



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**

NATÁLIA SANTOS DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE MICELAS POLIMÉRICAS CONTENDO MILTEFOSINA
PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *CANDIDA SPP***

João Pessoa - PB

2019

NATÁLIA SANTOS DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE MICELAS POLIMÉRICAS CONTENDO MILTEFOSINA
PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *CANDIDA SPP***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de conclusão de curso do Centro de Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Roberto Caçado Castellano

Co-Orientadora: Prof. Dra. Elisangela Afonso de Moura Kretzschmar

João Pessoa - PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244p Nascimento, Natalia Santos do.
Produção de micelas poliméricas contendo miltefosina
para o tratamento de infecções por *Candida* spp. /
Natalia Santos do Nascimento. - João Pessoa, 2019.
61 f. : il.

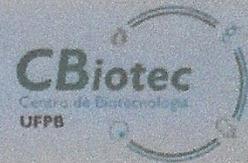
Orientação: Lúcio Roberto Cançado Castellano.
Coorientação: Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Antifúngicos. 2. Sistema de Liberação de Fármacos.
3. Bionanotecnologia. I. Castellano, Lúcio Roberto
Cançado. II. Kretzschmar, Elisângela Afonso de Moura.
III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dezenove dias do mês de setembro de 2019, às 14:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Lúcio Roberto Cançado Casteliano (ETS/CCS/UFPB) e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar (DB/CBIOTEC/UFPB), orientadora; 2. Dra. Tatiana Rita de Lima Nascimento, a discente Natália Santos do Nascimento, matrícula 11507475, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Produção de micelas poliméricas contendo Miltefosina para o tratamento de infecções por *Candida spp.*”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Lúcio Roberto Cançado Casteliano, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Presidente da Banca Examinadora

Orientadora e Avaliador 1

Natália Santos do Nascimento

Discente

Avaliador 2

João Pessoa/PB, 19 de setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da vida, e por permitir que tudo ocorresse em seu tempo. Aos espíritos de luz, que não me abandonaram em nenhum momento nessa minha jornada de 4 anos longe do meu aconchego, e por toda proteção.

Agradeço aos meus pais, Ransés Xavier do Nascimento e Ana Kárite Santos do Nascimento, assim como à minha irmã, Gabriela Santos do Nascimento, por todo o apoio proporcionados todos esses anos, distantes fisicamente, na maior parte do tempo. Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço aos meus avós maternos, Luís Paulo e Arlinda Francisca (*in memoriam*) por todo o incentivo e preocupação desde que me mudei para João Pessoa, em 2016.

Agradeço à minha avó paterna, Maria do Socorro, e tia-avó, Terezinha, pelo carinho e incentivo dados.

Agradeço à Prof^ª. Dra. Carlota Rangel pelo acolhimento, pela oportunidade de realizar uma parte deste trabalho no Laboratório de Nanobiotecnologia – NanoBio (USP) e pela confiança em mim depositada.

Agradeço ao Prof. Dr. Lúcio Roberto pelo amparo e disponibilidade de me orientar na realização deste trabalho, e aceitar a proposta de realizar esse trabalho no Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC), localizado na Escola Técnica de Saúde na UFPB, em parceria com a professora Carlota.

Agradeço à Prof^ª. Dra. Elisângela Moura pelas primeiras oportunidades de vivenciar a pesquisa acadêmica, pelos ensinamentos em salas de aulas e no Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia Industrial (LANNI).

Agradeço aqueles que tenho prazer em chamar de amigos, que deram um toque especial nessa jornada sinuosa.

Amigas da escola para vida: Marina, Larissa, Raquel, Nathalia. Meu querido amigo-irmão, Bruno, que partiu tão cedo para o outro plano. Vocês todos estiverem presentes em meus dias, direta ou indiretamente, sempre deixando viva aquela parte boa da adolescência e experiências vividas nesse “bando”.

Amigos que João Pessoa me trouxe: Ana Beatriz, Raniele, Gustavo, Kisie, Rayanelle, Rafael, Lucas, Matias, Pedro, Natanael, Hércules, Anchieta, Ana Carolina, e tantos outros, do curso de Biotecnologia e de fora. Vocês todos tiveram uma participação especial e me marcaram de alguma forma nesses 4 anos, e eu sou eternamente grata pelo acolhimento e amizade singular que desenvolvi com cada um.

Aos amigos de laboratório: Alan, Natalia, Maria Carolina, Miguel, Claudia, Brenna, Daniela, pela paciência, ensinamentos, apoio, finais de semanas de trabalho na universidade, dores na coluna em conjunto e saídas ao anoitecer da Universidade.

Amigos de São Paulo que fizeram a minha estadia na cidade bem mais leve e proveitosa: Marryelle, Gustavo, Lucas e Udemberg, pelo apoio e momentos inesquecíveis.

Aos amigos de laboratório: Marina, Amanda, Jhenifer, Eloísa e Rafael pela paciência, acolhimento, ensinamentos e momentos de descontração.

Aos técnicos Larissa e Gledson pelo apoio, paciência ensinamentos no NanoBio.

Ao Dr. Valter Feitosa pela paciência e disponibilidade para tirar minhas dúvidas e me auxiliar no decorrer do projeto.

Agradeço por último, e não menos importante, a mim mesma, por não ter desistido de realizar o meu sonho de infância de trabalhar com a nanotecnologia. A mudança de ares foi difícil e brusca, a adaptação foi lenta, mas valeu a pena.

*Foi o tempo que dedicaste à tua rosa
que a fez tão importante...
- O Pequeno Príncipe*

RESUMO

Nos últimos anos, infecções por *Candida spp.* têm aumentado de forma ativa em especial em indivíduos vulneráveis e em ambientes hospitalares, seja de forma cutânea ou invasiva. Devido a fatores como o uso indiscriminado de antifúngicos e corticosteroides, o tratamento destas patologias está cada vez mais complexo, tendo em vista o desenvolvimento de resistência aos mesmos. A miltefosina é um fármaco utilizado para o tratamento de câncer e leishmaniose, e possui características químicas que lhe conferem, também, ação antifúngica. Contudo, é necessário o desenvolvimento de métodos inovadores para disponibilização do fármaco, tendo em vista seus efeitos adversos, como atividade hemolítica. Sistemas de liberação controlada de fármacos, são alternativas bem elucidadas na literatura, em especial, micelas poliméricas como nanocarreadores de fármacos pouco solúveis. O método de dissolução direta para produção de micelas, é um método prático e eficiente para sua produção, como demonstrado neste trabalho. A partir do encapsulamento da miltefosina em micelas de Pluronic F127, foram realizados testes de caracterização física do perfil de distribuição de partículas das micelas, testes de microdiluição em caldo para *Candida spp.*, o método checkerboard para avaliar o efeito da interação entre as micelas poliméricas e o fármaco livre com a nistatina e avaliação do pH. A partir destes experimentos, observa-se que as micelas foram formadas em escala nanométrica, o fármaco foi eficientemente encapsulado, e a atividade antifúngica da miltefosina foi mantida, contra três espécies de cândida: *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, e apresentou pouca eficiência contra *C. krusei*, nas condições estudadas. Pode-se pautar que a encapsulação do fármaco resultou numa interação positiva com a nistatina, que não foi observada utilizando apenas o fármaco livre. Além disso, os resultados obtidos a partir da aferição do pH das micelas armazenadas em ambiente refrigerado, num intervalo de 60 dias, apresentou um comportamento que sugere a liberação da miltefosina e degradação do polímero ao longo do tempo, sem fortes indícios de uma interação entre as duas moléculas. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, as micelas contendo miltefosina apresentam um grande potencial para o tratamento de infecções fúngicas, em relação ao fármaco livre, pela manutenção de suas atividades antifúngicas, e apresenta um efeito de adição quando utilizada em conjunto com o fármaco de referência para o tratamento de candidemias, a nistatina.

Palavras Chave: Antifúngicos, Sistema de Liberação de Fármacos, Bionanotecnologia,

ABSTRACT

In recent years, *Candida spp.* infections has increased actively, especially in vulnerable individuals and in hospital environments, either cutaneous or invasive forms. Due to factors such as the indiscriminate use of antifungals and corticosteroids, the treatment of these pathologies is increasingly complex, owing the fact their development of resistance. Miltefosine is a drug used to treat cancer and leishmaniasis, and has chemical characteristics that also confer antifungal action. However, the development of innovative methods for drug availability is necessary, considering its side effects, such as hemolytic activity. Controlled drug release systems are well-elucidated alternatives in the literature, especially polymeric micelles as poorly soluble drug nanocarriers. The direct dissolution method for micelle production is a practical and efficient method for its production, as demonstrated in this work. With the encapsulation of miltefosine in Pluronic F127 micelles, where performed physical characterization tests of the micelle particle distribution profile, broth microdilution tests for *Candida spp.*, checkerboard method to evaluate the effect of the interaction between polymer micelles containing miltefosine and the free drug with nystatin, and pH assessment. From these experiments, it is observed that micelles were formed on a nanometer scale, the drug was effectively encapsulated, and the antifungal activity of miltefosine was maintained against three *Candida* species: *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*, and showed little efficiency against *C. krusei*, under the studied conditions. It can be argued that drug encapsulation resulted in a additive interaction with nystatin, which was not observed using only the free drug. Moreover, the results obtained from the pH measurement of the micelles stored in the refrigerated environment, within 60 days, showed a behavior that, probably, resulted from the release of miltefosine and polymer degradation over time, without great signs of an interaction between both molecules. According to the results obtained in this work, micelles-containing miltefosine have a great potential for treatment of fungal infections, in relation to the free drug, by maintaining its antifungal activities, and presents an additive effect when used in conjunction with reference drug for the treatment of candidemia, nystatin.

Keywords: Antifulgals, Drug Release System, Bionanotechnology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de CIM – MTF e MM para espécies de Candida.....	32
Tabela 2: Susceptibilidade a antifúngicos em isolados de Candida.....	40
Tabela 3: índice da FIC.....	42

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Concentração Molar das MM	24
Equação 2: Concentração Molar da MTF.....	24
Equação 3: Concentração Inibitória Fracionada (FIC)	27
Equação 4: FIC das MM e da MTF.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Molécula da Miltefosina	17
Figura 2: Fórmula estrutural do Pluronic F127 (PF127) (A) e Representação esquemática da formação de micelas de PF127 (B)	20
Figura 3: Método de Dissolução Direta, PF127 – Pluronic F127, MTF – Miltefosina	23
Figura 4: Desenho da placa de 96 poços.....	25
Figura 5: Desenho da placa do Checkerboard Method.....	26
Figura 6: Diluições seriadas da CIM	27
Figura 7: DLS – MB.....	28
Figura 8: DLS – MM.....	29
Figura 9: DLS – MM.F.....	29
Figura 10:Correlograma, MB e MM.F	30
Figura 11: Correlograma, MM e MM.F	30
Figura 12: Microdiluição <i>Candida albicans</i> (A), <i>C. glabrata</i> , (B), <i>C. tropicalis</i> , (C) e <i>C. krusei</i> (D) MB- Micelas Brancas, MM- Micelas MTF, C+- Controle positivo	31
Figura 13: Microdiluição <i>C. albicans</i> (H, G, F) x <i>C. glabrata</i> (E, D, C), (A), <i>C. tropicalis</i> (H, G, F) x <i>C. krusei</i> (E, D, C), (B). Ca – <i>C. albicans</i> , CG – <i>C. glabrata</i> , CT – <i>C. tropicalis</i> , CK – <i>C. krusei</i> C+- Controle positivo, CE- Controle de esterilidade.....	31
Figura 14: CIM - MM, <i>C. albicans</i> (A), <i>C. glabrata</i> (B) e <i>C. tropicalis</i> (C).....	32
Figura 15: CIM - MM, <i>C. albicans</i> (A), <i>C. glabrata</i> (B) e <i>C. tropicalis</i> (C).....	33
Figura 16: Checkerboard Method de <i>Candida albicans</i> - MM (A) e MTF (B).....	33
Figura 17: Representação da Parede e Membrana Celular em uma célula fúngica	37
Figura 18: Representação da parede celular de <i>Candida albicans</i>	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.2 Tratamento atual de infecções fúngicas	16
2.2 Miltefosina.....	17
2.3 Micelas poliméricas	19
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Método de Dissolução Direta	23
4.2 Concentração do Fármaco	24
4.3 Análise de Tamanho de Partícula	24
4.4 Teste de Microdiluição em caldo para <i>Candida spp</i>	24
4.5 Checkerboard Method	25
4.6 Análise de pH.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Análise de Tamanho de Partícula	28
5.2 Teste de Microdiluição de <i>Candida spp</i>	30
5.3 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	32
5.4 Checkerboard Method	33
5.5 pH.....	33
6. DISCUSSÃO	34
6.1 Análise de Tamanho de Partícula	34
6.2 Avaliação da atividade fúngica.....	36
6.3 Checkerboard Method	41
6.4 pH.....	43

7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
GLOSSARIO	54

1. INTRODUÇÃO

Desde os anos 2000, as infecções fúngicas têm aumentado consideravelmente, em especial, em ambientes hospitalares e indivíduos que possuem o sistema imune comprometido. Os fungos são organismos eucariotos que podem se apresentar como estruturas filamentosas, ou leveduriformes. Estas, podem se reproduzir por brotamento, e algumas podem ainda formar pseudo-hifas. No caso da *Candida albicans*, essa última formação, é responsável pela invasão de barreiras físicas, células, para chegar até os tecidos mais profundos, e então alastrar-se como infecção (TORTORA, 2012).

As espécies do gênero *Candida*, são fungos leveduriformes comensais –isto é, vivem em uma relação ecológica onde um organismo é beneficiado, sem trazer prejuízo para o outro (SHIEL, 2018), e causam infecções invasivas quando há o desequilíbrio nessa relação. A pele, as mucosas e a microbiota intestinal, impedem a colonização exacerbada da *Candida spp.*, pela competição entre outros microrganismos ali presentes. Por isso, quando ocorre uma disparidade nessas populações pela utilização de antifúngicos de amplo espectro, há então a colonização oportunista pelas espécies desse gênero, e o desenvolvimento então da infecção (SPELLBERG, EDWARDS, 2002).

A candidíase assim como a maioria das infecções fúngicas, pode ocorrer tanto de forma cutânea, quanto de forma invasiva. Esta última, está relacionada diretamente com as infecções pertinentes aos tecidos internos, em especial presentes na corrente sanguínea (HEMSLEY, 2009). Os fatores de risco que levam as leveduras a colonizar tecidos internos e chegarem à corrente sanguínea, além do uso recorrente de antifúngicos, incluem o rompimento das barreiras naturais da pele e mucosas, como queimaduras, colocação de cateteres percutâneos, cirurgias abdominais, atrofia de mucosas pela radiação, entre outros fatores (SPELLBERG, EDWARDS, 2002).

A partir disso, temos a estimativa anual de casos de candidemia – presença das leveduras na corrente sanguínea, nos Estados Unidos da América de aproximadamente 25 mil casos. A alta incidência de infecções por estas leveduras na corrente sanguínea, torna mais provável o desenvolvimento de uma candidíase invasiva. Somado a isto, a infecção no interior do organismo pode rapidamente se desenvolver em um quadro de septicemia, visto que essas podem afetar o coração, rins, ossos, entre outros órgãos internos, e não necessariamente serem disseminados pela corrente sanguínea (CDC, 2019; SPELLBERG, EDWARDS, 2002).

Os indivíduos que apresentam uma diminuição em sua imunidade são os mais susceptíveis a desenvolver diversas doenças, inclusive a candidíase (KRCMERY, BARNES, 2002). Diabéticos, portadores da AIDS, fibrose cística, podem apresentar neutropenia (contagem baixa de neutrófilos), linfopenia (contagem baixa de linfócitos), leucocitose (deficiência de adesão dos leucócitos), plaquetopenia (níveis baixos de plaquetas), entre outros (FERNANDEZ, 2016), por isso a maior facilidade de desenvolver formas invasivas da doença, e a depender do estado do paciente, há uma maior probabilidade de desenvolver um quadro de sepse. A presença de citocinas é de extrema importância para o recrutamento de neutrófilos para combater a infecção por *Candida spp.*, ao mesmo passo que testes em murinos demonstram que infecções por estas espécies *in vitro* e *in vivo* apresentam níveis do Fator de Necrose Tumoral (TNF) inferiores àqueles induzidos por patógenos procarióticos (SPELLBERG, EDWARDS, 2002). Com base nesses estudos, incluindo os de Netea *et al.*, 1999, pode-se afirmar que a disseminação da infecção destes ascomicetos, é mais provável, principalmente em indivíduos imunodeficientes.

Ainda de acordo com Spellberg e Edwards, 2002, em casos de candidíase invasiva em pacientes imunocompetentes, o tratamento é realizado normalmente com fármacos de referência como a Anfotericina B (AnfB) e/ou o Fluconazol. Porém, em pacientes em estado vulnerável, a utilização desses fármacos deve ser cuidadosa. É necessário um estudo prévio sobre a espécie a que está causando a infecção, e ainda ter em vista as reações adversas destes medicamentos. Por exemplo, a utilização do fluconazol em pacientes neutropênicos deve ser cuidadosa, uma vez que, de acordo com a bula do antifúngico, pode piorar esse estado de neutropenia.

Contudo, mesmo com o tratamento, os pacientes acometidos pela candidíase invasiva, apresentam uma taxa de mortalidade de 40%, e há uma tendência mundial no desenvolvimento de resistência, em especial nas espécies de *Candida não-albicans*. Logo, nos últimos anos, vem crescendo a necessidade de novos agentes terapêuticos com atividade antifúngica (KULLBERG, 2015), em especial tratamentos mais eficazes e seguros para as populações em estado imunocomprometido (VILA, 2015).

A miltefosina (MTF) é um alquilfosfolípídeo que possui características estruturais que lhe conferem o potencial antitumoral. Além disso, experimentos demonstraram que a MTF interage intimamente com as balsas lipídicas das células, indicando que sua ação sobre elas está bem relacionada ao envoltório lipídico das células, em especial o colesterol (MALTA DE SÁ, 2015). Além de sua utilização para tratamentos de tumores e leishmaniose, existem relatos na literatura da ação antifúngica da MTF em diferentes espécies de fungos, inclusive os do gênero

Candida: *C. parapsilosis* e *C. krusei*, resistentes à itraconazol e terbinafina (TONG, 2007), *C. albicans* resistentes ou susceptíveis ao fluconazol. Segundo este trabalho, há a demonstração da utilização da MTF como um antifúngico promissor em especial para o tratamento de candidíase cutânea resistente e seus biofilmes. Até o momento, as linhagens de *Candida spp.* utilizadas apresentaram baixo potencial de desenvolvimento de resistência à miltefosina (VILA, 2015).

Apesar do seu grande potencial em diversas patologias e patógenos, a MTF apresenta efeitos indesejáveis, em relação à destruição de células saudáveis do organismo. De acordo com Malta de Sá e colaboradores, 2015, a MTF apresenta citotoxicidade seletiva para células malignas ricas em colesterol e em membranas que apresentam ácidos graxos poli-insaturados. Todavia, estes também estão presentes em células saudáveis do nosso organismo, já que o colesterol envolve a membrana das hemácias (BUCHWALD, 2000; TINTLE, 2015), e apesar da maior parte das membranas do nosso organismo ser composta por ácidos graxos saturados, existem tecidos onde as células são ricas em lipídeos poli-insaturados, como o tecido cerebral (OLBRICH, 2000; GASCHLER, STOCKWELL 2017).

Logo, a utilização de grandes quantidades da MTF apresenta certa limitação devido aos seus efeitos colaterais e adversos. No tratamento de câncer colorretal, por exemplo, pesquisas relatam que a posologia de 150 mg – 200 mg da MTF por dia, apresentaram náuseas, vômitos, nefrotoxicidade, leucocitose e trombocitose em boa parte dos pacientes (PLANTING, 1993). E em casos de leishmaniose visceral, o tratamento com duração de aproximadamente 28 dias, sendo a posologia para adultos com mais de 50 kg, de aproximadamente 150 mg por dia, e os efeitos colaterais estão diretamente relacionados à desconfortos no trato gastrointestinal, com náuseas, vômitos, perda de apetite e diarreia (PIJPERS, 2019). A partir destas informações, percebe-se a necessidade de alternativas que possam diminuir os efeitos colaterais da MTF e aumentar a sua eficácia, em especial para os pacientes vulneráveis.

Uma alternativa interessante para esse caso, seria a utilização de Sistemas de Liberação de Fármacos (SLF's). Estes sistemas são comumente utilizados para liberação controlada de agentes terapêuticos, com a intenção de dissolução do agente, ao mesmo passo que os níveis de sua concentração permaneçam dentro da faixa terapêutica por um tempo maior, diminuindo a necessidade da administração de doses em um curto intervalo de tempo (BIZERRA, 2016). Os SLF's podem ser apresentadas como nanoemulsões, onde o tamanho das partículas se encontra numa escala nanométria (<1 µm), e as nanopartículas podem ser compostas de lipídios cristalinos, ceras e polímeros. Blocos de copolímeros são utilizados para a formação destas nanopartículas, em especial as micelas, onde o seu interior é constituído pelos blocos

hidrofóbicos, e envolto pelos blocos hidrofílicos numa solução aquosa (CHEVALIER, BOLZINGER, 2019). Os emulsionantes – a parte dispersa na emulsão, podem ser divididos em três classes: aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Estes últimos vêm ganhando destaque na produção destes SLF's, tendo em vista que eles apresentam uma maior estabilidade numa solução aquosa, não sofrendo dissociação em íons (FRANZOL, REZENDE, 2015). Os polímeros Pluronic[®] são surfactantes não-iônicos (CAMBRINI, 2018), utilizados constantemente para produção de micelas, principalmente pelo aperfeiçoamento de suas atividades, como demonstrado no trabalho de Mohamed e colaboradores, 2017, onde a incorporação do fármaco antitumoral em micelas de Pluronic F127 (PF127), apresentou um aumento em sua solubilidade e melhora em sua permeabilidade. Conseqüentemente, houve um aumento na absorção e na biodisponibilidade em sua administração oral. Os resultados indicaram que a utilização do polímero PF127 para produção de micelas, proporciona uma maior eficiência e estabilidade no encapsulamento de substâncias, em relação ao PF68. Este resultado também foi demonstrado por Feitosa e colaboradores, 2019, onde foi demonstrado que o PF127, apresenta o melhor potencial de diminuir o efeito hemolítico da miltefosina, em comparação aos polímeros L64, L44, F68 e F108. Além disso, o medicamento encapsulado nas micelas, apresentaram liberação prolongada, diminuição da citotoxicidade *in vitro*, melhora na atividade antitumoral e menor toxicidade hepática e renal em modelos animais (MOHAMED, 2017).

Seguindo esta linha de raciocínio, a produção de micelas de PF127 contendo a MTF apresenta um grande potencial de diminuição em sua toxicidade, em especial, sua atividade hemolítica, como demonstrado no trabalho de Feitosa *et al*, 2019.

No presente estudo, é proposta a observação da atividade antifúngica em *Candida spp*, das micelas de PF127 incorporadas com a MTF.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 Tratamento atual de infecções fúngicas

O ser humano apresenta mais de 300 tipos distintos de fungos compondo a microbiota natural da pele e mucosas. A espécie *Candida albicans*, é a mais prolífica no homem, e não é restrita à idade ou gênero, tendo em vista sua detecção em crianças desde seus anos mais jovens, até a idade adulta (LORENZANI, 1986). Infecções por *Candida*, em especial as não-*albicans*, são as principais causadoras de infecções hospitalares da corrente sanguínea (candidemia). Sendo um terço (1/3) dos casos ocasionados por *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Esses fungos muitas vezes trazem complicações, como endocardite e osteomielite, principalmente por fatores como a imunodeficiência do hospedeiro, e além da patogenicidade do M.O., e resistência à antibióticos presentes no mercado (KRCMERY, BARNES, 2002).

Desde os anos 2000, as infecções fúngicas em ambientes hospitalares e em indivíduos com o sistema imune comprometido, vêm ganhando destaque. A candidíase orofaríngea é uma patologia comum e uma das maiores causas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos, e traz um aumento na predisposição destes desenvolverem a forma invasiva desta infecção fúngica. Isso ocorre especialmente em pacientes após o transplante de órgãos, pouco tempo depois do procedimento. A candidíase invasiva pode atingir o sistema circulatório, tecidos do esôfago, gastrointestinal, respiratório, urinário, entre outros, e ocorrer entre 5 – 50% dos casos de transplantes. A formação de pseudo-hifas, no caso de *C. albicans*, é responsável pela invasão de barreiras físicas, células, para chegar até os tecidos mais profundos. Estas em pacientes imunocompetentes, os neutrófilos apresentam a capacidade de reconhecer estas estruturas e danificar o fungo (TORTORA, 2012; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2009; DIAMOND, 1978).

O aumento de ocorrências em procedimentos médicos invasivos (como cirurgias, utilização de fármacos intravenosos, utilização de cateteres vasculares e/ou urinários, fluidos de hiperalimentação), somados à alta incidência de casos envolvendo desequilíbrios na homeostase, causados por fungos, está também diretamente relacionada ao uso irregular de antibióticos de amplo espectro e anti-inflamatórios, e o crescente número de pessoas imunocomprometidas. Estas, envolvem o aumento de populações com HIV, diabéticas, neonatos, neutropênicos, entre outros. (VILA et al, 2015; KOJIC, DAROUICHE, 2004).

Em casos de candidíase disseminada, os pacientes normalmente são submetidos a tratamentos com AnfB ou fluconazol, porém o estado imune do paciente deve ser levado em

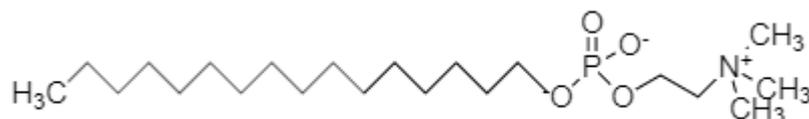
consideração antes da administração destes fármacos, uma vez que o fluconazol pode induzir um estado de neutropenia, - com redução da resposta antifúngica. Além disso, é recomendada a realização de testes de resistência a antibióticos, para a escolha de um tratamento mais eficaz, visto que a infecção pode ser causada por linhagens resistentes a distintos fármacos, e a utilização do medicamento errado, pode piorar o estado de saúde do indivíduo (SPELLBERG, EDWARDS, 2002; DIAMOND, 1978).

Existem diversos relatos na literatura de espécies de *Candida* (*albicans* e não-*albicans*) resistentes à antibióticos. Rex, et al em 1995, trouxe um compilado de estudos de casos clínicos com linhagens resistentes ao Fluconazol. Em 1997, Kelly e colaboradores, reportaram ainda que algumas linhagens resistentes ao Fluconazol apresentavam resistência cruzada com a AnfB em pacientes com AIDS. Esses relatos apesar de antigos, contém casos persistentes até os anos mais atuais, e despertam um interesse contínuo tanto como nos mecanismos de resistência (BERKOW, 2017), quanto na utilização de métodos alternativos para tratamento de biofilmes de *Candida spp* e do fungo em seu estado planctônico (VILA et al, 2015).

2.2 Miltefosina

A miltefosina (MTF), também conhecida como hexadecilfosfocolina, é um alquilfosfolipídio pequeno de amplo espectro, tendo atividades antimicrobianas, antileishmania e anticâncer. A MTF tem um tempo de meia vida de aproximadamente 96h, *in vivo* (DRUGBANK; PALUMBO, 2008).

Figura 1: Molécula da Miltefosina



Fonte: ChemDrawDirect

Seu potencial anticâncer se dá por ser um potencial imunomodulador, e em especial atuando diretamente na interferência em eventos chave para transdução de sinais, como a fosfolipase C e proteína quinase C (BRACHWITZ, 1996). Ainda, a MTF apresenta uma ação mais ampla membranas celulares, e assim como outras moléculas de sua classe, é capaz de marcar seletivamente tumores, induzindo apoptose (VAN BLITTERSWIJK, 2013).

Além disso, em 2015, Malta de Sá, e colaboradores, demonstraram as interações de membrana a partir de simulações dinâmicas entre a MTF em bicamadas lipídicas. A MTF apresenta a capacidade de aumentar a fluidez da membrana e conseqüentemente a mobilidade proteica, a partir da sua acumulação nas balsas lipídicas, em especial em membranas insaturadas, também influencia diretamente no transporte de colesterol, a partir do seu pareamento com o mesmo. O complexo formado então, serve de sinalizador para a apoptose celular.

Além de sua atividade anticâncer, a MTF também é utilizada para o tratamento de leishmaniose cutânea e visceral (SOTO, 2002; SUNDAR, 2002), devido seu potencial de induzir a apoptose no protozoário (PARIS, 2004). Na literatura, observa-se que a concentração inibitória mínima para 50% de *Leishmania*, numa concentração de 4×10^7 parasitos/mL, foi de 24,35 μ M da MTF. Apesar dos mecanismos leishmanicidas ainda não serem bem compreendidos, acredita-se que a alta afinidade da MTF pelas membranas lipídicas, seja responsável por este efeito no protozoário. Somado a isto, observou-se que a MTF aumenta a fluidez da membrana destes parasitos ao mesmo tempo em que inibe o crescimento e provoca lise celular (FERNANDES, 2016)

A MTF apresenta também atividade contra fungos, como demonstrado no trabalho de Tong e colaboradores em 2007, onde o fármaco apresentou ação antifúngica em espécies de *Candida* não-*albicans* resistentes à itraconazol e terbinafina. Contudo, essa ação também foi observada em *C. albicans* resistentes e susceptíveis ao fluconazol, no trabalho de Vila e colaboradores, em 2015. Estes estudos indicam e propõem a MTF como um antifúngico promissor para o tratamento de candidíase cutânea, de linhagens resistentes e seus biofilmes. Além de seu potencial uso para o tratamento de candidíase, ainda no trabalho de Vila e colaboradores, 2015, foi observado que as espécies desse gênero apresentam um baixo desenvolvimento de resistência ao fármaco.

Porém, mesmo apresentando um grande potencial e ganhando interesse na área médica, a MTF, por suas características químicas, apresenta diversos efeitos colaterais. Alguns exemplos são: desconfortos intestinais, níveis elevados da enzima aspartato aminotransferase e creatinina (JHA, 1999); indução da eriptose (apoptose de eritrócitos) pelo aumento da atividade citosólica de Ca^{2+} e encolhimento celular (MUNOZ, 2013); nefrotoxicidade, leucocitose, trombocitose (PLANTING, 1993); hemólise (ALONSO, 2019); atividade teratogênica (FERNANDES, 2016).

Para o tratamento de câncer e leishmaniose, cerca de 50-200 mg da MTF é utilizado por via oral, sendo a dose de 2.5 mg/Kg/dia. O excesso na dosagem é realizado, devido o

processamento que o fármaco irá ser submetido até chegar ao local desejado. Porém, como já foi demonstrado, essas concentrações elevadas do fármaco trazem prejuízos à saúde humana. Estudos em murinos, demonstraram que a MTF se acumula rapidamente em órgãos internos como rins, fígado, pulmões, baço e glândulas adrenais. Ou seja, há a interação com ampla variedade de tipos de células do trato gastrointestinal, *in vivo*, além de entrar em contato direto com as células sanguíneas ao ser absorvido, e as células renais e hepáticas. Nestas últimas, a MTF irá sofrer o processo de *clearance* (presença <0,2% da dose presente na urina, no dia 23 de 28 dias de tratamento) e metabolização por fosfolipases para formar subprodutos como colinas e metabólitos alcoólicos de cadeias longas que serão reciclados em fosfolipídios (PLANTING, 1993; VERWEIJ, 1992; PALUMBO, 2008; DORLO, 2012).

Devido a esses efeitos indesejados aos pacientes que já se apresentam num estado de saúde frágil, é evidente a necessidade de métodos inovadores de disponibilização deste fármaco em tratamentos, para diversas patologias. Assim, o modelo de liberação baseado em polímeros pode servir como opção para administração da MTF.

2.3 Micelas poliméricas

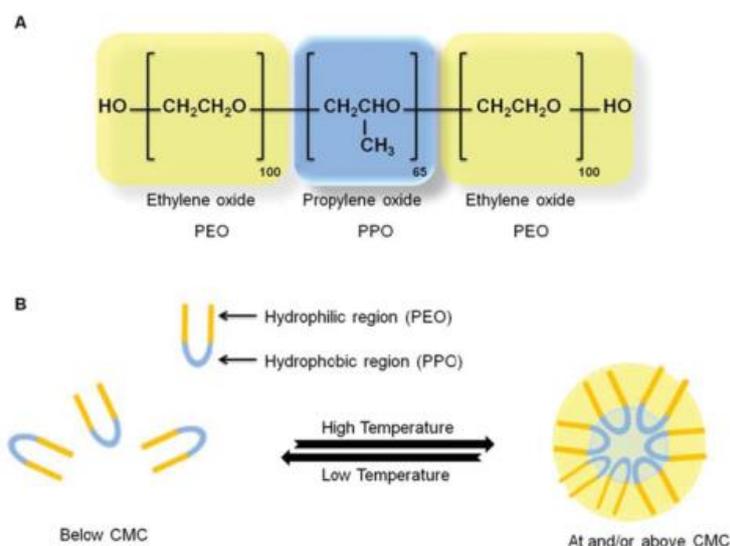
Os Sistemas de Liberação de Fármacos (SLF's) são compostos por lipossomas, micropartículas, nano-associados, nanopartículas, e micelas poliméricas (MP). Estas, são o grande objeto de estudo na área científica, em especial devido ao seu potencial de carrear fármacos pouco solúveis, devido ao seu interior de características hidrofóbicas e de tamanho pequeno (< 100 nm). Suas características inerentes se assemelham com carreadores naturais como vírus e lipoproteínas, e conseqüentemente, protegem o seu conteúdo. Além de também serem propensos a não serem captados pelo sistema mononuclear fagocitário (SMF) (JONES, LEROUX, 1999).

O processo de micelização irá ocorrer de acordo com a estreita faixa de concentração dos surfactantes em solução. Diversos métodos são utilizados para determinar essa concentração micelar crítica (CMC), e há muitas definições sobre este termo. Uma delas, considera a CMC como o número mínimo e constante de moléculas destes surfactantes que se encontram num estado agregado, ou seja, em um formato micelar (MOROI, 1992). A medida que este surfactante é adicionado a um solvente aquoso, a concentração de monômeros dissolvidos aumenta até que a CMC seja atingida, para então ocorrer a formação das micelas (LUCKEY, 2014). Estes detergentes podem ser encontrados em partes em copolímeros

anfifílicos, que apresentam tanto segmentos hidrofóbicos quanto hidrofílicos. Estes copolímeros em bloco podem se organizar em micelas, e outros tipos de estruturas complexas de organização a depender do solvente em que são solubilizados (LOIOLA, 2017). Em um solvente aquoso, a região hidrofóbica do emulsionante (líquido disperso), devido as interações entre as estruturas químicas das soluções, vai formar o núcleo das micelas em associação com o fármaco hidrofóbico, que irá gradualmente ser liberado e ocasionar numa diminuição do tamanho micelar (JONES, LEROUX, 1999). Esse processo pode ser observado na Fig. 2-B.

As MP são compostas por materiais anfifílicos, e são formadas espontaneamente quando colocadas em solução. Eles formam partículas coloidais esféricas, e em comparação a micelas surfactantes (como as micelas de MTF), as MP apresentam menor taxa de hemólise, assim como maior estabilidade cinética (VILLANOVA, et al, 2010). As MP podem ser preparadas a partir de diversos polímeros como o poli (etileno glicol) (PEG) (LEE, 2019), poli (caprolactona) (PCL) (ALAMI-MILANI, 2018), poli (ácido lático) (PLA) (CHO, 2016), dentre outros. Um dos mais comumente utilizados, o Pluronic® F127, consiste em blocos de três copolímeros de PEO-PPO-PEO (poli (óxido de etileno)- poli (óxido de propileno) – poli (óxido de etileno), vide Fig. 2 (VALENZUELA-OSES, et al, 2017).

Figura 2: Fórmula estrutural do Pluronic F127 (PF127) (A) e Representação esquemática da formação de micelas de PF127 (B)



Fonte: AKASH, M. S. H., 2014

As MP constituídas de Pluronic F127 (Poloxamer 407) são comuns na comunidade científica, como por exemplo, para produção de nanocarreadores aquosos com ação anti-*Leishmania*. Neste caso, promovem entrega seletiva do fármaco de interesse, melhorando sua

eficácia e promovendo menos efeitos adversos (OYAMA, J. *et al*, 2019). Ainda, esta estratégia foi usada em outras condições com o objetivo de aumentar a dissolução, sem apresentar interações químicas, de fármacos com baixa solubilidade em água, como os antitumorais Sorafenib (PARK, S. Y, *et al*, 2019), e Tadalafil (VYAS, 2009) e o antifúngico sintético Ciclopirox (TÄUBER, 2015), entre outros.

De acordo com Valenzuela-Oses *et al*, 2017, a MTF ao ser incorporada em micelas poliméricas, passa a ter sua eficiência e segurança melhoradas, tendo em vista que o fármaco encapsulado será impedido de formar agregados micelares, influenciando diretamente nos seus efeitos colaterais, tanto por via oral, quanto parenteral. Corroborando com estes resultados, Feitosa e colaboradores (2019), promoveram a micelização de diferentes compostos (incluindo a MTF) em cinco tipos de Pluronic: L64, L44, F68, F108 e F127. E em todos os casos, o PF127 apresentou maior potencial de proteção contra o efeito de hemólise *in vitro*, apresentado pelo fármaco livre. Baseado nisso, o mesmo grupo promoveu a incorporação de diferentes concentrações de MTF (50-1500 µg/mL) em micelas de Pluronic em concentrações distintas (1%, 3%, 6% e 9%), e concluiu que a melhor formulação (que garante segurança e o maior incorporação em µg da MTF) era a de PF127 3% incorporando 300 µg da MTF.

Deste modo, este projeto demonstra o interesse na utilização de micelas na proporção de PF127 3% incorporando 300µg da MTF, para o tratamento de infecções fúngicas, levando em conta a necessidade emergente do desenvolvimento de entregas de fármacos inovadoras, em especial para os públicos mais vulneráveis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir micelas poliméricas de Pluronic F127 para encapsular o fármaco miltefosina e observar a sua utilização contra infecções fúngicas provocadas por *Candidasp.*

3.2 Objetivos específicos

- Produzir micelas poliméricas de PF127 contendo MTF
- Caracterizar fisicamente o perfil de distribuição de partículas das micelas contendo MTF no Zetasizer Nano ZS90;
- Avaliar o potencial antifúngico das micelas produzidas em diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans* ATCC, *C. glabrata* ATCC, *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* ATCC;
- Avaliar o efeito de interação entre as micelas contendo a MTF, e o fármaco livre com o antifúngico Nistatina padrão para efeito anti-*Candida*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A MTF (*Avanti Polar Lipids – USA*), assim como o PF127 (*BASF – Brasil*), foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, do Laboratório de Nanobiotecnologia (NanoBio), da Universidade de São Paulo.

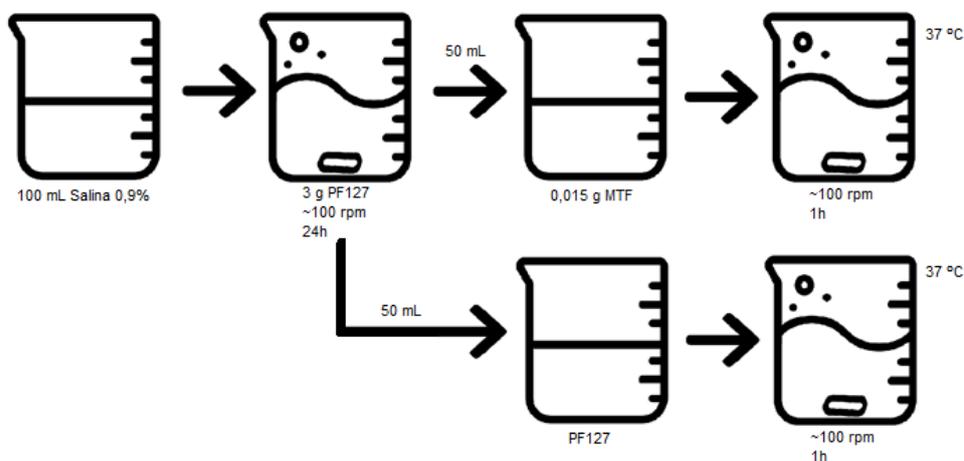
As espécies de *Candida spp.* utilizadas foram: *C. albicans* ATCC, *C. glabrata* ATCC, *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* ATCC.

4.1 Método de Dissolução Direta

As micelas foram preparadas de acordo com o método de dissolução direta, diluindo 3 g de PF127 em 100 mL de salina normal 0,9%, e agitação constante em ~100 rpm por 24h, como pode ser observado na Fig. 3. A solução foi então dividida em alíquotas de 50 mL. Uma alíquota foi utilizada para diluir 0,0153g de MTF, em agitação constante de ~100 rpm por 1h, para formar micelas com o fármaco incorporado. A outra alíquota foi submetida às mesmas condições, para promover a formação de micelas sem o fármaco, as micelas brancas.

A agitação final foi realizada sob aquecimento de 37 °C, em ~100 rpm por 1h, tanto para as micelas contendo a MTF (MM) e micelas brancas (MB), conforme ilustrado na Fig. 3.

Figura 3: Método de Dissolução Direta, PF127 – Pluronic F127, MTF – Miltefosina



Fonte: Autoral.

4.2 Concentração do Fármaco

A concentração molar de MTF nas micelas foi calculada para um volume de 50 mL.

Equação 1: Concentração Molar das MM

$$C = \frac{m}{MM \times V} = \frac{0,0153 \text{ g}}{407,568 \times 0,05 \text{ L}}$$

$$C = \frac{0,0153 \text{ g}}{20,3784 \text{ L}}$$

$$C = 0,000750 \text{ g/L}$$

$$C = \frac{0,000750 \times 1,000,000 \text{ } \mu\text{g}}{1000 \text{ mL}}$$

$$C = 0,750 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

E a concentração molar de MTF foi calculada para um volume de 5 mL, para efeitos comparativos.

Equação 2: Concentração Molar da MTF

$$C = \frac{m}{MM \times V} = \frac{0,0015 \text{ g}}{407,568 \times 0,005 \text{ L}}$$

$$C = \frac{0,0015 \text{ g}}{2,037 \text{ L}}$$

$$C = 0,000736 \text{ g/L}$$

$$C = \frac{0,000736 \times 1,000,000 \text{ } \mu\text{g}}{1000 \text{ mL}}$$

$$C = 0,736 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

4.3 Análise de Tamanho de Partícula

As amostras foram submetidas à análise de tamanho de partícula a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), com o auxílio do Equipamento Zetasizer Nano ZS90 (*Malvern Panalytical*), no Laboratório de Eletroquímica e Corrosão, coordenado pela Prof^ª. Idalina Vieira Aoki, localizado na Universidade de São Paulo – USP.

4.4 Teste de Microdiluição em caldo para *Candida spp*

Os testes de Microdiluição para as espécies de *Candida spp.* foram realizados de acordo com o Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica, da ANVISA (NORMA, 2002).

Para cada espécie de *Candida*, foi utilizada uma placa de 96 poços, contendo 100 µl do meio Sabouraud, e como demonstrado na Figura 4, na primeira linha dos poços H-F, continha 100 µl de uma solução de 5 mL de MB, os poços E-C, continham 100 µl de uma solução de 5 mL de MM, o poço B, continha 100 µl de nistatina. Todos os 7 poços da primeira linha sofreram uma diluição seriada ao decorrer das 12 linhas.

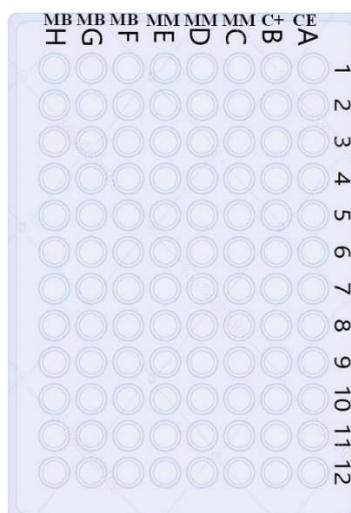
Após a diluição seriada das MB, MM e C+, 100 µl do inóculo de *Candida* foram adicionados em todos os 87 poços.

Os três primeiros poços da linha A serviram de controle de crescimento para as espécies de *Candida*, enquanto os outros 9 serviram como controle de esterilidade.

Também foram feitas microdiluições com 1,5 g de MTF diluída em 5 mL.

A leitura do crescimento microbiano foi realizada a partir da adição de 30 µl de 2, 4, 6-Tricloro- 1, 3, 5- Triazina (TCT) em cada poço.

Figura 4: Desenho da placa de 96



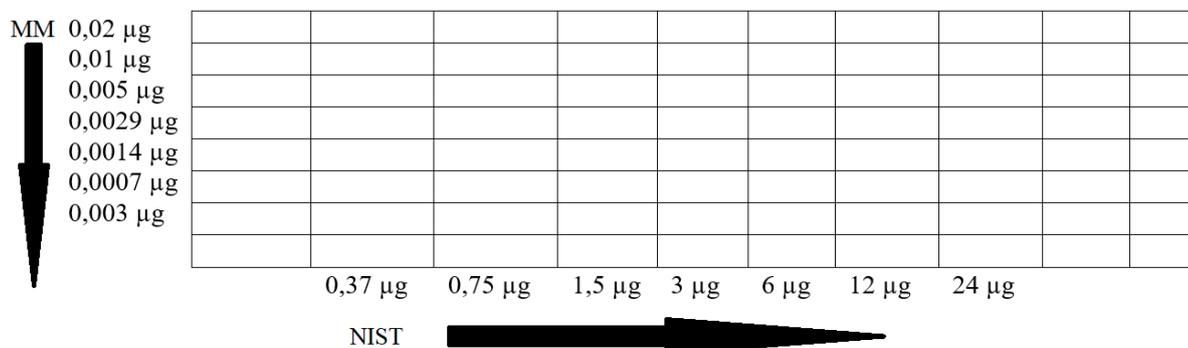
Fonte: DepositPhotos, modificado

4.5 Checkerboard Method

O Método de Checkerboard é um método utilizado para comparar a eficácia de combinações de antimicrobianos variados (ORHAN, 2005). A partir dos resultados obtidos com a microdiluição das MM nas espécies de *Candida*, o desenho da placa para o teste Checkerboard

pôde ser planejado, como mostrado na Fig. 5. Foram preparadas soluções de 6 mL relacionadas à Concentração Inibitória Mínima (CIM) x8, x4, x2, CIM, /2, /4 e /8, em falcons separados, para corretamente serem posicionados na placa.

Figura 5: Desenho da placa do Checkerboard Method



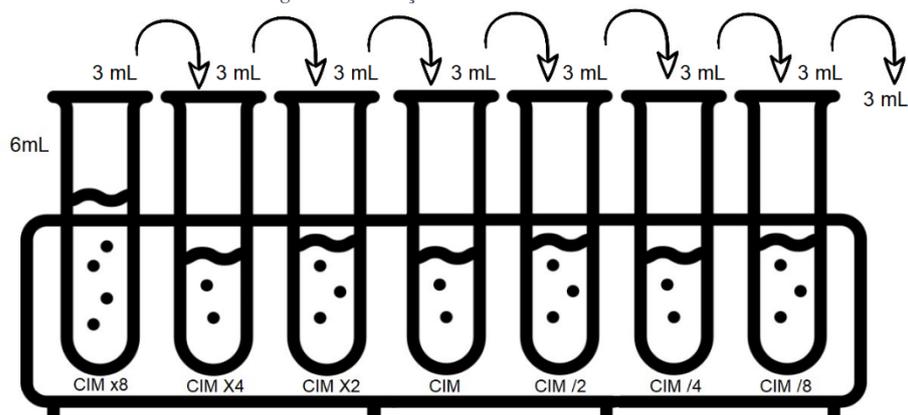
A preparação do inóculo ocorreu 24h antes dos experimentos, e a concentração de unidades formadoras de colônia (UFC), foi ajustado para 10^5 UFC com o auxílio do espectrofotômetro na faixa de 530 nm.

Inicialmente preparamos uma solução mãe contendo o valor máximo das CIM selecionadas (CIM x8) de 6 mL. Para criar a solução das micelas e do fármaco (MTF), retiramos um volume de 640 µL dos 5 mL, e então adicionamos em falcons contendo 5,360 mL de meio Sabouraud. Enquanto para criar a solução da Nistatina, foram retirados 57,6 µL, e adicionados em 5,942 mL de meio Sabouraud. A partir dessas soluções CIM x8, foram realizadas diluições seriadas, a fim de obter as outras concentrações desejadas, como demonstrado na Fig. 6.

A partir destas soluções geradas, foram adicionados 50 µL das MM ou MTF na linha 1, nas colunas A-G, 50 µL de Nistatina nas linhas 2-8 da coluna H e 150 µL de meio nos mesmos poços. Nos demais poços, foram colocados 100 µL de meio, 50 µL das MM ou MTF, e 50 µL da Nistatina (suas respectivas CIM, seguindo o desenho da Figura 5). Após esse processo, foram adicionados 10 µL do inóculo em cada poço, e no controle de crescimento.

A leitura foi realizada cerca de 24h após a inoculação da placa, e esta ficar em repouso na estufa à 35 °C. A leitura, assim como na Microdiluição, foi realizada utilizando o TCT.

Figura 6: Diluições seriadas da CIM



A partir da coloração das placas com o TCT, pôde-se calcular o valor da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) – observada abaixo, e então comparar com a tabela do índice de FIC (EMERYPHARMA).

Equação 3: Concentração Inibitória Fracionada (FIC)

$$\frac{A}{MIC_a} + \frac{B}{MIC_b} = FIC_a + FIC_b = \text{Índice da FIC}$$

Sendo: A – o fármaco de estudo, MIC_a – a concentração inibitória mínima do fármaco A, B – o fármaco de referência, MIC_b – a concentração inibitória mínima do fármaco B.

4.6 Análise de pH

O pH das soluções foi medido com o auxílio do equipamento PH700 Digital, Bench-model da Apera Instruments, em intervalo de 0-60 dias visando avaliar a estabilidade do sistema armazenado em ambiente refrigerado após a suspensão do material liofilizado em soro fisiológico, pH 6,0.

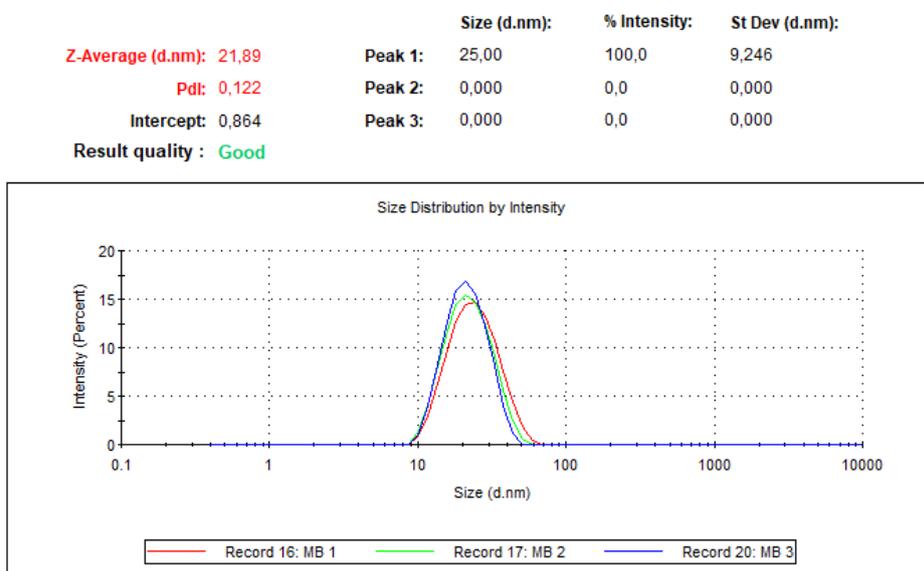
5. RESULTADOS

5.1 Análise de Tamanho de Partícula

A partir de 500 μL da solução coloidal, foram obtidas, em equipamento Zetasizer Nano ZS90, informações acerca do tamanho das partículas por intensidade e o seu índice de polidispersão (Pdi).

Na Fig.7, pode-se observar, que a solução de micelas brancas (MB), apresentou populações com baixa polidispersividade, com um tamanho médio de cerca de $\sim 21,8$ nm.

Figura 7: DLS – MB



Já na Fig.8, pode-se observar um comportamento semelhante às MB, Pdi mais alto, porém ainda com baixa polidispersão de populações, e diminuição no tamanho das micelas para diâmetro médio, aproximado em 20,14 nm.

Visando a padronização do nosso sistema, e a retirada de agregados, foi realizada uma etapa de filtração da solução coloidal em membrana estéril de seringa com poros de 0,22 μm . O resultado pode ser observado na Fig.9.

Figura 8: DLS – MM

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 20,14	Peak 1: 20,08	98,0	5,919
Pdl: 0,208	Peak 2: 5262	2,0	432,9
Intercept: 0,880	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

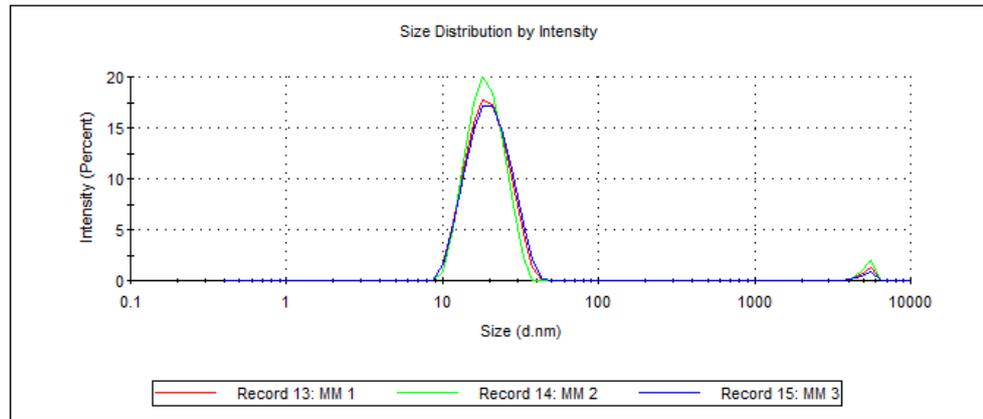
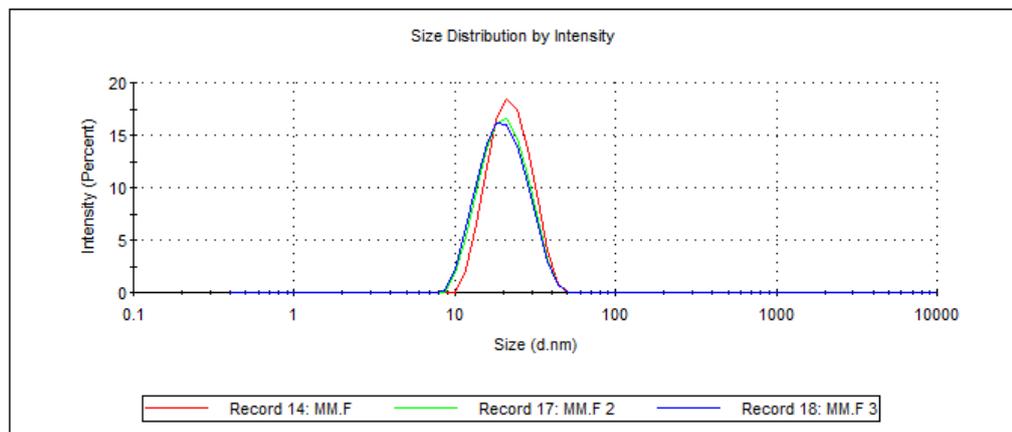


Figura 9: DLS – MM.F

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 21,51	Peak 1: 22,69	100,0	6,648
Pdl: 0,158	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,867	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



Na Fig. 10, pode-se observar o gráfico de correlação, comparando a variação na distribuição do tamanho das partículas, entre a formulação MM e das MM.F, enquanto na Fig. 11 o gráfico de função de correlação entre as formulações MB e MM.

Figura 11: Correlograma, MM e MM.F

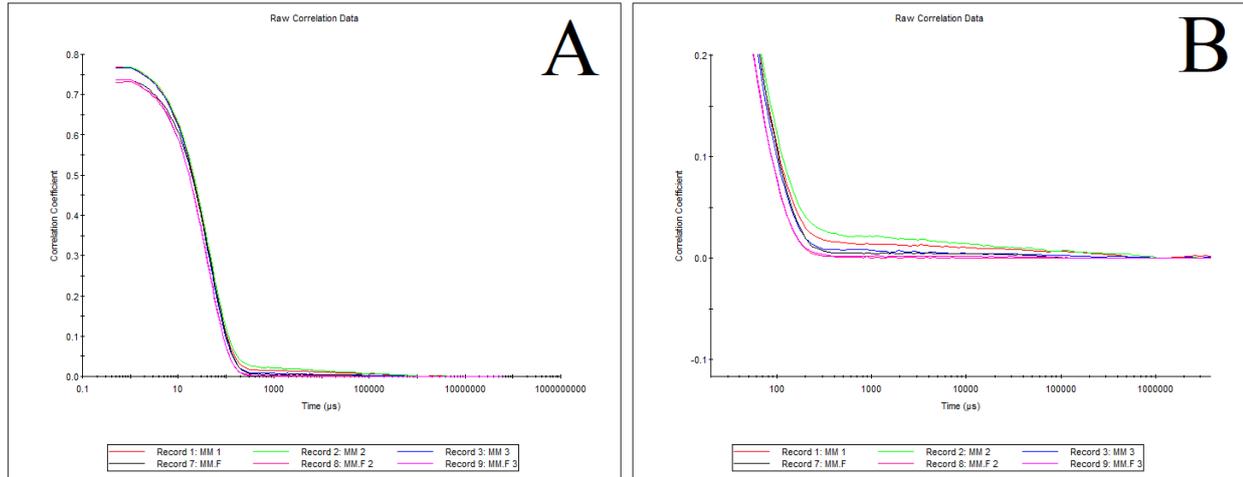
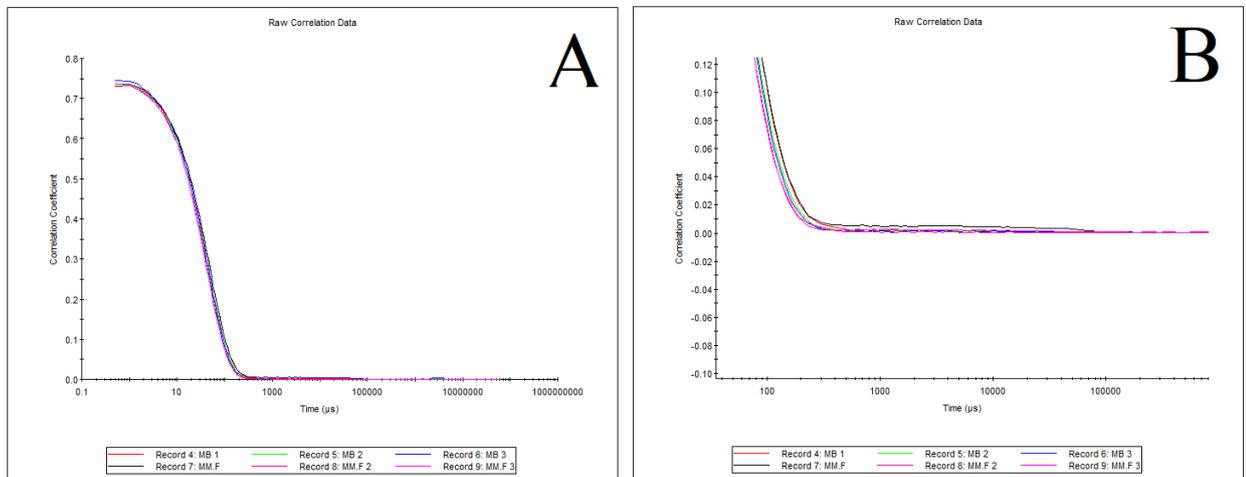


Figura 10: Correlograma, MB e MM.F



5.2 Teste de Microdiluição de *Candida spp*

Após 24h de inoculação, a leitura do crescimento microbiano foi realizada, a partir da adição de 30 μl de TCT e após 3h de incubação pôde-se observar a viabilidade dos fungos.

Como pode ser observado na Fig. 12, em *C. albicans* (A), as MM apresentaram ação até a linha 7. Em *C. glabrata* (B), houve ação das MM até a linha 6, enquanto em *C. tropicalis* as MM apresentaram ação até a linha 8. Além disso, podemos observar que houve viabilidade em todos os poços contendo as MB (F, G, H), demonstrando então que o polímero não apresenta atividade antifúngica, não interferindo então nos resultados demonstrado nos poços contendo as MM. As MM não apresentaram ação em *C. krusei* (D).

Enquanto na Fig. 13, podemos observar que na placa com *C. albicans* X *C. glabrata* (A) em contato com a MTF pura, houve ação do fármaco até a linha 7, em ambos. Enquanto na

placa com *C. tropicalis* X *C. krusei*, houve ação do fármaco até a linha 8 em *C. tropicalis*, e linha 5 em *C. krusei*.

Figura 12: Microdiluição *Candida albicans* (A), *C. glabrata*, (B), *C. tropicalis*, (C) e *C. krusei* (D) MB- Micelas Brancas, MM- Micelas MTF, C+- Controle positivo

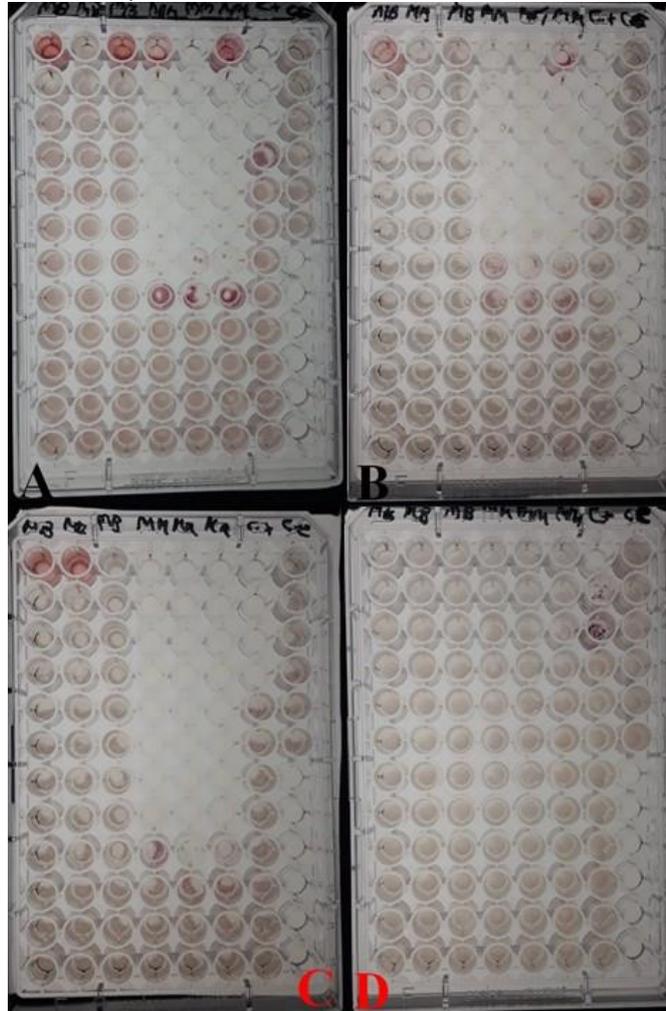
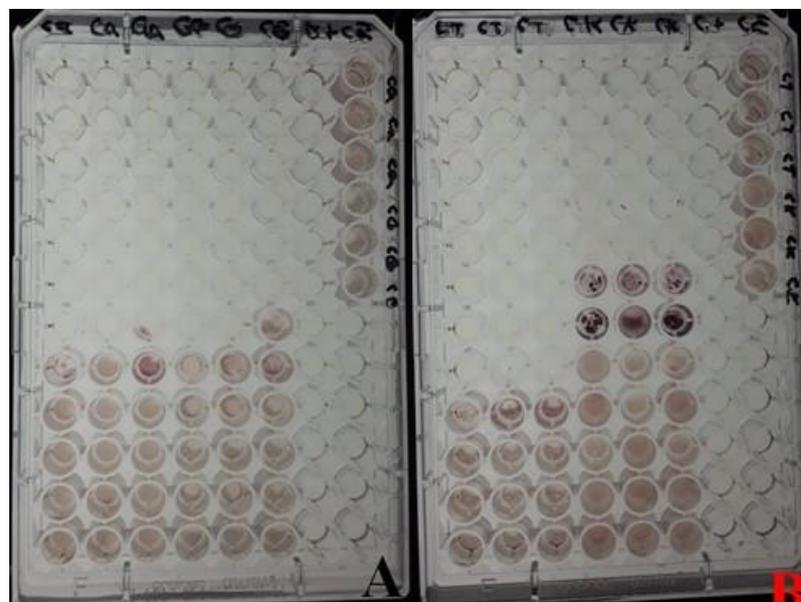


Figura 13: Microdiluição *C. albicans* (H, G, F) x *C. glabrata* (E, D, C), (A), *C. tropicalis* (H, G, F) x *C. krusei* (E, D, C), (B). Ca – *C. albicans*, CG – *C. glabrata*, CT – *C. tropicalis*, CK – *C. krusei* C+- Controle positivo, CE- Controle de esterilidade



A partir destes resultados, pôde-se calcular a concentração da miltefosina e nistatina nos poços referentes à concentração inibitória mínima (CIM), CIM 2x e CIM 4x, em todas as 6 placas, MM e MTF. O resultado pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de CIM – MTF, MM e NIST para espécies de *Candida*

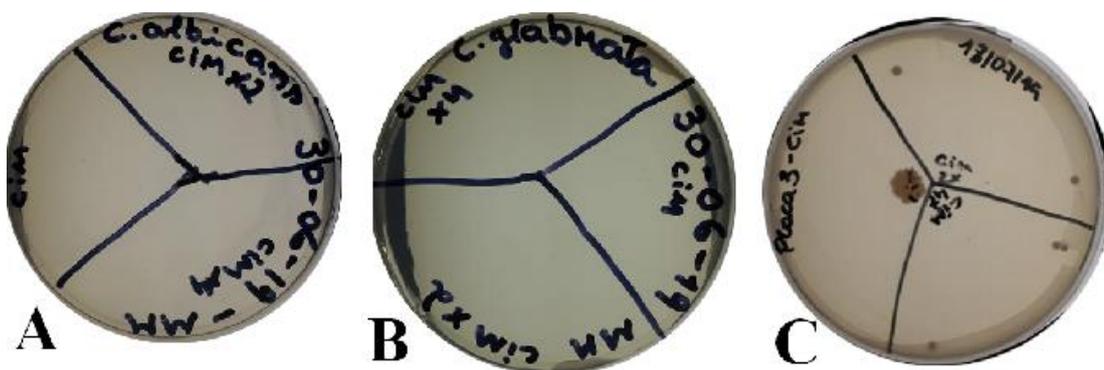
Espécie	CIM			CIM 2x (µg/mL)			CIM 4x (µg/mL)		
	MTF µg/mL	MM µg/mL	NIST mg/mL	MTF µg/mL	MM µg/mL	NIST mg/mL	MTF µg/mL	MM µg/mL	NIST mg/mL
<i>C. albicans</i>	0,0029	0,0029	3	0,0058	0,0058	6	0,011	0,011	12
<i>C. glabrata</i>	0,0029	0,0029	1,5	0,0058	0,0058	3	0,011	0,011	6
<i>C. tropicalis</i>	0,0014	0,0014	1,5	0,0029	0,0029	3	0,0058	0,0058	6
<i>C. krusei</i>	0,011	-	12	0,022	-	24	0,044	-	48

5.3 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

Alíquotas dos poços contendo CIM, CIM 2x e CIM 4x, foram retiradas para analisar a atividade fungicida ou fungioestática das MM.

Como pode ser observado na Figura 13-A e B, a MM em todas as 3 concentrações apresentou um efeito fungicida em *C. albicans* e *C. glabrata*. Enquanto em *C. tropicalis* apenas a CIM obteve um efeito fungicida, enquanto as outras concentrações apenas apresentaram uma atividade fungioestática, como pode ser observado na Figura 13-C.

Figura 14: CIM - MM, *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B) e *C. tropicalis* (C)



Esse padrão também foi observado nas placas contendo às CIM correspondentes à MTF, como pode-se observar na Figura 14.

Figura 15: CIM - MM, *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B) e *C. tropicalis* (C)



5.4 Checkerboard Method

Após 24h de inoculação, a leitura do crescimento microbiano foi realizada, a partir da adição de 30 μ l de TCT e após 3h de incubação pôde-se observar a viabilidade de *Candida albicans*. E como podemos avaliar na Figura 16-A, as MM e a Nistatina apresentaram um efeito de adição em suas respectivas CIM (poços D-5), com uma atividade antifúngica evidenciada, enquanto nas placas de MTF e a Nistatina, nas respectivas CIM (poços D-5), apresentaram um efeito de indiferença, sendo caracterizada pelo crescimento fúngico. (Figura 16-B).

Figura 16: Checkerboard Method de *Candida albicans* - MM (A) e MTF (B)



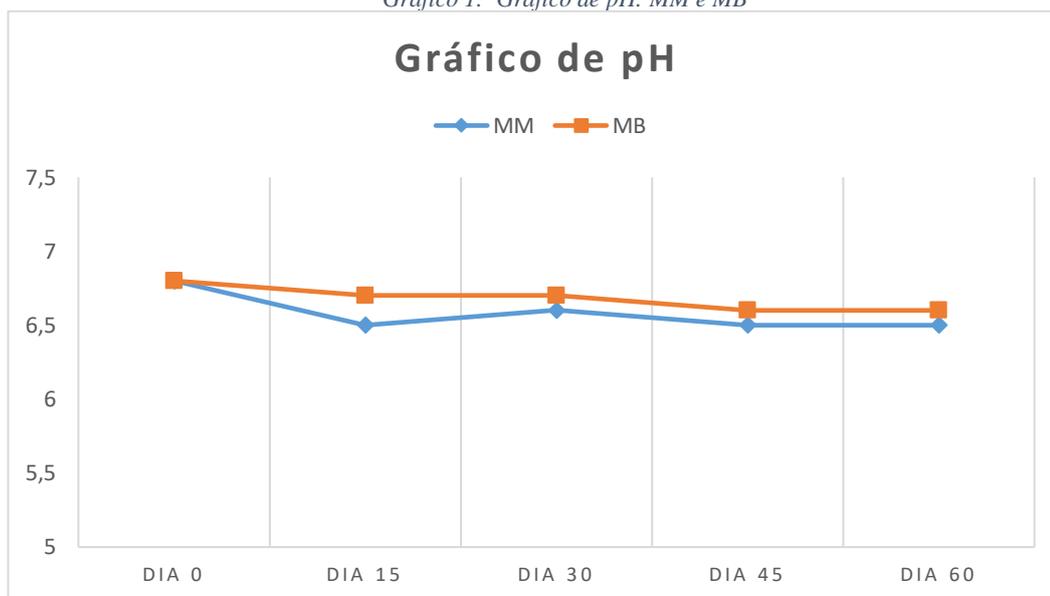
5.5 pH

O pH das soluções coloidais foi aferido em intervalo de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Como pode-se observar no Gráfico 1, no mesmo dia da resuspensão em soro fisiológico, ambas as soluções apresentaram o mesmo valor de pH = 6,8.

Nos dias subsequentes, a alteração do pH das formulações seguiu um mesmo padrão de variação, com pequenas alterações no perfil. Apenas no dia 15 pode-se observar que foi o ponto de diferença do potencial numericamente maior. No dia 15, as MB apresentaram um pH = 6,7, enquanto as MM obtiveram um pH = 6,5.

No dia 15, houve uma diferença de pH de 0,2, no dia 30 de 0,1, no dia 45 de 0,1 e no dia 60 também de 0,1.

Gráfico 1: Gráfico de pH: MM e MB



6. DISCUSSÃO

6.1 Análise de Tamanho de Partícula

O tamanho das micelas foi estabelecido a partir de uma das técnicas de dispersão de luz mais utilizadas no mundo científico: *Dynamic Light Scattering* (DLS), ou Espalhamento de Luz Dinâmico. Essa técnica é não invasiva e bem estabelecida para medição do tamanho e distribuição do tamanho de partículas na escala micro e nanométrica (LSINSTRUMENTS, MALVERN PANALYTICAL).

De forma simples, a amostra é iluminada por um laser e as flutuações da luz difusa são detectadas em um ângulo de espalhamento conhecido, por um detector de fótons rápido. A luz irá ser dispersa de forma distinta para soluções que contenham partículas de tamanhos diferentes, devido ao movimento browniano, e a partir dessas disparidades de intensidade vão

resultar no tamanho de partícula, a partir da relação Stokes-Einstein (LSINSTRUMENTS, MALVERN PANALYTICAL).

Como pode-se observar nas Figuras 7 e 8, houve uma variação de tamanho, de aproximadamente 5 nm entre os tamanhos das partículas contendo ou não o fármaco. Porém, na Figura 9, pode-se observar a existência de populações de partículas que apresentam uma diferença menor, em relação às micelas sem o fármaco (Figura 7), o que é algo observado na literatura (KIM, 2010). Essa variação de tamanho pode depender de diversos fatores, como a concentração do polímero utilizado, como demonstrado no trabalho de Kim et al. (2010) onde a concentração de PF127 foi de 2 g em micelas brancas, e estas apresentaram um diâmetro médio de 22.5 ± 0.8 nm. Enquanto no presente trabalho, a concentração do polímero foi de 3 g, seguindo o trabalho de Feitosa e colaboradores, (2019), e as micelas apresentaram valores entre 16.7-27 nm, e no trabalho de Valenzuela-Oses e colaboradores, (2017), demonstram que a incorporação crescente da MTF nas micelas de PF127, tende a ocorrer uma diminuição no diâmetro das mesmas.

Além disso, fatores como a solução utilizada para a reidratação das micelas, pode interferir diretamente no tamanho das mesmas, variando de 19.4 – 34.2 nm, em micelas de PF127, como demonstrado anteriormente (TIMA *et al*, 2017).

Além disto, a padronização da população das MM com o auxílio da filtração, proporcionou um índice de polidispersão menor. Esse índice representa a média de tamanho das partículas presentes na solução. Ou seja, quanto maior o índice, maior a variação de tamanhos das partículas em suspensão. Desta maneira pode-se deduzir a existência de agregados das partículas (CLAYTON, 2016). Porém, de acordo com Gaspari, 2016, o valor obtido de 0,158 na Figura 9, ainda classifica o presente sistema ainda com populações com baixa polidispersidade.

Ainda pode ser observado na Fig.8, que toda a MTF foi incorporada, visto que não há picos na região abaixo de 10 nm. No trabalho de Valenzuela-Oses e colaboradores, 2017, um pico em ~4,9nm foi observado, e eles estimaram que poderia ser resultado da micelização da MTF pura, devido às suas características químicas. Logo, podemos supor que o pico de 5262 nm, seja resultado das MM agregadas, que foram retiradas do sistema com o auxílio da filtração.

Na Fig. 10, tem-se o correlograma entre as formulações MM e MM.F, e ainda de acordo com Gaspari, 2016, o valor de Pdi será indicado pelo ângulo formado pelo decaimento da linha, e somado a isto, o tempo de decaimento irá informar sobre o diâmetro médio das partículas. A linha de base do gráfico de função de correlação gera informações relativas à presença de partículas maiores e agregados. Sabendo disso, pode-se observar no eixo x da Fig. 10-A, e mais

próximo na Fig. 10-B, a presença de pequenas oscilações, que representam as possíveis partículas aglomeradas, seja de MM, ou apenas de micelas de PF127. E podemos comparar o eixo das abscissas entre as Fig. 10-B e 11-B, e observar que houve a retirada destes agregados e micelas de maior diâmetro, após a filtração. Além disso, observa-se a partir da comparação entre ambas as Fig. 10-A e 11-A, a maior semelhança entre as MM.F e as MB.

Esta formulação no trabalho de Feitosa *et al*, 2019, apresentou uma melhora significativa em relação a diminuição do efeito hemolítico da MTF, contudo, são necessários testes de hemólise com as MM produzidas neste trabalho, para confirmar a segurança da formulação.

6.2 Avaliação da atividade fúngica

A ação antifúngica da MTF, assim como as interações celulares que conferem suas características antitumorais e leishmanicidas, não é completamente elucidada na literatura. Porém, a partir de estudos como os de Malta de Sá, 2015, e interações químicas, pode-se teorizar as interações da MTF com os fungos.

De acordo com a Fig.1 pode-se observar as características químicas do fármaco, que o identifica como uma substância majoritariamente apolar, e conseqüentemente mais bem retido em membranas lipídicas. Outro fator que indica essa maior absorção, é o valor da área de superfície polar (ASP), onde substâncias que apresentam esse valor de 60 \AA^2 ou menos, são completamente absorvidos (PAJOUHESH, 2005), e a ASP da MTF é de $73,5 \text{ \AA}^2$ (GÓMES-SERRANILLOS, 2004). Logo, apesar de ser pouco solúvel em solventes aquosos, há uma excelente captação do fármaco por membranas lipídicas, por suas interações apolares.

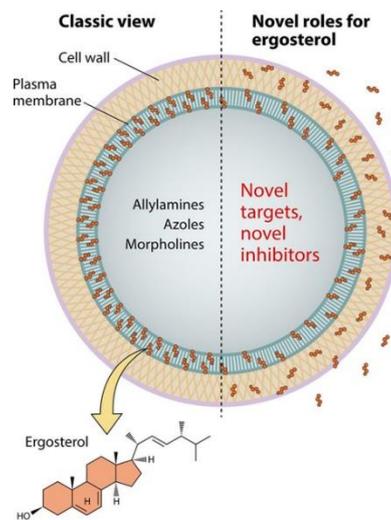
Visando compreender melhor essa interação entre a MTF e membranas lipídicas, Malta de Sá e colaboradores, 2015, produziram bicamadas lipídicas com diferentes graus de insaturação. A simulação demonstrou que o fármaco realmente interage com as balsas lipídicas, apresenta uma maior permeabilidade em camadas polinsaturadas, bicamadas fracamente organizadas, e tem maiores taxas de flip-flop em regiões específicas de membranas.

As membranas celulares dos eucariotos apresentam uma composição similar em sua estrutura básica, diferenciando-se apenas nos tipos de proteínas, carboidratos e lipídios. Nestes, existem diversas classificações, e entre elas, há os esteróis. No caso de células animais, o colesterol é o esteroide abundante, enquanto em *Candida spp*, assim como boa parte dos fungos, estes são compostos pelo ergosterol, como observado na Fig. 17. Esse lipídio confere

características que permitem a variação da permeabilidade e fluidez da membrana, sendo então um excelente alvo para diversos antifúngicos, como os antifúngicos azólicos (TORTORA, 2012; RODRIGUES, 2018).

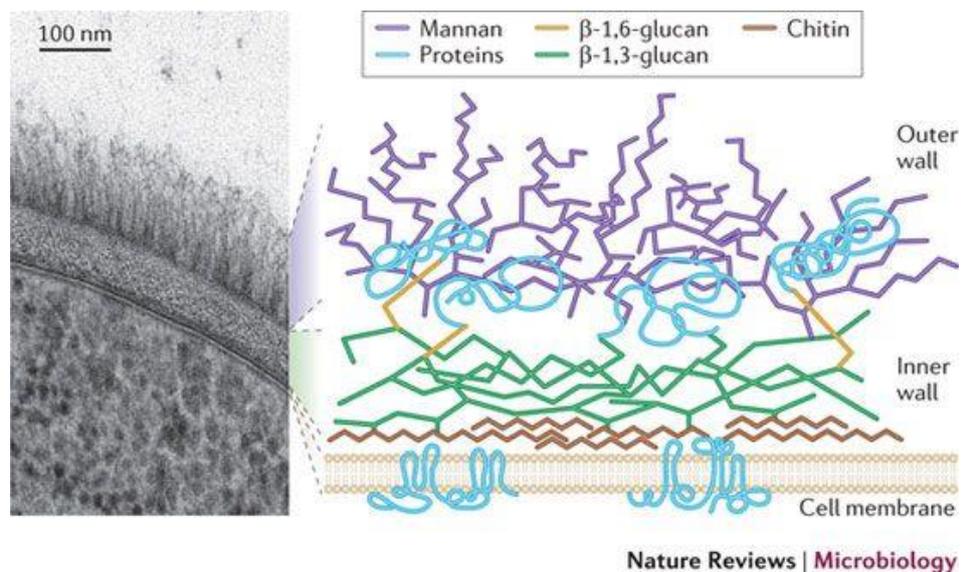
Apesar das células eucarióticas apresentarem essas semelhanças, os fungos apresentam uma parede celular composta de quitina, que é um misto de unidades de N-acetilglicosamina (NAG), mananas, β -glucanos e proteínas, como pode-se observar na Fig. 18. (TORTORA, 2012; GOW, 2012).

Figura 17: Representação da Parede e Membrana Celular em uma célula fúngica



Fonte: RODRIGUES, 2018

Figura 18: Representação da parede celular de *Candida albicans*



Fonte: GOW, 2012

Além da semelhança estrutural, em relação aos esteróis, assim como outros organismos eucarióticos, espécies de *Candida* apresentam fosfolipase C, porém, que confere a manutenção e a integridade da parede celular (ARAKAWA, 2009).

A partir da compreensão da estruturação das células fúngicas, pode-se supor e compreender o funcionamento da MTF e das MM para com elas. De acordo com os dados numéricos obtidos na Tabela 1, pode-se afirmar, com o auxílio gráfico das Figs. 14 e 15, a eficiência fungicida, em células planctônicas de *Candida albicans* e *glabrata*, e fungióstática em *C. tropicalis* da MTF ao ser encapsulada na mesma concentração do fármaco livre.

Visualmente, com o auxílio das Figs. 14-C e 15-C, observa-se que a incorporação da MTF nas micelas obteve uma atividade mais intensa contra *C. tropicalis*. Porém, a eficiência da MTF foi prejudicada ao ser incorporada nas micelas em testes com *C. krusei*, não apresentando atividade nas mesmas concentrações do fármaco livre no intervalo de 24h (como podemos observar nas Figs. 12-D e 13-B).

Em relação, a atividade positiva em *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, a MTF pura, por sua estrutura molecular, consegue se difundir mais facilmente pela parede celular dos fungos, em especial pelo tamanho de sua cadeia, sendo uma molécula pequena. A parede celular de *C. albicans* é composta por 5 camadas envolvendo açúcares, proteínas e polissacarídeos (Fig. 18). Sendo então possível se questionar, sobre como as MM em escala nanométrica (tamanho 2x maior que o tamanho molecular) conseguiram penetrar tal parede, aparentemente, densa. De acordo com De Souza Pereira e Geibel, 1999, a parede celular fúngica de leveduras apresenta poros de diâmetro entre 200 – 400 nm, em situações normais e de estresse, respectivamente, e essa informação também foi relatada anos antes, em 1990, por De Nobel e Barnett. Logo, apesar de apresentarem estruturas complexas em sua composição, as paredes celulares vão apresentar poros grandes o suficiente para a entrada das micelas carreando o fármaco, e então promover uma liberação controlada mais específica. Apesar de, neste trabalho, em *C. albicans* e *C. glabrata*, as MM não apresentarem uma melhor biodisponibilidade no sítio-específico da MTF, em relação ao fármaco puro, são necessárias mais avaliações, em especial a longo prazo das MM, visto que a liberação em 24h pode não ter sido o suficiente para atingir o efeito fungicida. Se, em estudos futuros, essa capacidade for melhorada, assim como em *C. tropicalis*, o tratamento, seja via oral ou parenteral das MM será bem mais proveitoso para o paciente, tendo em vista a eficiência à longo prazo, a manutenção da dose eficaz do fármaco, e um medicamento mais seguro.

A segurança do tratamento com as MM, em relação a utilização do fármaco puro, é demonstrada por Feitosa e colaboradores, 2019, onde o grupo, demonstrou que quanto maior a

concentração de PF127, mais eficiente será a administração da MTF com um efeito colateral hemolítico mínimo. O fármaco livre causa hemólise numa concentração de 20-25 µg/mL, enquanto a MTF nas MM, a concentração de MTF pode ser trinta (30) vezes aumentada, até aproximadamente 600 µg/mL, reduzindo significativamente esse quadro de hemólise, trazendo então essa como uma alternativa para administração parenteral da MTF. A maior concentração do polímero sem causar hemólise encontrada por eles, foi a formulação de proporção 3% de PF127, que consegue carrear no máximo 300 µg/mL da MTF, que é a formulação utilizada no presente trabalho. Porém, para confirmar a total eficácia do tratamento, são necessários estudos complementares, como de citotoxicidade, além dos ensaios *in vivo*.

Em relação, à pouca eficiência das MM em *C. krusei*, pode-se pautar que são comuns os relatos na literatura onde o tratamento de antifúngicos de referência como anfotericina B e fluconazol, apresentam uma eficácia reduzida nesta espécie em comparação à outras *Candida spp.*. Dados de 1991-1998, em pacientes que tinham ou tiveram câncer, transplante de medula óssea e com problemas hematológicos, apresentam uma maior predisposição a serem infectados pelas espécies de *Candida não-albicans*. Essas espécies foram responsáveis por 35-65% dos casos de candidemia, sendo *C. krusei* presente em 10-35% dos casos. Apesar de espécies como *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentarem uma taxa de mortalidade maior, assim como a *C. albicans*, *C. krusei* apresenta uma taxa de mortalidade semelhante à de *C. albicans*, de 20-40%, e é uma proporção elevada (KRCMERY, 2002). *C. krusei* é relatada em infecções sérias em pacientes imunocomprometidos, em especial com aqueles que recebem profilaxia com antifúngicos azólicos. Em algumas espécies resistentes à AnfB, a formulação em lipossomas, que continham uma dose maior do fármaco normalmente utilizado, também não demonstrou uma alteração significativa em relação à dose usual de AnfB pura a longo prazo, porém apresentou uma redução ao ataque fúngico aos rins dos animais infectados (KARYOTAKIS, 1994).

Essa maior resistência a tratamentos antifúngicos, pode ser bem observada em isolados clínicos de *Candida krusei*, em comparação à outras espécies do gênero (Tabela 2).

Tabela 2: Susceptibilidade a antifúngicos em isolados de *Candida*

	AMB		5FC		FLU		ITR		POS		VOR		AFG		CFG		MFG	
	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%
<i>C. albicans</i> (733)	0.06	0.25	0.13	1	0.25	2	0.06	0.5	0.03	0.13	0.03	0.06	0.03	0.03	0.5	0.5	0.03	0.03
<i>C. glabrata</i> (458)	0.13	0.5	0.13	0.13	8	32	1	4	1	2	0.25	1	0.03	0.13	0.5	1	0.03	0.06
<i>C. parapsilosis</i> (391)	0.13	0.5	0.13	0.13	1	2	0.13	0.25	0.03	0.13	0.03	0.06	2	2	2	2	1	2
<i>C. tropicalis</i> (307)	0.13	0.5	0.13	0.5	0.5	16	0.13	1	0.06	1	0.06	2	0.03	0.13	0.5	1	0.03	0.06
<i>C. krusei</i> (50)	0.25	0.5	4	32	32	>64	0.5	1	0.25	0.5	0.5	1	0.06	0.13	1	2	0.13	0.25
<i>C. lusitanae</i> (20)	0.13	0.5	0.13	0.13	0.5	2	0.06	0.25	0.03	0.13	0.03	0.06	0.06	0.25	1	2	0.06	2
<i>C. dubliniensis</i> (18)	0.03	0.13	0.13	0.13	0.13	0.5	0.03	0.06	0.03	0.06	0.03	0.03	0.03	0.06	0.5	0.5	0.03	0.03

Fonte: Ostrosky-Zeichner, 2003

No trabalho de Ostrosky-Zeichner, 2003, pode-se observar uma maior tendência de *C. krusei*, seguida por *C. glabrata*, em desenvolver uma resistência aos antifúngicos em relação às outras espécies. Porém, isso não ocorre apenas com antifúngicos azólicos e poliênicos. Existem relatos de linhagens de *C. krusei* resistentes à equinocandinas (KAHN, 2007). A susceptibilidade reduzida a estes antifúngicos está diretamente relacionada com mutações e a consequente adaptação das espécies.

Com base nos estudos de Vila *et al*, 2015, a partir de experimentos de passagem em série, foi visto que a MTF apresenta um potencial reduzido para indução de resistência em *C. albicans*. Apesar de, ainda, não existirem relatos na literatura em relação à *C. krusei*, a eficiência reduzida do fármaco puro, em relação às outras espécies, induz a teorizar que a resistência demonstrada pela espécie, provavelmente é derivado de outro fator, além da resistência ocasionada pela mutação genética. É importante lembrar que o mecanismo de ação da MTF está relacionado a interações com a membrana celular, e há relatos na literatura, que a parede celular de *C. krusei*, apresenta uma ultraestrutura, totalizando cerca de 6 camadas. Ainda no estudo de Samaranayake, 1994, pode-se citar:

A parede celular multicamadas consistia em: uma camada externa irregular de material floculento, uma zona eletrodensa, uma camada granulosa, uma camada menos granulosa, uma camada fina de grânulos densos e outra camada com grânulos mais esparsos fora da membrana celular trilaminar. A camada externa de material floculento, aparece em abundância em alguns isolados como extensões extracelulares que ligam as células individuais, especialmente durante o crescimento de colônias em meios sólidos (tradução nossa).

Logo, pode-se observar que até alcançar à membrana celular, há um certo impedimento físico, visto a abundância de material floculento, grânulos e da zona eletrodensa. Levando isso em consideração, a MTF pura, se encontra num tamanho molecular, tornando mais fácil penetrar a sêxtupla camada da *C. krusei*, do que as MM, que se encontram numa escala nanométrica. São necessários mais estudos que elucidem a complexa parede celular de *C. krusei*, para que seja possível compreender a – aparente, perda de eficiência dos fármacos ao serem encapsulados em sistemas lipídicos contra a espécie. Somado a isso, também são necessários estudos sobre o potencial zeta das micelas, para uma melhor compreensão desta realidade, visto que a polarização das micelas pode influenciar diretamente na não captação delas pelo organismo vivo.

Apesar da comprovação da eficiência relativa à segurança das MM no trabalho de Feitosa *et al*, 2019, e da eficácia da MTF em *Candida spp.* como citado anteriormente, não existem relatos na literatura em relação à utilização de micelas poliméricas de Pluronic F127 contendo a miltefosina para ação contra fungos.

Em uma formulação de 1% de PF127, é capaz de incorporar cerca de 100 µg, da MTF, com estimativa de que haja cerca de 28 moléculas da MTF por MM. Seguindo este raciocínio, a formulação utilizada neste trabalho, foi de 3% de PF127, para 300 µg da MTF, e supondo que as micelas incorporaram toda a MTF, tendo em vista que nestas concentrações houve uma ação hemolítica bem abaixo de 12,5%, há cerca de 84 moléculas da MTF por MM.

6.3 Checkerboard Method

Como citado anteriormente, de acordo com Orhan *et al*, 2005, o método de Checkerboard é utilizado para comparar a eficácia de combinações de antimicrobianos variados, a partir de testes de sinergia. A avaliação simultânea de fármacos ou entre fármacos e compostos bioativos extraídos de diversas fontes é relatada na literatura, em especial, a atividade em bactérias do gênero *Brucella*, e fungos de diversos gêneros, incluindo o *Candida spp.* (Jackson *et al*, 2009; Sharifzadeh *et al*, 2017).

Os resultados obtidos com este método, permite uma análise ampla em relação ao impacto da combinação de dois produtos (fármaco de escolha e sistema de delivery proposto/fármaco teste), em relação à suas atividades individuais. Essa análise foi quantificada a partir do valor da Concentração Inibitória Fracionada (FIC), obtida a partir da Equação 3. Como podemos observar na Fig. 16, o evento de adição, ocorreu na placa contendo as MM e a

nistatina, no poço correspondente ao CIM dos dois fármacos. Como pode-se observar na Equação 4, com os respectivos valores de CIM, nós temos a comprovação do efeito de adição ou indiferença, como pode-se comprovar na Tabela 3, abaixo.

Equação 4: FIC das MM e da MTF

$$\frac{0,029}{0,029} + \frac{3}{3} = 1 + 1 = 2$$

O FIC das duas substâncias resultou no número 2, indicando efeito de adição ou indiferença, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: índice da FIC

	FIC value
Synergy	<0.5
Antagonism	>4
Additive or indifference	0.5-4

Fonte: EMERYPHARMA

Porém, podemos afirmar visualmente na Fig. 16-A, que no caso das MM, o efeito foi de adição, tendo em vista que os valores de CIM de ambas as substâncias não apresentaram atividade antifúngica sozinhas, mas sim em conjunto, no poço D5. E isso já não é observado na Fig. 16-B, onde assim como nos respectivos valores de CIM, o poço D5, apresentou crescimento fúngico. O teste foi realizado em triplicata, e esse comportamento foi observado em todas as placas. Não podemos afirmar a ação sinérgica, de adição ou indiferença, ou antagonismo nos poços F5 e G5 da Fig. 16-A, tendo em vista que os resultados na triplicata foram distintos.

Contudo, é importante ressaltar que nestes experimentos, tanto as micelas quanto a miltefosina, foram resuspenas em 5 mL de caldo Sabouraud, diferentemente da resuspensão realizada nos testes de microdiluição, tornando então o ambiente, na placa, mais diluído. Somado a isto, as MM suspensas em meio Sabouraud, apresentaram no dia 0 um pH = 5,8, ou seja, a solução um pouco mais ácida e um ambiente mais rico em peptonas e dextrose para os fungos, um ambiente que apresenta condições mais ideais para o crescimento deles. Esses

fatores podem explicar o crescimento nas placas nos valores de CIM das MM e da MTF, (Fig. 16).

6.4 pH

De acordo com Schaffazick *et al*, 2003, as caracterizações físico-químicas das suspensões coloidais de nanopartículas, apresenta dificuldades técnicas, sendo necessário então de diversas análises:

A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho de partícula, a distribuição de massa molar do polímero, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento.

O presente estudo apresenta apenas a primeira parte destas avaliações, devendo ser então complementado posteriormente.

O aferimento do pH é utilizado para fornecer informações relacionadas a alterações químicas na suspensão. Na literatura, há um grande volume de informações relacionadas a análises de pH sobre nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões, porém um número limitado em relação a micelas. Poderão ser realizadas algumas associações entre os resultados obtidos neste trabalho e os presentes na literatura.

A partir dos dados obtidos do Gráfico 1, observa-se que no Dia 0, o pH de ambas as soluções, apresentaram o mesmo valor de $\text{pH} = 6,8$. A partir deste dado, pode-se afirmar que boa parte da MTF utilizada para produção das micelas foi incorporada pelas micelas em si – sendo um resultado congruente com o resultado obtido pela análise de tamanho de partícula discutido no tópico 6.1, tendo em vista que se o fármaco estivesse presente em quantidades relevantes fora das micelas, o pH tenderia a se alterar. O pH da solução apresentaria uma alteração mais significativa levando em consideração que o pK_a da MTF é de ~ 2 (DORLO, 2012), sendo caracterizado então como um ácido moderado.

As micelas ao decorrer do tempo, e sob refrigeração podem tanto se agregar e formar aglomerados, quanto sofrer degeneração, (Fig. 2). Pelo maior pico de diferença de pH se dar apenas no dia 15, e nos outros, a diferença entre os pontos das MB e das MM, sugere que a MTF não interage com o polímero, não modifica suas propriedades estruturais com afinco. Se isso ocorresse, haveria uma mudança conformacional entre as moléculas, formando um novo

produto, e conseqüentemente uma alteração mais significativa surgiria no Gráfico 1. Porém nos dias 30 e 45, a diferença de valores de pH, de MB e MM, é de 0,1.

De acordo com o gráfico, no dia 0, na solução das MM, o pH igual ao da solução das MB, indica a inexistência de MTF no exterior das micelas, indicando uma estabilidade na estrutura micelar após o processo de liofilização, e resuspensão no soro para vacina. No dia 15, foi observada a diferença de 0,2 no pH, o que sugere a liberação ao decorrer do tempo do fármaco no meio. Nos dias subseqüentes, 30, 45 e 60, houve uma redução similar no valor do pH das duas soluções, com diferença mínima de 0,1. Provavelmente, houve uma estabilização na solução, onde a MTF se agregou em micelas distintas, enquanto o polímero continuou o seu ritmo de degradação ou agregação natural.

7. CONCLUSÃO

As infecções derivadas dos fungos do gênero *Candida* são recorrentes num cenário mundial, e a necessidade de novas substâncias antifúngicas é crescente, em especial devido ao desenvolvimento de resistência pelos mesmos, aos fármacos já utilizados corriqueiramente. A miltefosina, apresenta um potencial antifúngico, contudo, seus efeitos colaterais tornam sua utilização em pacientes em estado vulnerável – como os indivíduos com AIDS e fibrose cística, inviável. A partir disso, os sistemas de liberação de fármacos, constituídos de nanocarreadores visam resolver esta problemática, a partir da entrega da substância em seu sítio-alvo, aumentando a segurança e eficácia do tratamento. As micelas poliméricas, são SLF's amplamente utilizados, e pesquisados, justamente pela promoção do aumento da eficiência do tratamento.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a MTF encapsulada em micelas de PF127, apresentam a atividade antifúngica do fármaco mantida, sem a interferência do polímero, em pelo menos três das quatro espécies estudadas, num período de 24h. A partir disso, pode-se inferir que as MM apresentam um grande potencial para serem utilizadas clinicamente para tratar infecções por *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. E apesar desta eficiência não ter sido demonstrada em 24h em *C. krusei*, são necessários estudos posteriores em intervalos de tempo maiores, para avaliar se a liberação do fármaco a longo prazo pode ser realmente considerada como ineficaz nesta espécie.

Somado a isto, o tratamento das micelas contendo a miltefosina, em conjunto com a nistatina, apresentaram um efeito de adição, que não foi demonstrado utilizando-se apenas o fármaco, sendo então mais uma vantagem em relação ao tratamento clínico contra *Candida albicans*. Essa utilização conjunta apresentou um efeito antifúngico mais promissor em relação a utilização das duas substâncias sozinhas, na concentração inibitória mínima de ambos.

Contudo, são necessários estudos posteriores para avaliar a segurança do tratamento, a partir de ensaios de citotoxicidade, *in vivo*, além do monitoramento da cinética de liberação do fármaco com o decorrer dos dias. Em relação à estruturação das nanopartículas, são necessários estudos para melhor caracterização e compreensão do comportamento das micelas, como ensaios de DSC, TGA, FTIR e DRX.

REFERÊNCIAS

ALAMI-MILANI, M.; ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H.; SALEHI, R.; JELVEHGARI, M. **Preparation and evaluation of PCL-PEG-PCL micelles as potential nanocarriers for ocular delivery of dexamethasone.** Iranian journal of basic medical sciences, 21: 153, 2018;

ALONSO, L.; CARDOSO, É. J. S.; MENDANHA, S. A.; ALONSO, A. **Interactions of miltefosine with erythrocyte membrane proteins compared to those of ionic surfactants.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 180:23-30, 2019;

ALVES, P. G. V. **Epidemiologia de infecção por Candida spp. relacionada a corrente sanguínea, ocorridas no Hospital de Clínicas de Uberlândia,** 2018;

ARAKAWA, J. A. R. **Fosfolipase C e sua interação com a fonte de carbono, cálcio, PKC e o ciclo de divisão celular em *Aspergillus nidulans*,** Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2009;

BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. **Fluconazole resistance in Candida species: a current perspective.** Infection and drug resistance, 10: 237, 2017;

BIZERRA, A.; SILVA, V. **Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações.** Revista Saúde e Meio Ambiente, 3: 1-12, 2016;

BRACHWITZ, H.; VOLLGRAF, C. **Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells.** Pharmacology & therapeutics, 66: 39-82, 1995;

BUCHWALD, H.; O'DEA, T. J.; MENCHACA, H. J.; MICHALEK, V. N.; ROHDE, T. D. **Effect of plasma cholesterol on red blood cell oxygen transport.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 27: 951-955, 2000;

CABRINI, F. M. **Hidrogéis de poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) modificados com Pluronic F127 para liberação tópica de óxido nítrico,** 2018;

CDC. **Invasive candidiasis statistics.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/statistics.html>, Acesso em: 05/08/2019;

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M. A. **Micelles and Nanoemulsions.** Nanocosmetics 47-72. Springer, Cham, 2019;

CHO, H.; GAO, J.; KWON, G. S. **PEG-b-PLA micelles and PLGA-b-PEG-b-PLGA sol-gels for drug delivery**. *Journal of Controlled Release*, 240: 191-201, 2016;

CLAYTON, K. N.; SALAMEH, J. W.; WERELEY, S. T.; KINZER-URSEM, T. L. **Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry**. *Biomicrofluidics*, 10: 054107, 2016;

DE NOBEL, J. G.; BARNETT, J. A. **Passage of molecules through yeast cell walls: A brief essay-review**. *Yeast*, 7: 313-323, 1991;

DE SOUZA PEREIRA, R.; GEIBEL, J. **Direct observation of oxidative stress on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* strains with atomic force microscopy**. *Molecular and cellular biochemistry*, 201: 17-24, 1999;

DIAMOND, R. D.; KRZESICKI, R.; JAO, W. **Damage to pseudohyphal forms of *Candida albicans* by neutrophils in the absence of serum in vitro**. *The Journal of clinical investigation*, 61: 349-359, 1978;

DONGARI-BAGTZOGLU, A.; DWIVEDI, P.; IOANNIDOU, E.; SHAQMAN, M.; HULL, D.; BURLESON, J. **Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients**. *Oral microbiology and immunology*, 24: 249-254, 2009;

DORLO, T. P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P. J. **Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 2576-2597, 2012;

FEITOSA, V. A.; DE ALMEIDA, V. C.; MALHEIROS, B.; DE CASTRO, R. D.; BARBOSA, L. R. S.; CERIZE, N. N. P.; DE OLIVEIRA RANGEL-YAGUI, C. **Polymeric micelles of pluronic F127 reduce hemolytic potential of amphiphilic drugs**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 180: 177-185, 2019;

FERNANDES, K. D. S. **Estudo das interações da miltefosina com membranas de *L.(Leishmania) amazonensis* e macrófagos peritoneais**, 2016;

FERNANDEZ, J. **Abordagem ao paciente com suspeita de imunodeficiência**. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/imunologia-dist%C3%BArbios-al%C3%A9rgicos/imunodefici%C3%Aancias/abordagem-ao-paciente-com-suspeita-de-imunodefici%C3%Aancia>, Acesso em: 05/08/2019;

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. **Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 25: 1-9, 2015;

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. **Lipid peroxidation in cell death**. *Biochemical and biophysical research communications*, 482: 419-425, 2017;

GASPARI, M. D. P. **Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic light scattering – DLS), Espectroscopia de Correlação de Fótons (Photon correlation spectroscopy PCS)**. 2016. 62 slides. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1950665/mod_resource/content/0/Aula%203%20-DLS.pdf. Acesso em: 23/05/2019;

GÓMEZ-SERRANILLOS, I. R.; MIÑONES JR, J.; DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P.; IRIBARNEGARAY, E.; CASAS, M. **Study of the π -A isotherms of miltefosine monolayers spread at the air/water interface**. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6: 1580-1586, 2004;

GOW, N. A.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J.; NETEA, M. G. **Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization**. *Nature reviews microbiology*, 10: 112, 2012;

HEMSLEY, C.; KIBBLER, C. **Fungal infections**. In **Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice**. Churchill Livingstone, 437-452, 2009;

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; NWOKE, V. **In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and Euphorbia hirta leaf extract against Candida albicans by the checkerboard method**. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 666-669, 2009;

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; *et al.* **Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis**. *New England Journal of Medicine*, 341:1795-1800, 1999;

JONES, M.-C.; LEROUX, J.-C. **Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 48: 101-111, 1999;

KAHN, J. N.; GARCIA-EFFRON, G.; HSU, M. J.; PARK, S.; MARR, K. A.; PERLIN, D. S. **Acquired echinocandin resistance in a Candida krusei isolate due to modification of glucan synthase**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51: 1876-1878, 2007;

KARYOTAKIS, N. C.; ANAISSIE, E. J. **Efficacy of escalating doses of liposomal amphotericin B (AmBisome) against hematogenous *Candida lusitanae* and *Candida krusei* infection in neutropenic mice.** Antimicrobial agents and chemotherapy, 38: 2660-2662, 1994;

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; KELLY, D. E.; MANNING, N. J.; LOEFFLER, J.; HEBART, H.; EINSELE, H. **Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta 5$, 6-desaturation.** FEBS letters, 400: 80-82, 1997;

KIM, T. H.; CHEN, Y.; MOUNT, C. W.; GOMBOTZ, W. R.; LI, X.; PUN, S. H. **Evaluation of temperature-sensitive, indocyanine green-encapsulating micelles for noninvasive near-infrared tumor imaging.** Pharmaceutical research, 27: 1900-1913, 2010;

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. ***Candida* infections of medical devices.** Clinical microbiology reviews, 17: 255-267, 2004;

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

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. **Invasive candidiasis.** New England Journal of Medicine, 373: 1445-1456, 2015;

LEE, J. H.; MATSUMOTO, H.; FUJII, S.; TAKAHASHI, R.; SAKURAI, K. **Monodisperse micelles composed of poly (ethylene glycol) attached surfactants: Platonic nature in a macromolecular aggregate.** Soft matter, 2019;

LOIOLA, D. M. L. **Copolímeros anfífilicos em bloco: síntese, caracterização e aplicação em biomateriais,** 2017;

LORENZANI, S.S; ***Candida: Uma Doença do Século XX.*** São Paulo, Ground, 1986;

LSINSTRUMENTS. **Dynamic Light Scattering.** Disponível em: <https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls>. Acesso em: 01 de Julho de 2019;

LUCKEY, M. **Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations.** Cambridge University Press, 2014;

MALTA DE SÁ, M.; SRESHT, V.; RANGEL-YAGUI, C. O.; BLANKSCHTEIN, D. **Understanding miltefosine–membrane interactions using molecular dynamics simulations.** Langmuir, 31: 4503-4512, 2015;

MALVERN PANALYTICAL. **Espalhamento de luz dinâmicos (DLS)**. Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/br/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>. Acesso em: 01 de Julho de 2019;

MELO, A. V.; ZUZA-ALVES, D. L.; DA SILVA-ROCHA, W. P.; FERREIRA CANÁRIO DE SOUZA, L. F.; FRANCISCO, E. C., SALLES DE AZEVEDO MELO, A.; CHAVES, G.M. **Virulence factors of *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil**. *Journal de Mycologie Médicale*, 29: 132-139, 2019;

MOHAMED, E. A.; HASHIM, I. I. A.; YUSIF, R. M.; SUDDEK, G. M.; SHAABAN, A. A. A.; BADRIA, F. A. E. **Enhanced in vitro cytotoxicity and anti-tumor activity of vorinostat-loaded pluronic micelles with prolonged release and reduced hepatic and renal toxicities**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96: 232-242, 2017;

MOROI, Y. **Micelles: theoretical and applied aspects**. Springer Science & Business Media, 1992;

MUNOZ, C.; ALZOUBI, K.; JACOBI, J.; ABED, M.; LANG, F. **Effect of miltefosine on erythrocytes**. *Toxicology in Vitro*, 27: 1913-1919, 2013;

NETEA, M. G.; VAN TITS, L. J.; CURFS, J. H.; AMIOT, F.; MEIS, J. F.; VAN DER MEER, J. W; KULLBERG, B. J. **Increased susceptibility of TNF- α lymphotoxin- α double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans***. *The Journal of Immunology*, 163: 1498-1505, 1999;

NORMA, NCCLS et al. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras**; Norma Aprovada–Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). 2002.

OLBRICH, K.; RAWICZ, W.; NEEDHAM, D.; EVANS, E. **Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers**. *Biophysical journal*, 79: 321-327, 2000;

ORHAN, G.; BAYRAM, A.; ZER, Y.; BALCI, I. **Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis***. *Journal of clinical microbiology*, 43: 140-143, 2005;

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; HOROWITZ, H. W.; MANGINO, J. E. **Antifungal susceptibility survey of 2,000**

bloodstream Candida isolates in the United States. Antimicrobial agents and chemotherapy, 47: 3149-3154, 2003;

OYAMA, J.; LERA-NONOSE, D. S. S. L.; RAMOS-MILARÉ, Á. C. F. H.; FERREIRA, F. B. P., DE FREITAS, C. F., CAETANO, W.; HIOKA, N.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. **Potential of Pluronic® P-123 and F-127 as nanocarriers of anti-Leishmania chemotherapy.** Acta tropica. 192: 11-21, 2019;

PAJOUHESH, H., & LENZ, G. R. **Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs.** NeuroRx, 2:, 541-553, 2005;

PALUMBO, E. **Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review.** Brazilian Journal of Infectious Diseases, 12: 2-4, 2008;

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. **Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes.** Antimicrobial agents and chemotherapy, 48: 852-859, 2004;

PARK, S. Y.; KANG, Z.; THAPA, P.; JIN, Y. S.; PARK, J. W.; LIM, H. J.; LEE, J. Y.; SEO, M. H.; KIM, M. S.; JEONG, S. H. **Development of sorafenib loaded nanoparticles to improve oral bioavailability using a quality by design approach.** International journal of pharmaceutics. 566: 229-238, 2019;

PIJPERS, J.; DEN BOER, M. L.; ESSINK, D. R.; RITMEIJER, K. **The safety and efficacy of miltefosine in the long-term treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis in South Asia—A review and meta-analysis.** PLoS neglected tropical diseases, 13: e0007173, 2019;

PLANTING, A. S. T.; STOTER, G.; VERWEIJ, J. **Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer.** European Journal of Cancer, 29: 518-519, 1993;

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. **Resistance of Candida species to fluconazole.** Antimicrobial agents and chemotherapy, 39: 1, 1995;

RODRIGUES, M. L. **The multifunctional fungal ergosterol.** MBio, 9: e01755-18, 2018;

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. D. L.; POHLMANN, A. R. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5, p. 726-737,2003;

SHARIFZADEH, A.; KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; TARI, P. S. **Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates.** Microbial pathogenesis, 107: 390-396, 2017;

SHIEL, W. C. JR. **Medical Definition of Commensal.** Disponível em: <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=34012>, Acesso em: 05/08/2019;

SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J. C.; DIAZ, A.; UNGE, K. **Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis.** Clinical infectious diseases, 38: 1266-1272, 2004;

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. **The pathophysiology and treatment of *Candida* sepsis.** Current infectious disease reports, 4: 387-399, 2002;

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H.; FISCHER, C.; BERMAN, J. **Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis.** New England journal of medicine, 347: 1739-1746, 2002;

TÄUBER, A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. **In vitro permeation and penetration of ciclopirox olamine from poloxamer 407-based formulations—comparison of isolated human stratum corneum, bovine hoof plates and keratin films.** International journal of pharmaceutics, 489: 73-82, 2015;

TIMA, S.; ANUCHAPREEDA, S.; AMPASAVATE, C.; BERKLAND, C.; OKONOGLI, S. **Stable curcumin-loaded polymeric micellar formulation for enhancing cellular uptake and cytotoxicity to FLT3 overexpressing EoL-1 leukemic cells.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 114: 57-68, 2017;

TINTLE, N. L.; POTTALA, J. V.; LACEY, S.; RAMACHANDRAN, V.; WESTRA, J., ROGERS, A.; SHEARER, G. C. **A genome-wide association study of saturated, mono- and polyunsaturated red blood cell fatty acids in the Framingham Heart Offspring Study.** Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 94: 65-72, 2015;

TONG, Z.; WIDMER, F.; SORRELL, T. C.; GUSE, Z.; JOLLIFFE, K. A.; HALLIDAY, C.; CHEN, S. C. **In vitro activities of miltefosine and two novel antifungal**

biscationic salts against a panel of 77 dermatophytes. Antimicrobial agents and chemotherapy, 51: 2219-2222, 2007;

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia-10ª Edição.** Artmed Editora, 2012;

VALENZUELA-OSES, J. K.; GARCÍA, M.C.; FEITOSA, V.A.; PACHIONI-VASCONCELOS, J. A.; GOMES-FILHO, S. M.; LOURENÇO, F.R.; CERIZE, N. N. P.; BASSÈRES, D. S.; RANGEL-YAGUI, C. O. **Development and characterization of miltefosine-loaded polymeric micelles for cancer treatment.** Materials Science & Engineering. 81: 327-333, 2017;

VAN BLITTERSWIJK, W. J.; VERHEIJ, M. **Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1831: 663-674, 2013;

VERWEIJ, J.; PLANTING, A.; VAN DER BURG, M.; STOTER, G. **A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours.** Journal of cancer research and clinical oncology, 118: 606-608, 1992;

VILA, T. V. M.; CHATURVEDI, A. K.; ROZENTAL, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L. **In vitro activity of miltefosine against Candida albicans under planktonic and biofilm growth conditions and in vivo efficacy in a murine model of oral candidiasis.** Antimicrobial agents and chemotherapy, 59: 7611-7620, 2015;

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. **Aplicações farmacêuticas de polímeros.** Polímeros. 20(1): 51-64, 2010;

VYAS, V.; SANCHETI, P.; KAREKAR, P.; SHAH, M.; PORE, Y. **Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407.** Acta pharmaceutica, 59: 453-461, 2009;

GLOSSARIO

Abscissas – O eixo horizontal que compõe o plano cartesiano, o eixo X;

Adaptação – Habilidade dos seres vivos de desenvolver uma harmonia, ajustar o seu organismo de acordo com o ambiente, influenciando diretamente em sua sobrevivência;

Agregados – Que está em conjunto, aglomerado;

Alíquotas – Uma parte da solução inicial;

Alquilfosfolipídio – Um lipídio com um grupamento alquila;

Antibióticos de Amplo espectro – São antibióticos que atingem um grande número de microrganismos em suas doses terapêuticas;

Antifúngicos Azólicos – São antifúngicos que inibem a enzima necessária para produção de ergosterol nas membranas de fungos;

Apolar – Molécula que não apresenta polaridade;

Apoptose – É uma forma de morte celular programada;

Aspartato aminotransferase – É uma enzima que catalisa a porção nitrogenada de um aminoácido para um resíduo de aminoácido;

Balsas lipídicas– Regiões definidas na membrana celular onde há a concentração de proteínas;

Bicamadas lipídicas – É uma camada dupla formada por lipídios anfifílicos;

Biodisponibilidade – Percentual de aproveitamento de uma substância pelo o organismo;

Biofilme – São comunidades biológicas com um elevado grau de organização onde os microrganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais;

Brotamento – Tipo de reprodução assexuada;

Caracterizações físico-químicas – Caracterizar as propriedades do material utilizado;

Cinética de liberação – Estuda a velocidade da liberação de determinado composto de acordo com o tempo;

Citocinas–É um grupo extenso de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes;

Citotoxicidade – Propriedade nociva de uma substância em relação as células;

Citotoxicidade Seletiva – A nocividade da substância é particular a um grupo específico;

Clearance – É a capacidade renal para depurar solutos a partir do plasma;

Colinas – Cátions orgânicos;

Colonização Oportunista – Um patógeno oportunista normalmente leva vantagem quando a defesa do organismo se encontra comprometida;

Concentração inibitória mínima – É a mais baixa concentração de um produto que limita o crescimento visível de um microrganismo;

Concentração molar – É a razão da quantidade de matéria, em mol, pelo volume de solução;

Copolímeros – Polímero formado por mais de um monômero

Copolímeros anfifílicos – Polímeros formados por mais de um monômero com características hidrofílicas e hidrofóbicas;

Creatinina – Moléculas derivada da creatina, seu valor exacerbado no sangue indica insuficiência renal;

Diluição seriada – É um processo de diluição em série, onde a partir de uma diluição primária (solução mãe), haverá uma série de diluições equivalentes matematicamente;

Efeitos colaterais – Consequência que a ingestão de um medicamento pode causar ao organismo;

Encapsular – Ato de colocar em uma cápsula;

Endocardite – Infecção no endocárdio;

Eritrócitos – Hemácias;

Escala nanométrica – Equivale a um bilionésimo de metro;

Espectrofotômetro – Instrumento de análise capaz de medir e comparar a quantidade de luz absorvida, transmitida ou refletida por uma amostra;

Estruturas filamentosas – São estruturas formadas por filamentos, finos e alongados;

Estruturas leveduriformes – Em aspecto físico se caracteriza por seres eucariontes que possuem apenas um núcleo, unicelular de função reprodutiva e vegetativa;

Fármaco – Qualquer produto ou preparado farmacêutico;

Fármaco de referência – São remédios que possuem eficácia terapêutica, segurança e qualidade comprovadas cientificamente junto à ANVISA;

Formulações – Redação em fórmula;

Fosfolipases – Enzima que hidrolisa as ligações éster presentes nos fosfolipídios;

Fungicida – Que destrói a ação do fungo;

Fungioestática – Que inibe o crescimento do fungo;

Hemólise – Destruição dos glóbulos vermelhos do sangue;

Homeostase – Estabilidade da qual o organismo necessita para realizar suas funções;

Imunomodulador – Substâncias que atuam no sistema imunológico, conferindo aumento da resposta imune;

Infecção – Invasão de tecidos corporais de um organismo hospedeiro;

Inóculo – É a suspensão de microrganismos de concentração adequada;

Lipoproteínas – Partículas pequenas compostas de proteínas, colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos;

Lise – Quebra;

Membranas insaturadas – Membranas que apresentam em sua constituição fosfolipídios insaturados;

Metabólitos – Produto do metabolismo de uma substância;

Microbiota – Conjunto de microrganismos que habitam em um ecossistema;

Murinos – Uma subfamília de roedores da família Muridae;

Nanocarreadores – Sistemas de entregas de fármacos para aumentar propriedades farmacológicas dos mesmos;

Nefrotoxicidade – Efeito tóxico sobre os rins;

Neutrófilos – Leucócitos;

Osteomielite – Inflamação nos ossos;

Parenteral – Nutrição parenteral é realizada por uma via diferente da gastro-intestinal;

Partículas coloidais – Partículas invisíveis a olho nu, porém maiores que moléculas grupais;

Patogenicidade – Capacidade de um agente causar doenças;

Patógenos – O agente causador de doenças;

Polímero – Macromolécula formada pela união de substâncias simples;

Polissacarídeos – Carboidratos que originam monossacarídeos a partir de processos de hidrólise;

Potencial Zeta – É a carga superficial da partícula;

Profilaxia – Procedimentos utilizados para prevenir e/ou evitar doenças;

Reações adversas – É qualquer efeito prejudicial ou indesejável, que aparece após a administração de um medicamento;

Resistencia cruzada – Ocorre quando um organismo é resistente a duas ou mais substâncias;

Sepse – Resposta generalizada do organismo à uma infecção;

Sinergia – Ação associada de duas ou mais substâncias;

Tempo de meia vida – O tempo em que uma amostra leva para reduzir a metade de sua concentração;

Teratogênica – Substância que produz alteração na função ou estrutura durante a vida embrionária ou fetal;

Trombocitose – Aumento do número de plaquetas;

Unidades formadoras de colônia – Unidade de medida usada para estimar o número de microrganismos viáveis;

Virulência – Capacidade de um microrganismo de se multiplicar num organismo e provocar uma patologia;