

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 04/12/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



“Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de Fenil-tio-ftalocianinica de Zinco e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana”

Rodrigo Passos Evangelista

Orientador: Prof. Dr Fernando Lucas Primo

Araraquara – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

“Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de Fenil-tio-ftalocianina de Zinco e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana”

Rodrigo Passos Evangelista

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr Fernando Lucas Primo

Araraquara – SP
2019

E92d Evangelista, Rodrigo Passos.
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de Fenil-tio-ftalocianina de Zinco e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana / Rodrigo Passos Evangelista. – Araraquara: [S.n.], 2019.
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

1. Nanocápsulas. 2. Fenil-tio-ftalocianina. 3. Anfotericina B. 4. Espectroscopia. 5. Microscopia de Força Atômica. 6. Citotoxicidade. 7. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

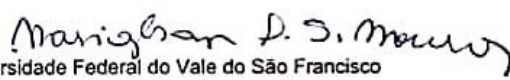
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de derivado ftalocianínico e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

AUTOR: RODRIGO PASSOS EVANGELISTA

ORIENTADOR: FERNANDO LUCAS PRIMO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO 
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARIGILSON PONTES DE SIQUEIRA MOURA 
Colegiado Acadêmico de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES 
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 04 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Permito-me iniciar revelando que com relação a esse trabalho desenvolvido, pessoas há cuja minha gratidão é enorme e, possivelmente, as palavras sejam ineficientes em expressar tal sentimento, pois apenas funcionam como a letra de uma bela música sem com isso poder transmitir a sua melodia que toca e encanta.

Meus Sinceros votos de agradecimentos:

À DEUS primeiramente, pois ele me deu a maior de todas as oportunidades, a VIDA, a partir da qual tudo se inicia tornando possíveis às realizações permeadas por ações, sensações e emoções, culminando em experiências de superação.

Ao meu Orientador e Prof. Dr. Fernando Lucas Primo que me aceitara como aluno oportunizando o avanço dos meus estudos e conhecimento. Além disso, sempre foi bastante compreensivo com minhas dificuldades, fossem elas de ordem teórico-práticas ou pessoais, e me deu apoio para continuar em um momento bem difícil por que passei durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP de Araraquara (incluindo aqui também todos os professores, técnicos e auxiliares administrativos) que mais uma vez abriu as suas portas para me receber permitindo que eu utilizasse as suas dependências sempre em prol do avanço do conhecimento.

À profa. Dr^a Rosimeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro que, com seu conhecimento, auxiliou no planejamento dos ensaios biológicos cedendo, também, a linhagem fúngica, e ao colega e técnico de laboratório, Rodrigo Sorrechia, pela ajuda, inclusive, na consecução de tais ensaios.

À minha companheira Lídia Harumi Uehara que divide comigo as alegrias e as tristezas de cada dia, incitando-me a tornar-me um Ser Humano cada vez melhor.

Aos colegas de pós-graduação Agnes, Bruno, Cassamo, Daniela, Renata, e, principalmente, à colega Camila Fernanda Amantino que, desde o início de minhas atividades de pós-graduando, foi quem mais me ensinou e ajudou no entendimento da teoria bem como da prática experimental. Doou seu tempo com paciência e, talvez sem perceber, fez não apenas o seu projeto de pesquisa acontecer, mas, certamente, o meu também. Muito obrigado Camila, desejo-lhe paz e um futuro abundante de realizações positivas.

À toda a minha família, sobretudo ao meu tio Valmir Passos que, desde o início da minha vida, me deu as oportunidades de estudar e à minha tia Fátima Derissi Passos, que com seu esforço e auxílio em meus deveres de ordem pessoal, permitiram que eu fosse até o fim neste projeto. Ah, quantas conversas e histórias foram contadas ao pé de uma mesa acompanhadas por uma deliciosa xícara de café.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

RESUMO

O avanço tecnológico cresce rapidamente no mundo, inclusive na área farmacêutica. Nesse contexto, sistemas nanoestruturados ganham progressivo destaque, porquanto carregam um enorme potencial para o aperfeiçoamento das práticas terapêuticas atuais. A administração de fármacos na forma livre pode apresentar problemas como baixa concentração no sítio ativo, inadequada distribuição pelo organismo, baixa biodisponibilidade, presença de efeitos adversos, entre outros. As nanocápsulas poliméricas são capazes de contornar tais vieses, possibilitando, inclusive, a diminuição da toxicidade com a diminuição de doses e aumento da estabilidade de fármacos em meios biológicos. Foram desenvolvidas nanocápsulas poliméricas contendo Anfotericina B (AMB) e Fenil-tio-ftalocianina de zinco (ZnS₄Pc) na concentração teórica de 0,05 mg.mL⁻¹ objetivando, com a associação entre os dois ativos, melhorar a atividade antifúngica conseguida pelo antifúngico isoladamente utilizando-se a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. A avaliação das características físico-químicas das nanocápsulas mostraram diâmetro médio de partícula de 253,8 ± 17,3 nm, índice de polidispersidade médio de 0,36 ± 0,01 e potencial Zeta médio de - 31,03 ± 5,54 mV. Tais análises revelaram-se satisfatórias já que o diâmetro de partícula conseguido pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizado na produção das nanocápsulas varia de 250 a 500 nm (MORA-HUERTAS et. al., 2010), enquanto que o potencial zeta considerado para uma formulação estável deve ser maior que 30 mV em módulo (RAVAL et al., 2019). Análises de espectroscopia de absorção e emissão realizadas na região do UV-Vis não encontraram alterações nas propriedades fotofísicas no estado estacionário de NC/ZnS₄Pc e NC/ZnS₄Pc + AMB em relação a ZnS₄Pc livre. Os ativos nas NC foram quantificados utilizando-se uma curva analítica de correlação de absorção e concentração variando de 0,255 a 2,04 µg.mL⁻¹ para a ZnS₄Pc e 0,50 a 10,00 µg.mL⁻¹ para AMB, de cuja análise obtivemos uma quantificação, para as NC com ativos isolados, de 43,8% para ZnS₄Pc e 75,0% para AMB; Para as NC mistas, isto é, NC/ZnS₄Pc + AMB, esses teores foram de 30,7% e 67,7%, respectivamente. No que diz respeito ao teor de encapsulação, para as nanocápsulas com ativos isolados, notou-se um alto valor de 89,6% para ZnS₄Pc e que se manteve com 89,2% para as NC Mistas. Além disso, um estudo morfológico das formulações de NC foi realizado com Microscopia de Força Atômica denotando a presença de nanocápsulas de formato esférico e com distribuição homogênea. O ensaio de viabilidade celular com as células NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™ não demonstrou citotoxicidade para as mesmas na presença das NC mistas com fatores de diluição de até 15% (v/v). Para o ensaio de atividade fotodinâmica, foram utilizadas NC mistas diluídas de 1% e 5% (v/v) junto às leveduras *Candida albicans* ATCC® 90028 e, diferentemente do que ocorreu para as células NIH/3T3, as NC mistas apresentaram toxicidade fúngica tanto na ausência de luz quanto na presença da mesma com irradiação de 12 J/cm² e 25 J/cm². Todos os resultados foram tratados estatisticamente através do teste de análise de variância One-way ANOVA seguido do pós teste Tukey t-test para múltiplas comparações (p<0,05).

Palavras-chaves: Nanocápsulas. Fenil-tio-ftalocianina. Anfotericina B. Espectroscopia. Microscopia de Força Atômica. Citotoxicidade. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

ABSTRACT

Technological advancement is growing rapidly in the world, including the pharmaceutical area. In this context, nanostructured systems gains progressive prominence, as they carry enormous potential for the improvement of current therapeutic practices. The drugs administration in the free-form may present problems such as low active site concentration, inadequate distribution throughout body, low bioavailability, presence of adverse effects, among others. Polymeric nanocapsules allowing the reduction of toxicity with decreasing doses and increasing the stability of drugs in biologic media. Polymeric nanocapsules containing Amphotericin B (AMB) and zinc phenyl-thio-phthalocyanine (ZnS4Pc) were developed at a 0.05 mg/mL theoretical concentration to improve antifungal activity with the association between the two actives over antifungal alone. The nanocapsules physical-chemical characteristics showed an average particle diameter of $253,8 \pm 17,3$ nm, an average polydispersity index of $0,36 \pm 0,01$ and negative Zeta potential $-31,03 \pm 5,54$ mV. These analyzes proved satisfactory since the particle diameter achieved by the preformed polymer interfacial deposition method used in nanocapsule production ranges from 250 to 500 nm (MORA-HUERTAS et. al., 2010), while the Zeta potential considered for a stable formulation should be bigger than 30 mV in modulus (RAVAL et al., 2019). Absorption and emission spectroscopy analyzes performed in the UV-Vis region found no changes in the steady state photophysical properties of NC / ZnS4Pc and NC / ZnS4Pc + AMB in relation to free form ZnS4Pc. Assay quantification was performed using a concentration and absorption correlation analytical curve ranging from 0.255 to 2.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ZnS4Pc and 0.50 to 10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for AMB. For NC with isolated assets, we got 43.8% for ZnS4Pc and 75.0% for AMB; for the mixed NC (NC / ZnS4Pc + AMB) these contents were 30.7% and 67.7% respectively. Regarding the encapsulation content, for nanocapsules with isolated actives, a high value of 89.6% was observed for ZnS4Pc and remained with 89.2% for Mixed NC. In addition, a morphological study of NC formulations was performed with Atomic Force Microscopy denoting the presence of homogeneously distributed spherical-shaped nanocapsules. Cell viability assay with NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™ cells showed no cytotoxicity to them in the presence of mixed NC with dilution factors of up to 15% (v/v). For the photodynamic activity assay, 1% and 5% (v/v) diluted mixed NC were used with *Candida albicans* ATCC® 90028™ yeasts and, unlike for NIH/3T3 cells, mixed NC showed fungal toxicity in both the absence of light and in its presence with irradiation of 12 J/cm² and 25 J/cm². All results were statistically treated using the One-way ANOVA analysis of variance test followed by the Tukey t-test post-test for multiple comparisons (p <0.05).

Keywords: Nanocapsules. Phenyl-thio-phthalocyanine. Amphotericin B. Spectroscopy. Atomic Force Microscopy. Cytotoxicity. Antimicrobial Photodynamic Therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>AMB</i>	Anfotericina B
<i>BHE</i>	Barreira HematoEncefálica
<i>d</i>	Diâmetro (nm)
<i>DLS</i>	Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico da luz)
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
<i>DP</i>	Desvio-Padrão
<i>KolliphorP188</i> poli(etilenoglicol)	Poli(etilenoglicol)-bloco-poli(propilenoglicol)-bloco poli(etilenoglicol)
<i>IC</i>	Intervalo de Confiança
<i>IUPAC</i>	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e aplicada)
<i>LD</i>	Limite de detecção
<i>LPC</i>	Concentração do princípio ativo presente no sobrenadante da amostra
<i>LQ</i>	Limite de Quantificação
<i>Lipoid S100</i>	Fosfatidilcolina de soja
<i>MFA</i>	Microscopia de Força Atômica
<i>MFC</i>	Concentração Fungicida Mínima
<i>% m/v</i>	Porcentagem massa/volume
<i>N/m</i>	Newtons/metros
<i>NC</i>	<i>Nanocápsulas</i>
<i>NC/AMB</i>	Nanocápsulas com Anfotericina B

<i>NC/Vazia</i>	Nanocápsulas vazias
<i>NC/ZnS4Pc</i>	Nanocápsulas com Fenil-Tio-Ftalocianina de zinco
<i>NC/ZnS4Pc + AMB</i> Anfotericina B	Nanocápsulas com Fenil-Tio-Ftalocianina de zinco e Anfotericina B
<i>nm</i>	Nanômetros
<i>nm/min</i>	Nanômetros/minutos
<i>µg/mL</i>	Microgramas/mililitro
<i>OMS</i>	Organização Mundial de Saúde
<i>O₂</i>	Oxigênio molecular
<i>¹O₂[*]</i>	Oxigênio no estado singleto
<i>³O₂</i>	Oxigênio no estado tripleto
<i>Pdl</i>	Índice de polidispersão
<i>PDT</i>	Terapia Fotodinâmica
<i>aPDT</i>	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
<i>PLGA</i>	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
<i>POP</i>	Procedimento Operacional Padrão
<i>PS</i>	Fotossensibilizador
<i>¹PS</i>	Fotossensibilizador no estado fundamental
<i>¹PS[*]</i>	Fotossensibilizador no estado singleto
<i>³PS[*]</i>	Fotossensibilizador no estado tripleto
<i>R</i>	Coeficiente de Correlação
<i>R²</i>	Coeficiente de Determinação
<i>rpm</i>	Rotações por minuto

<i>ROS</i>	Espécies reativas de Oxigênio
<i>Sp</i>	Solução padrão
<i>SNC</i>	Sistema Nervoso Central
<i>T.E</i>	Teor de Encapsulação
<i>TPC</i>	Concentração total do princípio ativo na formulação
<i>UV</i>	Ultravioleta
<i>UV-Vis</i>	Ultravioleta-Visível
<i>ZnS4Pc</i>	Fenil-Tio-Ftalocianina de zinco
ζ	Potencial zeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análises físico-químicas de NC/Vazias pelo método do DLS.

Tabela 2 – Análises físico-químicas de NC/ZnS₄Pc pelo método do DLS.

Tabela 3 – Análises físico-químicas de NC/AMB pelo método do DLS

Tabela 4 – Análises físico-químicas de NC/ZnS₄Pc + AMB pelo método do DLS

Tabela 5 - Quantificação dos ativos nas NC/ZnS₄PC e NC/AMB

Tabela 6 - Quantificação dos ativos nas NC/ZnS₄PC + AMB

Tabela 7. Teor de encapsulação de ZnS₄Pc para NC/ZnS₄Pc

Tabela 8. Teor de encapsulação de ZnS₄Pc e AMB para NC/ZnS₄Pc + AMB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas

Figura 2 – Estrutura molecular da Anfotericina B

Figura 3 – Mecanismo de ação da AMB.

Figura 4 – Estrutura e diferenciação dos principais PS derivados heterocíclicos utilizados em PDT

Figura 5 – Estrutura química do PS Zinco Fenil-Tio-Ftalocianina

Figura 6 – Diagrama de Jablonski simplificado – mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio medidas por luz

Figura 7 – Método de deposição interfacial do polímero pré-formado, também designado nanoprecipitação, descrito por Fessi et al. (1989)

Figura 8 – Espectrofotômetro GENESYSTM 10S UV-Vis- ThermoFisher Scientific e Espectrofluorímetro RF 6000 – Shimadzu

Figura 9 – Esquema representativo das etapas do experimento do teor de encapsulação

Figura 10 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/Vazia

Figura 11 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/Vazia

Figura 12 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/ZnS4Pc

Figura 13 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/AMB

Figura 14 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/ZnS4Pc + AMB

Figura 15 – Fotomicrografias tridimensionais obtidas das formulações NC/ZnS4Pc (A) e NC/ZnS4Pc + AMB (B) por Microscopia de Força Atômica

Figura 16 – Fotomicrografia tridimensional e perfil topográfico de NC/ZnS₄Pc (A) e NC/ZnS₄Pc + AMB (B) com medidas de diâmetro e altura provenientes da análise do software.

Figura 17 – Curva de espectro de absorção: de ZnS₄Pc livre (A) e AMB livre (B) em Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 1,275 µg.mL⁻¹ e 6 µg.mL⁻¹, respectivamente.

Figura 18 – Curva de espectro de emissão de ZnS₄Pc livre em ACN, ZnS₄Pc encapsulada (NC/ZnS₄Pc) em H₂O e NC/ZnS₄Pc + AMB em H₂O.

Figura 19 - Curva de espectro de absorção de ZnS₄Pc livre em 672 nm (A) correlacionando a máxima absorção e a concentração em DMSO variando de 0,255 – 2,04 µg.mL⁻¹ com equação da reta $y = 0,6053x + 0,0131$, $R = 0,9999$, e curva de espectro de absorção de AMB livre em 416 nm (B) correlacionando a máxima absorção e a concentração em DMSO variando de 0,5 – 10 µg.mL⁻¹ com equação da reta $y = 0,0752x + 0,0098$, $R = 0,9996$.

Figura 20 – Curva representativa da quantificação em triplicata de ZnS₄Pc e AMB para NC/ZnS₄Pc (A) e NC/AMB (B).

Figura 21 – Curva representativa da quantificação em triplicata de ZnS₄Pc e AMB para NC/ZnS₄Pc + AMB.

Figura 22 – Tempo de incubação em 0, 24 e 48 h de *C. albicans* com resazurina em PBS a 37° C.

Figura 23 – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* de NC Vazia e NC Mista em linhagem NIH/3T3 (fibroblastos de murino) utilizando resazurina, em que CT= controle somente com meio DMEN, A= NC Mista diluída a 1% (v/v), B= NC Mista diluída a 2,5% (v/v), C= NC Mista diluída a 5% (v/v), D= NC Mista diluída a 10% (v/v), E= NC Mista diluída a 15% (v/v), e F= NC vazia diluída a 15% (v/v).

Figura 24 – Ensaio de Atividade Fotodinâmica Antimicrobiana *in vitro* de NC Mista em *C. albicans* ATCC® 90028 utilizando resazurina, em que CT= controle somente com PBS, C1= NC Mista diluída a 1% (v/v) no escuro, C2= NC Mista diluída a 5% (v/v) no escuro, CTLD1= Controle com dose de luz 12 J/cm², C1LD1= NC Mista diluída a

1% (v/v) com dose de luz 12 J/cm², C2LD1= NC Mista diluída a 5% (v/v) com dose de luz 12 J/cm², CTLD2= Controle com dose de luz 25 J/cm², C1LD2= NC Mista diluída a 1% (v/v) com dose de luz 25 J/cm², C2LD2= NC Mista diluída a 5% (v/v) com dose de luz 25 J/cm².

Figura 25 – Ensaio de MFC com NC mistas diluídas a 1% e 5% (v/v) em PBS e doses de luz de 12 J/cm² e 25 J/cm² em que [A-D]1 = controles de dose luz (células em PBS + luz), [A-D]3 = leveduras com NC Mistas diluídas a 1% (v/v) e [A-D]5 = leveduras com NC Mistas diluídas a 5% (v/v).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	19
2.2	ANFOTERICINA B	21
2.3	FTALOCIANINAS	24
2.4	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT – “Antimicrobial Photodynamic Therapy”)	28
2.5	NANOMATERIAIS POLIMÉRICOS E NANOPARTÍCULAS	32
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVOS GERAIS	36
3.2	ETAPAS DO TRABALHO	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	MATERIAIS	37
4.2	MÉTODOS	38
4.2.1	PROTOCOLO DE PREPARO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO FENILTIO-FTALOCIANINA DE ZINCO E ANFOTERICINA B	38
4.2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS	40
4.2.2.1	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS E ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE	40
4.2.2.2	MEDIDA DO POTENCIAL ZETA	40
4.2.2.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	41
4.2.3	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO	42
4.2.4	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROANALÍTICO	43
4.2.4.1	LINEARIDADE	44
4.2.4.2	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	44

4.2.5.....	QUANTIFICAÇÃO E TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DOS ATIVOS NA FORMULAÇÃO	45
4.2.6	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO COM RESAZURINA: PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE VIABILIDADE CELULAR.....	46
4.2.7	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS NIH/3T3 UTILIZANDO RESAZURINA.....	47
4.2.8	ENSAIO DE ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICRIANA (FOTOINATIVAÇÃO) E MFC.....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS	52
5.1.1	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE E POTENCIAL ZETA DAS NANOCÁPSULAS.....	52
5.1.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	57
5.2	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	60
5.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROANALÍTICO	63
5.3.1	LINEARIDADE.....	63
5.3.2	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	65
5.4	QUANTIFICAÇÃO E TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DOS ATIVOS NA FORMULAÇÃO	65
5.5	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO COM RESAZURINA.....	70
5.6	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS NIH/3T3 UTILIZANDO RESAZURINA	71
5.7	ENSAIO DE ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (FOTOINATIVAÇÃO) E MFC.....	73
6	CONCLUSÕES.....	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
8	APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

É muito difícil, senão impossível, pensar na medicina, ciência e arte de curar, sem nos referirmos aos “remédios” que a ela auxiliam desde sempre a cumprir seu objetivo. A história nos revela que na antiguidade as práticas terapêuticas foram envolvidas em rituais religiosos, específicos no que diz respeito às crenças particulares de cada povo, e acompanhadas pela utilização das chamadas ervas medicinais (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). Hoje, com o conhecimento técnico-científico e avanço acelerado da ciência, muitas ervas e produtos de origem biológica e sintética deram origem aos medicamentos, como sendo poderosas ferramentas sem as quais as práticas médicas e terapêuticas não seriam possíveis. Em meio a esse cenário, houve um afã por novas descobertas e desenvolvimento de novos produtos visando melhorar os tratamentos médicos existentes e a qualidade de vida dos pacientes. Akkari *et al* (2016) cita, por exemplo, que desde a década de 1940 grandes empresas multinacionais do setor farmacêutico com forte investimento em P&D, cresceram de forma acelerada devido a um elevado número de lançamentos de medicamentos inovadores no mercado.

Assim, periodicamente, deparamo-nos com novas propostas medicamentosas que são lançadas no mercado, visando, de alguma forma, trazer novas esperanças terapêuticas. Os avanços mais recentes da ciência têm trabalhado com a ideia da nanotecnologia (FIGUEIRAS *et al.*, 2014), e não podia ser diferente na área de desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Polímeros (macromoléculas unidas repetida e continuamente) biodegradáveis dão origem a diferentes materiais que podem ser empregados na construção de reservatórios para o armazenamento e transporte de medicamentos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanopartículas poliméricas representam esses reservatórios de tamanho nanométrico que tem por objetivo, por meio de diversos mecanismos, otimizar a terapia medicamentosa frente a uma enfermidade (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A Anfotericina B (AMB) é um antifúngico pertencente à classe dos polienos. Foi descoberta e isolada em 1955, no Instituto Squibb para Pesquisas Médicas, a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* presentes em amostras obtidas do solo do Rio Orinoco da Venezuela (FALCI; PASQUALOTTO, 2015; ARRUDA *et al.*, 2016). Sua eficácia e espectro de ação a promoveram ao patamar de fármaco de referência

no controle de infecções fúngicas (ARRUDA *et al.*, 2016). Vários artigos já foram publicados relatando a melhora dos efeitos de AMB quando veiculados por nanopartículas, como, por exemplo, para o tratamento de Paracoccidiodomicose (SOUZA *et al.*, 2015) e Leishmaniose cutânea (CASA *et al.*, 2018).

Devemos nos ater, contudo, que não só evoluíram as plataformas de veiculação dos medicamentos, como, também, várias substâncias já foram propostas e estudadas com a meta de serem reconhecidos como possíveis novos arsenais terapêuticos. Assim é, por exemplo, o que ocorreu com um grupo de corantes chamado ftalocianinas que já experimentou diversas modificações estruturais visando alcançar melhores propriedades físicas, químicas e farmacocinéticas (LI, X. *et al.*, 2017). As ftalocianinas representam uma classe de compostos heterocíclicos caracterizadas por um macrociclo central conjugado por quatro unidades de diiminoisoindolinas unidas por átomos de nitrogênio (MELVILLE *et al.*, 2015). A partir da década de 1930, após as ftalocianinas serem estruturalmente definidas e nomeadas, ocuparam um lugar de destaque na indústria têxtil e de corantes devido a sua estabilidade térmica, baixa solubilidade e reatividade (GOBO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Sua aplicação, contudo, não se restringe a essas áreas, tendo aplicação em outras, tais como: células solares (VAROTTO *et al.*, 2010), materiais semicondutores (BECHTOLD *et al.* 2012), Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) (CARMELLO *et al.*, 2016), dentre outros.

Como se pôde notar, as ftalocianinas também são utilizadas na Terapia Fotodinâmica (PDT), que representa uma nova modalidade terapêutica cuja proposta é promover o tratamento de uma determinada enfermidade pela combinação de oxigênio molecular, substância sensível à luz – Fotossensibilizador (PS) e, claro, a presença da luz em um determinado comprimento de onda específico capaz de excitar o PS (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010)

6 CONCLUSÕES

As NC foram desenvolvidas e caracterizadas físico-quimicamente, alcançando, assim, o objetivo primeiro do trabalho. As análises apresentaram resultados satisfatórios com tamanhos médios inferiores a 300 nm, índice médio de polidispersão de $0,36 \pm 0,01$ e carga de superfície (Potencial zeta) negativa, cujo valor médio se encontra dentro da região de estabilidade. As análises espectroscópicas de emissão de fluorescência sugerem não ter havido indícios de interação do PS com os componentes da nanocápsula, o que é bom, já que é um indicativo da manutenção da integridade da molécula e manutenção de suas propriedades fotofísicas, permitindo a continuidade dos estudos. A linearidade das curvas analíticas foi conseguida com sucesso traduzindo-se por um valor de $R^2 > 0,999$ para ambas as curvas analíticas, e mantendo uma ótima correlação entre a concentração do analito e absorção da amostra. A concentração teórica das NC mostrou-se muito superior ao LQ do equipamento, permitindo quantificá-los seguramente. Consoante às medidas de quantificação, foi possível notar a existência de perda dos ativos durante o processo de produção de NC/ZnS₄Pc e NC mistas, sendo maiores, sobretudo, para as últimas. O teor de encapsulação de ZnS₄Pc revelou-se alto para a formulação de NC mistas, porém demonstrou baixa encapsulação de AMB. As fotomicrografias de MFA demonstraram NC de formato esférico característico e com tamanhos semelhantes aos encontrados pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz- DLS. Ensaio de viabilidade celular, utilizando células de fibroblasto de murino (NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™) e NC mistas diluídas até 15 % (v/v), não demonstraram citotoxicidade para as primeiras, o que possibilitou continuar com os estudos para avaliação do efeito fotodinâmico antimicrobiano *in vitro*. O ensaio de atividade

fotodinâmica antimicrobiana mostrou considerável efeito tóxico para as células leveduriformes de *C. albicans* ATCC® 90028™, em que na dose de luz de 12 J/cm² em 660 nm e NC Mista diluída a 5 % (v/v) (~ 0,64 µmol.L⁻¹ de ZnS₄Pc) verificou-se redução de 56% da viabilidade celular. Conjectura-se que, possivelmente, com maiores doses de luz e a formulação menos diluída, haja uma potencialização do efeito esperado, requerendo, para isso, mais estudos e ensaios que o comprovem. Todo efeito observado foi devido a uma atividade fungistática, como se observou no ensaio de MFC.

Dito isso, conclui-se que a utilização da nanotecnologia para produção de NC foi de extrema importância para a avaliação de atividade antifúngica de moléculas apolares, cuja atividade não seria possível de ser analisada sem o sistema empregado, dada a insolubilidade das mesmas em meio aquoso. Ademais, a utilização da aPDT mostrou resultados significativamente melhores em comparação à sua não utilização, o que, em outras palavras, justificou sua utilização para a proposta empregada desde o início, sendo, assim, uma ferramenta promissora.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKARI, A. C. S. *et al.* Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países farmaemergentes. **Gestão & Produção**, v. 23, n. 2, p. 365-380, 2016.

ARRUDA, G. J. B. *et al.* Estratégias tecnológicas para formulações de Anfotericina B em sistemas lipídicos disponíveis no mercado farmacêutico e outros promissores sistemas de administração. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 2, p. 59-67, 2016.

BANIK, B. L.; FATTAHI, P; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 271-299, 2016.

BECHTOLD, I. H. *et al.* New columnar Zn-phthalocyanine designed for electronic applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 45, p. 13554-13560, 2012.

CARMELLO, J. C. *et al.* In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. **Oral Diseases**, v. 22, n. 5, p. 415-422, 2016.

CASA, D. M. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 12-18, 2018.

CHAMIEH, J. *et al.* Size characterization of commercial micelles and microemulsions by Taylor dispersion analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1-2, p. 46-54, 2015.

CHEN, Z. *et al.* An effective zinc phthalocyanine derivative for photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Journal of Luminescence**, v. 152, p. 103-107, 2014.

CRUCHO, C. I. C; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771-784, 2017.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DLUGASZEWSKA, J. *et al.* Antimicrobial and anticancer photodynamic activity of a phthalocyanine photosensitizer with N-methyl morpholiniumethoxy substituents in non-peripheral positions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, p. 67-79, 2017.

DUBES, A. *et al.* Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 279-282, 2003.

ERTEM, B. *et al.* Synthesis, structural characterization, and investigation on photophysical and photochemical features of new metallophthalocyanines. **Journal of Luminescence**, v. 204, p. 464-471, 2018.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and biomedical Research**, Porto Alegre. v. 35, n. 2, p. 65-82, 2015.

FESSI, H. P. F. D. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIGUEIRAS, A. R. R; COIMBRA, A. B; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14, 2014.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C.. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de Anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FRESHNEY, R. I. The culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature. In: FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd. ed. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 71.

GOBO, N. R. da Silva. **Estratégias sintéticas para a preparação de novos fotossensibilizadores do tipo ftalocianinas**. 2013. 205 f. Tese (Mestrado em Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/6555/5184.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 01 Nov, 2017.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: A bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67-73, 2016.

HÖNIGSMANN, H. History of phototherapy in dermatology. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 12, n. 1, p. 16-21, 2013.

HU, C. *et al.* Atomic force microscopy characterisation of alkali-silica reaction products to reveal their nanostructure and formation mechanism. **Ceramics International**, v. 44, n. 6, p. 7310-7314, 2018.

IACG. Interagency Coordination Group on Microbiological Resistancy. Não há tempo a perder: Acautelar o futuro contra infeccções resistentes aos medicamentos – Relatório para o Secretário Geral das Nações Unidas. Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), 2019. Disponível em: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_summary_PT.pdf?ua=1.

ICH. Guideline Harmonized Tripartite. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). *In*: ICH. **International Conference on Harmonization**, Geneva. 2005. p. 11-12.

IMPERIALE, J. C. *et al.* Polymer-based carriers for ophthalmic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 285, p. 106-141, 2018.

INSTRUMENTS, Malvern. Zetasizer nano series user manual. **MAN0317**, v. 1, p. 288, 2004.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.

JAYME, C. C.; DE PAULA, L. B.; REZENDE, N.; CALORI, I. R.; FRANCHI, L. P.; TEDESCO, A. C. DNA polymeric films as a support for cell growth as a new material for regenerative medicine: Compatibility and applicability. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 2, p. 404-412, 2017.

LANGEVIN, D. *et al.* Towards reproducible measurement of nanoparticle size using dynamic light scattering: Important controls and considerations. **NanoImpact**, v. 10, p. 161-167, 2018.

LEE, J. J.; YAZAN, L. S.; ABDULLAH, Che Azurhanim Che. A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2373, 2017.

LI, Q. *et al.* A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, v. 7, n. 6, p. 122, 2017.

LI, X. *et al.* Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 379, p. 147-160, 2017.

LIU, X. *et al.* A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 97, p. 24-32, 2018,

MARÍN, R. R. R.; BABICK, F.; HILLEMANN, L. Zeta potential measurements for nonspherical colloidal particles—Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, p. 516-521, 2017.

MELO, M. T. de. **Atividade de nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro alumínio associada a fármacos leishmanicidas baseado na terapia fotodinâmica**, 2015. 144 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-07102015-144424/pt-br.php>>. Acesso em 10 Jan, 2019.

MELO, M. A. de.; CÁSSIA, W. de.; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 331-340, 2012.

MELVILLE, O. A.; LESSARD, B. H.; BENDER, T. P. Phthalocyanine-based organic thin-film transistors: a review of recent advances. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 24, p. 13105-13118, 2015.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, Article 286, p. 1-10, 2012.

MILADI, K. *et al.* Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies. **Industrial Crops and Products**, v. 72, p. 24-33, 2015.

MONTEIRO, S. da. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-M27A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002.

NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its applications in medicine. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 081-089, 2015.

OLIVEIRA, K. T. de. *et al.* Conceitos fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do tipo Porfirinas, clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: Opções de ação. Geneva, 2012. 16 p. Disponível em: <https://www.afro.who.int/sites/default/files/201706/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf> . Acesso em: 10 Ago. 2017.

RAMALHO, M. J. *et al.* Receptor-mediated PLGA nanoparticles for glioblastoma multiforme treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 545, n. 1-2, p. 84-92, 2018.

RAVAL, N. *et al.* Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *In*: TEKADE, R.K.; RAVAL, N. *et al.* **Basic Fundamentals of Drug Delivery**. Academic Press, 2019. p. 369-400.

RAWAT, M. *et al.* Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.

REZENDE, N. *et al.* Standardization of a resazurin-based assay for the evaluation of metabolic activity in oral squamous carcinoma and glioblastoma cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 371-374, 2019.

RIBEIRO, A. P. D. *et al.* Photodynamic Inactivation of Planktonic Cultures and Biofilms of *Candida albicans* Mediated by Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Entrapped in Nanoemulsions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 1, p. 111-119, 2012.

RIZVI, S. A. A; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p.64-70, 2017.

SATTLER, K. D. **Handbook of nanophysics**: Nanoparticles and Quantum Dots. Boca Raton: CRC Press; Taylor & Francis Group, 2010. 708 p. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9781420075458>>. Acesso em: 01 Ago. 2017.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHEIKH, N. *et al.* Antifungal drug resistance in Candida species. **European Journal of General Medicine**, v. 10, n. 4, p254-258, 2013.

SHEINGOLD, B. H.; HAHN, J. A. The history of healthcare quality: The first 100 years 1860–1960. **International Journal of Africa Nursing Sciences**, v. 1, p. 18-22, 2014.

SILVA, C. *et al.* Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. *et al.* Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 1, p. 9-14, 2010.

SOUTO, E. B. *et al.* Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SOUZA, A. C. O. *et al.* Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 267-276, 2015.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2013.

VAROTTO, A. *et al.* Phthalocyanine blends improve bulk heterojunction solar cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2552-2554, 2010.

XU, M.; MCCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 1-7, 2015.

WALSH, T.J.; FINBERG, R.W.; ARNDT, C.; HIEMENZ, J.; SCHWARTZ, C.; BODENSTEINER, D, *et al.* Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **New England Journal of Medicine**.v. 340, n. 10, p. 764-771, 1999. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199903113401004>.