



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS - CSHNB
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



CLARISSY RODRIGUES DE SOUSA

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DA ANFOTERICINA B ATRAVÉS DE
ENSAIOS IN VITRO**

PICOS-PI

2022

CLARISSY RODRIGUES DE SOUSA

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DA ANFOTERICINA B ATRAVÉS DE
ENSAIOS IN VITRO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, *campus* Senador Helvídio Nunes de Barros como requisito parcial para obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

PICOS 2022.

CLARISSY RODRIGUES DE SOUSA

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

S725e Sousa, Clarissy Rodrigues de
Efeitos toxicogenéticos da Anfotericina B nanoparticulada através de ensaios in vitro / Clarissy Rodrigues de Sousa – 2022.
Texto digitado
Indexado no catálogo *online* da biblioteca José Albano de Macêdo-
CSHN
Aberto a pesquisadores, com restrições da Biblioteca
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Piauí, Licenciatura em Ciências Biológicas, Picos, 2022.
“Orientador: Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva.”

1. Anfotericina B. 2. Fungicida. 3. Toxicidade. I. Silva, Felipe Cavalcanti Carneiro de. II. Título.

CDD 581.634

Maria José Rodrigues de Castro CRB 3: CE-001510/O

PICOS 2022.
CLARISSY RODRIGUES DE SOUSA

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DA ANFOTERICINA B
NANOPARTICULADA ATRAVÉS DE ENSAIOS IN VITRO**

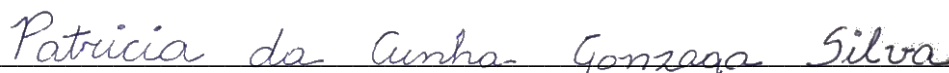
BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva



Prof. Dr. Victor de Jesus Silva Meireles
Membro da banca



Profa. Dra. Patricia da Cunha Gonzaga Silva
Membra da banca



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
() Dissertação
(x) Monografia
() Artigo

Eu, **Clarissy Rodrigues de Sousa**, autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação **Efeitos toxicogenéticos da anfotericina b nanoparticulada através de ensaios in vitro** de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI, 17 de Outubro de 2022.

Clarissy Rodrigues de Sousa
Assinatura

Clarissy Rodrigues de Sousa
Assinatura

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me dar forças e me permitir vivenciar novas experiências a cada dia, mesmo nas dificuldades, mas o Senhor sempre esteve ali segurando minha mão e fazendo continuar esta caminhada.

A minha família que sempre esteve ao meu lado, em especial ao meu pai Carlos e minha mãe Claudina que nunca mediram esforços para investir na minha educação, mesmo diante das dificuldades vocês sempre fizeram o melhor que podiam para que eu pudesse conquistar os meus sonhos, as minhas irmãs Carla e Ana Clara que estiveram do meu lado nessa trajetória, sou grata por cada conselho que me deram e por vocês sempre acreditarem em mim.

Agradeço aos meus amigos que sempre aguentarem firme junto comigo em especial a minha amiga Ângela que foi uma peça fundamental na minha graduação, obrigada por cada momento que passamos juntas, por cada conselho que você me deu e por você ter alegrado tanto os meus dias, sem você a UFPI não teria sido a mesma . Agradeço as minhas colegas de pesquisa Bruna e Raylla que estiveram ao meu lado nesta jornada, a palavra é gratidão.

Ao meu orientador Dr. Felipe por sua paciência e dedicação todos esses anos, gratidão por cada ensinamento.

LISTA DE ILUSTRÇÕES

Figura 1: Atividade tóxica da Anfotericina B em diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB). Fonte: autor 2021.....17

Figura 2. Teste de Fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8%. CP: Controle Positivo (Cisplatina $2\mu\text{/ml}$); CN: Controle negativo (solução salina). Fonte: autor 2021.....18

RESUMO

O uso de anfotericina B (Anf-B) um antibiótico poliênico e antifúngico, usado como a primeira opção de escolha para o tratamento da fungemia em pacientes críticos, especialmente a candidemia. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos toxicogênicos da Anf-B nanoparticulada. Para tanto, foi utilizado o teste de letalidade de *A. salina* para verificar a toxicidade da substância, bem como o teste de fragmentação de DNA para verificar danos ao material genético de células humanas (leucócitos- GM16000). Para o teste de *A. salina*, foi utilizado dois tempos de exposição (TE: 24h e 48h), com Anf-B. No TE 24h, a EC50 da anfotericina B foi de 67,3 µg/ml.. No TE 48h, todas as concentrações da substância foram altamente tóxicas, com EC50 de 0,1ng/ml. Na fragmentação de DNA (TE: 48h), verificou-se que a Anf-B mostrou pouca ou nenhuma genotoxicidade para os leucócitos humanos. Pelos testes avaliados, a anfotericina B mostrou-se um medicamento tóxico, porém mais estudos são necessários para verificar os riscos do tratamento com Anf-B e a possibilidade do uso de substâncias que possam atenuar a toxicidade sem diminuir sua ação.

PALAVRAS CHAVES: Anfotericina B; fungicida; Toxicidade.

ABSTRACT

The use of amphotericin B (12xt-B), a polyene and antifungal antibiotic, as the first choice for the treatment of fungemia in critically ill patients, especially candidemia. Thus, the present study aimed to evaluate the toxicogenetic effects of 12xt-B. Therefore, the *A. salina* lethality test was used to verify the toxicity of the substance, as well as the DNA fragmentation test to verify damage to the material. Gene of human cells (leukocytes-GM16000). For the *A. salina* test, two exposure times were used (TE: 24h and 48h), with 12xt-B. At ET 24h, the EC50 of amphotericin B was 67.3 µg/ml. At ET 48h, all concentrations of the substance were toxic. In DNA fragmentation (TE: 48h), it was found that 12xt-B showed little or no toxicity to human leukocytes. By the tests evaluated, amphotericin B proved to be a toxic drug, but more studies are needed to verify the risks of treatment with 12xt-B and the possibility of using substances that can attenuate toxicity without reducing its action.

KEYWORDS: Amphotericin B; fungicide; toxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
4 MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA	17
4.1 Bioensaios de letalidade em Artemia salina (BSLB)	17
4.2 Eletroforese em Gel de Agarose para detecção de Fragmentação de DNA. ..	18
4.3 Análise estatística.	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6 CONCLUSÃO	19
7 REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

O desafio de atenuar a toxicidade de medicamentos ainda insubstituíveis na prática clínica tem estimulado uma grande variedade de estudos para identificar estratégias processuais ou farmacológicas. Neste cenário, destaca-se o uso de anfotericina B (Anf-B), um antibiótico poliênico e antifúngico, como a primeira opção de escolha para o tratamento da fungemia em pacientes críticos, especialmente em casos de candidemia, devido ao seu amplo espectro de ação e também pelo baixo custo. (LANIADO; LABORIN 2009) Apesar do uso recorrente, sabe-se que a terapia deve ser cuidadosamente monitorada devido à alta incidência de reações adversas como náusea, vômitos, febre, hipertensão ou hipotensão hipóxia e eventos mais graves como a lesão renal aguda. (HASLAM, 1996)

Múltiplos agentes farmacológicos são utilizados para a assistência, tratamento e o diagnóstico de pacientes hospitalizados, sendo que as reações adversas são frequentes (PERAZELLA 2009). Entende-se por reação adversa ao medicamento, qualquer efeito prejudicial ou indesejado que se torna presente após a administração de doses do medicamento normalmente utilizadas na prática clínica. Neste contexto, insere-se a nefrotoxicidade induzida por agentes antimicrobianos, quimioterápicos, analgésicos e imunossupressores.

A nefrotoxicidade induzida pela Anf-B é muito frequente. Isso se deve ao mecanismo de acúmulo de medicamentos nos túbulos renais, visto que 25% do débito cardíaco destina-se ao suprimento do fluxo sanguíneo renal, somado a capacidade de excreção do órgão (PERAZELLA 2009). Tem sido demonstrado que a administração de Anf-B em altas doses resulta em reação adversa dose-dependente.

As altas doses e longos períodos de utilização da Anf-B na clínica resultam em índices alarmantes de nefrotoxicidade. A busca por uma alternativa de intervenção terapêutica que obtenha resultados promissores no desenvolvimento e agravamento da lesão renal aguda abre oportunidades para novos estudos que disponibilizem dados com impacto para melhoria de protocolos assistenciais, destinados a pacientes críticos em uso de medicamentos nefrotóxicos.

A fim de descobrir os efeitos adversos de infusões medicinais, é importante à realização de testes que assegurem que as substâncias tenham fins terapêuticos, e assim se possa chegar à novos medicamentos. Os testes toxicogenéticos possuem papéis importantes e fundamentais nas fases precoces do desenvolvimento de novos fármacos,

sendo que adianta os riscos e, portanto, reduzem as possibilidades de que um novo fármaco promissor falhe em etapas mais avançadas. Assim proporciona a segurança de que a saúde do ser humano não seja colocada em risco (CUNNIHGAM, 2000; DORATO e BUCKLEY, 2006).

O trabalho justifica-se pela necessidade de realizar testes para avaliar os efeitos toxicogénicos, a nível celular, da Anfotericina B em diferentes ensaios pré-clínicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos toxicogénicos, a nível celular, de um polímero nanoparticulado de angico associado a Anfotericina B em diferentes ensaios pré-clínicos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade do fármaco nanocapsulado através de testes de letalidade do microcrustáceo *A.salina*;
- Verificar os danos causados ao material genético por intermédio do método de fragmentação do DNA em gel de agarose.

3,REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A anfotericina B agrupa-se, juntamente com a nistatina, aos antibióticos poliênicos, cuja estrutura é macrocíclica e caracterizada por átomos de carbono divalentes dispostos em série. Atua como fungicida ligando-se ao ergosterol, esteróide presente na membrana de fungos sensíveis, alterando a permeabilidade desta e causando a perda de constituintes citoplasmáticos. Adicionalmente, leva a uma lesão oxidativa que resulta em alterações metabólicas prejudiciais à sobrevivência celular. (MARTINEZ 2006).

A anfotericina B (AmB) é um antimicrobiano da classe dos polienos, isolado pela primeira vez em 1955 a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* obtidas no delta do rio Orinoco, na Venezuela. A baixa solubilidade é uma característica dos antimicrobianos polienos (KLEINBERG et al).

A formulação convencional da anfotericina B, para uso médico, associa a esta droga o desoxicolato de sódio, cuja finalidade é solubilizá-la em água e estabilizar a suspensão na forma de micélios. A aplicação por via endovenosa, em infusão lenta, é necessária para se obter níveis úteis no sangue e tecidos. (SCIELO 2006).

A anfotericina é uma molécula anfipática, ou seja, possui uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica, esta última a torna insolúvel em meios aquosos. A solubilidade aquosa é adquirida através da formulação com o deoxicolato de sódio ou uma variedade de carreadores lipídicos. A anfotericina B produz freqüentes efeitos adversos, quer relacionados à infusão, quer tardios, por toxicidade celular e tecidual.

O principal efeito adverso associado ao uso de anfotericina B é a nefrotoxicidade. Além da nefrotoxicidade, outros efeitos adversos, como reações agudas infusionais, anemia, neutropenia, plaquetopenia e alterações de enzimas hepáticas, estão descritos. Os efeitos adversos da anfotericina B, especialmente a nefrotoxicidade, limitam seu uso de forma importante, pois trazem consequências significativas do ponto de vista de desfechos clínicos e custos hospitalares (BATES 2001). A intensidade dessas reações adversas varia conforme o paciente diminui com a progressão do tratamento. Os efeitos adversos tardios relacionam-se diretamente com a dose cumulativa recebida de anfotericina B e, também com a sensibilidade e condições orgânicas do paciente.

As reações imediatas à infusão decorrem da liberação de interleucinas e prostaglandinas, manifestando-se como febre, calafrios, taquicardia, hipertensão arterial, náuseas e vômitos. A intensidade dessas reações imediatas varia conforme o paciente e diminui com a progressão do tratamento. Os efeitos adversos tardios relacionam-se diretamente com a dose cumulativa recebida de anfotericina B e, também, com a sensibilidade e condições orgânicas do paciente. Mais comuns são a nefrotoxicidade e a anemia, que requerem correção de doses e de intervalos da administração e eventualmente obrigam a uma suspensão da terapia. (CARVALHO 1998)

A toxicidade da anfotericina B pode ser dividida em efeitos agudos (reações agudas infusionais) e subagudos (toxicidade renal, hematológica e hepática). Reações agudas infusionais são caracterizadas por sintomas como calafrios, febre, náuseas e vômitos, cefaleia, hipotensão, taquicardia e dispneia, que ocorrem durante a

administração de anfotericina B. Tais reações frequentemente requerem atenção médica e uso de medicamentos, tais como dexclorfeniramina ou meperidina.

A nefrotoxicidade é um evento adverso, bastante conhecido, da terapia com anfotericina B. A perda de função renal é uma complicação relativamente comum, assim como outros eventos, como hipocalemia, hipomagnesemia, acidose metabólica devido a acidose tubular renal distal e poliúria devido a diabetes insipidus nefrogênico. (DERAY,2002).

A despeito da disponibilidade de novas drogas antifúngicas, este medicamento ainda exerce um papel importante na prática clínica, particularmente em ambientes onde os recursos financeiros são limitados, como na maioria dos hospitais públicos brasileiros. (KLEINBERG,2006)

O termo “Nanopartícula”, aplicado literalmente, compreende uma partícula que, independentemente da sua constituição, forma, tipos de interações e aplicações, apresenta um tamanho nanométrico. As nanopartículas são uma inovação em ciências farmacêuticas. Permitem ultrapassar as limitações de sistemas de veiculação clássicos, desenvolver novas estratégias de diagnóstico e tratamento, assim como abrir caminho para uma melhor compreensão de mecanismos biológicos. (FRANCO 2013)

As nanopartículas apresentam características muito úteis, principalmente para a ciência. Podem aumentar os limites de sensibilidade e a especificidade de testes bioquímicos e métodos analíticos, permitir a visualização de tecidos e células marcadas com as nanopartículas em técnicas de imagiologia, e permitem o aumento da eficácia, conforto e segurança dos fármacos, como sistemas de veiculação de fármacos. (FRANCO 2013). São formadas por materiais diversos, como o ouro, a prata, o carbono, o zinco, a argila, dentre vários outros. Dessa forma, possuem utilidade devido à relação entre a área e o volume que apresentam.

O termo “nanopartícula” engloba dois tipos de estruturas diferentes, nomeadamente nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a sua composição e organização estrutural. As nanocápsulas constituem sistemas reservatórios onde é possível identificar-se um núcleo líquido diferenciado (óleo ou água) rodeado por material sólido (invólucro polimérico). Neste caso a substância ativa pode encontrar-se dissolvida no núcleo e/ou incluída ou adsorvida na parede polimérica. As nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas que, contrariamente às nanocápsulas não apresentam um núcleo diferenciado. As substâncias ativas neste tipo de nanopartículas

encontram-se frequentemente distribuídas/encapsuladas de forma homogênea no interior da matriz, sendo libertadas por difusão, podendo ainda encontrar-se adsorvidas à superfície da nanoesfera (COUVREUR et al., 1995, 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES, 2007, STEICHEN et al., 2013).

A proposição de nanocápsulas como sistemas capazes de controlar limitações associadas a terapêutica convencional está principalmente relacionada com suas propriedades de controle da liberação e transporte de fármacos para sítios de ação específicos, o que leva, conseqüentemente, a um aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos (BARRATT, 2000; NIMESH et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011). Além disso, as nanocápsulas são potencialmente capazes de proteger o fármaco contra a degradação química enzimática ou imunológica (MORA HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RFO; GECKELLER, 2011; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

Nanocápsulas poliméricas vêm sendo estudadas extensivamente para liberação de fármacos por diversas vias de administração. Atualmente a nanoencapsulação de fármacos é considerada o meio mais eficiente de assegurar liberação controlada, direcionamento específico e redução dos efeitos adversos.

Existem alguns métodos desenvolvidos para a preparação de nanopartículas poliméricas descritos na literatura. De uma maneira geral estes podem ser classificados em duas grandes categorias, dependendo se as nanopartículas são preparadas diretamente através de reações de polimerização de monómeros ou através de polímeros, sintéticos ou naturais, pré-formados (COUVREUR et al., 1995).

Os métodos que envolvem reações de polimerização de monómeros, tais como polimerização interfacial e polimerização por meio de emulsões (aquosas ou orgânicas), frequentemente requerem a realização de processos adicionais de purificação do material coloidal obtido de forma a eliminar moléculas residuais do meio de polimerização, que podem ser eventualmente tóxicas, tais como monómeros, ou surfactantes (COUVREUR et al., 1995; REIS et al., 2006).

A nanomedicina surgiu como uma nova ferramenta para alavancar os avanços das aplicações de nanomateriais na medicina tradicional. Com isso, inúmeras aplicações de nanomateriais para diagnóstico e tratamento têm sido descritas na literatura desde seu surgimento (BLANCO et al., 2011; CARUSO et al., 2012; PERINOTTO et al., 2008). A

entrega de medicamentos foi uma das primeiras áreas a crescer neste cenário, e uma das que mais se desenvolveu ao longo dos anos (COUVREUR 2012) Consequentemente, a ideia de aliar diagnóstico e entrega do ativo para o tratamento pontual tem avançado. (LIU; ROBINSON; TABAKMAN 2011).

A utilização de nanomateriais em medicina faz com que as instrumentações e metodologias tradicionais de análise sejam melhoradas a cada nova descoberta. (KRANZ; MIZAIKOFF 2011). Por isso, a utilização de técnicas de diagnóstico baseadas em nanopartículas oferece uma alta sensibilidade, como no caso do diagnóstico de cânceres em estágios iniciais. (BLANCO 2011). Por exemplo, se uma nanopartícula for suficientemente seletiva na marcação de uma célula cancerígena e esta for diagnosticada por imagem ou outra técnica analítica altamente sensível, aumentará as chances do paciente ter a cura completa da doença sem atingir os outros níveis da doença, como a metástase. (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO 2013).

Nanopartículas são tipicamente referidas como partículas microscópicas com tamanho entre 1 nm e 100 nm (LAURENT; MAHMOUDI, 2011). Algumas das características das partículas como tamanho, área superficial da partícula, composição química da superfície, dosagem e produção de radicais livres têm papel importante no comportamento, estabilidade e nanotoxicidade das nanopartículas (LAURENT; MAHMOUDI, 2011). Uma redução no tamanho dessas partículas aumenta a superfície de contato e, portanto, mais moléculas químicas podem se ligar a essa superfície, aumentando sua reatividade e/ou seus efeitos tóxicos. (NÓBREGA, 2019).

As nanopartículas usadas na liberação vetorizada de fármacos podem ser classificadas como passivas ou ativas. Na liberação passiva, as nanopartículas são planejadas de modo que seu tamanho ou características da superfície facilitem a acumulação das partículas no órgão alvo passivamente. Por exemplo, nanopartículas podem alvejar tumores através do efeito de permeabilidade e retenção aprimoradas (EPR effect). Para a vetorização ativa as nanopartículas são conjugadas com moléculas-ligantes ou sistemas carregadores que interajam com receptores associados no tecido-alvo (SINGH; LILLARD, 2009; BERTRAND et al., 2014; TROIANO et al., 2016; LEE; YEO, 2015).

As características químicas e físicas das partículas podem ser modificadas para aumentar sua reatividade com os tecidos do corpo. Mudanças químicas na superfície das

partículas podem vetorizá-las a um local de liberação específico (targeting) ou modificar sua toxicidade (CLIFT 2008; LAURENT; MAHMOUDI, 2011; SINGH; LILLARD, 2009; TROIANO 2016). São comumente usados com o objetivo de melhorar a estabilidade físico-química da droga carregada e, assim, sua biodisponibilidade (SOUTO et al., 2019).

Além disso, a efetividade das partículas depende também da dosagem prescrita e das substâncias utilizadas. Pesquisas demonstram que uma dose elevada de nanopartículas, em partículas pequenas ou grandes, pode ser prejudicial à saúde (SINGH et al., 2007).

O rápido avanço da nanomedicina está intimamente relacionado com algumas propriedades dos nanomateriais as quais permitem aplicações em diagnósticos e terapias. (CARUSO; HYEON; ROTELLO; CHEM 2012). Para o desenvolvimento de nanomateriais com alta especificidade, sejam quais forem as aplicações, características como estabilidade, dispersão de tamanho, morfologia, carga superficial e toxicidade devem ser bem definidas para que os resultados desejados sejam alcançados. (Boulaiz 2011) Por exemplo, os agentes terapêuticos podem ser encapsulados, ligados covalentemente ou adsorvidos sobre os nanomateriais, dando origem aos chamados materiais teranósticos (que servem para terapia e diagnóstico ao mesmo tempo). (Cancino, Marangoni, Zucolotto 2013).

Bioensaios toxicogenéticos

Um dos ensaios biológicos que vem tomando destaque por utilizar apenas morte ou sobrevivência de organismos como único parâmetro de análise, servindo como teste para o descobrimento de substâncias que venham a ter uma possível atividade biológica com base na toxicidade geral, além de ser de fácil manuseio e baixo custo, uma vez que não utiliza de aparelhagem especial e facilmente aloja um alto número de larvas, possibilitando validação estatística, garantindo um método confiável, é o bioensaio de toxicidade frente às larvas de *Artemia salina* (RAJABI 2015).

A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrado em águas salgadas utilizada como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos

encontrados em lojas de aquaristas. Essa espécie de microcrustáceo marinho tem sido utilizada em experimentos laboratoriais como um bioindicador, sendo o seu grau de tolerância em relação a um fator ambiental reduzido e específico, de modo que apresenta uma resposta nítida frente a pequenas variações na qualidade do ambiente (ABEL, 1989).

Este microcrustáceo enquadra-se como um organismo regulador hipo / hiper-osmótico capaz de manter as concentrações de íons de hemolinfa, dentro de limites estreitos sobre uma gama de salinidade externa de NaCl a 0,26% em ambientes supersaturados (CARVALHO et al., 2009; ATES et al., 2013). O uso da *Artemia salina* tem relevância ecológica nos ecossistemas marinhos, pois estes organismos são uma representação da comunidade zooplanctônica e vital na ecologia das praias.

A *Artemia salina* é conhecida por sua capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, tornando-se um organismo de teste crucial na ecotoxicologia (REGUEIRAS et al., 2018). Seus cistos se adaptam ao estresse de várias maneiras. Eles são cercados por uma parede celular rígida impermeável à maioria dos compostos químicos e que funciona como um escudo contra a radiação ultravioleta. Os cistos de *Artemia salina* contêm grandes quantidades de trealose, um açúcar não redutor com função de preservar membranas e proteínas durante a dessecação (MACRAE et al., 2016). Um fundamento pela ampla utilização deste microcrustáceo está ligado a disponibilidade comercial de ovos dormentes, os quais são colhidos em grandes quantidades em lagos de sal (ARCANJO et al., 2012)

O ensaio de letalidade de *Artemia salina* é um bioensaio padronizado em pesquisa marinha e aquática que tem sido sucessivamente empregado para fornecer dados iniciais de toxicidade que pode ser apoiada por bioensaios mais específicos e mais sofisticados, uma vez que os compostos ativos tenham sido isolados (REGUEIRAS et al., 2018; APU et al., 2010).

Vários estudos tem sido desenvolvido utilizando o teste de toxicidade em *Artemia salina*, o qual é empregado desde a extratos até substâncias isoladas com a finalidade de encontrar a LC_{50} , justificando assim seu uso como um dos primeiros testes a serem utilizados na investigação da concentração a ser utilizada (DO AMARANTE et al., 2011; ARCANJO et al., 2012; ULLAH et al., 2013), bem como correlacionar a toxicidade do bioensaio com outras atividades farmacológicas, tais como antifúngicos, antiviral e antimicrobiana (MACBAE et al., 1988), antiparasitária (SAHPAZ et al., 1994), antitripanossoma (ZANI et al., 1995), antiplasmódica (DO AMARANTE et al., 2011) e antitumoral (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN; ROGERS, 1988; NUNES et al.,

2009; ARCANJO et al., 2012) além de outra possibilidade que pode estar associadas a investigação da ecotoxicidade de nanomateriais em ecossistemas marinhos (ATES et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Bioensaios de letalidade em Artemia salina (BSLB)

Para tanto, foi utilizado o teste de letalidade de *Artemia salina* para verificar a toxicidade de ambas as substâncias, bem como o teste de fragmentação de DNA para verificar danos ao material genético de células humanas de sangue (leucócitos-GM16000). Para o teste de *Artemia salina*, foi utilizado dois tempos de exposição (TE: 24h e 48h), com diferentes concentrações de Anfotericina B.

Para a preparação da *A. salina*, os cistos do microcrustáceo foram adquiridos no mercado central de Teresina-PI, Brasil. Esta foi uma rápida modificação do método descrito por Meyer et. Al. (1982). Foram incubados cistos do microcrustáceo (*Artemia salina*) contendo uma mistura 50:50 de solução salina (água do mar artificial: 23,0 g de NaCl, 11,0 g de MgCl₂.6H₂O, 4 g de Na₂SO₄, 1,3 g de CaCl₂.2H₂O, 0,7 g de KCl em 1 L de água destilada e ajustado para pH 8,5 utilizando Na₂CO₃, 1N) e água mineral sob arejamento constante durante 48 h a $27 \pm 3^\circ$ C. Após incubação, os náuplios ativos livres de conchas do microcrustáceo foram recolhidos a partir da porção mais iluminada da câmara de incubação e utilizados para o ensaio. Dez náuplios foram retirados por meio de uma pipeta Pasteur e inseridos em cada tubo de ensaio contendo 5,5 mL da solução salina. Em cada experimento, foi adicionado 0,5 mL da amostra teste (tratamentos) a 5,5 mL de solução de salina. Mantendo a mesma temperatura de eclosão, sob a luz, os náuplios sobreviventes foram contados. Foram utilizados três tubos para cada tratamento. A mortalidade de *A. salina* foi contada após 24h e 48h de exposição às substâncias testadas. Ao todo foram testados 5 grupos experimentais, em dois tempos de exposição, sendo 10 náuplios por grupo em três tubos de ensaio, totalizando 150 náuplios.

Eletrforese em Gel de Agarose para detecção de Fragmentação de DNA

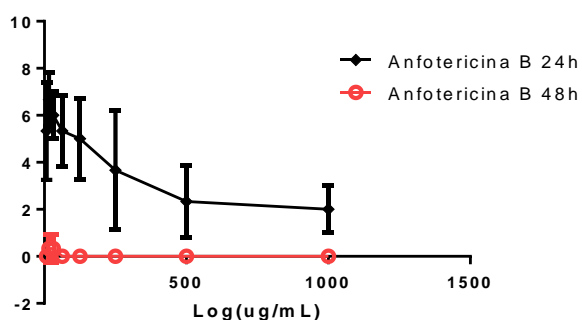
DNA celular total foi extraído de acordo com Smith et al. (1989) após a cultura de células de leucócitos (GM16000) por 48hs, na concentração de 1×10^6 células. Amostras de DNA na concentração de 200ng foram aplicadas em gel de agarose 2% e avaliadas por eletroforese usando TBE 1X por 2hs a 80V e 50mA. Foi utilizado o corante Diamond dye para revelação das imagens em lâmpada UV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artemia salina

No tempo de exposição de 24h, a EC50 da anfotericina B foi de 67,3 $\mu\text{g/ml}$. No tempo de 48h, todas as concentrações das substâncias foram tóxicas, onde a Anfotericina B apresentou uma EC50 de 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ (figura1).

Figura 1. Atividade tóxica da Anfotericina B em diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB).



DL50: 67.3 $\mu\text{g/ml}$ (24h) e 0.0001 $\mu\text{g/ml}$ (48h)

Fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose

No teste de fragmentação de DNA (TE: 48h), verificou-se que a Anfotericina B não apresentou fragmentação do DNA. O teste apresentou uma banda forte de DNA íntegro, com pouco arraste por fragmentação de DNA. Todos os tratamentos se mostraram muito semelhante ao controle negativo (CN). Além disso, percebe-se que o controle positivo (Cisplatina 2 $\mu\text{g/ml}$) apresentou fragmentação de DNA (arraste) e banda única em menor proporção (figura 2).

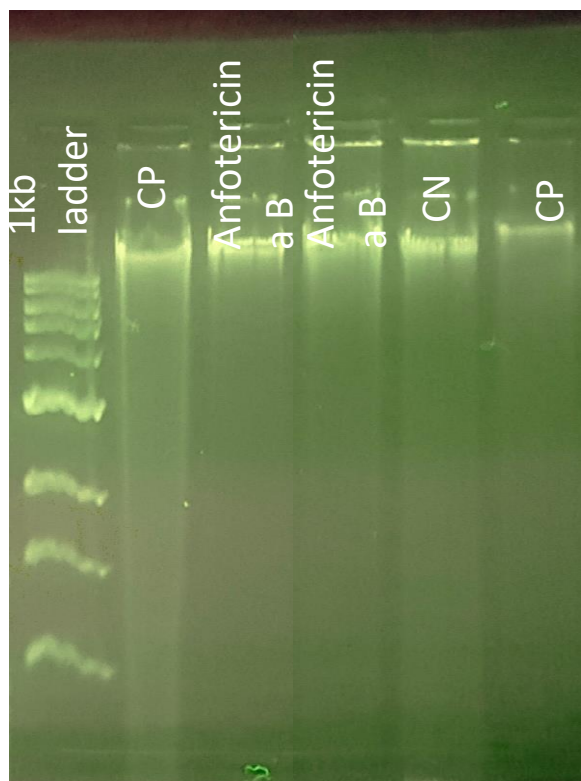


Figura 2. Teste de Fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8%. CP: Controle Positivo (Cisplatina 2 μ /ml); CN: Controle negativo (solução salina).

Nas últimas décadas a área de liberação de fármacos tem recebido crescente atenção por parte da comunidade científica por vários motivos. Um deles é a questão da não solubilidade dos fármacos em água, quando administrados por via venosa, irritação gastrointestinal durante a administração via oral entre outros. Esses problemas já vêm sendo resolvidos por várias frentes. Uma delas é o uso de nanopartículas coloidais para a distribuição da droga. As vantagens do uso desse tipo de carreador coloidal são a proteção dos agentes terapêuticos instáveis contra a degradação nas partículas e o controle da taxa de liberação do agente ativo a partir do transportador coloidal.

Os polímeros são uma das classes de materiais mais versáteis e têm mudado nosso cotidiano por várias décadas (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001) com importantes aplicações na área médica, agricultura (CHANDRA; RUSTGI, 1998) e engenharia (LANGER; PEPPAS, 2003). A fusão da ciência de polímeros com as ciências farmacêuticas conduziu para um avanço espetacular em termos de “inovação” (flexibilidade no estado físico, forma, tamanho e superfície) no design e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (SLFs) (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

Polímeros também funcionam como veículos e podem ser adicionados aos ingredientes ativos. Esses carreadores podem ser usados para liberar uma grande variedade de fármacos em uma taxa controlada no trato gastrintestinal (ZHU, 2002). Devido as suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada do fármaco, os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas (RIOS, 2005)

As nanopartículas poliméricas são as partículas mais estudadas para o carreamento de diversos tipos de moléculas terapêuticas, devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de serem não tóxicas e não imunogênicas. Um dos primeiros relatos da utilização de nanopartículas poliméricas para o tratamento de câncer foi em 1979 quando Couvreur et al. Desenvolveram um método simples para a produção de nanopartículas de poli (alquil- -cianoacrilato).

Desde então, nanopartículas desse polímero são intensivamente estudadas para o carreamento e a liberação de diversas drogas anticancerígenas. (COEVREUR, 1982). Além disso, as nanopartículas poliméricas são uma alternativa promissora para a síntese de transportadores de fármacos, uma vez que muitas dessas estruturas são bem aceitas pelo organismo, sejam elas naturais ou sintéticas (DHIVYA et al. 2018).

Os polímeros naturais são aqueles que são encontrados na natureza como, por exemplo, proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, amido, látex e algodão. Já os polímeros sintéticos são derivados de combustíveis fósseis, como o petróleo. São exemplos o poliestireno, o náilon, o polietileno, o polipropileno e o poli(tereftalato de etileno). (MANO; MENDES, 2004).

Os polímeros utilizados industrialmente são majoritariamente de origem sintética, estes são bastante resistentes e após seu descarte, permanecem por muitos anos quimicamente e fisicamente inalterados, por serem estáveis frente à absorção de radiação ultravioleta e à degradação enzimática causada por microorganismos (FECHINE, 2013). Os polímeros mais utilizados no cotidiano são: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (os), poli(tereftalato de etileno) (PET) e poli(cloreto de vinila) (PVC) (LANDIM et al., 2016). Apesar dos inúmeros benefícios da utilização desses materiais, há alguns problemas associados à relação de produção e consumo, pois as matérias-primas para a produção desses materiais são de fonte não renovável (petróleo) gerando problemas para o seu descarte.

No campo da medicina, as nanopartículas (NPs) estão sendo empregados como um novo sistema de entrega de drogas, proteínas, DNA e anticorpos monoclonais. A maioria das NPs com aplicações médicas são lipossomas, polietilenoglicol e dendrímeros (BAHADAR et al. 2016). Os seres humanos estão expostos a vários materiais em nanoescala desde a infância e o novo campo emergente da nanotecnologia tornou-se outra ameaça à vida humana. Devido ao seu pequeno tamanho, as NPs encontram seu caminho facilmente para entrar no corpo humano e atravessar as várias barreiras biológicas, podendo atingir os órgãos mais sensíveis. Os cientistas propuseram que NPs de tamanho inferior a 10 nm agem de forma semelhante a um gás e podem entrar facilmente nos tecidos humanos e podem perturbar o ambiente bioquímico normal da célula (VISHWAKARMA et al. 2010). Estudos em animais e humanos mostraram que após a inalação e através da exposição oral, os NPs são distribuídos para o fígado, coração, baço e cérebro, além dos pulmões e do trato gastrointestinal (HAGENS et al. 2007; NEMMAR et al. 2002; TAKENAKA et al. 2001). Para limpar esses NPs do corpo, os componentes do sistema imunológico são ativados. A meia-vida estimada de NPs nos pulmões humanos é de cerca de 700 dias, representando uma ameaça consistente ao sistema respiratório. Durante o metabolismo, algumas das NPs são congregadas nos tecidos hepáticos (BAHADAR et al. 2016).

Enquanto os estudos *in vivo* fornecem informações críticas para a avaliação de risco, os estudos *in vitro* nos ajudam a entender os mecanismos moleculares e bioquímicos da nanotoxicidade e fornecem informações sobre as propriedades físico-químicas dos nanomateriais que contribuem para a toxicidade. Por exemplo, nanopartículas de óxido metálico podem elevar o nível de estresse oxidativo (OS) através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS; por exemplo, $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2) de várias maneiras. Essas espécies de alta energia podem atacar lipídios, ácidos nucleicos, proteínas e outras biomoléculas essenciais. O dano consequente inclui danos à estrutura mitocondrial, despolarização da membrana mitocondrial e comprometimento da cadeia de transporte de elétrons. Danos ao DNA, incluindo quebras de fita dupla e fita simples, são identificadas pelo ensaio do cometa e podem levar à parada do ciclo celular ou apoptose.

O estudo de Soares et al. 2020 mostrou que a avaliação da citotoxicidade da papaína livre em macrófagos peritoneal de camundongos apresentou baixa citotoxicidade nas concentrações estudadas (12, - 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), porém quando foi associada a um

nanomaterial, demonstrou citotoxicidade nas concentrações entre 200-800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pati et al. 2016 mostram que a viabilidade celular de macrófagos expostos a ZnO de nanopartículas é dependente da concentração e diminui em 80% a viabilidade celular na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ZnO NPs. Isso ocorre porque as NPs de ZnO provocam apoptose e autofagia celular, contribuindo para a elevada citotoxicidade (ZHANG et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

Pelos testes avaliados, a Anfotericina B apresentou alta toxicidade no teste do microcrustáceo *A. salina*. No teste de fragmentação de DNA, houve poucos danos ao material genético de células de sangue periférico humano. Dessa forma, conclui-se que doses altas dessas substâncias podem ser tóxicas e perigosas para o uso humano, mesmo que a Anfotericina B tenha um amplo uso para tratamento de diferentes patologias. Dessa forma o presente estudo aponta que mais estudos são necessários para se verificar os potenciais benefícios da Anfotericina B nanoparticulada e, principalmente, seus riscos toxicológicos.

7. REFERÊNCIAS

ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

BAHADAR H, MAQBOOL F, NIAZ K, ABDOLLAHI M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran Biomed J.* 2016;20(1):1-11.

BATES DW, SU L, YU DT, CHERTOW GM, SEGER DL, GOMES DR, ET AL. Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. *Kidney Int.* 2001;60(4):1452-9. [http:// dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00948.x](http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00948.x). PMID:11576359

BLANCO, E.; HSIAO, A.; MANN, A. P.; LANDRY, M. G.; MERIC-BERNSTAM, F.; FERRARI, M.; *Cancer Science* 2011, 102, 1247.

BOULAIZ, H.; ALVAREZ, P. J.; RAMIREZ, A.; MARCHAL, J. A.; PRADOS, J.; RODRIGUEZ-SERRANO, F.; PERAN, M.; MELGUIZO, C.; ARANEGA, A.; *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 3303.

BRANCH RA. Prevention of amphotericin B-induced renal impairment. A review on the use of sodium supplementation. *Arch Intern Med.* 1988;148(11):2389- 94. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1988.00380110049010>. PMID:3056312

CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTO, Valtencir. NANOTECNOLOGIA EM MEDICINA: ASPECTOS FUNDAMENTAIS E PRINCIPAIS PREOCUPAÇÕES. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 3, 521-526, 2014

CARUSO, F.; HYEON, T.; ROTELLO, V. M.; *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2537.

CARVALHO, CAMILO ET AL. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers–Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 6, n. 1, 2009.

GIBAUD S, DEMOY M, ANDREUX JP, WEINGARTEN C, GOURITIN B, COUVREUR P. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J Pharm Sci.* 1996 Sep;85(9):944-50. .

COUVREUR P, KANTE B, GRISLAIN L, ROLAND M, SPEISER P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *J Pharm Sci.* 1982;71(7):790-2.

CUNNINGHAM M.J., LIANG S., FUHRMAN S., SEILHAMER J.J., SOMOGYI R. Gene expression microarray data analysis for toxicology profiling. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;919:52-67.

DERAY G. AMPHOTERICIN B NEPHROTOXICITY. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(Suppl 1):37- 41. http://dx.doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.37. PMID:11801579

DORATO M.A., BUCKLEY L.A. Toxicology in the drug discovery and development process. *Curr Protoc Pharmacol.* 2006 Apr;Chapter 10:Unit10.3.

FRANCO, N. A. **Nanopartículas e suas Aplicações em Ciências Farmacêuticas O Estado da Arte.** Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

GALLIS HA, DREW RH, PICKARD WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis.* 1990;12(2):308-29.

HAGENS WI, OOMEN AG, DE JONG WH, CASSE FR, SIPS AJ. What do we need to know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory toxicology and pharmacology*. 2007;49(3):217–229.

HASLAM, E. **Chemistry of vegetable tannins**. London: Academic, 1966. 170 p.

KLEINBERG M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(Suppl 1):12- 6.

KRANZ, C.; EATON, D. C.; MIZAIKOFF, B.; *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399, 2309.

LANIADO-LABORIN R, CABRALES-VARGAS MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol.* 2009;26(4):223-27

LEMKE A, KIDERLEN AF, KAYSER O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;68(2):151-62. [http:// dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1955- 9](http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9). PMID:15821914.

LIU, Z.; ROBINSON, J. T.; TABAKMAN, S. M.; YANG, K.; DAI, H.; *Mater. Today* **2011**,14,316

MARTINEZ, R. **Atualização no uso de agentes antifúngicos**. *J Bras Pneumol*, São Paulo, 2006, p.32. Disponível em

NEMMAR A, HOET PH, VANQUICKENBORNE B, DINSDALE D, THOMEER M, HOYLAERTS MF, VANBILLOEN H, MORTELMANS L, NEMERY B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002;105(4):411–414.

NOBREGA, F. J. **Estudo de caracterização de nanopartículas contendo carvacrol** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p.47, 2019.

OLIVEIRA, Renata Barbosa de; LIMA, Eliana Martins. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de Fármacos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, Goiânia, v. 3, n. 1, p. 29-35, jul./dez. 2006. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/2072/2014>>

PATHAK A, PIEN FD, CARVALHO L. Amphotericin B use in a community hospital, with special emphasis on side effects. *Clin Infect Dis*. 1998;26(2):334-8. Comment in: *Clin Infect Dis*. 1998;26(2):339-40.

PATI, R., DAS, I., MEHTA, R. K., SAHU, R., & SONAWANE, A. Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects

by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2016, 150(2), 454–472.

PERAZELLA M.A. Renal vulnerability to drug toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; 4(7):1275-83.

PERFECT JR, DISMUKES WE, DROMER F, GOLDMAN DL, GRAYBILL JR, HAMILL RJ, ET AL. Clinical practice

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI M.; NAJI T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 23, n. 1, p. 20, 2015.

SCHLOTTFELDT, F.S. **Prevenção da nefrotoxicidade da anfotericina B por meio do uso de fitomedicamentos**. *Revista da Escola de enfermagem, São Paulo*, 2014, p.74-78.

SOARES AMBF, GONÇALVES LMO, FERREIRA RDS, DE SOUZA JM, FANGUEIRO R, ALVES MMM, CARVALHO FAA, MENDES AN, CANTANHÊDE W. Immobilization of papain enzyme on a hybrid support containing zinc oxide nanoparticles and chitosan for clinical applications. *Carbohydr Polym*. 2020 Sep 1;243:116498. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116498.

TAKENAKA S, KARG E, ROTH C, SCHULZ H, ZIESENIS A, HEINZMANN U, SCHRAMEL P, HEYDER J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental health perspectives*. 2001;109(4):547–551.

VISHWAKARMA V, SAMAL SS, MANOHARAN N. Safety and risk associated with nanoparticles-a review. *Journal of minerals and materials characterization and engineering*. 2010;9(5):455.

ZHANG, J., SONG, W., GUO, J., ZHANG, J., SUN, Z., DING, F., ... GAO, M. Toxic effect of different ZnO particles on mouse alveolar macrophages. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 219–220, 148–155.