

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

FRANCINE ALESSANDRA MANENTE

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HESPERIDINA E ANFOTERICINA EM
DANOS HEPÁTICO E RENAL E NAS OXIDAÇÕES BIOQUÍMICAS**

PONTA GROSSA

2013

FRANCINE ALESSANDRA MANENTE

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HESPERIDINA E ANFOTERICINA EM
DANOS HEPÁTICO E RENAL E NAS OXIDAÇÕES BIOQUÍMICAS**

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, da Universidade
Estadual de Ponta Grossa.**

**Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio
Velloso**

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

PONTA GROSSA

2013

M274 Manente, Francine Alessandra
Estudo da associação entre hesperidina e anfotericina em danos hepáticos e renal e nas oxidações bioquímicas / Francine Alessandra Manente. Ponta Grossa, 2013.
92 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) , Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso.

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes.

1. Hesperidina. 2. Anfotericina B. 3. Estresse oxidativo. 4. Citotoxicidade. 5. Nefrotoxicidade. I. Velloso, José Carlos Rebuglio. II. Fernandes, Daniel . III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T

CDD : 615

TERMO DE APROVAÇÃO

FRANCINE ALESSANDRA MANENTE

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HESPERIDINA E ANFOTERICINA EM DANOS HEPÁTICO E RENAL E NAS OXIDAÇÕES BIOQUÍMICAS

Dissertação aprovada em 18 de fevereiro de 2013 como requisito para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG e Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, área de concentração em Farmacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

Prof Dr José Carlos Rebuglio Velloso
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof Dr Paulo César Ghedini
Universidade Federal de Goiás

Prof Dr Edmar Miyoshi
Universidade Estadual de Ponta Grossa

PONTA GROSSA - PR

2013

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises Moleculares e Bioquímicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) com apoio Financeiro da Fundação Araucária de Apoio ao desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná por meio da concessão de Bolsa de Mestrado.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação as pessoas que sempre me apoiaram e estão ao meu lado em todas as horas e momentos, sendo eles bons e ruins. São as pessoas mais importantes na minha vida e que sempre incentivam minhas decisões. Dedico este trabalho a minha família: **Meu pai, Minha mãe e Meu irmão.** Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado a oportunidade de estudar, de poder realizar este mestrado e de tudo o que Ele tem me proporcionado.

Agradecer aos meus pais Francisco Carlos Manente e Nilcéia Costa Manente, e ao meu irmão Francis Albert Manente por todo apoio, toda compreensão, mesmo quando eu achava que não era capaz de alguma coisa e não acreditava no meu potencial.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso por me orientar, por me incentivar a continuar nesta carreira, me apoiar e por ter se tornado um grande amigo.

Ao meu namorado André Almeida por todo carinho, pela paciência, ajuda e compreensão. Obrigada amor!

Ao meu co-orientador prof Dr. Daniel Fernandes pela ajuda na experimentação animal, e aos alunos Willian Machado e Luiz Renato Olchanheski Junior porque sem eles eu não conseguiria ter realizado os experimentos nos animais.

Ao prof Dr. Najeh Khalil e a aluna Juliana Kovalczuk por terem realizado o teste antifúngico.

Ao prof Dr. Eduardo Campagnoli por ter me ajudado a fazer toda a histologia e a interpretar os resultados.

Ao prof Alceu Toledo por ter me disponibilizado os equipamentos do Laboratório Vicentino e a farmacêutica Carla Luiza Blasius por ter me ajudado a realizar a hematologia e os testes bioquímicos das ratas.

Ao prof Fabio André Santos e a aluna Letícia Antonello de Campos por terem me ajudado a realizar os ensaios com a Artemia Salina.

Ao secretário do mestrado, o Rubyan pela ajuda e paciência.

A prof Dr. Iracilda Zeppone Carlos e as alunas Livia e Ana Carolina da UNESP de Araraquara por terem realizado os ensaios com as células.

Ao prof Dr. Flávio Luis Beltrame por toda ajuda e apoio.

Aos meus colegas, amigos e companheiros de laboratório Ana Flávia Tostes da Silva, Isabella Aparecida Heinrich, Josiane Schemberger, Gisele Chibisnki Parabocz, Josilaine Tonin Ribas e Harli Pasquinni Netto pela ajuda, companheirismo e horas de conversa.

Aos meus colegas e amigos de mestrado Antonio Munhoz, Yvanna Carla Salgado, Débora Dalla Vecchia, Anelise Russo Sanches, Stefanie Nolte Dykstra e Thais Latansio de Oliveira.

Aos professores Dr. Paulo César Ghedini, Dr. Edmar Mioshi, Dr. Flávio Luis Beltrame e Dra. Katia Paludo por terem aceitado o meu convite de participar da minha banca defesa.

"Os três grandes fundamentos para se

conseguir qualquer coisa são:

Primeiro: trabalho árduo;

Segundo: perseverança;

Terceiro: senso comum."

[Thomas A. Edison]

RESUMO

A anfotericina B (AmB) é fármaco "padrão ouro" para o tratamento de infecções fúngicas invasivas desde 1960. Entretanto, a anfotericina B apresenta elevada toxicidade, que se manifesta mais freqüentemente nos rins (nefrotoxicidade) e com menor frequência no fígado (hepatotoxicidade). É sabido, desde 1985, que a auto-oxidação da anfotericina B origina diferentes formas de espécies reativas oxidativas e estas seriam responsáveis, em parte, pela toxicidade. Agentes antioxidantes, tais como a hesperidina e rutina, poderiam contribuir, por meio do decréscimo do estresse oxidativo, para a proteção renal e contra a injúria gerada pela isquemia. Tal fato e o envolvimento da anfotericina B na geração de radicais livres tornam interessante a avaliação do efeito da hesperidina, rutina e anfotericina B (isoladamente ou associadas) frente a espécies reativas do oxigênio e radicais livres, bem como o estudo das mesmas em modelos de toxicidade. No teste antifúngico a associação com a hesperidina mostrou sinergismo. Nos testes em sistemas oxidativos, frente ao ABTS^{•+}, a hesperidina apresentou IC₅₀= 0,0044mg/mL, a rutina IC₅₀=0,0023mg/mL e a anfotericina B IC₅₀=0,0124mg/mL (isolada), IC₅₀=0,0003mg/mL (associada à hesperidina) e IC₅₀=0,0014mg/mL (associada à rutina). No ensaio do DPPH[•] apenas a rutina mostrou ação. Frente ao HOCl, a hesperidina apresentou IC₅₀=0,0109, a rutina IC₅₀=0,0025 e a anfotericina B apresentou IC₅₀=0,0056 (isolada), IC₅₀=0,0023mg/mL (associada com a hesperidina) e IC₅₀=0,0036 (associada com a rutina). No ensaio com o O₂^{•-} as amostras não foram efetivas. Na inibição da cinética da MPO/H₂O₂/Guaiacol somente a rutina promoveu inibição. Frente aos eritrócitos, a anfotericina promoveu lise de modo dose-dependente. Utilizando as células HUVEC, as associações diminuíram a viabilidade celular. Entretanto, no ensaio de toxicidade com a *Artemia salina* as amostras associadas foram capazes de diminuir a toxicidade da anfotericina B. Para finalizar, nos testes com os animais a anfotericina B causou leucopenia, monopenia e gerou dano renal, o qual pode ser revertido utilizando a hesperidina em associação. Com estes resultados pode-se sugerir que a associação de um produto natural com a anfotericina B poderia diminuir a toxicidade causada por este antifúngico, sendo que sua utilização concomitante poderá ser promissora.

Palavras-chave: hesperidina, anfotericina B, rutina, estresse oxidativo, citotoxicidade, nefrotoxicidade.

ABSTRACT

Amphotericin B (AmB) is drug "gold standard" for the treatment of invasive fungal infections since 1960. However, amphotericin B has high toxicity, which manifests itself most commonly in the kidneys (nephrotoxicity) and less frequently in the liver (liver toxicity). It is known since 1985 that self-oxidation of amphotericin B gives different forms of reactive oxidative species and these are responsible in part by toxicity. An antioxidant, such as hesperidin and rutin, could contribute, through the reduction of oxidative stress, and to protect against renal injury generated by ischemia. This fact and the involvement of amphotericin B in the generation of free radicals make it interesting to evaluate the effect of hesperidin, rutin and amphotericin B (alone or associated) against reactive oxygen species and free radicals, as well as the study of the same models in toxicity. In testing the antifungal combination with hesperidin showed synergism. In tests oxidative systems, opposite the ABTS^{•+}, the hesperidin showed IC₅₀= 0,0044mg/mL, rutin IC₅₀=0,0023mg/mL and amphotericin B IC₅₀=0,0124mg/mL (isolated), IC₅₀=0,0003mg/mL (associated with hesperidin) and IC₅₀=0,0014mg/mL (associated with rutin). In the DPPH[•] assay only rutin was action. Front HOCl, hesperidin showed IC₅₀=0,0109, rutin IC₅₀=0,0025 and amphotericin B showed IC₅₀=0,0056 (isolated) IC₅₀=0,0023mg/mL (associated with hesperidin) and IC₅₀=0,0036 (associated with rutin). In the trial with O₂^{•-} the samples were not effective. In inhibition kinetics MPO/H₂O₂/Guaiacol only rutin promote inhibition. Front to erythrocytes, amphotericin promoted lysis in a dose-dependent manner. HUVEC cells using the associations decreased cell viability. However, in the toxicity test with *Artemia salina* associated samples were able to lower the toxicity of amphotericin B. To conclude, in tests with animals amphotericin B caused leukopenia, monopenia generated and renal damage, which can be reversed using hesperidin in combination. With these results, we suggest that the combination of a natural product with amphotericin B could decrease the toxicity caused by this antinfúngico, and concomitant use could be promising.

Keywords: hesperidin, amphotericin B, rutin, oxidative stress, cytotoxicity, nephrotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura molecular da Anfotericina B	20
Figura 2 - Estrutura molecular Hesperidina	27
Fluxograma 1 - Delineamento experimental	35
Gráfico 1 - Ação <i>scavenger</i> da anfotericina B e hesperidina sobre o radical ABTS ^{•+} , em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0	47
Gráfico 2 - Ação <i>scavenger</i> sobre o radical ABTS ^{•+} : hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações, em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0	48
Gráfico 3 - Ação <i>scavenger</i> da anfotericina B e hesperidina sobre o radical DPPH [•] (60μM), em etanol absoluto	49
Gráfico 4 - Ação <i>scavenger</i> sobre o radical DPPH [•] (60μM): hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações	50
Gráfico 5 - Ação <i>scavenger</i> da anfotericina B e hesperidina sobre o HOCl.....	51
Gráfico 6 - Ação <i>scavenger</i> sobre o HOCl: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações	52
Gráfico 7 - Ação <i>scavenger</i> da anfotericina B e hesperidina sobre o ânion superóxido	53
Gráfico 8 - Ação <i>scavenger</i> sobre o ânion superóxido: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações	54
Gráfico 9 - Inibição da cinética da MPO/H ₂ O ₂ /Guaiacol pelas amostras anfotericina B e hesperidina	55
Gráfico 10 - Ação hemolítica da anfotericina B em função do tempo	56
Gráfico 11 - Efeito da hesperidina sobre eritrócitos em função do tempo..	57
Gráfico 12 - Efeito das amostras sobre células endoteliais (HUVEC) nativas (sem estímulo).....	59
Gráfico 13 - Efeito das amostras sobre células endoteliais (HUVEC) estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS).....	60
Gráfico 14 - Análise do hemograma, parâmetro contagem de Eritrócitos (RBC) de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.) **p<0,01 com relação ao grupo controle	63

Gráfico 15 - Análise do hemograma, parâmetro Hemoglobina de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.) **p<0,01 com relação ao grupo controle	63
Gráfico 16 - Análise do hemograma, parâmetro Hematócrito de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.) *p<0,05 com relação ao grupo controle	64
Gráfico 17 - Análise do hemograma, parâmetro Plaquetas de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)**p<0,01 com relação ao grupo controle	64
Gráfico 18 - Análise do hemograma, parâmetro Leucócitos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.) **p<0,01 com relação ao grupo controle ...	65
Gráfico 19 - Análise do hemograma, parâmetro Linfócitos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.) *p<0,05 com relação ao grupo controle	65
Gráfico 20 - Análise do hemograma, parâmetro contagem de Monócitos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.) **p<0,01 com relação ao grupo controle *p<0,05 com relação ao grupo controle	66
Gráfico 21 - Análise do hemograma, parâmetro contagem de Neutrófilos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)	66
Gráfico 22 - Análise do hemograma, parâmetro contagem de Eosinófilos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)	67
Gráfico 23 - Análise bioquímica, parâmetro Creatinina de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.) **p<0,01 com relação ao grupo controle *p<0,05 com relação ao grupo controle	68
Gráfico 24 - Análise bioquímica, parâmetro Uréia de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.) ***p<0,001 com relação ao grupo controle	68

Gráfico 25 - Análise bioquímica, parâmetro TGO de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)	69
Gráfico 26 - Análise bioquímica, parâmetro TGP de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)	69
Gráfico 27 - Análise bioquímica, parâmetro Fosfatase Alcalina de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação do crescimento em cultivo de 24 horas em placa de 96 poços com meio RPMI de <i>C. albicans</i> ATCC 14053, <i>C. albicans</i> ATCC 64546 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258 com contagem de colônias em Ágar Sabouraud-Dextrose após 24 horas do plaqueamento	45
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (MIC) da Anfotericina B e hesperidina, isoladas e associadas, para <i>Candida albicans</i> ATCC 14053 e <i>Candida albicans</i> ATCC 64546	46
Tabela 3 – Quantidade de colônias observadas para Anfotericina B e hesperidina, isoladas e associadas, para <i>Candida albicans</i> ATCC 14053	46
Tabela 4 - Ação <i>scavenger</i> da anfotericina B e hesperidina sobre o radical ABTS ^{•+}	47
Tabela 5 - Ação <i>scavenger</i> sobre o radical ABTS ^{•+} : hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações	48
Tabela 6 - Ação <i>scavenger</i> da anfotericina B e hesperidina sobre o radical DPPH [•]	49
Tabela 7 - Ação <i>scavenger</i> sobre o radical DPPH [•] hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações	50
Tabela 8 - Ação <i>scavenger</i> da anfotericina B e hesperidina sobre o HOCl.	51
Tabela 9 - Ação <i>scavenger</i> sobre o HOCl: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações	52
Tabela 10 - Ação <i>scavenger</i> da anfotericina B e hesperidina sobre o ânion superóxido	53
Tabela 11 - Ação <i>scavenger</i> sobre o ânion superóxido: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações	54
Tabela 12 - Inibição da cinética da MPO/H ₂ O ₂ /Guaiacol pelas amostras anfotericina B e hesperidina	55
Tabela 13 - Inibição da cinética da MPO/H ₂ O ₂ /Guaiacol, associando a anfotericina B com hesperidina	55
Tabela 14 - Ação sobre os eritrócitos sem AAPH durante 5 horas de incubação a 37°C	58

Tabela 15 - Ação sobre os eritrócitos com AAPH durante 5 horas de incubação a 37°C	58
Tabela 16 - Viabilidade (%) de células endoteliais (HUVEC) frente à anfotericina B e suas associações com hesperidina, na ausência de estímulo LPS	59
Tabela 17 - Viabilidade (%) de células endoteliais (HUVEC) frente à anfotericina e suas associações com hesperidina, na presença de estímulo LPS	60
Tabela 18 - CL ₅₀ (µg/mL) das amostras isoladas avaliadas frente a <i>Artemia salina</i>	61
Tabela 19 - CL ₅₀ (µg/mL) das amostras associadas avaliadas frente a <i>Artemia salina</i>	62
Tabela 20 – Capacidade antioxidante do soro dos ratos utilizando o método ABTS ^{•+}	70

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1 ANFOTERICINA B	20
1.2 ANFOTERICINA B E ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO	24
1.3 ANTIOXIDANTES	27
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAIS	35
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 Ensaio Antifúngio	36
4.2.2 Avaliação <i>in vitro</i> em sistemas oxidativos	36
4.2.2.1 Ação <i>scavenger</i> das amostras sobre o radical ABTS ^{•+}	36
4.2.2.2 Ação <i>scavenger</i> das amostras sobre radical DPPH [•]	36
4.2.2.3 Atividade <i>scavenger</i> das amostras sobre o HOCl	37
4.2.2.4 Atividade <i>scavenger</i> sobre o ânion superóxido	37
4.2.2.5 Inibição da mieloperoxidase.....	37
4.2.2.6 Ação sobre eritrócitos	37
4.2.3 Ensaio utilizando linhagem celular	38
4.2.3.1 Células endoteliais HUVEC (ATCC® CRL-2873 TM)	38
4.2.3.2 Avaliação da citotoxicidade – Método MTT	38
4.2.4 Estudos de toxicidade	39
4.2.4.1 <i>Artemia salina</i>	39
4.2.4.2 Avaliação da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade	40
4.2.4.2.1 Determinação da capacidade antioxidante do soro	41
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Ensaio Antifúngio	43
5.2 Avaliação <i>in vitro</i> em sistemas oxidativos	47
5.2.1 Ação <i>scavenger</i> das amostras sobre o radical ABTS ^{•+}	47
5.2.2 Ação <i>scavenger</i> das amostras sobre radical DPPH [•]	49
5.2.3 Atividade <i>scavenger</i> das amostras sobre o HOCl	50
5.2.4 Atividade <i>scavenger</i> sobre o ânion superóxido	52
5.2.5 Inibição da mieloperoxidase	54
5.2.6 Ação sobre eritrócitos	56
5.3 Ensaio utilizando linhagem de células endoteliais: HUVEC (ATCC® CRL-2873 TM)	59
5.4 Estudos de toxicidade	61

5.4.1 <i>Artemia salina</i>	61
5.4.2 Avaliação da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade	62
5.4.2.1 Determinação da capacidade antioxidante do soro	70
6 CONCLUSÕES	71
7 REFERÊNCIAS	73

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ANFOTERICINA B

A anfotericina B (AmB), cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 1, é um agente antifúngico poliênico, que foi isolado pela primeira vez do *Streptomyces nodosus* em 1955 (KLEINBERG, 2006). Sua molécula é cíclica assimétrica, apresenta um grupo aminoaçúcar e contém uma face hidrofóbica e outra hidrofílica. Esta molécula apresenta um perfil de solubilidade muito limitado, sendo quase completamente insolúvel em água, pouco solúvel em álcoois e solúvel em solventes orgânicos, tais como dimetilsulfóxido (DMSO) (BARRAT; BRETAGNE, 2007). Em água, forma agregados e sua baixa solubilidade é responsável pela baixa biodisponibilidade por via oral. Seu uso é, portanto, limitado a infusão intravenosa e aplicação local. A formulação convencional da AmB (Fungizone®) é de micelas mistas com o desoxicolato de sódio, e desta forma é o fármaco de escolha para infecções sistêmicas para espécies de fungos sensíveis (BARRAT; BRETAGNE, 2007).

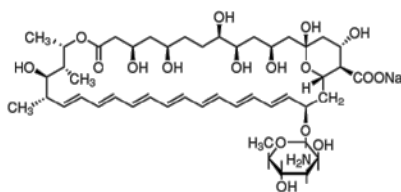


Figura 1 - Estrutura molecular da Anfotericina B

A anfotericina B é um antifúngico "padrão ouro" para infecções fúngicas invasivas desde 1960 (KHAN; OWAIS, 2006) pois, em geral, apresenta um amplo espectro de atividade e tem sido eficaz no tratamento da Candidíase, Criptococose, Aspergilose, Histoplasmose, Blastomicose, Coccidioidomicose, Zigomicose, Esporotricose, Fusariose e Feohifomicose. Uma formulação de AmB na forma multiagregada é especialmente interessante no tratamento contra a Leishmaniose visceral (MULLEN et al., 1997).

A atividade farmacoterapêutica da anfotericina B é máxima na faixa de pH 6,0 a 7,5 e a ação pode ser fungistática ou fungicida, dependendo da concentração sérica e tecidual do antifúngico e da suscetibilidade do patógeno (FILLIPIN; SOUZA, 2006). Entretanto, os efeitos celulares da AmB são complexos e dependem de uma variedade de fatores, tais como a fase de crescimento das células, a dose e a forma de administração (BRAJTBURG et al., 1990).

É amplamente aceito que as moléculas de AmB interagem com membranas celulares e formam canais iônicos transmembrana. De acordo com a teoria mais popular ("hipótese do

esterol”), a presença de esteróis na membrana celular é necessária para a manifestação quimioterapêutica relevante da atividade formadora de canais iônicos pela AmB (CZUB et al., 2007).

A anfotericina B exerce efeito sobre as células fúngicas formando complexos com o ergosterol e fosfolipídios da membrana, permitindo o escape de íons (Na^+ , K^+ e Mg^{+2}) e outros componentes vitais para a célula (LINCOPAN et al., 2005). O domínio hidrofóbico poliênico da AmB promove a ligação à bicamada lipídica em membranas de fungos e sua inserção na mesma. Na presença do ergosterol da membrana de fungos, monômeros de AmB sofrem nucleação para formar poros multiméricos de AmB com as cadeias poliênicas lipofílicas externas do poro que estão em contato com a membrana lipídica. As cadeias polihidroxílicas formam as paredes internas hidrofílicas destes poros (KLEINBERG, 2006).

Brajtburg et al. (1990) propuseram que os efeitos da AmB em células leveduriformes podem ser divididos em diferentes estágios dose-dependentes: estimulação, permeabilização e letalidade. O efeito estimulatório ocorre em baixas concentrações, inferiores às necessárias para induzir a permeabilização. O efeito letal, por outro lado, ocorre em concentrações de AmB superiores às necessárias para induzir aumento da permeabilidade da membrana celular. Desta forma, a letalidade das células fúngicas não é uma simples consequência de mudanças na permeabilidade das membranas celulares (BRAJTBURG et al., 1990). Além disso, Palacios et al. (2007) observaram que a formação de poros na membrana das leveduras não é essencial para a ação fungicida da AmB.

A aplicação terapêutica da AmB é baseada em sua maior reatividade contra membranas contendo ergosterol (principal esteroide em fungos) do que membranas que contenham colesterol (esteroide de mamíferos). Entretanto, este efeito diferencial da AmB entre células fúngicas e de mamíferos é muito pequeno, o que caracteriza a baixa seletividade responsável pela toxicidade da AmB (CZUB et al., 2007).

A anfotericina B apresenta dois tipos de toxicidade principais: i) a toxicidade aguda, relacionada à infusão, que se manifesta clinicamente com calafrios e hipotensão, e ii) a toxicidade crônica, que manifesta-se mais frequentemente nos rins (nefrotoxicidade) e com menor frequência no fígado (hepatotoxicidade) (PEIXOTO, 2008).

A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral dose-limitante do uso de anfotericina B (AmB), sendo geralmente reversível. Porém, 15% dos pacientes podem necessitar de diálise, resultando num maior tempo de internação do paciente e aumento da mortalidade. A nefrotoxicidade alta acarreta a duplicação dos níveis de creatinina (FONTINHA, 2010).

Considerando que a urina apresenta baixos valores de pH (5,5 a 6,0), o ambiente das células epiteliais tubulares nos rins influencia na toxicidade da AmB, a qual é elevada em

meios cujo pH encontra-se abaixo de 6,0 (WALEV; BHAKDI, 1996). Com isso, a abertura de poros pela AmB nas células renais agravaria a sua toxicidade, pois elevaria a permeabilidade das membranas aos íons H^+/OH^- , o que, conseqüentemente, acidificaria mais o meio (COHEN, 1998). Além disso, a afinidade da AmB por lipídios permite que a mesma seja rapidamente incorporada às lipoproteínas plasmáticas, particularmente a lipoproteína de baixa densidade (LDL). O englobamento de partículas de LDL contendo AmB pelas células epiteliais renais, mediado por receptores de LDL, é um dos mecanismos de toxicidade renal (BARRAT; BRETAGNE, 2007).

A nefrotoxicidade, secundária à vasoconstrição renal, causa dano tubular e, conseqüentemente, diminuição da taxa de filtração glomerular (ODABASI et al., 2009). Da ação conjunta destes dois processos resultam a diminuição da taxa de filtração glomerular e os distúrbios hidroeletrólíticos e ácido-básicos (BERDICHEVSKI; MANFRO, 2003).

Essa nefrotoxicidade ocorre devido a dois mecanismos básicos: i) disfunção do fluxo vascular renal e ii) lesão direta na célula tubular. Embora a anfotericina B possua maior afinidade por ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (FILLIPIN; SOUZA, 2006). A AmB causa vasoconstrição e conseqüente isquemia por interação direta com as membranas das células epiteliais promovendo deficiência tubular (FONTINHA, 2010). Com a função renal diminuída, pode ocorrer cardiotoxicidade, com uma arritmia ventricular devido a hipocalemia causada pela nefrotoxicidade (FILLIPIN; SOUZA, 2006).

A hipocalemia, freqüentemente associada ao tratamento com anfotericina B, é resultante da lesão direta às células renais. Esta hipocalemia é apontada como um fator importante em algumas nefropatias agudas. Estes efeitos agudos podem ter um papel na nefrotoxicidade crônica (SABRA et al., 1990).

Além da nefrotoxicidade, a anfotericina B também pode causar hepatotoxicidade. Ela eleva as concentrações séricas da fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, lactato desidrogenase e bilirrubina sem, no entanto, causar hepatotoxicidade severa (INSELMANN et al., 2002).

A anfotericina B também age de forma concentração-dependente sobre os eritrócitos, sendo que em baixos níveis provoca permeabilização reversível nas membranas destas células, enquanto em concentrações maiores causa lise (BRAJTURG et al., 1985).

Desta forma, mesmo que a AmB tenha maior afinidade pelo ergosterol do que pelo colesterol, ainda assim, há a formação de poros nas membranas do hospedeiro (FONTINHA, 2010), demonstrando que a afinidade da AmB pelo ergosterol não é absoluta.

Diferentes estratégias foram estudadas para diminuir a toxicidade da preparação comercial de AmB (Fungizone®). Uma delas foi aquecer a preparação a fim de induzir a agregação de AmB (GABORIAU et al., 1997; VAN ET TEN et al., 2000; HARTSEL et al., 2001). Formulações lipídicas associadas à AmB são formulações menos nefrotóxicas que foram desenvolvidas com sucesso, mas a sua utilização pode ser limitada por seu alto custo (DIX; ANDRIOLE, 2001). Recentemente, Damasceno et al. (2012) sugeriram que a microemulsão seria um sistema carreador para a anfotericina B ou a outras moléculas de água insolúveis com potencial de aplicação contra células fúngicas, tendo apresentado uma nova formulação de Anfotericina B em microemulsão.

A menor toxicidade de novas formulações de AmB como a lipossomal pode ser explicada devido a liberação gradativa de monômeros de AmB a partir de complexos. Como os agregados de AmB não são formadores de canais específicos ao contrário da AmB monomérica, qualquer método que reduz a concentração de AmB livre também reduz sua toxicidade. Além disso, sistemas lipossomais podem modificar a toxicidade da AmB por meio de ligação diferenciada às lipoproteínas séricas (WASAN et al., 1994; KENNEDY; WASAN, 1999; HARTSEL et al., 2001).

Hartsel et al. (2001) demonstraram maiores estabilidades cinética e termodinâmica dos complexos, bem como menor atividade intrínseca formadora de canais em modelo de membranas de mamíferos. Além disso, estes autores ainda observaram que o complexo se liga menos à LDL sérica do que seu monômero, além de apresentar menor atividade estimulante de monócitos humanos.

Czub et al. (2007) propuseram que a modificação química parece ser a estratégia mais promissora para alteração dos efeitos tóxicos da AmB, mas afirmam ser esta uma tarefa difícil devido, não somente aos problemas relacionados ao próprio processo de modificação molecular, mas também ao conhecimento inadequado acerca do mecanismo de ação da AmB, especialmente em relação à natureza molecular da toxicidade seletiva deste fármaco.

Diante do exposto, o uso da anfotericina B tende a causar danos renais importantes no paciente em terapia antifúngica (ODABASI et al., 2009) e a utilização concomitante de um agente protetor contra estes danos poderia favorecer maior eficiência do esquema terapêutico e menor dano ao paciente.

Além disso, a resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio à prática clínica. O uso extensivo e freqüente do fluconazol para o tratamento comum de infecções fúngicas tem resultado no surgimento de cepas azólicas resistentes de fungos. A anfotericina B é um agente antifúngico clássico, mas que tem sua eficiência reduzida em alguns casos (NETO et al., 1999). Dentre alguns dos fungos resistentes à AmB incluem-se

Trichosporon spp., *Aspergillus terreus*, *Scedosporium* spp. e *Malassezia furfur* (KLEINBERG, 2006). Os mecanismos de resistência à AmB entre fungos varia, mas Sokol-Anderson et al. (1988) observaram que a resistência das cepas de *C. albicans* ao dano dependente de oxidação promovido pela AmB, provavelmente, contribui para a diminuição da eficácia deste fármaco.

1.2 ANFOTERICINA B E ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO

Um número crescente de evidências sugere que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de várias doenças, incluindo hipertensão, diabetes tipo II, hipercolesterolemia, aterosclerose, insuficiência cardíaca, neoplasias, doenças neurodegenerativas e inflamações crônicas (FILIPIN et al., 2008). O estresse oxidativo é a exposição excessiva às espécies reativas de oxigênio (ERO) e resulta do desequilíbrio entre os níveis de pró-oxidantes e antioxidantes (CHEN et al., 2010). Em determinadas condições, pode ocorrer elevação na produção de ERO, levando ao estresse oxidativo, no qual as espécies reativas podem produzir danos, tais como a peroxidação em membranas celulares (VELLOSA, 2007).

Sendo assim, o estresse oxidativo é caracterizado como um excesso de formação de moléculas altamente reativas, tais como ERO, e/ou remoção insuficiente destas (JOHANSEN et al., 2005). Esse desequilíbrio leva a danos em biomoléculas e células, com impacto em todo o organismo (DURACKOVA, 2010).

As ERO são produtos do metabolismo celular normal e apresentam papel vital na estimulação das vias de sinalização de célula em resposta a mudanças em condições intra e extracelulares (JABS, 1999). A maioria das ERO é gerada pela cadeia respiratória mitocondrial, durante a transferência de elétrons para o oxigênio (POYTON et al., 2009). Os organismos possuem sistemas de defesa para escapar das consequências de danos às células causados pelas ERO, incluindo enzimas, tais como a catalase e superóxido dismutase, e compostos de baixo molecular, como, por exemplo, a glutatona (VELLOSA, 2007).

Embora sejam estudadas separadamente, as vias metabólicas e imunes do organismo humano são interdependentes, visto que hormônios, citocinas, fatores de transcrição e proteínas de sinalização atuam em ambas as vias, visando à homeostase do organismo. A integração entre metabolismo e imunidade, que em condições normais tende a resultar na manutenção de um estado de saúde adequado, pode não ser efetiva em algumas condições, tais como na imunossupressão (GERALDO et al., 2009). Na defesa contra infecções fúngicas, naturalmente, há produção de NO, dentre outros compostos, que são secretados pelos

fagócitos. Também há a participação de $\text{INF-}\gamma$, o qual atua como agente estimulador de neutrófilos e macrófagos (MACHADO et al., 2004).

A AmB apresenta ação modulatória sobre o sistema imunológico, particularmente sobre macrófagos, interferindo em muitas das atividades de leucócitos, como na quimiotaxia, produção de anticorpos e fagocitose, com consequente interferência na destruição de fungos, tais como *Candida albicans*. Em macrófagos, a AmB estimula a produção de IL-1, $\text{TNF-}\alpha$, ERO e NO. Tais propriedades contribuem com sua atividade antimicrobiana, mas podem também aumentar sua toxicidade (BARRATT; BRETAGNE, 2007).

Alguns estudos demonstraram que a capacidade antifúngica da anfotericina B é muito mais complexa do que a simples formação de poros na membrana celular do microrganismo, indicando que a formação destes poros não é essencial para o efeito fungicida da AmB, enquanto outros estudos concluíram que a ocorrência de estresse oxidativo por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio melhora a ação da AmB no dano celular à *C. albicans* e *C. neoformans* (GONZÁLEZ-PÁRRAGA et al., 2011). A geração em excesso de radicais livres e acúmulo de cálcio, consequentes da ação da AmB, desencadeia a morte celular via apoptose e necrose (BERDICHEVSKI; MANFRO, 2003).

A geração de radicais livres pode ser consequência da abertura de poros nas membranas celulares. A anfotericina B desencadeia aumento da permeabilidade a íons intracelulares, que por sua vez, são perdidos para o meio extracelular, o que ativa a bomba Na^+/K^+ ATPase. Para manter os níveis de ATP intracelulares, a célula intensifica a respiração mitocondrial e eleva o consumo de oxigênio. Desta forma, quando a demanda supera a capacidade de produção de ATP, ocorre depleção energética, formação de radicais livres e acúmulo de cálcio intracelular (BERDICHEVSKI; MANFRO, 2003).

Sokol-Anderson et al. (1986; 1988) concluíram que, por meio da geração de radicais livres, há melhora na ação da anfotericina. Como consequência, há lise da célula e aumento dos níveis extracelular e intracelular de catalase e superóxido dismutase. Concentrações intermediárias do antifúngico (0,02-0,10 μg de AmB/mL) são suficientes para promover o aumento da permeabilidade de íons, e altas concentrações ($\geq 0,30$ μg de AmB/mL) causam a lise completa e morte da levedura (SOKOL-ANDERSON et al., 1988).

Entretanto, Osaka et al. (1997A) observaram que a AmB apresenta, também, ação como antioxidante, na medida em que a mesma inibiu a oxidação do ácido cis-parinárico em modelos de estudo aquosos e lipofílicos (membrana). Estes pesquisadores ainda observaram que a ação antioxidante da AmB era bloqueada na presença de colesterol, o que poderia indicar afinidade relativamente elevada deste fármaco pelo colesterol.

Diferentes estudos demonstraram que o paraquat (agente gerador de ânion superóxido), o t-butil-hidroperóxido (agente acelerador de peroxidação lipídica) e a alicina (eficaz agente antibacteriano presente no alho e que induz a peroxidação de fosfolipídios na membrana plasmática) apresentaram significativo efeito sinérgico com a AmB *in vitro* e em um modelo de candidíase disseminada em ratos (ENJALBERT et al., 2006; OKAMOTO et al., 2004; AN et al., 2009).

A AmB é tida como agente pró-oxidante de membranas que causa estresse oxidativo devido à geração de radicais livres (OSAKA et al., 1997B). De acordo com Wilson et al. (1991), a anfotericina também é uma substância pró-oxidante na medida em que é capaz de ativar macrófagos e aumentar a produção de ânion superóxido. O estímulo deste “burst” oxidativo em macrófagos pode sugerir que anfotericina B ativaria estas células via efeito direto na membrana plasmática (FILLIPIN; SOUZA, 2006). Por outro lado, Fillipin e Souza (2006) demonstraram a ocorrência de inibição do “burst” oxidativo gerador de ERO em leucócitos polimorfonucleares, quando incubados com anfotericina desoxicolato, o que poderia ser prejudicial à defesa antimicrobiana e demonstra complexidade na definição dos mecanismos relacionados às propriedades antifúngicas da AmB.

Segundo Osaka et al. (1997B), o fato de que os antioxidantes parecem proteger eritrócitos da lise induzida pela AmB tem sido usado para apoiar a idéia de que os antioxidantes podem ser eficazes contra os efeitos nocivos da AmB.

Sabe-se, desde 1985, que a auto-oxidação da AmB origina diferentes formas de espécies reativas oxidativas e estas, por serem tóxicas para a célula, seriam responsáveis pela hemólise (BRAJTBURG et al., 1985). Kudva et al. (2011) verificaram que a presença do produto natural curcumina reduziu significativamente a lise dos glóbulos vermelhos promovidos pela anfotericina B, indicando a possibilidade de moderar os efeitos tóxicos da mesma. Desta forma, a associação de um agente *scavenger* de radicais livres ou antioxidante, tal como a hesperidina, poderia reduzir a atividade hemolítica da AmB.

Além disso, Lamy-Freund et al. (1985) propuseram que esta auto-oxidação da AmB poderia ser a responsável também pela sua inativação, o que estimula a idéia de que a AmB associada a um antioxidante poderia ter sua atividade favorecida e/ou prolongada. Entretanto, deve ser destacado que a auto-oxidação da AmB deve-se ao fato de a mesma possuir sete ligações duplas conjugadas (Figura 1), o que também resultaria em um efeito antioxidante coerente com o dos carotenóides e retinóides (OSAKA et al., 1997B).

1.3 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que reagem com radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). O uso de antioxidantes presentes na dieta ou na forma de agentes terapêuticos pode oferecer proteção contra o dano induzido pelos radicais livres. Dentre os antioxidantes mais conhecidos estão as vitaminas, principalmente C e E (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; HALLIWELL, 2006).

O sistema de defesa antioxidante do organismo pode agir como um sistema inicial de defesa contra infecções antecedendo a formação de anticorpos (FOSTER, 2007). Considerando esta informação, não seria errado propor que em alguns tipos de infecções em que o agente infeccioso se sobrepõe ao sistema imunológico, também haveria a evolução da doença em detrimento do sistema antioxidante. Desta forma, a associação de agentes antioxidantes a agentes antimicrobianos pode ser uma estratégia terapêutica interessante.

Muitas pesquisas demonstraram o potencial do uso de flavonóides como seqüestrantes de radicais livres, prevenindo o dano oxidativo. (VAN ACKER et al., 2000). Tais substâncias têm apresentado propriedades benéficas contra várias doenças, assim como atividades biológicas em experimentos com animais, células e ensaios *in vitro* (KOYUNCU et al., 1999). As flavonas, por exemplo, flavonóides mais abundantes em frutas do gênero *Citrus*, não apenas têm um importante papel fisiológico e ecológico, mas também apresentam interesse comercial por suas múltiplas aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (MARÍN et al., 2007).

A hesperidina (hesperitina-7-ramnoglicosídeo), cuja estrutura molecular também é apresentada na figura 2, é um subproduto barato e abundante do cultivo de *Citrus* e é o flavonóide majoritário da laranja e do limão. Em laranjas imaturas representa até 14% do peso da fruta fresca. (BARTHE et al., 1988).

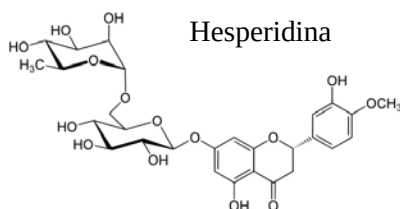


Figura 2 - Estrutura molecular da Hesperidina

A hesperidina é isolada em grandes quantidades da casca de *Citrus aurantium*, *C. sinensis* e *C. unshiu*. Também é encontrada em outros gêneros das famílias *Fabaceae*, *Betulaceae*, *Lamiaceae* e *Papilionaceae* (PRADEEP, 2008).

Têm sido relatadas várias propriedades da hesperidina, tais como hipocolesterolêmica (SON et al., 1991), analgésica (GALATI et al., 1994), antifúngica (KROLICKI; LAMER-ZARAWASKA, 1984) e anticarcinogênica (YANG et al., 1997). A ação antiinflamatória da hesperidina também é conhecida e foi relatada por Jain e Parmar (2011), que observaram a redução do grau de inflamação em ratos sem a ocorrência de toxicidade.

Os bioflavonóides parecem promover aumento da resistência da parede vascular, com diminuição da permeabilidade capilar consequente a inibição da hialuronidase. Alguns, como a diosmina e a hesperidina, apresentam também atividade flebotônica (PITTA et al., 2003). A suplementação com hesperidina atua contra a permeabilidade capilar anormal responsável por causar dores, fraqueza e câibras nas pernas. A suplementação com hesperidina também auxilia na redução do edema em membros inferiores (CHEN et al., 2010). O uso na medicina tradicional, geralmente, é feito de modo combinado com a diosmina. Estudos experimentais sugerem que a associação destas duas substâncias potencializa a ação vasoconstritora da noradrenalina (PITTA et al., 2003).

Segundo Jovanovic et al. (1994) a hesperidina tem a propriedade de neutralizar o ânion superóxido, o oxigênio singlete e o radical hidroxil, contribuindo significativamente com o sistema de defesa antioxidante intracelular. Flavonóides apresentam propriedades antioxidantes por diferentes mecanismos: i) ação *scavenger* de radicais livres, ii) quelatação de íons metálicos, como o ferro e o cobre, que são de grande importância para as reações de iniciação radicalares, iii) inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas e iv) a facilitação do sistema de defesa (BENAVENTE GARCIA et al., 1997; CHEN et al., 2010).

A disfunção endotelial é observada em pacientes com hipertensão e em modelos animais de hipertensão essencial (PANZA et al., 1993). A mais proeminente causa fisiopatológica da disfunção endotelial é a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$). A inativação do $\text{NO}^\bullet$ provavelmente resulta da sua interação com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), gerado por sistemas enzimáticos, como a NADPH oxidase e xantina oxidase (CAI; HARRISON, 2000). De fato, em pacientes com hipertensão essencial, é observado o aumento do estresse oxidativo (ZALBA et al., 2000). A glucosil-hesperidina, um derivado hidrossolúvel da hesperidina, quando ingerida de forma contínua, reduziu o estresse oxidativo por meio da inibição da expressão da NADPH oxidase nos vasos sanguíneos, amenizando a disfunção endotelial em ratos com hipertensão essencial (YAMAMOTO et al., 2008).

A isquemia e reperfusão de um órgão podem gerar ERO, que ativam a liberação de mediadores inflamatórios. O aumento do estresse oxidativo resulta no distúrbio da integridade das células endoteliais e isso é refletido pelo aumento da permeabilidade e pode gerar hemorragia renal (CARDEN, 2000).

Pickelmann et al. (1999) demonstraram que a hesperidina, em sua forma comercial, combinada com a diosmina, reduziu significativamente a infiltração de leucócitos após a isquemia induzida em camundongos. Posteriormente, Ünlü et al. (2003) confirmaram que a hesperidina combinada com diosmina, reduziu os níveis de H_2O_2 , aumentou a glutathione reduzida, e também diminuiu a infiltração por leucócitos em áreas perivasculares no rim, em ratos expostos à isquemia e, em seguida, à reperfusão. Considerando tais resultados e que a AmB causa vasoconstrição e conseqüente isquemia (FONTINHA, 2010), pode-se sugerir como sendo interessante o estudo da hesperidina sobre esse mecanismo de toxicidade da AmB.

Os resultados obtidos por Ünlü et al. (2003) indicam que a hesperidina contribui, por meio do decréscimo do estresse oxidativo, para a proteção renal e contra a injúria gerada pela isquemia. Tal fato e o envolvimento da AmB na geração de radicais livres (SOKOL-ANDERSON et al., 1988; WILSON et al., 1991; BERDICHEVSKI; MANFRO, 2003; FILLIPIN; SOUZA, 2006) também torna interessante a avaliação do efeito da hesperidina e AmB (isoladamente e associadas) frente a espécies reativas do oxigênio e radicais livres.

O estresse oxidativo é reconhecido com um fator presente em muitas doenças hepáticas (KAPLOWITZ, 2000). Kaur et al., (2006) observaram que a hesperidina é capaz de atenuar a hepatotoxicidade induzida por lipopolissacarídeo por meio da ação contra óxido nítrico e radicais livres derivados do oxigênio o que sugere o potencial hepatoprotetor desta molécula. Chen et al. (2003) demonstraram que a hesperidina protege significativamente os hepatócitos contra a citotoxicidade induzida por oxidação através do terc-butil hidroperóxido (t-BuOOH). Os hepatócitos tratados com hesperidina foram protegidos contra os radicais livres por meio da indução da expressão do gene citoprotetor heme-oxigenase (HO-1). Isto sugere que a hesperidina tem potencial como agente terapêutico no tratamento de disfunções hepáticas (CHEN et al., 2010), sendo, desta forma, interessante sua associação com fármacos hepatotóxicos, tais como a AmB.

Considerando-se que o estresse oxidativo poderia apresentar envolvimento importante na história natural da infecção fúngica, torna-se interessante avaliar: i) a interação antifúngico – sistemas oxidativos e ii) a interação antifúngico – antioxidante. Além disso, é importante estudar o efeito de produtos naturais a proteção sobre o dano renal e hepático decorrentes da administração de anfotericina B.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de ser amplamente divulgado o mecanismo de ação e a toxicidade da anfotericina como decorrente da interação com membranas biológicas, ainda há um mecanismo complementar que corre simultaneamente e em decorrência do primeiro. Tal mecanismo refere-se à geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e radicais livres (RL) oriundos da auto-oxidação da anfotericina B e da desestabilização metabólica conseqüente do desarranjo da membrana plasmática.

Da mesma forma que RL e ERO são importantes na defesa contra microrganismos, os mesmos podem causar lesões em um tecido ou células específicos, tais como eritrócitos, hepatócitos ou células renais. A anfotericina em sua auto-oxidação pode desencadear, dentre outros, lipoperoxidação das membranas biológicas que, juntamente com a abertura de poros nas membranas, propagaria a lesão.

Diante do exposto, torna-se interessante investigar o envolvimento direto da AmB e de produtos naturais que possuem propriedades antioxidantes, tais como a hesperidina e rutina, com as ERO. Cabe ainda ressaltar a existência de poucos trabalhos correlacionando o uso de produtos naturais para tentar minimizar os danos que a anfotericina causa no organismo.

Desta forma, o presente estudo justifica-se, dada a importância do uso terapêutico da anfotericina B em muitos casos de infecções fúngicas e também em virtude dos efeitos tóxicos advindos de seu uso, sendo ainda interessante avaliar se a hesperidina ou a rutina alteram os efeitos tóxicos da anfotericina. Para tanto, a fim de esclarecer tais interações, são propostos neste projeto, ensaios modelo amplamente utilizados com a finalidade de se estudar as interações de diferentes fármacos e outras moléculas (tais como antibióticos, antiinflamatórios e antioxidantes) com radicais livres e espécies oxidantes não-radicalares.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

É objetivo geral deste trabalho a avaliação dos efeitos da associação da hesperidina à anfotericina em sistemas oxidativos e em modelos de estudo de toxicidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos deste trabalho:

- i)** avaliar as interações da AmB com a hesperidina frente a radicais livres e ERO por meio de sistemas modelo de estudos oxidativos *in vitro*,
- ii)** avaliar a citotoxicidade destes componentes isoladamente e das associações entre AmB e a hesperidina,
- iii)** avaliar o status antioxidante de soro de ratos tratados e não-tratados com anfotericina e/ou hesperidina, e, ainda,
- iv)** avaliar a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade nos ratos tratados e não-tratados com anfotericina e/ou hesperidina determinando-se os níveis de fosfatase alcalina, transaminases, ácido úrico, uréia e creatinina nos soros destes animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

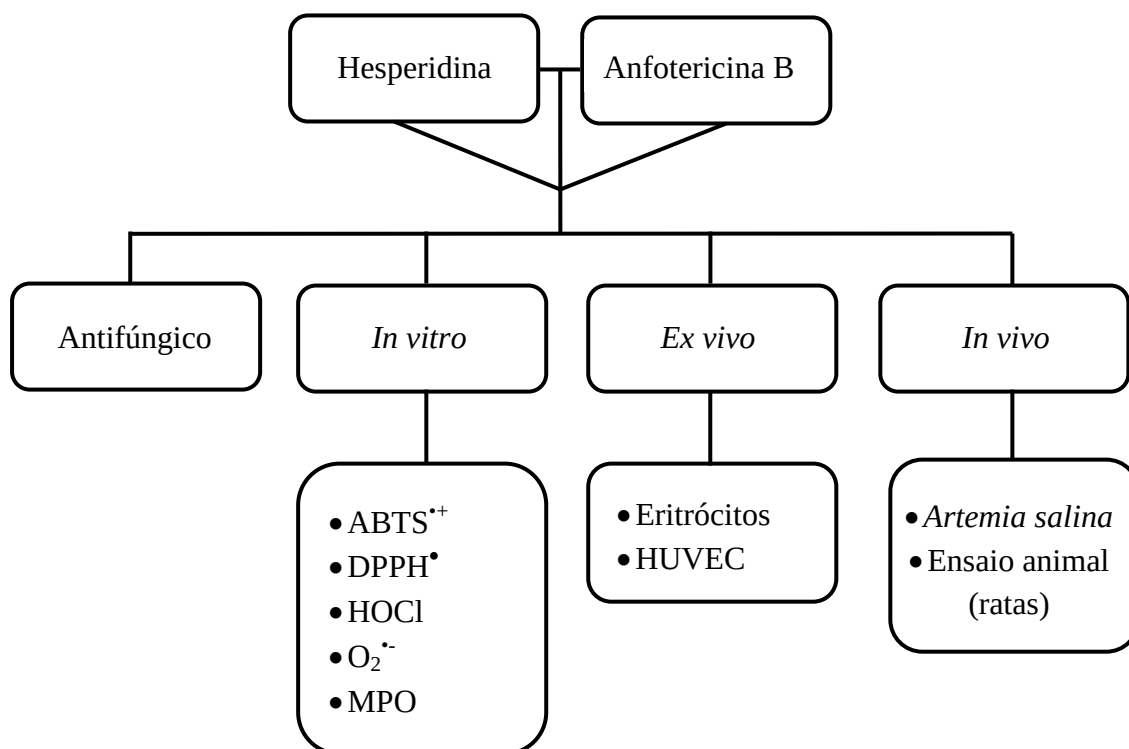
Os reagentes utilizados apresentam pureza analítica e alta qualidade e fornecidos pelas empresas Sigma e Merck, salvo quando indicado de outra forma.

A anfotericina (disponibilizada pela Pharmanostra[®]), por ter característica anfotérica, se dissolve tanto em meio ácido como alcalino. Entretanto, ela é insolúvel na maioria dos solventes (FONTINHA, 2010), o que motiva a utilização do dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente das amostras, pois este é um dos poucos solventes em que a anfotericina é solúvel (FONTINHA, 2010).

A hesperidina (Sigma-Aldrich[®]) também foi dissolvida em DMSO, e em todos os testes foram realizados controles utilizando o solvente, para certificar se este não causava interferência.

Os equipamentos utilizados para realizar as leituras foram o espectrofotômetro de cubetas da PerkinElmer Lambda[®] 25 UV-VIS e espectrofotômetro de placas da BioTeck μ Quant[®].

4.2 MÉTODOS



Fluxograma 1: Delineamento experimental

4.2.1 Ensaio Antifúngico

O ensaio antifúngico realizado foi baseado no documento M27-A2 (2002) do CLSI (Manual Clinical and Laboratory Standards Institute) com modificações. Foram utilizadas culturas de *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida albicans* ATCC 64546 e *Candida krusei* ATCC 6258, de modo que para cada cultura foi preparado um inóculo em NaCl 0,85%, estéril e este medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530nm. Este inóculo apresentou absorvância entre 0,08 e 0,1. Após definida a suspensão fúngica, foram realizadas duas diluições sucessivas, a primeira de 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI, que gera uma suspensão fúngica com concentração entre $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL. Deste preparado, foram pipetados 100 μ L do inóculo em cada poço na placa de 96 poços.

Para preparar as amostras, levou-se em conta o MIC (Concentração Inibitória Mínima) da Anfotericina B para a levedura. E a partir deste MIC prepararam-se concentrações iguais e inferiores ao MIC. Para a hesperidina, preparou-se 3 concentrações (5mg/mL, 2,5mg/mL e 1mg/mL) que foram testadas isoladas e associadas com a Anfotericina B.

Após 24 horas realizou-se o plaqueamento das amostras, em que foi feita uma diluição 1:20 de cada poço e foi plaqueada por técnica de esgotamento em Ágar Sabouraud-Dextrose. Depois de 24 horas novamente, foi feita a contagem de colônias na placa.

4.2.2 Avaliação *in vitro* em sistemas oxidativos

4.2.2.1 Ação *scavenger* das amostras sobre o radical ABTS^{•+}

A ação das amostras frente ao radical ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6'-sulfonic acid) - Sigma-Aldrich[®]) foi verificada segundo metodologia descrita por Pellegrini et al. (1999), com pequenas modificações. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 10mM (pH 7,0) por meio do decréscimo da absorvância em 734 nm, de acordo com Velloso et al. (2007).

4.2.2.2 Ação *scavenger* das amostras sobre radical DPPH[•]

A ação das amostras sobre radicais livres foi avaliada por meio do decréscimo da absorvância em 531nm da solução de DPPH[•] (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl - Sigma-Aldrich) na concentração de 60 μ M em etanol absoluto, segundo Soares et al. (1997).

4.2.2.3 Atividade *scavenger* das amostras sobre o HOCl

As reações foram feitas de acordo com Costa et al. (2004), com algumas modificações. A concentração da solução de HOCl (Ácido Hipocloroso) é determinada espectrofotometricamente em 295nm. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4 com incubação de 10 minutos das amostras com HOCl (30 μ M) e por mais 5 minutos após adição de TMB (3',5,5'-*Tetramethyl-benzidine* - *Sigma-Aldrich*) na concentração de 2,8 mM. A leitura das absorbâncias foi feita em 652nm.

4.2.2.4 Atividade *scavenger* sobre o ânion superóxido

Este ensaio foi realizado de acordo com Kakkar (1984). O ânion superóxido reage com o NBT (*Nitro blue tetrazolim* - *Sigma Chemical*[®]) para formar o cromóforo (formazana) cuja intensidade de cor, medida em 560 nm, é diretamente proporcional à concentração do radical.

4.2.2.5 Inibição da mieloperoxidase

A cinética de oxidação do guaiacol (70 mM) pela MPO humana (*EMD Chemicals*[®]) na concentração de 8 nM, H₂O₂ (0,3 mM), foi feita em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, 37⁰C. A reação foi seguida à 470nm por 1 minuto (KHALIL, 2005). Determinou-se v₀ na ausência e na presença das amostras.

4.2.2.6 Ação sobre eritrócitos

O ensaio foi realizado segundo Velloso (2008) com modificações. O sangue total foi coletado de pessoas híginas e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, em que o soro foi retirado das hemácias e estas lavadas utilizando uma solução de tampão Fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM. Após, preparou-se uma suspensão de eritrócitos 5%, a hemólise foi determinada na presença das amostras e ausência de radical livre. Também foram avaliadas as ações dos compostos (anfotericina e hesperidina) na presença de 2'-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH - *Sigma-Aldrich*[®]) 50 mM, em suspensão de eritrócitos 5%. Estas amostras foram incubadas por 5 horas à 37°C. Após este tempo, foram centrifugadas (10 minutos- 2500 rpm) e o sobrenadante teve a absorbância lida em 414 nm.

Aprovado no Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob o número 190.375.

4.2.3 Ensaio utilizando linhagem celular

4.2.3.1 Células endoteliais HUVEC (ATCC® CRL-2873™)

As células HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Dúlcineia Saes Parra Abdalla da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo – USP, foram mantidas em meio RPMI (*RPMI Medium 1640 – Sigma*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibióticos/antimicóticos (*Sigma*), 1% de L-glutamina 200mM, 2g de bicarbonato de sódio e 4,68g de HEPES, e mantidas em estufa de 5% CO₂ à temperatura de 37°C. Para utilização, as garrafas de cultura celular de 75cm³, foram tripsinizadas com 2mL de Tripsina 1x (*Sigma*) por 5min, em seguida, foi adicionado 4mL de meio RPMI completo. As células foram centrifugadas à 200 x g por 10min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado com PBS pH 7,4 e centrifugado nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1mL de PBS pH 7,4, e então diluídas na proporção de 1:10 em azul de Trypan 0,04% para a contagem em câmara de Neubauer, onde também se analisou a viabilidade celular, e o volume final foi acertado para a concentração desejada.

4.2.3.2 Avaliação da citotoxicidade – Método MTT

Para o ensaio de citotoxicidade, utilizou-se o método baseado na capacidade que as células viáveis têm em clivar o anel tetrazólico presente no MTT (*brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio*) pela ação de enzimas desidrogenases contidas na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983).

A uma placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (*Corning, Inc.*) foram distribuídos 200µL de uma suspensão à 5×10^5 céls HUVEC (células aderentes)/mL, dispersas em meio de cultura completo apropriado (RPMI-1640-C) (C = completo - contendo soro fetal bovino e mix de antibióticos e antimicóticos) por cavidade. A placa foi incubada por 24h, a 37°C, em estufa sob tensão constante de 5% de CO₂ (*Forma Scientific, EUA*).

O sobrenadante das células aderentes foi vertido e os compostos em várias concentrações foram adicionados. O controle negativo foi constituído somente de meio de

cultura completo apropriado adicionado à placa, equivalendo a 100% de viabilidade celular. A placa foi novamente incubada em estufa por 24h, a 37°C e 5% de CO₂. Após esta incubação, o sobrenadante das células aderentes foi descartado e foi adicionado aos orifícios da placa 100µL de uma solução de MTT (*Sigma*) a 1mg/mL em meio apropriado incompleto, ou seja, sem soro fetal e a placa foi, então, incubada por 3h nas mesmas condições de incubação anteriores.

Os sobrenadantes de cultura foram, então, descartados e adicionou-se a cada cavidade 100µL de álcool isopropílico (*Mallinckrodt Chemical*) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica (absorbância) foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent, Labsystems*) em UV/visível, a 540nm, com filtro de referência de 620nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

Ambos os ensaios foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes.

4.2.4 Estudos de toxicidade

4.2.4.1 *Artemia salina*

Atualmente, tem-se observado uma tendência à busca pela substituição de animais em laboratório por técnicas toxicológicas alternativas que reduzam o custo dos experimentos e o sofrimento animal. Tais testes podem ser empregados a fim de reduzir o numero de animais utilizados, reduzir a dor e o estresse e, até mesmo, substituir a experimentação animal por completo (PARRA et al., 2001).

Desta forma, preliminarmente, foi feito ensaio de triagem, por meio do estudo com *Artemia salina* baseado na técnica descrita por Meyer et al. (1982), no qual definir-se-á a concentração letal para 50% das larvas (CL₅₀). Este teste é de grande importância, pois como descrito por Parra et al. (2001), a CL₅₀ é parâmetro importante para a definição das doses a serem utilizadas em ensaios com ratos (PARRA, 2001).

Para o teste com *Artemia salina*, utilizou-se 100 mg de ovos do microcrustáceo em água salinizada na proporção de 38g de sal marinho (*Red Sea*®) por litro. A temperatura foi mantida entre 28 a 30°C, pH entre 8 e 9 e iluminação artificial. O estado de saturação de oxigênio foi atingido com auxílio de uma bomba. Após 48 horas, as larvas atingem o estágio de metanúplio do microcrustáceo, que é mais sensível ao tratamento, em que elas não são alimentadas. O bioensaio com *Artemia salina* consistiu em distribuir 10 larvas (n=10) em

cada tubo de ensaio com 5 mL da solução salina nas concentrações graduais de 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750 e 1000ug/mL de hesperidina e anfotericina B avaliadas separadamente. No controle negativo não foi adicionada nenhuma substância e o dicromato de potássio a 0,1% nas mesmas concentrações acima foi utilizada como controle positivo. Após 24h e 48h as larvas vivas foram contadas e a CL₅₀ foi estimada pelo método estatístico de Probits e análise de regressão.

4.2.4.2 Avaliação da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade

Neste estudo foram avaliados os efeitos renais e hepáticos da anfotericina e da hesperidina, utilizando 35 ratas (*Rattus Norvergicus albinus* Wistar) com 90 dias de idade, pesando em média 200-250 gramas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (COBEA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o número 13926/2012. A manipulação dos animais seguiu-se um protocolo de acordo com as recomendações do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório).

Na primeira etapa foi induzido um dano renal com anfotericina B (3mg/kg/dia) para numa segunda etapa avaliar os efeitos da hesperidina nas doses de 50, 100 e 200mg/kg/dia. Os parâmetros renais e hepáticos da anfotericina B e da hesperidina foram avaliados por meio da determinação laboratorial de fosfatase alcalina, transaminases hepáticas (AST e ALT), ácido úrico, uréia e creatinina. Também foram avaliados todos os parâmetros hematológicos.

As doses das amostras testadas foram escolhidas com base em artigos que tenham previamente testado tais produtos, ou similares, em ratos ou outros roedores tais como Pradeep et al., (2008) e Jain et al. (2011). Pradeep et al. (2008) e Jain et al.(2011) utilizaram salina (NaCl 0,9%) como veículo para administração via oral da hesperidina. Baseando-se nestes trabalhos, realizamos o ensaio dividindo-se em grupos:

- G1) animais tratados por via oral (v.o) durante 5 dias somente com o veículo (salina 0,9%);
- G2) animais tratados via i.v com anfotericina B 3mg/kg/dia e v.o. com hesperidina 50mg/kg/dia durante 5 dias;
- G3) animais tratados via i.v com anfotericina B 3mg/kg/dia e v.o. com hesperidina 100mg/kg/dia durante 5 dias;
- G4) animais tratados via i.v com anfotericina B 3mg/kg/dia e v.o. com hesperidina 200mg/kg/dia durante 5 dias;
- G5) animais tratados via i.v com anfotericina B 3mg/kg/dia durante 5 dias;
- G6) animais tratados v.o com hesperidina 200mg/kg/dia durante 5 dias.

No sexto dia os animais foram anestesiados para coleta de sangue (punção cardíaca) para análise dos parâmetros bioquímicos. Para isso, foi utilizado como anestésico uma mistura contendo quetamina (90 mg/kg) e xilazina (15 m/kg), injetados via intraperitoneal. Após os animais foram sacrificados por decaptação. Após o sacrifício foram retirados os rins e o fígado para análises histológicas.

4.2.4.2.1 Determinação da capacidade antioxidante do soro

O sistema antioxidante de defesa do ser humano compreende muitos componentes (ZARAGOZA et al., 2000) e desta forma, a deficiência de um destes componentes pode provocar redução no estatus antioxidante global do indivíduo. Tal situação pode estar implicada em muitas doenças, tais como câncer e doenças cardiovasculares (HU et al., 2000). A capacidade antioxidante total sérica foi determinada conforme procedimento descrito no item 4.2.2.1 (ABTS^{•+}), utilizando o soro diluído 1:30, conforme padronização em nosso laboratório.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados como Média $\pm$ DP. Foram realizadas as análises de variância (ANOVA) considerando-se $p < 0,05$, pelo teste de uma via de Tukey, e o gráfico construído utilizando o programa OriginPro 8.

Para a análise dos resultados no teste de avaliação da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, foi utilizado o programa Prisma[®] para a confecção dos gráficos e em todos foram aplicados ANOVA de uma via seguida por Dunett, em que se comparam todos os resultados com o controle. Para representar a diferença estatística foi utilizada a seguinte simbologia * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio Antifúngico

A leitura dos resultados (ensaio em triplicata) foi realizada após 24 horas de incubação, visto que, para a maioria dos isolados, a diferença entre leitura após 24 horas ou 48 horas é mínima e não altera a categoria de interpretação (CLSI, 2002). Os resultados foram dispostos através dos resultados qualitativos de análise de turbidez, Concentração Inibitória Mínima (MIC) e UFC/mL.

Na Tabela 1 são apresentados os dados do estudo qualitativo sobre a turvação de 24h das espécies *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida albicans* ATCC 64546 e *Candida krusei* ATCC 6258. Em relação a *Candida albicans* ATCC14053 e ATCC64546 a anfotericina B associada à hesperidina teve uma ação bem melhor do que isolada, apesar de a hesperidina não ter apresentado ação antifúngica nas concentrações testadas. O mesmo não foi observado para a cepa de *Candida Krusei* sendo que as amostras não apresentaram ação o que indica a necessidade de se testar concentrações maiores do que as utilizadas neste estudo.

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) encontrada da anfotericina B para *Candida albicans* ATCC 14053 e *Candida albicans* ATCC 64546 foi de 0,025µg/mL. Entretanto no estudo de Khan e Owais (2006) encontrou-se um MIC de 0,25mg/L (0,25µg/mL), ou seja, uma concentração dez vezes maior. Segundo Karlowski et al. (2006) o MIC para anfotericina B testado em *Candida albicans* foi 0,5mg/L ou 0,5 µg/mL. As diferenças entre os resultados obtidos nos diferentes estudos poderia ser explicada em função de particularidades relacionadas às cepas do microrganismo estudado e a manutenção dos mesmos em laboratório ou ainda, pela solubilidade das preparações de anfotericina testadas nos estudos.

Quando a Anfotericina B (0,0063µg/mL) foi associada com a hesperidina (125µg/mL) o MIC diminuiu para 0,0063µg/mL (Tabela 2), demonstrando que a associação com um produto natural, que não possui ação antifúngica, é capaz de aumentar a efetividade da AmB. Khalil et al. (2012) já haviam demonstrado que a associação de uma substância com propriedades antioxidantes (ácido ascórbico) a um composto antifúngico (curcumina) favorece a ação do mesmo de forma sinérgica.

Finalmente, na Tabela 4, apresentam-se os resultados quantitativos expressos em UFC/mL, em que com isto pode-se perceber como a hesperidina melhorou a ação da anfotericina B, afirmando os resultados expressos nas demais tabelas. A AmB na concentração de 0,0125µg/mL obteve $7,38 \cdot 10^6$ UFC/mL e quando associado com a hesperidina (125µg/mL) não houve o crescimento de nenhuma colônia na placa, e mesmo com as outras concentrações de hesperidina (62,5 e 25 µg/mL) o crescimento de colônias

baixou para $9,5 \cdot 10^5$ e $1,23 \cdot 10^5$ UFC/mL respectivamente. O mesmo ocorreu com as outras concentrações testadas, demonstrando um sinergismo entre a AmB com hesperidina.

Tabela 1 - Avaliação do crescimento em cultivo de 24 horas em placa de 96 poços com meio RPMI de *C. albicans* ATCC 14053, *C. albicans* ATCC 64546 e *C. krusei* ATCC 6258 com contagem de colônias em Ágar Sabouraud-Dextrose após 24 horas do plaqueamento

Amostra	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	<i>Candida albicans</i> ATCC 64546	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
Anfotericina 0,025 µg/mL	Sem turvação	Sem turvação	Turvo
Anfotericina 0,0125 µg/mL	Turvo	Pouco turvo	Turvo
Anfotericina 0,0063 µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Anfotericina 0,0031 µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Anfotericina 0,0016 µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Anfotericina 0,0008 µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Hesperidina 125µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Hesperidina 62,5µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Hesperidina 25µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Anfo 0,025µg/mL + Hesp 125µg/mL	Sem turvação	Sem turvação	Turvo
Anfo 0,025µg/mL + Hesp 62,5µg/mL	Sem turvação	Sem turvação	Turvo
Anfo 0,025µg/mL + Hesp 25µg/mL	Sem turvação	Sem turvação	Turvo
Anfo 0,0125µg/mL + Hesp 125µg/mL	Sem turvação	Sem turvação	Turvo
Anfo 0,0125µg/mL + Hesp 62,5µg/mL	Pouquíssima turvação	Sem turvação	Turvo
Anfo 0,0125µg/mL + Hesp 25µg/mL	Pouquíssima turvação	Pouquíssima turvação	Turvo
Anfo 0,0063µg/mL + Hesp 125µg/mL	Sem turvação	Sem turvação	Turvo
Anfo 0,0063µg/mL + Hesp 62,5µg/mL	Pouquíssima turvação	Pouquíssima turvação	Turvo
Anfo 0,0063µg/mL + Hesp 25µg/mL	Pouquíssima turvação	Pouquíssima turvação	Turvo
Anfo 0,0031µg/mL + Hesp 125µg/mL	Pouquíssima turvação	Pouquíssima turvação	Turvo
Anfo 0,0031µg/mL + Hesp 62,5µg/mL	Pouco turvo	Pouquíssima turvação	Turvo
Anfo 0,0031µg/mL + Hesp 25µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Anfo 0,0016µg/mL + Hesp 125µg/mL	Pouquíssima turvação	Turvo	Turvo
Anfo 0,0016µg/mL + Hesp 62,5µg/mL	Pouco turvo	Turvo	Turvo
Anfo 0,0016µg/mL + Hesp 25µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Anfo 0,0008µg/mL + Hesp 125µg/mL	Pouquíssima turvação	Turvo	Turvo
Anfo 0,0008µg/mL + Hesp 62,5µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Anfo 0,0008µg/mL + Hesp 25µg/mL	Turvo	Turvo	Turvo
Controle Positivo	Turvo	Turvo	Turvo

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (MIC) da Anfotericina B e hesperidina, isoladas e associadas, para *Candida albicans* ATCC 14053 e *Candida albicans* ATCC 64546

Compostos ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	<i>Candida albicans</i> ATCC 64546
Anfotericina	0,025	0,025
Hesperidina	> 125	> 125
Anfo + Hesp (125)	0,0063	0,0063
Anfo + Hesp (62,5)	0,025	0,0125
Anfo + Hesp (25)	0,025	0,025

Tabela 3 - Quantidade de colônias observadas para anfotericina B e hesperidina, isoladas e associadas, para *Candida albicans* ATCC 14053

Compostos ($\mu\text{g/mL}$)	Contagem de colônias (UFC/mL)
Anfotericina (0,025)	$1,34 \cdot 10^6$
Anfotericina (0,0125)	$7,38 \cdot 10^6$
Anfotericina (0,0063)	$7,75 \cdot 10^6$
Anfotericina (0,0031)	$> 8,5 \cdot 10^6$
Anfotericina (0,0016)	$> 8,5 \cdot 10^6$
Anfotericina (0,0006)	$> 8,5 \cdot 10^6$
Hesperidina	$> 8,5 \cdot 10^6$
Anfo(0,025) + Hesp (125)	0
Anfo(0,025) + Hesp (62,5)	$6,5 \cdot 10^5$
Anfo(0,025) + Hesp (25)	$7,4 \cdot 10^5$
Anfo(0,0125) + Hesp (125)	0
Anfo(0,0125) + Hesp (62,5)	$9,5 \cdot 10^5$
Anfo(0,0125) + Hesp (25)	$1,23 \cdot 10^6$
Anfo(0,0063) + Hesp (125)	$1,09 \cdot 10^6$
Anfo(0,0063) + Hesp (62,5)	$2,37 \cdot 10^6$
Anfo(0,0063) + Hesp (25)	$4,06 \cdot 10^6$
Anfo(0,0031) + Hesp (125)	$1,05 \cdot 10^6$
Anfo(0,0031) + Hesp (62,5)	$3,9 \cdot 10^6$
Anfo(0,0031) + Hesp (25)	$7,72 \cdot 10^6$
Anfo(0,0016) + Hesp (125)	$1,61 \cdot 10^6$
Anfo(0,0016) + Hesp (62,5)	$3,45 \cdot 10^6$
Anfo(0,0016) + Hesp (25)	$7,84 \cdot 10^6$
Anfo(0,0008) + Hesp (125)	$4,58 \cdot 10^6$
Anfo(0,0008) + Hesp (62,5)	$> 8,5 \cdot 10^6$
Anfo(0,0008) + Hesp (25)	$> 8,5 \cdot 10^6$
Controle positivo	$> 8,5 \cdot 10^6$

5.2 Avaliação *in vitro* em sistemas oxidativos

5.2.1 Ação *scavenger* das amostras sobre o radical ABTS^{•+}

O ensaio foi realizado em triplicata, sendo que foi possível observar que a atividade da hesperidina ($IC_{50} = 0,0044\text{mg/mL}$) foi maior que a da anfotericina ($IC_{50} = 0,0124\text{mg/mL}$, Gráfico 1 e Tabela 4), em que as duas substâncias obtiveram uma boa ação na captura do radical ABTS^{•+}.

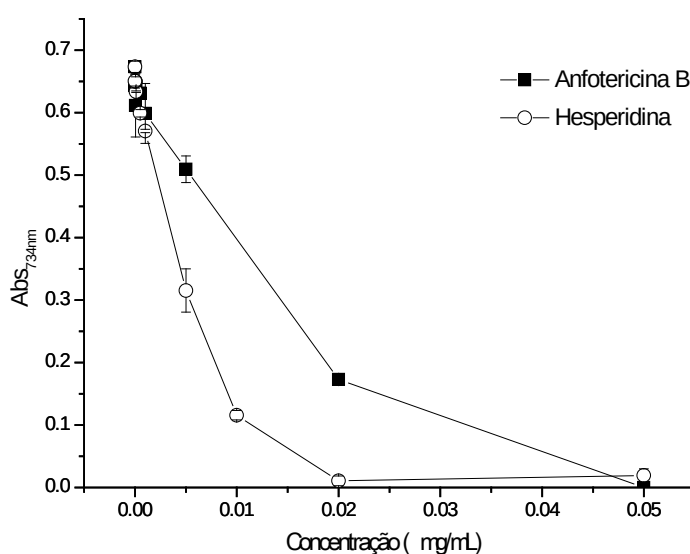


Gráfico 1 - Ação *scavenger* da anfotericina B e hesperidina sobre o radical ABTS^{•+}, em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0

Tabela 4 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o radical ABTS^{•+}

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,00001	0,6434	0,0140	0,6503	0,0110
0,00005	0,6117	0,0507	0,65	0,0076
0,0001	0,6423	0,0042	0,6337	0,0012
0,0005	0,6313	0,0015	0,599	0,0061
0,001	0,5987	0,0479	0,5707	0,0025
0,005	0,5093	0,0214	0,3153	0,0346
0,02	0,173	0,0061	0,0107	0,0078
0,05	0	0	0,0193	0,0104

Quando foram associadas diferentes concentrações de hesperidina com diferentes concentrações de anfotericina B também se pode notar que as duas substâncias em conjunto foram capazes de capturar o radical $ABTS^{•+}$ mais eficientemente, diminuindo a IC_{50} das substâncias (Gráfico 2 e Tabela 5). A anfotericina associada à hesperidina 0,005mg/mL, 0,001mg/mL e 0,0005mg/mL apresentou IC_{50} de 0,0003mg/mL, 0,0074mg/mL e 0,0083mg/mL, respectivamente. Isto demonstra que a presença do produto natural melhora a ação na captura de radicais livres do antifúngico. Essa ação em que a AmB associada a um antioxidante poderia ter sua atividade favorecida já havia sido proposta por Lamy-Freund et al. (1985). Desta forma, pode-se sugerir que a associação da anfotericina com um produto natural, obtendo uma boa ação antioxidante, diminuiria os efeitos nocivos da anfotericina relacionados a radicais livres (OSAKA et al., 1997B).

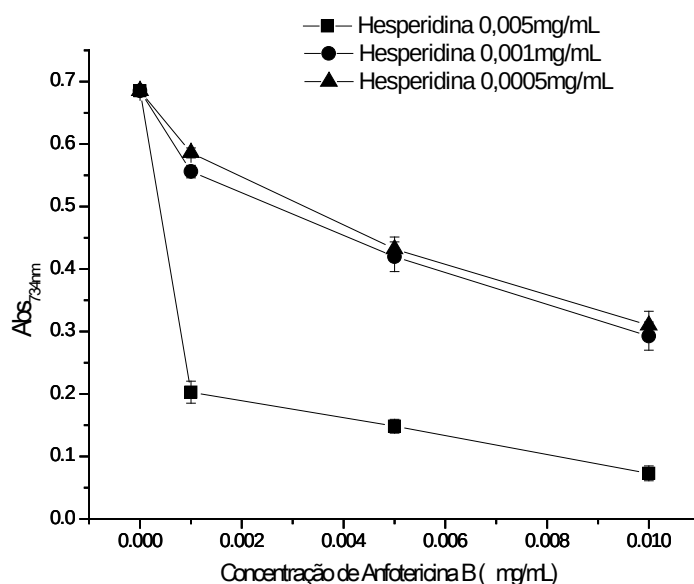


Gráfico 2 - Ação *scavenger* sobre o radical $ABTS^{•+}$: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações, em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0.

Tabela 5 - Ação *scavenger* sobre o radical $ABTS^{•+}$: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações

Conc. Anfo. (mg/mL)	Hesperidina 0mg/mL		Hesperidina 0,005mg/mL		Hesperidina 0,001µg/mL		Hesperidina 0,0005mg/mL	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
0,001	0,5987	0,0479	0,203	0,0177	0,556	0,01	0,586	0,008
0,005	0,5093	0,0214	0,1483	0,0110	0,4197	0,0236	0,432	0,0191
0,01	0,173	0,0061	0,073	0,0118	0,2927	0,0226	0,31	0,0223

5.2.2 Ação *scavenger* das amostras sobre radical DPPH•

Neste ensaio, anfotericina B e hesperidina praticamente não apresentaram ação sobre o radical DPPH• (Gráfico 3, Tabela 6).

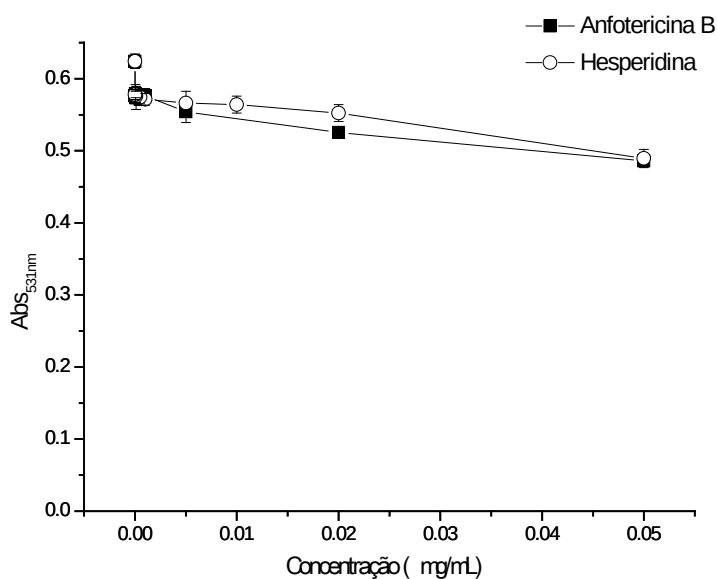


Gráfico 3 - Ação *scavenger* da anfotericina B e hesperidina sobre o radical DPPH• (60μM), em etanol absoluto

Tabela 6 - Ação *scavenger* da anfotericina B e hesperidina sobre o radical DPPH•

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,00001	0,576	0,0105	0,578	0,007
0,00005	0,5793	0,0125	0,578	0,0044
0,0001	0,5733	0,0159	0,5757	0,0086
0,0005	0,5717	0,0051	0,5743	0,0091
0,001	0,576	0,0104	0,5713	0,0081
0,005	0,554	0,0147	0,566	0,0165
0,01	x	x	0,564	0,0118
0,02	0,5253	0,0067	0,5523	0,0117
0,05	0,486	0,0042	0,4893	0,0125

Como obtido a partir da Tabela 6, as inibições máximas nas doses testadas pelas amostras frente ao DPPH• foram alcançadas na concentração de 0,05 mg/mL sendo que a hesperidina e anfotericina alcançaram 22% de inibição. Com 0,02 mg/mL, anfotericina e hesperidina promoveram respectivamente 15,8% e 11,5% de inibição. Jain e Parmar (2011)

em seus estudos já haviam demonstrado que a hesperidina não possuía ação na captura do radical DPPH•.

A anfotericina 0,02 mg/mL quando associada à hesperidina (Gráfico 4, Tabela 7) alcançou 10%, 5% e 4% de inibição estando a hesperidina nas concentrações 0,05, 0,02 e 0,01mg/mL, respectivamente, indicando que, quando associadas, anfotericina e/ou hesperidina não apresentaram o mesmo potencial individual.

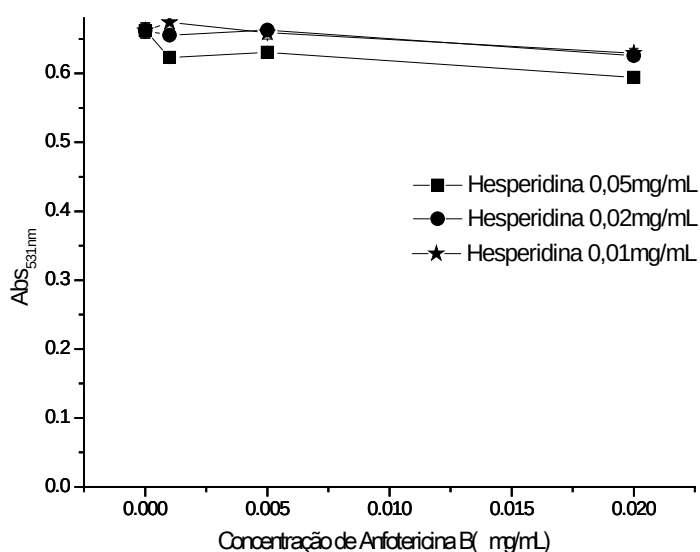


Gráfico 4 - Ação *scavenger* sobre o radical DPPH• (60µM): hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações

Tabela 7 - Ação *scavenger* sobre o radical DPPH• hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações

Conc. Anfo. (mg/mL)	Hesperidina 0mg/mL		Hesperidina 0,05mg/mL		Hesperidina 0,02mg/mL		Hesperidina 0,01mg/mL	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
0,001	0,576	0,0104	0,623	0,0072	0,655	0,0045	0,674	0,0118
0,005	0,554	0,0147	0,631	0,0081	0,663	0,0066	0,659	0,0093
0,02	0,5253	0,0067	0,594	0,003	0,6257	0,0065	0,6293	0,0071

5.2.3 Atividade *scavenger* das amostras sobre o HOCl

Neste ensaio, tanto a anfotericina quanto a hesperidina apresentaram ação na captura do HOCl apresentando IC₅₀ de 0,0056mg/mL e 0,0109mg/mL, respectivamente (Gráfico 5, Tabela 8).

Porém pode-se notar que a anfotericina apresentou melhor ação que a hesperidina, podendo isso ser explicado pela própria estrutura da anfotericina (sete ligações duplas conjugadas), em que esta pode ter uma ação antioxidante (OSAKA et al., 1997B).

Pode-se comparar essa boa ação da hesperidina, com a ação das frutas cítricas em que a hesperidina está presente. No estudo de Ramful et al. (2010) para a laranja foi encontrada IC_{50} de 3,98mg/mL e para o limão IC_{50} de 10,70mg/mL, valores que quando comparados ao produto natural isolado são relativamente ruins, mas que podem ser explicados pelo processamento da fruta, conservação ou ainda pela presença de outros constituintes da mistura que podem interferir na ação final.

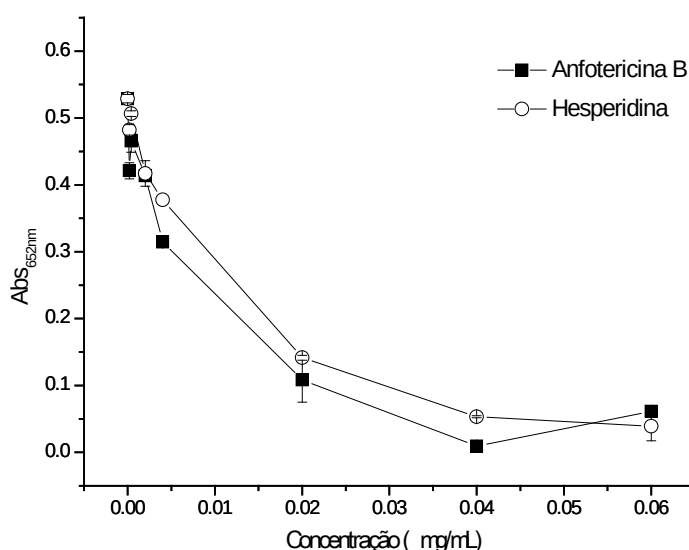


Gráfico 5 - Ação *scavenger* da anfotericina B e hesperidina sobre o HOCl

Tabela 8 - Ação *scavenger* da anfotericina B e hesperidina sobre o HOCl

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,0002	0,4212	0,0120	0,4822	0,0078
0,0004	0,4657	0,0170	0,5067	0,0042
0,002	0,4135	0,0021	0,417	0,0190
0,004	0,3145	0,0064	0,3777	0
0,02	0,1085	0,0332	0,1415	0,0035
0,04	0,0093	0,002	0,0533	0,0014
0,06	0,0612	0,0050	0,0392	0,0219

Na associação entre a hesperidina e a anfotericina (Gráfico 6, Tabela 9), frente à hesperidina 0,004mg/mL e 0,002mg/mL a AmB apresentou valores de IC_{50} de 0,0023mg/mL

e 0,0043mg/mL, respectivamente, aumentando a ação antioxidante da anfotericina em relação a substância isolada ($IC_{50} = 0,0056\text{mg/mL}$).

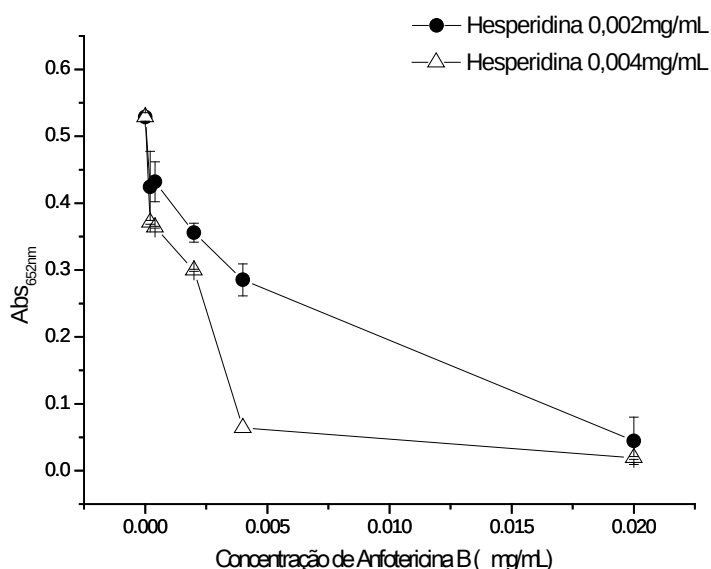


Gráfico 6 - Ação *scavenger* sobre o HOCl: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações

Tabela 9 - Ação *scavenger* sobre o HOCl: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações

Concentração Anfotericina (mg/mL)	Hesperidina 0mg/mL		Hesperidina 0,002mg/mL		Hesperidina 0,04mg/mL	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
0,002	0,4135	0,0021	0,4243	0,0530	0,3713	0,003
0,004	0,3145	0,0064	0,432	0,0297	0,364	0,0014
0,02	0,1085	0,0332	0,3557	0,0141	0,2997	0,0014
0,04	0,0093	0,002	0,2853	0,0239	0,064	0
0,06	0,0612	0,0050	0,0447	0,0355	0,0192	0,0021

5.2.4 Atividade *scavenger* sobre o ânion superóxido

As inibições máximas pelas amostras frente ao ânion superóxido foram alcançadas na concentração de 0,167mg/mL sendo que a hesperidina alcançou 25,7% (Tabela 10). Na ação sobre o ânion superóxido, as duas substâncias testadas isoladamente ou associadas não apresentaram uma atividade considerável, discordando de Jovanovic et al. (1994), em que afirmaram que a hesperidina teria a propriedade de neutralizar o ânion superóxido.

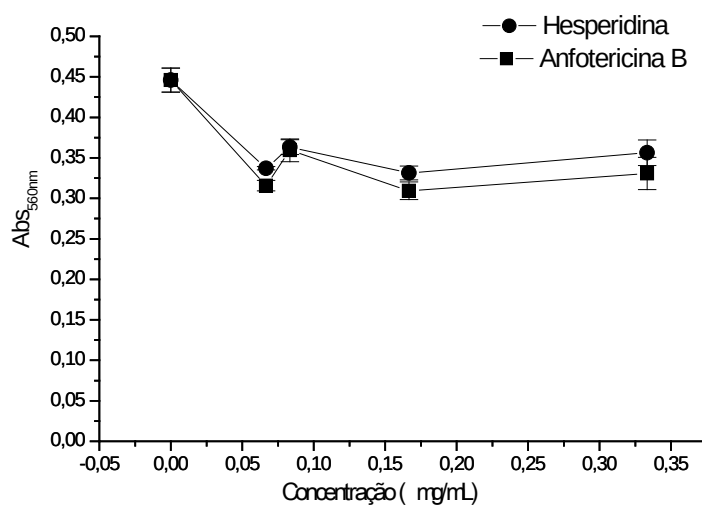


Gráfico 7 - Ação *scavenger* da anfotericina B e hesperidina sobre o ânion superóxido

Tabela 10 - Ação *scavenger* da anfotericina B e hesperidina sobre o ânion superóxido

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,333	0,3307	0,0200	0,3563	0,0159
0,167	0,3093	0,0120	0,3313	0,0085
0,083	0,3593	0,0141	0,3633	0,0092
0,067	0,3157	0,0066	0,3372	0,0021
0	0,4460	0,0148	0,4460	0,0148

A anfotericina, na maior concentração testada, alcançou inibições de 26% na ausência de hesperidina (tabela 10) e 36,3% (tabela 11) quando associada à mesma, indicando que, quando associadas, apresentam ação *scavenger* de radical superóxido aprimorada.

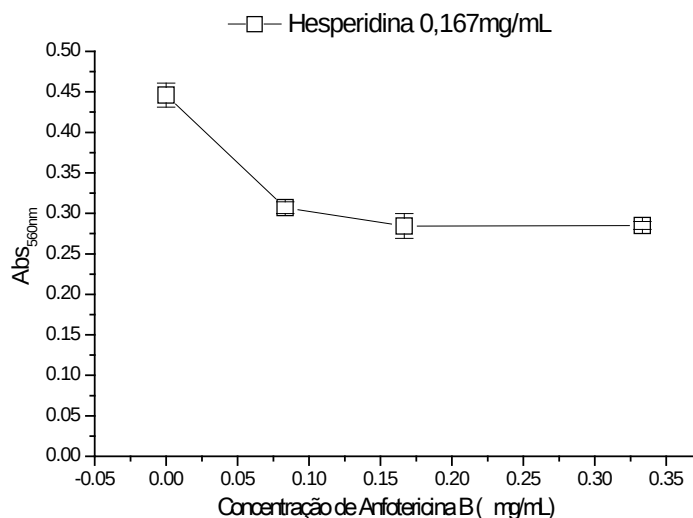


Gráfico 8 - Ação *scavenger* sobre o ânion superóxido: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações

Tabela 11 - Ação *scavenger* sobre o ânion superóxido: hesperidina associada com anfotericina B em diferentes concentrações

Concentração Anfotericina (mg/mL)	Hesperidina 0mg/mL		Hesperidina 0,167mg/mL	
	Média	±DP	Média	±DP
0,333	0,3307	0,0200	0,285	0,0050
0,167	0,3093	0,0120	0,2843	0,0154
0,083	0,3593	0,0141	0,307	0,0072
0	0,4460	0,0148	0,4460	0,0148

5.2.5 Inibição da mieloperoxidase

De acordo com os resultados apresentados no Gráfico 9 e Tabela 12, a anfotericina não é bom agente inibidor da mieloperoxidase à medida que promoveu pequena redução nos valores de v_0 . Além disso, a hesperidina não foi capaz de promover redução nos valores de velocidade de reação. Este dado é importante na medida em que tal enzima participa na resposta a microrganismos, catalisando a produção de HOCl e em algumas situações exacerbando a resposta inflamatória e favorecendo o estresse oxidativo.

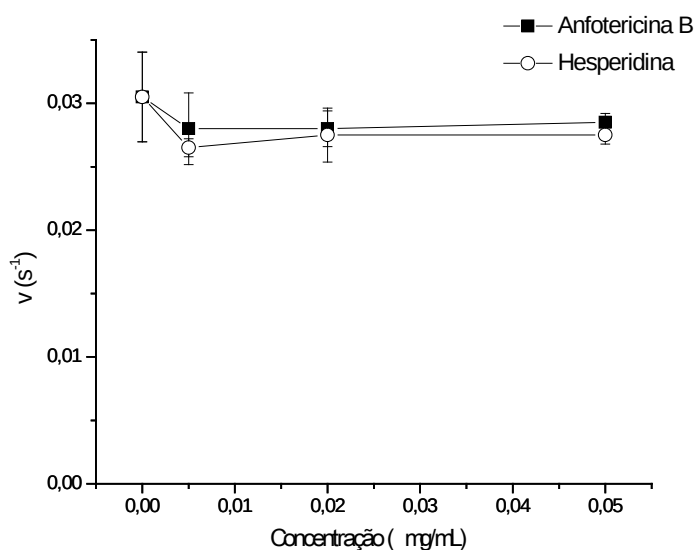


Gráfico 9 - Inibição da cinética da MPO/H₂O₂/Guaiacol pelas amostras anfotericina B e hesperidina

Tabela 12 - Inibição da cinética da MPO/H₂O₂/Guaiacol pelas amostras anfotericina B e hesperidina

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,05	0,0275	0,0007	0,0285	0,0007
0,02	0,0275	0,0021	0,028	0,0014
0,005	0,0265	0,0007	0,028	0,0028
0	0,0305	0,0035	0,0305	0,0035

Como pode ser observado na Tabela 13, a hesperidina quando associada à AmB não foi capaz de alterar significativamente a ação desta última frente à MPO, mesmo quando elevou-se a concentração da primeira.

Tabela 13 - Inibição da cinética da MPO/H₂O₂/Guaiacol, associando a anfotericina B com hesperidina

Hesperidina (mg/mL)	AmB 0,02 mg/mL	
	Média	±DP
0	0,0275	0,0021
0,005	0,027	0,0014
0,002	0,0285	0,0007
0,05	0,02	0,0071

5.2.6 Ação sobre os eritrócitos

Na Tabela 14 e Gráfico 11, pode-se perceber que a hesperidina não apresentou ação hemolítica com o passar do tempo. Entretanto, a anfotericina mostrou-se um forte agente hemolítico com ação concentração-dependente e tempo-dependente (Gráfico 10), confirmando a pesquisa de Brajtburg et al. (1985) em que a anfotericina, mesmo em pequenas concentrações é capaz de causar lise.

Acredita-se que isso se deve à auto-oxidação da AmB, em que origina diferentes formas de espécies reativas oxidativas e estas, por serem tóxicas para a célula seriam responsáveis pela hemólise (BRAJTBURG et al.,1985).

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Khan e Owais (2006) que utilizaram várias formulações de anfotericina e chegaram a conclusão que a anfotericina deoxicolato apresenta maior hemólise induzida em eritrócitos humanos de uma maneira dose-dependente.

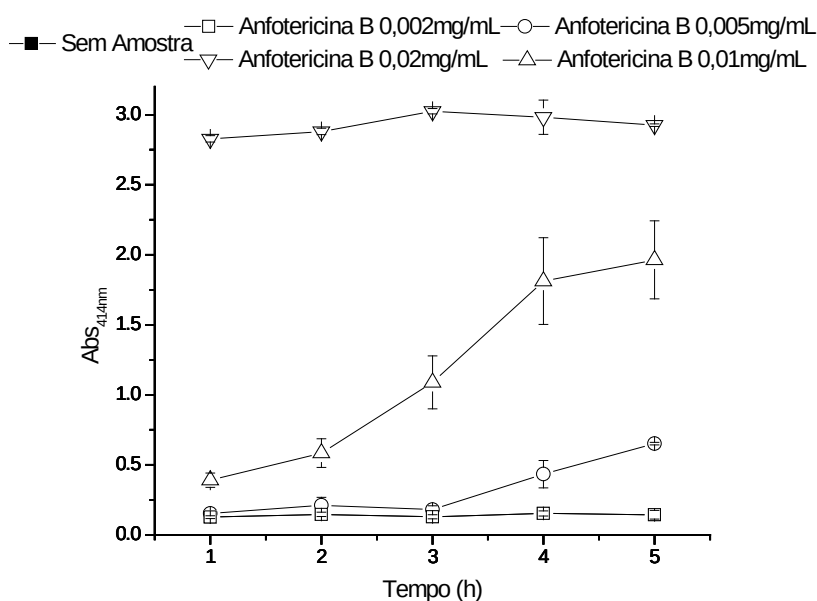


Gráfico 10 - Ação hemolítica da anfotericina B em função do tempo

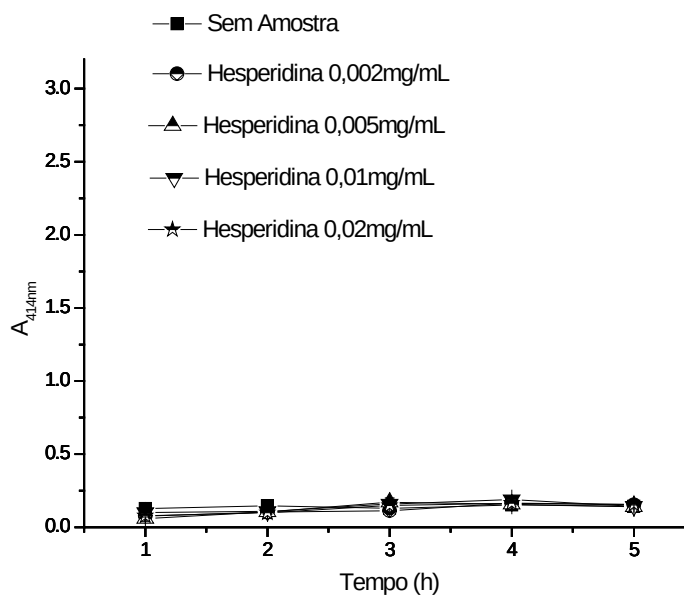


Gráfico 11 - Efeito da hesperidina sobre eritrócitos em função do tempo

Quando se adicionou o oxidante (APPH) (Tabela 15) elevou-se a lise dos eritrócitos de modo tempo-dependente sendo que ao se adicionar a hesperidina, a hemólise promovida pelo radical AAPH foi reduzida de forma concentração dependente. Por outro lado, quando a hesperidina foi associada à Anfotericina B, a hemólise foi exacerbada seja na ausência do radical (Tabela 14) ou na presença do mesmo (Tabela 15).

A hemólise intensificada na presença de AmB e AAPH indica um possível envolvimento de radicais livres no dano às membranas de tal forma que a interação entre estes dois poderia gerar um novo produto radicalar. Além disso, a associação da hesperidina mostrou potencial citotóxico exacerbado à medida que potencializou o dano que a AmB promoveu isoladamente na ausência e na presença do radical livre. Considerando que, em nossos ensaios químicos de interação com modelos oxidativos, a hesperidina não demonstrou grande potencial antioxidante, pode ser esperado baixa atuação frente aos radicais gerados pela AmB.

Tabela 14 - Ação sobre os eritrócitos sem AAPH durante 5 horas de incubação a 37°C

Concentração das amostras (mg/mL)	1 hora		2 horas		3 horas		4 horas		5 horas	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
0	0,0733	0,0065	0,055	0,0028	0,087	0,0102	0,0965	0,0021	0,086	0,0085
Anfotericina B 0,002	0,105	0,0120	0,1145	0,0151	0,1992	0,0206	0,3102	0,0361	0,366	0,0742
Hesperidina 0,02	0,102	0,0111	0,0915	0,0064	0,1327	0,0098	0,1513	0,0220	0,1425	0,0162
Hesperidina 0,01	0,0723	0,0115	0,1055	0,0021	0,129	0,0168	0,1425	0,0064	0,1385	0,0078
Hesperidina 0,005	0,0825	0,0050	0,088	0,004	0,126	0,007	0,1375	0,0304	0,141	0,0191
Hesperidina 0,002	0,085	0,0096	0,099	0,0028	0,0985	0,0035	0,0945	0,0050	0,133	0,0212
Anfo.(0,002)+Hesp.(0,02)	0,1405	0,0035	0,501	0,0071	0,7245	0,0813	0,8205	0,1124	0,996	0
Anfo.(0,002)+Hesp.(0,01)	0,1195	0,00495	0,4035	0,0021	1,18	0,1527	1,17	0,5502	1,2815	0,1195
Anfo.(0,002)+Hesp.(0,005)	0,1375	0,0113	0,335	0,0177	0,7142	0,0605	1,0695	0,1344	1,6125	0,2687
Anfo.(0,002)+Hesp.(0,002)	0,14	0,0066	0,3737	0,0948	0,897	0,2151	1,579	0,1332	1,605	0,0679

Tabela 15 - Ação sobre os eritrócitos com AAPH durante 5 horas de incubação a 37°C

Concentração das amostras (mg/mL)	1 hora		2 horas		3 horas		4 horas		5 horas	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
0	0,074	0,004	0,242	0,0057	0,529	0,0212	0,84	0,0474	1,226	0,0297
Anfotericina B 0,002	0,116	0	0,3855	0,0120	0,822	0,0481	1,2765	0,0092	1,98	0,0071
Hesperidina 0,02	0,0957	0,0129	0,1257	0,0093	0,168	0,0014	0,2247	0,0080	0,421	0,0042
Hesperidina 0,01	0,122	0,0028	0,1465	0,0078	0,2365	0,0488	0,49	0,0156	0,8693	0,0523
Hesperidina 0,005	0,1	0,0028	0,165	0,0085	0,4185	0,0035	0,5453	0,0204	0,9605	0,0007
Hesperidina 0,002	0,114	0,0014	0,231	0,0212	0,52	0,0014	0,677	0,0028	1,0835	0,0643
Anfo.(0,002)+Hesp.(0,02)	0,1165	0,0092	0,267	0,0156	0,866	0,0127	0,986	0,0156	1,429	0,0693
Anfo.(0,002)+Hesp.(0,01)	0,124	0,0036	0,4575	0,0375	1,3135	0,0106	1,3325	0,0884	1,971	0,1796
Anfo.(0,002)+Hesp.(0,005)	0,1185	0,0021	0,6285	0,0389	1,5725	0,0714	1,8095	0,0771	2,455	0,0255
Anfo.(0,002)+Hesp.(0,002)	0,144	0,012	0,833	0,1230	1,869	0,0028	1,863	0,0410	2,618	0,2800

5.3 Ensaio utilizando linhagem de células endoteliais: HUVEC (ATCC® CRL-2873™)

As células endoteliais vasculares foram escolhidas devido a seu envolvimento na troca de metabólitos nos tecidos e por apresentarem papel fundamental na fisiologia normal e fisiopatologia do corpo humano (BALA et al., 2011). No teste de avaliação de citotoxicidade das amostras revelada pelo MTT, a AmB e a hesperidina apresentaram citotoxicidade considerável à medida que, com o aumento da concentração, houve redução no número de células viáveis (Gráfico 12).

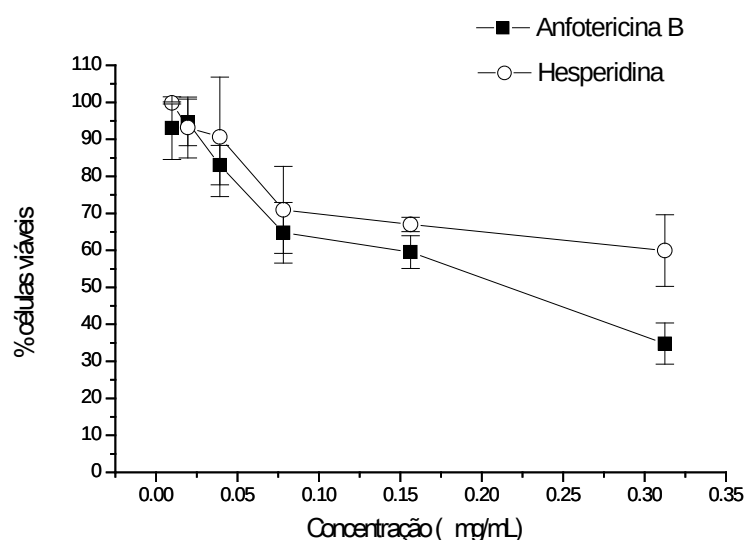


Gráfico 12 - Efeito das amostras anfotericina B e hesperidina sobre células endoteliais (HUVEC) nativas (sem estímulo)

Quando as amostras foram associadas (Tabela 16) houve uma diminuição do número de células viáveis quando comparado às amostras sozinhas, demonstrando que quando associada à hesperidina, a AmB apresenta maior potencial de citotoxicidade.

Tabela 16 - Viabilidade (%) de células endoteliais (HUVEC) frente à anfotericina B e sua associação com hesperidina, na ausência de estímulo LPS

Conc. mg/mL	Anfotericina		Hesperidina		Anfo + Hesp (0,07810mg/mL)	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
0,3125	34,80	5,54	59,97	9,68	29,07	8,19
0,0391	83,03	5,33	90,67	16,17	36,93	3,72
0,0195	94,55	6,29	93,23	8,24	38,90	0,46
0,0098	93,03	8,46	99,83	0,29	50,57	0,76

Como pode ser observado no Gráfico 13 e Tabela 17, quando se estimula as células com LPS, e, portanto, induz a produção de ERO/ERN, há ligeira alteração na morte celular promovida pelas amostras isoladamente, mas essa citotoxicidade é bastante acentuada quando as amostras são associadas, o que parece indicar um envolvimento importante das ERO neste processo.

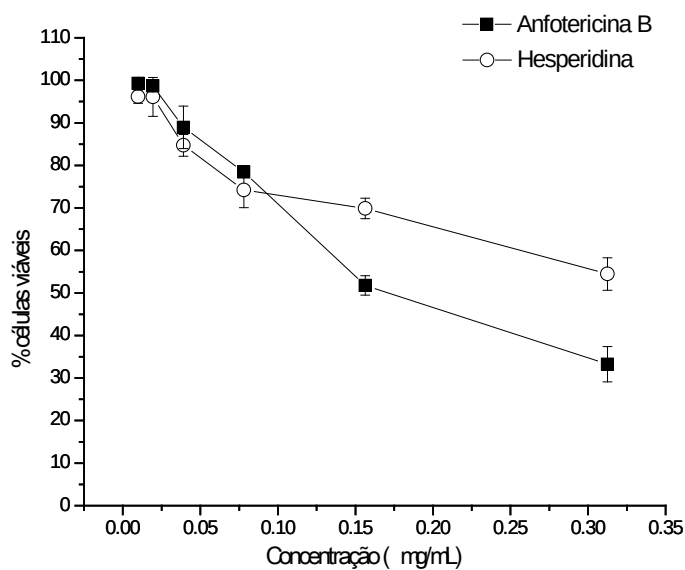


Gráfico 13 - Efeito das amostras sobre células endoteliais (HUVEC) estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS)

Tabela 17 - Viabilidade (%) de células endoteliais (HUVEC) frente à anfotericina e suas associações com hesperidina, na presença de estímulo LPS

Conc. mg/mL	Anfotericina		Hesperidina		Anfo + Hesp (0,07810mg/mL)	
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP
0,3125	33,26	4,12	54,46	3,82	10,56	2,13
0,0391	88,93	4,99	84,72	2,57	51,87	1,63
0,0195	98,68	1,40	96,10	4,55	61,33	3,16
0,0098	99,27	0,89	96,16	1,57	88,89	1,68

5.4 Estudos de toxicidade

5.4.1 *Artemia salina*

O método de Probit (Finney, 1971) foi usado para o cálculo dos valores da CL_{50} e dos respectivos intervalos de confiança 95% (IC-95%). O programa StatPlus 2007® foi utilizado para execução das análises de Probit e construção das curvas de dose-resposta.

Para obter um resultado mais confiável, foi testado de forma isolada o DMSO, que é a substância utilizada para dissolver as amostras. Pode-se notar que ele sozinho é tóxico para as “artemias” (CL_{50} = 294,14 em 24h e 172,88 em 48h).

Para uma padronização dos resultados, como base se tem a classificação quanto a atividade citotóxica em *Artemia salina* feita por David et al. (2001) para classificação de substâncias puras obtidas de extratos de plantas: $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ são consideradas inativas; $CL_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ são muito ativas e $CL_{50} \geq 100 \mu\text{g/ml}$ são substâncias medianamente ativas.

A anfotericina mostrou-se bastante tóxica com as mais baixas CL_{50} (CL_{50} = 25,37 $\mu\text{g/mL}$) enquanto a hesperidina apresentou baixa citotoxicidade (CL_{50} = 423,47 $\mu\text{g/mL}$), sendo considerada medianamente ativa (tabela 18).

Esta ação do produto natural pode ser comparada ao da quercetina, que também é um flavonóide isolado, que segundo Harada (2009) possui uma $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, enquanto um alcalóide, como a duguetina, apresenta toxicidade de 20,8 $\mu\text{g/mL}$, bem próxima da encontrada para a anfotericina.

Tabela 18 - CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) das amostras isoladas avaliadas frente a *Artemia salina*

Produto	CL ₅₀ : Concentração Letal 50	
	24h	48h
DMSO	294,14 $\mu\text{L/mL}$	172,88 $\mu\text{L/mL}$
Anfotericina	25,37 $\mu\text{g/mL}$	Todas Mortas*
Hesperidina	423,47 $\mu\text{g/mL}$	232,72 $\mu\text{g/mL}$

*Cálculo não possível

Quando as amostras foram associadas, conforme apresentado na Tabela 19, na presença da hesperidina a toxicidade da anfotericina B diminuiu. O que demonstra que a hesperidina pode ser capaz de diminuir a toxicidade da AmB, que é o principal problema do uso deste medicamento.

Tabela 19 - CL₅₀ (µg/mL) das amostras associadas avaliadas frente a *Artemia salina*

Produto	CL ₅₀ : Concentração Letal 50 (µg/mL)
	24h
Anfotericina + Hesperidina 423 µg/mL	334,14
Hesperidina + Anfotericina 90 µg/mL	119,44

5.4.2 Avaliação da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade

Nesta etapa, o hemograma completo e a bioquímica (ácido úrico, tgo, tgp, uréia e creatinina) foram realizados no Laboratório Vicentino em Ponta Grossa.

Nos gráficos não foram apresentados os valores dos animais tratados apenas com hesperidina, pois estes não apresentaram diferença em relação ao grupo controle.

Na análise do hemograma é possível observar que a Anfotericina B causou alteração em todos os parâmetros, que foram revertidos na presença da hesperidina. Observando o Gráfico 14 percebe-se uma redução da massa eritrocitária na presença do antifúngico, que quando utilizado em associação com o produto natural retornou a normalidade. Foi também possível observar que a AmB foi capaz de causar uma leucopenia (Gráfico 18) que, na presença de hesperidina, foi revertida, sendo que a menor dose utilizada no tratamento (50µg/mL) foi a mais eficiente. Peixoto (2008), relatou apenas leucopenia nas primeiras 12horas no tratamento utilizando AmB, sendo depois estabilizada. Esta diminuição do número de leucócitos pode estar diretamente ligada com a diminuição linfócitos que são encontrados mais abundantemente no sangue dos ratos (PEIXOTO, 2008). Com esse resultado pode-se supor que o uso da anfotericina B em pacientes imunossuprimidos agravaria ainda mais o quadro, ocorrendo uma supressão da medula óssea. A monocitopenia, apresentada no Gráfico 20, causada pela AmB foi revertida na menor dose de hesperidina (50µg/mL), entretanto na maior dose (200µg/mL) não foi capaz de reverter esse quadro. Essa monopenia poderia estar diretamente ligada a leucopenia.

Apenas neutrófilos e eosinófilos (Gráfico 21 e 22), dos parâmetros hematológicos não apresentaram diferença estatística. Talvez pelo grupo pequeno (n) apresentado essa diferença não foi percebida, entretanto, Peixoto (2008) já havia relatado não ter apresentado mudança nestes aspectos, mesmo com um tratamento de 80 dias com AmB. Com isso, demonstrou-se que a menor dose (50µg/mL) do produto natural utilizado foi mais eficiente que a maior dose (200µg/mL) para reverter este quadro apresentado pelo uso de anfotericina B.

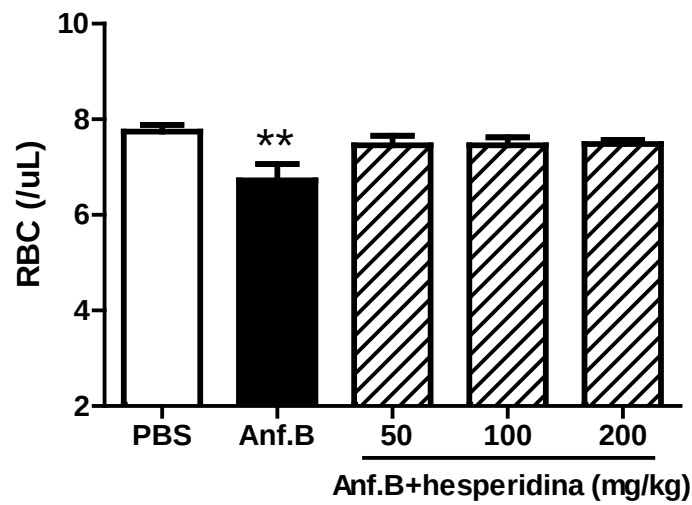


Gráfico 14 - Análise do hemograma, parâmetro contagem de Eritrócitos (RBC) de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

**p<0,01 com relação ao grupo controle

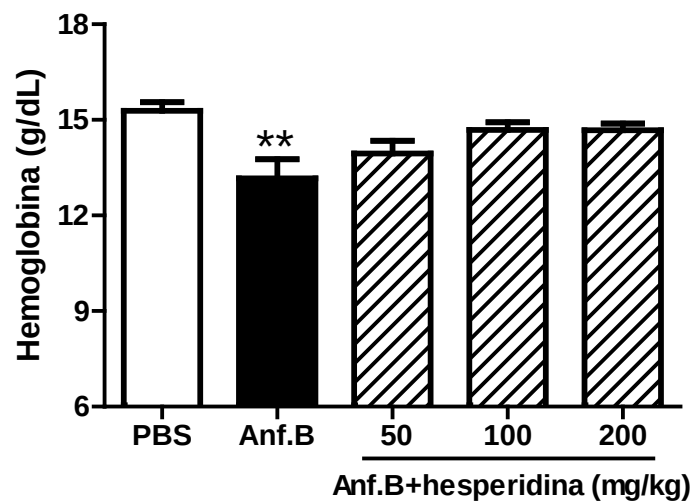


Gráfico 15 - Análise do hemograma, parâmetro Hemoglobina de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

**p<0,01 com relação ao grupo controle

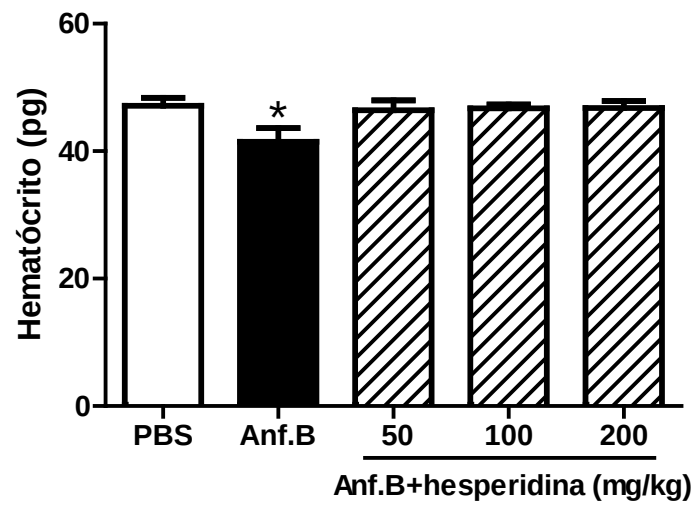


Gráfico 16 - Análise do hemograma, parâmetro Hematócrito de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)
* $p < 0,05$ com relação ao grupo controle

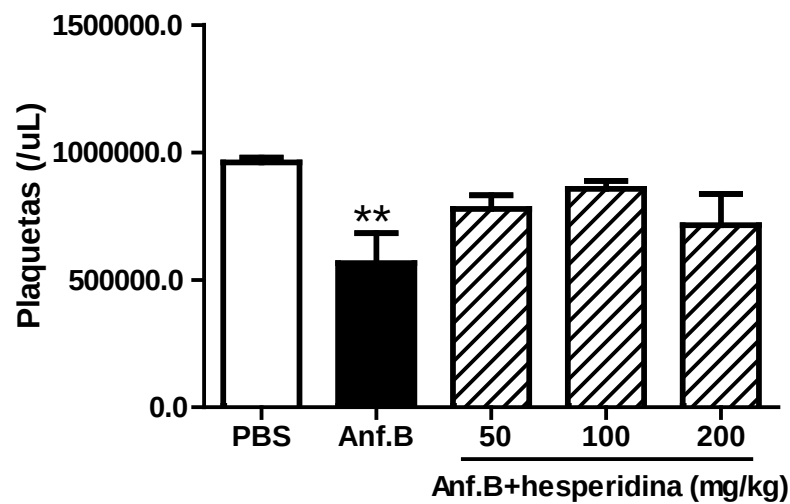


Gráfico 17 - Análise do hemograma, parâmetro Plaquetas de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)
** $p < 0,01$ com relação ao grupo controle

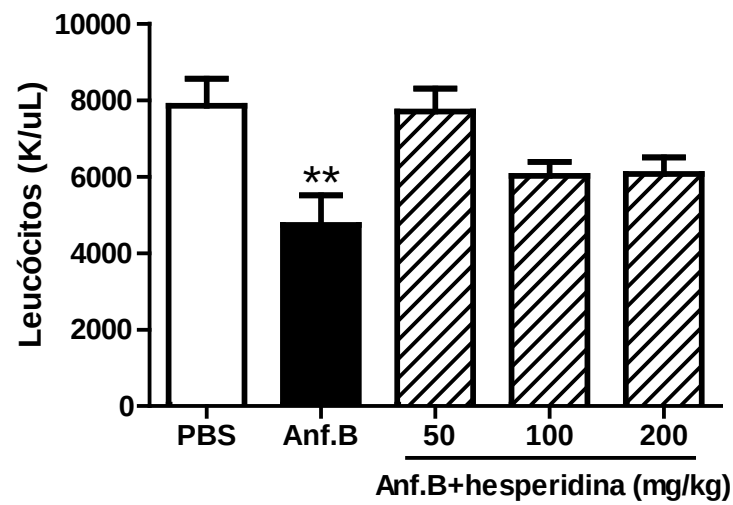


Gráfico 18 - Análise do hemograma, parâmetro Leucócitos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)
 **p<0,01 com relação ao grupo controle

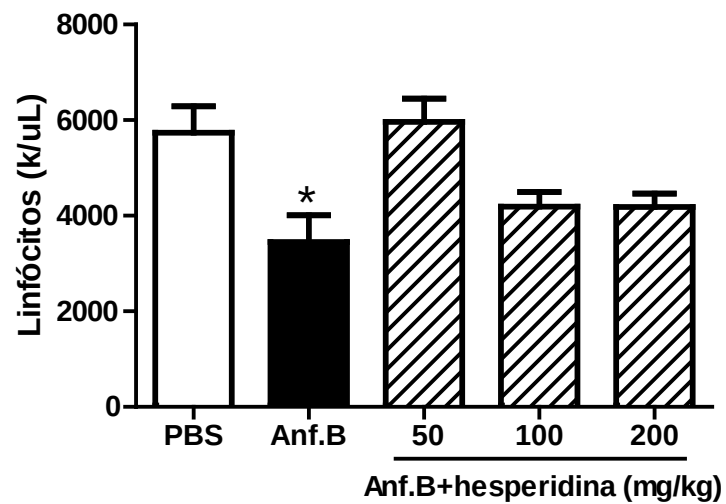


Gráfico 19 - Análise do hemograma, parâmetro Linfócitos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)
 *p<0,05 com relação ao grupo controle

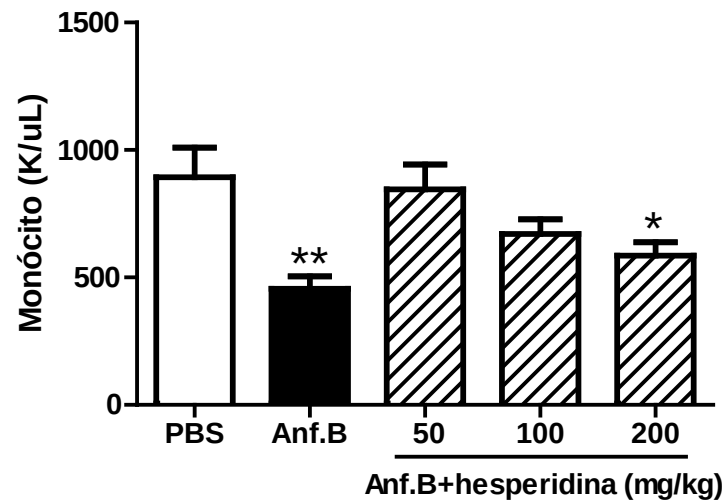


Gráfico 20 - Análise do hemograma, parâmetro contagem de Monócitos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

**p<0,01 com relação ao grupo controle

*p<0,05 com relação ao grupo controle

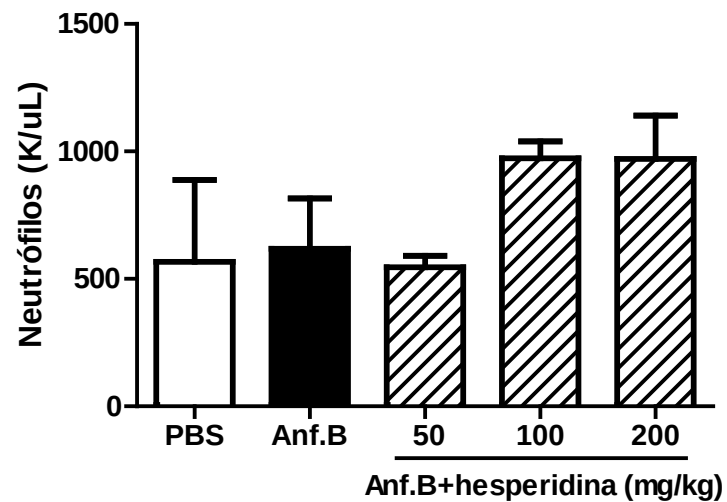


Gráfico 21 - Análise do hemograma, parâmetro contagem de Neutrófilos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

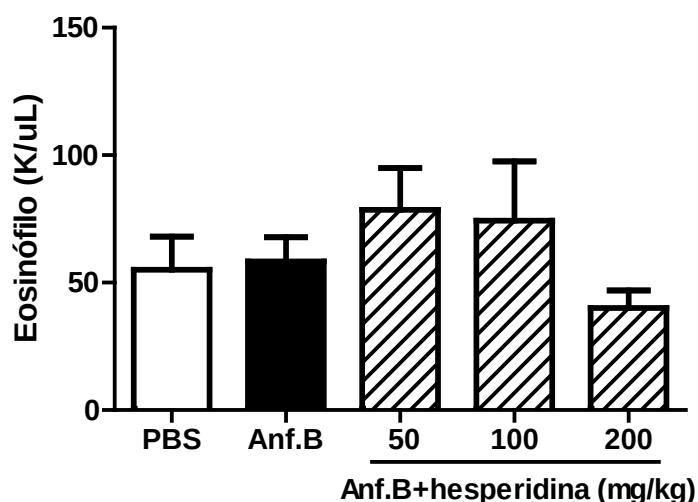


Gráfico 22 - Análise do hemograma, parâmetro contagem de Eosinófilos de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

Analisando os dados dos parâmetros bioquímicos, a creatinina (Gráfico 23) e a uréia (Gráfico 24) apresentaram diferença estatística entre os animais não tratados em relação ao controle, demonstrando que houve um dano renal. Quando os animais foram tratados de maneira associada entre anfotericina B e hesperidina, esta última na maior concentração (200µg/mL) foi capaz de reverter o dano.

Este dano renal poderia estar ligado à forma de administração (intravenosa) e a dose, pois no estudo realizado por Peixoto (2008) não ocorreu dano. Isto se deveu provavelmente pela via de administração utilizada (intraperitoneal), pela qual não há boa absorção do medicamento, e a dose 2mg/mL/kg.

Com relação aos dados bioquímicos que indicam uma possível doença hepática, não foram observadas diferenças estatísticas. A TGO (Gráfico 24), TGP (Gráfico 25) e fosfatase alcalina (Gráfico 26) não se apresentaram alterados. Segundo Ozer et.al (2008) a TGP é um ótimo biomarcador para dano hepático, comprovado histopatologicamente. Entretanto, se a anfotericina tivesse causado hepatotoxicidade, este poderia, talvez, ser revertido pela hesperidina dado que alguns estudos indicam que a hesperidina é capaz de combater as espécies reativas de oxigênio geradas nos hepatócitos (CHEN et al, 2010; KAUR et. al, 2006).

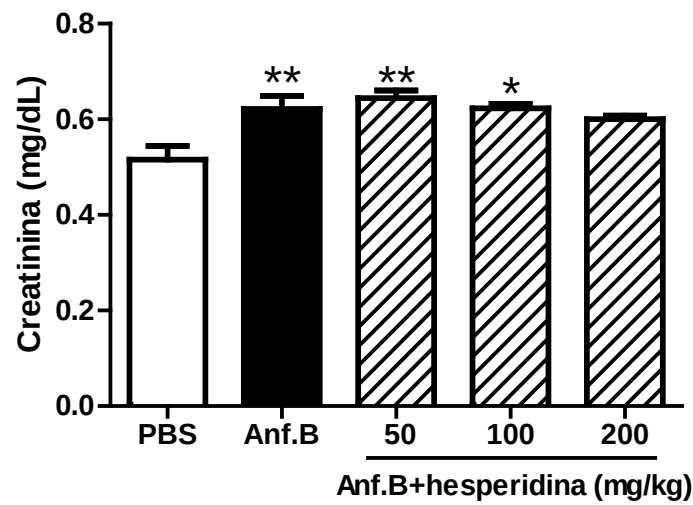


Gráfico 23 - Análise bioquímica, parâmetro Creatinina de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

**p<0,01 com relação ao grupo controle

*p<0,05 com relação ao grupo controle

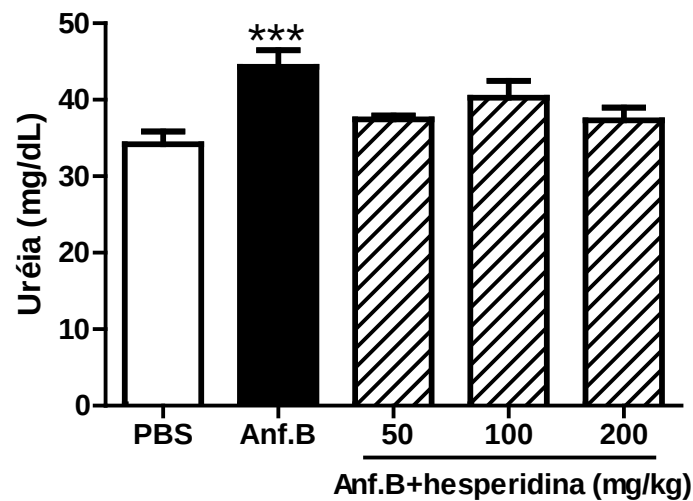


Gráfico 24 - Análise bioquímica, parâmetro Uréia de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

***p<0,001 com relação ao grupo controle

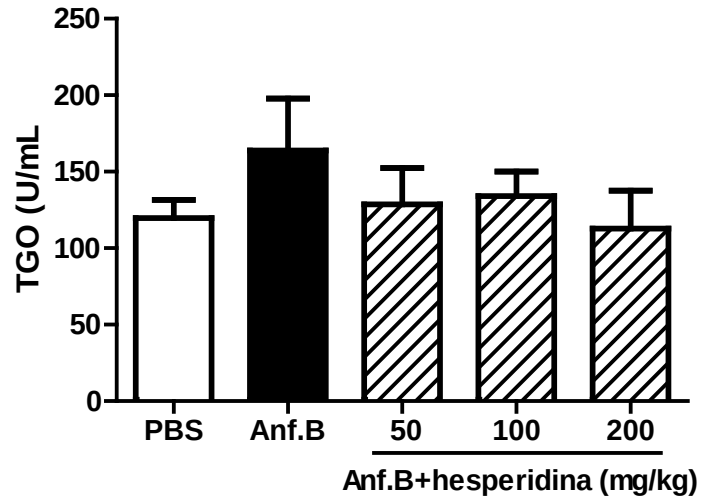


Gráfico 25 - Análise bioquímica, parâmetro TGO de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

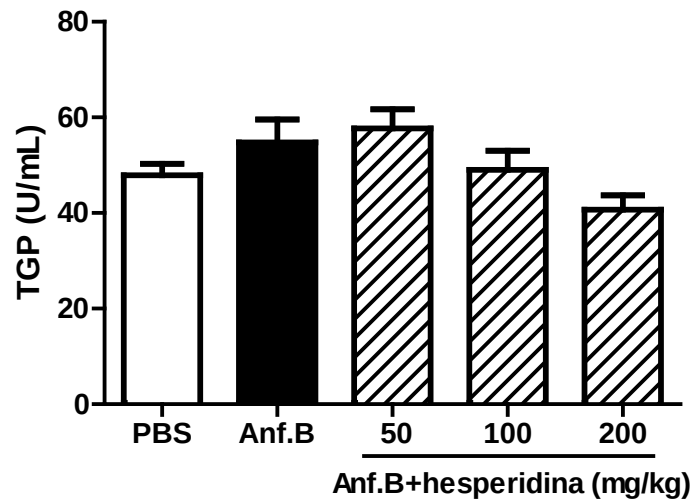


Gráfico 26 - Análise bioquímica, parâmetro TGP de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

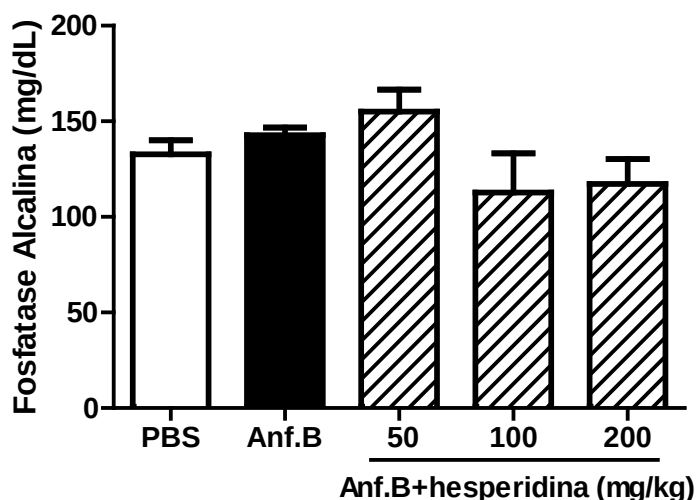


Gráfico 27 - Análise bioquímica, parâmetro Fosfatase Alcalina de ratas Wistar tratadas por 5 dias com anfotericina B (3mg/kg/dia, i.v.) sozinha ou associada com hesperidina (50, 100 e 200mg/kg/dia, v.o.)

5.4.2.1 Determinação da capacidade antioxidante do soro

Para a determinação da capacidade antioxidante do soro foi utilizado o método ABTS^{•+}, e pode-se perceber que o tratamento com hesperidina não alterou a capacidade de captura de radicais livres, a qual foi maior no soro dos ratos que eram apenas tratados com Anfotericina B. Isto talvez possa ser explicado pela anfotericina induzir um estresse oxidativo e no período estudado, o organismo tentar reagir ao mesmo elevando os níveis de antioxidantes endógenos. Desta forma, ao se utilizar hesperidina nos animais tratados com anfotericina, a mesma combateria o estresse oxidativo e normalizaria a capacidade antioxidante do soro restabelecendo os níveis dos antioxidantes endógenos aos níveis do grupo controle (*naive*). Esta teoria deve ser comprovada em novos estudos mensurando-se separadamente os diferentes marcadores antioxidantes endógenos.

Tabela 20 – Capacidade antioxidante do soro dos ratos utilizando o método ABTS^{•+}

Produto	Média da % de captura	±DP
Controle/ <i>Naive</i>	34,6145	2,7226
Anfo. 3mg/kg/dia	37,4263	3,5608
Hesp. 200mg/kg/dia	33,9814	2,520
Anfo+Hesp.50mg/kg/dia	35,0272	1,7873
Anfo+Hesp.100mg/kg/dia	34,1862	2,9896
Anfo+Hesp.200mg/kg/dia	32,3028	1,1832

6 CONCLUSÕES

Em nosso estudo foi possível avaliar que a associação da anfotericina com um produto natural realmente melhora a ação antifúngica e pode-se haver uma diminuição na toxicidade.

Na associação da AmB com a hesperidina, esta foi capaz de aumentar a ação antifúngica da anfotericina B. As duas substâncias também apresentaram uma ação antioxidante relevante associadas e nos ensaios de citotoxicidade com a *Artemia salina* demonstraram de que associadas são menos tóxicas do que a AmB sozinha. Porém nos ensaios celulares as duas substâncias se mostraram tóxicas, mesmo associadas. No ensaio animal o resultado não foi o mesmo que observado com as células. A AmB causou uma lesão renal já esperada do medicamento e, quando foi utilizado de maneira concomitante a hesperidina, esta conseguiu reverter este quadro, trazendo a normalidade, mesmo na menor quantidade testada. Entretanto não foi observada hepatotoxicidade provocada pela anfotericina B.

Entretanto a associação da anfotericina B com a hesperidina, esta última não apresentou uma ação antioxidante tão relevante, e no ensaio celular as duas substâncias se apresentaram tóxicas mesmo associadas. Porém nos testes de toxicidade em *Artemia salina* e em animais a associação foi muito adequada, diminuindo os efeitos colaterais causados pela AmB. Com isso podemos propor que a associação da Anfotericina B com a hesperidina poderia ser uma solução promissora para combater a toxicidade renal e aprimoramento da ação antifúngica.

7 REFERÊNCIAS

AN, M.; SHEN, H.; CAO, Y.; ZHANG, J.; CAI, Y.; WANG, R.; JIANG, Y. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *International Journal Antimicrobial Agents*, v.33, p.258–263, 2009.

BALA, K.; AMBWANI, K.; GOHIL, N.K. Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: Implication on use of higher passage cells. *Tissue and Cell*, v.43, p.216-222, 2011.

BALAKRISHNAN, A.; MENON, V. P. Effect of hesperidin on matrix metalloproteinases and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Toxicology*, v.238, p.90-98, 2007.

BALAKRISHNAN, A.; MENON, V.P. Protective effect of hesperidin on nicotine induced toxicity in rats. *Indian Journal and Experimental Biology*, v.45, p. 194-202, 2007.

BARTHE, G.A.; JOURDAN, P.S.; MCINTOSH, C.A.; MANSELL, R.L. Radioimmunoassay for quantitative determination of hesperidin and analysis of its distribution in *Citrus sinensis*. *Phytochemistry*, v.27, p.249–254, 1988.

BARRATT, G.; BRETAGNE, S. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. *International Journal of Nanomedicine*, v.2, p.301–313, 2007.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J.A. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.4505–4515, 1997.

BERDICHEVSKI, R.H.; MANFRO, R.C. Nefrotoxicidade associada à anfotericina B em pacientes de baixo risco. *Dissertação de Mestrado*. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina, 2003.

BRAJTBURG, J.; ELBERG, S.; SCHWARTZ, D.R.; VERTUT-CROQUIN, A.; SCHLESSINGER, D.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Involvement of Oxidative Damage in Erythrocyte Lysis Induced by Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 27, n.2, p. 172-176, 1985.

BRAJTBURG, J.; POWDERLY, W.G.; KOYAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.34, p.183-188, 1990.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, v.87, p.840-844, 2000.

CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Pathology*, v.190, p.255-266, 2000.

CASTOR, L.R.G.; LOCATELLI, K.A.; XIMENES, V.F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010.

CHEN, M. A.; GU, H.; YE, Y.; LIN, B.; SUN, L.; DENG, W.; ZHANG, J.; LIU, J. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of tert-butyl hydroperoxide in human hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v.48, p.2980-2987, 2010.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. *Anal. Biochem.*, v. 218, p. 377-381, 1994.

COHEN, B.E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *International Journal of Pharmaceutics*, v.162, p.95–106, 1998.

COSTA, M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, p.1183-1187, 2004.

CZUB, J. BOROWSKI, E.; BAGINSKI, M. Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes - A molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1768, p. 2616–2626, 2007.

DAMASCENO, B.P.G.L. ; DOMINICI, V. A. ; Urbano, I.A. ; Araújo, I.B. ; Magalhães, N.E.S. ; SILVA, A.K.A. ; MEDEIROS, A.C. ; Oliveira, A.G. ; EGITO, E.S.T. . Amphotericin B Microemulsion Reduces Toxicity and Maintains the Efficacy as an Antifungal Product. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 290-300, 2012.

DAVID, J.P.; SILVA, E.F.; MOURA, D.L.; GUEDES, M.L.S.; ASSUNÇÃO, R.J.; DAVID, J.M. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. *Química Nova*, v.24, p.730-733, 2001.

DIX, S.P.; ANDRIOLE, V.T. Lipid formulations of amphotericin B. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, v. 20, p. 1–23, 2000.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*. v.59, p.459-469, 2010.

ENJALBERT, B.; SMITH, D.A.; CORNELL, M.J.; ALAM, I.; NICHOLLS, S.; BROWN, A.J.; QUINN, J. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, v.17, p.1018–1032, 2006.

FILIPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N.P.; XAVIER, R.M. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. *Revista Brasileira Reumatologia*, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

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

FONTINHA, A.L.D. Determinação da susceptibilidade de *Candida* spp. à Anfotericina B, pelo método da microdiluição. Dissertação em Farmácia, Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2010.

FOSTER, H.D. A role for the antioxidant defense system in preventing the transmission of HIV. *Medical Hypotheses*, v. 69, p.1277–1280, 2007.

GABORIAU, F.; CHÉRON, M.; PETIT, C.; BOLARD, J. Heat induced superaggregation of amphotericin B reduces its in vitro toxicity: a new way to improve its therapeutic index. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. v.41, p. 2345–2351, 1997.

GALATI, E.M.; MONFORTE, M.T.; KIRJAVAINEN, S.; FORESTIERI, A.M.; TROVATO, A.; TRIPODO, M.M. Biological effects of hesperidin - a citrus flavonoid. Part 1. Anti-inflammatory and analgesic activity. *Farmaco*, v.49, p.709–712, 1994.

GERALDO, J.M.; COSTA, J.A.; PRIORE, S.E.; ALFENAS, R.C.G.; FRANCESCHINI, S.C.C. Utilização de biomarcadores inflamatórios para avaliação do estado Nutricional. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v.24, p.40-52, 2009.

GHIASI, M.; AZADNIA, A.; ARABIEH, M.; ZAHEDI, M. Protective effect of rutin (vitamin p) against heme oxidation: A quantum mechanical approach. *Computational and Theoretical Chemistry*, v.996, p.28–36, 2012.

GIL, F.Z.; MALNIC, G. Effect of amphotericin B on renal tubular acidification in the rat. *European Journal of Physiology*, v.413, p.280-286, 1989.

GONG, G.; QIN, Y.; HUANG, W.; ZHOU, S.; YANG, X.; LI, D. Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*, v.628, p.27–35, 2010.

GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; ZARAGOZA, O.; ARGÜELLES, J. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1810, p. 777–783, 2011.

GREEN, L .C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytic. Biochem.*, New York, v.126, n.1 p.131-138, 1982.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3^aed., Clarendon Press: Oxford, 2000.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, v. 97, p. 1634–1658, 2006.

HARADA, T.N. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. Dissertação em Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal do Mato Grosso, Campo Grande, 2009.

HARTSEL, S.C.; BAAS, B.; BAUER, E.; FOREE, L.T.; KINDT, K.; PREIS, H.; SCOTT, A.; KWONG, E.H.; RAMASWAMY, M.; WASAN, K.M. Heat induced superaggregation of amphotericin B modifies its interaction with serum proteins and lipoproteins and stimulation of TNF- α . *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.90, p.124–133, 2001.

HU, H.; FORSEY, R.J.; BLADES, T.J.; BARRATT, E.J.; PARMAR, P.; POWELL, J.R. Antioxidants may contribute in the fight against ageing: an in vitro model. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 121, p. 217–230, 2000.

INSELMANN, G.; INSELMANN, U.; HEIDEMANN, H.T. Amphotericin B and liver function. *European Journal of Internal Medicine*, v. 13, p. 288–292, 2002.

JABS, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology*, v.57, p.231–245, 1999.

JAIN, M.; PARMAR, H.S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflammation Research*, v.60, p.483-491, 2011.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A.K.; RYCHLY, D.J.; ERGUI, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, v. 4, n.5, p.1-11, 2005.

JOVANOVIC, S. V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC, B.; SIMIC, M.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, v.116, p.4846–4851, 1994.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, v. 21, p.130-132, 1984.

KAMARAJ, S.; ANANDAKUMAR, P.; JAGAN, S.; RAMAKRISHNAN, G.; DEVAKI, T. Hesperidin attenuates mitochondrial dysfunction during benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v.25, p. 91–98, 2011.

KAPLOWITZ, N. Mechanisms of liver cell injury. *Journal of Hepatology*, v.32, p.39–47, 2000.

KARLOWKY, J.A.; HOBAN, D.J.; ZHANEL, G.G.; GOLDSTEIN, B.P. In vitro interactions of anidulafungin with azole antifungals, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida* species. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.27, p.174–177, 2006.

KAUR, G.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity. *Toxicology*, v.226, p.152–160, 2006.

KENNEDY, A.L.; WASAN, K.M.. Preferential distribution of amphotericin B lipid complex into human HDL(3) is a consequence of high density lipoprotein coat lipid content. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.88, p.1149–1155, 1999.

KHALIL, O.A.K.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; VELLOSA, J.C.R.; QUADROS, A.U.; DALPOSSO, L.M.; KARAM, T.K.; MAINARDES, R.M.; KHALIL, N.M. Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid. *Food Chemistry*, v.133, p. 1001–1005, 2012.

KHALIL, N.M. **Interação das aminas terciárias nicotina, quinina, ranitidina e trimetilamina com o Ácido Hipocloroso: Efeitos em biomoléculas e sistemas enzimáticos.**

110f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2005.

KHAN, M.A.; OWAIS, M. Toxicity, stability and pharmacokinetics of amphotericin B in immunomodulator tuftsin-bearing liposomes in a murine model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p.125–132, 2006.

KEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.27S, p.S12–S16, 2006.

KOYUNCU, H.; BERKARDA, B.; BAYKUT, F.; SOYBIR, G.; ALATLI, C.; GÜL, H.; ALTUN, M. Preventive effect of hesperidin against inflammation in CD-1 mouse skin caused by tumor promoter. *Anticancer Research*. v.19, p.3237–3242, 1999.

KROLICKI, Z.; LAMER-ZARAWASKA, E. Investigation of antifungal effect of flavonoids. Part 1. *Herb. Pol.* v.30, p.53–57, 1984.

KUDVA, A.K.; MANOJ, M.N.; SWAMY, B.M.; RAMADOSS, C.S. Complexation of amphotericin B and curcumin with serum albumins: solubility and effect on erythrocyte membrane damage. *Journal of Experimental Pharmacology*, v.3, p. 1–6, 2011.

LAMY-FREUND, M.T., FERREIRA, V.F.N.; SCHREIER, S. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, v.38, p.753-757, 1985.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, p. 727–734, 2005.

LOSCALZO, L.M.; YOW, T.T.; WASOWSKI, C.; CHEBIB, M.; MARDER, M. Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglicone, hesperetin, binds to μ -opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 333–341, 2011.

LUE, B.; NIELSEN, N.S.; JACOBSEN, C.; HELLGREN, L.; GUO, Z.; XU, X. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. **Food Chemistry**, v.123, p.221–230, 2010.

MACHADO, P.L.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.; ARAÚJO, M.I.A.S. Immune response mechanisms to infections. **Anais brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.79, n.6, p.647-664, 2004.

MARÍN, F.R.; SOLER-RIVAS, C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. By-products from different Citrus processes as source of customized functional fibres. **Food Chemistry**, v.100, p.736–741, 2007.

Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada (CLSI), Agência nacional da Vigilância Sanitária, Segunda Edição, v.17, n.9, 2002.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 45, p. 31- 4, 1982.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v.65, p.55-63, 1983.

MULLEN, A.B.; CARTER, K.C.; BAILLIE, A.J. Comparison of the efficacies of various formulations of amphotericin B against murine visceral leishmaniosis. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.41, p. 2089–2092, 1997.

NETO, R.J.P.; MACHADO, A.A; CASTRO, G.; QUAGLIO, A.S.S.; MARTINEZ, R. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida - Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v32(1), p.57-61, 1999.

NGUYEN, T.A.; LIU, B.; ZHAO, J.; THOMAS, D.S.; HOOK, J.M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. **Food Chemistry**, v. 136, p.186–192, 2013.

NONES, J.; SAMPAIO E SPOHR, T.C.L.; GOMES, F.C.A. Hesperidin, a Flavone Glycoside, as Mediator of Neuronal Survival. **Neurochemical Research**, 2011.

ODABASI, Z.; KARAALP,A.; CERMIK, H.; MOHR, J.; TIGEN, E.T.; KOC, M.; KORTEN, V. Reduction of Amphotericin B-Induced Renal Tubular Apoptosis by N-Acetylcysteine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.3100-3102, 2009.

OKAMOTO, Y.; AOKI, S.; MATAGA, I. Enhancement of amphotericin B activity against *Candida albicans* by superoxide radical. **Mycopathologia**, v.158, p.9–15, 2004.

OSAKA, K.; RITOV, V.B.; BERNARDO, J.F., BRANCH, RA; KAGAN, V.E. Free (but not cholesterol-bound) amphotericin B protects cis-parinaric acid against peroxyl radical-induced oxidation: Amphotericin B as an antioxidant. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.41, p. 743-747, 1997A.

OSAKA, K.; TYURINA, Y.Y.; DUBEY, R.K.; TYURIN, V.A.; RITOV, V.B.; QUINN, P.J.; BRANCH, R.A.; KAGAN, V.E. Amphotericin B as an Intracellular Antioxidant. Protection against 2,2' - azobis (2,4 – dimethylvaleronitrile) – induced peroxidation of membrane phospholipids in rat aortic smooth muscle cells. **Biochemical Pharmacology**, v.54, p. 937-945, 1997B.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, p. 194–205, 2008.

PALACIOS, D.S.; ANDERSON, T.M.; BURKER, M.D. A post-PKS oxidation of the amphotericin B skeleton predicted to be critical for the channel formation is not required for potent antifungal activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p.13804–13805, 2007.

PANZA, J. A.; CASINO, P.R.; KILCOYNE, C.M.; QUYYUMI, A.A. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. **Circulation**, v.87, p.1468-1474, 1993.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n.5, p. 395–400, 2001.

PEIXOTO, D.L.G. **Avaliação da biocompatibilidade da anfotericina B em duas formulações: livre e associada com nanopartículas magnéticas**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C.R. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, v.299, p. 379-389, 1999.

PICKELMANN, S.; NOLTE, D.; LEIDERER, R.; MÖLLMANN, M.; SCHÜTZE, E.; MESSMER, K. Effects of the phlebotropic drug Daflon 500 mg on postischemic reperfusion injury in striated skin muscle: A histomorphologic study in the hamster. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.134, n.5, p.536-546, 1999.

PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A.; BURIHAN, E.(editores). **Angiologia e cirurgia vascular: Guia ilustrado**. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA. 2003. Disponível em: <http://www.lava.med.br/livro>, acessado em 25 de setembro de 2011.

POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.20, p.332–340, 2009.

PRADEEP, K.; PARK, S. H.; KO, K. C. Hesperidin a flavanoglycone protects against γ -irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague–Dawley rats. **European Journal of Pharmacology**, v.587, p.273–280, 2008.

RAMFUL, D.; BAHORUN, T.; BOURDON, E.; TARNUS, E.; ARUOMA, O.I. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. **Toxicology**, v.278, p. 75–87, 2010.

RAINEY-SMITH, S.; SCHROETKE, L.W.; BAHIA, P.; FAHMI, A.; SKILTON, R.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C.; RATTRAY, M.; WILLIAMS, R.J. Neuroprotective effects of hesperetin in mouse primary neurones are independent of CREB activation. **Neuroscience Letters**, v.438, p.29–33, 2008.

SABRA, R.; TAKAHASHI, K.; BRANCH, R.A.; BADR, K.F. Mechanisms of Amphotericin B-Induced Reduction of the Glomerular Filtration Rate: A Micropuncture Study. **The journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, v. 253, p.34-37, 1990.

SOARES, J. R.; DINIS, T. C.; CUNHA, A. P.; ALMEIDA, L. M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v. 26, p.469-478, 1997.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **Journal of Infectious Disease**, v.154, p.76-83, 1986.

SOKOL-ANDERSON, M.; SLIGH JR., J. E.; ELBERG, S.; BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.32, p.702-705, 1988.

SON, H. S.; KIM, H. S.; JU, J. S. Effects of rutin and hesperidin on total cholesterol concentration, transaminase and alkaline phosphatase activity in carbon tetrachloride treated rats. **Hanguk Nonghwa Hakhoe Chi**, v.34, p.318–326, 1991.

SUN, T.; POWERS, J.R.; TANG, J. Loss of rutin and antioxidant activity of asparagus juice caused by a pectolytic enzyme preparation from *Aspergillus niger*. **Food Chemistry**, v.105, p.173–178, 2007.

TANAKA, T.; MAKITA, H.; OHNISHI, M.; MORI, H.; SATOH, K.; HARA, A.; SUMIDA, T.; FUKUTANI, K.; TANAKA, T.; OGAWA, H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. **Cancer Research**, v.57, p.246–252, 1997.

VAN ACKER, F. A.; SCHOUTEN, O.; HAENEN, G.R.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. Flavanoid can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. **FEBS Letters**, v.473, p.145–148, 2000.

VAN ETEN, E.W.M.; VAN VIANEN, W.; ROOVERS, P.; FREDERIK, P. Mild heating of amphotericin B desoxycholate: effects on ultra-structure, in vitro activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 44, p. 1598–1603, 2000.

VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; KHALIL, N.M.; SANTOS, V.A.F.F.M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Profile of Maytenus aquifolium action over free radicals and reactive oxygen species. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p.447-453, 2007.

VELLOSA, J.C.R. **Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de Pterogyne nitens Tulasne (Fabaceae) em processos oxidativos: sistema modelo “químicos”, “enzimáticos” e “celulares”**. Tese de doutorado em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2008.

VELLOSA, J.C.R. ; KHALIL, N.M.; GUTIERRES, V.O.; SANTOS, V.A.F.F.M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M. Salacia campestris Root Bark Extract: Peroxidase Inhibition, Antioxidant and Antiradical Profile. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p.99-107, 2009.

VOLPATO, G.T.; DAMASCENO, D.C.; MIRANDA, M.R.F.; SABBAG FILHO, D.; CALDERON, I.M.P.; RUDGE, M.V.C. Mixture of vitamin C, hesperidin and piperidol exposure in pregnancy: maternal-fetal repercussions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

WALEV, I.; BHAKDI, S. Possible Reason for Preferential Damage to Renal Tubular Epithelial Cells Evoked by Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p. 1116–1120, 1996.

WASAN, K.M.; MORTON, R.E.; ROSENBLUM, M.G.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Decreased toxicity of liposomal amphotericin B due to association of amphotericin B with high-density lipoproteins: role of lipid transfer protein. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.83, p.1006–1010, 1994.

WILSON,E.; THORSON, L.; SPEERT,D.P. Enhancement of Macrophage Superoxide Anion Production by Amphotericin B. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.35, n.5, p. 796-800, 1991.

ÜNLÜ, A.; SUCU, N.; TAMER, L.; COSKUN, B.; YÜCEBILGIC, G.; ERCAN, B.; GÜL, A.; DIKMENGİL, M.; ATIK, U. Effects of Daflon on oxidative stress induced by hindlimb ischemia/reperfusion. **Pharmacological Research**, v.48, p.11-15, 2003.

YAMAMOTO, M.; SUZUKI, A.; JOKURA, I.; YAMAMOTO, N.; HASE, T. Glucosyl hesperidin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Nutrition**, v.24, p.470–476, 2008.

YANG, M.; TANAKA, T.; HIROSE, Y.; DEGUCHI, T.; MORI, H.; KAWADA, Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. **International Journal of Cancer**, v.73, p.719–724, 1997.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT**, v.41, p.1060–1066, 2008.

ZALBA, G.; BEAUMONT, F.J.; SAN JOSÉ, G.; FORTUÑO, A.; FORTUÑO, M.A.; ETAYO, J.C.; DÍEZ, J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 35, p.1055-1061, 2000.

ZARAGOZA, A.; DÍEZ-FERNÁNDEZ, C.; ALVAREZ, A.M.; ANDRÉS, D.; CASCALES, M. Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidant defense system gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1496 p. 183-195, 2000.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ação de xenobióticos sobre eritrócitos e hemólise provocada por radicais livres

Pesquisador: JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07588412.1.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 190.375

Data da Relatoria: 04/02/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto versa sobre a pesquisa das ações de produtos naturais tais como extratos vegetais e substâncias isoladas, bem como alguns xenobióticos de interesse, como a anfotericina B, sobre eritrócitos e os processos de destruição de hemácias por radicais livres. A atividade antioxidante de compostos de plantas deve-se às suas propriedades REDOX e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de neutralizar os radicais livres. Espera-se que os produtos estudados apresentem ação protetora contra a hemólise provocada por radicais livres e que estes ainda não apresentem ação hemolítica intrínseca. Neste caso busca-se maior embasamento para justificar um possível uso de produtos naturais, associados aos xenobióticos mencionados, em terapias antioxidantes e antiradicais livres.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar as ações de diferentes produtos naturais (hesperidina e rutina), extratos (*Psychotria nuda* (Rubiaceae)) e xenobióticos (anfotericina B), associados ou não, sobre a hemólise causada por radicais livres.

Objetivo Secundário:

Definir se as amostras apresentam ação hemolítica; Definir se as amostras interferem na hemólise provocada por radicais livres (modelo AAPH).

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro:

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108

Fax: (42-)3220-3102

E-mail: secccep@uepg.br

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Desconforto mínimo para retirada de sangue utilizando somente material descartável. Risco mínimo e possibilidade de estudar os efeitos de produtos naturais em células humanas. Material descartável para a coleta (seringa, agulha, luvas e tubos) protegendo o manipulador e o voluntário.

Durante a manipulação das amostras será utilizado luvas descartáveis para evitar o contato com o sangue. Os extratos vegetais, os produtos naturais e o xenobiótico utilizado na pesquisa não apresentam riscos ao manipulador.

Benefícios:

É muito difundido atualmente o uso de plantas e produtos naturais em diferentes terapias. Neste caso busca-se maior embasamento para justificar um possível uso de compostos isolados de plantas em terapias antioxidantes e anti-radicais livres. Ou então, caso o resultado seja a exacerbação da hemólise pelos compostos testados, mostrar o risco do uso dos mesmos em terapias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Após a inclusão das recomendações e correção das inadequações o projeto tem pertinência e há possibilidade de execução. Somente há necessidade de alterar as datas do cronograma de execução. O correto é iniciar após a aprovação da COEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi corrigido e está de acordo.

Recomendações:

Há necessidade de alterar as datas do cronograma de execução. O correto é iniciar após a aprovação da COEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Há necessidade de alterar as datas do cronograma de execução. O correto é iniciar após a aprovação da COEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro:

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108

Fax: (42-)3220-3102

E-mail: seccoop@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PONTA GROSSA, 30 de Janeiro de 2013

Assinador por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro: CEP: 84.030-900

UF: PR Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108 Fax: (42-)3220-3102 E-mail: seccoop@uepg.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 23/2012

Protocolo UEPG – 13926/2012

Título – “Projeto de Pesquisa intitulado Estudo da associação entre hesperidina e anfotericina em danos hepáticos e renal e nas oxidações bioquímicas”.

Interessado – Prof. José Carlos Rebuglio Velloso

Data de Entrada – 24/09/2012

Resultado: Aprovado

**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
23/09/2014**

Considerações

Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 35 ratos Wistar.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.

Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG