e recobertas com bicamada de lauráto e conjugada com anfotericina B - BCL-AmB (■).

#### 4.1.5 Concentração de anfotericina B

A concentração do fármaco presente na amostra BCL-AmB foi determinada por HPLC a partir da concentração de AmB encontrada no sobrenadante da amostra após separação magnética prévia. O valor encontrado (18,73  $\mu\text{g/mL}$ ) foi subtraído do valor da concentração total de AmB no fluido magnético (6073,74  $\mu\text{g/mL}$ ). Para determinar a concentração total de fármaco, as NPMs foram solubilizadas com fase móvel acetonitrila:EDTA dissódico 10mM pH 4,6 (38:62), como descrito no item 3.3.6. Portanto, a concentração de anfotericina B adsorvida a bicamada de lauráto foi de 6055  $\mu\text{g/mL}$ . Os cromatogramas são apresentados na figura 14.



**Figura 14.** Cromatogramas da determinação da concentração de anfotericina B (AmB) conjugada as nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de lauráto e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB). A) Cromatograma para a determinação da concentração total de AmB. B) Cromatograma para a determinação da concentração de AmB no sobrenadante da amostra após separação magnética.

#### 4.1.6 Características físico-químicas das amostras BCL e BCL-AmB

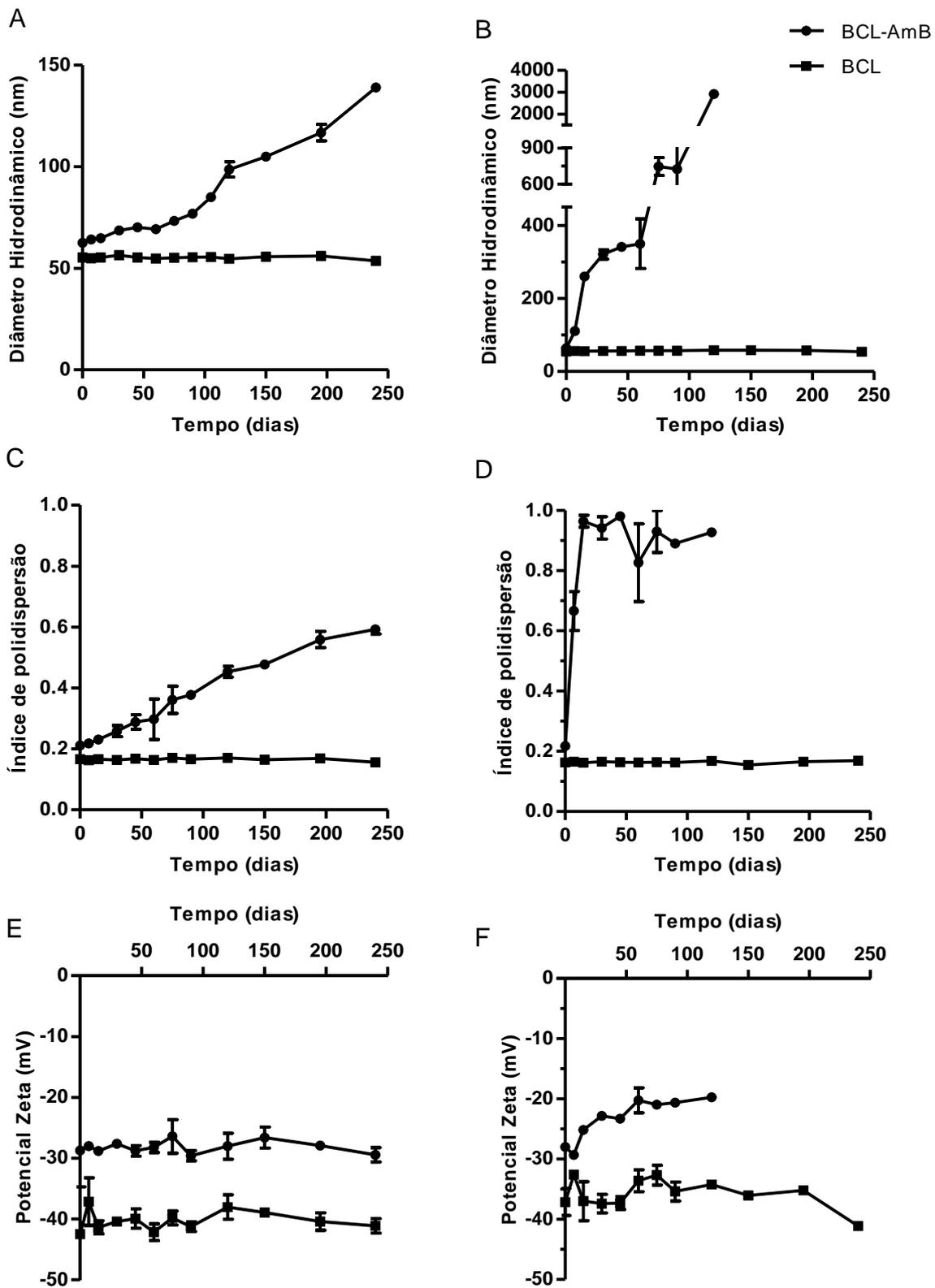
A tabela 2 apresenta um resumo das caracterizações físico-químicas determinadas para as duas amostras de nanopartículas magnéticas sintetizadas (BCL-AmB e BCL).

**Tabela 2.** Características físico-químicas das nanopartículas magnéticas.

Parâmetros	BCL-AmB	BCL
Diâmetro médio – DRX / MET (nm)	13 / 9,5	13 / 9,4
Diâmetro hidrodinâmico (nm)	62,54	55,27
Potencia zeta (mV)	-28,7	-42,5
Número de partículas / mL	$3,41 \times 10^{14}$	$3,78 \times 10^{14}$
Concentração de ferro (mg/mL)	10,75	11,92
Concentração de AmB (mg/mL)	6,1	-

#### 4.2 ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

A estabilidade coloidal das amostras BCL e BCL-AmB foram acompanhadas por 240 dias, mantendo alíquotas em duas diferentes condições de temperatura, 4 °C e temperatura ambiente (TA). A estabilidade coloidal foi determinada pelas medidas de diâmetro hidrodinâmico médio (DH), índice de polidispersão (Pdl) e pelo potencial zeta (PZ), que é a carga de superfície.



**Figura 15.** Estabilidade coloidal das nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de lauráto (BCL) e recobertas com bicamada de lauráto e conjugadas com anfotericina B (BCL-Amb) mantidas a 4 °C (A, C e E) e temperatura ambiente (B, D e F). A e B apresentam a variação dos diâmetros hidrodinâmicos. C e D apresentam a variação do índice de polidispersão. E e F apresentam a variação dos potenciais zeta (carga de superfície).

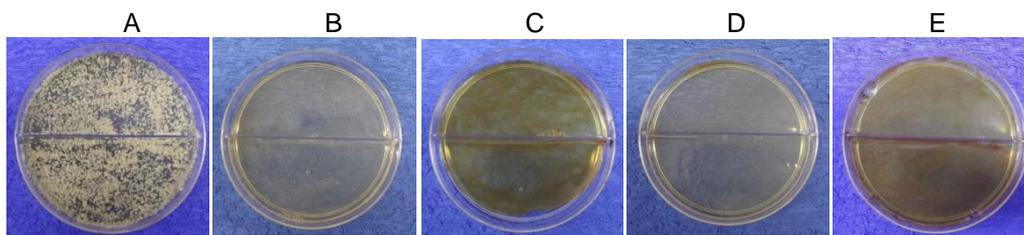
Os resultados obtidos para o DH (Fig. 15A e 15B) indicam que para BCL, a correlação entre o tempo e o diâmetro hidrodinâmico não foi significativa a 4 °C ( $r_{\text{Spearman}} = 0,011$ , correlação não significativa) nem a TA ( $r_{\text{Spearman}} = 0,47$ , correlação não significativa). Porém, o DH de BCL-AmB variou significativamente com o tempo, tanto a 4 °C ( $r_{\text{Spearman}} = 0,99$ ,  $p < 0,05$ ) quanto a TA ( $r_{\text{Spearman}} = 0,98$ ,  $p < 0,05$ ). A variação do diâmetro hidrodinâmico de BCL-AmB, a 4 °C e a TA, foi de 62 a 140 nm e 64 a 2920 nm, respectivamente.

Os índices de polidispersão (Fig. 15C e 15D) indicam que para BCL, a correlação entre o tempo e o Pdl não foi significativa a 4 °C ( $r_{\text{Spearman}} = 0,15$ , correlação não significativa) nem a TA ( $r_{\text{Spearman}} = 0,26$ , correlação não significativa). Entretanto, o Pdl de BCL-AmB variou significativamente com o tempo a 4 °C ( $r_{\text{Spearman}} = 1,00$ ,  $p < 0,001$ ). A variação do índice de polidispersão de BCL-AmB, a 4 °C, foi de 0,211 a 0,592. A amostra BCL-AmB a TA não apresentou correlação significativa, apesar do valor  $r_{\text{Spearman}} = 1,00$ . Foi realizado o teste da análise de variância uma via com pós-teste Tukey para BCL-AmB a TA e foi observada uma diferença significativa entre o primeiro ponto (dia zero) e todos os outros pontos da mesma linha ( $p < 0,001$ ).

O potencial zeta a 4 °C (Fig. 15E) não variou significativamente em BCL ( $r_{\text{Spearman}} = 0,23$ , correlação não significativa) e em BCL-AmB ( $r_{\text{Spearman}} = 0,05$ , correlação não significativa). O mesmo foi observado para BCL a TA (Fig. 15F) ( $r_{\text{Spearman}} = -0,04$ , correlação não significativa). Entretanto, o PZ de BCL-AmB a TA apresentou correlação com o tempo ( $r_{\text{Spearman}} = 0,91$ ,  $p < 0,05$ ). A variação do potencial zeta de BCL-AmB a TA foi de -29 a -19 mV.

### 4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ANFOTERICINA B CONJUGADA

A anfotericina B conjugada com nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de laurato (BCL-AmB) foi avaliada quanto a sua atividade antifúngica em ensaios *in vitro* contra a espécie *P. brasiliensis*, cepa Pb18. A Figura 17 ilustra que a concentração mínima inibitória (MIC) do BCL-AmB foi de 1,25 µg/mL. O MIC da AmB livre foi de 1 µg/mL e a amostra BCL, como previsto, não apresentou MIC, pois não tem em sua constituição nenhum agente antifúngico. O controle negativo foi feito com as leveduras sem nenhum tratamento (Figura 16A). Em alguns poços foram colocados somente o meio BHI sem leveduras (Figura 16B) e em outros BHI com as amostras BCL-AmB (Figura 16C), AmB (Figura 16D) e BCL (Figura 16E), mostrando que nem o meio, nem as amostras estavam contaminados com algum agente biológico (Figura 16).



**Figura 16.** Controle do crescimento do fungo *Paraccoccidioides brasiliensis* em placas de cultivo com meio BHI sólido. A) Suspensão de leveduras em meio BHI. B) somente meio BHI líquido. C) BCL-AmB com meio BHI. D) Anfotericina B com meio BHI. E) BCL com meio BHI.

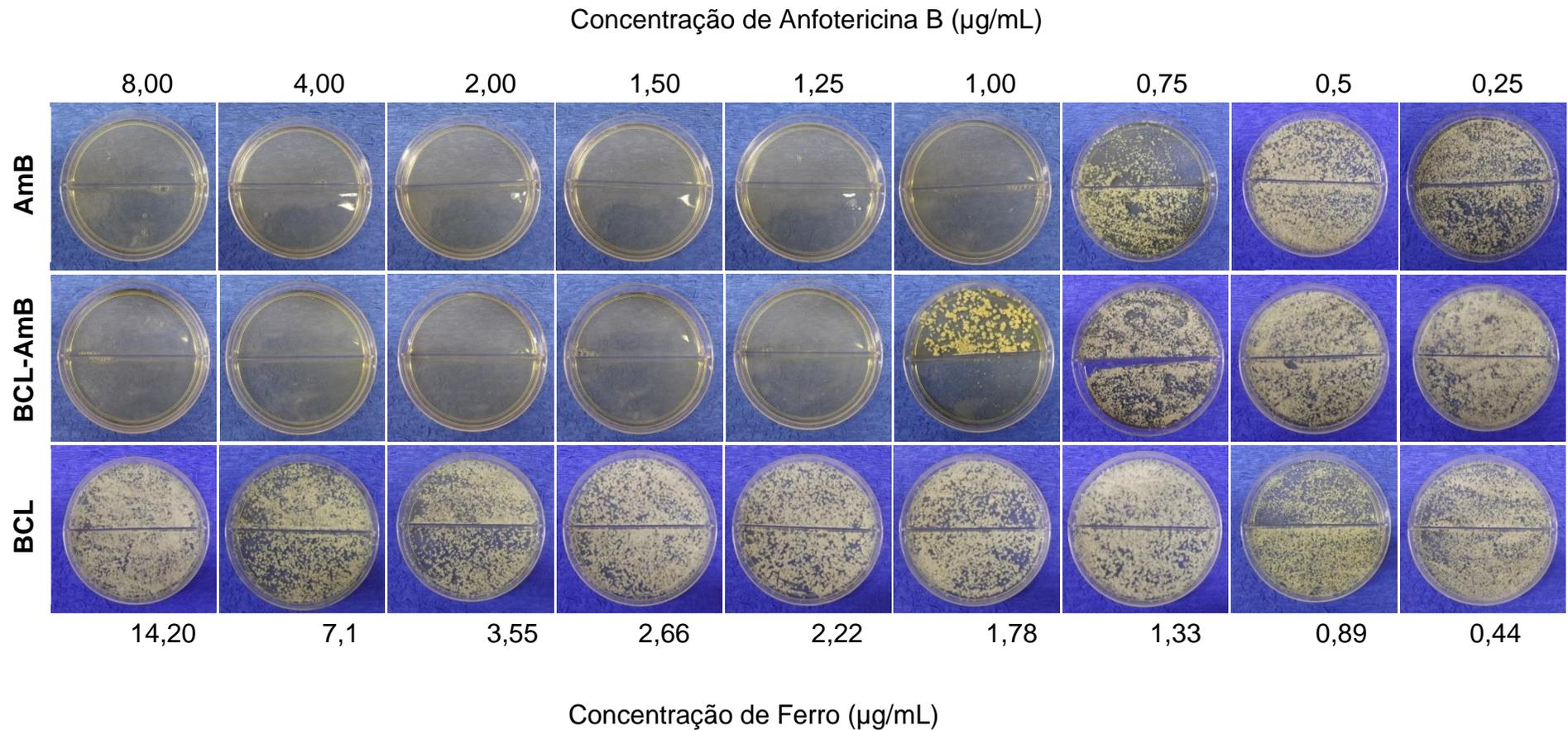


Figura 17. Concentração mínima inibitória (MIC) da anfotericina B livre (AmB) e conjugada a nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL-AmB) contra o fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. Nanopartícula sem fungicida (BCL) testada nas mesmas concentrações correspondentes de ferro da amostra BCL-AmB. Na parte superior é demonstrada as concentrações de anfotericina B do tratamento com AmB e BCL-AmB. Na parte inferior são demonstradas as concentrações de ferro dos tratamentos BCL-AmB e BCL.

#### 4.4 TOXICIDADE DA ANFOTERICINA B CONJUGADA

Os ensaios de toxicidade foram realizados em células do túbulo contorcido proximal de porco (LLC PK1) e fibroblastos murino (NIH-3T3) com o intuito de verificar uma possível alteração da toxicidade da anfotericina B quando conjugada a nanopartículas magnéticas. A citotoxicidade foi determinada pela viabilidade celular (ensaio MTT) e a genotoxicidade pela fragmentação de DNA (ensaios cometa e citometria de fluxo).

##### 4.4.1 Citotoxicidade

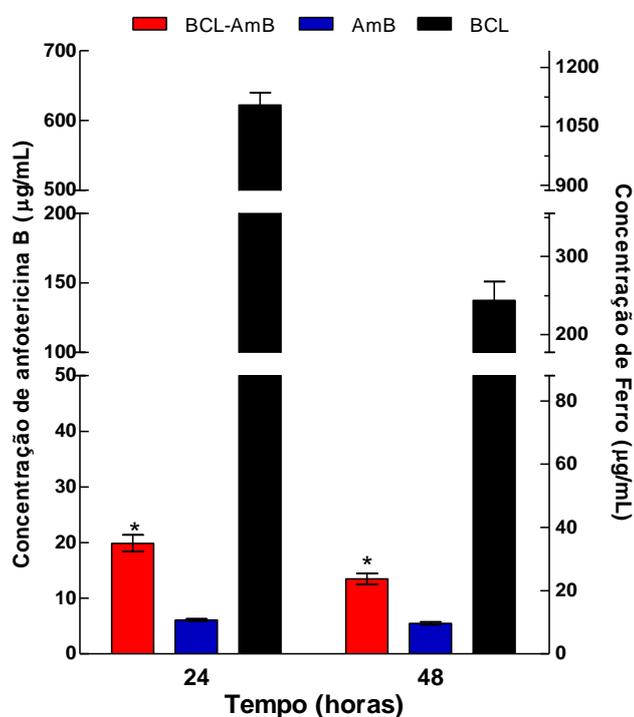
A viabilidade celular foi determinada em dois tempos experimentais (24 e 48 horas) e a citotoxicidade das amostras BCL-AmB e AmB foram comparadas pela concentração citotóxica que diminuiu a viabilidade em 50% das células ( $CC_{50}$ ). As concentrações da amostra BCL utilizadas foram as concentrações equivalentes de ferro presente na amostra BCL-AmB conforme mostra a Tabela 3.

**Tabela 3.** Correspondência entre as concentrações de anfotericina B (AmB) e de ferro (Fe) em BCL-AmB.

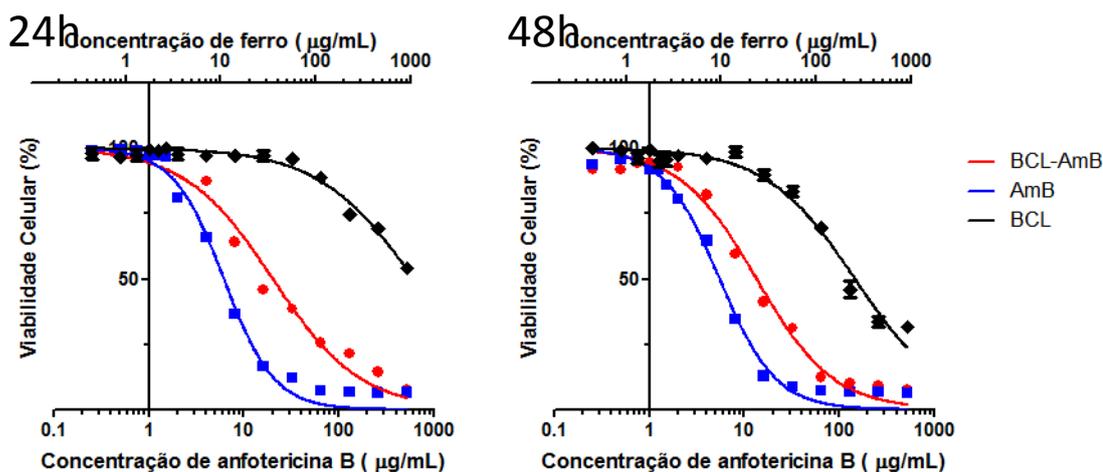
	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )														
AmB	512,0	256,0	128,0	64,0	32,0	16,0	8,0	4,0	2,0	1,5	1,25	1,00	0,75	0,50	0,25
Fe	908,8	454,4	227,2	113,6	56,8	28,4	14,2	7,1	3,5	2,6	2,22	1,78	1,33	0,89	0,44

Para a linhagem NIH-3T3 no tempo experimental de 24 horas, BCL-AmB apresentou citotoxicidade menor que AmB, uma vez que a  $CC_{50}$  do complexo nanoestruturado (19,88  $\mu\text{g/mL}$ ) foi 3,25 vezes maior que a  $CC_{50}$  do fármaco livre (6,10  $\mu\text{g/mL}$ ). Embora a  $CC_{50}$  do BCL-AmB diminuiu com 48 horas de incubação (13,47  $\mu\text{g/mL}$ ), ainda foi 2,4 vezes maior que a  $CC_{50}$  do AmB, 5,5  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 18). Existem diferenças estatísticas entre as  $CC_{50}$  do BCL-AmB e AmB dentro do mesmo tempo experimental e entre as  $CC_{50}$  do BCL-AmB variando de 24 para 48 horas ( $p < 0,05$ ). Isso pode ser corroborado analisando a figura 19 na qual se constata diferenças estatísticas entre os tratamentos BCL-AmB e AmB nas concentrações de 2 a 256  $\mu\text{g/mL}$  e 1,5 a 32  $\mu\text{g/mL}$  nos tempos experimentais de 24 e 48 horas, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

A amostra BCL apresentou uma  $CC_{50}$  de 1105 e 244  $\mu\text{g}$  de ferro/mL nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. Isso corresponde as concentrações de anfotericina B de 622,5 e 137,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Assim, BCL apresentou uma citotoxicidade muito baixa, uma vez que suas  $CC_{50}$  foram 31 e 10 vezes maiores que as  $CC_{50}$  de BCL-AmB. Existe diferença estatística entre BCL e BCL-AmB desde a concentração 7,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  até a concentração mais alta de ferro (24 horas) e desde 3,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  até a concentração mais alta de ferro (48 horas) com  $p < 0,05$ .



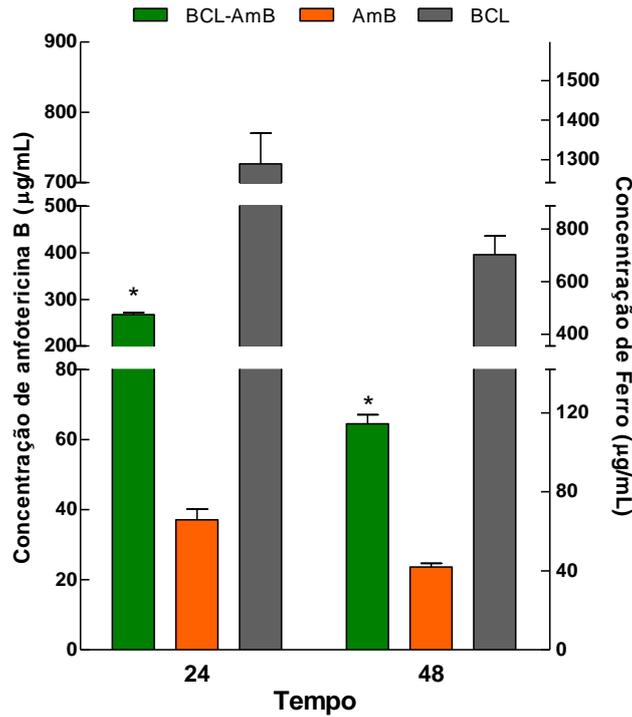
**Figura 18.** Concentração citotóxica que diminui em 50% a viabilidade das células ( $CC_{50}$ ) em fibroblastos (NIH-3T3) tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL); recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB) e com anfotericina B (AmB), por 24 ou 48 horas. (\*) diferença significativa entre BCL-AmB e AmB dentro do mesmo tempo experimental,  $p < 0,05$ .



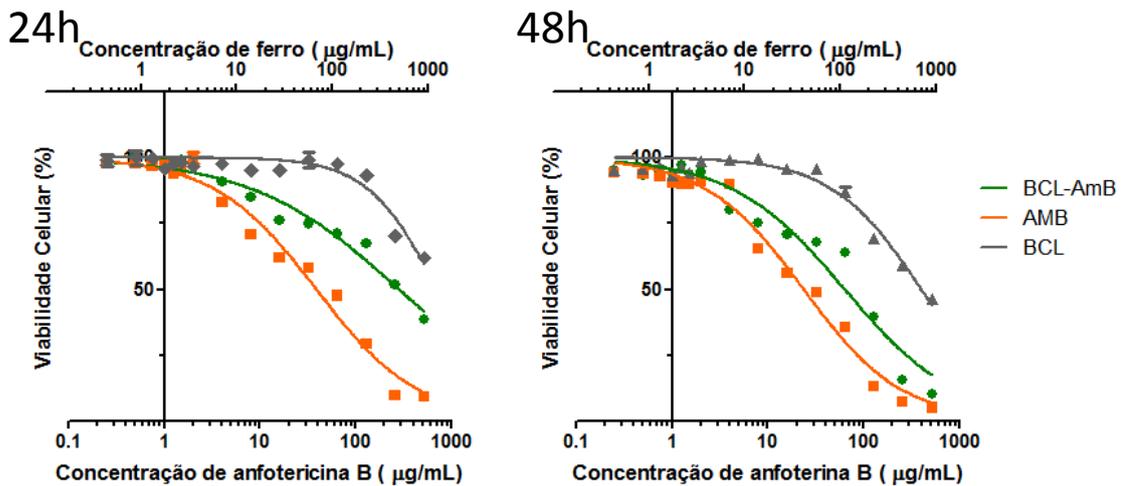
**Figura 19.** Porcentagem de fibroblastos (NIH-3T3) viáveis após incubação com nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de lauráto (BCL), recobertas com bicamada de lauráto e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB) e com anfotericina B (AmB), por 24 ou 48 h

Para a linhagem LLC-Pk1 no tempo experimental de 24 horas, BCL-AmB apresentou citotoxicidade menor que AmB, uma vez que a  $CC_{50}$  do complexo nanoestruturado (267,45  $\mu\text{g/mL}$ ) foi 7,2 vezes maior que a  $CC_{50}$  do fármaco livre (37,15  $\mu\text{g/mL}$ ). Embora a  $CC_{50}$  do BCL-AmB diminuiu com 48 horas de incubação (64,53  $\mu\text{g/mL}$ ), ainda foi 2,7 vezes maior que a  $CC_{50}$  do AmB, 23,67  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 20). Existem diferenças estatísticas entre as  $CC_{50}$  do BCL-AmB e AmB dentro do mesmo tempo experimental e entre as  $CC_{50}$  do BCL-AmB variando de 24 para 48 horas ( $p < 0,05$ ). Isso pode ser corroborado analisando a figura 21 na qual se constata diferenças estatísticas entre os tratamentos BCL-AmB e AmB nas concentrações de 4 a 512  $\mu\text{g/mL}$  e 4 a 256  $\mu\text{g/mL}$  nos tempos experimentais de 24 e 48 horas, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

A amostra BCL apresentou uma  $CC_{50}$  de 1290 e 703  $\mu\text{g}$  de ferro/mL nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. Isso corresponde as concentrações de anfotericina B de 726,6 e 396,1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Assim, BCL apresentou uma citotoxicidade muito baixa, uma vez que suas  $CC_{50}$  foram 2,7 e 6,1 vezes maiores que as  $CC_{50}$  da amostra BCL-AmB. Existe diferença estatística entre BCL e BCL-AmB desde a concentração 14,2  $\mu\text{g/mL}$  até a concentração mais alta de ferro (24 horas) e desde 7,1  $\mu\text{g/mL}$  até a concentração mais alta de ferro (48 horas) com  $p < 0,05$ .



**Figura 20.** Concentração citotóxica que diminui em 50% a viabilidade das células ( $CC_{50}$ ) em células do túbulo contorcido proximal (LLC-Pk1) tratados nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL), recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB) e com anfotericina B (AmB), por 24 ou 48 horas. (\*) diferença significativa entre BCL-AmB e AmB dentro do mesmo tempo experimental,  $p < 0,05$ .



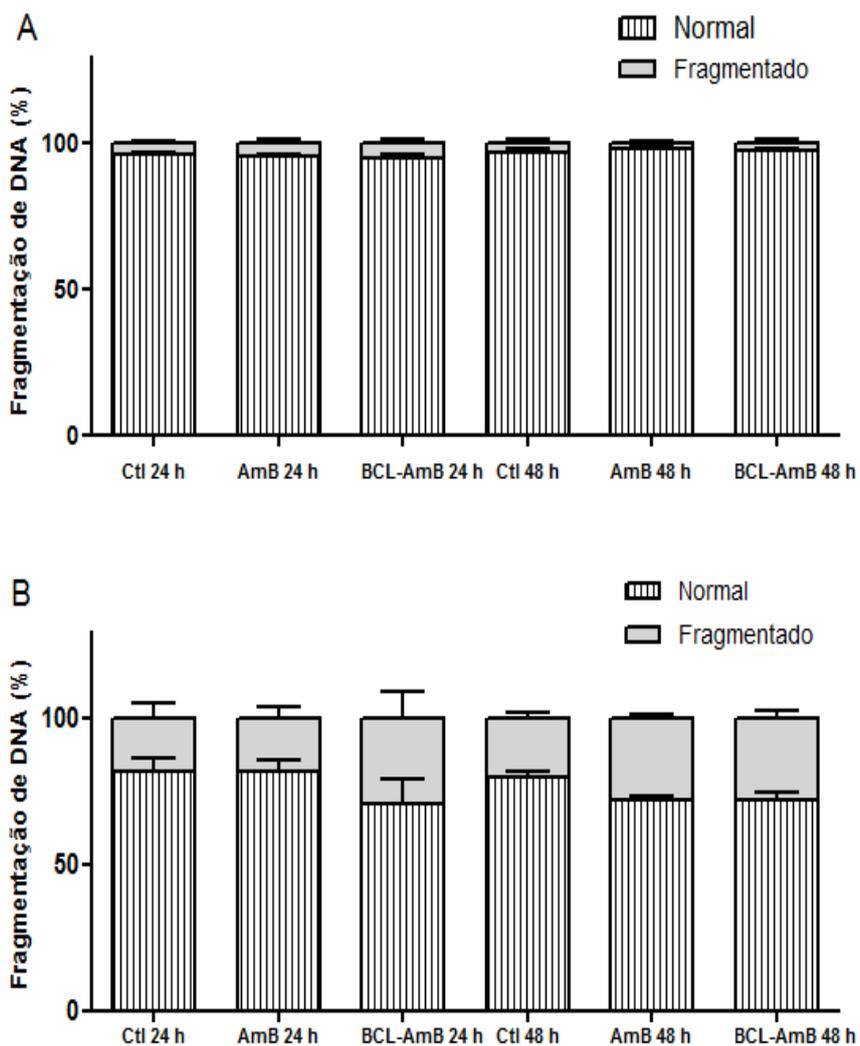
**Figura 21.** Porcentagem de células do túbulo contorcido proximal (LLC-Pk1) viáveis após incubação com nanopartículas magnéticas recobertas com bicamada de laurato (BCL), recobertas com bicamada de laurato e conjugada com anfotericina B (BCL-AmB) e com anfotericina (AmB), por 24 ou 48 horas.

## 4.4.2 Genotoxicidade

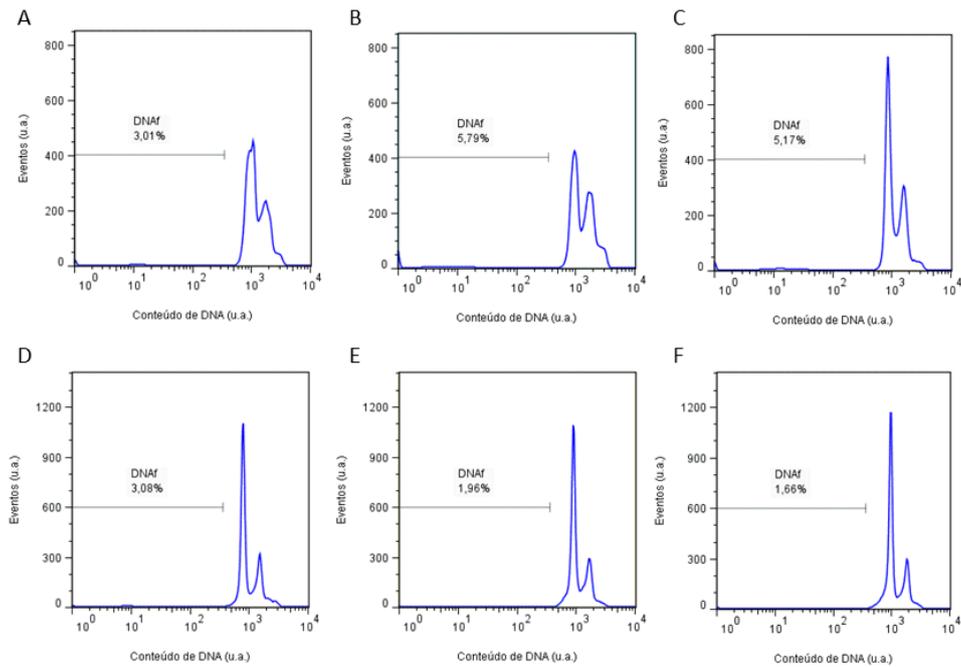
### 4.4.2.1 Fragmentação de DNA em citômetro de fluxo

Ambas as linhagens celulares NIH-3T3 e LLC-Pk1 apresentaram baixos índices de fragmentação de DNA (DNAf) após os tratamentos com AmB e BCL-AmB (Figura 22). As concentrações utilizadas foram as determinadas pelo MIC (Item 3.5.2) sendo 1 e 1,25 µg/mL para a anfotericina B e BCL-AmB, respectivamente. Os ensaios foram realizados por 24 e 48 horas. O controle (Ctl) foi definido pelas células não tratadas.

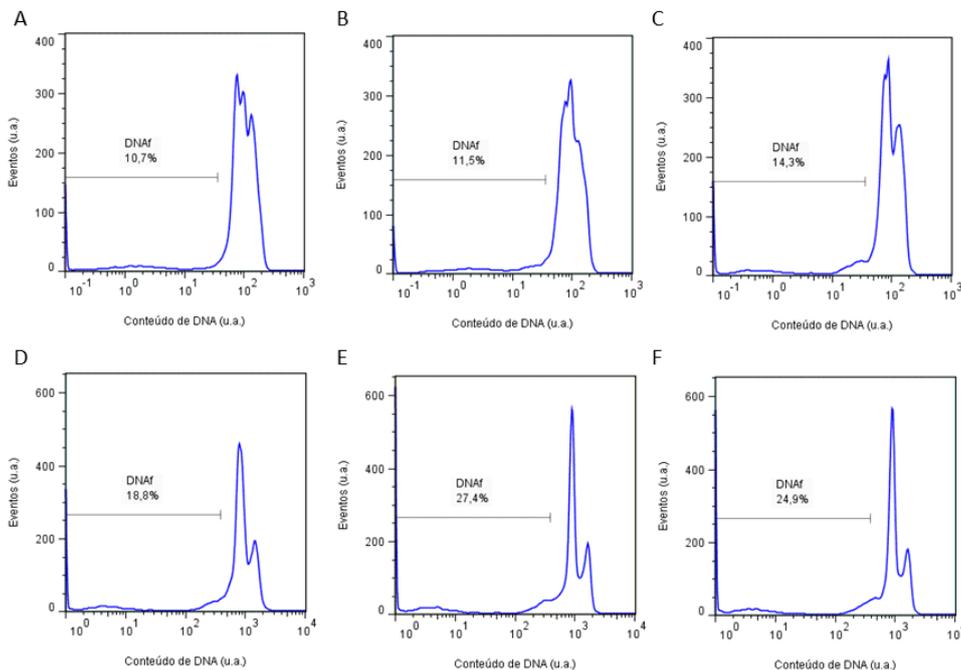
Na linhagem celular NIH-3T3, não foram evidenciadas diferenças significativas na fragmentação de DNA em 24 h (3,93% ± 0,81 Ctl; 4,56% ± 0,86 AmB e 5,21% ± 0,91 BCL-AmB,  $p > 0,05$ ) e 48 h (3,17% ± 1,01 Ctl; 1,79% ± 0,53 AmB e 2,83% ± 0,99 BCL-AmB,  $p > 0,05$ ) comparando-se os grupos tratados e não tratados. Na linhagem LLC-Pk1, as taxas de fragmentação de DNA em relação ao grupo controle em 24 h (18,47% ± 4,79 Ctl; 18,03% ± 3,74 AmB e 29,55% ± 8,80 BCL-AmB) e 48 h (20,08% ± 1,80 Ctl; 28,05% ± 1,12 AmB e 28,08% ± 2,40 BCL-AmB) não foram estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Em ambas as linhagens celulares e tempos, não existem diferenças significativas nas taxas de fragmentação de DNA comparando-se os tratamentos com AmB e BCL-AmB ( $p > 0,05$ ). Nos histogramas abaixo estão representados os perfis de fragmentação de DNA dos grupos tratados e controle das linhagens NIH-3T3 (Figura 23) e LLC-Pk1 (Figura 24) em 24 h e 48 h.



**Figura 22.** Fragmentação de DNA em citômetro de fluxo. A) NIH-3T3. B) LLC-Pk1. Células não tratadas (Ctl) e tratadas com AmB (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e BCL-AmB (1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por diferentes períodos de tratamento. Os dados foram expressos como porcentagem de fragmentação de DNA  $\pm$  erro padrão de dois experimentos independentes. A.  $p > 0,05$  para Ctl vs AmB e Ctl vs BCL-AmB em ambos 24 h e 48 h. B.  $p > 0,05$  para Ctl vs AmB e Ctl vs BCL-AmB em ambos 24 h e 48 h.



**Figura 23.** Fragmentação de DNA em células NIH3T3 controle (A, D), tratadas com AmB (B, E) e BCL-AmB (C, F) por 24 h (A, B, C) e 48 h (D, E, F). Os histogramas são representativos de cada grupo experimental e demonstram a intensidade de fluorescência do DNA total. DNaF representa a população sub-G1 e foi expressa como porcentagem de fragmentação de DNA em relação ao conteúdo de DNA total.



**Figura 24.** Fragmentação de DNA em células LLC controle (A, D), tratadas com anfotericina AmB (B, E) e BCL-AmB (C, F) por 24 h (A, B, C) e 48 h (D, E, F). Os histogramas são representativos de cada grupo experimental e demonstram a intensidade de fluorescência do DNA total. DNaF representa a população sub-G1 e foi expressa como porcentagem de fragmentação de DNA em relação ao conteúdo de DNA total.

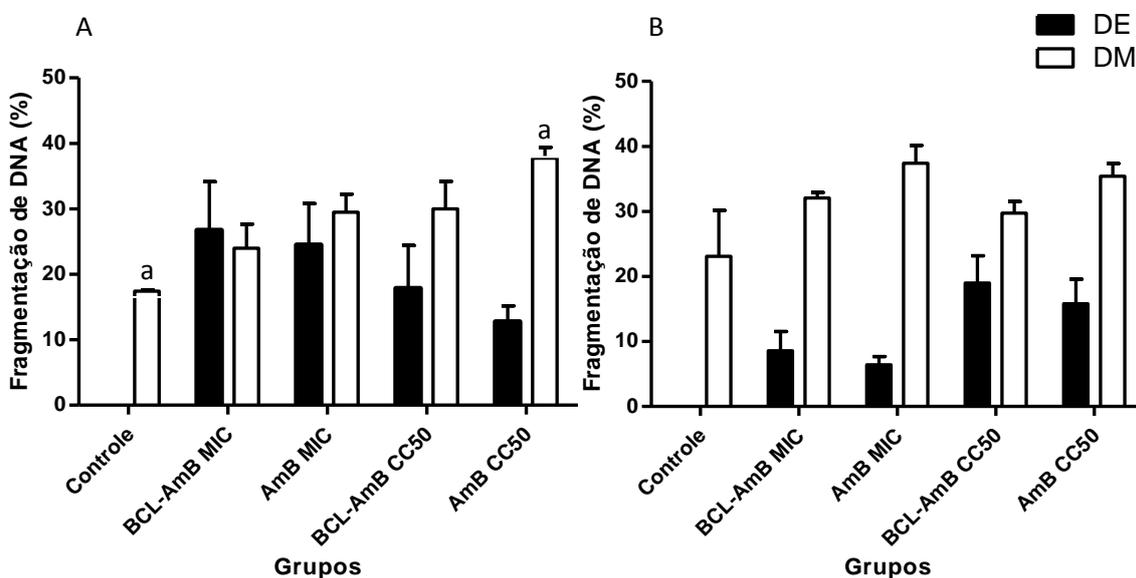
#### 4.4.2.2 Fragmentação de DNA pelo Ensaio Cometa

A fragmentação de DNA foi apresentada em porcentagens de danos elevados (DE) e danos moderados (DM). As linhagens celulares LLC-Pk1 e NIH-3T3 foram tratadas com BCL-AmB e AmB em duas concentrações diferentes em cada um dos tempos testados (24 e 48 horas). As concentrações utilizadas estão apresentadas na tabela 4.

**Tabela 4.** Concentrações utilizadas na ensaio cometa ( $\mu\text{g/mL}$ ).

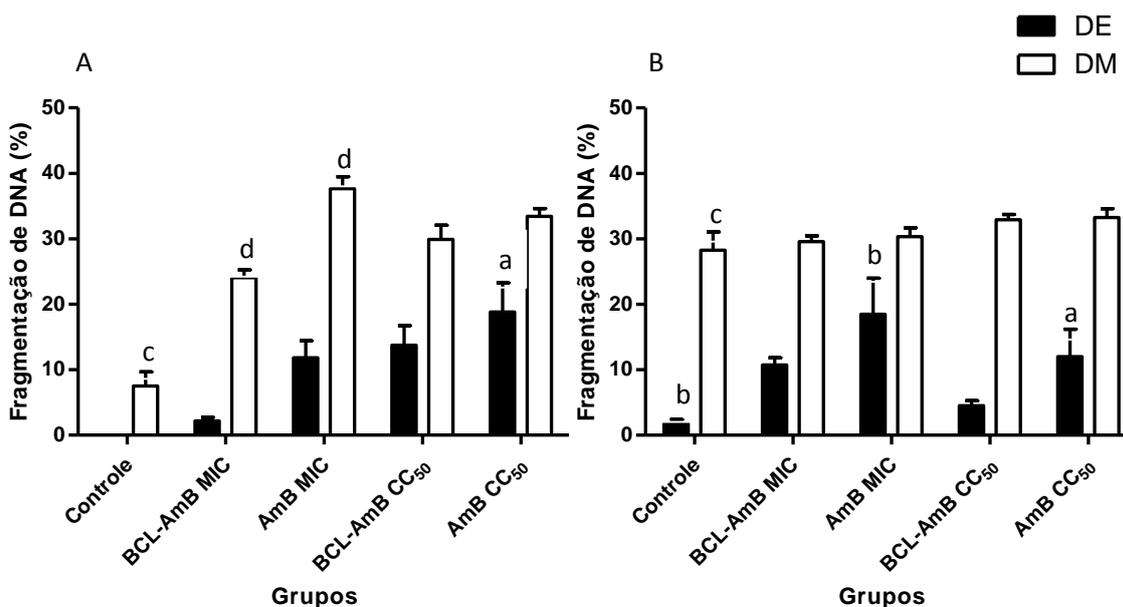
Grupos	LLC-Pk1	NIH-3T3
BCL-AmB – MIC	1,25	1,25
AmB – MIC	1,0	1,0
BCL-AmB – CC <sub>50</sub> – 24h	267,45	19,88
BCL-AmB – CC <sub>50</sub> – 48h	64,53	13,47
AmB – CC <sub>50</sub> – 24h	37,15	6,10
AmB – CC <sub>50</sub> – 48h	23,67	5,5

Os resultados para a linhagem celular LLC-Pk1 são apresentados na figura 25. Comparando-se pares de colunas, houve diferença significativa apenas nos danos moderados com 24 horas entre o grupo controle ( $17,4 \pm 0,4$ ) e AmB – CC<sub>50</sub> ( $37,7 \pm 2,8$ ).



**Figura 25.** Fragmentação de DNA pelo ensaio cometa. Porcentagens Dano Elevado (DE) e Dano Moderado (DM) em células LLC-Pk1 após exposição a BCL-AmB e AmB. A) Tempo experimental de 24 horas. B) Tempo experimental de 48 horas. As concentrações de BCL-AmB utilizadas foram 1,25 (MIC), 267 (CC<sub>50</sub> 24 horas) e 64  $\mu\text{g/mL}$  (CC<sub>50</sub> 48 horas). As concentrações de AmB utilizadas foram 1,0 (MIC), 37 (CC<sub>50</sub> 24 horas) e 23  $\mu\text{g/mL}$  (CC<sub>50</sub> 48 horas). Os dados representam a média da %  $\pm$  Desvio Padrão. Comparando colunas, letras idênticas representam diferenças significativas,  $p < 0,05$ .

A resultados para a linhagem celular LLC-Pk1 são apresentadas na figura 26. Houveram várias diferenças significativas interessantes e estas estão expressas na forma de par de letras iguais sobre as barras do gráfico abaixo. Vale destacar a comparação entre o controle ( $1,7 \pm 1,1$ ) dos danos elevados em 48 horas e a AmB MIC ( $18,5 \pm 9$ ); e a comparação entre BCL-AmB MIC ( $24 \pm 2$ ) e AmB MIC ( $37,6 \pm 3,1$ ) dos danos moderados 24 horas.



**Figura 26.** Fragmentação de DNA pelo ensaio cometa. Porcentagens Dano Elevado (DE) e Dano Moderado (DM) em células NIH-3T3 após exposição a BCL-AmB e AmB. A) Tempo experimental de 24 horas. B) Tempo experimental de 48 horas. As concentrações de BCL-AmB utilizadas foram 1,25 (MIC), 19 (CC<sub>50</sub> 24 horas) e 13 µg/mL (CC<sub>50</sub> 48 horas). As concentrações de AmB utilizadas foram 1,0 (MIC), 6 (CC<sub>50</sub> 24 horas) e 5 µg/mL (CC<sub>50</sub> 48 horas). Os dados representam a média da % ± Desvio Padrão. Comparando colunas, letras idênticas representam diferenças significativas,  $p < 0,05$ .

## ***DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

Aplicações biomédicas de partículas magnéticas são relatadas desde a década de 1950, quando Gilchrist e colaboradores (1957), citado por Corchero (2009), trataram nódulos linfáticos cancerígenos pela injeção de partículas magnéticas com posterior aquecimento utilizando campo magnético. Desde então, o sucesso na síntese de nanopartículas metálicas proporcionou uma infinidade de aplicações biotecnológicas. Várias características como uniformidade de tamanho, superfície, cinética de absorção, superparamagnetismo, momento magnético e biocompatibilidade são ajustados durante a síntese das nanopartículas magnéticas para fins específicos (Corchero, 2009).

A maioria dos materiais com alta magnetização, como cobalto e níquel, são tóxicos e susceptíveis a oxidação, portanto, limitados em suas aplicações biomédicas. Entretanto, materiais ferrimagnéticos, como nanopartículas de maguemita, são adequados para aplicações *in vivo*, uma vez que apresentam baixa toxicidade, excelente biocompatibilidade e podem ser metabolizados pela heme-oxigenase-1, para formar hemoglobina e conseqüentemente, manter a homeostase de ferro pelas células (Pradhan, 2007; Corchero, 2009).

Nosso grupo vem testando a biocompatibilidade e a biodistribuição de nanopartículas magnéticas recobertas por diferentes substâncias estabilizantes, como o dextran (Lacava *et al.*, 2002 e 2003), o ácido cítrico (Garcia, 2002), o ácido glucônico (Barbosa, 2004), o ácido poliaspártico (Sadeghiani *et al.*, 2005) e ácido dimercaptosuccínico (Chaves *et al.*, 2002, 2005 e 2008; Garcia *et al.*, 2005; Braz, 2008; Monge-Fuentes *et al.*, 2011). Vale destacar o trabalho de Chaves (2008) que observou o acúmulo de NPMs de maguemita recobertas com bicamada de ácido láurico no pulmão 24 horas após a injeção intravenosa, sugerindo assim, que essas nanopartículas magnéticas, uma vez conjugadas com drogas específicas, poderiam ser utilizadas no tratamento de doenças pulmonares.

Tendo isso em mente, foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de maguemita, estabilizadas com bicamada de laurato (ácido láurico) e conjugadas com o antifúngico anfotericina B (BCL-AmB), com o objetivo de investigar o seu

potencial como uma nanoferramenta no combate a paracoccidiodomicose, uma doença que atinge em muitos casos o pulmão. Entretanto, foi necessário estudar primeiramente o processo de síntese e estabilidade físico-química desta formulação, assim como a sua toxicidade sobre células animais e sua eficiência antimicrobiana, mais especificamente, contra o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidiodomicose.

## 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO NÚCLEO METÁLICO DAS NANOPARTÍCULAS DE MAGUEMITA

No processo de síntese, as nanopartículas de maguemita foram obtidas a partir da oxidação da magnetita por borbulhamento de oxigênio e as NPMs de magnetita foram produzidas pelo método de coprecipitação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  em meio aquoso, sendo este método o mais comum para produzir nanopartículas magnéticas (Kang *et al.*, 1996; Thorek *et al.*, 2006).

A oxidação da magnetita, formando a maguemita, foi considerada eficiente a partir de dois critérios. O primeiro foi uma modificação visual. De forma que, a coloração antes do processo de oxidação que era preto intenso deu lugar a uma coloração marrom. O segundo foi a partir das bandas em 578 e em 632  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à ligação Fe-O obtidas por espectroscopia na região do infravermelho (figura 12). A presença dessas duas bandas caracteriza o óxido de ferro como maguemita, pois a magnetita apresenta apenas uma banda por volta de 580  $\text{cm}^{-1}$  (Yang *et al.*, 2010). Isso pode ser evidenciado pelo trabalho de Santos (2012), que sintetizou nanopartículas de magnetita estabilizadas com laurato e estas somente apresentavam a banda em 586  $\text{cm}^{-1}$  quando caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho. O mesmo foi observado por Calmon e colaboradores (2012) para nanopartículas de magnetita recobertas com citrato, uma vez que não apresentam a banda por volta de 630  $\text{cm}^{-1}$ .

As nanopartículas de maguemita, que correspondem à parte central das amostras BCL e BCL-AmB, teve o seu diâmetro médio determinado por difração de raio-X (DRX) e microscopia eletrônica e transmissão (MET). O diâmetro médio estimado por DRX foi de 13 nm enquanto que o determinado pela técnica

de MET foi de 9,3 nm (BCL) e 9,5 nm (BCL-AmB). Geralmente, o valor do diâmetro estimado por DRX é maior que a o determinado pela MET, exceto quando as partículas não são monocristais (Berkovski e Bashtovoy, 1996). Além disso, o difratograma mostrou picos largos e com baixos valores de intensidade, o que sugere a presença de domínios cristalinos extremamente pequenos (Nalbandian *et al.*, 2008). No entanto, vale ressaltar que pela DRX o valor obtido é estimado a partir do uso de uma fórmula, e não determinado diretamente, como no caso da MET (Figueiredo, 2009).

Leite e colaboradores (2009) determinaram o diâmetro de nanopartículas de maguemita por DRX e por MET, obtendo valores de 10,2 nm e 8,74 nm, respectivamente. Soler e colaboradores (2011) determinaram o diâmetro de nanopartículas de maguemita estabilizadas com DMSA, resultando em 8 nm por DRX, e 9,5 nm por MET. Silva (2008) sintetizou cinco amostras de nanopartículas de maguemita e determinou o diâmetro por DRX, obtendo cinco valores diferentes, variando de 8,87 até 13 nanômetros. Dessa forma, concluímos que, mesmo o diâmetro apresentando pequenas variações quando determinado por técnicas diferentes ou em amostras independentes, os resultados se mantêm em uma mesma faixa.

## 5.2 ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE MAGUEMITA COM ÁCIDO LÁURICO

A estabilização das nanopartículas de maguemita pelo ácido láurico foi evidenciada pela espectroscopia na região do infravermelho (figura 12). Por essa técnica é possível sugerir a presença desse ácido graxo, uma vez que evidencia ligações químicas C-H, e pela presença de grupos carboxilatos desprotonados, que são provenientes da ionização do ácido láurico. Assim o ânion laurato resultante promove a formação da bicamada lipídica e estabiliza as nanopartículas de maguemita. Santos (2012) estabilizou com laurato nanopartículas de magnetita e obteve bandas, nas mesmas regiões das nanopartículas deste trabalho, em 2921 e 2847  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às ligações C-H, e em 1553 e 1407  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos grupos carboxilatos.

Apenas pelo espectro infravermelho não se pode afirmar que houve a formação de bicamada lipídica. Assim, a formação da bicamada de laurato também pôde ser evidenciada pela dispersão das nanopartículas em meio aquoso. Uma vez que a dispersão obtida não ocorreria caso só tivesse sido formado uma única camada, pois a parte hidrofóbica do laurato estaria exposta para o lado exterior da nanopartícula (Silva, 2008).

A estabilização das nanopartículas de maguemitita pela bicamada de laurato proporciona sua dispersão em meios aquosos e reduz a opsonização por proteínas plasmáticas e posteriormente a internalização por macrófagos ou monócitos (Dobrovolskaia, 2008; Hafeli *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010). Dessa forma, o fluido magnético BCL torna-se candidato para várias aplicações biológicas, principalmente em sistemas de entrega de fármacos a sítios específicos.

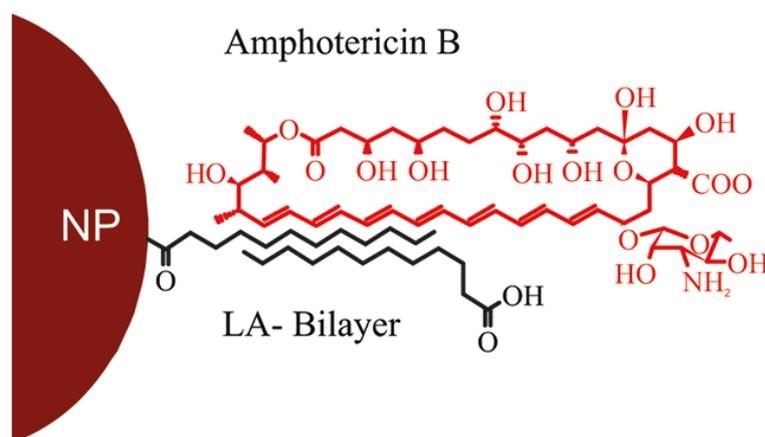
### 5.3 ADSORÇÃO DA ANFOTERICINA B ÀS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE MAGUEMITA ESTABILIZADAS COM LAURÁTO

O potencial das nanopartículas BCL para sistemas de entrega de drogas se baseia na alta relação superfície/volume e na capacidade de responder a um campo magnético, podendo ser conduzida até sítios específicos (Figuerola *et al.*, 2010). Lembrando que Chaves (2008) investigou nanopartículas similares e observou acúmulo nos pulmões de camundongos, após 24 horas da injeção intravenosa. Então se optou pela conjugação do fármaco anfotericina B à bicamada de laurato com o intuito de desenvolver uma possível estratégia no tratamento da paracoccidiodomicose, a qual se instala predominantemente no pulmão.

O método utilizado para adsorver a anfotericina B na bicamada de laurato mostrou ser de grande eficiência e, além disso, o procedimento é de fácil execução, não necessitando de equipamentos especiais, somente um agitador. A adsorção da anfotericina B foi evidenciada pelas bandas na espectroscopia na região do infravermelho correspondentes as ligações C–O–C, N–H<sub>2</sub> e C–C–H. O mesmo foi observado quando Santos (2012) adsorveram anfotericina B em nanopartículas de magnetita estabilizadas com laurato.

A eficiência de adsorção do fármaco na bicamada de lauráto foi superior a 99%. Este valor foi determinado a partir da cromatografia de alta eficiência - HPLC, realizada na amostra após uma separação magnética, uma vez que não foram encontradas quantidades significativas de AmB no sobrenadante (figura 14). Esse resultado era esperado uma vez que a proporção AmB/Fe utilizada nesse trabalho foi baseada em Silva (2008), no qual mostrou uma adsorção de 100% da anfotericina B na proporção máxima de 0,63 mg de AmB/mg de ferro, a mesma utilizada neste trabalho.

Esse resultado de adsorção da anfotericina B à bicamada de lauráto, que é um lipídio saturado, é corroborado por Carmona e colaboradores (2001), que mostraram a excelente solubilização da AmB às bicamadas lipídicas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e de dihexadecil fosfato (DHP) em meio aquoso. Vale ressaltar que a anfotericina B possui baixíssima solubilidade em meio aquoso e sua associação à bicamada lipídica das nanopartículas magnéticas se deve a propriedade hidrofóbica que o fármaco apresenta (Torrado *et al.*, 2007). O arranjo molecular da anfotericina B na bicamada de lauráto das nanopartículas magnéticas acontece via interação do anel de macrolactona do fármaco com a cadeia de polieno do lauráto (Figura 27), como foi demonstrado por Santos e colaboradores (2011), por meio de espectroscopia Raman.



**Figura 27.** Proposta de ancoragem da anfotericina B (amphotericin B) a bicamada de ácido láurico (LA-Bilayer) estabilizando nanopartícula de magnetita (NP). Modificado de Santos *et al.*, 2011.

Assim foi possível funcionalizar as nanopartículas magnéticas estabilizadas pela bicamada de lauráto (BCL-AmB) com o fármaco anfotericina

B. Entretanto foram necessárias investigações quanto a manutenção da estabilidade coloidal desse fluido magnético ao longo do tempo.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO COLOIDAL DAS AMOSTRAS BCL-AMB E BCL APÓS A SÍNTESE

A caracterização coloidal dos fluidos magnéticos BCL-AmB e BCL foi determinada a partir da análise de dois parâmetros: a carga de superfície e o diâmetro hidrodinâmico. A carga de superfície média obtidas para BCL-AmB e para BCL foram de -28,7 e -42,5 mV, respectivamente. O aumento no valor da carga de superfície após a adsorção da anfotericina B se deve as interações via ponte de hidrogênio entre as hidroxilas (-OH) das moléculas do fármaco e os grupos carboxilatos (-COO<sup>-</sup>) do laurato. Assim, menor será a contribuição de carga negativa dos grupos carboxilatos na carga final de superfície das nanopartículas magnéticas quando funcionalizadas.

Essa diferença na carga de superfície também foi apresentada por Santos (2012), em nanopartículas de maguemita estabilizadas com bicamada de laurato, -42 mV, ou com AmB adsorvida, -19 mV. Entretanto, Saldanha (2012) e Santos e colaboradores (2011) trabalharam com a mesma nanopartícula de magnetita estabilizadas com bicamada de laurato com ou sem adsorção de anfotericina e obtiveram cargas de superfície de -15,3 mV para amostra sem o fármaco e -22 mV para amostra com AmB, ou seja, nestes casos, após a adsorção, a carga final de superfície ficou mais negativa. Eles justificam esse aumento da negatividade pela adição de grupamentos de hidroxilas vindos do fármaco.

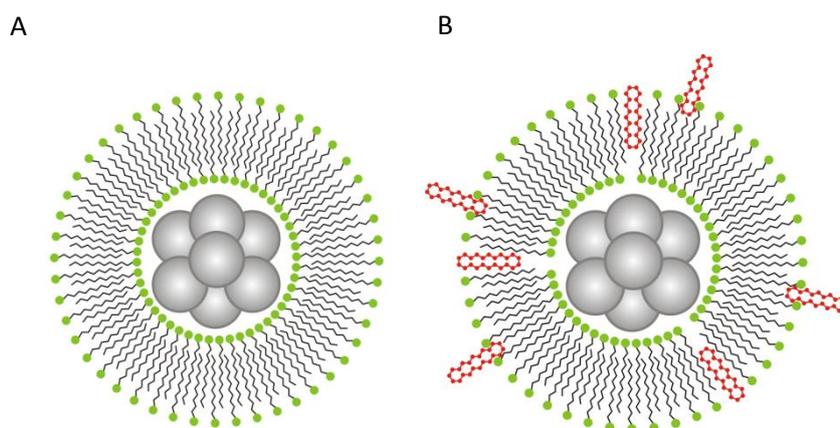
Vale ressaltar que nanopartículas com carga de superfície superior a +30 mV ou inferior a -30 mV configura boa estabilidade da suspensão coloidal (Shaw, 1975), uma vez que repulsão eletrostática contribui significativamente nessa estabilidade.

Ainda para a caracterização coloidal dos fluidos magnéticos foram mensurados os diâmetros hidrodinâmicos das amostras BCL-AmB e BCL, os quais apresentaram valores médios de 62 e 55 nm, respectivamente. Essa diferença nos valores de diâmetros é devido a presença da anfotericina B. Como

também obtido por Saldanha (2012) e dos Santos (2012), que utilizaram nanopartículas de constituição próxima a desse trabalho, alterando somente o núcleo para magnetita. Os valores dos diâmetros hidrodinâmicos obtidos das amostras sem AmB por Saldanha (2012) e por dos Santos (2012) foram 77,7 e 100 nm, respectivamente, e após a adsorção da AmB os valores passaram a 84,8 e 138 nm, respectivamente.

Ao comparar os diâmetros hidrodinâmicos de BCL-AmB e BCL com seus respectivos diâmetros obtidos por meio de MET (9,5 e 9,4 nm), nota-se que os valores dos diâmetros hidrodinâmicos são bem maiores que os diâmetros esperados, ou seja, um diâmetro máximo formado pela adição do diâmetro da nanopartícula de maguemita, da espessura da bicamada de laurato e da molécula de anfotericina B absorvida somente na superfície. Então, a partir dessas comparações, duas possibilidades são propostas para justificar esses valores tão maiores.

A primeira possibilidade é a ocorrência de aglomeração das nanopartículas de maguemita antes da estabilização com o ácido láurico, levando à formação de uma nanoestrutura com mais de uma nanopartícula de maguemita na região central, caracterizando a amostra BCL como também proposto por Silva (2008), e com posterior adsorção da anfotericina B caracterizando a amostra BCL-AmB, conforme apresentada pela figura 28.

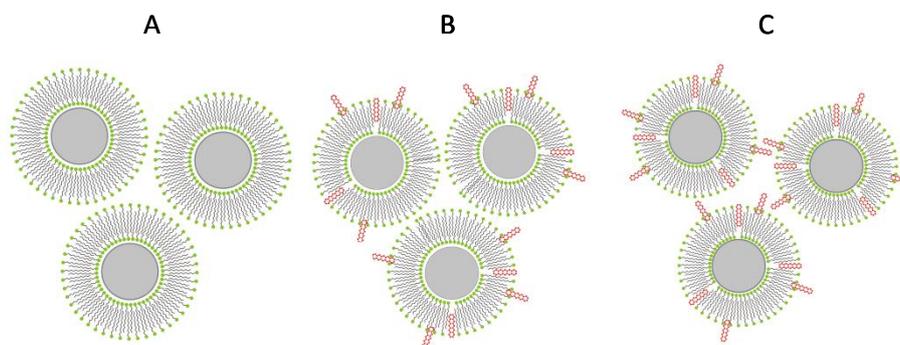


**Figura 28.** Representação da aglomeração das nanopartículas de maguemita antes da estabilização com a bicamada de ácido láurico. A) BCL. B) BCL-AmB.

A segunda possibilidade é a interação entre os grupos carboxilatos, da camada externa de duas ou mais nanopartículas, gerando aglomerados de

nanopartículas de maguemita individualmente estabilizadas pela bicamada de laurato no caso da amostra BCL (Figura 29A) (Xu *et al.*, 2004).

Para a amostra BCL-AmB, pode ser que a adsorção da AmB aconteceu em nanopartículas de BCL que já estavam aglomeradas e então o fármaco foi adsorvido na região da bicamada livre, ou seja, a região que não estava interagindo com a cobertura da nanopartícula vizinha (Figura 29B). Outro levantamento, é que a própria AmB estaria proporcionando a aglomeração, uma vez que a parte polar de uma molécula do fármaco estaria interagindo com a parte polar de outra molécula de AmB presente na cobertura da nanopartícula vizinha (Figura 29C).



**Figura 29.** Representação da aglomeração de NPMs após estabilização com bicamada de ácido láurico. A) BCL. B) BCL-AmB, agregados formados antes da conjugação com anfotericina B. C) BCL-AmB, agregados formados após conjugação com anfotericina B.

Do ponto de vista das propriedades necessárias para aplicações biológicas, a possibilidade de agregação não teria tantas implicações, uma vez que os diâmetros observados ainda são muito pequenos comparados com os tamanhos de outras formulações de anfotericina B comerciais, como Abelcet<sup>®</sup> (tamanho de 1,6 a 11,1  $\mu\text{m}$ ) ou Amphotec<sup>®</sup> (115 nm), ou próximos aos do Ambisome<sup>®</sup> (45 a 80 nm), que é uma formulação lipossomal da AmB também já em uso na clínica terapêutica.

Outro fato importante é que os agregados de nanopartículas magnéticas apresentam magnetização superior à das nanopartículas isoladas o que seria

um fator desejado no caso de aplicação via vetorização por campo magnético externo (Silva, 2008).

## 5.5 ESTABILIDADE COLOIDAL DAS AMOSTRAS BCL-AMB E BCL AO LONGO DO TEMPO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA

A estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos BCL-AmB e BCL foi acompanhada por 240 dias, a 4 °C e a temperatura ambiente. A amostra BCL não apresentou variação significativa em nenhum dos parâmetros analisados (diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão) quando mantida tanto a 4 °C ou a temperatura ambiente, indicando ser estável neste período. Vale ressaltar que esta amostra passou ainda por autoclavagem como processo de esterilização antes da adsorção da anfotericina B, processo que poderia ter prejudicado a estabilidade da amostra, mas isto não ocorreu. Ainda mais, passados 120 dias após a síntese, uma alíquota do fluido magnético BCL foi reautoclavada e não houve alteração novamente em nenhum dos parâmetros da caracterização coloidal (dados não mostrados), evidenciando assim que após um segundo processo de autoclavagem, as nanopartículas mantiveram sua estabilidade.

Entretanto, a conjugação da anfotericina B diminuiu drasticamente a estabilidade coloidal do fluido magnético. Isso pôde ser observado principalmente quando a amostra BCL-AmB foi armazenada a temperatura ambiente (Figura 15B). Nesta condição, o diâmetro hidrodinâmico dobrou em sete dias e com trinta dias já era cinco vezes maior. Porém, a amostra de BCL-AmB quando mantida a 4 °C, apresentou uma maior estabilidade, pois com 45 dias o diâmetro hidrodinâmico variou de 62 para 70 nm e foram necessários quase 240 dias para que o diâmetro dobrasse. Portanto, quando condicionada a 4 °C a amostra mantém a sua estabilidade coloidal por até 45 dias. Vale lembrar que o índice de polidispersão aumentou com o decorrer do tempo, justificando o aumento do diâmetro hidrodinâmico e mostrando uma gradual heterogeneidade que a amostra BCL-AmB apresentava.

Em contraste com o aumento do diâmetro hidrodinâmico do fluido magnético BCL-AmB, a carga de superfície dessas nanopartículas, quando

mantidas a 4 °C, não apresentou variação significativa. Esse resultado indica que, apesar de terem acontecido aglomerações, não houve um colapso das nanopartículas, pois a carga da superfície dos aglomerados foi a mesma da carga da superfície das nanopartículas no momento após a adsorção da anfotericina B. Entretanto, quando o fluido magnético foi mantido a temperatura ambiente, a carga de superfície aumentou significativamente, evidenciando a instabilidade dos aglomerados micrométricos resultantes.

## 5.6 ATIVIDADE FUNGICIDA DA ANFOTERICINA B ADSORVIDA AS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Após a adsorção da anfotericina B à bicamada de laurato das nanopartículas de maguemita e posterior caracterização coloidal desse complexo, foi necessário investigar se o fármaco manteria suas propriedades fungicidas. Para tal, foi escolhido o fungo *P. brasiliensis*, determinando qual a concentração mínima (MIC) de anfotericina B adsorvida capaz de matar 100% das células fúngicas. Os MICs encontrados para BCL-AmB e AmB livre foram 1,25 e 1 µg/mL, respectivamente (figura 17). Esses resultados estão dentro da faixa de atividade antifúngica reportada em estudos *in vitro*, cujos valores variam de 0,03 – 2,0 µg/mL (Hamdan e Resende, 1988; Heins-Vaccari *et al.*, 1988; NCCLS, 2002).

A diferença entre os resultados pode ser explicada pela disponibilidade do fármaco contra o fungo. No experimento com a AmB livre (Fungizon®), todas as moléculas do fármaco já estão disponíveis, enquanto que no experimento com o fluido BCL-AmB, as moléculas de anfotericina B ainda estão interagindo com a bicamada da nanopartícula. Isto faz com que diminua a quantidade real de fármaco disponível. Entretanto, se for utilizado um campo magnético para direcionar o BCL-AmB a um sítio específico, a quantidade de fármaco administrada pode ser até menor do que aquela usada para o Fungizon® pois haverá uma atração das nanopartículas para o local desejado, diminuído a sua distribuição em outras regiões, como os rins, por exemplo. Além disso, essa quantidade de fármaco que chega no local desejado poderá ter a sua eficácia potencializada. Testes de quantificação, por HPLC, da AmB liberada da amostra BCL-AmB, submetida a diferentes condições de meio, podem elucidar qual a

quantidade real de fármaco que está disponível a partir da BCL-AmB. O fato da anfotericina B manter a atividade antifúngica quando conjugada à bicamada lipídica, mostra que esse fármaco ainda consegue se ligar ao ergosterol das membranas celulares dos fungos. Santos e colaboradores (2011) sugeriram que a AmB quando conjugada à bicamada de laurato, as “cabeças” hidrofílicas da anfotericina B estariam disponíveis para interagir com o ergosterol presente na membrana celular das células fúngicas, promovendo assim a formação de poros e conseqüentemente a morte do fungo pelo extravasamento do conteúdo citoplasmático.

Saldanha (2012) encontrou um MIC de 0,5 µg/mL para a anfotericina B adsorvida à bicamada de laurato de nanopartículas de magnetita e de 0,25 µg/mL para a anfotericina B (Fungizon®) contra o *P. Brasiliensis*. Evidenciando uma diferença entre o fármaco livre e adsorvido à nanopartícula magnética, como também encontrado para amostra BCL-AmB aqui testada, que tem o centro de magnetita. A diferença de MICs entre as amostras de anfotericina B adsorvida à nanopartículas no trabalho de Saldanha e dessa dissertação se deve a quantidade de células fúngicas utilizadas nos experimentos, neste trabalho utilizou-se cinco vezes mais células viáveis do fungo, portanto, justificando a necessidade de uma concentração maior de fármaco.

Não foram encontrados outros trabalhos na literatura associando AmB às nanopartículas magnéticas. Entretanto, alguns trabalhos mostram a associação desse fármaco em outros tipos de nanopartículas e sua eficiência contra o *P. brasiliensis* ou outros microorganismos.

Amaral e colaboradores (2009) trataram camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* com anfotericina B adsorvida a nanopartículas poliméricas de PLGA (ácido polietileno glicol) e DMSA (ácido dimercaptosuccínico) e compararam os resultados com os obtidos para o Fungizon®. A eficiência foi determinada pela carga fúngica encontrada nos pulmões, e observaram que não houveram diferenças entre as formulações testadas. Entretanto, a utilização das nanopartículas, neste trabalho, proporcionou uma liberação sustentada da AmB, uma vez que os tratamentos eram realizados a cada três dias. Enquanto que com Fungizon® era diário.

Lincopan e colaboradores (2003) adsorveram anfotericina B à fragmentos de bicamadas do lipídio DODAB e testaram *in vitro* contra *Candida albicans* durante 48 horas a 37 °C. O MIC encontrado para essa formulação foi de 0,125 µg/mL e para a anfotericina B (Fungizon®) foi 0,25 µg/mL. Van de Ven e colaboradores (2012) associaram anfotericina B à nanopartículas poliméricas de PLGA e determinaram o MIC<sub>50</sub> (concentração mínima inibitória de 50% das células fúngicas) em três fungos diferentes: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*, obtendo MIC<sub>50</sub> de 0,12; 0,4 e 0,3 µg/mL, respectivamente. Esses resultados foram comparados com o MIC<sub>50</sub> do Fungizon® respectivamente nos mesmos fungos, 0,77; 0,34 e 0,39 µg/mL, mostrando que sua formulação apresentou maior eficiência que a forma livre da anfotericina B. Entretanto, nesses dois trabalhos apresentados, não foram realizados estudos de biodistribuição da AmB associadas tanto aos fragmentos lipídicos quanto às nanopartículas poliméricas de PLGA.

Assim, como apresentado nos resultados de Amaral e colaboradores (2009) em que a anfotericina B quando associada às nanopartículas deve sua eficiência mantida quando aplicada a cada três dias, portanto, indicando uma liberação controlada do fármaco; sugere-se o mesmo para a AmB quando associada a BCL, já que esta também mantém a sua atividade antifúngica. Outro ponto de importância é o fato da BCL-AmB ser uma nanopartícula magnética e, portanto capaz de responder a um campo magnético externo, o que não ocorreria com as formulações testadas por Lincopan e colaboradores (2003), Amaral e colegas (2009) e Ven e colaboradores (2012), favorecendo ainda mais o emprego clínico do BCL-AmB.

## 5.7 TOXICIDADE DA ANFOTERICINA B ADSORVIDA À BICAMADA DE LAURÁTO DAS NANOPARTÍCULAS DE MAGUEMITA

### 5.7.1 Citotoxicidade

Embora a Anfotericina B tenha afinidade maior pelo ergosterol presente na membrana celular do fungo *P. brasiliensis*, ela também se liga ao colesterol encontrado na membrana das células de mamíferos (Huang *et al*, 2002),

proporcionando dessa forma seu potencial tóxico. Então, após mostrar a eficácia fungicida da AmB quando adsorvida as nanopartículas magnéticas (BCL-AmB), era necessário investigar o seu potencial tóxico sob células de mamíferos. Assim, foram realizados testes de citotoxicidade celular utilizando células do túbulo contorcido proximal de porco (LLC-PK1) e fibroblastos murino (NIH-3T3), verificando se BCL-AmB alteraria a viabilidade destas células em comparação a AmB não conjugada.

Pelos resultados apresentados foi possível determinar uma diminuição da citotoxicidade da anfotericina B quando conjugada as nanopartículas. O fluido magnético BCL-AmB apresentou  $CC_{50}$  3,25 e 2,4 vezes maiores que a  $CC_{50}$  da AmB em 24 e 48 horas, respectivamente, na linhagem NIH-3T3. A diferença entre as  $CC_{50}$ , na linhagem LLC-Pk1, foi ainda maior, 7,2 e 2,7 vezes maiores que a  $CC_{50}$  da AmB, em 24 e 48 horas, respectivamente. Esses resultados mostram que BCL-AmB foi menos prejudicial que AmB livre para o metabolismo celular, principalmente para as células renais, lembrando que a nefrotoxicidade é um dos principais efeitos colaterais no tratamento convencional utilizando anfotericina B. Quando comparadas as citotoxicidades de BCL-AmB e AmB livre nas concentrações determinadas pelo MIC (1,25 e 1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) percebe-se que não houve diminuição na viabilidade celular em nenhuma das duas linhagens e tempos experimentais.

Saldanha (2012) testou a citotoxicidade da anfotericina B conjugada a nanopartículas de magnetita estabilizadas por bicamada de laurato, muito semelhante ao BCL-AmB, em células mesangiais de rim humanas e macrófagos peritoneais na concentração máxima de 1  $\mu\text{g/mL}$ , por até 24 horas. Os resultados mostram que também não houve nenhuma diminuição significativa no metabolismo celular.

A anfotericina também teve sua citotoxicidade avaliada quando associada a outras nanopartículas que não magnéticas. Espuelas e colaboradores (2003) avaliaram a citotoxicidade da anfotericina B associada à nanopartícula polimérica de PCL (policaprolactona) com 280 nm, contra células LLC-Pk1 e macrófagos (J774) por 18 horas. Os resultados foram comparados com a anfotericina B livre e foram utilizadas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  do fármaco. Para a linhagem J774 tanto a AmB livre quanto associada a

nanopartícula causaram uma diminuição de 50-70% na viabilidade celular. Entretanto, para a linhagem LLC-Pk1 a citotoxicidade da AmB na nanopartícula não foi maior que 10% para todas as concentrações, diferentemente da AmB livre que mostrou toxicidade de 80% na concentração mais alta testada. Evidenciando assim que este fármaco quando associado à nanopartículas tem sua toxicidade diminuída, como também demonstrado para BCL-AmB.

É sabido que a citotoxicidade de nanopartículas de óxido de ferro está associada à produção de espécies reativas de oxigênio, EROs (Lewinsk *et al*, 2008). Apesar de não ter sido avaliada a produção de EROs neste trabalho, foi avaliada a toxicidade somente do nanocarreador magnético, o BCL. As nanopartículas BCL apresentaram uma citotoxicidade muito baixa nas duas linhagens testadas. Para fibroblastos (NIH-3T3) as  $CC_{50}$  encontradas após 24 e 48 horas foram de 1105 e 244  $\mu\text{g}$  de ferro/mL, respectivamente; portanto, mais tóxica do que para LLC-Pk1 que teve as  $CC_{50}$ , após 24 e 48 horas, de 1290 e 703  $\mu\text{g}$  de ferro/mL, respectivamente.

Dependendo da formulação da nanopartícula de óxido de ferro e da sua aplicação biomédica, faz-se necessário o uso de grandes quantidades destas nanopartículas e, portanto, o aumento da exposição do indivíduo a concentrações altas de ferro. Assim, estudos dos efeitos dos óxidos de ferro nanoestruturados quando em alta concentração se fazem necessários (Braz, 2011). Dentre todas as concentrações de ferro de BCL testadas, a maior concentração que não apresenta diminuição da viabilidade celular para fibroblastos (NIH-3T3) foi 112 e 56  $\mu\text{g}$  de ferro/mL, após 24 e 48h de exposição, respectivamente. Para as células renais (LLC-Pk1) a maior concentração foi 225 e 112  $\mu\text{g}$  de ferro/mL, respectivamente para os mesmos tempos. Essas concentrações são relativamente altas, portanto há boa expectativa para a utilização do BCL em aplicações que requeiram altas concentrações de nanopartículas magnéticas, seja para o direcionamento de fármacos e/ou a lise celular por magnetohipertermia.

Os resultados de citotoxicidade dos fibroblastos murinos (NIH-3T3) deste trabalho não diferem quando comparados aos resultados de citotoxicidade dos fibroblastos humanos mostrados por Chaves (2008), onde foram utilizadas nanopartículas de mesma constituição de BCL. E este mesmo trabalho mostrou

que não houve diminuição da viabilidade em células mesangiais de rim humano até a concentração mais alta testada (250 µg de ferro/mL).

Vale ressaltar que NPMs de óxidos de ferro continuam a atrair atenção para aplicações biomédicas devido à sua baixa toxicidade, excelente biocompatibilidade e, pelo fato de que podem ser metabolizados pela heme-oxigenase-1, para formar hemoglobina e conseqüentemente, manter a homeostase de ferro pelas células (Pradhan, 2007; Corchero, 2009).

### **5.7.2 Genotoxicidade**

Depois de mostrar que a anfotericina B conjugada a nanopartícula magnética manteve sua propriedade fungicida e apresentou citotoxicidade menor que a anfotericina B livre, verificou-se a possível genotoxicidade do fluido BLC-AmB comparada a da AmB. Essa investigação foi realizada por duas metodologias, uma quantitativa, por meio de citometria de fluxo, e uma qualitativa, por meio do ensaio cometa (Milner, 1987).

A partir dos dados da fragmentação de DNA em citômetro de fluxo (figura 22) não foram detectadas diferenças significativas entre o controle, BCL-AmB e AmB para as duas linhagens celulares (NIH-3T3 e LLC-Pk1) nos períodos de experimentação (24 e 48 horas). Foram utilizadas as concentrações do fármaco determinadas pelo MIC, ou seja, 1 e 1,25 µg/mL para AmB e BCL-AmB, respectivamente.

Amaral e colaboradores (2009) verificaram que a viabilidade de células peritoneais tratadas com AmB livre apresentou alterações significativas em período longo (7-30 dias) de tratamento. Observaram também por meio do ensaio de micronúcleo ausência de danos nas células sanguíneas policromáticas de roedores, após administração de AmB conjugada com nanopartículas em um período de 24h. Esses resultados apontados nos ajudam a compreender os dados encontrados no presente trabalho, onde BCL-AmB e AmB não apresentaram diferença na fragmentação do DNA analisado por citometria de fluxo, provavelmente pela baixa concentração da AmB (1.0 µg/mL) administrada nos dois grupos celulares.

Outro ponto importante a ser considerado é o período de exposição (24 e 48 horas), provavelmente a baixa fragmentação do DNA detectado pela citometria de fluxo nos dois tipos celulares analisados pode estar associada também ao tempo de exposição, relativamente curto.

É importante também citar que a técnica de detecção de dano no DNA por citometria de fluxo é capaz de analisar células em suspensão que passam em frente ao laser em fila única, dessa forma é possível detectar de dois a cinco mil eventos por segundo. Tal análise permite verificar a intensidade dos danos causados no DNA de células em suspensão, comparado ao método de microscópica convencional onde as células são analisadas de forma imobilizada, sendo a contagem e a classificação do dano feita de forma manual, portanto o citometro de fluxo apresenta alta sensibilidade. Apesar da alta sensibilidade é importante a corroboração com outra técnica, como o ensaio cometa, capaz de detectar o mesmo dano de forma qualitativa e individual, dando maior robustez aos dados. O ensaio cometa permite a obtenção de dados qualitativos em células individuais em número reduzido (<300 células por grupo), apresenta alta sensibilidade com qualquer tipo de célula nucleada.

O ensaio cometa foi realizado nas concentrações determinadas pelo MIC e as  $CC_{50}$  provenientes do ensaio MTT. As amostras testadas foram BCL-AmB e AmB livre nas duas linhagens celulares (NIH-3T3 e LLC-Pk1) nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. Para LLC-Pk1, a diferença significativa observada entre o controle e a  $CC_{50}$  da AmB em 24 horas, mostrou que o fármaco gerou danos genéticos a nível moderado (figura 26). Já para a linhagem NIH-3T3 observou-se que em 24 horas, a AmB livre ocasionou uma maior porcentagem de danos moderados que BCL-AmB na concentração determinada pelo MIC (figura 26). Também foi observada alta porcentagem de dano elevado na AmB (quando na mesma concentração do MIC) comparada ao controle no tempo de 48 horas.

Esses resultados indicam que BCL-AmB apresenta baixa genotoxicidade, quando comparado a AmB livre, nos dois tipos celulares durante os períodos de exposição. No trabalho de Charvalos e colaboradores (2006), foi indicado que alto nível de AmB na corrente sanguínea provoca dano no DNA de células monocromáticas, em contra partida a liberação controlada de AmB conjugada

com nanopartículas apresentou redução do acúmulo desta droga nos tecidos e conseqüentemente baixa genotoxicidade. Esses achados confirmam os resultados aqui apresentados, mostrando que AmB conjugada com nanopartículas é menos tóxica, não perdendo sua eficiência antifúngica.

## 5.8 PERSPECTIVAS FUTURAS DA NANOPARTÍCULA BCL-AMB

Uma vez que o fármaco, anfotericina B, quando associado a nanopartícula de maguema estabilizada com bicamada de ácido láurico, não perdeu sua propriedade fungicida e, além disso, mostrou ter poucos efeitos tóxicos em células de mamíferos, ao comparar com os efeitos da anfotericina B livre, acredita-se que esta formulação possa ser uma forte candidata no tratamento da paracoccidiodomicose. Para tanto, como próximos passos de investigações estão o estudo de agregação, a determinação das taxas de liberação do fármaco em diferentes tipos de tecidos, principalmente no sangue, já que a via endovenosa seria a ideal para um subseqüente emprego de magnético externo e, finalmente, os ensaios de sua utilização em modelo animal acometido pela doença.

Nesse trabalho foi mostrado que após a conjugação da anfotericina B às nanopartículas magnéticas houve uma diminuição da estabilidade coloidal desse complexo resultante, principalmente quando a amostra é mantida a temperatura ambiente, porém à 4 °C sua estabilidade só se alterou após 45 dias de armazenamento. Assim futuros tratamentos utilizando a formulação BCL-AmB deverão acontecer dentro do período de tempo de 45 dias após a adsorção da anfotericina B ao nanocarreador.

No entanto, devido ao fato da formulação de BCL ter se mantido estável coloidalmente por um longo período a temperatura ambiente, surge a possibilidade de que numa futura comercialização do BCL-AmB, o processo de adsorção da anfotericina B seja realizado no próprio local em que acontecerá o tratamento, como hospitais e clínicas, uma vez que o processo de adsorção não demanda equipamentos ou técnicas sofisticadas. Assim, a comercialização seria por meio de *kits* contendo BCL, anfotericina B em pó e o agente solubilizante do fármaco.

## 5.8 PERSPECTIVAS FUTURAS DA NANOPARTÍCULA BCL

A nanopartícula magnética estabilizada com bicamada de laurato (BCL) apresentou uma grande estabilidade coloidal por longo período, além de não ser tóxica em vários tipos celulares como as apresentadas nesse trabalho, assim como por Chaves (2008) e por Saldanha (2013) que testaram sistemas nanocarreadores semelhantes.

A funcionalização da superfície de nanopartículas com um ligante específico para um determinado alvo é uma estratégia que permite um maior acúmulo do material no local desejado, como um tumor, melhorando sua eficácia no tratamento por magnetohipertermia, por exemplo, sem afetar os tecidos normais. Assim, sugere-se que a nanopartícula BCL poderia ser utilizada em tratamentos de tumores com magnetohipertermia e/ou como agente no contraste de imagens para diagnóstico, a partir da conjugação de um ligante específico. Vários trabalhos mostram essa potencialidade para nanopartículas de óxidos de ferro, independente da cobertura estabilizante (Hu *et al.*, 2011; Santos, 2012; Fardis *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2012; Iconaru *et al.*, 2012; Khurshid, 2013).

## **CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram a viabilidade de síntese de um fluido magnético constituído por nanopartículas de maguemita estabilizadas com bicamada de laúrate e a posterior adsorção da anfotericina B (BCL-AmB), um fármaco antifúngico. Pela caracterização deste fluido magnético, ou seja, o diâmetro da maguemita, o diâmetro hidrodinâmico; a carga de superfície; a concentração de ferro e a eficiência do fármaco adsorvido, esta formulação mostrou-se apta para ser testadas nos primeiros ensaios biológicos necessários para sua futura aplicação biomédica.

Quanto a estabilidade das amostras ao longo do tempo, observou-se que BCL manteve sua estabilidade coloidal nas diferentes condições de temperatura, porém após a conjugação da anfotericina B (BCL-AmB) houve uma perda da estabilidade da formulação, que foi menor quando mantida a 4 °C. A anfotericina B adsorvida no BCL não perdeu sua propriedade fungicida quando confrontada com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, o qual é o agente etiológico da micose sistêmica paracoccidioidomicose.

A toxicidade da anfotericina B adsorvida no BCL foi menor comparada a do fármaco livre, analisando-se a citotoxicidade e genotoxicidade em fibroblastos e células renais em cultivo.

Desta forma, pode-se concluir que, utilizando conceitos e ferramentas da nanobiotecnologia, foi possível desenvolver uma nova formulação, BCL-AmB, a qual possui grande potencial no futuro tratamento da paracoccidioidomicose.

## ***REFERÊNCIAS***

## 7 REFERÊNCIAS

AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 144, 2012.

ALEXANDER B.D; WINGARD J.R.; Study of renal safety in amphotericin B lipid complex-treated patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 414-421, 2005.

ALLOUNI, Z.E.; CIMPAN, M.R.; HOL, P.J.; SKODVIN, T.; GJERDET, N.R. Agglomeration and sedimentation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture medium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, n. 1, p. 83-87, 2009.

ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidiótico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais Faculdade Medicina de São Paulo**. v.5, p.125-141, 1930.

AMARAL, A.C.; BOCCA, A.L.; RIBEIRO, A.M.; NUNES, J.; PEIXOTO, D.L.G.; SIMIONI, A.R.; PRIMO, F.L.; LACAVA, Z.G.M.; BENTES, R.; TITZE-DE-ALMEIDA, R.; TEDESCO, A.C.; MORAIS, P.C.; FELIPE, M.S.S. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 63. p. 526-533. 2009.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS INTERNATIONAL COMMITTEE E56 ON NANOTECHNOLOGY. **ASTM E2456-06 Standard Terminology for Nanotechnology**. West Conshohocken, ASTM International, 2006.

ANAND, P.; NAIR, H.B.; SUNG, B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; YADAV, V. R.; TEKMAL, R.R.; AGGARWAL, B.B. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 337-345, 2010.

ASHER, I.M.; SCHWARTZMAN, G. **Amphotericin B**. In: FLOREY, K. (Org.). Analytical profiles of drug substances. v. 6. New York: Academic Press, 1977.

BAGINSKI M.; STERNAL K.; CZUB J.; BOROWSKI E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta Biochimica Polonica**. v. 52, n. 3, p. 655-663, 2005.

BALEY, J.E.; MEYERS C.E.; KLIEGMAN, R.M. Pharmacokinetic outcome and toxic effects of amphotericin B and 5 fluorocytosine in neonates. **Journal of Pediatrics**, v. 116, p. 791-797, 1990.

BARBOSA, L.S. **Avaliação *in vivo* da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico**. 2004. 64 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

BECK, J.R.W. **Nanopartículas magnéticas metálicas recobertas com óxido de ferro: intensificação das propriedades magnéticas da nanopartícula e funcionalização para aplicação em biomedicina**. 2011, 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

BELIN, T.; GUIGUE-MILLOT, N.; CAILLOT, T.; AYMES, D.; NIEPCE, J. C. Influence of grain size, oxygen stoichiometry, and synthesis conditions on the  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vacancies ordering and lattice parameters. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 163, p. 459-463, 2002.

BERKOVSKI, B.; BASHTOVOY, V. *Magnetic Fluids and Applications Handbook*. New York: Begell House, 1996.

BERRY, C.C.; CURTIS, A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of physics D: applied physics**, v. 36, p. 198–206, 2003.

BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; AEPINUS, C.; NAJVAR, L.K.; FOTHERGILL, A.W.; KNOBLOCH, J.; GRAYBILL, J.R. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **Journal Clinical Microbiology**. v.38, p.2940-2952, 2000.

BICANIC, T.; WOOD, R.; MEINTJES, G.; REBE, K.; BROUWER, A.; LOYSE, A.; BEKKER, L.G.; JAFFAR, S.E.; HARRISON, T. High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 1, p. 123-130, 2008.

BORBA, L.A. Impedância e permeabilidade magnética Inicial dos compostos Heusler Pd<sub>2</sub>MnSn e Pd<sub>2</sub>MnSb próximo da temperatura de Curie. Dissertação (Mestrado em Física). 2006, 111 p. Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BOWDEN, R.; CHANDRASEKAR, P.; WHITE, M.H.; LI, X.; PIETRELLI, L.; GURWITH M.; VAN BURIK, J.A.; LAVERDIERE, M.; SAFRIN, S.E.; WINGARD, J.R. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 359-366, 2002

BRAZ, J.M. **Efeitos das nanopartículas magnéticas a base de maguemita recobertas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico em macrófagos de camundongos**. 2011, 109 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. *Paracoccidioidomycosis: an update*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 89-117, 1993.

CALMON, M.F.; SOUZA, A.T.; CANDIDO, N.M.; RAPOSO, M.I.B.; TABOGA, S.; RAHAL, P.; NERY, J.G. A systematic study of transfection efficiency and cytotoxicity in HeLa cells using iron oxide nanoparticles prepared with organic

and inorganic bases. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 100, p. 177-184, 2012.

CAMILO, R.L. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriétoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia**. 2006, 187 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CAPELLE, H.A.; BRITCHER, L.G.; MORRIS, G.E. Sodium stearate adsorption onto titania pigment. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 268, p. 293-300, 2003.

CARMONA, M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.244, p. 427-431, 2001.

CARVALHO, R.F. **Estudo in vivo da ação de nanocápsulas de PLGA contendo Anfotericina B, DMSA e nanopartículas magnéticas no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2011, 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CHARVALOS, E.; TZATZARAKIS, M.N.; BAMBEKE, F.V.; TULKENS, P.M.; TSATSAKIS, A.M.; TZANAKAKIS, G.N.; MINGEOT-LECLERCQ, M.P. Water-soluble Amphotericin B-polyvinylpyrrolidone complexes with maintained antifungal activity against *Candida* spp. And *Aspergillus* spp. And reduced haemolytic and cytotoxic effects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 236-244, 2006.

CHAVES, S.B., **Efeitos biológicos de nanopartículas magnéticas recobertas por bicamada de ácido láurico: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2008, 112 p. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CHAVES, S.B.; LACAVAL, L.M.; LACAVAL, Z.G.M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. **IEEE Transactions on Magnetics**, v.38, p. 3231-3233, 2002.

CHAVES, S.B.; LACAVAL, Z.G.M.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lung induced by DMSA-coated magnetic nanoparticles. **Journal Applications Physics**, v. 97, p. 915-917, 2005.

CHEN, F.H.; GAO, Q.; NI, J.Z. The grafting and release behavior of doxorubicin from Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell structure nanoparticles via an acid cleaving amide bond: the potential for magnetic targeting drug delivery. **Nanotechnology**, v. 19, n. 16, p. 1-9, 2008.

CHEN, J.P.; YANG, P.C.; MA, Y.H.; WU, T. Characterization of chitosan magnetic nanoparticles for in situ delivery of tissue plasminogen activator. **Carbohydrate Polymeres**, v. 84, p. 364-372, 2011.

COCK, A.M.; CANO, L.E.; VÉLEZ, D.; ARISTIZÁLBAL, B.H.; TRUJILLO, J.; RESTREPO A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 59-66, 2000.

CORCHERO, J.L.; VILLAVERDE, A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 468-476, 2009.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública (Rio de Janeiro)**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.

CULLITY, B.D.; GRAHAM, C.D. **Introduction to Magnetic Materials**. 2. ed. New Jersey: Wiley-IEEE Press, 2009.

CULLITY, B.D.; STOCK, S.R. **Elements of X-ray diffraction**. 3. ed. Canadá: Addison-Wesley, 2001.

DARZYNKIEWCZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27, p. 1–20, 1997.

DENNIS, C.L.; JACKSON, A.J.; BORCHERS, J.A.; IVKOV, R.; FOREMAN, A.R.; HOOPEES, P.J.; STRAWBRIDGE, R.; PIERCE, Z.; GOERTTIZ, E.; LAU, J.W.; GRUETTNER, C. The influence of magnetic and physiological behaviour on the effectiveness of iron oxide nanoparticles for hyperthermia. **Journal of physics D: applied physics**, v. 41, 134020, 2008.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **Journal Antimicrobiology Chemotherapy**, v. 49, p 37-41, 2002.

DERFUS, A.M.; MALTZAHN, G.; HARRIS, T.J.; DUZA, T.; VECCHIO, K.S.; RUOSLAHTI, E.; BHATIA, S. N. Remotely triggered release from magnetic nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 19, p. 3932–3936, 2007.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; AGGARWAL, P.; HALL, J. B.; MCNEIL, S.E. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

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

ESTEVANATO, L.; CINTRA, D.; BALDINI, N.; PORTILHO, F.; BARBOSA, L.; MARTINS, O.; LACAVAL, B.; MIRANDA-VILELA, A.L.; TEDESCO, A.C.; BÃO, S.; MORAIS, P.C.; LACAVAL, Z.G. Preliminary biocompatibility investigation of

magnetic albumin nanosphere designed as a potential versatile drug delivery system. **International Journal Nanomedicine**. v. 6, p. 1709-1717, 2011.

FARDIS, M.; DOUVALIS, A.P.; TSITROULI, D.; RABIAS, I.; STAMOPOULOS, D.; KEHAGIAS, T.; KARAKOSTA, E.; DIAMANTOPOULOS, G.; BAKAS, T.; PAPAVALASSILIOU, G. Structural, static and dynamic magnetic properties of dextran coated Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles studied by <sup>57</sup>Fe NMR, Mossbauer, TEM and magnetization measurements. **Journal of Physics: Condensed Matter**. v. 24.156001 (16pp) 2012.

FERREIRA, H.S.; RANGEL, M.C.; Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, p. 1860-1870, 2009.

FIGUEIREDO, L.C. **Sistemas Magnéticos nanoparticulados à base de maghemita**. Tese (Doutorado em Física). 2009, 121 p. Instituto de Física. Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

FIGUEROLA, A.; CORATO, R.D.; MANNA, L.; PELLEGRINO. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**. v. 62. p. 126-143. 2010.

FUKUI, H.; KOIKE, T.; SAHEKI, A.; SONOKE, S.; SEKI, J. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS). **International Journal Pharmacological**, v. 263, p.51-60, 2003

GAGÓS, M.; ARCZEWSKA, M. Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, n. 11, p. 2124-2130, 2010.

GAO, J.; GU, H.; XU, B. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 8, p. 1097-1107, 2009.

GARCIA, M.P. **Estudo in vivo dos efeitos crônicos e subcrônicos de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA**. Brasília. 2005, 89p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

GARCIA, M.P.; PARCA, R.M.; CHAVES, S.B.; SILVA, L.P.; SANTOS, A.D.; LACAVA, Z.G.M.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. **Journal Magnetic Magnetism Materials**, v.293, p.277-282, 2005.

GARCIA, V.A.P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos**. Brasília. 2002, 155p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

GILCHRIST, R.D. et al. Selective inductive heating of lymph nodes. **Annals of Surgery** v. 4, p. 596–606, 1957 *apud* CORCHERO, 2009.

GIRI, J.; PRADHAN, P.; SRIHARSHA, T.; BAHADUR, D. Preparation and investigation of potentiality of different soft ferrites for hyperthermia applications. **Journal of Applied Physics**, v. 97, n. 10, p. 10Q916-10Q916-3, 2005.

GOLD, N.; STOUT, H.A.; PAGANO, J.F.; DONOVICK, R. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. **Antibiotics Annual**, p.579-586, 1956 In RUIJGROK, 2006

GOLDSTEIN, L.S.; DEWHIRST, M.W.; REPACHOLI, M.; KHEIFETS, L. Summary, conclusions and recommendations: adverse temperature levels in the human body, **International Journal of Hyperthermia** v. 19, p. 373–384, 2003.

GOMES, G.M.; CISALPINO, P. S.; TABORDA, A. P.; CAMARGO, Z.P. PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, p. 3478-3480, 2000.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

GORDON, R.; LOSIC, D.M.A.; NAGY, S.S.; STERRENBURG, F.A.S. The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.27, p.116-127, 2009.

GROOT, O.A.; TROF, R.J.; GIBBES, A.R.; SWART, N.L.; BEISHUIZEN, A. Acute refractory hyperkalaemia and fatal cardiac arrest related to administration of liposomal amphotericin B. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 66, p.433-7, 2008.

GRUSZECKI, W.L.; GAGOS, M.; HEREC, M.; KERNEN, P.; Organization of antibiotic amphotericin b in model lipid membranes. A mini review. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 8, p.161-170, 2003.

GULLOTTI, E.; YEO, Y. Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 4, p. 1041-1051, 2009.

GUO, L.S.S. Amphotericin B colloidal dispersion: an improved anti-fungal therapy. **Advanced Drug Delivery Ver**, v. 47, p.149–63, 2001.

GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v.26, p.3995-4021, 2005.

GUPTA, N.; SHRIVASTAVA, A.; SHARMA, R.K. Silica nanoparticles coencapsulating gadolinium oxide and horseradish peroxidase for imaging and therapeutic applications. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7. p. 5491-5500. 2012

HAFELI, U.; RIFFLE, J.S.; HARRIS-SHEKHAWAT, L.; CARMICHAEL-BARANAUSKAS, A.; MARK, F.; DAILEY, J.P.; BARDENSTEIN, D. Cell uptake and in vitro toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**. v. 6, p. 1417-1428. 2009.

HAHN, R.C.; CONCEIÇÃO, Y.T.M.; SANTOS, N.L.; FERREIRA, J.F.; HAMDAN, J.S.; Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v.46, p.324-329; 2003.

HALBREICH, A.; ROGER, J.; PONS, J.N.; GELDWERTH, D.; DA SILVA, M.F.; ROUDIER, M.; BACRI, J.C. Biological applications of maghemite ferrofluid. **Biochimie**, v.80, p. 379 – 390, 1998.

HAMDAN, J.S.; RESENDE, M.A. Lipid composition and effect of amphotericin B on yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 102, p. 97–105, 1988.

HAO, R.; XING, R.; XU, Z.; HOU, Y.; GAO, S.; SUN, S. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 22, p. 2729-2742, 2010.

HARISINGHANI, M.G.; BARENTSZ, J.; HAHN, P.F.; DESERNO, W.M.; TABATABAEI, S.; VAN DE KAA, C.H.; DE LA ROSETTE, J.; WEISSLEDER, R. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 2491–2506, 2003.

HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.; LACAZ, C.S.; PEREIRA, A.D.; DEL NEGRO, G. Ação *in vitro* do itraconazol sobre *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 63, p.299–302, 1988.

HILLERY, A.M.; LLOYD, A.W.; SWARBRICK, J. Drug Delivery and Targeting: for pharmacists and pharmaceutical scientists. **Ed. Taylor e Francis**, Londres, ISBN: 0415271983; 2001.

HSUCHEN, C.C.; FEINGOLD, D.S. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on natural membranes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, p. 316-319, 1973.

HU, F.; JIA, Q.; LI, Y.; GAO, M. Facile synthesis of ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles for dual-contrast T<sub>1</sub>- and T<sub>2</sub>- weighted magnetic resonance imaging. **Nanotechnology**. v. 22. 245604 (7pp) 2011.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J.; DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy, **Biophysical Journal**. v.83, p.3245-3255, 2002.

HUNTER, R.J. Foundations of colloid science. Oxford, UK: Clarendon Press, 1986

HÜTTEN, A.; SUDFELD, D.; ENNEN, I.; REISS, G.; HACHMANN, W.; HEINZMANN, U.; WOJCZYKOWSKI K., THOMAS G. New magnetic nanoparticles for biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 112, p. 47-63, 2004.

ICONARU, S.L.; PRODAN, A.M.; MOTELICA-HEINO, M.; SIZARET, S.; PREDOI, D. Synthesis and characterization of polysaccharide-maghemite composite nanoparticles and their antibacterial properties. **Nanoscale Research Letters**. v. 7. p. 576-584. 2012.

JAIN, K.K. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. **Medical Principles and Practice**, 17:89-101, 2008.

JAIN, T.K.; MORALES, M.A.; SAHOO, S.K.; LESLIE-PELECKY, D.L.; LABHASETWAR, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. **Molecular Pharmacology**, v.2, p.194-205, 2005.

JEDLOVSZKY-HADJÚ, A.; TOMBÁ CZ, E.; BÁNYAI, I.; BABOS, M.; PALKÓ, A. Carboxylated magnetic nanoparticles as MRI contrast agents: relaxation measurements at different field strengths. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 19, p. 3173-3180, 2012.

JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1992.

JUN, Y.; HUH, Y.; CHOI, J.; LEE, J.; SONG, H.; KIM, S.; YOON, S.; KIM, K.; SHIN, J.; SUH, J.; CHEON, J. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 16, p. 5732-5733, 2005.

KANG, Y.S.; RISBUD, S.; RABOLT, J.F.; STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\lambda\text{-Fe}_2\text{O}_3$  particles. **Chemistry of Materials**, v. 8, n. 9, p. 2209-2211, 1996.

KAPPIYOOR, R.; LIANGRUKSA, M.; GANGULY, R.; PURI, I.K. The effects of magnetic nanoparticle properties on magnetic fluid hyperthermia. **Journal of Applied Physics**, v. 108, p. 094702-1-094702-8, 2010.

KARINI, Z., SHOKROLLAHI H., KARINI, L. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating material. **Material Science & Engineering C**. (2013). doi: 10.1016/j.msec.2012.01.045.

KAWAI, N.; FUTAKUCHI, M.; YOSHIDA, T.; ITO, A.; SATO, S.; NAIKI, T.; HONDA, H.; SHIRAI, T.; KOHRI, K. Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone. **Prostate**, v. 68, p. 784-792, 2008.

KHURSHID, H.; HADJIPANAYIS, C.G.; CHEN, H.; LI, W.; MAO, H.; MACHAIDZE, R.; TZITZIOS, V.; HADJIPANAYIS, G.C. Core/shell structures iron-iron-oxide nanoparticles as excellent MRI contrast enhancement agents. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 331. p. 17-20. 2013.

KIM, D.; NIKLES, D.E.; BRAZEL, C.S. Synthesis and characterization of multifunctional chitosan- $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles for magnetic hyperthermia and drug delivery. **Materials**, v. 3, n. 7, p. 4051-4065, 2010.

KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, Suppl 1:12-6, 2006.

KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 12-16, 2006.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 1, p. 193-212, 2005.

KULSHRESTHA, P.; GOGOI, M.; BAHADUR, D.; BANERJEE, R. In vitro application of paclitaxel loaded magnetoliposomes for combined chemotherapy and hyperthermia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 96, p. 1-7, 2012.

KUMAR, C.S.S.R.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 789–808, 2011.

LACAVA, L.M.; GARCIA, V.A.P.; KÜCKELHAUS, S.A.; AZEVEDO, R.B.; LACAVA, Z.G.M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; GANSAU, C.; BUSKE, N.; MORAIS, P.C. Magnetic resonance and light microscopy of a dextran coated magnetic fluid. **Journal Applied Physics**, v.93, p.7563-7565, 2003.

LACAVA, L.M.; LACAVA, Z.G.M.; AZEVEDO, R.B.; CHAVES, S.B.; GARCIA, V.A.P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DA SILVA, M.F.; MORAIS, P.C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.252, p.367-369, 2002.

LACAVA, Z.G. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. In: DURAN, N.; CAPPARELLI, L.H.; MORAIS, P.C. (Org.). NANOTECNOLOGIA Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 01ª ed. São Paulo: **Artliber Editora**, p. 175-181, 2006.

LACAVA, Z.G.; AZEVEDO, R. B.; MARTINS, E.V.; LACAVA, L.M.; FREITAS, M.L.; GARCIA, V.A. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 201 (1-3), p. 431-434, 1999.

LEE, J.; JUNG, M. J.; HWANG, Y. H.; LEE, Y. J.; LEE, S.; LEE, D.Y.; SHIN, H. Heparin-coated superparamagnetic iron oxide for in vivo MR imaging of human MSCs. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4861-4871, 2012.

LEITE, E.S. **Caracterização magnética de óleos magnéticos isolantes para aplicação em transformadores**. 2009, 102 p. Dissertação (Mestrado em Física). Instituto de Física. Universidade Brasília, Brasília, 2009.

LEMKE A, KIDERLEN AF E KAYSER O. Amphotericin B. **Applied Microbiology of Biotechnology**, 68:151-162, 2005.

LÉVY, M.; WILHELM, C.; SIAUGUE, J.M.; HORNER, O.; BACRI, J.C.; GAZEAU, F. Magnetically induced hyperthermia: size-dependent heating power of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 20, 204133, 2008.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26-48, jan. 2008.

LIEN, Y.H.; WU, T.M.; WU J.H.; LIAO, J.W. Cytotoxicity and drug release behavior of PNIPAM grafted on silica-coated iron oxide nanoparticle. **Journal of Nanoparticle Research**, v.13. p.5065-5075. 2011.

LIN, M. M.; KIM, H-H.; KIM, H. Iron oxide-based nanomagnets in nanomedicine: fabrication and applications. **Nano Reviews**, v. 1, p. 4883-4900, 2010.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52. p. 412-418. 2003

LING, Y.; WEI, K.; ZOU, F.; ZHONG, S. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 266-275, 2012.

LIU, L.; NI, F.; ZHANG, J.; JIANG, X.; LU, X.; GUO, Z. Silver nanocrystals sensitize magnetic-nanoparticle-mediated thermo-induced killing of cancer cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, p. 316-323, 2011.

LIU, Y.; ZHANG, N. Gadolinium loaded nanoparticles in theranostic magnetic resonance imaging. **Biomaterials**, v. 33, n. 21, p. 5363-5375, 2012.

LOSIC, D.; YU, Y.; AW, M.S.; SIMOVIC, S.; THIERRY, B.; ADDAI-MENSAH, J. Surface functionalisation of diatoms with dopamine modified iron-oxide nanoparticles: toward magnetically guided drug microcarriers with biologically derived morphologies. **Chemical Communications (Camb)**, v. 46, p. 6323–6325, 2010

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brazil. Contribuicao ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Bras-Med.* v.22, p.121-124, 1908.

MAHMOUDI, M.; SANT, S.; WANG, B.; LAURENT, S.; SEN, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 24-46, 2011.

MAINARDES, R.M. & SILVA, L.P. Drug delivery systems: past, present, and future. **Current drug targets**, v. 5, p.389-406, 2004.

MALVERN INSTRUMENTS LTD, **Zetasizer nano series user manual**. Malvern Instruments, 2005.

MARQUES, S.A. Paracoccidiodomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, p.135-150, 2003.

MASSART, R. Magnetic fluids and process for obtaining them. US Patent 4 329 241, 1982.

MAURIN, I.; DANTELLE, G.; BOILOT, J.; GACION, T. A protected annealing process for the production of high quality colloidal oxide nanoparticles with optimized physical properties. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, p. 13-21, 2013.

MILNER, A.E.; VAUGHAN, A.T.M.; CLARK, I.P. Measurement of DNA damage in mammalian cells using flow cytometry. **Radiation research**. v. 110 p. 108-117. 1987.

MONGE-FUENTES, V.; GARCIA, M.P.; TAVARES, M.C.; VALOIS, C.R., LIMA, E.C.; TEIXEIRA, D.S.; MORAIS, P.C.; TOMAZ, C.; AZEVEDO, R.B. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus spp.*). **Nanomedicine (Lond)**. v.6, p.1529-1544, 2011.

MONTENEGRO M. R. G. Formas clínicas da paracoccidiodomicose. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p.203-204, 1986.

MORAIS, P.C.; SANTOS, R.L.; PIMENTA, A.C. M.; AZEVEDO, R.B.; LIMA, E.C.D. Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 1, p. 266-270, 2006.

MORAIS, P.C.; SKEFF NETO, K.; GRAVINA, P.P.; FIGUEIREDO, L.C.; DA SILVA, M.F.; LACAVA, Z.G.M.; AZEVEDO, R.B.; DE CUYPER, M. Birefringence and transition electron microscopy of monolayer and bilayer magnetoliposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p.418-420, 2002.

MOREIRA, A.P.V. Paracoccidiodomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **Boletim Epidemiológico Paulista**. v. 5. n. 51. 2008.

NA, H. B.; SONG, C.; HYEON, T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. **Advanced Materials**, v. 21, p. 2133-2148, 2009.

NAGARAJAN, S.; YONG, Z. Use of core/shell structured nanoparticles for biomedical applications. **Recent Patents Biomed**, v. 1, p 34-42, 2008.

NALBANDIAN, L.; DELIMITIS, A.; ZASPALIS, V. T.; DELIYANNI, E. A.; BAKOYANNAKIS, D. N.; PELEKA, E. N. Hydrothermally prepared nanocrystalline Mn-Zn ferrites: synthesis and characterization. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 114, p. 465-473, 2008.

NASCHIE, M.S.E.L. Nanotechnology for the developing world. **Chaos, Solitons and Fractals**, v. 30, p. 769–773, 2006.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4)**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NG, A.W.K.; WASAN, K.M.; BERESTEIN, G.L. Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. **Journal Pharmacy Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p.67-83, 2003.

NIVEN, R.W.; Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. v.12, p.151–231, 1995.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; MARR, K.A.; REX, J.H.; COHEN, S.H. Amphotericin B: time for a new “gold standard”. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p.415-25, 2003.

PANKHURST, Q.A.; CONNOLLY, J.; JONES, S.K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, England, v. 36, n. 13, p. R167-R181, 2003.

PEIXOTO, D.L.G. **Avaliação da biocompatibilidade da Anfotericina B em duas formulações**: livre e associada com nanopartículas magnéticas. 2008, 114 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

PRADHAN, P.; GIRI, J.; BANERJEE, R.; BELLARE, J.; BAHADUR, D. Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.311, p.282–287, 2007.

RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v.39, p.233-241, 2001.

RICCI, G.; SILVA, I.D.C.G.; MOTA F.T.; WAKAMATSU, A.; FRANCO, M.F. Canine paracoccidioidomycosis: report on the first case of the literature. **ARBS. Annual Review of Biomedical Sciences**. Special Issue, 2002.

ROSENSWEIG, R.E. **Ferrohydrodynamics**. New York: Cambridge University Press, 1985.

RUIJGROK, E.J.; FENS, M.H.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.; VAN ETTEN, E.W.; VULTO, A.G. Nebulized amphotericin B combined with intravenous amphotericin B in rats with severe invasive pulmonary aspergillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.1852-4, 2006.

SADEGHIANI, N.; BARBOSA, L.S.; SILVA, L.P.; AZEVEDO, R.B.; MORAIS, P.C.; LACAVA, Z.G.M. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface-coated with polyaspartic acid. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 466-468, 2005.

SALDANHA, C.A. **Avaliação da atividade antifúngica da anfotericina B conjugada com fluido magnético bicamada de ácido láurico no tratamento da Paracoccidioidomicose.** Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v.40, p.225-42, 2002.

SANTOS, C.M.B.; SILVA, S. W., GUILERME, L.R., MORAIS, P.C. SERRS Study of molecular arrangement of amphotericin B adsorbed onto iron oxide nanoparticles precoated with a bilayer of lauric acid. **The Journal of Physical Chemistry C**. v. 115. p. 20442-20448. 2011.

SANTOS, M.C. **Nanopartículas funcionalizadas com ácido láurico: associação de moléculas bioativas e estudo de interação com BSA.** Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

SANTOS-MARQUES, M.J.; CARVALHO, F.; SOUSA, C.; REMIAO, F.; VITORINO, R.; AMADO, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J.A.; BASTOS, M.L. Cytotoxicity and cell signalling induced by continuous mild hyperthermia in freshly isolated mouse hepatocytes, **Toxicology**, v.224, p.210–218, 2006.

SASIDHARAN, M.; LUITEL, H. N.; GUNAWARDHANA, N.; INOUE, M.; YUSA, S.; WATARI, T.; NAKASHIMA, K. Synthesis of magnetic  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hollow nanospheres for sustained release of ibuprofen. **Materials Letters**, v. 73, p. 4-7, 2012.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e Superfícies.** São Paulo: Edgard Blücher, Ed. Universidade de São Paulo, 1975, p. 1-6, 128.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q., MENDES, R.P.; COLOMBO, A.P.; MORETTI, M.L. Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose, Guideliness in Paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p.297-310, 2006.

SILVA, J.R. **Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamadas de laurato/laurato e laurato/pluronic:** estudo da associação com anfotericina B. 2008, 106 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

SILVA, S.M.; TELLES-FILHO, F.Q. Diagnosis pf paracoccidioidomycosis by dectetion of antigem and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. **Vaccine**, v.13, p.305-311, 2006.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Biology** v.175, p.184-191, 1988.

SMITH, W. F. **Princípios de Ciência e Engenharia de Materiais**. 3 ed. Portugal : McGRAW-HILL, 1998, 892 p.

SOLER, M.A.G.; LIMA, E.C.D.; NUNES, E.S.; SILVA, F.L.R.; OLIVEIRA, A.C.; AZEVEDO, R.B.; MORAIS, P.C. Spectroscopic study of maghemite nanoparticles surface-grafted with DMSA. **Journal of Physical and Chemistry A**, v. 115. p. 1003-1008. 2011.

STURME, M.H.J.; PUCCIA, R.; GOLDMZN, G.H.; RODRIGUES, F. Molecular biology of the dimorphic fungi *Paracoccidioides* spp. **Fungal Biology Reviews**. v. 25. p. 89-97. 2011.

SUN, S.; LEE, J.J.H.; ZHANG, M.; Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, p.1252-1265, 2008.

SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D.B.; RAOUX, S.; RICE, P.M.; WANG, S.X.; LI, G. Monodisperse  $MFe_2O_4$  (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. **Journal of American Chemical Society**, v.126, p.273-279, 2004.

TARTAJ, P.; MORALES, M.P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZALEZ-CARRENO, T.; SERNA, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal Physic D: Applied Physic**, v. 36, p. R182-R197, 2003.

THOREK, D.L.J.; CHEN, A.K.; CZUPRYNA, J.; TSOURKAS, A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging. **Biomedical Engineering Society**, v. 34, p. 23-38, 2006.

TIPHINE, M.; LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacology characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transplant Infectious Disease**, v. 1, p. 273-283, 1999.

TONG, Q.; LI, H.; LI, W.; CHEN, H.; SHU, X.; LU, X.; WANG, G. In vitro and in vivo anti-tumor effects of gemcitabine loaded with a new drug delivery system. **Journal Nanoscience Nanotechnology**, v.11, p. 3651–3658, 2011.

TORRADO, J.J.; ESPADA, R.; BALLESTEROS, M.P.; TORRADO-SANTIAGO, S. Amphotericin B formulations and drug targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 97. p. 2405-2425. 2008.

VAN DE VEM, H.; PAULUSSEN, C.; FEIJENS, P.B.; MATHEEUSSEN, A.; ROMBAUT, P.; KAYAERT, P.; VAN DEN MOOTER, G.; WEYENBERG, W.; COS, P.; MAES, L.; LUDWIG, A. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with Amphotericin B: potent in vitro and in vivo alternatives to fungizone and AmBisome. **Journal of Controlled Release**. v. 161. p. 795-803. 2012.

VEISEH, O.; GUNN J.; ZHANG, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. **Advanced Drug Delivery**. v. 62 p. 284-304. 2010

VIEIRA, D.B. **Arranjos supramoleculares de drogas em lípides sintéticos e/ou polieletrólitos: estabilidade coloidal e atividade in vitro.** 2008, 109 p. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

WALSH, T.J.; TEPPLER, H.; DONOWITZ, G.R.; MAERTENS, J.A.; BADEN, L.R.; DMOSZYNSKA, A.; CORNELLY, O.A.; BOURQUE, M.R.; LUPINACCI, R.J.; SABLE, C.A.; DEPAUW, B.E. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **New England Journal of Medicine**, v.351, p.1391-402, 2004.

WANG, Y.X.; HUSSAIN, S.M.; KRESTIN, G.P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. **European Radiology**, v. 11, p. 2319-2331, 2001.

WILCZEWSKA, A.Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K.H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**. v. 64 p. 1020-1037. 2012

WILLS, E.A.; REDINBO, M.R.; PERFECT, J.R.; DEL POETA, M. The potential targets for antifungal development. **Emerging Therapeutic Targets**, v. 4, p.1-32, 2000.

WINGARD, J.; KUBILIS, P.; LEE, L.; YEE, G.; WHITE, M.; WALSH, L. Clinical Significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergilosis. **Clinical Infections Diseases**. V 29, p 1402-1407, 1999.

WUST, P.; HILDEBRANDT, B.; SREENIVASA, G.; RAE, B.; GELLERMANN, J.; RIESS, H.; FELIX, R.; SCHLAG, P.M. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **Lancet Oncology**, v.3 p.487–497, 2003.

XIE, J.; HUANG, J.; LI, X.; SUN, S.; CHEN, X. Iron Oxide Nanoparticle Platform for Biomedical Applications. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p.1278-1294, 2009.

XU, C.; SUN, S. Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Polymer International**, v. 56, p. 821-826, 2007.

XU, X.; SHEM, H.; XU, J.; LI, X. Aqueous-based magnetite magnetic fluids stabilized by surface small micelle of oleolysarcosine. **Applied Surface Science**, v. 221, p. 430-436, 2004.

YALLAPU, M.M.; FOY, S.P.; JAIN, T.K.; LABHASETWAR, V. PEG-functionalized magnetic nanoparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging applications. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 11, p. 2283-2295, 2010.

YANG, H.; ZHANG, C.; SHI, X.; HU, H.; DU, X.; FANG, Y.; MA, Y.; WU, H.; YANG, S. Water-soluble superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for magnetic resonance imaging. **Biomaterials**, v. 31, p. 3667-3673, 2010.

YILMA, S.; LIU, N.; SAMOYLOV, A.; LO, T.; BRINKER, C.J.; VODYANOY, V. Amphotericin B channels in phospholipid membranes-coated nanoporous silicon surfaces: implications for photovoltaic driving of ions across membranes. **Biosens Bioelectron**, v.22, p.1605-11, 2007.

YU, F; ZAHNG, L; HUANG, Y; SUN, K; DAVID, AE; YANG, V. The magnetophoretic mobility and superparamagnetism of core-shell iron oxide nanoparticles with dual targeting and imaging functionality. **Biomaterials**. v.31. p. 5842-5848. 2010.

ZENG, L.; REN, W.; ZHENG, J.; CUI, P.; WU, A. Ultrasmall water-soluble metal-iron oxide nanoparticles as T1-weighted contrast agents for magnetic resonance imaging. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14. P. 2631-2636. 2012