

ELAINE PATRÍCIA CUNHA AZEVEDO

NANOPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS DE PLGA,
RECOBERTAS COM DMSA, CONTENDO ITRACONAZOL PARA O
TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE.

BRASÍLIA, 2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ELAINE PATRÍCIA CUNHA AZEVEDO

NANOPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS DE PLGA, RECOBERTAS
COM DMSA, CONTENDO ITRACONAZOL PARA O TRATAMENTO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília

2011

ELAINE PATRÍCIA CUNHA AZEVEDO

NANOPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS DE PLGA, RECOBERTAS COM
DMSA, CONTENDO ITRACONAZOL PARA O TRATAMENTO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 21 de janeiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Ricardo Bentes de Azevedo – (presidente)
Universidade de Brasília

Arnóbio Antônio da Silva Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Wilson Sacchi Peternele
Universidade Federal de Rondônia

Mônica Valero da Silva
Universidade de Brasília

Ildinete Silva Pereira
Universidade de Brasília

Dedico esse trabalho...

Ao meu amado pai Odilon Cunha, meu exemplo de caráter, bondade e honestidade, que nunca mediu esforços para nos fazer o melhor e que sempre fez questão que eu fosse adiante, acreditando no meu potencial e se orgulhando das minhas conquistas. O melhor pai do mundo, o meu herói!

A minha amada mãe Elzi, a melhor pessoa que existe em todos os sentidos, a melhor mãe do mundo, a minha alma gêmea!

Ao meu amado marido Júnior, meu amor, meu porto seguro. O melhor companheiro de todas as horas! Te amo muito!

Agradecimentos

Principalmente a Deus, pois em minha vida sempre pude contar com uma força maior que guiou o meu caminho e me acompanhou em todos os momentos. Obrigada meu Deus por todas as bênçãos e graças derramadas sobre mim!

Ao meu amado marido Júnior, a pessoa que mais me incentivou e apoiou em todos os momentos, que mais acreditou em mim, mais que eu mesma! Que me mostrou o mundo e a vida sob a ótica mais linda e poderosa que existe: o amor! Esse trabalho também é um pouco seu, pois sempre me ajudou com muito carinho e paciência! A sua presença ao meu lado, faz com que a vida fique mais fácil, mais bonita e muito mais interessante! Obrigada meu Amorecito por estar comigo e me fazer tão feliz!

Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, por sua generosidade ao me receber em seu laboratório e aceitar me orientar. Obrigada pelo conhecimento transmitido, pelos ensinamentos de vida, pela força e, principalmente, por acreditar no meu potencial e no meu trabalho.

Ao Professor Dr. Antônio Cláudio Tedesco, pela importante colaboração nesse trabalho, com a preparação das nanopartículas. Obrigada também pelas orientações e ensinamentos sempre que precisei, sendo muito simpático e solícito!

Aos alunos do Professor Tedesco, Marigilson e Olimpia pelos envios das nanopartículas.

À Professora Dr^a Anamélia Lorezenti Bocca, por me receber de braços abertos em seu laboratório, dando uma importante colaboração neste trabalho. Obrigada pela amizade, dedicação e apoio.

Aos alunos da Prof^a Anamélia que sempre me ajudaram com muita simpatia, especialmente a Ana Camila que me acompanhou em muitos momentos com muito carinho e dedicação.

À Professora Dr^a Sueli Felipe e seus alunos pelo apoio e cooperação para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Luciano Paulino da Silva, a quem tenho muita admiração pela inteligência, espírito científico e generosidade. Desde quando ingressei no doutorado, sempre foi presente e oportuno com sugestões e conselhos.

A Todos os Professores do Departamento de Genética e Morfologia por compartilhar grandes momentos de conhecimento que contribuíram muito para a minha formação, muito obrigada!

Ao Professor Marcos Célio pela grande ajuda nas análises histopatológicas.

Ao Professor Dr. Valbert Nascimento Cardoso, da UFMG, e seus alunos, em especial Leonardo Fuscaldi, que me receberam com muito carinho e presteza em seu laboratório e me auxiliaram nos experimentos de biodistribuição, e com o incomparável “jeito mineiro de ser” tornaram aqueles dias muito prazerosos.

Ao Professor Dr. Osmino R. Pires Júnior, que foi muito importante na etapa final desse projeto. Muito Obrigada por seu grande auxílio com HPLC, e principalmente suas palavras de incentivo, tão preciosas na reta final.

À Dr^a Beatriz Simas Magalhães, da Universidade Católica de Brasília, por não medir esforços em me ajudar sempre que precisei! Obrigada por toda ajuda e confiança em mim!

Ao Professor Dr. André Correa Amaral, por todo conhecimento compartilhado, pela sempre disponibilidade e principalmente pela amizade!

Aos funcionários da Universidade de Brasília: Bráulio (Patologia Molecular), Sr. Dedé (Biotério da FS), Greice (Secretaria da FS), Djalma e Felipe (Laboratório de Morfologia e Morfogênese), pela importante ajuda durante todo o doutorado.

À Débora pela importante colaboração na execução das imagens por MET, obrigada pela disponibilidade, interesse e entusiasmo no trabalho desenvolvido e também pela amizade.

À amiga Jaqueline Rodrigues Silva, pela amizade, cumplicidade, força e por todos os momentos que se dedicou ao meu trabalho e a mim, me ajudando de uma forma grandiosa e da qual eu nunca vou esquecer. Muito Obrigada Jaque!

Aos amigos do laboratório, que me receberam com muito amor, que sempre me ajudaram com dedicação e carinho: Nathália Veloso, Caroline Valois, Victoria Monge, Graziella Joanitti, Camila Arruda, João Paulo Longo, Luciana Pereira, Luís Alexandre, Cláudio Cavalcanti, Leandro Bicalho, Vera Soviero, Beatriz Ma, Diego Iocca, Taynan Santos, Ludmila Souza, Mariana Campos, Luciana, Marcela Carneiro, Rafael, Luíza Fascineli, Renata Carvalho. Obrigada por tudo!

À aluna de IC Khélida Loyane, que com determinação, entusiasmo e força de vontade me ajudou e fez experimentos muito importantes para esse trabalho. Obrigada pelo carinho, pela boa vontade e amizade!

À Dona Zélia Madeira, que com sua incomparável competência organizou o nosso laboratório e com sua grande simpatia e boa vontade sempre faz tudo para nos ajudar!

Às minhas queridas amigas: Maitê Mijan, Juliana Braz e Larissa Melo por tornarem meus dias mais fáceis com a amizade, apoio e cumplicidade. Obrigada por dividirem comigo o peso das dificuldades e multiplicarem a alegria das vitórias alcançadas. Obrigada por serem as minhas amigas!

Á minha linda Família: irmãos, cunhados, sobrinhos; em especial as minhas queridas irmãs, Nenena, Tatá, Gigi e Rose; meu cunhado Renato, minhas primas Jú e Cinara por sempre me darem força, acreditarem em mim e por trazerem mais alegria a minha vida! A melhor família que existe!

Aos amigos e afilhados Shélida e Dallago, pela amizade, apoio, momentos de descontração e alegria. Obrigada por nos receber com tanto carinho na vida de vocês!

Aos queridos primos Luciana e Elvio, pela amizade, cumplicidade, por tantos momentos felizes, por estarem sempre por perto e por acreditarem sempre em meu potencial! Vocês são a nossa família de BsB!!

Á querida amiga Mariza, que foi uma mãe para mim em Brasília e mesmo distante geograficamente continua a cuidar de mim e estar ao meu lado.

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

Aos órgãos financiadores: CNPq, Capes, FAPDF, FINATEC.

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma endemia de relevância na América Latina, sendo responsável por 1,45 mortes/milhão de habitantes apenas no Brasil, onde é considerada uma doença negligenciada pelo Ministério da Saúde. A atual terapia para a PCM recai principalmente em duas classes de antifúngicos: a) os imidazólicos, como o itraconazol; e b) os polienos como a anfotericina B, cujos tratamentos resultam em graves efeitos colaterais para o paciente e que são considerados como os principais selecionadores das formas resistentes de diversos fungos patogênicos. Este estudo tem como objetivo avaliar uma nova formulação para tratar de infecções fúngicas, pelo uso de itraconazol encapsulado em sistemas nanoestruturado de PLGA (polímero derivado ácido láctico e ácido glicólico) no tratamento da PCM em modelo experimental *in vitro* e *in vivo*; comparada com o fármaco convencionalmente usado no tratamento desta micose, como estratégia para evitar problemas de efeitos colaterais causados pelos antifúngicos atualmente usados. A caracterização das nanopartículas contendo itraconazol (ITZ-NANO) mostrou sucesso da técnica de nanoencapsulação com eficiência de encapsulação de $72,8 \pm 3.50\%$. As nanopartículas apresentaram formatos esféricos, densidades similares, e diâmetro médio de 174 nm. As partículas apresentaram carga negativa (-40 mV). Por meio do teste de MTT, ITZ-NANO mostrou baixa toxicidade em células mesangiais de rim e hepatócitos; e similar eficácia antifúngica comparada ao fármaco convencional, através de contagem de unidades formadoras de colônia. A biodistribuição de ITZ-NANO foi realizada por meio da marcação das nanopartículas com tecnécio e injetadas em camundongos da linhagem Balb C revelando uma concentração significativamente maior nos pulmões, fígado e rins após 8 horas da administração. Nos testes *in vivo*, os cortes histológicos dos pulmões dos camundongos Balb C após 30 e 60 dias de tratamento mostraram comprometimento nos indivíduos de todos os grupos infectados, como intenso infiltrado inflamatório, parênquima espesso e presença de granulomas com células fúngicas, porém, nos animais tratados com ITZ-NANO, os pulmões estavam mais preservados e não foi visto célula fúngica. Nas dosagens de enzimas hepáticas, foram observadas alterações depois de 30 dias de tratamento, como aumento da enzima transaminase pirúvica no grupo tratado com itraconazol convencional e diminuição da enzima

fosfatase alcalina no grupo tratado com ITZ-NANO. Quanto ao aspecto físico dos animais, o grupo tratado com itraconazol convencional apresentou alopecia após 30 dias de tratamento e maior diminuição de seu peso (15%). Os resultados indicam que ITZ-NANO apresentou melhor ação que o itraconazol convencional quanto à citotoxicidade, *in vitro*, análises histopatológicas dos pulmões, dosagens de enzimas hepáticas e aparência física dos animais, *in vivo*.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose; PLGA; Nanopartículas; DMSA; Itraconazol.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic disease of relevance in Latin America, being responsible for 1,45 deaths/million of inhabitants only in Brazil, where it is an illness neglected by the health authorities. In current days, there are two groups of antifungal agents used in the treatments, the imidazoles (itraconazole) and the polyenes (amphotericin B), both can result in serious side effects for the patient, and are also being considered responsible for the resistant forms of several pathogenic fungi. This study aims to evaluate a new formulation against fungal infections by means of the sustained release of encapsulated itraconazole in nanostructured PLGA in the treatment of paracoccidioidomycosis in an experimental model *in vitro* and *in vivo*. Through the characterization of nanoparticle itraconazole (ITZ-NANO) were identified an encapsulation efficiency of 72.8%, rounded shapes, similar densities, average diameter of 174 nm, and also a negatively charged (-40 mV). The biodistribution of ITZ-NANO was performed by marking the nanoparticles with technetium. This showed a higher concentration in the lungs, liver and kidneys. The cytotoxicity assays performed in mesangial cells of kidney and hepatocytes using the MTT assay showed that the ITZ-NANO was less cytotoxic than the conventional itraconazole. In *in vivo* tests, histological sections of lungs of animals held at 30 and 60 days of treatment, showed impairment in individuals of all infected groups, such as an intense inflammatory infiltrated, a increased thick parenchyma, and the presence of granulomas with fungal cells, on the other hand, in animals treated with ITZ-NANO, the lungs were better preserved and were not observed the presence of fungal cells. In the dosing of the hepatic enzymes, changes were observed after 30 days of treatment, such as an increase in the lactate dehydrogenase in the group treated with conventional itraconazole, and a decrease of the alkaline phosphatase enzyme in the group treated with ITZ-NANO. Regarding the physical appearance of animals, the group that was treated with conventional itraconazole it showed alopecia after 30 days of treatment, and also a significant decrease of their weight (15%). The results suggest that ITZ-NANO showed better action in comparison with the conventional itraconazole regarding cytotoxicity *in vitro*, histopathological analysis of the lungs, liver enzyme dosings and in the physical appearance of animals *in vivo*.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; PLGA; Nanoparticles; DMSA;
Itraconazole;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do itraconazol.

Figura 2- Desenho esquemático do mecanismo de ação do Itraconazol.

Figura 3- Exemplos de nanocarreadores.

Figura 4- Perfis de liberação de drogas em função do tempo: convencional x controlada.

Figura 5- Estruturas químicas dos poliésteres do ácido glicólico (PGA), ácido láctico (PLA) e poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).

Figura 6- Exemplo de biodegradação de polímero e liberação da droga.

Figura 7- Microscopia eletrônica de transmissão de ITZ-NANO.

Figura 8- Medida de tamanho e dispersão pelo aparelho NanoSight.

Figura 9- Potencial Zeta de amostras de ITZ-NANO monitoradas durante 60 dias.

Figura 10- Atividade antifúngica de ITZ-NANO e ITZ contra *P.brasiliensis* nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias.

Figura 11- Citotoxicidade de ITZ-NANO e ITZ nas células mesangiais de rim humano (CM) (A) e hepatócitos de rato AML12 (B).

Figura 12- Citotoxicidade de ITZ-NANO em células mesangiais de rim humano (CM) durante 60 dias.

Figura 13- Perfil de biodistribuição de ITZ-NANO^{99m}Tc-DMSA e ^{99m}Tc-DMSA livre.

Figura 14- Imagens da biodistribuição de ITZ-NANO^{99m}Tc-DMSA e ^{99m}Tc-DMSA livre nos tempos 1, 2, 4, 6 e 8 horas após a injeção endovenosa.

Figura 15- Fotomicrografias dos pulmões de animais sadios (grupo 1) e infectados sem tratamento (grupo 2).

Figura 16- Fotomicrografias dos pulmões de animais infectados e tratados com ITZ.

Figura 17- Fotomicrografias dos pulmões infectados e tratados com ITZ -NANO.

Figura 18- Fotomicrografias dos pulmões com 60 dias de tratamento com ITZ-NANO e ITZ.

Figura 19- Aspectos físicos dos animais após os tratamentos com ITZ-NANO e ITZ.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantificação das enzimas hepáticas após 30 dias de tratamento com ou sem ITZ-NANO e ITZ.

Tabela 2- Quantificação das enzimas hepáticas após 60 dias de tratamento com ou sem ITZ-NANO e ITZ.

Tabela 3- Avaliação da massa corporal de acordo com cada grupo experimental 30 e 60 dias após o início dos tratamentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ALP- fosfatase alcalina

ALT- alanina aminotransferase

AML 12- alpha mouse liver 12

BHI: meio de cultura composto por uma infusão de cérebro e coração (do Inglês, *Brain Heart Infusion*)

CM- células mesangiais

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSA- ácido dimercaptosuccínico

DMSO- Dimetilsulfóxido

FDA- *Food and Drug Administration*

HE- hematoxilina-eosina

hrs- horas

ITZ- itraconazol

ITZ-NANO- nanopartículas de PLGA contendo itraconazol

Kg- quilograma

L- litro

MBq- Millibecquerel

MET- microscopia eletrônica de transmissão

mg- miligrama

MIC- concentração mínima inibitória (do Inglês, *Minimum Inhibitory Concentration*)

mL- mililitro

MTT- 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

mV- milivolts

µL- microlitro

µm- micrômetros

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards

ng- nanograma

P. brasiliensis- *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS- tampão fosfato (do Inglês, *Phosphate Buffer Saline*)

PCM- Paracoccidioidomicose

PGA- ácido poli glicólico

PLA- poli lático

PLGA- co-polímero ácido poli lático-glicólico

PVA- álcool polivinil

Rpm- rotações por minuto

RPMI- Meio de cultura - Instituto Roswell Park Memorial

^{99m}Tc- Tecnécio 99

YPD- meio de cultura líquido para crescimento de fungos

°C- Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS</i>	2
1.2	A PARACOCCIDIOIDOMICOSE	3
1.2.1	<i>A forma aguda da Paracoccidioidomicose</i>	4
1.2.2	<i>A forma crônica da Paracoccidioidomicose</i>	5
1.3	TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	5
1.4	ITRACONAZOL	6
1.4.1	<i>Estrutura química e características físico-químicas</i>	6
1.4.2	<i>Indicações terapêuticas</i>	6
1.4.3	<i>Propriedades farmacocinéticas do itraconazol</i>	7
1.4.4	<i>Mecanismo de ação do itraconazol</i>	7
1.4.5	<i>Efeitos colaterais do uso do itraconazol</i>	9
1.5	CARREAMENTO E VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS	9
1.5.1	<i>Nanopartículas poliméricas</i>	12
1.5.2	<i>Nanopartícula de poli (lático-co-glicólico) (PLGA)</i>	14
1.5.3	<i>Biodegradação Polimérica</i>	14
1.6	JUSTIFICATIVA	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	MÉTODOS.....	19
3.1	ITRACONAZOL NANOESTRUTURADO (ITZ-NANO)	20
3.2	ITRACONAZOL LIVRE (ITZ).....	20
3.3	EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS.	20
3.4	CARACTERIZAÇÃO DE ITZ-NANO	22
3.4.1	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i>	22
3.4.2	<i>Medida de tamanho e dispersão</i>	22

3.4.3	<i>Eficiência de encapsulamento</i>	23
3.4.4	<i>Análise do Potencial Zeta de ITZ-NANO</i>	23
3.4.5	<i>Estudo da Estabilidade de ITZ-NANO</i>	23
3.5	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	24
3.5.1	<i>Preparação do inóculo</i>	24
3.5.2	<i>Concentração Mínima Inibitória (MIC)</i>	24
3.5.3	<i>Citotoxicidade in vitro de ITZ-NANO</i>	25
3.6	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	25
3.6.1	<i>Animais de experimentação</i>	25
3.6.2	<i>Biodistribuição de ITZ-NANO marcadas com Tecnécio 99 (99mTc)</i>	26
3.7	PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES PARA A INFECÇÃO CRÔNICA	26
3.8	GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
3.9	HISTOPATOLOGIA	27
3.10	ASPECTOS FÍSICOS	28
3.11	DOSAGEM DE ENZIMAS HEPÁTICAS.....	28
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
3.13	APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA	28
4	RESULTADOS	29
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	30
4.1.1	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i>	30
4.1.2	<i>Medida de tamanho e dispersão</i>	31
4.1.3	<i>Eficiência de encapsulamento</i>	31
4.1.4	<i>Análise do Potencial Zeta de ITZ-NANO</i>	32
4.2	ESTABILIDADE DE ITZ-NANO	32
4.2.1	<i>Potencial Zeta</i>	32
4.2.2	<i>Eficácia Antifúngica de ITZ-NANO</i>	33
4.2.3	<i>Citotoxicidade de ITZ-NANO</i>	34
4.3	BIODISTRIBUIÇÃO DE ITZ-NANO	37
4.4	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ITZ-NANO <i>IN VIVO</i>	38
4.5	DOSAGENS DAS ENZIMAS HEPÁTICAS	41

4.6	AVALIAÇÕES DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS	43
4.7	ASPECTOS FÍSICOS DOS ANIMAIS	43
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Paracoccidioides brasiliensis*

O *P. brasiliensis* é um fungo assexuado e dimórfico, ou seja, possui a capacidade de crescer em duas formas diferentes conforme as condições ambientais: como fungo filamentosos entre 25 a 30°C e como levedura quando incubados entre 35 e 37°C. A forma de crescimento do fungo está relacionada com a proporção dos glicolipídios e polissacarídeos presentes externamente na parede celular e de seu arranjo espacial, e particularmente a presença de alfa-1,3-glucana na levedura e de beta-1,3-glucana no micélio (1).

O *P. brasiliensis* apresenta uma distribuição geográfica limitada, tendo sido isolado de plantações em regiões com o clima temperado ou quente, e com verões chuvosos e invernos secos; particularmente no solo das plantações de café, pois esta cultura é praticada intensivamente em regiões endêmicas (2). Os índices de infecção também foram elevados em tribo de índios da Amazônia cuja principal cultura é o café (3).

A participação de animais no ciclo biológico do *P. brasiliensis* é também cogitada em razão deste ter sido identificado em fezes de morcego frugívoro (4), fezes de pinguim (5), vísceras de macaco (6) e em vísceras de tatu (2). Os isolados de *P. brasiliensis* encontrados em tatu são de grande importância, pois esses animais escavam o solo e têm distribuição geográfica semelhante, podendo ter alguma relação com o ciclo de vida do *P. brasiliensis* (3).

O fungo *P. brasiliensis* foi classificado taxonomicamente através de estudos moleculares baseados nos sequenciamentos e comparações dos genes, demonstrando que esse patógeno poderia ser enquadrado no Reino: Fungi Filo: Ascomycota, Sub-Filo: Pezizomycotina, Classe: Eurotiomycetes, Sub-Classe: Eurotiomycetidae, Ordem: Onygenales, Família: Ajellomycetaceae, Genero: Paracoccidioides, Espécie: *P. brasiliensis* (7).

Atualmente foram sequenciados 33.921 nucleotídeos e 213 proteínas. Há 45 projetos genomas em andamento com 99 sequências genômicas, aproximadamente 290.000 proteínas e 840.000 nucleotídeos (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>, acessado em 02 de dezembro de 2010).

1.2 A PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma infecção sistêmica causada por *P. brasiliensis* (4). A PCM é conhecida também como blastomicose sul-americana ou moléstia de Lutz-Splendore-Almeida. A primeira descrição da doença e do seu agente etiológico foi realizada por Adolpho Lutz no ano de 1908. A PCM ocorre como doença endêmica entre 20° ao Norte e 35° ao Sul do Equador, estendendo-se do México à Argentina, no Brasil, Venezuela e Colômbia onde está a maior parte dos casos já relatados (8,9).

No Brasil, a incidência e a prevalência desta micose são difíceis de determinar porque a notificação de ocorrência não é compulsória. Os cálculos de prevalência, incidência e morbidade desta micose, baseiam-se em relatos de inquéritos epidemiológicos e de séries de casos. Com base na experiência de serviços de referência no atendimento de pacientes com PCM, acredita-se que sua incidência em zonas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes ao ano. Informações registradas no Ministério da Saúde atestam que 3.181 casos de óbito por PCM foram registrados no Brasil entre 1980 e 1995, resultando em uma taxa de mortalidade por PCM de 1,45 casos por milhão de habitantes. Shikanai-Yasuda *et al*, 2006 apontaram a PCM como oitava causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias, inclusive maior que a mortalidade por leishmanioses, e a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas (10). Além disso, um estudo no Rio de Janeiro indicou que 14,6% de 500 adultos hospitalizados em vários centros têm PCM e cinco novos casos por milhão de pacientes acontecem por ano (11).

A PCM tem sido observada em pacientes de todas as faixas etárias a partir dos três anos de vida e com acentuada predominância entre 30 e 50 anos de idade. Até a puberdade, a incidência da moléstia é idêntica para ambos os sexos. Contudo, na idade adulta mais de 80% dos pacientes acometidos por esta doença são do sexo masculino, sendo 13 vezes mais comum à infecção em homens que em mulheres, uma vez que se acredita que a mulher possui uma proteção natural conferida por estrógenos. Alguns estudos (12) demonstraram que o estrógeno inibe a transição micélio-levedura, porque a infecção aumentou gradativamente em ratos machos infectados intranasalmente, enquanto que em fêmeas, a transição não

ocorreu e conseqüentemente a infecção não se instalou. Estes dados sugerem que o hormônio feminino estrógeno é um bloqueador da transição e possivelmente responsável pela resistência a infecção em mulheres (13).

A infecção pulmonar adquirida pelos seres humanos ocorre por inalação dos pequenos conídios de 4µm de diâmetro oriundo da forma filamentosa encontrada no solo. Ao alcançar as porções distais do parênquima pulmonar, os conídios se transformam em leveduras que podem permanecer confinadas localmente, causando uma infecção crônica, ou disseminar para órgãos distantes no caso da doença disseminada progressiva, denominada infecção aguda ou juvenil. A doença não tratada adequadamente pode comprometer um ou mais órgãos e evoluir para óbito (14).

1.2.1 A forma aguda da Paracoccidioidomicose

A forma aguda ou subaguda da doença compromete em geral crianças, adolescentes e adultos jovens. A forma aguda progride com rapidez, cerca de um a dois meses e a doença é amplamente disseminada. O comprometimento nos pulmões é raro, lesões mucosas são pouco frequentes, mas o envolvimento com os órgãos do sistema reticuloendotelial e a disfunção da medula óssea podem ser tão graves que simulam doenças linfoproliferativas. Esta forma da PCM pode ser classificada em moderada ou grave e não apresenta forma leve, pois o período de latência é curto e o envolvimento imune celular intenso (2,4,15). A forma aguda da PCM pode estar associada com outras doenças infecciosas como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) que ocorre principalmente em indivíduos que vivem em regiões endêmicas na América Latina (16). Também é de grande importância a associação entre a tuberculose e a PCM, sendo que esta associação pode induzir o erro no diagnóstico e na conduta terapêutica. O comprometimento pulmonar por tuberculose pode preceder, suceder ou ser simultâneo ao da PCM e é observado em 5,4 a 10% dos casos (2).

1.2.2 A forma crônica da Paracoccidioidomicose

A forma crônica da doença acomete, em geral, adultos com idade superior a 30 anos. O quadro clínico progride lentamente com frequência acima de seis meses e permanece restrita aos pulmões causando lesões nodulares, infiltrativas, fibróticas ou cavitárias (14). A fibrose grave, que leva à doença pulmonar obstrutiva crônica e o aumento ventricular direito, devido às alterações funcionais e estruturais dos pulmões chamada de *cor pulmonale*, é considerada uma sequela fatal. As lesões de pele, mucosa nasal e oral são usualmente encontradas em pacientes com a forma crônica multifocal (17).

A doença crônica pode ser classificada quanto à gravidade em leve, moderada ou grave, segundo o estado geral e o nível imunológico do paciente. As formas leves apresentam envolvimento pulmonar discreto, não exibem acometimento com os outros órgãos. Nas formas graves há lesões extensas nos pulmões, lesões tegumentares, podendo ocorrer lesões em outros órgãos. Já as formas moderadas consistem em um grupo de pacientes heterogêneos que não apresentam todos os critérios para serem classificados quanto à forma leve (18).

1.3 TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A escolha da droga a ser usada no tratamento da PCM é feita de acordo com o estado do paciente e requer, além de um longo período de tratamento, o monitoramento para avaliar a eficácia e a tolerância ao antifúngico (19). Os fármacos usados na terapêutica para a PCM são os das seguintes classes: Imidazólicos (itraconazol, fluconazol, ketoconazol), Polienos (anfotericina B) e Sulfas (sulfadiazina). Destes, os mais utilizados são o itraconazol e a anfotericina B (10, 14).

1.4 ITRACONAZOL

1.4.1 Estrutura química e características físico-químicas

A unidade estrutural básica dos antifúngicos azóis é a presença de cinco membros do tipo azol, unidos por uma ligação do nitrogênio com o carbono aos outros anéis aromáticos (Figura 1).

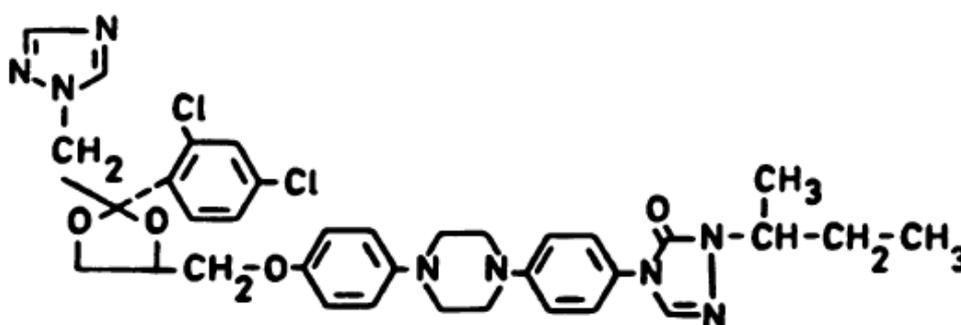


Figura 1- Estrutura química do itraconazol.

Os imidazóis (cetoconazol, miconazol e clotrimazol) apresentam dois átomos de nitrogênio no anel azol, e os triazóis (fluconazol e itraconazol) contém três átomos de nitrogênio no mesmo anel (20). O itraconazol é uma mistura racêmica 1:1:1:1 de quatro diastereoisômeros (dois pares enantioméricos), cada um possuindo três centros quirais. Apresenta fórmula molecular de $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$ e massa molecular de 705,64. É um pó branco ligeiramente amarelado, insolúvel em água, ligeiramente solúvel nos álcoois e altamente solúvel em diclorometano; possui pKa 3.70 e coeficiente de partição de 5.66 em pH de 8.1 (21).

1.4.2 Indicações terapêuticas

Apresenta amplo espectro de ação, sendo empregado no tratamento das micoses sistêmicas, como: aspergilose, blastomicose, candidíase, cromomicose, esperotricose, histoplasmose e paracoccidioidomicose. Nas micoses superficiais é empregado no tratamento da candidíase oral e vulvovaginal, ceratite micótica,

dermatofitoses, onicomicoses, pitiríase versicolor, *Tinea cruris*, *Tinea manuum* e *Tinea pedis* (21).

1.4.3 Propriedades farmacocinéticas do itraconazol

O itraconazol apresenta biodisponibilidade média de 55% com pico de concentração plasmática de 150 ng/mL, em cerca de 3 a 4 horas após a administração oral de uma dose única de 100 mg e se distribui amplamente pelo organismo humano e se acumula nos tecidos em concentrações 3 a 20 vezes superiores aquelas do plasma (22). É altamente lipofílico, se liga 99,8% às proteínas plasmáticas especialmente a albumina, e apresenta volume de distribuição médio de 11 L/kg (23, 24).

O itraconazol é biotransformado extensivamente no fígado, predominantemente pelo citocromo P450 3A4, resultando na formação de vários metabólitos (21, 23, 24) Dentre estes, o hidroxitraconazol, formado pela oxidação do grupo 1-metilpropil, é de particular interesse pela sua atividade antifúngica *in vitro*, com concentrações plasmáticas duas a três vezes superiores ao fármaco original, contribuindo, provavelmente, para o efeito terapêutico (25).

1.4.4 Mecanismo de ação do itraconazol

O mecanismo de ação do itraconazol baseia-se na inibição do sistema do citocromo P-450, responsável pela desmetilação do lanosterol, precursor do ergosterol, um componente vital da membrana celular do fungo. Deste modo, o medicamento inibe a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e conduz ao acúmulo de lanosterol e 14-alfa-metilesteróis, os quais podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolípídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e enzimas do sistema do transporte de elétrons, inibindo, conseqüentemente, o crescimento dos fungos (Figura 2) (25, 26).

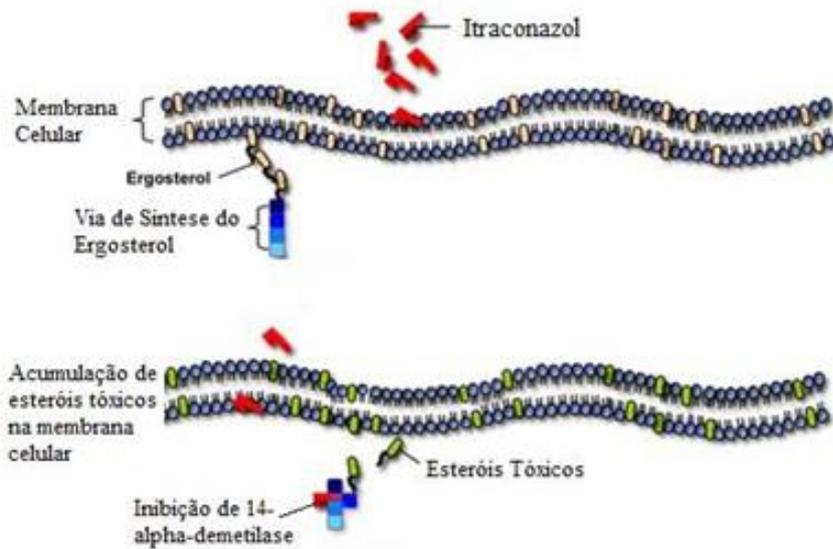


Figura 2- Desenho esquemático do mecanismo de ação do Itraconazol. Adaptado de http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm, acessado em 28 de novembro de 2010.

1.4.5 Efeitos colaterais do uso do itraconazol

Como todo tratamento antifúngico, o itraconazol é utilizado em altas doses e por um tempo prolongado, levando a incidências de efeitos colaterais, como: náuseas, vômitos, dor abdominal, diarréia, leve alopecia e cefaléia; podendo causar também hepatotoxicidade dose-dependente, incluindo falência hepática e óbito, cujo mecanismo ainda permanece desconhecido. Com o aumento da dose podem ser observados níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), além de necrose hepatocelular, degeneração dos hepatócitos, hiperplasia do ducto biliar e cirrose (27, 28). Este fármaco também pode ocasionar efeitos sérios e raros envolvendo baço, pele e sangue, sendo classificado pelo *Food and Drug Administration (FDA)* como um agente da categoria C, ou seja, contra indicado para pacientes que estão grávidas, haja vista ser teratogênico em ratos e camundongos, ocasionando má formação óssea, encefalocelos e macroglossia (29).

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

1.5 CARREAMENTO E VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS

Uma forma de modificar e melhorar a biodistribuição de fármacos é associá-los a nanocarreadores (30), como vesículas lipídicas (lipossomas) e nanopartículas poliméricas (Figura 3). Ao associar um fármaco, já conhecido e aprovado pelas agências reguladoras, em um sistema nanoestruturado, ou seja, na escala nanométrica, as suas propriedades cinéticas ou dinâmicas podem ser modificadas para melhorar a sua resposta farmacológica (30).

Desse modo, a associação de fármacos a esses nanocarreadores apresenta diversas vantagens em relação ao tratamento convencional:

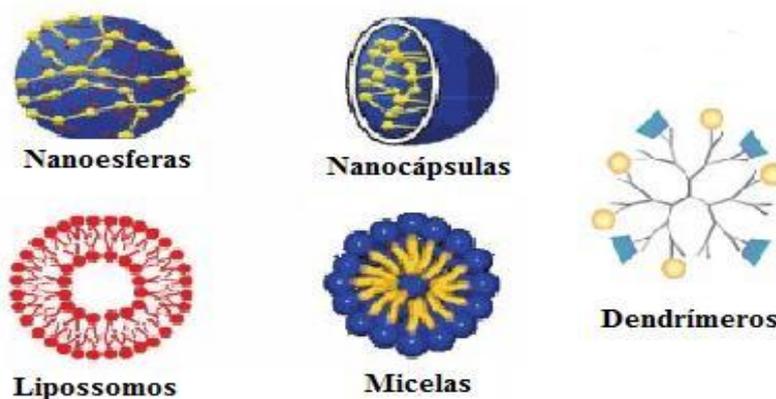


Figura 3- Exemplo de nanocarreadores. Adaptado de <http://www.zangani.com/node/491>, acessado em 02 de novembro de 2008.

a) diminuição da toxicidade; b) maior eficácia terapêutica devido à liberação progressiva e controlada do fármaco; c) alvo-especificidade, isto é, as nanopartículas podem ser direcionadas ao local de ação da droga; d) maior tempo de permanência na circulação; e) administração conveniente e segura; f) redução das dosagens de fármaco empregadas, bem como a frequência de administração e, conseqüentemente; g) redução do custo da terapia (30, 31, 32).

Estes sistemas podem ser aplicados, principalmente, para formulações cujo princípio ativo requer mais do que uma aplicação ao dia no paciente para atingir a eficácia do tratamento. Deste modo, a droga é liberada de maneira lenta e gradual, permanecendo por um maior período de tempo no organismo sem ser degradada, diferentemente do que aconteceria com as formulações convencionais (33, 34).

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

fármaco pode ser inativado ou induzir efeitos indesejados nos órgãos e tecidos que não envolvem processos patológicos (35).

Portanto, para alcançar a concentração terapêutica requerida do fármaco em certo compartimento do organismo, deve-se administrá-lo em grandes quantidades, dessa forma, a concentração do ativo na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada composto sempre possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Isto será problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica e também pelo fato de haver acúmulo de fármaco e/ou metabólitos também tóxicos. Desse modo, o objetivo de um sistema de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis (ou seja, na faixa terapêutica) por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (36). A diferença da variação de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser melhor visualizado na Figura 4.

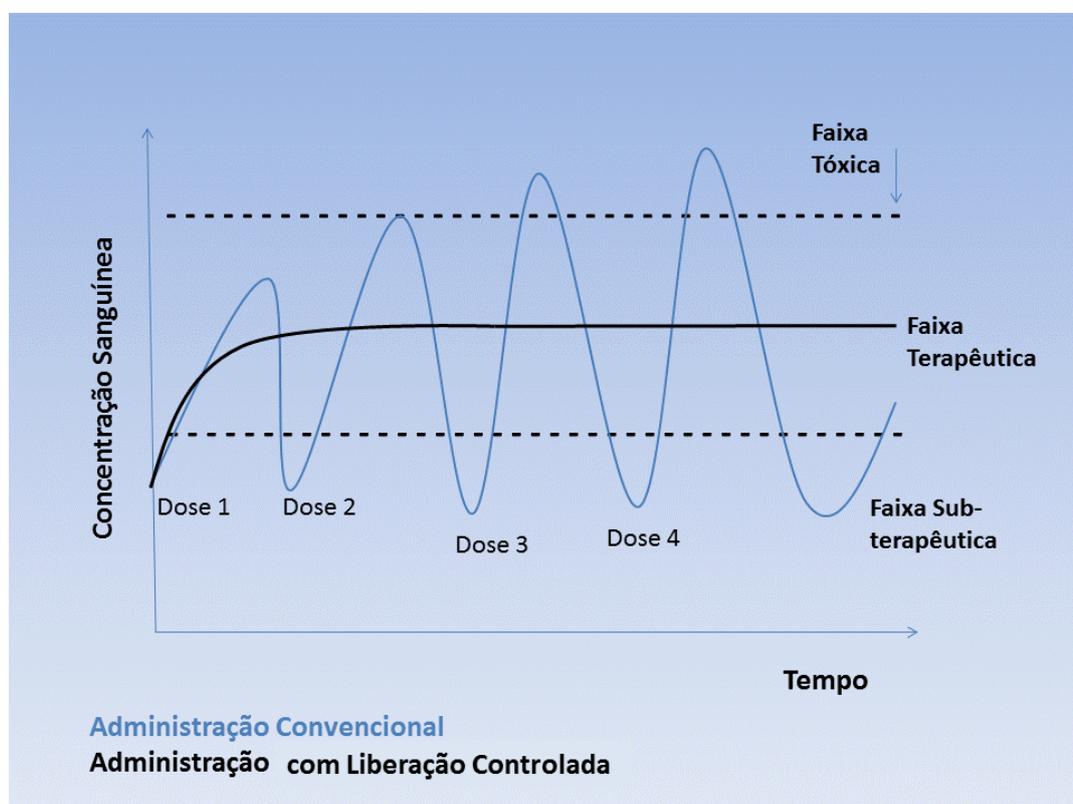


Figura 4: Perfis de liberação de drogas em função do tempo: convencional x controlada.

1.5.1 Nanopartículas poliméricas

Os carreadores podem ser classificados em microparticulados quando possuem diâmetro superior a 1 μm ou nanoparticulados se apresentarem diâmetro na ordem nanométrica (entre 10 e 1000 nm) (37). Dentre os principais nanocarreadores encontram-se os lipossomas e as nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas).

Essas nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade tanto nos fluidos biológicos quanto durante o processo de armazenamento (38). As nanopartículas poliméricas diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (39).

As aplicações de nanopartículas poliméricas estão presentes nas áreas de terapia gênica, entrega de proteínas, e terapias de combate ao câncer, devido às suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis (39).

Os polímeros utilizados na preparação dessas nanopartículas são moléculas orgânicas de alta massa molecular, constituídos em geral, por mais de 50 monômeros. Ao se agregarem em um padrão regular, formam uma matriz ou reservatório onde a droga estará inserida. A liberação da droga é facilitada pela dissolução gradual da matriz e é controlada pela solubilidade e porosidade da mesma (34). Os polímeros mais usados para síntese de nanopartículas podem ser naturais, como a quitosana e o alginato, ou sintéticos, como o ácido poli lático (PLA), ácido poli glicólico (PGA) e o co-polímero ácido poli lático-glicólico (PLGA). Esses polímeros são conhecidos por sua biocompatibilidade e sua reabsorção através das vias naturais (32, 40).

Alguns estudos mostraram a utilização de nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos antifúngicos, como a incorporação de itraconazol a emulsões parenterais por meio da tecnologia SolEmuls® que utilizou diferentes concentrações do fármaco. A incorporação do fármaco na camada de lecitina

aumentou o efeito de dispersão e a formulação permaneceu estável por 3 meses à temperatura ambiente (41).

Miyamoto *et al*, 1997 avaliaram a viabilidade do uso de um implante escleral polimérico contendo fluconazol como sistema de liberação controlada. Nesse trabalho, o copolímero PLGA foi utilizado para encapsular 10, 20, 30 e 50% de fluconazol e avaliar suas taxas de liberação *in vitro* e *in vivo*. O estudo sugeriu que o implante polimérico contendo fluconazol pode ser promissor no tratamento de endoftalmite fúngica (42). Além disso, um estudo feito em colaboração com nosso laboratório demonstrou que a anfotericina B associada a nanopartículas de PLGA apresenta mais eficiência contra a Paracoccidioidomicose em experimentos *in vitro* e *in vivo*, diminuindo significativamente a toxicidade e aumentando a eficácia do fármaco (43). Além disso, diferentes tipos de nanopartículas de PLGA podem ser preparadas modificando suas propriedades de superfície, para auxiliar no direcionamento e estabilidade por conjugação com peptídeos (44), proteínas (45) ou ácido dimercaptosuccínico (DMSA) (43).

O ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) apresenta grandes vantagens quando utilizado como cobertura de nanopartículas. Ele é capaz de formar complexos fortes com a superfície das nanopartículas (46). Além disso, é possível imobilizar moléculas na superfície devido aos seus grupamentos químicos disponíveis. As coberturas nas nanopartículas são essenciais para a estabilização das mesmas. Para as aplicações *in vivo* e *in vitro*, as nanopartículas devem estar dispersas em soluções fisiológicas, porém na presença de sal elas tendem a aglomerar, resultando em efeitos diferentes de quando não aglomeradas. A estabilização das nanopartículas é, portanto, essencial para obter formulações que não agreguem em meio biológico e, além da cobertura, o conteúdo do meio de dispersão também é capaz de estabilizá-las (47). Alguns estudos, como Chaves *et al*, 2005 (48); Garcia *et al*, 2005 (49) e Valois *et al* 2009 (50), demonstraram que nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA apresentam uma distribuição preferencial para o pulmão.

1.5.2 Nanopartícula de poli (láctico-co-glicólico) (PLGA)

O ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) é um copolímero formado por dois monômeros, o ácido láctico (PLA) e do ácido glicólico (PGA) em diferentes proporções (Figura 5). Os dímeros cíclicos destes ácidos são ligados randomicamente por meio de ligações do tipo éster, resultando em um poliéster de cadeia alifática (51, 52).

Durante a síntese deste polímero, pode-se definir a sua cinética de degradação do sistema e de liberação da droga incorporada através da massa molecular, do grau de cristalinidade e da relação entre a quantidade de PLA e PGA utilizada para a síntese do PLGA (52, 53).

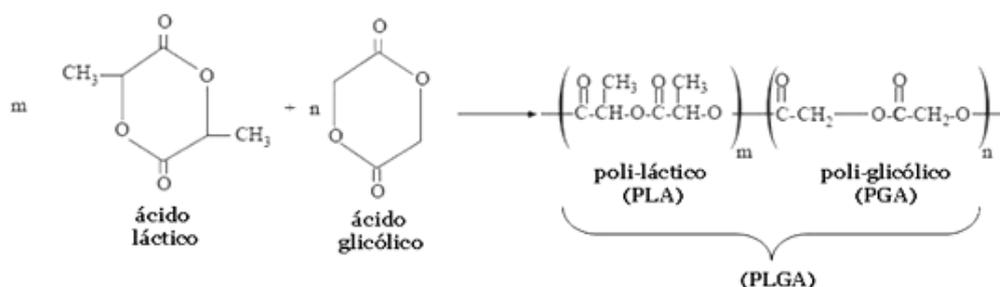


Figura 5- Estruturas químicas dos poliésteres do ácido glicólico (PGA), ácido láctico (PLA) e poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Adaptado de (40).

As nanopartículas biodegradáveis de PLGA são utilizadas no sistema de liberação controlada devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os produtos de degradação do PLGA, que incluem os ácidos láctico e glicólico, são componentes normais do ciclo de Krebs e são subsequentemente eliminados como o dióxido de carbono e água sem afetar as funções celulares normais (40, 54).

1.5.3 Biodegradação Polimérica

A biodegradação é um termo utilizado para descrever a degradação dos sistemas poliméricos quando ocorridos *in vivo*. Embora os mecanismos de biodegradação ainda não estejam muito bem descritos, sabe-se que a clivagem da

cadeia polimérica ocorre pela hidrólise das ligações éster. A hidrólise resulta em uma clivagem da cadeia de oligômeros principais produzindo oligômeros menores e, finalmente, monômeros (55).

As maneiras pelas quais pode ocorrer a biodegradação são as seguintes: (a) toda a área da matriz polimérica está sujeita às reações de hidrólise e a nanopartícula sofre erosão das porções mais internas para as mais externas; (b) a biodegradação do polímero pode estar limitada à superfície da nanopartícula exposta ao meio e tem início das camadas mais superficiais para as mais internas (35, 40) (Figura 6).

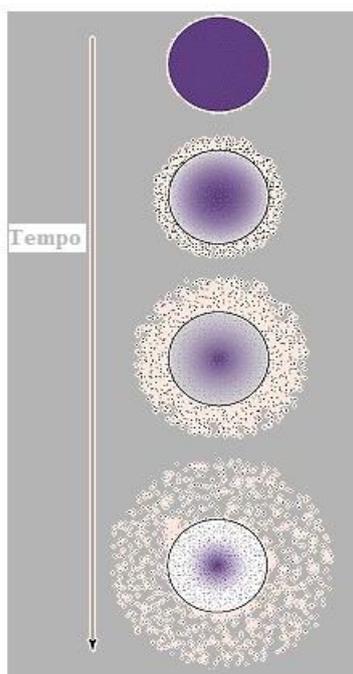


Figura 6- Exemplo de biodegradação de polímero e liberação da droga. Adaptado de <http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>, acessado em 30 de novembro de 2008.

As características do polímero determinarão qual o tipo de biodegradação que ocorrerá. Se a água penetrar facilmente no centro do polímero, toda a matriz polimérica é rapidamente hidratada e ocorre erosão de dentro para fora. Caso contrário, se a água não conseguir penetrar no centro, a erosão acontece na superfície da matriz de fora para dentro (35, 52).

1.6 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novas formas de administração que aumentem a eficiência terapêutica de drogas utilizadas para o tratamento das micoses é uma necessidade para a saúde humana, principalmente em vista dos graves efeitos colaterais provocados pelos fármacos clássicos. O uso de sistemas nanoestruturados pode representar uma melhora na sua eficiência, na medida em que diminui suas concentrações circulantes e reduz sua administração terapêutica, minimizando portanto, seus já conhecidos efeitos colaterais, e aumentando a eficácia do tratamento (56).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é avaliar a eficácia e eficiência de uma formulação de itraconazol encapsulado em nanopartículas a base de PLGA e recobertas com DMSA (ITZ-NANO), para aplicação no tratamento da Paracoccidioidomicose em modelo experimental murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a.** Caracterizar a ITZ-NANO quanto ao diâmetro, carga, eficiência de encapsulação e estabilidade;
- b.** Investigar a eficácia da ITZ-NANO contra o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, *in vitro*;
- c.** Verificar a citotoxicidade da ITZ-NANO em cultura de diferentes linhagens celulares;
- d.** Investigar a biodistribuição da ITZ-NANO em camundongos Balb C;
- e.** Comparar, em modelo experimental murino, a eficácia terapêutica da ITZ-NANO com a formulação de itraconazol livre no tratamento da Paracoccidioidomicose;
- f.** Avaliar *in vivo* os efeitos resultantes do uso da ITZ-NANO durante o tratamento da PCM com relação a aspectos clínicos e hepatotoxicidade.

3 MÉTODOS

3.1 ITRACONAZOL NANOESTRUTURADO (ITZ-NANO)

O Itraconazol nanoestruturado foi preparado pela equipe do Prof. Antônio Cláudio Tedesco da USP/RP, na concentração de 60µg de itraconazol em 300µL da suspensão aquosa de nanopartículas de PLGA (200 µg ITZ/mL).

3.2 ITRACONAZOL LIVRE (ITZ)

O Itraconazol livre foi comprado na farmácia de manipulação Farmacotécnica® sob a responsabilidade do farmacêutico Gabriel Oliveira Monteiro – CRF/DF 3164, na concentração de 10 mg/mL. Concentração usada de acordo com dados publicados por McEwen *et al*, 1985 (57).

3.3 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS.

Equipamento	Fabricante
Câmara de Neubauer	C. A. Hausser & Son, EUA
Câmara Digital	Zeiss, ALE
Centrífuga Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, ALE
Estufa	Tecnal, BRA
Estufa com Shaker	Certomat- Biotech International
Fluxo Laminar	Veco, BRA
Homogeneizador	Quimis Aparelhos Científicos, BRA
Leitora de Microplacas Modelo 3550-V	BioRad, EUA
Microscópio Axiophot	Zeiss, ALE
Micrótomo	Leica,
Shaker	Nova Técnica, BRA

Materiais	Fabricante
Frascos de Cultura	TPP, ALE
Lâmina	Perfecta, BRA
Lamínula	Perfecta, BRA
Placas de 96 poços	TPP, ALE
Placas de Petri	Prolab, BRA
Tubos Falcon de 15 e 50 mL	TPP, ALE

Reagentes	Fabricante
Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA)	Sigma, USA
Álcool	Zulu, BRA
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Azul Tripán	Sigma-Aldrich Co., EUA
Corante Verde Janus	Sigma-Aldrich, EUA
Dimercaptosuccínico (DMSA)	Sigma-Aldrich, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich Co., EUA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Gibco, USA
Itraconazol	Sigma-Aldrich, EUA
Meio BHI	Hymedia
Meio RPMI	Invitrogen, EUA
MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	Invitrogen, EUA
Parafina	Vetec, BRA
Paraformaldeído	Vetec, BRA
Soro de Cavalo	Gibco, USA
Soro Fetal Bovino	Gibco, USA
Tampão fosfato-salina (PBS)	Laborclin, BRA
Tripsina	Sigma-Aldrich, EUA
Xileno	Vetec, BRA

3.4 CARACTERIZAÇÃO DE ITZ-NANO

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As nanopartículas foram caracterizadas quanto à morfologia e tamanho por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras foram preparadas adicionando-se uma gota de uma dispersão de uma solução estoque sobre grade de cobre recoberta com filme de carbono, seguido da secagem. As análises foram realizadas em um equipamento Electron Microscope JEOL JEM 1200 operando a 100 kV. As medidas de tamanho foram realizadas com a utilização do *software* Image-ProPlus versão 5.1.

3.4.2 Medida de tamanho e dispersão

A distribuição de tamanho e dispersão das partículas foi feita usando o aparelho NanoSight (NanoSight LM20), onde um feixe de laser incide sobre a amostra de nanopartículas e várias fotos são tiradas em sequência. O resultado é um vídeo, onde é possível vê-las se movimentando caoticamente (com uma trajetória que descreve um fractal). Assim, uma gota da solução estoque foi inserida no aparelho e em seguida, analisada. Foram analisadas 900 estruturas pelo aparelho e uma média dos valores obtidos foi retirada.

3.4.3 Eficiência de encapsulamento

Para determinação da eficiência de encapsulamento foi utilizado o método de espectrofotometria no ultravioleta em um comprimento de onda de 262 nm (linearidade 3.0-17.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $y = 6.75 \times 10^{-2} X - 4.51$, $r = 0.999$). Para isso, as alíquotas contendo ITZ-NANO foram dissolvidas em DMSO (1:1, v/v) e sonicadas por 5 minutos para liberar todo o ITZ contido. As amostras foram então, diluídas em acetonitrila, com volume final de 3 mL, e filtradas em membrana de 0,4 μm . A eficiência de encapsulação do ITZ nas nanopartículas foi determinada usando a equação abaixo:

$$\text{E.E. (\%)} = \text{CN} / \text{CTH} \times 100$$

Onde E.E. significa eficiência de encapsulação de ITZ, CN é a concentração de ITZ nas nanopartículas, e CTH é a concentração teórica de ITZ. As análises foram realizadas em triplicatas e a média \pm desvio padrão foi mostrada. Experimento realizado no Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina do Prof^o Antônio Cláudio Tedesco na USP/RP.

3.4.4 Análise do Potencial Zeta de ITZ-NANO

O potencial zeta de ITZ-NANO foi medido usando anemometria laser dopler (zeta plus, zeta potential analyzer, Brookhaven instruments corporation). Uma suspensão das nanopartículas foi diluída em água deionizada antes de fazer as medidas. Cada amostra foi submetida a sete medidas e foi realizada a média das medidas para serem utilizadas como resultado final. Experimento realizado no Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina do Prof^o Antônio Cláudio Tedesco na USP/RP.

3.4.5 Estudo da Estabilidade de ITZ-NANO

Para avaliar a estabilidade de ITZ-NANO, foram realizados experimentos para verificar o potencial zeta, a citotoxicidade e a eficácia antifúngica nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias após a preparação das nanopartículas, que ficaram estocadas em geladeira sob a temperatura de 4°C. Os testes foram realizados usando os mesmos protocolos descritos aqui anteriormente (Análise do Potencial Zeta, página 26) e

alguns que serão descritos posteriormente (Eficácia Antifúngica, página 27 e Citotoxicidade, página 28).

3.5 ENSAIOS *IN VITRO*

3.5.1 Preparação do inóculo

O isolado virulento Pb18 do fungo *P. brasiliensis* da coleção de fungos do laboratório de Patologia Molecular da UnB foi cultivado em meio de cultura líquido YPD (10g yeast, 20g dextrose, 20g peptona bacteriológica, 1L água destilada) a 36° C em shaker rotatório (220 rpm). Após 5 dias de cultivo, a cultura foi centrifugada a 1000 rpm durante 3 minutos e o sedimento de células ressuspendido em PBS estéril (pH 7,4). A viabilidade celular foi determinada pelo corante Verde-Janus para preparar uma suspensão de fungos contendo 5×10^4 células viáveis/mL para o teste de microdiluição de drogas.

3.5.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A determinação da concentração mínima inibitória (MIC) foi feita com base no protocolo M-27A do NCCLS (“National Committee for Clinical Laboratory Standards”) para microdiluição seriada de drogas. Este ensaio é usado para investigar a capacidade de a célula fúngica crescer em outro meio após ter sido exposta a uma molécula tóxica para ela.

As amostras do ITZ-NANO e ITZ foram diluídas em meio RPMI 1640 nas seguintes concentrações: 100 µg/mL, 50 µg/ml, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,8 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,1 µg/mL.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato adicionando 100 µL das amostras diluídas e 100 µL da suspensão de *P.brasiliensis*. Uma placa adicional foi feita apenas com as células fúngicas, como controle, para verificar a viabilidade e crescimento do fungo. As placas foram, então incubadas por 24 hrs a 36° C sob agitação de 40 rpm em estufa com *shaker*. Após este período, 100 µL de cada poço foram adicionados em placas de Petri de vidro contendo meio BHI suplementado. Essas placas foram incubadas durante 5 dias, conforme descrito

acima, e então realizado o MIC pela contagem das unidades formadoras de colônia do fungo.

Para testes de estabilidade de ITZ-NANO, o MIC foi feito nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias após a preparação da solução de ITZ-NANO.

3.5.3 Citotoxicidade *in vitro* de ITZ-NANO

O teste de citotoxicidade celular foi avaliado pelo método de MTT conforme estabelecido na literatura (58). Em células viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenase, reduzem o substrato MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), formando cristais de formazan, que é um produto de cor azulada. Desta forma, a quantificação da produção desses cristais por células submetidas a determinado tratamento está correlacionada com sua viabilidade.

As células mesangiais de rim humano (CM) e hepatócitos AML12 (alpha mouse liver 12) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e tratadas com ITZ NANO e ITZ. Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados. A quantificação foi feita pela medida da absorbância dos poços em comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem, o controle foi considerado 100% de células vivas.

3.6 ENSAIOS *IN VIVO*

3.6.1 Animais de experimentação

Camundongos Balb/C fêmeas com idade de 8 semanas foram adquiridos do CEMIB, UNICAMP. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições controladas de luminosidade, com livre acesso à água e a

comida e alojados no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB. As técnicas utilizadas para infecção, administração dos tratamentos e sacrifício dos animais foram seguidas de acordo com as normas éticas de manuseio de animais, os quais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UnB.

3.6.2 Biodistribuição de ITZ-NANO marcadas com Tecnécio 99 (^{99m}Tc)

Para a marcação do DMSA foi utilizado um kit liofilizado contendo:

- DMSA ----- 1,0 mg
- $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- 0,4 mg

Esse kit foi radiomarcado com 370 MBq (10 mCi) de ^{99m}Tc , em 1 mL de salina ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$). Após adição do $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ aguardou-se 10 minutos em temperatura ambiente para efetiva ligação do radionuclídeo ao fármaco.

Para marcação da ITZ-NANO foi adicionada à suspensão de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ uma solução de 370 MBq de ^{99m}Tc -DMSA e a mesma foi colocada sob agitação durante 1 hora para adsorção do radiofármaco, obtendo-se, assim, as nanopartículas radiomarcadas. As ITZ-NANO marcadas e o ^{99m}Tc -DMSA livre foram injetados, por via intravenosa, em camundongos machos BALB/c ($n=3$). Transcorridas 1, 2, 4, 6 e 8 horas, imagens cintilográficas foram obtidas em gama-câmara. Após o tempo de 8 horas, os animais foram anestesiados e sacrificados, retirando-se sangue, pulmões, fígado, baço, rins e bexiga para a determinação da radioatividade em contador de radiação gama.

3.7 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES PARA A INFECÇÃO CRÔNICA

Preparou-se uma suspensão de 3×10^7 células viáveis/mL de *P. brasiliensis* (isolado Pb18) em PBS estéril (pH 7,4). Os animais foram anestesiados e inoculados com 100 μL da suspensão de células por via endovenosa (retro-orbital).

3.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais para os ensaios tiveram n= 10 animais. No 30º dia após serem infectados, como descrito acima, os animais foram divididos em grupos que receberam tratamento por 30 (5 animais/grupo) e 60 dias(5 animais/grupo) com diferentes doses das formulações propostas, sendo:

- **Grupo 1** - animais sadios;
- **Grupo 2** - animais infectados e sem tratamento;
- **Grupo 3** - animais infectados e tratados com ITZ;
- **Grupo 4** – animais infectados e tratados com ITZ-NANO.

No **grupo 3** foi administrada diariamente, via intragástrica, 100 µL da suspensão de ITZ. Numa dose de itraconazol 1 mg/100 µL ou 10 mg/mL.

No **grupo 4** foi administrado a cada três dias via intraperitoneal, 300 µL da suspensão de ITZ-NANO. Numa dose de itraconazol 60µg/ 300 µL ou 200 µg/mL.

Grupos de animais controle (**grupo 1 e 2**) receberam 100 µL PBS via intraperitoneal todos os dias.

Ao final de cada tratamento, os animais foram sacrificados para avaliação dos efeitos dos tratamentos aplicados.

3.9 HISTOPATOLOGIA

A análise histopatológica foi usada para observar a formação de granulomas e a presença de células fúngicas nos animais após os tratamentos.

Após cada período de tratamento (30 e 60 dias) os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e fragmentos dos pulmões foram coletados e fixados em paraformaldeído tamponado em PBS (4%), para serem processados de acordo com as técnicas de inclusão em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura em micrótomo. A coloração usada foi a hematoxilina-eosina (HE) para avaliar a morfologia e resposta inflamatória do órgão e Grocotti-Gomori para

identificação do fungo. Os cortes histológicos foram fotografados em Microscópio Zeiss, sendo as imagens capturadas pelo programa Axio Vision 40v 4.6.1.0. Copyright ©.

3.10 ASPECTOS FÍSICOS

Para avaliar os aspectos clínicos durante os tratamentos, os animais tiveram suas massas corporais monitoradas antes do início dos tratamentos e no dia de cada sacrifício. Além disto, os animais foram fotografados para registrar a aparência física após receberem as diferentes formulações farmacológicas.

3.11 DOSAGEM DE ENZIMAS HEPÁTICAS

O sangue de cada animal foi coletado e o soro separado por centrifugação e armazenado a -80°C . Os títulos séricos de: Transaminase Glutâmica Pirúvica, Desidrogenase Láctica e Fosfatase Alcalina foram medidos para comparar os efeitos do ITZ e ITZ-NANO. As análises foram realizadas no laboratório de Patologia Clínica Sabin®.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se o programa Prism 3.0. Para os resultados envolvendo 2 grupos empregou-se o teste t de Student não-pareado. Já comparações entre 3 ou mais grupos foram tratadas por análise de variância com o teste de Tukey. Os resultados foram considerados significantes quando $P < 0,05$ (5%).

3.13 APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O projeto de pesquisa desenvolvido na presente tese foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (anexo 1).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia e o tamanho das nanopartículas foram analisados por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde se observou semelhança na forma dessas nanopartículas, as quais apresentaram formatos regulares, esféricos e tamanhos em torno de 174 ± 86 nm (média \pm DP), como mostrado nas Figuras 7A e 7B.

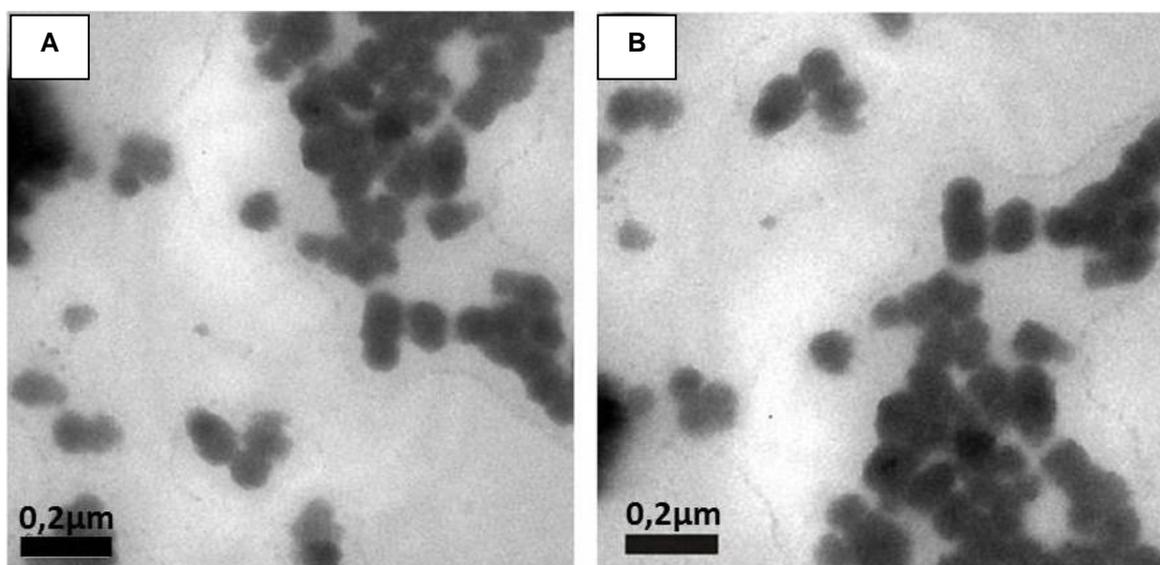


Figura 7- Microscopia eletrônica de transmissão de ITZ-NANO: as figuras A e B mostram partículas com formatos arredondados, densidades similares, e tamanho médio de 174 nm. Barra de: 0.2 µm.

4.1.2 Medida de tamanho e dispersão

Por meio de análises de monitoramento realizadas no aparelho NanoSight, observou-se que a ITZ-NANO apresentou um tamanho médio de 170 ± 83 nm, com picos de 209 nm (Figura 8).

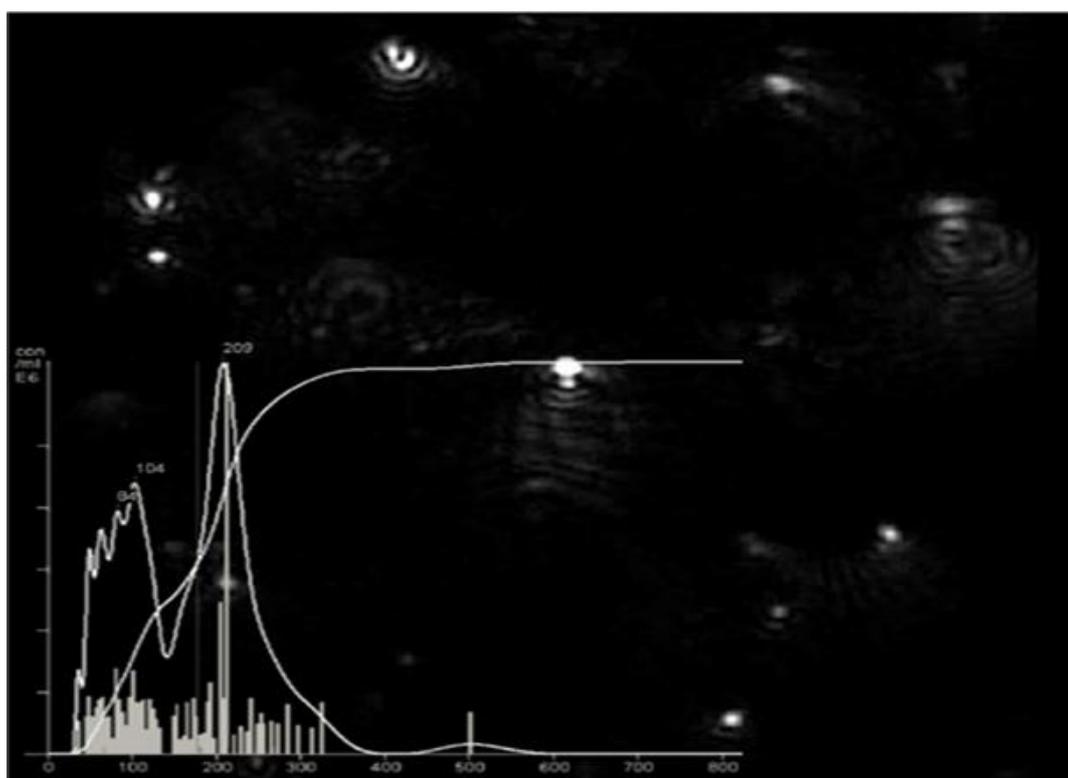


Figura 8- Medida de tamanho e dispersão pelo aparelho NanoSight: o gráfico apresenta medidas de ITZ-NANO, com média de 170 nm e picos de 209 nm.

4.1.3 Eficiência de encapsulamento

Por meio do método de espectrofotometria por UV observou-se que o itraconazol foi encapsulado de maneira eficiente nas nanopartículas com uma eficiência de $72,8 \pm 3,50\%$ (média \pm DP).

4.1.4 Análise do Potencial Zeta de ITZ-NANO

Por meio de anemometria laser doppler, a ITZ-NANO se mostrou com carga negativa cujo valor médio foi de -40mV.

4.2 ESTABILIDADE DE ITZ-NANO

Realizaram-se testes para verificar o potencial zeta, a citotoxicidade e a eficácia antifúngica de ITZ-NANO nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias após a preparação das nanopartículas.

4.2.1 Potencial Zeta

A medida de potencial zeta mostrou que as nanopartículas apresentaram uma carga negativa de -40mV nos tempos 0, 15 e 30 dias. Contudo, no tempo 60 dias, houve uma mudança na carga, passando para -50 mV (Figura 9).

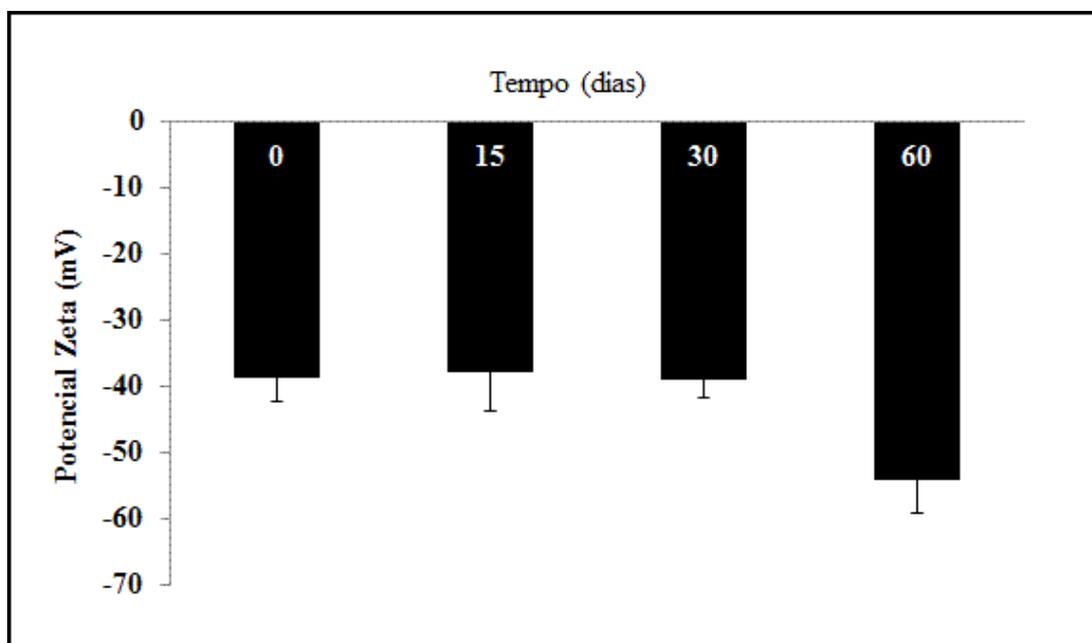


Figura 9- Potencial zeta de amostras de ITZ-NANO monitoradas durante 60 dias: mostra que as nanopartículas apresentaram uma carga negativa e que após 30 dias de estoque essa carga diminuiu.

4.2.2 Eficácia Antifúngica de ITZ-NANO

Avaliou-se a eficácia antifúngica de ITZ-NANO por meio do teste MIC nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias. Os resultados mostraram que no tempo zero e no tempo 15 dias, obteve-se um MIC de 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 30 dias, a sua efetividade foi maior, na medida em que a concentração de inibição das colônias se reduziu para 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No tempo 60 dias, essa efetividade aumentou ainda mais, já que a concentração de inibição das colônias caiu para 0,4 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Desse modo, após 60 dias, a ITZ-NANO se mostrou tão efetiva quanto o ITZ na redução do crescimento do fungo. O ITZ apresentou o mesmo resultado (0,4 $\mu\text{g} / \text{mL}$) em todos os tempos estudados (Figura 10).

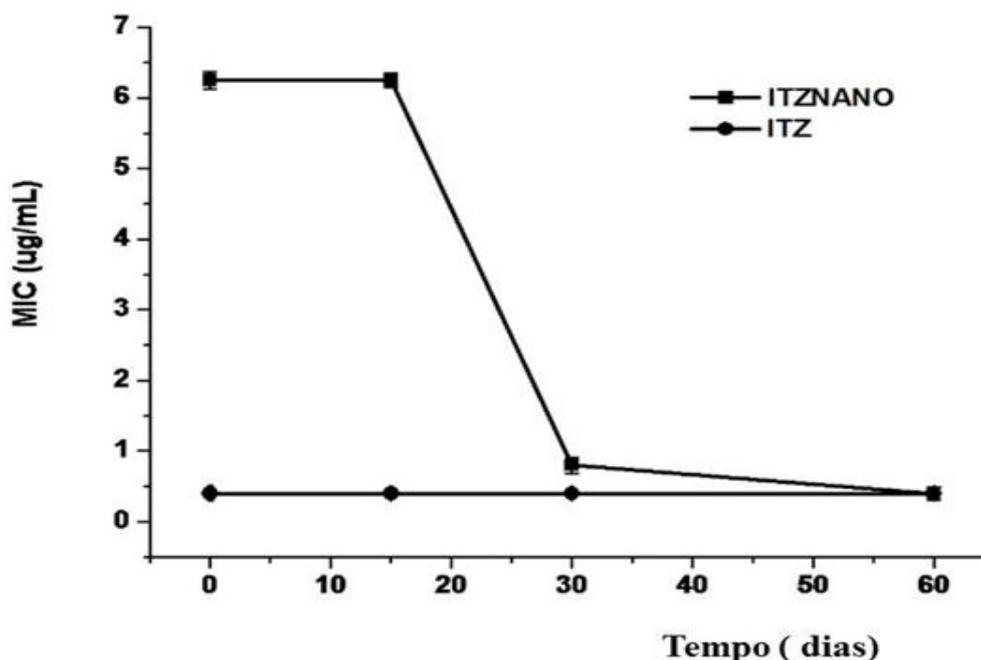


Figura 10- Atividade antifúngica de ITZ-NANO e ITZ contra *P.brasiliensis* nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias. A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada por contagem de colônias após 24 horas de incubação do fungo com diferentes concentrações de droga. Cada concentração de ITZ-NANO e ITZ foram testadas em duplicata e repetidas duas vezes em experimentos separados. Os resultados estão apresentando a menor concentração necessária para reduzir o número de colônias a zero.

4.2.3 Citotoxicidade de ITZ-NANO

Avaliou-se, por meio de ensaios de MTT, a citotoxicidade de ITZ-NANO e ITZ (Figuras 11A e 11B) e verificou-se que a ITZ-NANO mostrou menor toxicidade em células mesangiais de rim (CM) e hepatócitos em comparação com o ITZ.

Nos testes em CM, com as concentrações de 200 µg/ mL de ITZ-NANO e de ITZ, encontrou-se 83% e 20% de viabilidade celular, respectivamente ($P < 0,05$). Em uma concentração maior, de 400 µg / mL, constatou-se que ambas as amostras apresentaram citotoxicidade mais elevada. Contudo, a ITZ-NANO se mostrou menos citotóxica, com 45% de viabilidade celular, enquanto o ITZ apresentou viabilidade de apenas 11%.

Ainda nesse contexto, nos ensaios em hepatócitos, com as concentrações de 200 µg/ mL de ITZ-NANO e de ITZ, a porcentagem de células vivas foi de 44% e 15%, respectivamente. Em uma concentração maior, de 400 µg / mL, constatou-se que ambas as amostras apresentaram citotoxicidade mais elevada. Contudo, a ITZ-NANO se mostrou menos citotóxica, com 32% de viabilidade celular, enquanto o ITZ apresentou viabilidade de apenas 12%.

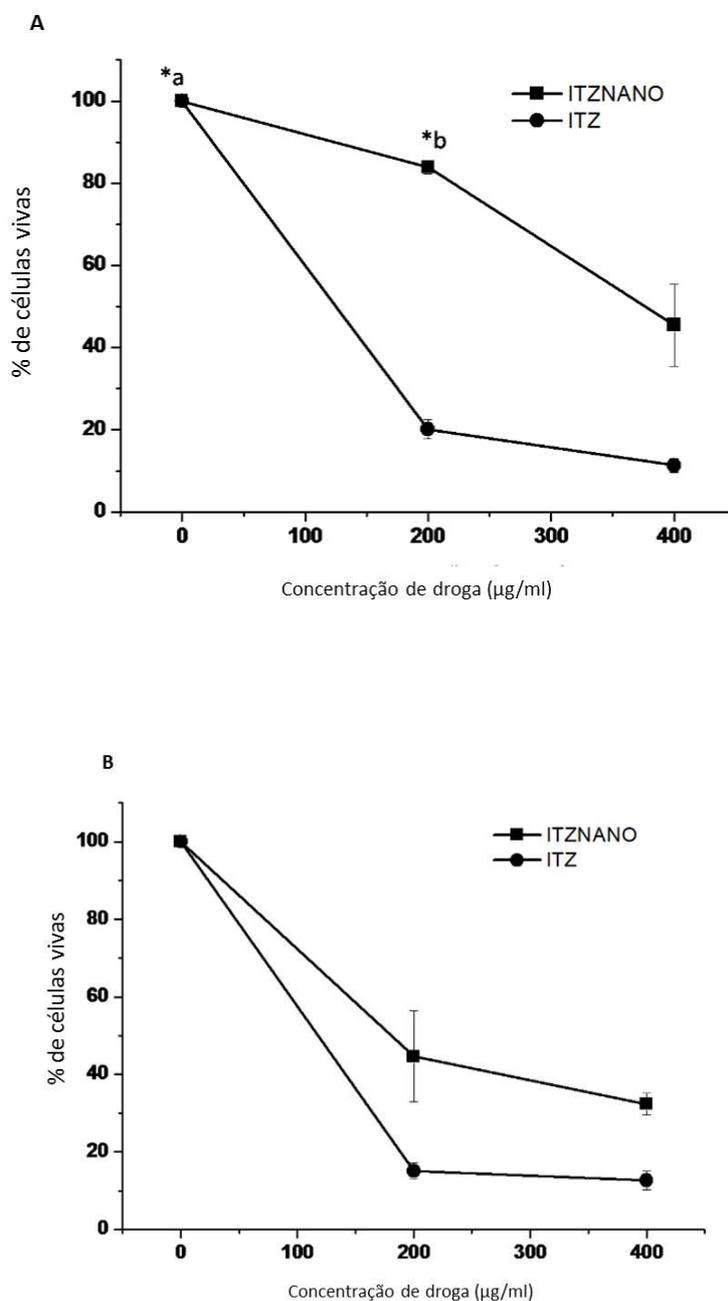


Figura 11- Citotoxicidade de ITZ-NANO e ITZ nas células mesangiais de rim humano (CM) (A) e hepatócitos de rato AML12 (B): a viabilidade celular foi expressa em % de células vivas e foi calculado como $(Nt / Nc) \times 100$, onde Nt e Nc é o número de células vivas no grupo tratado e no grupo não tratado, respectivamente. A viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT após 24 horas de incubação dos tratamentos com as células. Diferentes concentrações de nanopartículas foram testadas em triplicata e repetidos duas vezes em experimentos separados. Os resultados são expressos como média \pm D.P. de células vivas.

*a: $p < 0,05$ controle vs ITZ-NANO e ITZ

*b: $p < 0,05$ ITZ-NANO vs ITZ.

Os testes de MTT em células mesangiais de rim para avaliar a toxicidade das nanopartículas nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias, após a sua preparação, mostraram que a ITZ-NANO continua apresentando baixa toxicidade nessas células, com viabilidade superior a 60% (Figura 12).

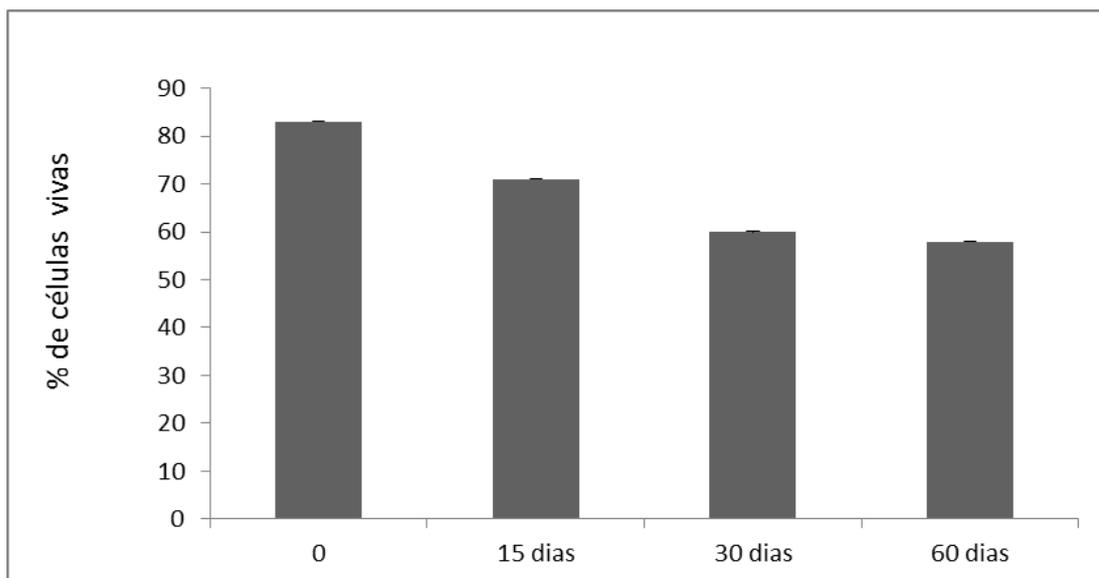


Figura 12- Citotoxicidade de ITZ-NANO em células mesangiais de rim humano (CM) durante 60 dias: a viabilidade celular foi expressa em % de células vivas e foi calculada como $(N_t / N_c) \times 100$, onde N_t e N_c é o número de células vivas no grupo tratado e no grupo não tratado, respectivamente. A viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT após 24 horas de incubação dos tratamentos com as células. Os resultados são expressos como média \pm D.P. de células vivas.

4.3 BIODISTRIBUIÇÃO DE ITZ-NANO

Marcou-se a ITZ-NANO com radioisótopo tecnécio 99 (^{99m}Tc -DMSA). Desse modo, os dados indicaram que houve captação estatisticamente maior das ITZ-NANO para pulmões ($13,44 \pm 0,69\%$) e fígado ($9,25 \pm 0,32\%$) quando comparados com o ^{99m}Tc -DMSA livre ($3,53 \pm 0,19\%$) e ($6,62 \pm 0,19\%$), respectivamente. Por outro lado, a captação das ITZ-NANO ($36,74 \pm 5,65\%$) foi estatisticamente menor nos rins em relação ao ^{99m}Tc -DMSA livre ($55,19 \pm 2,85\%$) (Figura 13).

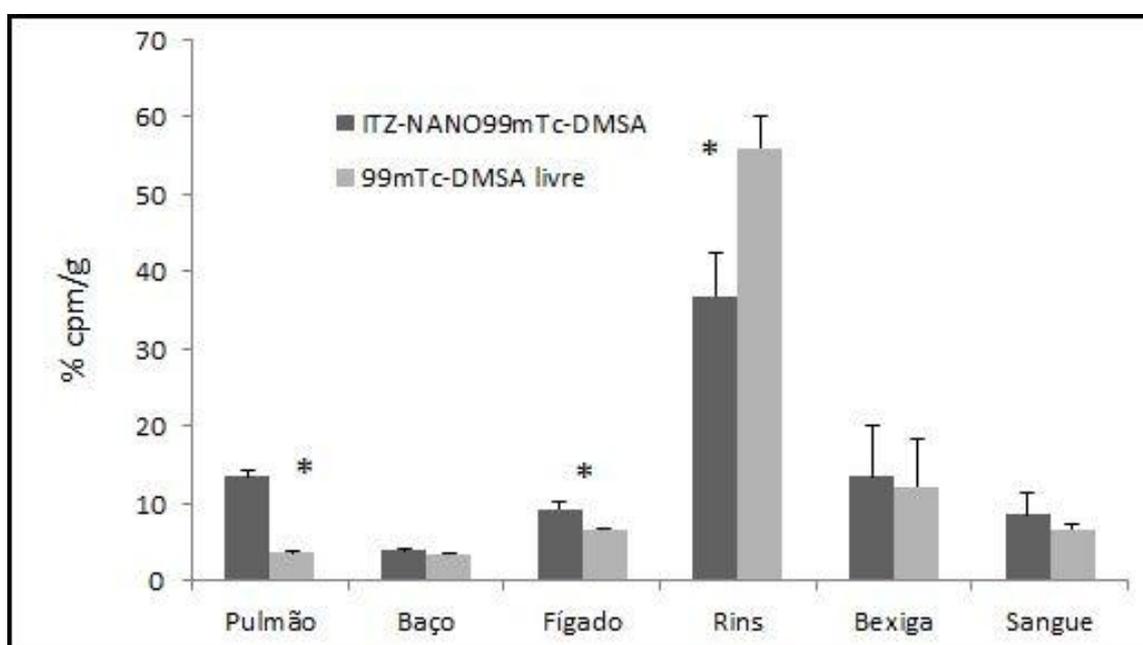


Figura 13- Perfil de biodistribuição de ITZ-NANO ^{99m}Tc -DMSA e ^{99m}Tc -DMSA livre.

As imagens cintilográficas ressaltaram a captação renal do ^{99m}Tc -DMSA livre, característica deste radiofármaco. Entretanto, quando se utilizou as ITZ-NANO observou-se maior concentração de radioatividade nas regiões abdominal e torácica, sugerindo captação pelo fígado e pulmões (Figura 14).

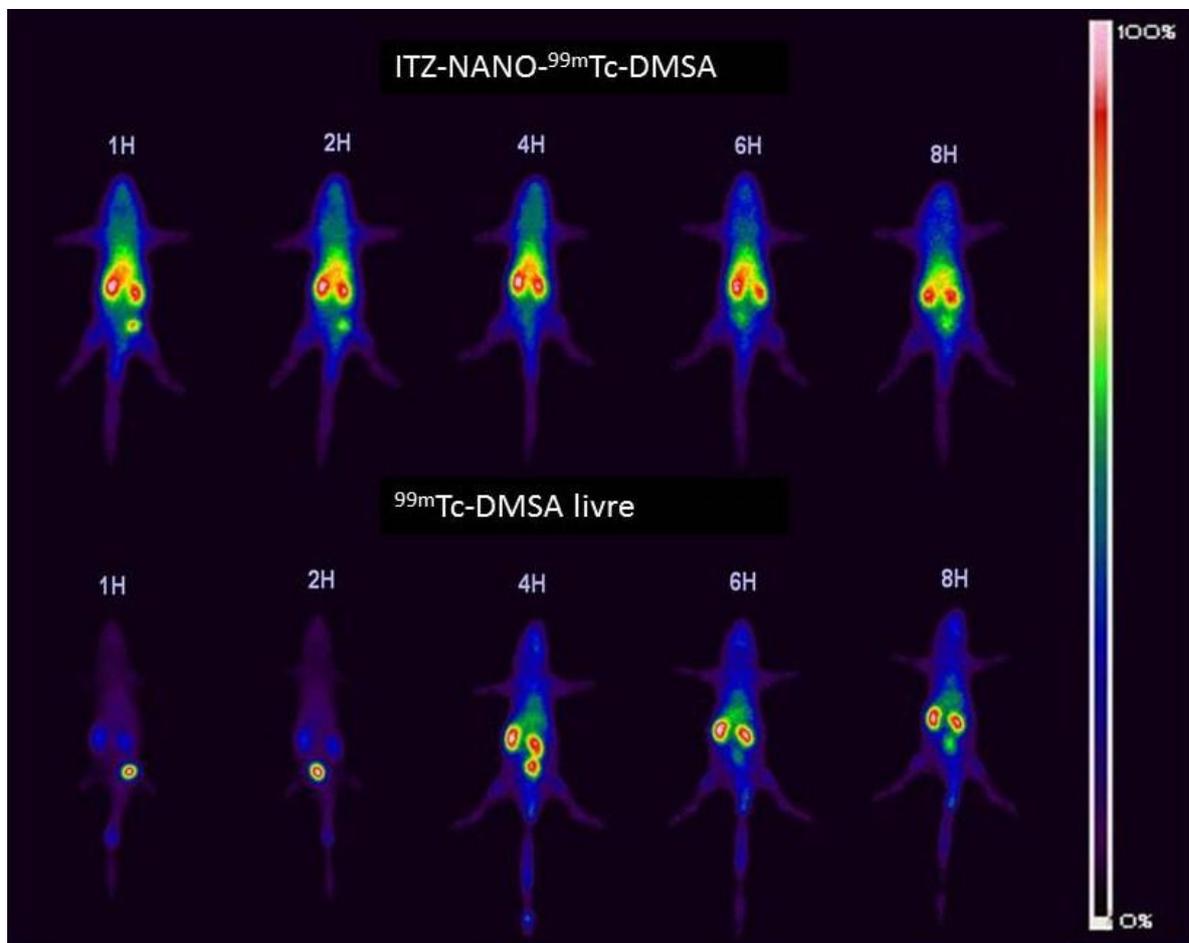


Figura 14- Imagens da biodistribuição de ITZ-NANO^{99m}Tc-DMSA e ^{99m}Tc-DMSA livre nos tempos 1, 2, 4, 6 e 8 horas após a injeção endovenosa.

4.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ITZ-NANO *IN VIVO*

Após 30 dias da infecção experimental com *P. brasiliensis* em camundongos Balb C, iniciou-se o tratamento com doses diárias de ITZ e doses de ITZ-NANO a cada 3 dias.

A fim de avaliar a eficácia antifúngica de ITZ-NANO e ITZ, após 30 dias do início do tratamento, realizaram-se análises histopatológicas nos pulmões dos animais experimentais. Na Figura 15, pode-se observar fotomicrografias de pulmões de animais saudáveis com aparência e morfologia normais e livres de infecção (15A). As

figuras 15B e 15C mostram pulmões com parênquima espesso, presença de infiltrado inflamatório e granuloma com células fúngicas, característico de animais infectados com *P. brasiliensis*.

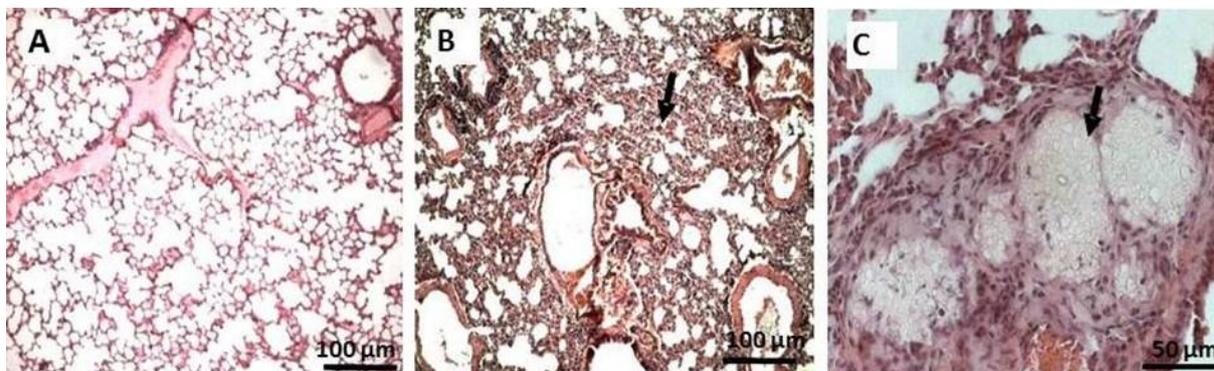


Figura 15- Fotomicrografias dos pulmões de animais sadios (grupo 1) e infectados sem tratamento (grupo 2). Em A, órgão normal sem infecção (HE). Em B, órgão infectado sem tratamento, com parênquima espesso e infiltrado inflamatório intenso (seta) (HE). Em C granuloma com presença de células fúngicas (seta), corados com HE.

A análise histopatológica dos pulmões dos animais tratados por 30 dias com o ITZ mostrou comprometimento do órgão com grandes infiltrados inflamatórios, parênquima espesso e granulomas com presença de células fúngicas (Figura 16).

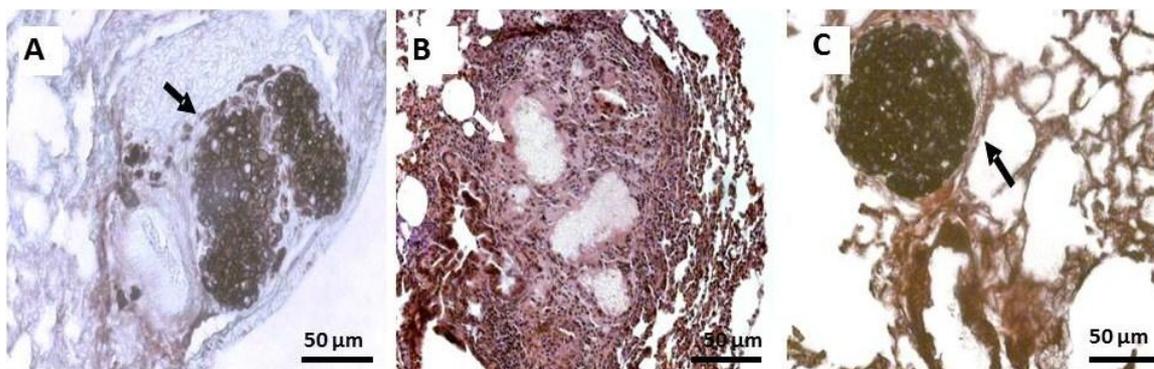


Figura 16- Fotomicrografias dos pulmões de animais infectados e tratados com ITZ: a figura A apresenta o órgão infectado e tratado com ITZ, mostrando massa de fungos (seta) corados com Grocott e a mesma identificação corada com HE (B). Em C, massa de fungos (seta) e parênquima livre infiltrado inflamatório (Grocott).

O tratamento efetuado com ITZ-NANO por 30 dias, revelou um moderado comprometimento dos pulmões caracterizado por infiltrado inflamatório, mas não se viu granulomas e nem células fúngicas, como observou-se nos pulmões dos animais tratados com ITZ (Figura 17).

Nos tratamentos efetuados por 60 dias, observou-se uma melhora no grupo tratado com ITZ-NANO, no qual se notou clara redução nas regiões com infiltrado

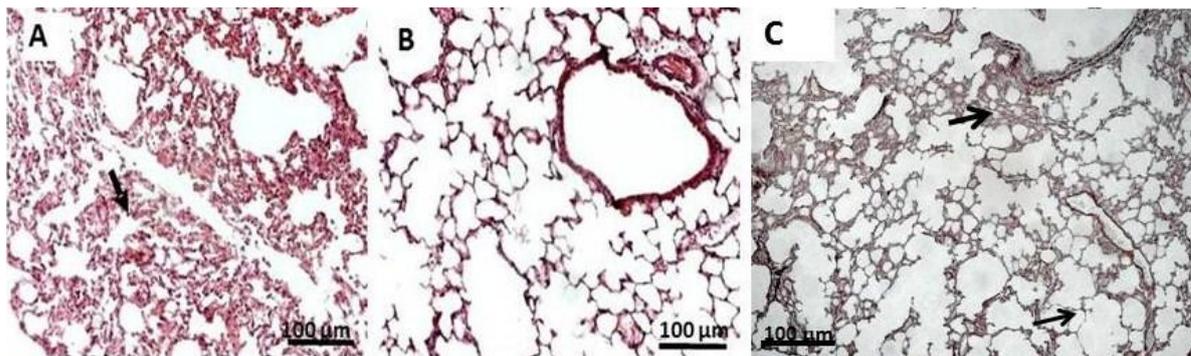


Figura 17- Fotomicrografias dos pulmões infectados e tratados com ITZ –NANO: em A, B e C, órgão infectado e tratado com ITZ-NANO; parênquima com pouco infiltrado inflamatório (seta) e corados com HE (A) e, outra região livre de infiltrado inflamatório (HE) (B). A figura C mostra duas regiões, uma com pouco infiltrado inflamatório (seta) e outra com alvéolos livres de infiltrado, corado com Grocott.

inflamatório do órgão, que se apresentou com parênquima sem alterações e alvéolos livres. O grupo tratado com ITZ permaneceu com infiltrado inflamatório e parênquima espesso, contudo, não se viu granulomas com células fúngicas (Figura 18).

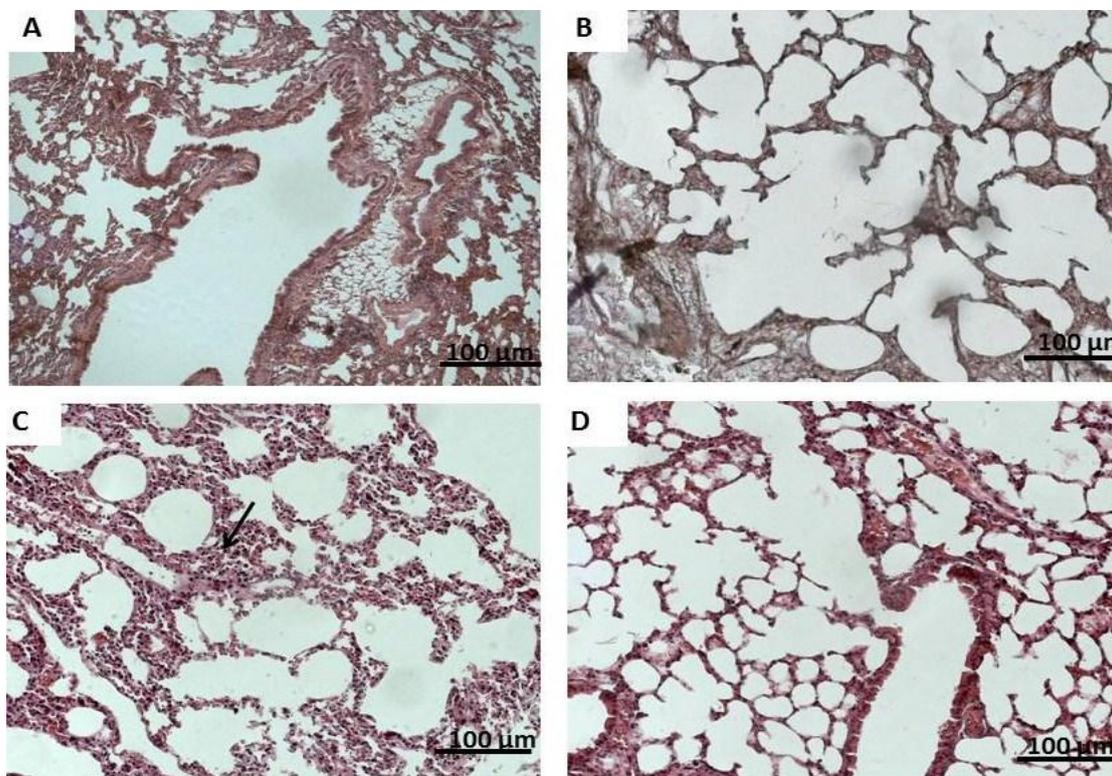


Figura 18- Fotomicrografias dos pulmões com 60 dias de tratamento: em A e B, órgãos infectados e tratados com ITZ, com parênquima espesso e infiltrado inflamatório (A). Em B, outra área do corte, mostrando uma região livre de infiltrado inflamatório. Em C e D, órgão infectado e tratado com ITZ-NANO, mostrando um pouco infiltrado (seta) (C) e outra área, aparentemente normal (D).

4.5 DOSAGENS DAS ENZIMAS HEPÁTICAS

As análises bioquímicas das enzimas: Transaminase Pirúvica, Gama Glutamil Transferase, Fosfatase Alcalina e Desidrogenase Lática realizadas 30 dias após o início dos tratamentos não mostraram diferenças significativas em nenhum dos grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1- Quantificação das enzimas hepáticas após 30 dias de tratamento com ou sem ITZ-NANO e ITZ. Os resultados mostram a média \pm DP. Os valores estão expressos em U/L.

Grupos	Transaminase Pirúvica	Desidrogenase Láctica	Fosfatase Alcalina	Gama Glutamil
Sadio	52 \pm 3,55	2.277 \pm 379	70 \pm 15,4	3 \pm 0,44
Infectado	50,75 \pm 9,79	1.836 \pm 403	60 \pm 2,70	2,5 \pm 0,38
ITZ	57,6 \pm 19	2.536 \pm 450	41 \pm 18	2,4 \pm 0,8
ITZ-NANO	51,25 \pm 14	2.332 \pm 621	27,75 \pm 8,5	1,5 \pm 0,78

Por outro lado, no tratamento de 60 dias, as enzimas Desidrogenase Láctica e Fosfatase Alcalina se mostraram alteradas (Tabela 2). O grupo tratado com ITZ apresentou uma maior produção de Desidrogenase Láctica que os demais grupos ($p < 0,05$). E o grupo tratado com ITZ-NANO apresentou a enzima Fosfatase Alcalina diminuída em relação aos outros grupos ($p < 0,05$). A quantidade de soro não suficiente para dosar a enzima Gama Glutamil.

Tabela 2- Quantificação das enzimas hepáticas após 60 dias de tratamento com ou sem ITZ-NANO e ITZ. Os resultados mostram a média \pm DP. * $p < 0,05$. Os valores estão expressos em U/L

Grupos	Transaminase Pirúvica	Desidrogenase Láctica	Fosfatase Alcalina
Sadio	51,5 \pm 4,7	1.450 \pm 375	63,75 \pm 24
Infectado	48 \pm 8	1.433 \pm 288	58,6 \pm 4,5
ITZ	68 \pm 20	1.802 \pm 145 *	45,8 \pm 18
ITZ-NANO	50 \pm 15	1.700 \pm 180	25,8 \pm 8 *

4.6 AVALIAÇÕES DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS

Monitorou-se a massa corporal dos animais antes e ao final do tratamento. Desse modo, pode-se observar (Tabela 3) que a massa corporal dos animais não infectados, aumentou cerca de 6% enquanto a massa corporal dos animais infectados e sem tratamento aumentou 3%. Contudo, nos animais infectados e tratados com ITZ-NANO observou-se uma pequena redução na massa corporal de cerca de 2%. Por outro lado, essa alteração foi mais significativa nos animais tratados com ITZ, que perderam em torno de 15% de massa corporal ao final de 60 dias de tratamento.

Tabela 3- Avaliação da massa corporal de acordo com cada grupo experimental nos dias 30 e 60 após o início dos tratamentos: os resultados mostram a média \pm desvio padrão do peso corporal dos animais

Grupos	Tempo 0	30 dias	Varição (g)	60 dias	Varição (g)
Sadio	22,89 \pm 1,22	24,95 \pm 0,49	8%	26,50 \pm 0,70	6%
Infectado	21,33 \pm 1,06	22,29 \pm 1,01	4%	23,15 \pm 0,79	3%
ITZ	20,95 \pm 1,42	23,80 \pm 2,10	13%	20,44 \pm 0,89	-15%
ITZ-NANO	20,84 \pm 2,82	22,98 \pm 1,38	10%	22,61 \pm 0,32	-2%

4.7 ASPECTOS FÍSICOS DOS ANIMAIS

Monitorou-se o aspecto físico dos animais diariamente após o início dos tratamentos. A figura 19 demonstra o animal que melhor representa o seu grupo de tratamento. Observou-se que os animais infectados e tratados com ITZ apresentaram alopecia em seu ventre e a pelagem do dorso disforme e arrepiada após 30 dias. Esse efeito foi observado em todos os animais desse grupo (Figuras 19A e 19B). Por outro lado, de modo diferente do que se viu nos animais tratados com ITZ, os animais infectados que receberam a ITZ-NANO apresentaram um padrão de pelagem semelhante ao grupo controle (Figuras 19C e 19D), sem alterações em seu aspecto físico.



Figura 19- Aspectos físicos dos animais após os tratamentos com ITZ-NANO e ITZ . Em A e B, animal tratado com ITZ mostrando alopecia. Animais C e D tratados com ITZ-NANO mostrando uma pelagem de aparência saudável.

5 DISCUSSÃO

A escolha do fármaco a ser adotado para tratar a PCM requer uma análise do estado geral do paciente e do estágio da doença. Em casos graves, é utilizado o itraconazol ou a anfotericina B e após o controle da infecção a manutenção do tratamento segue com a administração de um derivado sulfonamídico (9). No entanto, apesar da variada opção de tratamentos disponíveis, algumas desvantagens ainda são observadas em consequência do uso dessas drogas. Por exemplo, o itraconazol, apesar da sua eficácia terapêutica e amplo espectro de ação, requer cuidados de monitoramento do paciente durante a sua administração devido ao seu histórico de efeitos tóxicos adversos (29).

Deste modo, uma proposta terapêutica atraente que procura melhorar a terapia com fármacos tóxicos, como no caso do itraconazol, é a utilização de formulações alternativas que visam à administração segura e com maior praticidade.

Nesse contexto, a nanobiotecnologia possibilita o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para a entrega de fármacos, as quais podem evitar muitos dos problemas relacionados à baixa eficiência ou aos efeitos colaterais clássicos de fármacos já empregados na prática clínica. Isso se deve em grande parte ao fato de que a farmacocinética ou mesmo a farmacodinâmica de um fármaco encapsulado em nanopartículas podem ser modificadas de modo a otimizar suas propriedades farmacológicas (59).

Neste estudo, desenvolveu-se uma nanopartícula de PLGA recoberta com DMSA e composta com itraconazol como fármaco de escolha com o objetivo de reduzir o número de doses, a concentração do fármaco e também os efeitos colaterais desencadeados pela administração do mesmo durante o tratamento da infecção fúngica PCM. Essa proposta se baseou nos sistemas de entrega e liberação controlada de diferentes classes de fármacos, incluindo antimicrobianos, antifúngicos e antagonistas hormonais; com o objetivo de agregar uma quantidade de droga acima da dosagem mínima requerida, melhorando a eficácia do tratamento e possibilitando a diminuição do número de aplicações do fármaco (60-63).

Os sistemas de liberação controlada, após injetados no paciente, possuem a característica de atuar de forma sistêmica ou em regiões específicas do corpo, onde liberam o princípio ativo de maneira gradual e controlada, minimizando os efeitos colaterais (64, 65). Cita-se como exemplo do uso dos sistemas de liberação as nanopartículas de PLGA carregadas com o antibiótico ciprofloxacina, o qual é

liberado por duas semanas, apresentando eficácia superior na inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli* quando comparadas com o fármaco livre; outro exemplo é a eficiente entrega de anfotericina B do conjugado PLGA-PEG, que mantém o padrão por nove dias após a administração (65).

Há diversas técnicas disponíveis para encapsulação de fármacos e a decisão do método a ser utilizado depende da matriz da nanopartícula, do fármaco, do local de ação e do protocolo terapêutico em questão. Qualquer que seja o método de escolha faz-se necessária a caracterização das nanopartículas obtidas, o que engloba: eficiência de encapsulamento do fármaco, avaliação de diâmetro e morfologia, determinação do potencial zeta, estabilidade da preparação em função do tempo de armazenamento, dentre outras (38).

Desse modo, as nanopartículas ITZ-NANO, estudadas nesse trabalho, apresentaram uma boa eficiência de encapsulação ($72,76 \pm 3,50\%$ / Média \pm DP), resultado que está de acordo com dados publicados por Italia *et al*, 2007 (55), que conseguiram uma eficiência de encapsulação de 79% utilizando o mesmo polímero e também uma droga de baixa solubilidade em água, como a utilizada nesse estudo.

A ITZ-NANO apresentou um diâmetro médio de 174 ± 86 nm (Média \pm DP) (Figuras 7 e 8), com formatos regulares e esféricos. Em geral, as partículas menores (100 a 500 nm) tem a possibilidade de permear através de barreiras fisiológicas além de atravessar a membrana de células epiteliais por meio da endocitose (66). Além disso, as nanopartículas com diâmetro inferior a 200nm apresentam uma tendência de retenção nos pulmões e um maior transporte transepitelial quando comparadas com partículas maiores (67). A razão para essa retenção ainda não está totalmente esclarecida, embora possa estar relacionada ao diâmetro. Isso pode representar um grande potencial de aplicação no sistema de entrega da droga ao alvo (68). Desse modo, sugere-se que a utilização de ITZ-NANO com diâmetro inferior a 200nm seja capaz de contribuir no direcionamento desse fármaco aos pulmões.

Sabe-se que as nanopartículas compostas pelo copolímero de PLGA apresentam carga negativa, haja vista a presença de grupos carboxílicos terminais no copolímero (69, 70), fato que foi confirmado pelo potencial zeta das ITZ-NANO (média de -40 mV). O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em

razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio de dispersão (71). As características de superfície das partículas também podem alterar a resposta biológica do fármaco associado. Quando se administram intravenosamente sistemas de nanopartículas convencionais, estes são rapidamente removidos da circulação sanguínea pela ação de células do sistema fagocitário mononuclear, dificultando a chegada do fármaco ao sítio de ação. Diferentes estratégias têm sido propostas para modificar a distribuição *in vivo* das nanopartículas, baseadas principalmente na redução da hidrofobicidade da superfície das partículas através da adsorção física de uma molécula hidrofílica, como o DMSA, que contribuiu também para a carga negativa da ITZ-NANO (70, 72, 50).

Cabe observar que o armazenamento das nanopartículas a 4°C por até 60 dias, mostrou alterações na carga (potencial zeta) (Figura 9) e aumento da eficácia antifúngica (Figura 10) após 30 dias. A diminuição de 20% no potencial zeta da ITZ-NANO após 30 dias (de -40 para -51 mV), bem como a maior eficácia antifúngica relaciona-se, provavelmente, à degradação do polímero, o que aumenta a liberação do fármaco no meio, potencializando seus efeitos nas células fúngicas (72, 73), apresentando, dessa forma, o mesmo efeito fungistático que o fármaco livre.

Por outro lado, como citado anteriormente, o itraconazol é um fármaco que, embora apresente um excelente espectro de ação fungicida, provoca também toxicidade em células normais, especialmente nas hepáticas. Isso ocorre em face da sua interação com o citocromo P-450, que causa alterações nas enzimas hepáticas e a inibição do sistema enzimático dos mamíferos, tais como aqueles envolvidos com a síntese de hormônios esteróides e prostaglandinas, que são dependentes dessa estrutura (74-78).

Assim, para se avaliar a segurança da ITZ-NANO em células normais, estudou-se sua citotoxicidade por meio do ensaio de MTT. A incubação da ITZ-NANO e do ITZ em células normais mostrou perfis diferentes. Com a ITZ-NANO, a viabilidade celular foi superior a 83% e 44% em células mesangiais de rim e hepatócitos, respectivamente. O ITZ apresentou toxicidade em ambas as linhagens celulares (Figuras 11A e 11B), o que resultou em 80% de células mortas. Os resultados de MTT feitos apenas com células mesangiais de rim por 15, 30 e 60 dias após a síntese das nanopartículas, (Figura 12), mostraram que as mesmas não

provocaram significativo aumento da toxicidade nessas células, obtendo mais de 60% de viabilidade celular, o que demonstra um alto grau de estabilidade do preparado, e que condiz com a hipótese de pequena biodegradação do polímero e liberação de uma certa quantidade de fármaco para o meio. No entanto, foi visto que esta degradação não é suficiente para trazer drástica toxicidade celular. Isso fica mais evidente quando se observa os resultados *in vivo*, nos quais há clara diminuição dos efeitos colaterais nos animais.

Esses resultados indicaram que a incorporação do fármaco em nanopartículas de PLGA promoveu proteção contra a toxicidade do mesmo. O que está em conformidade com outros estudos realizados em linhagens celulares e com fármacos diferentes e que também apresentaram menor toxicidade quando encapsulados em nanopartículas de PLGA (77). Além disso, estudos de Yi *et al*, 2007 (78) utilizando hemácias, mostraram que o itraconazol em micelas de PLA apresentou menor hemólise (18%) em comparação com o fármaco livre (93%).

Por meio dos experimentos *in vitro* com a ITZ-NANO, observou-se que essa nanopartícula foi tão eficiente quanto o fármaco livre (ITZ) no combate ao *P. brasiliensis*. Além disso, a ITZ-NANO apresentou maior segurança em comparação com a droga livre, com menor toxicidade em células renais e hepáticas. Todos os resultados *in vitro* acima descritos, além de se fazerem necessários para o desenvolvimento e aplicação de novos fármacos, foram suficientes para a continuidade dos estudos *in vivo*, fornecendo uma base científica considerável.

Baseando-se no propósito de direcionamento das nanopartículas aos pulmões, estudou-se a biodistribuição de ITZ-NANO após a marcação das nanopartículas com tecnécio 99. Esse radioisótopo tem sido útil na compreensão do destino *in vivo* dos fármacos encapsulados (79). Os resultados obtidos demonstraram captação estatisticamente maior das ITZ-NANO pelos pulmões ($13,44 \pm 0,69\%$) e pelo fígado ($9,25 \pm 0,32\%$), quando comparado com o DMSA livre ($3,53 \pm 0,19\%$) e ($6,62 \pm 0,19\%$), respectivamente, após 8 horas da injeção endovenosa das nanopartículas (Figura 14). Como observado, essa diferença nas captações para pulmões e fígado apresenta um perfil bastante distinto do que normalmente se espera do DMSA livre marcado com tecnécio, já que este é preferencialmente captado pelos rins (79, 80) (Figura 15).

Stevanovi *et al*, 2008 (81), estudaram a biodistribuição de nanopartículas de PLGA sem cobertura, também marcadas com tecnécio 99. Os autores encontraram uma captação nos pulmões de apenas 1,97% nos primeiros 30 minutos, 1,44% em 60 minutos, e 0,80% em 120 minutos, após a aplicação. Resultado semelhante também foi apresentado por Mondal *et al*, 2010 (82), no qual trabalharam com nanopartículas de PLGA que mostraram captação de 1,04% para pulmões após 4 horas da injeção endovenosa. Essa diferença comparada maior quantidade de ITZ-NANO direcionada para os pulmões indica uma maior afinidade dessas partículas por esse órgão, o que pode ser decorrente de dois fatores: i) o seu tamanho - partículas menores que 200 nm podem apresentar retenção nos pulmões; e ii) a presença do DMSA na superfície das nanopartículas.

Destaca-se, no entanto, que apesar de as partículas estudadas por Stevanovi *et al*, 2008 e Mondal *et al*, 2010 apresentarem diâmetro menor que 200 nm, o tamanho por si não foi suficiente para direcionar uma maior quantidade de nanopartículas para os pulmões, o que reforça a importância da presença do DMSA na obtenção de uma maior quantidade de ITZ-NANO para aquele órgão.

Além disso, estudos anteriores do laboratório demonstraram que nanopartículas magnéticas à base de maghemita e magnetita recobertas com DMSA tiveram uma distribuição preferencial para os pulmões (49, 50). No entanto, não se observou o mesmo resultado quando o núcleo (maghemita e magnetita) foi associado com dextran (83), o que sugere ser o DMSA a molécula responsável por esse direcionamento.

Sabe-se que em nanopartículas com a superfície modificada com moléculas hidrofílicas, como o DMSA, ocorre uma minimização da opsonização, aumentando o tempo de circulação no sangue e eventual diminuição da quantidade de partículas que atingem o fígado (70). Dessa forma, poderia ocorrer uma maior retenção nos pulmões, talvez, devido à presença de capilares sanguíneos de menor diâmetro nesse órgão. Novos experimentos necessitam ser realizados para testar as diferentes hipóteses.

A formulação ITZ-NANO foi desenvolvida para promover uma liberação sustentada e gradual do itraconazol após a primeira injeção. À medida que se incorporou ao copolímero uma quantidade de itraconazol suficiente para três doses em uma única administração, pode-se reduzir o número de injeções da ITZ-NANO.

Assim, a ITZ-NANO numa dose terapêutica de 60 µg/300µL, administrada a cada três dias, por um período de trinta dias, foi eficaz no controle da infecção pulmonar observada na PCM, como se pode observar nas fotomicrografias dos pulmões (Figuras 17 e 18), onde se viu infiltrado inflamatório, mas não se observou a presença de células fúngicas nesses órgãos. Por outro lado, nos animais tratados com o ITZ (1 mg/mL) diariamente, que é uma dose estabelecida para tratamento para camundongos (57), foi observado infiltrado inflamatório e granulomas com células fúngicas (Figura 16). Isso mostra que o tratamento com a ITZ-NANO apresentou um efeito terapêutico melhor que o ITZ, sendo considerado mais efetivo já que sua administração foi realizada a cada três dias.

Com sessenta dias de tratamento, em ambos os grupos de animais (ITZ e ITZ-NANO), ainda havia comprometimento dos pulmões, que se caracterizava por infiltrado inflamatório e parênquima espesso, porém não foi mais observado a presença de células fúngicas nos animais tratados com ITZ.

Esses resultados com ITZ, estão em conformidade com o estudo feito por Naranjo *et al*, 2010 que utilizou esse fármaco para tratamento da PCM crônica, o qual identificou que ocorreu uma redução significativa no infiltrado inflamatório, mas apesar de bastante reduzida, ainda havia a presença de células fúngicas nos pulmões, após quatro semanas de tratamento (84).

A administração da ITZ-NANO foi eficiente no tratamento da PCM crônica, entretanto, faz-se necessário monitorar os seus efeitos colaterais, já que a utilização do itraconazol pode provocar náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, dor de cabeça e leve alopecia, além de hepatotoxicidade, a qual é monitorada por meio do aumento dos níveis de enzimas hepáticas (75, 76).

A avaliação dos parâmetros bioquímicos em relação à hepatotoxicidade mostrou que nos primeiros 30 dias de tratamento, nenhum dos grupos apresentou alterações nas enzimas hepáticas (Tabela1). Contudo, após esse período, observou-se um aumento estatisticamente significativo da enzima desidrogenase láctica no grupo que recebeu ITZ (Tabela 2), o que demonstra o início de hepatotoxicidade. Por outro lado, a ITZ-NANO não causou toxicidade hepática nos animais, provavelmente devido à sua baixa concentração efetiva livre circulante que foi gradualmente liberada, e/ou uma menor concentração de fármaco livre captado pelo fígado. Esta última hipótese se baseia na menor captação de ITZ-NANO marcadas

com tecnécio 99 por esse órgão, quando comparamos com trabalhos na literatura que demonstram um maior percentual de partículas de PLGA no mesmo (70, 81, 82).

Outro dado importante que demonstra a menor toxicidade da ITZ-NANO foram as análises observadas quanto aos seus aspectos clínicos. Com 60 dias de tratamento, os animais tratados com a ITZ-NANO tiveram uma menor perda do peso corporal (2%) quando comparados com os animais que foram tratados com o ITZ (15%) (Tabela 3). Os animais tratados com ITZ-NANO também não apresentaram alopecia, ao contrário do que foi observado em todos os animais que receberam ITZ (Figura 19). Esses dados sugerem que a administração de ITZ-NANO ameniza os efeitos colaterais nos animais, o que pode relacionar-se a dois fatores: i) liberação controlada do fármaco; e ii) diminuição do estresse dos animais, na medida em que receberam uma aplicação de ITZ-NANO a cada três dias. Esses achados corroboram ainda mais com a aplicabilidade clínica dos protocolos empregados com o uso de nanopartículas e conseqüentemente da nanobiotecnologia, cujo propósito de origem foi exatamente potencializar a especificidade dos tratamentos, promovendo maior qualidade de vida aos pacientes por ela contemplados.

Por meio desses resultados, as metas do trabalho foram alcançadas, uma vez que o objetivo da incorporação de fármacos em nanopartículas é, além de promover a mesma eficiência de tratamento dos fármacos convencionais, reduzir efeitos colaterais e ainda, promover um maior incentivo à adesão dos tratamentos por parte dos pacientes. Atualmente o índice de evasão aos tratamentos é muito alto, já que são oferecidos sob a forma de administração oral por várias vezes ao dia por um longo período do tempo – seis meses ou mais. Com os resultados encontrados, a redução no número de administrações possibilita uma maior colaboração dos pacientes, o que é um fator determinante no sucesso do protocolo terapêutico que muitas vezes é negligenciado durante o tratamento (19).

Dessa forma, constatou-se que a ITZ-NANO se apresentou efetiva no tratamento da PCM crônica e evitou os conhecidos efeitos colaterais deste. Destaca-se também, que a concentração de fármaco na ITZ-NANO foi inferior àquela administrada no ITZ, o que contribuiria para a redução do custo total do tratamento e reduziria o tempo e o estresse causado ao paciente.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- a.** A ITZ-NANO apresentou um diâmetro médio de 174 nm que mostrou ser adequado para sua biodistribuição;
- b.** A preparação de ITZ-NANO apresentou uma boa eficiência de encapsulação da ordem de 72%;
- c.** O potencial zeta da ITZ-NANO foi de – 40 mV, e após 30 dias do preparo diminuiu para – 50 mV;
- d.** Quanto a eficácia antifúngica, a ITZ-NANO mostrou-se tão eficaz quanto o ITZ, especialmente após 30 dias de seu preparo;
- e.** Os estudos de citotoxicidade demonstraram que a ITZ-NANO foi menos citotóxica que o ITZ em células mesangiais de rim e hepatócitos;
- f.** A biodistribuição das ITZ-NANO marcadas com tecnécio mostrou uma maior captação das nanopartículas pelos pulmões, fígado e rins;
- g.** Quanto à eficácia terapêutica, ITZ-NANO se mostrou um sistema de liberação de fármacos eficiente, capaz de reduzir a frequência da administração da dose itraconazol em três vezes sem afetar a sua eficácia farmacológica;
- h.** ITZ-NANO apresentou a eficácia terapêutica no modelo murino da PCM sem causar toxicidade hepática, além de prevenir a ocorrência de efeitos colaterais como a perda de peso e a alopecia.

Diante dos resultados expostos, pode-se concluir que a nanotecnologia aplicada à formulação do antifúngico itraconazol no tratamento da Paracoccidioidomicose, uma doença comumente negligenciada pelas autoridades de saúde no Brasil, torna-se uma alternativa terapêutica de considerável importância, uma vez que se apresenta mais eficaz que a formulação convencional, além de reduzir de maneira significativa os efeitos adversos e ainda o tempo requerido no tratamento. Portanto, os dados acima fornecem bases científicas suficientes para o desenvolvimento de novos estudos clínicos que possibilitarão a entrada no mercado dessa formulação nanoestruturada.

REFERÊNCIAS

1. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, De Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of clinical microbiology*. 2000; 38(9):3478-80.
2. Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZP, Malta MHB, Maffei CML, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Medical Mycology*. 2000; 38(3):193-9.
3. Martinez R, Ferreira MS, Mendes RP, Telles Filho FQ, Veronesi R, Fiocaccia R. Blastomicose sul-americana (Paracoccidioidomicose): Etioepidemiologia e ecologia. *Tratado de Infectologia São Paulo: Atheneu*. 1996; 1081-3.
4. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, SA. *Medical Mycology*. 1965; 4(2):124-5.
5. Camargo ZP, Taborda CP. Antigenic relationship between *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from faeces of a penguin and a human isolate of *P. brasiliensis*. *Medical Mycology*. 1993; 31(5):347-52.
6. Johnson WD, Lang CM. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Veterinary pathology*. 1977; 14(4):368-71.
7. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 2006; 443(7113):818-22.
8. De Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Medical Mycology*. 1971; 9(3):248-53.
9. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology*. 2002; 40(3):225-42.
10. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39:297-10.

11. Ferreira-da-Cruz MF, Wanke B, Galvao-Castro B. Prevalence of paracoccidioidomycosis in hospitalized adults in Rio de Janeiro (RJ) Brazil. *Mycopathologia*. 1987; 97(1):61-4.
12. Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infection and immunity*. 1998; 66:5587-91.
13. Clemons KV, Stevens DA. Interactions of mammalian steroid hormones with *Paracoccidioides brasiliensis*: estradiol receptor binding and mediation of cellular functions. *Interciencia*. 1990; 15:206-8.
14. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993; 6(2):89-17.
15. Marques AS. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An Bras Dermatol*. 2003; 78(2):135–50.
16. Goldani LZ, Sugar AM. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clinical Infectious Diseases*. 1995; 21(5):1275-81.
17. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico microbiológico*. Rio de Janeiro: MEDSI. 2001; 1465.
18. Franco M, Montenegro MRG, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Motta NGS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987; 20(2):129-32.
19. Hahn RC, Hamdan JS. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs In-vitro-Empfindlichkeit von *Paracoccidioides brasiliensis* in der Hefephase für Antimykotika. *Mycoses*. 2000; 43(11-12):403-7.
20. Saag MS, Dismukes WE. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1988; 32(1):1-8.
21. De Beule K. Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development. *International journal of antimicrobial agents*. 1996; 6(3):175-81.

22. Cazedey ECL, de Cp. Azevedo R, de Fsilva E, de Araújo MB. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. QUIMICA NOVA. 2007; 30(4):774-76.
23. Negroni R, Arechavala AI. Itraconazole: pharmacokinetics and indications. Archives of medical research. 1993; 24(4):387-93.
24. Poirier M, Cheymol G. Optimisation of itraconazole therapy using target drug concentrations. Clinical pharmacokinetics. 1998; 35(6):461-73.
25. Prentice AG, Glasmacher A. Making sense of itraconazole pharmacokinetics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 56(sup 1):17-22.
26. Koks CHW, Meenhorst PL, Bult A, Beijnen JH. Itraconazole solution: summary of pharmacokinetic features and review of activity in the treatment of fluconazole-resistant oral candidosis in HIV-infected persons. Pharmacological Research. 2002; 46(2):195-01.
27. Somchit N, Norshahida AR, Hasiah AH, Zuraini A, Sulaiman MR, Noordin MM. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative in vivo study. Human & experimental toxicology. 2004; 23(11):519-25.
28. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Revista iberoamericana de micología. 2006; 23:39-49.
29. Bradbury BD, Jick SS. Itraconazole and fluconazole and certain rare, serious adverse events. Pharmacotherapy. 2002; 22(6):697-00.
30. Allemann E, Gurny R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 1993; 39(5):173-91.
31. Chellat F, Merhi Y, Moreau A, Yahia LH. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. Biomaterials. 2005; 26(35):7260-75.
32. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. Current Opinion in Solid State & Materials Science. 2002; 6(4):319-27.

33. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol.* 2007; 2:16-22.
34. Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrick J. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists.* 1^a ed. London: Taylor & Francis; 2001.
35. Torchilin VP. Drug targeting. *European journal of pharmaceutical sciences.* 2000; 11:81-91.
36. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science.* 2004; 303(5665):1818-22.
37. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems.* 2002; 19(2):99-34.
38. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LDL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova.* 2003; 26(5):726-37.
39. Delie F, Blanco-Príeto MJ. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules.* 2005; 10(1): 65-80.
40. Commandeur S, Van Beusekom HMM, Van Der Giessen W. Polymers, Drug Release, and Drug-Eluting Stents. *Journal of Interventional Cardiology.* 2006; 19(6):500-6.
41. Akkar A, Müller RH. Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2003; 56(1):29-36.
42. Miyamoto H, Ogura Y, Hashizoe M, Kunou N, Honda Y, Ikada Y. Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole. *Current Eye Research.* 1997; 16:930-5.
43. Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM, Nunes J, Peixoto DLG, Simioni AR, et al. Amphotericin B in poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2009; 63(3):526-33.

44. Danhier F, Vroman B, Lecouturier N, Crockart N, Pourcelle V, Freichels H, et al. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with Paclitaxel. *Journal of Controlled Release*. 2009; 140(2): 166-73.
45. Rajapaksa TE, Stover-Hamer M, Fernandez X, Eckelhoefer HA, Lo DD. Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *Journal of Controlled Release*. 2010; 142(2): 196-05.
46. Wilhelm, C.; Billotey, C.; Roger, J.; Pons, J. N., Bacri, J-C; Gazeau, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*. 2003; 24:1001-11.
47. Alexis, F. A.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*. 2008; 5(4): 505-15.
48. Chaves, S. B. ; Silva, L. P.; Lacava, Z. G. M.; Morais, P. C.; Azevedo, R. B. Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lung induced by 2,3-meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. *Journal of Applied Physics*. 2005; 97(10): 915/1-915/3.
49. Garcia MP, Miranda Parca R, Braun Chaves S, Paulino Silva L, Djalma Santos A, Guerrero Marques Lacava Z, et al. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005; 293(1):277-82.
50. Valois CRA, Braz JM, Nunes ES, Vinolo MAR, Lima ECD, Curi R, et al. The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a 2 integrin-dependent pathway. *Biomaterials*. 2010; 2(2): 366-74.
51. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2006; 2(1):8-21.

52. Brannon-Peppas L. Polymers in Controlled Drug Delivery. *Medical Plastic and Biomaterials*. 1997; 4:34-45.
53. Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol*. 2001; 5(4):447-51.
54. Newman MS, Colbern GT, Working PK, Engbers C, Amantea MA. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1999; 43(1):1-7.
55. Italia JL, Bhatt DK, Bhardwaj V, Tikoo K, Kumar M. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: Nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral®. *Journal of Controlled Release*. 2007; 119(2):197-06.
56. Fukui H, Koike T, Saheki A, Sonoke S, Tomii Y, Seki J. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS®). *International Journal of Pharmaceutics*. 2003; 263(1-2):51-60.
57. McEwen JG, Peters GR, Blaschke TF, Brummer E, Perlman AM, Restrepo A, et al. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole in a murine model. *The Journal of tropical medicine and hygiene*. 1985; 88(5):295-99.
58. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983; 65(1-2):55-63.
59. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature*. 1998; 392(6679):5-10.
60. Rivera PA, Martinez-Oharriz MC, Rubio M, Irache JM, Espuelas S. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *Journal of microencapsulation*. 2004; 21(2):203-11.
61. Du L, Cheng J, Chi Q, Qie J, Liu Y, Mei X. Biodegradable PLGA microspheres as a sustained release system for a new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2006; 54(9):1259-65.

62. Esmaeili F, Hosseini-Nasr M, Rad-Malekshahi M, Samadi N, Atyabi F, Dinarvand R. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2007; 3(2):161-7.
63. Peng H, Liu X, Lv G, Sun B, Kong Q, Zhai D, et al. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. *International journal of pharmaceutics*. 2008; 352(1-2):29-35.
64. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MNV. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*. 2007; 119(1):77-85.
65. Nahar M, Dutta T, Murugesan S, Asthana A, Mishra D, Rajkumar V, et al. Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2006; 23(4):259-18.
66. Yin Win K, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005; 26(15):2713-22.
67. Chow AHL, Tong HHY, Chattopadhyay P, Shekunov BY. Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharmaceutical Research*. 2007; 24(3):411-37.
68. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Möller W. Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *Journal of Aerosol Medicine*. 2006; 19(1):74-83.
69. Müller RH, Wallis KH, Tröster SD, Kreuter J. In vitro characterization of poly (methyl-methacrylate) nanoparticles and correlation to their in vivo fate. *Journal of Controlled Release*. 1992; 20(3):237-46.
70. Semete B, Booyesen L, Lemmer Y, Kalombo L, Katata L, Verschoor J, et al. In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010; 6(5): 662-71.

71. Mosqueira VCF, Legrand P, Pinto Alphandary H, Puisieux F, Barratt G. Poly (D, L lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2000; 89(5):614-26.
72. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 2001; 70(1-2):1-20.
73. Rodrigues JS, Santos-Magalhaes NS, Coelho L, Couvreur P, Ponchel G, Gref R. Novel core (polyester)-shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *Journal of Controlled Release*. 2003; 92(1-2):103-12.
74. Amichai B, Grunwald MH. Adverse drug reactions of the new oral antifungal agents: terbinafine, fluconazole, and itraconazole. *International journal of dermatology*. 1998; 37(6):410-5.
75. Abe S, Ochi H, Takahashi Y, Ishijima SA, Osumi M, Yamaguchi H. Characteristic biological effects of itraconazole on L929 fibroblasts and their cell membrane. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2000; 6(6):35-40.
76. Meinerz ARM, Cleff MB, da Silva Nascente P, de Oliveira Nobre M, Schuch LFD, de Ávila Antunes T, et al. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 43(1): 105-09.
77. Khandare J, Minko T. Polymer–drug conjugates: progress in polymeric prodrugs. *Progress in Polymer Science*. 2006; 31(4):359-97.
78. Yi Y, Yoon HJ, Kim BO, Shim M, Kim SO, Hwang SJ, et al. A mixed polymeric micellar formulation of itraconazole: Characteristics, toxicity and pharmacokinetics. *Journal of Controlled Release*. 2007; 117(1):59-67.
79. Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, Klepetsanis P, Livaniou E, Evangelatos G, et al. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003; 259(1-2):115-27.

80. Lima MCL, Ramos CD, Brunetto SQ, Lima ML, Ferreira U, Etchebehere E, et al. Estimation of absolute renal uptake with technetium-99m dimercaptosuccinic acid: direct comparison with the radioactivity of nephrectomy specimens. *Sao Paulo Medical Journal*. 2008; 126:150-5.
81. Stevanovi M, Maksin T, Petkovi J, Filipi M, Uskokovi D. An innovative, quick and convenient labeling method for the investigation of pharmacological behavior and the metabolism of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanospheres. *Nanotechnology*. 2009; 20:335102.
82. Mondal N, Halder KK, Kamila MM, Debnath MC, Pal TK, Ghosal SK, et al. Preparation, characterization, and biodistribution of letrozole loaded PLGA nanoparticles in Ehrlich Ascites tumor bearing mice. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 397(1-2): 194-00.
83. Lacava LM, Garcia VAP, Kückelhaus S, Azevedo RB, Sadeghiani N, Buske N, et al. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2004; 272:2434-35.
84. Naranjo TW, Lopera DE, Diaz-Granados LR, Duque JJ, Restrepo A, Cano LE. Histopathological and immunologic effects of the itraconazole treatment in a murine model of chronic pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. *Microbes and Infection*. 2010; 12(14-15):1153-62.

ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 27 de março de 2007.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA DROGA ANFOTERICINAB E DO ITRACONAZOL NANOCAPSULADAS COM E/OU SEM FLUIDO MAGNÉTICO NO TRATAMENTO DA PARACOCIDIDOMICOSE EM MODELO EXPERIMENTAL MURINA”**, sob responsabilidade da Profa. Maria Sueli Soares Felipe, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA

Anexo 2 - Produção científica associada À tese

Artigo

CUNHA-AZEVEDO Elaine Patrícia, SILVA, J. R., SIQUEIRA-MOURA, M. P., BOCCA, A. L., FELIPE, M. S. S., TEDESCO, A. C., AZEVEDO, R. B.

In vitro antifungal activity and toxicity of itraconazole in DMSA-PLGA nanoparticles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. , 2010.

Participação em Congressos

CUNHA-AZEVEDO Elaine Patrícia, AZEVEDO, R. B.

Antifungal activity and toxicity of itraconazole in DMSA-PLGA nanoparticles, 2010. Apresentação Oral, NANOSMAT, Reims, França.

Fuscaldi, L L, CUNHA-AZEVEDO Elaine Patrícia, TEDESCO, A. C., AZEVEDO, R. B., CARDOSO, V. N.

Biodistribuição de nanocápsulas poliméricas, contendo itraconazol, marcadas com 99mtc-DMSA em camundongos Balb/c , 2010.

VII Congresso da SBBN, Recife, PE.

CUNHA-AZEVEDO Elaine Patrícia, SILVA, J. R., SIQUEIRA-MOURA, M. P., TEDESCO, A. C., BOCCA, A. L., AZEVEDO, R. B.

Evaluation of itraconazole entrapped in nanospheres of plga for the treatment of paracoccidioides brasiliensis, 2009.

Particles 2009, Berlim- Alemanha.

CUNHA-AZEVEDO Elaine Patrícia, SILVA, J. R., SIQUEIRA-MOURA, M. P., BOCCA, A. L., TEDESCO, A. C., AZEVEDO, R. B.

Morphological analysis of lung tissue obtained from balb-c mice treated, 2009

Congresso da SBMM, Belo Horizonte - MG.

CUNHA-AZEVEDO Elaine Patrícia, SILVA, J. R., SIQUEIRA-MOURA, M. P., TEDESCO, A. C., BOCCA, A. L., AZEVEDO, R. B.

Lung morphological analysis of balb-c infected with Paracoccidioides Brasiliensis after treatment with free and nanoespheres entrapment itraconazole In: Simpósio de Microscopia do Cerrado, 2008,

Simpósio Microscopia do Cerrado. Pirinópolis-GO

Patente

CUNHA-AZEVEDO Elaine Patrícia, SIQUEIRA-MOURA, M. P., BOCCA, A. L., FELIPE, M. S. S., TEDESCO, A. C., AZEVEDO, R. B.

Composição nanoestruturada de antifúngico imobilizado em blenda polimérica para tratamento de micoses.

INCT, 2011.

Anexo 3 – Artigo Publicado



Copyright © 2010 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

Journal of
Nanoscience and Nanotechnology
Vol. 10, 1-7, 2010

In Vitro Antifungal Activity and Toxicity of Itraconazole in DMSA-PLGA Nanoparticles

Elaine P. Cunha-Azevedo¹, Jaqueline R. Silva¹, Olimpia P. Martins²,
Marigilson P. Siqueira-Moura², Anamélia L. Bocca¹, Maria Sueli S. Felipe¹,
Antonio C. Tedesco², and Ricardo B. Azevedo^{1,*}

¹Biological Sciences Institute, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil

²Chemistry Institute, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto SP 14040-901, Brazil

Itraconazole (ITZ) is a drug used to treat various fungal infections and may cause side effects. The aim of this study was to develop and evaluate the *in vitro* activity of DMSA-PLGA nanoparticles loaded with ITZ against *Paracoccidioides brasiliensis*, as well as their cytotoxicity. Nanoparticles were prepared using the emulsification-sonication technique and characterized by their encapsulation efficiency, morphology (TEM), size (Nanosight) and charge (zeta potential). Antifungal efficacy in *P. brasiliensis* was determined by minimal inhibition concentration (MIC), and cytotoxicity using MTT assay. ITZ was effectively incorporated in the PLGA-DMSA nanoparticles with a loading efficiency of $72.8 \pm 3.50\%$. The shape was round with a solid polymeric structure, and a size distribution of 174 ± 86 nm (Average \pm SD). The particles were negatively charged. ITZ-NANO presented antifungal inhibition (MIC = $6.25 \mu\text{g/ml}$) against *P. brasiliensis* and showed lower *in vitro* cytotoxicity than free drug (ITZ).

Keywords: *Paracoccidioides Brasiliensis*, Nanotoxicology, Drug Delivery, Drug Release, ITZ.

1. INTRODUCTION

Itraconazole (ITZ), an azole antifungal agent, is widely used for a variety of serious fungal infections, including Aspergillosis, Cryptococcus, Candida, Blastomyces and Paracoccidioidomycosis.^{1,2} As with other azole antifungals, itraconazole acts as an ergosterol synthesis inhibitor through potent inhibition of cytochrome P450 activity (CYP450). Conversion of lanosterol to ergosterol in fungal cell membranes is interrupted by inhibiting the fungal CYP450 dependant enzyme lanosterol 14- α -methylase.^{3,4}

For the treatment of fungal infections, high doses of itraconazole are administered over a long period of time, causing many side effects such as nausea, vomiting, abdominal pain, diarrhea, headaches and mild alopecia. It also causes hepatotoxicity and thereby increased levels of bilirubin and transaminases.^{3,5} The side effects and toxicity of these drugs increases the need for the development of different approaches for specific drug delivery and new therapeutic protocols.⁷

In this context, recent findings in the field of nanotechnology have dramatically increased research on specific

drug delivery systems for the pharmaceutical industry.⁸ These novel drug formulations could reduce both the dose required to achieve a therapeutic level and the related toxicity.⁹ Among these methods, polymeric nanoparticles composed of poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) have shown several technological advantages such as biocompatibility, biodegradability, sustained release and safety.^{10,11} The antibiotics ciprofloxacin and rifampicin and the antifungals fluconazole, voriconazole and amphotericin B are examples of drugs that have already been incorporated into PLGA preparations.¹²⁻¹⁶

The development of targeted drug carriers systems that could be used for the treatment of fungal infections has gained increasing attention in the fields of pharmacology and medicine. Different types of PLGA nanoparticles can be achieved by modifying their surface properties, by conjugation with peptides,¹⁷ proteins¹⁸ or dimercaptosuccinic acid (DMSA),¹⁶ depending on the specific purpose. The lung is the preferential organ targeted by magnetic nanoparticles covered with DMSA, which is a potent chelating chemical, as described in previous studies.¹⁹⁻²¹ This points to its potential use in drug delivery systems designed for the treatment of pulmonary mycoses and other diseases that affect this organ.¹⁶

*Author to whom correspondence should be addressed.

Paracoccidioidomycosis (PCM), a disease caused by the *Paracoccidioides brasiliensis*, mainly affects the lungs and disseminates to other organs and systems.^{22,23} Some authors reported that PCM is the eighth leading cause of mortality from infectious disease when looking at predominantly chronic infectious and parasitic diseases, and the highest among the systemic mycoses.²⁴ Itraconazole is the drug of choice for the treatment of this disease.²² Therefore, the aim of this study was to develop and evaluate *in vitro* activity of DMSA-PLGA nanoparticles loaded with itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*, as well as their cytotoxicity in two different normal cell lines.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Drugs and Chemicals

Itraconazole, polylactic acid (PLA), polyglycolic acid (PGA), polyvinyl alcohol (PVA) and DMSA were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). The itraconazole suspension (ITZ) was from Farmacotecnic[®] (Brasília, Brazil). All mediums were purchased from GIBCO (USA). Ultrapure water was obtained using E-pure apparatus (Barnstead, Iowa, USA).

2.2. Characterization of DMSA-PLGA Nanoparticles Loaded with Itraconazole

2.2.1. Preparation of DMSA-PLGA Nanoparticles Loaded with Itraconazole (ITZ-NANO)

Nanoparticles containing ITZ were prepared using a modified emulsification- evaporation technique as described previously.²⁵ Briefly, an organic solution of PLGA and ITZ was prepared. This organic phase was poured slowly into an aqueous solution of polyvinyl alcohol (PVA) 1% (w/v) which was homogenized using an Ultraturrax emulsifier at 15,000 rpm for 10 min. After this, a double emulsion was formed with 1% PVA solution and the organic solvent was removed from the solution by continuous stirring at room temperature (25 °C) for 4 h inducing polymer precipitation as nanospheres. The nanoparticles were isolated by centrifugation (25 °C, 6,000 rpm) in intervals of 10 minutes and were washed three times in distilled water. The formulation was suspended in 3.0 mL physiological PBS solution, and stored at 4 °C. All procedures were carried out in a sterile hood.

2.2.2. Drug Encapsulation Efficiency (EE)

The determination of ITZ content in nanoparticles was carried out using an UV spectrophotometric method at 262 nm (linearity $3.0 - 17.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $y = 6.75 \times 10^{-2} X - 4.51$, $r = 0.999$). Briefly, aliquots of nanoparticles containing ITZ were dissolved in DMSO (1:1, v/v) and sonicated for 5 min to release all their ITZ content. The

samples were then diluted to the final volume (3 mL) with acetonitrile and filtered through a $0.4 \mu\text{m}$ membrane. The encapsulation efficiency of ITZ into nanoparticles was determined using the following equation:

$$\text{E.E. (\%)} = \text{CN/CTH} \times 100$$

where E.E. is ITZ encapsulation efficiency, CN is the concentration of ITZ in nanoparticles, and CTH is the theoretical concentration of ITZ. The analyses were performed in triplicate and the mean results (\pm SD) are reported.

2.2.3. Particle Morphology and Size

Shape, surface morphology and size distribution of ITZ-NANO were analyzed using transmission electron microscopy (TEM) (Jeol, Tokyo, Japan). Size distribution was also determined by nanoparticle tracking analyses (NanoSight LM20).²⁶

2.2.4. Zeta Potential

The zeta potential of ITZ-NANO was measured using laser Doppler anemometry (zeta plus, zeta potential analyzer, Brookhaven instruments corporation). The particle suspension was diluted in deionized water before measurement. Seven measurements were carried out for each sample and the average value was recorded.

2.3. Antifungal Efficacy

2.3.1. Fungal Strain and Culture Conditions

P. brasiliensis 18 isolate was recovered in the Molecular Pathological Laboratory of the University of Brasília and identified using conventional mycological techniques. *P. brasiliensis* was sub-cultured in liquid YPD medium (10 g of yeast extract, 20 g of peptone, 20 g of dextrose, 1 L of distilled water) at 36 °C in a rotary shaker (220 rpm). After 5 days of culture, the yeast cells were collected by centrifugation. The fungi cells were prepared at a concentration of 2×10^8 cells/mL of *P. brasiliensis* per well. The cellular viability was determined by vital staining with 0.05% green-Janus.

2.3.2. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC was determined using the microbroth dilution method described in the NCCLS-M27. Briefly, serial dilutions (from 100 to 0.1 $\mu\text{g/mL}$) of ITZ-NANO and free itraconazole (ITZ) suspension were prepared in RPMI1640 medium (Invitrogen, USA). Using a flat-bottomed 96-well plate (TPP, USA), 100 μL of each dilution was added in combination with 100 μL of *P. brasiliensis* suspension. The plates were incubated for 24 h at 36 °C under agitation

at 40 rpm. After this, 100 μ l of each well was plated on BHI agar (Acumedia, Baltimore, MD) supplemented with 4% horse serum, 5% *P. brasiliensis* 192 culture filtrate and 40 mg/l gentamicin (gentamicin sulphate, Schering-Plough), maintained for 5 days. The MIC was evaluated by counting units of colony-forming fungus.

2.4. In Vitro Toxicity Study

2.4.1. Cell Culture

Human kidney mesangial cells (MC) and mouse hepatocytes AML12 cells were grown in DMEM (Gibco, USA) buffered with sodium bicarbonate, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

MC and hepatocyte cells were seeded on 24-well plates (TPP, Germany) at the density of 5×10^4 cells/well and incubated for 24 h. Cells were then incubated with ITZ-NANO or ITZ suspension at the following concentrations: 0, 200 and 400 μ g/ml, diluted in culture medium for 24 h. After the incubation time culture medium was removed and 150 μ l of MTT (Invitrogen, USA) solution (15 μ l of MTT 5 mg/ml diluted in 135 μ l of complete DMEM) was added to each well, and the plates were further incubated at 37 °C for 3 h. The solution was removed and 200 μ l of DMSO (Sigma-Aldrich Co, USA) was added to dissolve the formazan crystals formed. The plates were analyzed by a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, USA) at a wavelength of 595 nm. Control cells were considered 100% living cells and results were expressed in percentage of living cells.

2.5. Statistical Analysis

Origin Version 8 was used to analyze the data. All results were expressed as means \pm standard error of the means. Student's unpaired *t* test was used to compare the two data

sets (control and test). Statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Characterization of ITZ-NANO

Itraconazole was effectively incorporated into the PLGA-DMSA nanoparticles with a loading efficiency of $72.8 \pm 3.50\%$ (Average \pm SD), using the UV spectrophotometric method.

Under TEM observation (Fig. 1(A)), the ITZ-NANO had a round shape with a solid polymeric structure. In aqueous medium the size distribution was 174 ± 86 nm (Average \pm SD) with a peak at 209 nm, measured by tracking analysis (Nanosight) (Fig. 1(B)).

Using Laser Doppler Anemometry, the ITZ-NANO was found to be negatively charged with an average value of around -40 mV. This charge decreased after 60 days of storage (-51 mV) (Fig. 2).

3.2. Determination of MIC

To evaluate antifungal efficacy of the ITZ-NANO and ITZ, the microbroth dilution method was carried out (Fig. 3). The ITZ-NANO and ITZ solution presented antifungal activity against *P. brasiliensis*; the MIC was 6.25 μ g/ml for ITZ-NANO and 0.4 μ g/ml for ITZ. After thirty days the ITZ-NANO presented more effectiveness, because the concentration for growth inhibition of colonies was 0.8 μ g/ml, and after sixty days, the effectiveness was higher (0.4 μ g/ml). ITZ-NANO was as effective as ITZ in reducing growth of fungi after 60 days. The ITZ presented the same results (0.4 μ g/ml) at all times. A control group without drug was added in order to analyze the viability of the cells, showing a normal growth of the fungi (data not shown).

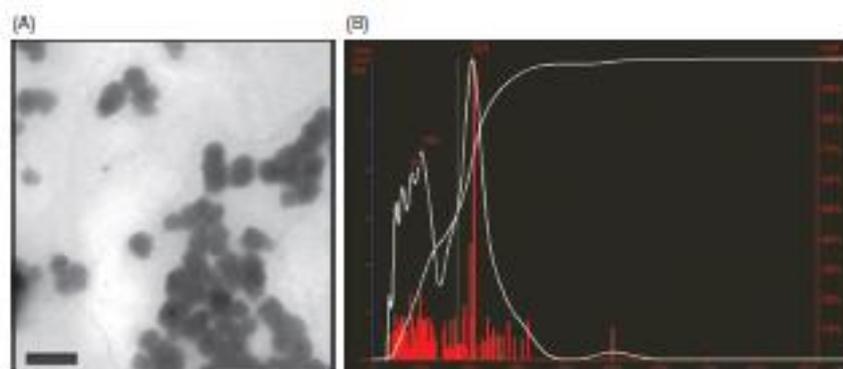


Fig. 1. Transmission electron microscopy of ITZ-NANO (A) and Sino (B). A shows particles with round shape, similar density and mean size of 174 nm Bar: 0.2 μ m. B shows nanoparticles size distribution by nanoparticles tracking analysis (Nanosight).

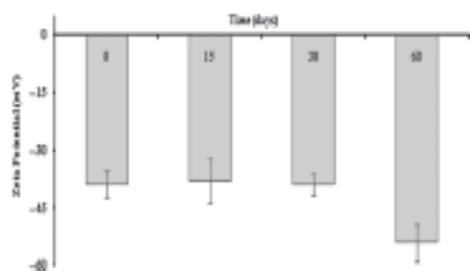


Fig. 2. Zeta potential of the ITZ-NANO sample monitored during 60 days after preparation. This picture shows that the nanoparticles presented a negative charge and that after 60 days of storage, the charge decreased.

3.3. In Vitro Toxicity Study

The cytotoxicity of ITZ-NANO and ITZ suspension were studied using MTT assays (Fig. 4). The ITZ-NANO presented lower toxicity in MC and hepatocyte cells compared to ITZ. At 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration the tests with MC showed 83% live cells for ITZ-NANO and 20% for ITZ ($P < 0.05$). The test with hepatocytes showed that the percentage of living cells was 44% for ITZ-NANO and 15% for ITZ.

The highest concentration tested (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was more cytotoxic in both samples (ITZ and ITZ-NANO), however ITZ-NANO showed lower cytotoxicity than ITZ. The MTT with MC showed 45% live cells for ITZ-NANO and 11% for ITZ. The MTT with hepatocytes showed that the

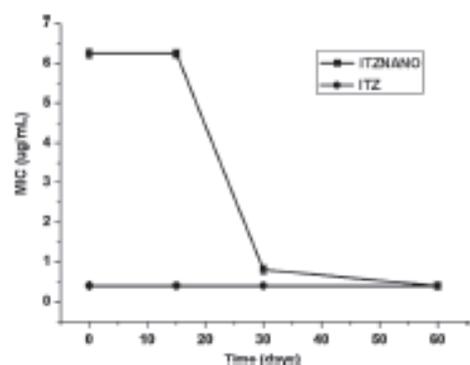


Fig. 3. In vitro antifungal activity of ITZ-NANO and ITZ against *P. brasiliensis*. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by colonies count after 24 h of incubation of the fungi with different drug concentration. Each concentration of ITZ-NANO and ITZ was tested in duplicate and repeated two times in separate experiments. Results are presented as the minimum concentration necessary to reduce colonies count to zero.

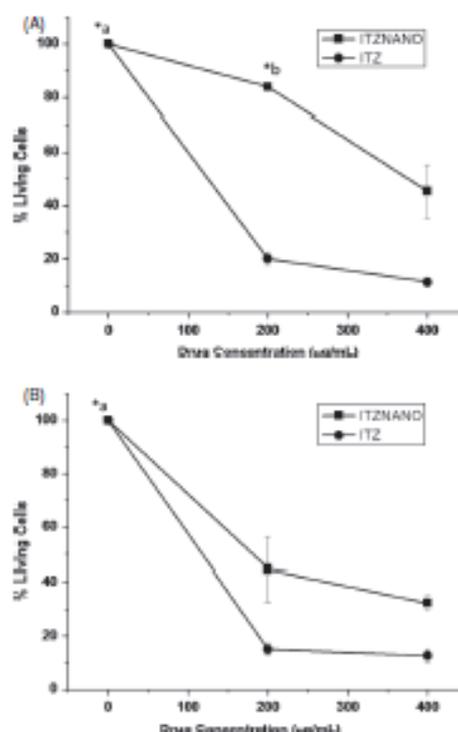


Fig. 4. Cytotoxicity on the human kidney mesangial cells (MC) (A) and mouse hepatocytes AML12 cells (B) of ITZ-NANO and ITZ suspension. Cellular viability expressed in % was calculated as $(N_i/N_c) \times 100$, where N_i and N_c are the number of living cells in the treated group and in the untreated group, respectively. Cell viability was determined by MTT reduction after 24 h of incubation with the cells. Different concentrations of nanoparticles were tested in triplicate and repeated two times in separate experiments. Results are expressed as the mean \pm S.D. of living cells. ^a $p < 0.05$ Control vs. ITZ-NANO and ITZ. ^b $p < 0.05$ ITZ-NANO vs. ITZ.

percentage of living cells was 32% for ITZ-NANO and 12% for ITZ.

4. DISCUSSION

The aim of this study was to prepare and test DMSA-PLGA nanoparticles loaded with itraconazole, to test its potential antifungal activity and cytotoxicity. Itraconazole is the drug of choice for the treatment of PCM and other fungal diseases.^{22,23} However, the use of high doses for a prolonged period increases the elimination of the drug in the serum, which may contribute to liver toxicity.²⁷⁻²⁹ In this study, a DMSA-PLGA nanoparticle loaded with itraconazole was developed that was shown to be as effective

as the free drug. Furthermore, it presented much lower *in vitro* cytotoxicity for liver and kidney cell lines. This proposal was based on drug delivery and controlled release where drug concentration can be increased in a specific organ and the number of applications and total doses can be reduced. The systemic circulation of the drug and side effects should also, as a consequence, be reduced.^{30,31}

PLGA is a copolymer identified by the monomer ratio (e.g., PLGA 50:50) whose composition is 50% lactic acid and 50% glycolic acid.^{32,33} The preparation of PLGA nanoparticles presented satisfactory results for the controlled delivery of different classes of drugs, including antimicrobials, antifungals and hormone antagonists,^{12,13,15,34} such as a ciprofloxacin-loaded PLGA nanoparticles that released the antibiotic for 2 weeks, with a superior efficacy in inhibiting *Escherichia coli* growth in comparison with free ciprofloxacin,¹⁴ or efficient delivery of amphotericin B entrapment in polymer-ligand conjugate, PEG-PLGA, that maintained the substantiated pattern for nine days.³⁵

Studies suggest that process preparation of drug delivery system entrapped drugs can be feasible, even with low encapsulation efficiency, as demonstrated in fluconazole-loaded PLGA microspheres prepared by the spray-drying process,¹² PLGA nanoparticles loaded with voriconazole using emulsion-solvent evaporation technique¹⁵ and; in our case, the entrapment of itraconazole into PLGA-DMSA nanoparticles was successfully achieved ($72.76 \pm 3.50\%$ /Average \pm SD), as determined using an UV spectrophotometric method, in accordance with Pandey et al.³⁶ that used azole antifungal PLG nanoparticles prepared by the same emulsion-solvent evaporated technique.³⁵

As was demonstrated in other study,³⁷ smaller particles have higher surface area/volume ratio, which makes it easier for the encapsulated drug to be released from the NPs via diffusion and surface erosion, and this also has the added advantage for the drug-loaded NPs to penetrate into, and permeate through, the physiological drug barriers. In addition³⁸ suggested that large particles (<5 nm) could be taken up via the lymphatic, and small particles (<500 nm) can cross the membrane of epithelial cells through endocytosis. The morphology and size distribution of ITZ-NANO were studied by TEM and Nanosight (Fig. 1), with size of about 174 ± 86 nm (Average \pm SD). Nanoparticles smaller than 200 nm, could encounter delayed lung clearance, and present higher transepithelial transport compared to larger particles.³⁹ The reason for the delayed particle clearance and its dependency on particle size is still under debate, although these properties may pose potential application in targeted drug delivery.⁴⁰ Independent of the reason for this delay, using DMSA-PLGA nanoparticles smaller than 200 nm could be useful for *in vivo* drug targeting in the lung. As observed earlier, maghemite or magnetite based magnetic nanoparticles covered with DMSA have a preferential distribution to the lung.^{19–21} The same results were

not observed if the same core (maghemite or magnetite) is associated with dextran,⁴¹ for example, indicating that DMSA is probably the molecule responsible for this preferential distribution.

When stored at 4 °C, all nanoparticles were stable during at least 30 days, as neither size evolution nor morphological changes were detected (data not shown). After this time a change in their charge was observed, using zeta potential (Fig. 2). The zeta potential measurement of the nanoparticles was negative (average around -40 mV), due the presence of terminal carboxylic groups in the PLGA copolymer and its decrease was probably related to polymer degradation.^{42,43} Antifungal efficacy after exposure to a determined compound can be demonstrated by MIC. We found that at time zero the ITZ-NANO at a concentration of $6.25 \mu\text{g/ml}$ was an efficient fungistatic to the fungus *P. brasiliensis*, with no fungi colony growth observed. After 30 days this efficiency increased, with MIC of $0.8 \mu\text{g/ml}$, and after 60 days the lowest concentration (MIC = $0.4 \mu\text{g/ml}$) (Fig. 3) was achieved. This MIC reduction in ITZ-NANO indicated that there occurred polymer degradation over the time tested, which increased drug release in the media, improving the ITZ effect in fungal cells. Previous studies⁴⁴ showed ITZ diluted in PEG or DMSO had a MIC = $0.03 \mu\text{g/ml}$ and 0.01 to $0.12 \mu\text{g/ml}$ for *Candida Albicans* and *P. brasiliensis*, respectively, showing that ITZ-NANO was as effective as ITZ.

Due to ethical and cost issues, *in vitro* cell-based assays are preferred over animal studies for toxicity screening.⁴⁵ In MTT assay, the yellow tetrazolium salt MTT is converted by mitochondrial dehydrogenases of metabolically active cells to an insoluble purple formazan product.⁴⁶ As seen in our results, the incubation of normal cells demonstrated different results using ITZ-NANO and ITZ suspension. *In vitro* tests using two different cell lines showed lower toxicity for nanoparticulate PLGA.⁹ Using ITZ-NANO, the cellular viability was maintained at levels higher than 83% in the case of MC cells, and 44% in hepatocytes. The free drug concentration tested was toxic in both cell lines (Figs. 4(A) and 4(B)); mostly 80% of the cells died. According to previous studies,^{5,6,27,46} the itraconazole interaction with cytochrome P-450 can cause changes in liver enzymes and inhibition of the enzymatic system of mammals, such as those involved with the synthesis of steroid hormones and prostaglandins, which are dependent on this cytochrome. Thus, a higher toxicity in hepatocytes compared with other cells, such as mesangial, would be expected. However, our results indicated that the incorporation of drugs in PLGA nanoparticles promoted a certain protection against cytotoxicity.

One of the goals of the delivery systems of drugs is release without cytotoxicity. At present, this system of drug delivery is advantageous because it could eliminate the need for daily administration of drugs and maintain the concentration of active tissue with a lower total drug exposure. This could reduce the side effects that currently exist

in free drug administration.⁴⁷ PLGA nanoparticles have some advantages over other drug delivery vehicles. This polymer is US Food and Drug Administration—approved for a variety of applications and has been in use in humans for over 30 years; the amount and rate of drug release can be controlled via mechanisms that are well known; and a wide array of molecules—large and small, hydrophobic and hydrophilic—can be encapsulated within PLGA.⁴⁸ *In vivo* and *in vitro* studies tested toxicity and biocompatibility, showing that PLGA nano-materials were free of significant toxicity and have satisfactory biocompatibility.⁴⁹

In conclusion we demonstrated that ITZ-NANO was as efficient as a freely administered (ITZ) antifungal against *P. brasiliensis*. Furthermore it was safer than the free drug, since it showed lower toxicity in kidney and liver cells.

Acknowledgments: The authors thank the Brazilian agencies MCT/CNPq, FINEP, FINATEC and FAP-DF for financial support, and Dr. C. M. McManus for the English correction of this manuscript.

References and Notes

- O. Lortholary, D. W. Denning, and B. Dupont, *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 321 (1999).
- G. Vialat, G. San-Blas, J. Margich, and H. Franco, *Current Drug Targets-Infectious Disorders* 5, 211 (2005).
- K. De Beule, *International Journal of Antimicrobial Agents* 6, 175 (1996).
- N. Isoberranon, K. L. Katze, K. E. Allen, W. L. Nelson, and K. E. Thummel, *Drug Metabolism and Disposition* 32, 1121 (2004).
- S. Abe, H. Ochi, Y. Takahashi, S. A. Ishijima, M. Ozari, and H. Yamaguchi, *Journal of Infection and Chemotherapy* 6, 35 (2000).
- M. Catalán and J. C. Montejó, *Revista Iberoamericana de Micología* 23, 39 (2006).
- A. J. Carrillo-Munoz, G. Guisano, P. A. Ercuma, and G. Quindos, *Revista Española de Quimioterapia* 19, 130 (2006).
- B. D. Alexander and J. R. Wingard, *Clinical Infectious Diseases* 40, 414 (2005).
- J. Khandave and T. Minko, *Prog. Polym. Sci.* 31, 359 (2006).
- M. L. Hans and A. M. Lowman, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6, 319 (2002).
- S. Corrao, H. M. M. Van Beusden, and W. Van Der Giessen, *Journal of Interventional Cardiology* 19, 500 (2006).
- P. A. Rivera, M. C. Martínez-Olivera, M. Rubio, J. M. Irache, and S. Espasola, *J. Microencapsulation* 21, 203 (2004).
- F. Farnesi, M. Hossaini-Naz, M. Rad-Malekshahi, N. Samadi, F. Atyabi, and R. Dinarvand, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3, 161 (2007).
- Y. I. Jeong, H. S. Na, D. H. Son, D. G. Kim, H. C. Lee, M. K. Jung, S. K. Na, S. H. Roh, S. I. Kim, and J. W. Nah, *Int. J. Pharm.* 352, 317 (2008).
- H. Peng, X. Liu, G. Lv, B. Sun, Q. Kong, D. Zhai, Q. Wang, W. Zhao, G. Wang, and D. Wang, *Int. J. Pharm.* 352, 29 (2008).
- A. C. Amador, A. L. Bocca, A. M. Ribeiro, J. Nunes, D. L. G. Pinoto, A. R. Simioni, F. L. Primo, Z. G. M. Lacava, and R. Bentes, *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 526 (2009).
- F. Dushier, B. Vreeman, N. Lacrostaris, N. Crokart, V. Pouscalle, H. Frueholz, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, and V. Pétat, *J. Controlled Release* 140, 166 (2009).
- T. E. Rajapaksa, M. Stover-Hamer, X. Fernandez, H. A. Fickelboffer, and D. D. Lo, *J. Controlled Release* 142, 196 (2009).
- S. B. Chavez, L. P. Silva, Z. G. M. Lacava, P. C. Morais, and R. B. Azevedo, *J. Appl. Phys.* 97, 915 (2005).
- M. P. Garcia, R. M. Parra, S. B. Chavez, L. P. Silva, A. D. Santos, Z. G. M. Lacava, P. C. Morais, and R. B. Azevedo, *J. Magn. Magn. Mater.* 293, 277 (2005).
- C. R. A. Valois, J. M. Braz, E. S. Nunes, M. A. R. Vinolo, E. C. D. Lima, R. Cari, W. M. Kuebler, and R. B. Azevedo, *Biomaterials* 31, 366 (2009).
- C. A. Lyman and T. J. Walsh, *Drugs* 44, 9 (1992).
- E. Brammer, E. Castaneda, and A. Rautrup, *Clinical Microbiology Reviews* 6, 89 (1993).
- M. A. Shikama-Yasuda, F. Q. Tellen Filho, R. P. Mendes, A. L. Colombo, and M. L. Moroti, *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 297 (2006).
- C. P. Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2, 8 (2006).
- J. Ponti, E. Sabbioni, B. Munari, F. Broggi, P. Marmorato, F. Franchini, R. Colagnato, and F. Romi, *Matigenesir* 24, 439 (2009).
- B. Amichai and M. H. Gerswald, *International Journal of Dermatology* 37, 410 (1998).
- G. E. Pierard, J. E. Aerts, and C. Pierard-Franchimont, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 1, 287 (2000).
- F. C. Odds, *Mycologist* 17, 51 (2003).
- G. Mittal, D. K. Sabana, V. Bhartiwaj, and M. N. V. Ravi Kumar, *J. Controlled Release* 119, 77 (2007).
- S. S. Sari, H. Fenniri, and B. Singh, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2, 16 (2007).
- N. Dhawan, M. Datta, and G. K. Khuller, *Indian Journal of Experimental Biology* 38, 746 (2000).
- J. M. Lu, X. Wang, C. Marin-Muller, H. Wang, P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen, *Expert Review of Molecular Diagnostics* 9, 325 (2009).
- L. Du, J. Cheng, Q. Chi, J. Qiu, Y. Liu, and X. Mei, *Chem. Pharm. Bull.* 54, 1259 (2006).
- M. Nisar, T. Datta, S. Maraganan, A. Arthana, D. Mishra, V. Rajkumar, M. Tare, S. Saraf, and N. K. Jain, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 23, 259 (2006).
- R. Pandey, Z. Ahmad, S. Sharma, and G. K. Khuller, *Int. J. Pharm.* 301, 268 (2005).
- Z. Zhang and S. S. Fong, *Biomaterials* 27, 4025 (2006).
- S. S. Fong and S. Chien, *Chem. Eng. Sci.* 58, 4087 (2003).
- A. H. L. Chow, H. H. Y. Tong, P. Chattopadhyay, and B. Y. Shukunov, *Pharm. Res.* 24, 411 (2007).
- W. G. Kreyling, M. Sommer-Bührike, and W. Müller, *Journal of Aerosol Medicine* 19, 74 (2006).
- L. M. Lacava, V. A. P. Garcia, S. Kückelhaus, R. B. Azevedo, N. Sadoghiani, N. Buzko, P. C. Morais, and Z. G. M. Lacava, *J. Magn. Magn. Mater.* 272, 2434 (2004).
- R. H. Müller, K. H. Wallis, S. D. Tröster, and J. Krosner, *J. Controlled Release* 20, 237 (1992).

43. J. S. Rodrigues, N. S. Santos-Magalhaes, L. Coelho, P. Couvreur, G. Ponchel, and R. Graf, *J. Controlled Release* 92, 103 (2003).
44. D. S. Burgess, R. W. Hastings, K. K. Suresh, T. C. Hardin, and M. G. Rinaldi, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 36, 13 (2000).
45. V. Bhardwaj, D. D. Asikola, S. C. Gupta, M. Schneider, C. M. Lehr, and M. Kumar, *Pharm. Res.* 26, 2495 (2009).
46. A. R. M. Meisner, M. B. Cleff, P. da Silva Nuncio, M. de Oliveira Nobre, L. F. D. Schuch, T. de Ávila Antunes, M. O. Xavier, M. C. A. Meireles, and J. R. de Braga Mello, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 43, (2007).
47. C. J. Destache, T. Belgam, K. Christiansen, A. Shibata, A. Sharma, and A. Dhab, *BMC Infectious Diseases* 9, 198 (2009).
48. J. Park, P. M. Forgy, J. Lu, K. S. Russell, C. J. Booth, W. M. Salzman, and T. M. Fahmy, *Nanomedicine: Nanotechnology Biology, and Medicine* 5, 410 (2009).
49. K. A. Athanasiou, G. G. Niederman, and C. M. Agrawal, *Biomaterials* 17, 93 (1996).

Received: April 7, 2010. Accepted: May 11, 2010.