

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IZABELA MANSUR ALVES

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR E EFICÁCIA DE UMA
NANOEMULSÃO CONTENDO ANFOTERICINA B PARA O TRATAMENTO
EXPERIMENTAL DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Belo Horizonte – MG

2018

IZABELA MANSUR ALVES

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR E EFICÁCIA DE UMA
NANOEMULSÃO CONTENDO ANFOTERICINA B PARA O TRATAMENTO
EXPERIMENTAL DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Dissertação apresentada por Izabela Mansur Alves
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Minas Gerais como parte
dos pré-requisito para obtenção do grau de mestra
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira
Coorientadores: Prof^a Dr^a Marta Marques Gontijo de
Aguiar

Prof. Dr. Christian Fernandes

Belo Horizonte – MG

2018



FOLHA DE APROVAÇÃO

**AValiação DA ESTABILIDADE E EFICÁCIA DE UMA NANOEMULSÃO
CONTENDO ANFOTERICINA B PARA O TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

IZABELA MANSUR ALVES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Lucas A. M. Ferreira

Prof. Lucas Antônio Miranda Ferreira - Orientador
UFMG

Marta M. Gontijo de Aguiar
Profa. Marta Marques Gontijo de Aguiar - Coorientadora
UFMG

Christian Fernandes
Prof. Christian Fernandes - Coorientador
UFMG

Mônica Cristina de Oliveira
Profa. Mônica Cristina de Oliveira
UFMG

Eliane de Moraes Teixeira
Dra. Eliane de Moraes Teixeira
Fiocruz

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.

COLABORADORES

Naialy Fernandes Araújo – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

Professor Dr. André Luís Branco de Barros – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

Professora Dra. Délia Chaves Moreira dos Santos – Departamento de Farmácia e Nutrição – Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde – Universidade Federal do Espírito Santo.

Professor Dr. Frédéric Jean Georges Frézard – Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.

Dr. Arshad Islam – Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.

Dedico este trabalho a todos, sejam humanos ou animais, que padecem/padeceram dos males das doenças negligenciadas, especialmente das leishmanioses, com destaque para aqueles cujas vidas possibilitaram este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram durante o período do mestrado e ao longo da minha vida.

Ao meu orientador Professor Lucas Ferreira, por, mais uma vez, ter me recebido prontamente, mesmo com minhas limitações de horário. Obrigada pelo exemplo profissional, por se fazer presente durante todo esse trabalho e por buscar, constantemente, formas de torná-lo melhor.

À minha co-orientadora, Professora Marta Gontijo, pela contribuição em diversos aspectos deste trabalho. Agradeço ainda pelo interesse, paciência, conselhos e por tentar me manter calma nas horas de maior ansiedade. Sua ajuda foi indispensável para este trabalho.

Ao Professor Christian Fernandes, por ter aceitado a co-orientação que tanto acrescentou a este trabalho. Muito obrigada por todo o suporte prestado.

Ao Professor Frézard pela colaboração e recepção em seu laboratório; e ao Islam pelo auxílio e horas gastas nos nossos experimentos.

À Naialy, pela paciência e atenção sempre que precisei de direcionamento.

Aos professores do LTF, pela convivência sadia e ensinamentos constantes.

Ao Professor André, que se mostrou disponível sempre que necessário, mesmo quando aos sábados, domingos e feriados.

A todos os colegas do LTF pelo conhecimento compartilhado, companheirismo e boa vontade em ajudar. Obrigada pelo convívio agradável e enriquecedor.

À Délia, pela participação constante neste trabalho, mesmo distante.

À Lorena, Brenda, Larissa e Raphaela pelo auxílio e oportunidade de aprendizado.

Ao Batista e à Adelaide, que sempre me recebiam com sorriso no rosto durante às várias idas ao biotério; aos técnicos do LTF por toda assistência prestada; e ao Marton, por se mostrar atencioso ao prestar informações sobre o programa de pós-graduação.

Aos amigos que souberam compreender esse momento da minha vida e se fazer presentes de alguma forma.

Às colegas de trabalho na Secretaria de Saúde/Vigilância Sanitária de Matozinhos, por compreenderem minhas limitações durante este período; e à Marsileidy, por facilitar e até tornar possível essa jornada.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela presença e preocupação constantes, por sempre encontrarem meios de ajudar. Obrigada por serem parte da minha vida, meus exemplos, meus suportes nas mais diversas formas. Vocês são especiais demais para mim.

Aos meus irmãos, pelo amor, carinho, compreensão e ligação inabalável. Agradeço muito por nossa família e por ter vocês comigo.

Ao Marcone, por ser meu melhor amigo, meu companheiro; por incentivar e demonstrar entusiasmo por essa minha escolha; pelo interesse em conhecer este trabalho; por buscar me ajudar de todas as formas; por suportar com carinho e ouvir com paciência minhas frustrações, tristezas e desabafos em cada etapa. Obrigada pela confiança, por tornar meus dias mais leves, por me dar forças para prosseguir e por fazer de mim uma pessoa melhor. Agradeço muito por fazer parte da minha vida.

À minha avó Marina, por encher meus dias com sua luz. À Natália, minha amiga-irmã, pela lembrança acolhedora, pelo exemplo de força e alegria. À minha família, pelo apoio e carinho.

À Deus, por me dar força e tranquilidade nos momentos mais difíceis dessa e de várias outras caminhadas.

“Todas as outras ciências são nocivas a quem não possui a ciência da bondade”.
(Montaigne)

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”
(Julio Verne)

RESUMO

A anfotericina B (AmB), fármaco segunda escolha no tratamento da leishmaniose, está associada a elevada incidência de reações adversas quando administrada na forma convencional, Anforicin®. As nanoemulsões (NE) são consideradas alternativas atraentes para reduzir essa toxicidade. Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade de uma NE contendo AmB (NE-AmB) e avaliar sua eficácia no tratamento experimental da leishmaniose tegumentar. Os seguintes parâmetros foram avaliados no estudo de estabilidade (4 °C): teor total, teor de encapsulação (TE), diâmetro de glóbulo, potencial zeta e estado de agregação da AmB (por espectroscopia UV-Visível e dicroísmo circular). Estudo de hemólise *in vitro* em células sanguíneas vermelhas de coelho foi conduzido, comparando a NE-AmB com o Anforicin®. A eficácia da NE-AmB foi avaliada em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) major* divididos nos seguintes grupos: Anforicin® (1 mg/kg) e NE-AmB (1; 4; ou 8 mg/kg/dia) administrados, por via endovenosa, em cinco dias alternados. Após o fim do tratamento foram avaliados a carga parasitária (lesão e baço) e o tamanho da lesão. O método analítico foi otimizado e validado, atendendo as especificações preconizadas e sendo capaz de promover a separação da AmB dos seus produtos de degradação alcalina. A presença do colesterol 0,5% se mostrou fundamental para a estabilidade da formulação e manutenção da AmB na forma monomérica. O estudo de estabilidade indicou que a NE-AmB 0,5% colesterol é estável, com valores de teor e TE acima de 90% e ligeiro aumento de tamanho, após 180 dias. Ademais, a NE não demonstrou presença de espécies agregadas mesmo após 260 dias de estabilidade. A atividade hemolítica *in vitro* do Anforicin® foi significativamente maior do que aquela observada para a NE-AmB, mesmo daquela mantida em estabilidade por 180 dias ($p < 0,05$). O estudo *in vivo* mostrou que a NE-AmB na dose de 8 mg/kg/dia foi capaz de estabilizar o tamanho da lesão e reduzir a carga parasitária no baço em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), entretanto, não houve redução significativa da carga parasitária na lesão ($p > 0,05$). Já o Anforicin® não mostrou eficácia em nenhum dos parâmetros avaliados ($p > 0,05$), em relação ao grupo controle. Esses dados indicam o potencial das NE para o carreamento da AmB no tratamento parenteral da leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Nanoemulsão. Anfotericina B. Leishmaniose tegumentar. Estabilidade. Colesterol. Atividade em modelo animal.

ABSTRACT

Amphotericin B (AmB), second line drug on leishmaniasis treatment, has been associated with high adverse reaction incidence. Nanoemulsions (NE) are an attractive alternative since they are capable of reducing the drug's toxicity. Therefore, this study aimed to evaluate the preliminary stability of a previously described AmB-loaded NE (NE-AmB) and evaluate its efficacy on an experimental treatment for cutaneous leishmaniasis. The following parameters were evaluated by an NE-AmB stability study (4 °C): total content determination, encapsulation efficiency (EE), particle size, zeta potential and AmB aggregation state (measured by UV-Visible spectroscopy and circular dichroism). The NE-AmB capacity to induce *in vitro* hemolysis of rabbit red blood cells was also evaluated, in comparison to Anfotericin[®]. Finally, the NE-AmB activity on BALB/c mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* was evaluated on the following groups: Anfotericin[®] (1 mg/kg) and NE-AmB (1; 4; or 8 mg/kg/day), intravenously administered in five alternate days. After the end of the treatment, the parasitic load (lesion and spleen) and the lesion size were evaluated. The analytic method was optimized and validated, meeting the recommended specifications and furthermore being able to promote the separation between the AmB from its alkaline degradation products. The 0.5% cholesterol was fundamental to the formulation stability and to the maintenance of the AmB monomeric form. The stability study shows that NE-AmB 0.5% cholesterol is stable, with total content and EE above 90% and a slight increase in size, keeping the appropriate parameters for intravenous administration during the 180 days of evaluation. In addition, the formulation does not show aggregate species even after 260 days of stability. The Anfotericin[®] *in vitro* hemolytic activity was significantly higher than that which can be observed for the NE-AmB with maintained stability during the 180 days ($p < 0.05$). The *in vivo* study shows that the 8 mg/kg/day dosage of NE-AmB was capable of stabilizing the lesion size and reducing the parasitic load on the spleen in comparison to the control group ($p < 0.05$), however, there was no significant parasitic load reduction on the lesion ($p < 0.05$). On the other hand, Anfotericin[®] shows no activity on neither of the evaluated parameters ($p > 0.05$) in comparison to the control group. Hence, the results found in this study indicates the NE potential on AmB transportation for the parenteral treatment of cutaneous leishmaniasis. **Key-words:** Nanoemulsion. Amphotericin B. Cutaneous leishmaniasis. Stability. Cholesterol. Activity in animal model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fêmea de flebotomíneo da espécie <i>Phlebotomus papatasi</i>.	21
Figura 2 –	(A) <i>Leishmania</i> – forma amastigota. (B) <i>Leishmania</i> – forma promastigota.	21
Figura 3 –	Ciclo de vida simplificado da <i>Leishmania</i>.	22
Figura 4 –	Situação endêmica da LT no mundo.....	24
Figura 5 –	Aspecto inicial inespecífico da LC.	25
Figura 6 –	Lesões (A) papulonodular e (B) ulcerada da LCL.	26
Figura 7 –	Fórmula estrutural da AmB	30
Figura 8 –	Representação esquemática de NE O/A, estabilizada por meio de fosfolípides na interface, contendo moléculas do fármaco (pontos vermelhos).....	38
Figura 9 –	Ilustração do preparo da NE.....	44
Figura 10 –	Diâmetro médio das lesões desenvolvidas em animais infectados com <i>L. (L.) major</i>. (A): maior entre duas bordas. (B): linha que corta (A) com ângulo de 90°.	56
Figura 11 –	Sobreposição de perfis cromatográficos para análise da seletividade do método.	61
Figura 12 –	Sobreposição dos perfis cromatográficos do padrão daAmB e da NE-AmB....	61
Figura 13 –	Espectro de absorção no UV do cromatograma relativo ao padrão da AmB em dois ângulos: (A) frontal; (B) inclinado.....	62
Figura 14 –	Espectro de absorção no UV do cromatograma relativo à NE-AmB em dois ângulos: (A) frontal; (B) inclinado	63
Figura 15 –	Cromatogramas do padrão de AmB submetido à degradação alcalina (NaOH 0,2 mol/L) por 30 e 180 minutos sobrepostos ao da AmB não exposta.	64
Figura 16 –	Curva analítica média, gerada a partir de três replicatas, para avaliação da linearidade do método de doseamento de AmB por CLAE.	66
Figura 17 –	Espectro UV-vis das NE-AmB nas diferentes concentrações de colesterol: 0%, 0,25% e 0,5%.	69
Figura 18 –	Espectro de DC das NE-AmB nas diferentes concentrações de colesterol: 0%, 0,25% e 0,5%.	69
Figura 19 –	NE-AmB 0% Chol após um dia de preparo.	72
Figura 20 –	NE-AmB 0,5% Chol (à esquerda) e NE-AmB 0,25% Chol (à direita) após 120 dias de estabilidade.	73

Figura 21 – Espectro UV-visível da NE-AmB nos tempos zero (T0) e 260 dias (T260), em comparação com o Anforicin® e solução aquosa da AmB.....	77
Figura 22 – Espectro de DC da NE-AmB nos tempos zero (T0) e 260 dias (T260), em comparação com o Anforicin® e solução aquosa da AmB.....	77
Figura 23 – Atividade hemolítica das formulações de AmB: NE-AmB nos tempos zero e 180 dias e Anforicin® (n=3).	79
Figura 24 – Avaliação da eficácia (% de aumento da lesão considerando-se o valor inicial) da NE-AmB em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) major</i>.	81
Figura 25 – Avaliação da eficácia (carga parasitária na lesão) da NE-AmB em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) major</i>.....	82
Figura 26 – Avaliação da eficácia (carga parasitária no baço) da NE-AmB em camundongos BALB/c infectados na base da cauda com <i>L. (L.) major</i>.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Exemplos de espécies de <i>Leishmania</i> que causam doenças em humanos.....	20
Tabela 2 –	Modificações propostas para otimização das condições cromatográficas do método analítico para o doseamento de AmB por CLAE.....	48
Tabela 3 –	Parâmetros modificados para a avaliação da robustez do método de doseamento de AmB por CLAE.	52
Tabela 4 –	Resultados obtidos com as diferentes proporções SO:EDTA da fase móvel ...	59
Tabela 5 –	Condições cromatográficas do método analítico para o doseamento de AmB por CLAE.....	60
Tabela 6 –	Porcentagem de AmB e seus produtos de degradação pelo tempo de exposição ao meio alcalino (NaOH 0,2 mol/L).	65
Tabela 7 –	Valores de área e DPR estimados para precisão intra-corrida e inter-corridas de método de doseamento de AmB por CLAE (n=3).	66
Tabela 8 –	Porcentagem de recuperação de AmB adicionada ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento por CLAE (n=3).....	67
Tabela 9 –	Teores de AmB obtidos com as variações dos parâmetros para o teste de robustez do método de doseamento por CLAE (n=3).....	68
Tabela 10 –	Estabilidade à 4° C das NE-AmB nas diferentes concentrações de colesterol: 0%, 0,25% e 0,5% (n=3).	72
Tabela 11 –	Estabilidade à 4° C das NE-AmB nas diferentes concentrações de colesterol (0,25% e 0,5%) adotando-se agitação mais branda anterior à amostragem (n=3).	74
Tabela 12 –	Estabilidade à 4° C da NE-AmB preparada utilizando-se o HAP (n = 3).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
°C	Graus Celsius
™	Marca comercial
®	Marca registrada
μ	Micro
%	Porcentagem
AmB	Anfotericina B
AmB-D	Complexo micelar da AmB com desoxicolato de sódio
ANOVA	Análise de variância
A/O	Água em óleo
ASC	Área sob a curva
BHT	Hidroxibutiltolueno
C ₁₈	Octadecilsilano
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
DME	Dose média efetiva
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fase aquosa
FM	Fase móvel
FO	Fase oleosa
G	Força gravitacional
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IM	Intramuscular
IP	Índice de polidispersão
IV	Intravenoso

kg	Kilograma
L.	Leishmania
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
Mdeg	Millidegrees
mg	Miligrama
min.	Minuto
mL	Mililitro
mV	Milivolt
NE	Nanoemulsão
NE-Amb	Nanoemulsão contendo anfotericina B
nm	Nanômetro
O/A	Óleo em água
OMS	Organização Mundial de Saúde
Oxy-hb	Hemoglobina oxigenada
NaOH	Hidróxido de sódio
P	Probabilidade de significância
PD	Produto de degradação
PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial hidrogeniônico
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-calazar
q.s.p	Quantidade suficiente para
R	Coeficiente de correlação
R ²	Coeficiente de determinação
RE	Resolução
rpm	Rotações por minuto
Sb ⁺⁵	Íon antimonial pentavalente
SA	Solvente aquoso
SFB	Soro fetal bovino

SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SO	Solvente orgânico
TE	Teor de encapsulação
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Leishmanioses	19
2.1.1	Etiologia	19
2.1.2	Influência de fatores do hospedeiro na evolução da doença	22
2.1.3	Leishmaniose Tegumentar	24
2.1.4	Leishmaniose Visceral	27
2.1.5	Tratamento das Leishmanioses	28
2.2	Anfotericina B (AmB).....	30
2.2.1	Sistemas Lipídicos contendo AmB.....	32
2.2.2	Nanoemulsão (NE).....	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral	42
3.2	Objetivos Específicos.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	Materiais	43
4.2	Métodos	43
4.2.1	Preparo da nanoemulsão.....	43
4.2.2	Caracterização das nanoemulsões	45
4.2.3	Otimização do método analítico.....	47
4.2.4	Validação do método analítico	48
4.2.5	Avaliação da influência do colesterol na NE.....	53
4.2.6	Estudo de estabilidade das nanoemulsões.....	54
4.2.7	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da NE-AmB.....	55
4.2.8	Análise Estatística	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59

5.1 Otimização do método analítico	59
5.2 Validação do método analítico	60
5.2.1 Seletividade.....	60
5.2.2 Linearidade.....	65
5.2.3 Precisão.....	66
5.2.4 Exatidão.....	67
5.2.5 Robustez	67
5.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação	68
5.3 Avaliação da influência do colesterol na formulação.....	68
5.4 Estudo de estabilidade das nanoemulsões.....	75
5.5 Avaliação da eficácia in vivo da NE-AmB	80
6 CONCLUSÃO.....	85

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um complexo de doenças parasitárias, causadas por protozoários, que têm amplo espectro de manifestações clínicas. A terapia de primeira escolha se baseia na utilização de antimoniais pentavalentes como o estibogluconato de sódio (Pentostam®) ou antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). Os índices de cura são altos, no entanto, o tratamento antimonial é acompanhado por alguns inconvenientes relacionados às reações adversas relativamente frequentes (GOTO & LINDOSO, 2010; MURRAY *et al.*, 2005; SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2013).

A anfotericina B (AmB) é considerada um dos fármacos mais potentes no tratamento da leishmaniose visceral, com taxas curas de aproximadamente 100% para a leishmaniose visceral (BERMAN, 2005; DAVIDSON, 2005). É indicada como segunda linha de tratamento, especialmente nos casos de resistência ou pacientes não responsivos à terapia antimonial, e como fármaco de escolha para pacientes portadores do HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015 e 2017; YARDLEY & CROFT, 1997). Entretanto, quando administrada na forma convencional (complexo de AmB com desoxicolato de sódio) por via intravenosa, não é bem tolerada, estando associada a elevada incidência de reações adversas. A disfunção renal é normalmente observada, ainda que em grau variável e dose-dependente, e, em casos extremos, a nefrotoxicidade e hemólise severas exigem a interrupção do tratamento (JAIN *et al.*, 2012; SHADKAN *et al.*, 1997).

Com o objetivo de reduzir essa toxicidade, foram desenvolvidas formulações lipídicas, com destaque para a forma lipossomal. Embora estas formulações tenham demonstrado boa eficácia contra a leishmaniose visceral e estejam relacionadas a menores incidências de reações adversas, ainda apresentam custo de produção muito alto (ALVAR *et al.*, 2008; MOHAMED-AHMED *et al.*, 2012; SUNDAR *et al.*, 2008; TIUMAN *et al.*, 2011; VANLERBERGH *et al.*, 2007).

As nanoemulsões (NE) têm sido utilizadas há anos na nutrição parenteral e como carreadora de fármacos lipofílicos devido à sua biocompatibilidade. São sistemas que apresentam vantagens em relação a outros nanocarreadores, por serem de tecnologia relativamente simples e baixo custo do ponto de vista de produção.

Ademais, apresentam potencial para reduzir a citotoxicidade dos fármacos e de protegê-los da hidrólise e degradação enzimática em condições fisiológicas (AKHTER, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2011).

O uso de NE para o carreamento da AmB vem sendo descrito na literatura como uma alternativa atrativa para o tratamento das leishmanioses (CALDEIRA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2012). Recentemente, uma formulação de NE contendo AmB (NE-AmB) foi comparada com a forma convencional de desoxicolato em relação à sua toxicidade e eficácia no tratamento de animais infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Os resultados foram bastante promissores, indicando a possibilidade da administração endovenosa de maiores doses de AmB, com redução significativa da carga parasitária e sem o aparecimento de sinais de toxicidade aguda (SANTOS *et al.*, 2017).

O presente trabalho se insere nesse contexto, com a proposta de caracterizar a NE relatada por Santos e colaboradores (2017) durante seu período de estabilidade e de avaliar sua eficácia em animais experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) major*, um modelo murino de leishmaniose tegumentar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias negligenciadas com amplo espectro de manifestação clínica e epidemiológica, encontradas em grandes áreas dos trópicos, subtropicais e no sul da Europa (CDC, 2013; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Elas são classificadas em duas formas principais, leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (CARNEIRO *et al.*, 2012).

Consideradas um grande problema de saúde pública, as leishmanioses são zoonoses de notificação compulsória no Brasil com forte associação com a pobreza e à má nutrição, deslocamento populacional, más condições de moradia e de saneamento básico. Fatores ambientais, como urbanização e desmatamento, e mudanças climáticas também influenciam a incidência da doença (OMS, 2016; ALVAR *et al.*, 2006). Dessa forma, o padrão de transmissão, essencialmente silvestre no início, foi alterado devido a modificações socioambientais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2016), 97 países e territórios são endêmicos e casos já foram reportados em outros 4 países. Estima-se a prevalência de 12 milhões de casos no mundo, com 350 milhões de pessoas sob risco de infecção, 700 mil a 1 milhão de novos casos e 200 mil a 300 mil mortes todo ano, entretanto, há evidências de que a incidência é subestimada, especialmente em regiões hiperendêmicas (AMEEN, 2010; ANTINORI *et al.*, 2012; OMS, 2017).

2.1.1 Etiologia

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios das células de mamíferos. Existem ao menos 25 espécies de *Leishmania*, com ampla distribuição geográfica (**Tabela 1**), capazes de infectar mamíferos, incluindo o homem (MATLASHEWSKI, 2001). A doença é transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Europa, África e Ásia), e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (América e Oceania)

(STOCKDALE & NEWTON, 2013). Mais de 90 espécies de flebotomíneos, também conhecidos no Brasil como mosquito-palha (**Figura 1**), são capazes de transmitir os parasitos do gênero *Leishmania*, e, aproximadamente 70 animais, incluindo o homem, podem ser considerados reservatórios naturais deste parasito (OMS, 2017).

Tabela 1 – Exemplos de espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos.

	Manifestação clínica principal	Distribuição geográfica principal
Novo Mundo		
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LCL e LMC	América do Sul, partes da América Central e México
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LCL e LMC	Norte da América do Sul e sul da América Central
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LCL e LMC	América do Sul
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LCL e LCD	América do Sul e América Central
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LCL e LCD	América Central, México e EUA
<i>L. (Leishmania) lainsoni</i>	LCL	América do Sul
Velho Mundo		
<i>L. (Leishmania) major</i>	LCL	Ásia Central, norte da África, Oriente Médio, leste da África
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LCL	Ásia Central, Oriente Médio, partes do norte da África, leste da África
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	LV, LCL	África, Ásia central, sul da Ásia
Velho e Novo Mundo		
<i>L. (Leishmania) infantum</i> ou <i>L. (Leishmania) chagasi</i>	LV	Europa, norte da África, América Central, América do Sul

LCL = Leishmaniose cutânea localizada; LCD = Leishmaniose cutânea difusa; LMC = Leishmaniose mucocutânea; LV = Leishmaniose visceral

Adaptado de MCCALL *et al.* (2013) e REITHINGER *et al.* (2007).

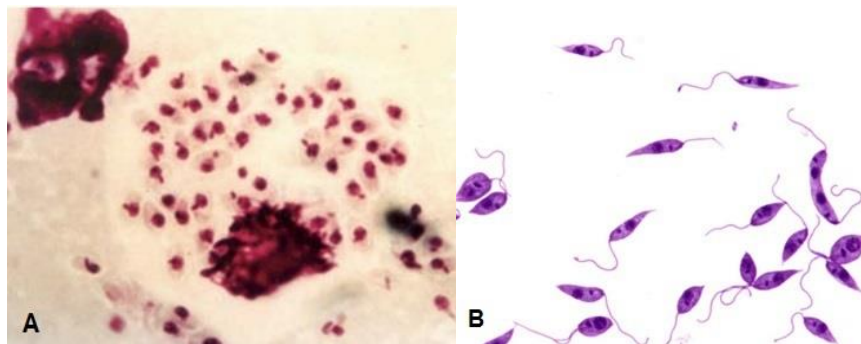
Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo da espécie *Phlebotomus papatasi*.



Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>.

As espécies de *Leishmania* apresentam-se em duas formas evolutivas (**Figura 2**) principais: amastigota, forma intracelular no hospedeiro vertebrado, ovalada e sem flagelo aparente, e a forma promastigota, forma extracelular no vetor, alongada e flagelada (FOGANHOLI & ZAPPA, 2011; GOLENSER & DOMB, 2006; MATLASHEWSKI, 2001; MCCALL *et al.*, 2013).

Figura 2 – (A) *Leishmania* – forma amastigota. (B) *Leishmania* – forma promastigota.

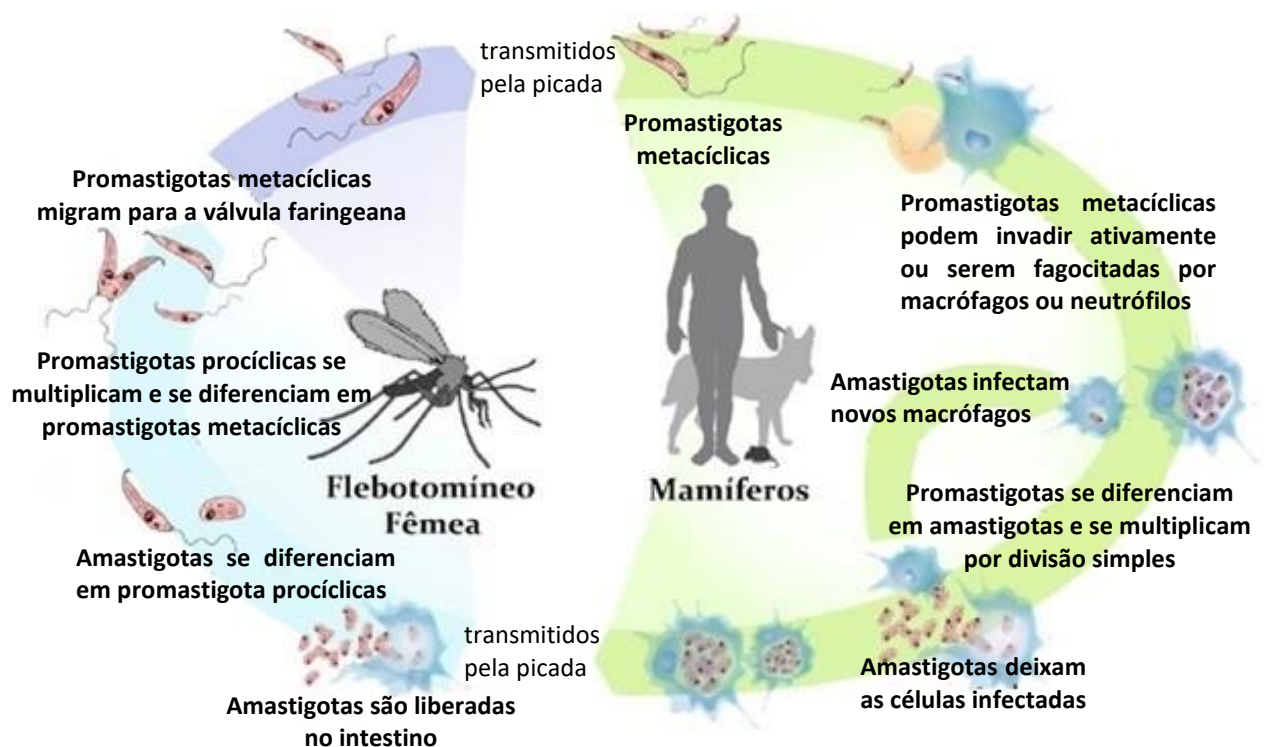


Adaptado de http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_viscerai_canina.html

No ciclo de vida do parasito (**Figura 3**), ao picar um mamífero infectado, o vetor ingere, juntamente com o sangue, células contendo formas amastigotas, especialmente macrófagos. Essas formas são conduzidas à porção anterior do trato digestivo do invertebrado, onde se transformam em promastigotas procíclicos. As formas promastigotas migram, então, para o epitélio do tubo digestivo, onde se multiplicam por divisão binária e se aderem pela região do flagelo. Após a multiplicação, os parasitos migram para a porção anterior trato digestivo, até a válvula estomodeal do

inseto, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas, forma altamente infectiva. Em seguida, essas formas se direcionam à probóscide e são regurgitadas, sendo transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado, como o homem, durante a picada. O parasito pode ser fagocitado por diversas células humanas, infectando-as: os neutrófilos, primeiramente; células dendríticas; e, principalmente, os macrófagos. No interior do vacúolo parasitóforo, as promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas que, por sua vez, se multiplicam por divisão binária. A multiplicação intensa ocasiona o rompimento da membrana do macrófago, liberando os amastigotas que, então, se disseminam pelos sistemas circulatório e linfático e infectam novos monócitos e macrófagos do sistema fagocitário mononuclear (CHAPPUIS *et al.*, 2007; KAYE & SCOTT, 2011; MATLASHEWSKI, 2001).

Figura 3 – Ciclo de vida simplificado da *Leishmania*.



Adaptado de http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_viscerar_canina.html

2.1.2 Influência de fatores do hospedeiro na evolução da doença

O estabelecimento da infecção primária e as diversas manifestações clínicas das leishmanioses são resultado de um conjunto de fatores: espécie de *Leishmania*,

fatores de virulência do vetor, aspectos genéticos do hospedeiro e resposta imunológica aos parasitos (AMEEN, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007).

Cada espécie de *Leishmania* produz um padrão característico da doença, com grau variado de metástase do parasito, por exemplo, a *L. (L.) major* tende a permanecer circunscrita à lesão e órgãos linfáticos, enquanto a *L. (L.) donovani* se dissemina para vários órgãos (MCCALL *et al.*, 2013). Entretanto, além da espécie causadora, a genética e a resposta imune do hospedeiro influenciam a evolução da doença (para uma forma clínica ou para a cura espontânea), a disseminação do parasito (que pode manter-se na pele ou se espalhar para a mucosa e órgãos) e até a resposta ao tratamento (que pode ser completa ou parcial) (DAVIDSON, 2005). Como consequência, a infecção por parasitos *Leishmania* nem sempre resulta em manifestação clínica, apenas uma pequena porção das pessoas infectadas desenvolve a doença. A taxa incidência assintomática por incidência sintomática varia dependendo da região, sendo de 18:1 no Brasil (MCCALL *et al.*, 2013).

O tipo de resposta imune parece ser determinante para a resistência ou a susceptibilidade à infecção, sendo o processo patológico dependente de uma interação complexa de fatores das respostas imune inata e adquirida. De forma simplificada, as células dendríticas e os macrófagos apresentam os antígenos da *Leishmania* para as células T, subdivididas em Th1 e Th2, que medeiam respostas diferentes, de acordo com seu subtipo. Uma resposta imune efetiva, associada à cura clínica e prevenção de recidivas, está relacionada à ativação do macrófago para um estado leishmanicida e é principalmente mediada pelas células Th1 por meio de secreção de citocinas pró-inflamatórias. A resposta Th2, por sua vez, envolve a produção de citocinas anti-inflamatórias, a desativação do macrófago e a redução de citocinas pró-inflamatórias, estando associada à promoção da infecção intracelular. Este tipo de resposta, entretanto, ao contrário da resposta Th1, provavelmente previne a destruição tecidual severa (AMEEN, 2010; DAVIDSON, 2005; REITHINGER *et al.*, 2007).

A evolução inicial da lesão, entretanto, é similar no sítio da picada. Após o período de incubação, que pode variar de algumas semanas a anos (normalmente menor que dois anos), aparece uma pequena pápula ou nódulo eritematoso (**Figura 5**) que cresce de tamanho, podendo ser único ou múltiplos, e algumas vezes precedidos ou acompanhados pelo aumento do linfonodo satélite. Frequentemente, a lesão se transforma em uma úlcera com bordas elevadas, contorno regular e fundo com granulações, recoberta ou não por exsudato sero-purulento (ALMEIDA & SANTOS 2010; GREVELINK & LENER, 1996; GOTO & LINDOSO, 2010; MOORE, 2011).

Figura 5 – Aspecto inicial inespecífico da LC.



Adaptado de AMEEN, 2010.

As formas clínicas principais são a leishmaniose cutânea localizada (LCL); leishmaniose cutânea difusa (LCD); e leishmaniose mucocutânea (LMC). Entretanto, são encontradas ainda a forma cutânea disseminada (LD) e recidiva cútis (GOTO & LINDOSO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; STEVERDING, 2017).

A LCL, também conhecida como leishmaniose cutânea (LC), é a forma mais prevalente da doença, sendo comumente causada por espécies dermatrópicas de *Leishmania*. As lesões (**Figura 6**) normalmente aparecem em áreas expostas do corpo, variam em número e tendem à cura de forma espontânea, podendo, entretanto, deixar cicatrizes suaves. A LCL pode evoluir para outras formas, dependendo da relação de fatores parasito/hospedeiro, conforme descrito previamente (GOLENSER & DOMB, 2006; GOTO & LINDOSO, 2010).

Figura 6 – Lesões (A) papulonodular e (B) ulcerada da LCL.



Adaptado de: (A) AMEEN, 2010; (B) MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017.

A LCD é uma variante rara e grave da LT, caracterizada pela presença de lesões disseminadas, nodulares e não-ulcerativas. Trata-se de condição apresentada por pacientes anérgicos, com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* e que não respondem ou respondem mal aos tratamentos (GOTO & LINDOSO, 2010; GREVELINK & LENER, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A LMC é caracterizada por lesões localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores, podendo causar a destruição, dentre outras, das cavidades oral, nasal e faríngea. Nessa forma, as lesões são potencialmente desfigurantes ao se estenderem para a face. A forma mais comum da LMC é secundária à lesão cutânea, e seu desenvolvimento pode ocorrer vários anos após a cicatrização da lesão inicial. Acredita-se que a LMC esteja associada às lesões cutâneas múltiplas ou grandes, persistentes por períodos maiores que um ano, e às curas espontâneas ou com tratamento inadequado (GOTO & LINDOSO, 2010; GREVELINK & LENER, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As formas de recidivas caracterizam-se pelo desenvolvimento ou ativação de novas lesões no centro ou bordas de lesão já cicatrizada, apresentando resposta terapêutica inferior à da lesão primária. Bastante incomum, a forma cutânea disseminada, por sua vez, é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face. A disseminação das lesões ocorre, possivelmente, pela disseminação dos parasitos

pela corrente sanguínea ou linfática, podendo demorar alguns dias para se manifestar (GREVELINK& LENER, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Cabe ressaltar que os pacientes coinfectados com *Leishmania* e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam lesões atípicas e de espectro variado, máculas, pápulas e úlceras, tanto nas áreas expostas, quanto em áreas não-expostas, como a genital. A evolução da doença nesses pacientes costuma ser acompanhada por falhas terapêuticas e recidivas, necessitando de antirretrovirais de alta atividade. Ademais, existem relatos de disseminação da doença cutânea com envolvimento de órgãos raramente acometidos em indivíduos imunocompetentes, em um processo conhecido como visceralização da LT (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015 e 2017).

2.1.4 Leishmaniose Visceral

A LV é altamente endêmica na Índia e no leste da África, e estima-se que 50 mil a 90 mil novos casos surgem ao redor do mundo por ano. Em 2015, a maioria dos novos casos reportados (mais de 90%) se concentrou em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul. Programas no sudeste da Ásia têm conseguido diminuir o número de casos em três importantes países endêmicos: Bangladesh, Índia e Nepal. As espécies envolvidas na transmissão da LV e sua distribuição geográfica principal estão relacionadas na **Tabela 1**. No Brasil, a espécie de interesse é a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, espécie semelhante à *Leishmania (Leishmania) infantum*, muitas vezes sendo descritas como uma só (OMS, 2017). A LV está distribuída em 21 estados, em todas as 5 regiões do país, sendo observada média anual de 3.454 casos e aumento da sua letalidade, de 3,2% no ano 2000 para 7,1% em 2013 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Também chamada de “calazar” (“febre negra”), a LV é uma doença sistêmica causada pela disseminação do parasito *Leishmania* pelo sangue e sistema retículo endotelial. É fatal se não tratada em mais de 95% dos casos. O período de incubação é variável, geralmente durando de 2 a 6 meses, mas com manifestações aparecendo de 10 dias a até um ano após a exposição. Alguns sintomas comuns tanto no Novo quanto no Velho Mundo incluem febre, anorexia, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza progressiva. A hiperpigmentação, que provavelmente originou o nome “calazar”

(“febre negra”), só foi descrita na Índia e, hoje, se tornou um sintoma incomum (CHAPPUIS *et al.*, 2007; GREVELINK & LENER, 1996; PACE, 2014).

A disseminação dos parasitos induz o acúmulo de células fagocitárias mononucleares nos órgãos invadidos e hiperplasia secundária das células reticulo endoteliais, manifestando-se na clínica principalmente como esplenomegalia e hepatomegalia. Linfonodos aumentados também podem ser observados em algumas regiões do mundo, principalmente no Sudão. A febre geralmente se associa a calafrios e pode ser intermitente. A fadiga e fraqueza são agravadas pela anemia, causada pelo estado inflamatório persistente, hiperplenismo (destruição periférica de eritrócitos no baço inchado) e, algumas vezes, por hemorragia. Com o avanço da doença, a esplenomegalia e hepatomegalia podem aumentar, provocando dor (CHAPPUIS *et al.*, 2007; PACE, 2014).

2.1.5 Tratamento das Leishmanioses

As leishmanioses são doenças tratáveis e passíveis de cura, desde que o indivíduo seja imunocompetente, uma vez que os medicamentos não eliminam o parasito do organismo e a imunossupressão pode resultar em recidivas (OMS, 2017). O tratamento da doença depende de vários fatores, como espécie causadora, forma clínica, estado clínico do paciente, comorbidades existentes e localização geográfica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; MINODIER & PAROLA, 2007; OMS, 2017).

Na LV, a falta de tratamento sistêmico pode resultar em morte. Já na LT, o objetivo do tratamento é acelerar a cura, reduzir o aparecimento de cicatrizes e prevenir a disseminação, as recidivas e a evolução para a forma mucocutânea, especialmente no caso da *L. (V.) braziliensis* (AMEEN, 2010; HEPBURN 2000; MURRAY, 2005). Para a LT, a abordagem pode ser local ou sistêmica, sendo a abordagem local indicada quando não há envolvimento de mucosas ou linfonodos e quando as lesões são responsivas ao tratamento local. Formulações contendo paromomicina, fármaco mais utilizado no tratamento tópico, são consideradas alternativas interessantes para a LC. Modalidades físicas, como crioterapia e aquecimento local por infravermelho, fazem parte dos tratamentos locais utilizados, porém a eficácia é bastante variável (AMEEN, 2010; PACE, 2014; PISCOPO & AZZOPARDI, 2006; TIUMAN *et al.*, 2011).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), desenvolvidos em 1945, são ainda hoje a primeira linha de tratamento das diversas formas de leishmanioses, na maior parte do mundo (TIUMAN *et al.*, 2011). São disponibilizados no mercado nas formas de estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), sendo que no Brasil esta última é a única formulação disponível, distribuída gratuitamente pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; THORNTON *et al.*, 2010).

Os protocolos terapêuticos do Ministério da Saúde (2017) recomendam a administração via intravenosa (IV) ou intramuscular (IM) de 20 mg Sb^{5+} /kg/dia, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias, para a LV. Para a LT é recomendada a aplicação IV ou IM de 20 mg Sb^{5+} /kg/dia, durante 30 dias consecutivos para as formas difusa e mucocutânea, e doses de 10-20 mg Sb^{5+} /kg/dia, durante 20 dias consecutivos para a forma localizada. Aplicações intralesionais de antimoniais pentavalentes também podem ser realizadas para a forma localizada, quando a lesão for única com até 3 cm no seu maior diâmetro.

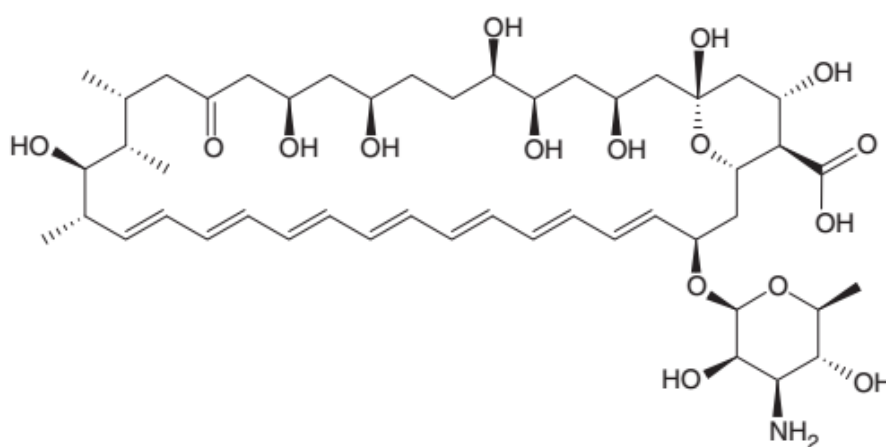
As taxas de cura relatadas para os antimoniais chegam a ser superiores a 90%, no entanto, sua eficácia varia com a região geográfica e espécie de *Leishmania* (MINODIER & PAROLA, 2007; PAVLI & MALTEZOU, 2010; PISCOPO & AZZOPARDI, 2006). Na Índia, o uso indiscriminado resultou no aparecimento de resistência, enquanto casos de falhas terapêuticas têm sido observados em várias outras partes do mundo, chegando a 16% no Brasil (GOTO & LINDOSO, 2010; MALTEZOU, 2009; MURRAY, 2000). Além disso, o tratamento é acompanhado por reações adversas frequentes, como pancreatite, artralgia, mialgia, dor abdominal e náuseas, e por reações severas relacionadas à cardio, nefro e hepatotoxicidade. A toxicidade é ainda maior em portadores do vírus HIV, idosos e gestantes, situação na qual a contraindicação é absoluta devido ao potencial abortivo dos antimoniais (GOTO & LINDOSO, 2010; MURRAY *et al.*, 2005; SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2013).

Nos casos em que os antimoniais são contraindicados ou quando não há resposta satisfatória com o seu uso, agentes alternativos são empregados, como a anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina (SANTOS *et al.*, 2008; PAVLI & MALTEZOU, 2010).

2.2 Anfotericina B (AmB)

A anfotericina B (**Figura 7**) é um antibiótico macrolídeo poliênico, de cor amarelo-alaranjado, extraído de culturas de *Streptomyces nodosus* e isolado pela primeira vez em 1956 (GOLENSER & DOMB, 2006). Inicialmente utilizada para combater infecções fúngicas sistêmicas, também possui atividade antiparasitária e leishmanicida (CARNEIRO *et al.*, 2012; CHATTOPADHYAY & JAFURULLA, 2011).

Figura 7 – Fórmula estrutural da AmB



Adaptado de CARNEIRO, 2012.

Composto anfifílico, a AmB possui características hidrofóbicas, devido à presença de cadeia rígida com sete duplas conjugadas carbono-carbono, e características hidrofílicas, decorrentes dos vários grupos hidroxila. A presença dos grupos ionizáveis amino e carboxílico lhe confere, ainda, propriedades anfotéricas (FOGLIA *et al.*, 2014; GOLENSER & DOMB, 2006). Como consequência dessas características e da distribuição assimétrica entre as porções hidrofóbica e hidrofílica, o fármaco é insolúvel em solventes aquosos e na maioria dos solventes orgânicos. Sua solubilidade em água em pH fisiológico (6 a 7) é inferior a 1 mg/L, sendo solúvel em pH abaixo de 2 ou acima de 11; nessas condições de pH extremo, entretanto, a molécula não é estável (EGITO *et al.*, 2002; LEMKE *et al.*, 2005; TORRADO *et al.*, 2008). A AmB é praticamente insolúvel em etanol, muito levemente solúvel em metanol, levemente solúvel em dimetilformamida e solúvel em dimetilsulfóxido (THE EUROPEAN Pharmacopoeia, 2010).

O mecanismo de ação da AmB é mediado pela sua capacidade de interagir com os esteróis constituintes das membranas celulares: ergosterol, nas células fúngicas e de *Leishmania*, e colesterol, nas células dos mamíferos. A ligação ao ergosterol resulta na formação de poros nas membranas dos parasitos, o que leva ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e, como consequência, morte celular do microrganismo. Grande parte dos efeitos tóxicos causados pelo fármaco, entretanto, provem da sua interação com o colesterol nas membranas do hospedeiro; a maior afinidade pelo ergosterol, em comparação ao colesterol, é o que permite seu uso clínico como antibiótico (GOLENSER & DOMB, 2006; LENIADO-LABORÍN & CABRALES-VARGAS, 2009).

Devido à sua natureza anfifílica, a AmB é capaz de se auto associar e formar agregados. A toxicidade observada na terapia é relacionada a esta capacidade, sendo que os vários estados de agregação (monômeros, oligômeros e agregados de oligômeros) podem interagir de diferentes maneiras com os esteróis das membranas. O efeito tóxico em membranas contendo ergosterol é normalmente associado à espécie monomérica, enquanto a forma agregada é a principal responsável pela toxicidade em células de mamíferos (BRAJTBURG & BOLARD, 1996; EGITO *et al.*, 2002; LEGRAND *et al.*, 1992; TORRADO *et al.*, 2008).

Os diferentes estados de agregação podem coexistir numa mesma formulação, em diferentes proporções, dependendo de fatores como: temperatura a que foi exposta, modo de preparo, ação do surfactante e de outros excipientes, e, principalmente, concentração de AmB. Uma formulação ideal, no entanto, deveria possibilitar a permanência majoritária da AmB na forma monomérica (EGITO *et al.*, 2002; JAIN *et al.*, 2012; LEMKE *et al.*, 2005; TORRADO *et al.*, 2008). Isso não ocorre com a formulação convencional, uma vez que, ao se dissociar parcialmente do desoxicolato, a AmB “livre” forma uma mistura de monômeros e oligômeros solúveis em diferentes estados de agregação (BRAJTBURG & BOLARD, 1996).

A baixa solubilidade, baixa permeabilidade intestinal e a instabilidade em meio ácido dificultam o desenvolvimento de formulação oral da AmB, ainda não disponível no mercado. A formulação parenteral convencional utiliza-se do sal biliar desoxicolato de sódio para promover a sua solubilidade em meio aquoso, através da formação de

complexos micelares. A forma comercial disponibilizada é conhecida como Fungizone® (Bristol-Meyers Squibb, EUA) e Anforicin B® (Cristália, Brasil), ambos de administração intravenosa (FILIPPIN & SOUZA, 2006; JAIN *et al.*, 2012). Contudo, a formulação com desoxicolato de sódio (AmB-D) não é bem tolerada, estando associada a elevada incidência de reações adversas (SHADKAN *et al.*, 1997).

As reações adversas agudas, tais como febre, calafrios, tremores, náusea, vômitos, diarreia e cefaleia, são frequentes e normalmente relacionados à infusão. Outras alterações observadas incluem: hipotensão, hipertensão, arritmia cardíaca, disfunção renal, hipocalcemia, hiponatremia, hipomagnesemia, diurese aumentada e efeitos tóxicos sobre a medula óssea. A disfunção renal é normalmente observada durante o tratamento, ainda que em grau variável e dose-dependente, e, em casos extremos, a nefrotoxicidade e hemólise severas exigem a interrupção do tratamento. Os efeitos graves, especialmente a nefro e cardiotoxicidade, e a administração intravenosa determinam que a terapia ocorra em ambiente hospitalar (CHAPPUIS *et al.*, 2007; FILIPPIN & SOUZA, 2006; GOLENSER & DOMB, 2006; GONTIJO & CARVALHO, 2003; JAIN *et al.*, 2012).

A AmB é considerada um dos fármacos mais potentes contra a leishmaniose, com taxas de curas de aproximadamente 100% para a LV (BERMAN, 2005; DAVIDSON, 2005). É indicada como segunda linha de tratamento, especialmente nos casos de resistência ou pacientes não responsivos à terapia, e como fármaco de escolha para pacientes portadores do HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015 e 2017; YARDLEY & CROFT, 1997). Na forma de desoxicolato, o Ministério da Saúde recomenda para a LV a dose de 1 mg/kg/dia, em dias alternados, com dose total máxima de 3 gramas, e para a LT a dose de 0,5 a 1,0 mg/kg/dia, com dose total de 25 a 40 mg/kg, não excedendo a máxima diária de 50 mg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014 e 2017).

2.2.1 Sistemas Lipídicos contendo AmB

O desenvolvimento de formulações lipídicas contendo AmB foi um grande avanço para a terapia da leishmaniose. De forma geral, as três preparações comercialmente disponíveis – AmB lipossomal (Ambisome®), complexo lipídico de AmB (Abelcet®, ABLC) e dispersão coloidal de AmB (Amphocil®, ABCD) – possuem eficácia similar à

formulação convencional com desoxicolato e são menos tóxicas (GOTO & LINDOSO, 2010; TIUMAN *et al.*, 2011; VYAS & GUPTA, 2006).

A menor toxicidade dos sistemas lipídicos está relacionada à capacidade de interagirem com as moléculas de AmB, impedindo que o fármaco se dissocie do carreador lipídico ao ser diluído no sangue. O sistema funciona como um reservatório que possibilita a liberação lenta da AmB, na sua forma monomérica, o que modifica sua distribuição no organismo, reduzindo efeitos tóxicos, mas mantendo a atividade contra células parasitárias (ARAÚJO *et al.*, 2005; IMAN *et al.*, 2011; VYAS & GUPTA, 2006).

Ademais, devido à natureza coloidal dos sistemas lipídicos, eles são rapidamente removidos da circulação por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), o que também modifica a biodisponibilidade e distribuição da AmB, reduzindo a toxicidade associada ao fármaco. Essa remoção funciona, ainda, como um direcionamento passivo ao alvo, uma vez que os parasitos invadem o SFM. Dessa forma, consegue-se atingir tanto parasitos intracelulares, pela captação do sistema lipídico por macrófagos e monócitos, quanto parasitos extracelulares, pela dissociação lenta da AmB antes da fagocitose (TORRADO *et al.*, 2008; VYAS & GUPTA, 2006).

Dentre as formulações lipídicas, o Ambisome® apresenta a maior eficácia e toxicidade significativamente menor, relacionadas, dentre outros fatores, à capacidade do lipossoma interagir fortemente com as moléculas de AmB, ao ancorá-las na bicamada lipídica, e à sua remoção da corrente sanguínea pelo SFM, sendo transportado aos vacúolos parasitóforos (IMAN *et al.*, 2011; MOHAMED-AHMED *et al.*, 2012; PAPAHAADJOPOULOS, 1996; VYAS & GUPTA, 2006; YARDLEY & CROFT, 1997).

Recentemente, o Ministério da Saúde oficializou a utilização da forma lipossomal da AmB no tratamento da LT. A nova recomendação inclui o medicamento como primeira escolha na LCL, LD, LMC e em portadores de HIV nas seguintes situações: pacientes com idade a partir de 50 anos; com insuficiência renal, cardíaca ou hepática de qualquer idade; transplantados renais, cardíacos ou hepáticos; gestantes de qualquer idade. É, também, indicado como segunda escolha no tratamento da LCD. Os protocolos terapêuticos recomendam a administração de 2 a 5 mg/kg/dia, sem limite

de dose máxima diária, até a dose total de 25 a 40 mg/kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Para a leishmaniose visceral, a forma lipossomal é indicada nas doses de 1,0 a 1,5 mg/kg/dia, durante 21 dias, ou 3,0 mg/kg/dia durante 10 dias, em pacientes graves que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso do Antimoniato de N-metilglucamina e de outras drogas de escolha, não obtendo melhora ou cura clínica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Essa ampliação do uso do medicamento e um aumento na quantidade da AmB lipossomal adquirida pelo Ministério da Saúde ocorreram, em parte, graças ao acordo firmado entre OMS e o laboratório produtor da forma lipossomal para a redução do custo unitário deste medicamento para países em desenvolvimento. Entretanto, não se sabe até quando esse acordo entre OMS e a indústria detentora do registro poderá ser mantido (ALVAR *et al.*, 2008; MOHAMED-AHMED *et al.*, 2012; SUNDAR *et al.*, 2008; TIUMAN *et al.*, 2011; VANLERBERGH *et al.*, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas carreadores de AmB efetivos, menos tóxicos e mais viáveis economicamente ainda se faz necessário.

2.2.1.1 Avaliação de eficácia e toxicidade da AmB em formulações lipídicas

Diversos estudos pré-clínicos têm sido realizados com o objetivo de comparar o Fungizone® com as formulações lipídicas contendo AmB, notadamente a lipossomal (Ambisome®). Entretanto, observa-se que poucos trabalhos utilizam modelos de LT, enquanto a grande maioria é executada em modelos de LV, especialmente em animais infectados com a *L. (L.) donovani*.

Gangneux e colaboradores (1996) compararam a eficácia e tolerância do Fungizone® com Ambisome® em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum*. O Ambisome® foi mais eficaz que o Fungizone® na redução da carga parasitária no baço, fígado e pulmão, quando ambos foram administrados na dose de 0,8 mg/kg/dia. As doses de 5 mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia do Ambisome® foram bem toleradas pelos animais e erradicaram completamente os parasitos nos três órgãos (GANGNEUX, 1996a). Em um segundo estudo, a eficácia e tolerância do Fungizone® e Ambisome® foram novamente avaliadas. O Ambisome® foi bem tolerado e permitiu o tratamento com doses maiores (12 mg/kg) em comparação com a mistura AmB + Intralipid® (1,2

mg/kg) e Fungizone® (0,8 mg/kg). Além disso, após tratamento com essas doses, o Ambisome® erradicou completamente os parasitos nos tecidos avaliados (GANGNEUX, 1996b).

Outro estudo comparou a atividade leishmanicida de quatro formulações comerciais (Fungizone®, Ambisome®, Abelcet® e Amphocil®) em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani*, tratados com 2,5 mg/kg por cinco dias, via endovenosa. Com exceção do Abelcet®, que se mostrou inativo na análise da medula óssea, todas as formulações levaram à supressão significativa da carga parasitária no baço, fígado e medula óssea, quando comparadas ao grupo controle. A eficácia das formulações foi classificada como: Amphocil® = Ambisome® > Abelcet®. Fungizone® foi omitido em decorrência de toxicidade nas doses usadas nesse modelo de doses múltiplas (MULLEN *et al.*, 1997).

Yardley e Croft (2000) avaliaram a eficácia, através da determinação da dose média efetiva (DME₅₀), e a toxicidade, através da dose máxima tolerada (DMT), de formulações comercialmente disponíveis contendo AmB, utilizando como modelo camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani*. Os resultados mostraram que a DME₅₀ foi de 0,21 mg/Kg para o Fungizone® e 0,73 mg/kg para o Ambisome®. Já a DMT foi de 1 mg/Kg para o Fungizone®, enquanto para a formulação lipídica dose maior foi tolerada, 25 mg/kg.

A eficácia de diferentes formulações de AmB em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*, espécie causadora de LT, foi investigada (YARDLEY & CROFT, 1997). Os animais foram tratados, em seis dias alternados, com Fungizone® 1 mg/kg por via endovenosa e Ambisome® 25 mg/kg, por via subcutânea ou endovenosa. O Ambisome® por via endovenosa foi o único que mostrou atividade em comparação ao controle, com redução significativa das lesões. Em um segundo experimento, o Ambisome® foi administrado por via endovenosa em diferentes doses (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/kg) e os resultados mostraram um efeito dose-resposta, sendo que, na dose mais alta (50 mg/kg), quatro dos cinco animais apresentaram cicatrização completa das lesões (YARDLEY & CROFT, 1997).

Estudos clínicos têm sido conduzidos para avaliar a eficácia e a segurança das diferentes formulações de AmB disponíveis comercialmente, para o tratamento da leishmaniose. Tem-se verificado redução considerável na incidência de efeitos adversos para pacientes tratados com a formulação lipossomal quando comparados com aqueles tratados com a formulação convencional. Novamente, pode-se observar uma maior quantidade de ensaios clínicos para avaliação da eficácia em pacientes portadores de LV, enquanto para a LT menos estudos são encontrados e, normalmente, envolvem um menor número de pacientes, ou são realizados como relatos de casos.

Berman e colaboradores (1998) realizaram um ensaio clínico aberto fase II, em três países, para avaliação da eficácia e segurança do Ambisome[®], em diferentes doses totais (dose diária de 2 mg/kg/dia), no tratamento de pacientes portadores de LV. Para a obtenção de taxas elevadas de cura (100%) foram necessárias as doses totais de 6 mg/kg e 14 mg/Kg, na Índia e no Quênia, respectivamente. No Brasil, foi necessário esquema com dose total de 20 mg/kg para atingir uma taxa de cura de 87%. Em relação à toxicidade, os pacientes da Índia e do Quênia relataram poucos efeitos adversos, normalmente febre e calafrios associados à infusão. No Brasil, além da maior incidência desses efeitos adversos, alguns pacientes exibiram dificuldade respiratória e/ou arritmia cardíaca associadas à infusão.

Recentemente, no Brasil, Romero e colaboradores (2017), conduziram um estudo clínico multicêntrico, aberto e randomizado com o intuito de avaliar a segurança e a eficácia dos tratamentos recomendados para LV. Observou-se eficácia equivalente do Ambisome[®] (3 mg/kg/dia por 7 dias) em comparação com o tratamento com Glucantime[®] (20 mg Sb⁵⁺/kg/ dia por 20 dias). O grupo do Anforicin B[®] (1 mg/kg/dia por 14 dias) foi descontinuado devido à observação de grande número de reações adversas, incluindo reações graves. O Ambisome[®] como monoterapia se mostrou mais seguro que o Glucantime[®], tanto em relação à frequência de reações adversas relacionadas ao tratamento, quanto à proporção de pacientes que apresentaram ao menos uma reação grave e à proporção de reações que resultaram em interrupção definitiva do tratamento (ROMERO *et al.*, 2017).

Solomons e colaboradores (2007) avaliaram a eficácia da AmB lipossomal em um grupo de sete pacientes ambulatoriais com LT causada por *L. (V.) braziliensis*. Foi administrada dose de 3 mg/kg/dia por via endovenosa, durante cinco dias consecutivos, com uma sexta dose sendo administrada no décimo dia de tratamento. Todos os pacientes foram considerados curados dentro de 1 mês, com completa reepitelização das lesões e sem o aparecimento de recidiva durante o acompanhamento de 12 meses. Em um segundo estudo, os autores utilizaram o mesmo protocolo de tratamento em um grupo de treze pacientes ambulatoriais infectados com *L. (L.) tropica*. Onze dos treze pacientes alcançaram a cura clínica dentro de 2 meses, com completa reepitelização das lesões e sem recidivas durante os 11 meses de acompanhamento. Para os outros dois pacientes o tratamento foi considerado ineficaz, com o aparecimento de recidiva ou cura parcial. Cabe mencionar que seis pacientes haviam sido tratados anteriormente, sem sucesso, com o estibogluconato de sódio intralesional e quatro com paromomicina tópica (SOLOMONS *et al.*, 2011).

Outros estudos avaliaram a segurança das formulações de AmB em pacientes apresentando redução do número de neutrófilos. Efeitos adversos graves relacionados ao fármaco foram observados em maior extensão nos pacientes tratados com a formulação convencional em comparação àqueles tratados com a formulação lipossomal. Ademais, a incidência de efeitos adversos foi menor para o Ambisome® quando comparado ao Fungizone® ou Abelcet® (PRENTICE *et al.*, 1997; WINGARD *et al.*, 2000).

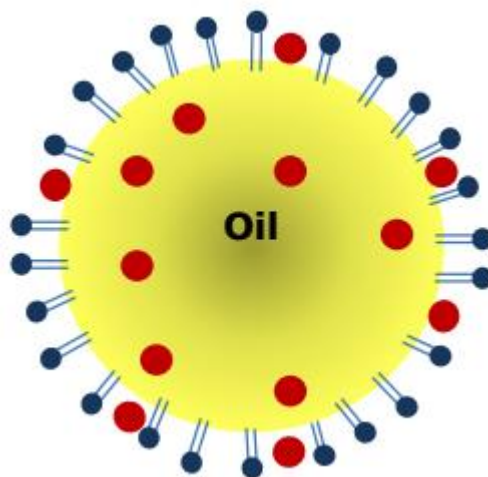
Conforme pode ser observado, os resultados encontrados nos diversos estudos são variáveis e não é definida de forma absoluta a superioridade clínica de qualquer um dos tratamentos. Entretanto, é bem estabelecido que os sistemas lipídicos apresentam vantagens em relação à forma convencional da AmB com desoxicolato. O direcionamento passivo das formulações lipídicas resulta em maiores concentrações nos órgãos do SFM, alvos da infecção, e menores concentrações nos rins, reduzindo notadamente a nefrotoxicidade. Adicionalmente, doses maiores podem ser administradas por meio de formulações lipídicas sem aumento da toxicidade, o que constitui estratégia interessante na busca de esquemas terapêuticos

mais eficazes (DUPONT, 2002; MOHAMED-AHMED *et al.*, 2012; TORRADO *et al.*, 2008; VYAS & GUPTA, 2006).

2.2.2 Nanoemulsão (NE)

Nanoemulsões (NE) são sistemas heterogêneos contendo dois líquidos imiscíveis, no qual um está disperso no outro na forma de glóbulos, sendo esta dispersão estabilizada por agentes emulsionantes ou tensoativos. Podem ser classificadas em: óleo em água (O/A), quando a fase dispersa é a oleosa e a fase externa ou dispersante é aquosa, (**Figura 8**) ou em água em óleo (A/O), quando o contrário acontece (GANTA *et al.*, 2014; TAMILVANAN, 2009). O tamanho dos glóbulos varia de 50 a 1000 nm, geralmente se encontrando entre 100 e 500 nm para administração endovenosa. Partículas muito maiores (5 μm) são clinicamente inaceitáveis, uma vez podem ocasionar embolismo (BENITA & LEVI, 1993; BHOSALE *et al.*, 2014; TAMILVANAN, 2009).

Figura 8 – Representação esquemática de NE O/A, estabilizada por meio de fosfolípides na interface, contendo moléculas do fármaco (pontos vermelhos).



Adaptado de HORMANN, 2015.

As NE vêm sendo utilizadas como sistemas de transporte devido à sua biocompatibilidade, capacidade de solubilizar grande quantidade de compostos hidrofóbicos, protegê-los de hidrólise e de degradação e diminuir a toxicidade associada aos fármacos (ARAÚJO *et al.*, 2011; BENITA & LEVI, 1993; MÜLLER *et al.*,

2004; SANTOS *et al.*, 2017). Assim, constituem opção menos onerosa ao uso do Ambisome®, uma vez que são facilmente escalonáveis para a produção em larga escala, possuem menor custo e técnica de preparo mais simples (GANTA *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-GASCÓN *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017).

Alguns autores sugerem a mistura do Fungizone® a emulsões lipídicas nutricionais de uso parenteral (Lipofundin® e Intralipid®) para redução dos efeitos tóxicos da AmB, como alternativa de baixo custo às formulações lipídicas comercialmente disponíveis (ARAUJO, *et al.*, 2005; EGITO *et al.*, 2002; SHADKHAN *et al.*, 1997). Entretanto, outros estudos relatam separação de fases do sistema, com a formação de precipitados de AmB e aumento do tamanho de partícula (RANCHÈRE, *et al.*, 1996; WALKER *et al.*, 1998). Apesar das desvantagens da técnica de incorporação do fármaco no sistema, foi demonstrado o potencial do uso das emulsões, uma vez que o procedimento proposto resultou em diminuição de toxicidade.

Mais um exemplo de utilização de mistura da AmB na forma de desoxicolato com emulsões lipídicas comerciais de uso parenteral foi o desenvolvimento da emulsão ABLE, na Índia. Em um estudo multicêntrico, aberto e randomizado, com 500 pacientes portadores de LV, ABLE foi comparado à formulação lipossomal utilizando regime de dose única, 15 mg/kg. A melhora clínica foi comparável nos dois grupos, assim como a ocorrência de reações adversas relacionadas ao tratamento. Nenhum paciente apresentou sinais e sintomas de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Entretanto, a porcentagem de pacientes sem sinais e sintomas clínicos de recaída, em seis meses de acompanhamento, foi de 85,9% para ABLE e 98,4% para a formulação lipossomal (SUNDAR *et al.*, 2014).

Outros estudos abordam a utilização de emulsões como veículo da AmB e apontam para sua eficácia e segurança. Egito e colaboradores (1996b) testaram a toxicidade e atividade *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo AmB, comparadas às do Fungizone®. A emulsão se mostrou menos tóxica para as hemácias humanas e igualmente ativa contra *Candida albicans in vitro*. Os experimentos *in vivo* com camundongos OF₁ também mostraram toxicidade aguda menor para as emulsões (DL₅₀ 7,24 mg/Kg e 3,46 mg/kg para a emulsão e Fungizone®, respectivamente). Quanto à atividade, adotou-se o modelo murino para candidíase, com camundongos BALB/c, e, para

doses iguais de 0,8 mg/Kg, observou-se eficácia equivalente das duas formulações; já na avaliação de atividade na dose máxima tolerada (2 mg/kg e 1 mg/kg para a emulsão e Fungizone[®], respectivamente), a emulsão se mostrou mais eficaz em prolongar o tempo de sobrevivência dos animais infectados.

O processo de incorporação da AmB na emulsão proposta por Egito e colaboradores (1996b) foi por meio da sua solubilização em metanol, com posterior aquecimento do sistema para evaporação do solvente. A estratégia de uso de solventes orgânicos na incorporação do fármaco ao carreador é descrita por vários autores (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; DAROLE *et al.*, 2008; FILIPPIN & SOUZA, 2008), entretanto, deve ser evitada, pois pode acarretar problemas toxicológicos e ambientais.

Lance e colaboradores (1995) desenvolveram método de incorporação da AmB em emulsões lipídicas que não envolve o uso de solventes. Baseado no perfil pH-solubilidade, o procedimento proposto utiliza-se de solução alcalina para a solubilização do fármaco que, então, é adicionada à emulsão lipídica, proporcionando a incorporação da AmB ao sistema, provavelmente na sua interface. Em seguida, o pH da formulação é ajustado para a faixa de interesse.

Dessa forma, NE contendo AmB, para administração tópica, foi desenvolvida utilizando-se da estratégia de incorporação baseada no perfil pH-solubilidade, previamente descrita por Lance e colaboradores (1995). A formulação não foi capaz de aumentar a penetração de AmB, mas apresentou elevado teor de encapsulação ($95 \pm 1\%$), e se manteve consideravelmente estável por 90 dias. Essa estabilidade foi atribuída à presença de estearilamina que favorece a formação de par-iônico com a AmB (SANTOS *et al.*, 2012).

Caldeira e colaboradores (2015) modificaram a NE proposta por Santos e colaboradores (2012) para administração endovenosa, adicionando colesterol como co-surfactante, e avaliaram a influência da estearilamina. O teor de encapsulação de AmB obtida foi alto (aproximadamente 100%) e as formulações se mostraram estáveis por 180 dias, independente da presença da estearilamina. A caracterização por dicróismo circular e espectro no ultravioleta mostrou ausência de sinal de AmB agregada, a forma mais tóxica para as células hospedeiras, tanto na NE contendo

estearilamina quanto naquela sem o lipídeo catiônico. Já o estudo de atividade *in vitro* contra a forma amastigota de *L. amazonenses* indicou atividade leishmanicida por parte da estearilamina, que pode agir sinergicamente com AmB. Por outro lado, a citotoxicidade em macrófagos J774 aumentou consideravelmente na presença de estearilamina, sendo que a NE sem este lipídeo não se mostrou citotóxica. Todavia, a formulação convencional com desoxicolato (Anforicin®) se mostrou ainda mais tóxica do que a NE contendo estearilamina 0,1%.

Mais recentemente, Santos e colaboradores (2017) relataram otimização do tamanho de partícula dessa NE por meio do ajuste da concentração do tensoativo e pelo aumento gradual da aplicação de pressão durante o preparo da NE-branco em homogeneizador de alta pressão. A toxicidade hemolítica *in vitro* foi significativamente menor para a NE em comparação com o Anforicin® ($7,9 \pm 1,5\%$ e $99,7 \pm 1,2\%$, respectivamente). A eficácia da NE-AmB no tratamento da leishmaniose foi avaliada em camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) infantum chagasi*. A NE se mostrou tão eficaz quanto o Anforicin® na concentração de 1 mg/kg, sendo também tolerada a 2 mg/kg, já o Anforicin® não pode ser administrado nessa concentração devido à alta toxicidade.

Diante do exposto, NE carregadas com AmB constituem uma alternativa atraente para o tratamento das leishmanioses. Pode ser observada na literatura uma maior quantidade de estudos que avaliam a eficácia de formulações lipídicas em modelos de LV e poucos estudos para LT. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho se insere nesse contexto, com a proposta de estender os estudos de estabilidade descritos por Santos e colaboradores (2017) e avaliar sua eficácia em modelo animal de LT.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar, avaliar a estabilidade e a eficácia de NE contendo AmB em animais experimentalmente infectados com *L. (L.) major*, tendo como perspectiva o tratamento da leishmaniose por administração endovenosa.

3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar método analítico para doseamento de AmB por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) proposto por Chang e colaboradores (2011).
- Validar método analítico para doseamento de AmB por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).
- Avaliar a influência do colesterol nas características físico-químicas das NE, por meio da determinação do teor total, teor de encapsulação (TE), diâmetro de partícula, potencial zeta, estado de agregação da AmB e avaliação visual das NE-AmB.
- Avaliar a estabilidade da NE-AmB, por meio da determinação do teor total, teor de encapsulação (TE), diâmetro de partícula, potencial zeta, estado de agregação da AmB e potencial hemolítico.
- Avaliar a eficácia da NE-AmB, administrada por via endovenosa, no tratamento de animais experimentalmente infectados com *L. (L.) major*, por meio da determinação da carga parasitária (baço e lesão) e do acompanhamento do tamanho das lesões durante o tratamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A Anfotericina B (AmB) e o Anforicin[®] foram gentilmente fornecidos pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. (São Paulo, Brasil). O triglicéride de cadeia média, (Lipoid MCT), foi obtido da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O Monoleato de sorbitano etoxilado (Tween[™] 80) foi gentilmente cedido pela Croda (Pensilvânia, EUA). O Hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), colesterol, dimetilsulfóxido (DMSO), hidroxibutiltolueno (BHT) e o sal dissódico de ácido etilenodiamino tetra-acético dihidratado (EDTA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O glicerol foi obtido da Casa da Química Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida de um Sistema de Água Milli-Q[®]. Tetrahidrofurano (THF), acetonitrila e metanol, grau CLAE, foram obtidos da Tedia (Ohio, EUA), Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) e J. T. Baker (EUA), respectivamente. A água ultrapura foi obtida de um Sistema de Água Milli-Q[®].

O sangue de coelho citratado foi gentilmente fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Os camundongos BALB/c (*Mus musculus*) fêmeas foram adquiridos com cerca de 4 a 5 semanas do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A *L. (L.) major* (MHOM/IL/80 Friedlin) foi gentilmente cedida pelo Instituto René Rachou - Fiocruz Minas, juntamente com os hamsteres da linhagem Dourado (*Mesocricetus auratus*). O meio Schneider's, Soro fetal bovino e a solução dos antibióticos penicilina-estreptomicina foram obtidos Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O estudo em modelo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob protocolo n° 346/2016.

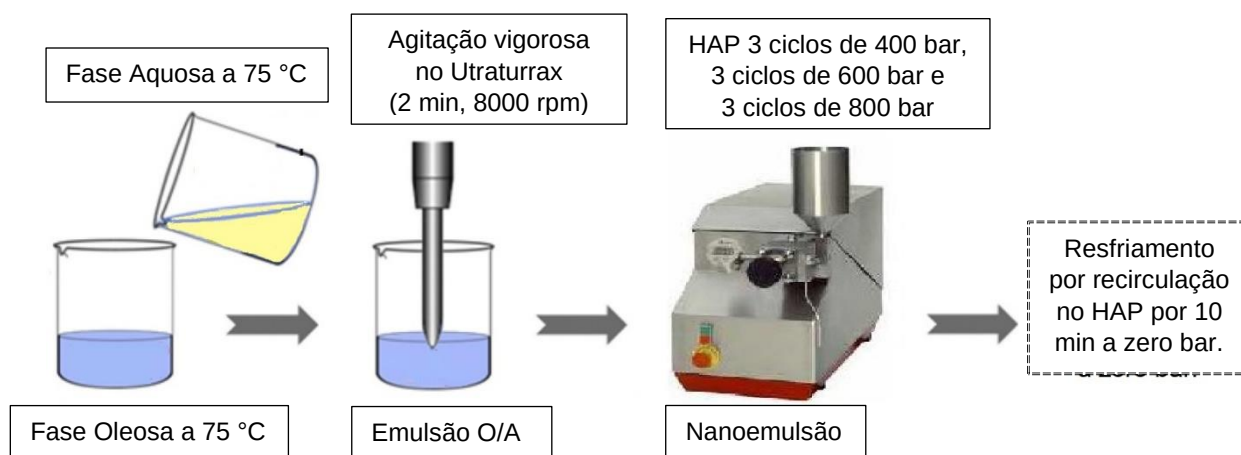
4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da nanoemulsão

A composição da NE e seu preparo (**Figura 9**) foram de acordo com o proposto por Santos e colaboradores (2017). A fase oleosa (FO) foi composta por TCM (5,0%; triglicéride de cadeia média), Tween 80 (1,5 % surfactante hidrofílico), colesterol (0,5

%), e BHT (0,01 %; antioxidante). Já a fase aquosa (FA) foi composta por glicerol (2,25%; isotonzante) e água ultrapura. A NE branco foi preparada por método de emulsificação de alta energia, utilizando o agitador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Staufen, Alemanha) e o Homogeneizador de Alta Pressão (HAP) AV-1000 (Invensys, Dinamarca). As FO e FA foram pesadas separadamente e aquecidas, paralelamente, a 75 °C. Após completa fusão dos lípides, mantendo-se a temperatura de 75 °C, a FA foi lentamente vertida sobre a FO, sob agitação de 8.000 rotações por minuto (rpm), no agitador Ultra Turrax T-25 por dois minutos. Em seguida, a emulsão foi submetida ao homogeneizador de alta pressão por 3 ciclos a 400 bar, 3 ciclos a 600 bar e 3 ciclos a 800 bar. Findo os nove ciclos, a NE foi recirculada no HAP por 10 minutos, a 0 (zero) bar, para resfriamento à temperatura ambiente.

Figura 9 – Ilustração do preparo da NE.



Adaptado de HU *et al.*, 2016.

Uma vez resfriada à temperatura ambiente, a AmB foi incorporada à NE branco na concentração de 2 mg/ mL, em lotes de 20 mL. Nesse sentido, 1 mL de NaOH 0,2 mol/L foi adicionado sobre o pó da AmB (40 mg), para sua dissolução. O sistema foi mantido sobre agitação magnética até solubilização quase completa da AmB. Em seguida, 17 mL da NE branco foram adicionados e a agitação mantida por 2 minutos. Ao final deste tempo, a AmB foi completamente solubilizada. Adicionou-se, então, quantidade previamente padronizada de HCl 0,2 mol/L para acerto do pH próximo à faixa desejada (7,0 a 7,5). O ajuste fino foi feito com solução de NaOH 0,2 mol/L ou

HCl 0,2 mol/L, sendo o pH determinado em potenciômetro. O volume da NE foi completado com água ultrapura para 20 mL (q.s.p 100%).

Para o estudo da influência do colesterol (item **4.2.5**), a NE foi preparada utilizando-se o aparelho de homogeneização do tipo ultrassom com sonda de alta potência de 500 W (Cole Parmer, Vernon Hills, EUA). Da forma similar, após o aquecimento das fases FA e FO a 75 °C e agitação no Ultra Turrax T-25 por dois minutos, a emulsão resultante foi submetida ao ultrassom com sonda de alta potência (21% de amplitude), por 10 minutos. Em seguida, a NE foi deixada em repouso até que atingisse a temperatura ambiente e o fármaco foi incorporado.

4.2.2 Caracterização das nanoemulsões

4.2.2.1 Determinação do diâmetro, índice de polidispersão e potencial Zeta das partículas

A análise do diâmetro e do índice de polidispersão (IP) das partículas foi realizada por espalhamento dinâmico da luz (DLS) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25° C. O potencial zeta foi avaliado por DLS associado à mobilidade eletroforética, a um ângulo de 90°. As medidas foram efetuadas utilizando-se de um Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As formulações foram diluídas a uma proporção de 1:100 em água ultrapura.

4.2.2.2 Determinação do teor de encapsulação de AmB

O teor de AmB na NE foi avaliado utilizando-se o método de CLAE validado (ver item **4.2.4**). Para sua determinação compararam-se as áreas sob o pico de absorção de AmB obtidas a partir de solução padrão de AmB e de solução de NE-AmB, na mesma concentração teórica de 1,4 µg/mL. As amostras foram preparadas conforme descrito nos itens **4.2.4.1**, **4.2.4.3** e **4.2.4.6**, em triplicata.

O teor total foi calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\text{Área do pico de AmB a partir de solução de NE-AmB não filtrada}}{\text{Área do pico de AmB a partir de solução padrão de AmB}} \times 100$$

Da mesma forma, o teor de encapsulação (TE) da AmB na NE foi determinado pelo método de CLAE, comparando-se as áreas sob o pico de absorção de AmB obtidas a partir de solução de NE-AmB filtrada e de solução de NE-AmB não filtrada, na mesma concentração teórica de 1,4 µg/mL, conforme fórmula abaixo:

$$\text{TE (\%)} = \frac{\text{Área do pico de AmB a partir de solução de NE-AmB filtrada}}{\text{Área do pico de AmB a partir de solução de NE-AmB não filtrada}} \times 100$$

As NE-AmB foram filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore®, EUA), para remoção da AmB insolúvel não incorporada à NE. O procedimento foi realizado em triplicata.

Para se determinar o teor total e o teor de encapsulação no experimento de influência do colesterol na formulação (item 4.2.5) foi utilizado o espectrofotômetro de absorção no UV-VIS Thermo Scientific Modelo Evolution 2000 (Massachusetts, EUA), conforme método de doseamento por espectrofotometria no U.V-visível proposto por Santos e colaboradores (2012). As leituras foram feitas a 405 nm.

A solução padrão de AmB foi preparada pesando-se 25 mg de AmB em balão volumétrico de 25 mL e dissolvendo-se o pó do fármaco em 2,5 mL de DMSO, em banho de ultrassom por 1 minuto. Em seguida, completou-se o volume do balão com metanol e homogeneizou-se (1 mg/mL). Com o auxílio de pipetas volumétricas, diluições sequenciais foram realizadas até as concentrações de interesse, utilizando-se metanol como diluente.

Para o preparo da solução amostra de NE-AmB, foram transferidos 70 µL da NE carregada com AmB 0,2% p/v para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de DMSO, o volume foi completado com THF e homogeneizado, obtendo-se concentração de 14 µg/mL. Em seguida, 2 mL foram transferidos para balão de 10 mL, completou-se o volume do balão com metanol e homogeneizou-se. O mesmo procedimento de diluição foi realizado para a NE Branco, NE-AmB não filtrada e NE-

AmB filtrada. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das absorvâncias obtidas e os teores foram calculados conforme fórmulas previamente expostas, substituindo-se, entretanto, a área do pico pela concentração da amostra.

4.2.2.3 Avaliação do estado de agregação

Para avaliação do estado de agregação da AmB na formulação foram utilizadas as técnicas espectroscopia UV-Visível e espectro de dicroísmo circular (JAIN & KUMAR, 2010).

Para o preparo da solução aquosa, 5,0 mg de AmB foram pesados em balão de 10 mL e dissolvidos em 1 mL de DMSO em banho de ultrassom por 1 minuto. O volume do balão foi aferido com água ultrapura e 100 µL foram transferidos para outro balão de 10 mL, novamente completando-se o volume com água ultrapura. A NE e o Anforicin B[®] também foram diluídos em água ultrapura até a concentração de 5,0 µg/mL. O mesmo procedimento de diluição foi realizado para a NE Branco.

As análises foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, no equipamento Espectropolarímetro Chirascan™, à temperatura de 25° C. Antes da obtenção dos espectros das amostras de interesse, o equipamento foi zerado com o diluente (água ultrapura) e foi realizada a análise da NE branco para descontar, dos espectros das NE carregadas com AmB, os valores de absorvância e sinal de dicroísmo circular dos componentes da formulação. Foram feitas três varreduras de cada amostra entre os comprimentos de onda de 250 e 450 nm, em atmosfera de nitrogênio, para obtenção dos espectros.

4.2.3 Otimização do método analítico

O método de análise, utilizado neste estudo, para a determinação quantitativa de AmB por CLAE foi uma modificação do trabalho de Chang e colaboradores (2011). De forma preliminar e com o objetivo de reduzir o tempo de análise, foram testadas fases móveis com diferentes proporções da mistura de solventes orgânicos (SO) – Metanol/Acetonitrila/Tetraidrofurano (41/18/10) – e da solução de EDTA. Os resultados foram analisados em relação ao tempo de retenção da AmB e pureza do

pico. As modificações propostas em relação ao método descrito por Chang e colaboradores (2011) estão expressas na **Tabela 2**.

Após otimização do método, a validação foi realizada de acordo com as recomendações da Resolução RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 2 – Modificações propostas para otimização das condições cromatográficas do método analítico para o doseamento de AmB por CLAE.

Parâmetro	Chang <i>et al.</i> (2011)	Modificações propostas
Temperatura	30 °C	25 °C
Fase móvel (SO:EDTA)	55:45	65:35
		70:30

SO = solvente orgânico; EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

4.2.4 Validação do método analítico

4.2.4.1 Preparo das soluções estoque do padrão de AmB e de NE-AmB

A solução padrão estoque de AmB (20 µg/mL) foi preparada pesando-se 50 mg de AmB em balão volumétrico de 50 mL e dissolvendo-se o fármaco em 5 mL de DMSO, em banho de ultrassom por 1 minuto. Em seguida, completou-se o volume do balão com metanol e homogeneizou-se (1 mg/mL). Com o auxílio de uma pipeta transferiram-se 2 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se, obtendo-se concentração de 20 µg/mL. As diluições subsequentes para as concentrações desejadas foram realizadas com fase móvel.

Para o preparo da solução estoque da amostra de NE contendo AmB (NE-AmB) (20 µg/mL), foi transferido 1,0 mL da NE carregada com AmB 0,2% p/v para balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 10 mL de DMSO e o volume foi completado com THF e homogeneizado, obtendo-se concentração de 20 µg/mL. O mesmo procedimento de diluição foi realizado para a NE Branco. Utilizou-se fase móvel para as diluições subsequentes até as concentrações desejadas.

4.2.4.2 Seletividade

Para comprovar a seletividade do método, ou seja, sua capacidade de separar o fármaco dos outros componentes da formulação e de suas impurezas, foram avaliados os cromatogramas do padrão de AmB, da NE branco e da NE-AmB.

Para o preparo das amostras, 3,5 mL da solução padrão estoque de AmB (20 µg/mL) foram transferidos para balão de 50 mL com o auxílio de bureta, o volume do balão foi completado com fase móvel e homogeneizado, obtendo-se concentração de 1,4 µg/mL. O mesmo procedimento foi feito para solução estoque da amostra de NE-AmB (20 µg/mL) e para a NE branco. As soluções finais foram injetadas no cromatógrafo.

Os cromatogramas obtidos foram comparados, avaliando-se a presença de picos interferentes, no mesmo tempo de retenção da AmB, no comprimento de onda de absorção de 405 nm. O metanol utilizado no preparo das amostras, assim como o DMSO e a fase móvel, também foram injetados para avaliação de interferência em 405 nm.

Avaliou-se, ainda, a capacidade do método de separar o fármaco dos produtos de degradação formados em condição alcalina, uma vez esse ambiente é necessário durante o preparo da NE-AmB, na etapa de incorporação do fármaco.

Para o estudo de degradação, foram pesados 25 mg de AmB em balão âmbar de 25 mL, sendo o volume completado com NaOH 0,2 mol/L (1 mg/mL). Após homogeneização, alíquotas de 1 mL foram retiradas, em tempos pré-determinados (2; 5; 30; 60; 120 e 180 minutos), e a concentração ajustada para a mesma concentração teórica do padrão, 1,4 µg/mL. As soluções finais foram injetadas no cromatógrafo.

As porcentagens de AmB e dos produtos de degradação formados foram calculadas a partir da área do padrão AmB que não foi submetido à degradação alcalina. Os cromatogramas obtidos foram comparados, avaliando-se a presença de picos interferentes.

4.2.4.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se uma curva analítica para a AmB com seis níveis de concentração igualmente espaçados, na faixa de 0,6 µg/mL a 2,6 µg/mL, definindo-se 1,4 µg/mL como concentração de trabalho. Para a construção da curva, a solução padrão estoque de AmB (20 µg/mL) foi preparada conforme descrito no item **4.2.4.1**.

Em seguida, prepararam-se as soluções amostras de 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; 2,2 e 2,6 µg/mL, por meio da diluição das soluções padrão estoque utilizando-se uma bureta de 10 mL. Transferiram-se, respectivamente, os volumes de 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 mL para balões volumétricos de 50 mL, completando-se o volume com fase móvel. As soluções foram homogeneizadas, filtradas e transferidas para *vials* para injeção no cromatógrafo. Esse procedimento foi feito em triplicata, obtendo-se três soluções de cada uma das concentrações. Após estabilização da coluna, nas condições do ensaio, as soluções foram injetadas duas vezes cada no cromatógrafo.

Os valores obtidos das áreas dos picos, correspondentes a cada concentração do padrão, foram analisados estatisticamente (ver **item 4.2.8**). Ao final dos experimentos construiu-se uma curva única, a partir dos resultados das três réplicas, relacionando a área sob o pico da AmB e a concentração de cada amostra. Obteve-se então, o coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de correlação (R), o coeficiente angular (b) e o coeficiente linear (a). A regressão linear foi calculada pelo método estatístico denominado Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e a linearidade foi avaliada por meio destes parâmetros.

4.2.4.4 Precisão

A precisão intra-corrida do método, ou seja, sua repetibilidade, foi determinada por meio da quantificação da AmB em três níveis de concentração: 0,6 µg/mL (baixo), 1,4 µg/mL (médio) e 2,6 µg/mL (alto). Para cada concentração foram preparadas três replicatas. A precisão inter-corridas, ou intermediária, foi realizada pela repetição do mesmo procedimento em outro dia.

Em cada dia de análise foi preparada uma solução padrão estoque de AmB (20 µg/mL), conforme descrito no item **4.2.4.1** e, a partir dela, as soluções amostras foram preparadas conforme descrito no item **4.2.4.3**.

Os valores médios do teor e os desvios padrões relativos de cada nível de concentração foram calculados para o primeiro dia e para o primeiro e segundo dias de análise.

4.2.4.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela determinação da porcentagem de recuperação do fármaco adicionado a uma mistura dos componentes da formulação. Para utilização deste método, denominado fortificação do placebo, quantidades conhecidas de AmB foram adicionadas a soluções contendo a NE branco. Foram realizadas nove determinações contemplando os níveis de concentração 0,6 µg/mL (baixo), 1,4 µg/mL (médio) e 2,6 µg/mL (alto), sendo realizada em triplicata para cada nível de concentração.

Para a obtenção das amostras, preparou-se, inicialmente, solução estoque da NE branco, simulando o preparo da solução estoque da amostra de NE-AmB 20 µg/mL, descrita no item **4.2.4.1**. Foi transferido 1,0 mL da NE branco para balão volumétrico de 100 mL, adicionaram-se 10 mL de DMSO e o volume foi completado com THF e homogeneizado. Essa solução foi reservada.

Em seguida, preparou-se a solução padrão estoque de AmB de 20 µg/mL, descrita no item **4.2.4.1**, e os volumes de 6,0 mL, 14 mL e 26 mL foram transferidos, respectivamente, para três balões volumétricos de 50 mL, com o auxílio de bureta. O volume destes balões foi completado com a solução estoque da NE branco, descrita no parágrafo anterior. Transferiram-se, então, 2,5 mL de cada uma das três soluções amostras preparadas para três balões de 10 mL, completando-se seu volume com fase móvel e obtendo-se, respectivamente, soluções de concentração 0,6 µg/mL, 1,4 µg/mL e 2,6 µg/mL.

As porcentagens de recuperação foram calculadas pela relação entre a concentração média de AmB determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

4.2.4.6 **Robustez**

A robustez foi avaliada a partir da variação intencional de algumas condições cromatográficas, com o objetivo de avaliar a capacidade do método de resistir a elas. Os parâmetros analisados foram: proporção de solvente orgânico (SO) na fase móvel, vazão de fase móvel, temperatura da coluna e marca da coluna, como apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Parâmetros modificados para a avaliação da robustez do método de doseamento de AmB por CLAE.

Parâmetros	Condições						
	Nominal	1	2	3	4	5	6
% SO : EDTA	70:30	70:30	70:30	70:30	68:32	72:28	70:30
Vazão (mL/min)	1,0	1,1	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0
Temperatura (°C)	25	25	25	30	25	25	25
Coluna	Supelco®	Supelco®	Supelco®	Supelco®	Supelco®	Supelco®	Agilent®

SO = solvente orgânico, EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

As amostras foram preparadas a partir da solução estoque da amostra de NE-AmB (20 µg/mL), descrita no item **4.2.4.1**. Foram transferidos 3,5 mL desta solução para balões de 50 mL, o volume foi completado com fase móvel e a solução foi homogeneizada, obtendo-se concentração de 1,4 µg/mL. Em cada condição modificada foram injetadas três amostras de NE-AmB.

4.2.4.7 Limite de detecção e limite de quantificação

Os Limites de detecção e de quantificação foram realizados utilizando-se as equações abaixo (BRASIL,2003):

$$LD = \frac{(DP_a \times 3)}{IC} \qquad LQ = \frac{(DP_a \times 10)}{IC}$$

em que:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

DP_a= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração

IC = a inclinação da curva de calibração.

4.2.5 Avaliação da influência do colesterol na NE

A influência da concentração do colesterol (0%, 0,25% e 0,5%) nas propriedades físico-químicas da NE foi avaliada. As NE foram testadas quanto ao estado de agregação e mantidas em estabilidade para avaliação do diâmetro, IP, potencial zeta, teor total e TE, logo após o preparo e durante o período de armazenamento. O acondicionamento foi feito em frascos de penicilina sob refrigeração a 4 °C.

Por se tratar de um experimento preliminar, optou-se por métodos de preparo e de doseamento mais simples, conforme descrito nos itens **4.2.1** e **4.2.2.2**, respectivamente. As NE foram preparadas por método de homogeneização à quente que permitisse a produção lotes menores, utilizando-se aparelho de homogeneização do tipo ultrassom com sonda de alta potência; e o doseamento foi realizado por espectrofotometria no U.V-visível, o que permite a utilização de menores volumes de solventes orgânicos.

4.2.6 Estudo de estabilidade das nanoemulsões

A avaliação da estabilidade de armazenamento da NE contendo AmB foi realizada em diferentes tempos após o preparo das formulações. Para comparação com a NE, um sistema micelar contendo TweenTM 80 a 2% em água ultrapura foi preparado, sendo a AmB incorporada de forma similar ao descrito previamente para a NE.

O acondicionamento dos sistemas foi feito em frascos de penicilina sob refrigeração a 4 °C, e os parâmetros avaliados para a NE foram diâmetro, IP, potencial zeta, teor, TE, estado de agregação e potencial hemolítico *in vitro*; para o sistema micelar avaliou-se somente a TE.

A fim de se estudar a toxicidade *in vitro* da NE-AmB durante o período de estabilidade, foi conduzido um ensaio de atividade hemolítica utilizando-se sangue de coelho, conforme descrito por SANTOS (2017). A NE foi testada em dois tempos: inicial (tempo zero) e após armazenamento durante 180 dias; o Anforicin[®] foi usado como controle. As amostras foram diluídas com tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4. Para a separação das hemácias, o sangue total foi submetido à centrifugação a 3000 G por 5 minutos a 4 °C; findo o tempo, o sobrenadante foi descartado. Visando eliminar outros componentes do sangue, adicionou-se PBS pH 7,4 às células sanguíneas vermelhas e, após leve homogeneização, a mistura foi novamente submetida à centrifugação, nas mesmas condições, e o sobrenadante, descartado; esse procedimento foi repetido três vezes, obtendo-se as hemácias isoladas.

A suspensão estoque de células vermelhas foi preparada misturando-se as hemácias isoladas com PBS pH 7,4 na proporção 2:11. Em seguida, 1 mL da suspensão estoque foi misturado a 1 mL das formulações de interesse (NE-AmB tempo zero e após 180 dias e Anforicin[®], nas concentrações 10, 20 and 40 µg/mL de AmB). A água ultrapura foi usada como controle positivo e PBS pH 7,4 como controle negativo, diluídos na mesma proporção com suspensão das células vermelhas.

As amostras foram incubadas a 37 °C em banho-maria com agitação, por 3 horas e, então, centrifugadas a 3000 G por 5 minutos, em temperatura ambiente. O

sobrenadante foi separado e mantido em repouso por 30 minutos para oxidação da hemoglobina.

A absorbância da hemoglobina oxigenada (Oxy-Hb) foi medida por espectrofotometria no U.V-visível em 540 nm, e a porcentagem de hemólise foi calculada usando a equação abaixo (MOHAMED-AHMED, 2013; PHAM *et al.*, 2014).

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{stampão}}}{\text{Abs}_{\text{água}} - \text{Abs}_{\text{stampão}}} \times 100$$

4.2.7 Avaliação da eficácia *in vivo* da NE-AmB

4.2.7.1 Infecção dos camundongos

Parasitos *L. (L.) major* foram isolados a partir da pata de hamster da linhagem Dourado, previamente infectado, e cultivados *in vitro* para propagação da sua forma promastigota. O cultivo foi realizado em meio Schneider completo pH 7,4, enriquecido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (56 °C por 40 minutos) e solução de antibióticos 40 µL/mL (penicilina 1000U e 10 mg estreptomicina/mL). Para o preparo do meio de cultura seguiram-se as instruções do fabricante, ajustando-se o pH para 7,4 no final do procedimento; em seguida, o meio foi esterilizado por filtração em membrana de polietersulfona 0,22 µm; o SFB e a solução de antibióticos foram adicionados ao meio somente no momento de uso. Os parasitos foram cultivados (estufa BOD-Fanem, Brasil – 23° C) até a fase estacionária de crescimento, sendo a curva de crescimento monitora por contagem executada em câmara de Neubauer.

Trinta e cinco camundongos fêmeas BALB/c, com 7-8 semanas, foram tricotomizados e inoculados via subcutânea, na base da cauda, com 1×10^7 promastigotas de *L. (L.) major*, contidas em 0,03 mL.

4.2.7.2 Preparo das formulações

A NE-AmB foi preparada conforme descrito no item 4.2.1 e diluída em solução estéril de glicose (5%), no momento do uso, para as concentrações determinadas. Em

seguida, foram filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm, em capela de fluxo laminar.

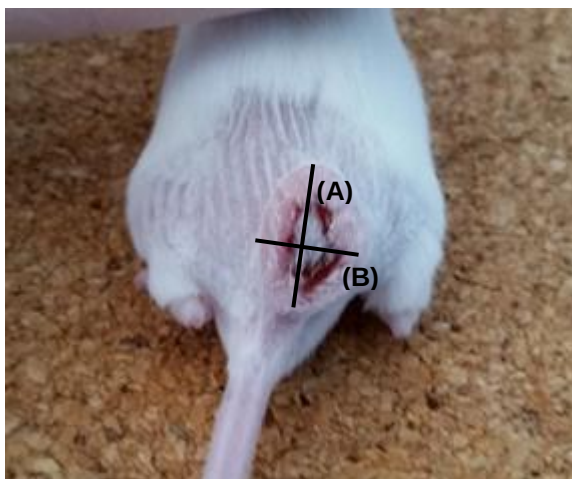
O Anforicin® foi ressuspendido conforme instruções da bula e diluído, no momento do uso, para a concentração determinada em solução estéril de glicose (5%), em capela de fluxo laminar.

4.2.7.3 Tratamentos

Após o desenvolvimento da lesão (diâmetro médio de aproximadamente 6 mm), os animais foram divididos em cinco grupos de sete camundongos cada: Grupo 1 (controle; glicose 5%), Grupo 2 (Anforicin® – 1 mg/kg/dia de AmB), Grupo 3 (NE-AmB – 1 mg/kg/dia de AmB), Grupo 4 (NE-AmB – 4 mg/kg/dia de AmB) e Grupo 5 (NE-AmB – 8 mg/kg/dia de AmB). Todos os grupos foram tratados por via endovenosa por cinco dias alternados, com volume de injeção igual a 0,1 mL, conforme descrito por Santos *et al.*, 2017.

O diâmetro de lesão e o peso dos animais foram acompanhados durante o tratamento (tempo inicial, 5 e 10 dias). Para medida da lesão utilizou-se um paquímetro (Mitutoyo, Brasil), e o diâmetro médio foi calculado pela média entre a maior distância entre duas bordas da lesão (A) e o comprimento da linha que corta esta distância com um ângulo de 90° (B), conforme **Figura 10** (GOLENSER *et al.*, 1999).

Figura 10 – Diâmetro médio das lesões desenvolvidas em animais infectados com *L. (L.) major*. (A): maior entre duas bordas. (B): linha que corta (A) com ângulo de 90°.



$$\text{Diâmetro médio} = \left[\frac{A + B}{2} \right]$$

4.2.7.4 Avaliação da eficácia dos tratamentos pelo método de diluição limitante

Para avaliação da eficácia das diferentes doses de NE-AmB, a carga parasitária no baço e no sítio de infecção (lesão) foi investigada pelo método de diluição limitante. Os animais foram eutanasiados no terceiro dia após o fim do tratamento, em câmara de CO₂, e foram removidos o baço e a lesão.

Cada lesão e baço foram pesados e triturados (Ultra-turrax, IKA) em meio Schineider contendo 20% de soro fetal bovino e 10 µL/mL da solução de antibióticos. Em seguida, os tecidos foram centrifugados (Heraeus™ Multifuge™ X1, Thermo Scientific™) por 2 minutos a 50 G (lesão) e a 500 rpm (baço). O sobrenadante foi coletado e submetido a nova centrifugação a 1700 G por 15 minutos (lesão) e a 4200 rpm por 2 minutos (baço). Os pellets formados foram ressuspensos em 1 mL de meio Schineider contendo 20% de soro fetal bovino e 10 µL/mL da solução de antibióticos. Em triplicata, foram realizadas diluições sucessivas (com meio Schineider contendo 20% de soro fetal bovino e 10 µL/mL da solução de antibióticos) em placa de cultivo de 96 orifícios estéreis, em capela de fluxo laminar. As placas foram incubadas a 23 °C por 7 dias (BOD-Fanem, Brasil) e a carga parasitária foi determinada a partir da mais alta diluição na qual foi observada presença de parasitos viáveis.

4.2.8 Análise Estatística

4.2.8.1 Validação do método analítico

A análise estatística do experimento de linearidade foi realizada por meio do programa Excel. Inicialmente, os valores dispersos (outliers) para as três replicatas foram identificados pelo teste de resíduo padronizado de Jackknife ($\alpha = 0,05$), e foram excluídos até que novos valores dispersos não fossem detectados. O critério de aceitação utilizado foi que no máximo 22% dos dados originais da curva de calibração poderiam ser excluídos, além disso, se o ponto fosse a terceira e última replicata do nível de concentração, não poderia ser excluído (SOUZA, 2007). Para estimar os parâmetros do modelo de regressão linear foi utilizado o método estatístico MMQO, sugerido por Souza e Junqueira (2005). Os seguintes testes estatísticos foram utilizados para verificação dos dados de regressão linear em relação às premissas do

MMQO: teste de Ryan-Joiner para análise da normalidade, teste de Levene modificado por Brown e Forsythe para avaliação da homocedasticidade (variância constante dos erros) e teste de Durbin-Watson para verificação da independência dos resíduos. Em seguida, os valores que passaram na análise de outliers foram submetidos à regressão linear, gerando uma curva única a partir das três replicatas. Verificou-se, então, a adequação dos dados ao modelo linear, ou seja, verificou-se se a regressão foi significativa e se o desvio da linearidade não foi significativo utilizando a análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2007; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Para a análise estatística da robustez foi utilizado o programa Prism. Após análise da normalidade, pelo teste Kolmogorov–Smirnov, e homocedasticidade pelo teste de Bartlett, os dados foram submetidos à ANOVA. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

4.2.8.2 Ensaio de atividade hemolítica in vitro

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Prism. Foram feitas análises da normalidade (teste Kolmogorov–Smirnov) e de homocedasticidade (teste de Brown-Forsythe) nos dados transformados em log. Em seguida esses dados foram avaliados por ANOVA, e, em caso de diferença estatística, utilizou-se o pós teste de Tukey. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

4.2.8.3 Ensaio de eficácia in vivo de NE-AmB por via endovenosa

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Prism. Os dados obtidos para a carga parasitária, na lesão e no baço, e para tamanho de lesão (porcentagem em relação ao valor inicial) foram transformados em log e submetidos aos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS) e homocedasticidade de Bartlett. Em seguida, foram avaliados por ANOVA, e, em caso de diferença estatística, os resultados foram submetidos ao teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para valores de P menores que 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do método analítico

Na **Tabela 4** estão expressos os resultados obtidos para as fases móveis com diferentes proporções SO:EDTA.

Conforme pode ser observado, o aumento da proporção da fase orgânica resultou no aumento de pureza do pico; a utilização da proporção 70:30 resultou em 95% da pureza, sendo um indicativo da ausência de co-eluição. Portanto, o aumento da proporção de solventes orgânicos levou a uma separação melhor entre AmB e os interferentes.

Com o aumento da proporção de solventes orgânicos também ocorreu uma redução do tempo de retenção da AmB, como era esperado. Em fase reversa, como é o caso da fase estacionária C18, os solventes orgânicos possuem força de eluição maior do que a fase aquosa. Quando se empregou a proporção 70:30 o tempo de retenção da AmB foi de 5,7 minutos, sendo, portanto, a fase móvel escolhida para a validação do método analítico.

Tabela 4 – Resultados obtidos com as diferentes proporções SO:EDTA da fase móvel

SO: EDTA	Pureza	Tempo de retenção
55:45	~ 65%	~ 25 min
65:35	~ 73%	~ 9,5 min
70:30	~ 95%	~ 5,7 min

SO = solvente orgânico, EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

As condições cromatográficas utilizadas para a validação estão descritas **Tabela 5**.

Tabela 5 – Condições cromatográficas do método analítico para o doseamento de AmB por CLAE.

Parâmetros	Condições
Fase móvel (SO:EDTA)	Metanol/Acetonitrila/Tetraidrofurano (41/18/10) : Edetato dissódico 2,5 mM/L (70:30)
Vazão	1,0 mL/ min
Volume de injeção	20 µL
Deteção	405 nm
Temperatura	25 °C
Coluna	C ₁₈ (250x 4,6 mm; 5 µm)
Equipamento	Cromatógrafo Agilent série 1260 (Santa Clara, EUA), equipado com degaseificador, bomba quaternária (G1311B), forno (G1316A), injetor automático (G1329B) e detector de arranjo de diodos (DAD) (G4212B), software EzChrom.

SO = solvente orgânico, EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

5.2 Validação do método analítico

5.2.1 Seletividade

Na **Figura 11** estão apresentados os cromatogramas do padrão de AmB, da NE Branco, das substâncias utilizadas no preparo de amostra (metanol e DMSO) e da fase móvel. A análise de sobreposição dos perfis cromatográficos demonstrou não haver picos interferentes próximos ao tempo de retenção da AmB, que foi de aproximadamente 5,7 minutos, indicando que o método apresenta seletividade para a determinação do fármaco incorporado na NE. Essa conclusão é corroborada pela sobreposição dos cromatogramas do padrão de AmB e da NE-AmB observada na **Figura 12**. Pode-se, ainda, observar a separação de substância eluída entre 3,5 e 4,0 minutos, que, provavelmente, se trata da impureza Anfotericina X1 descrita por Chang e colaboradores (2011).

Figura 11 – Sobreposição de perfis cromatográficos para análise da seletividade do método.

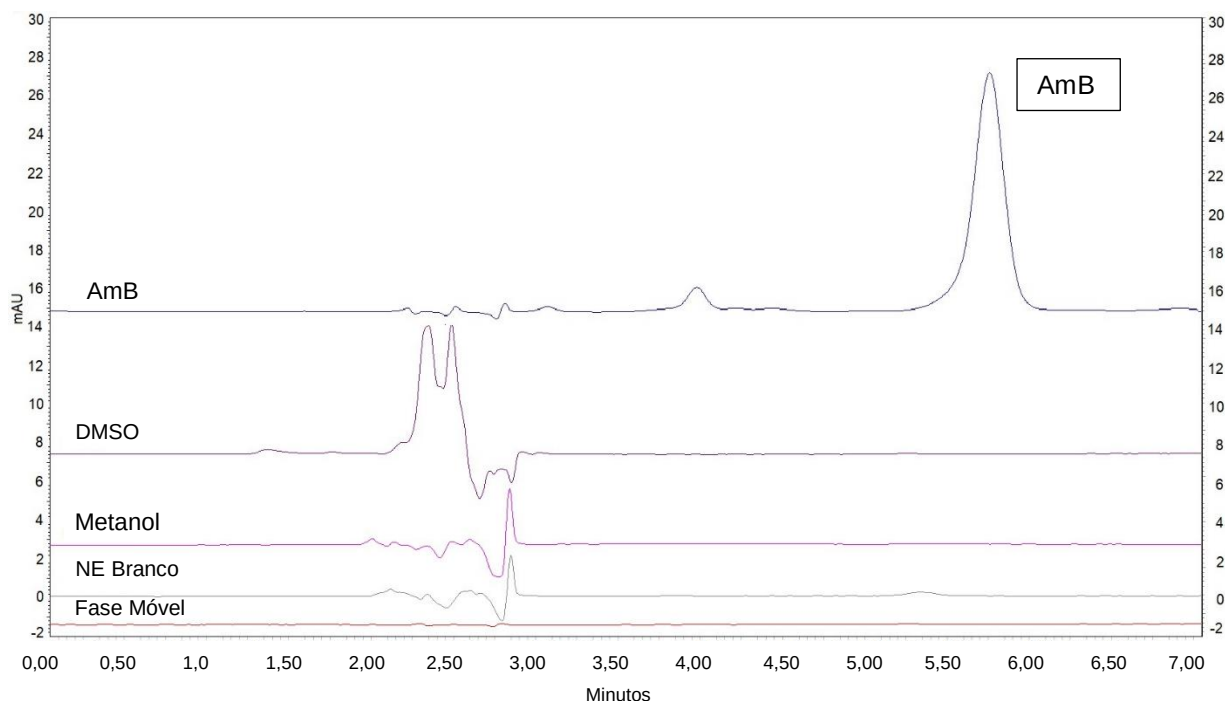
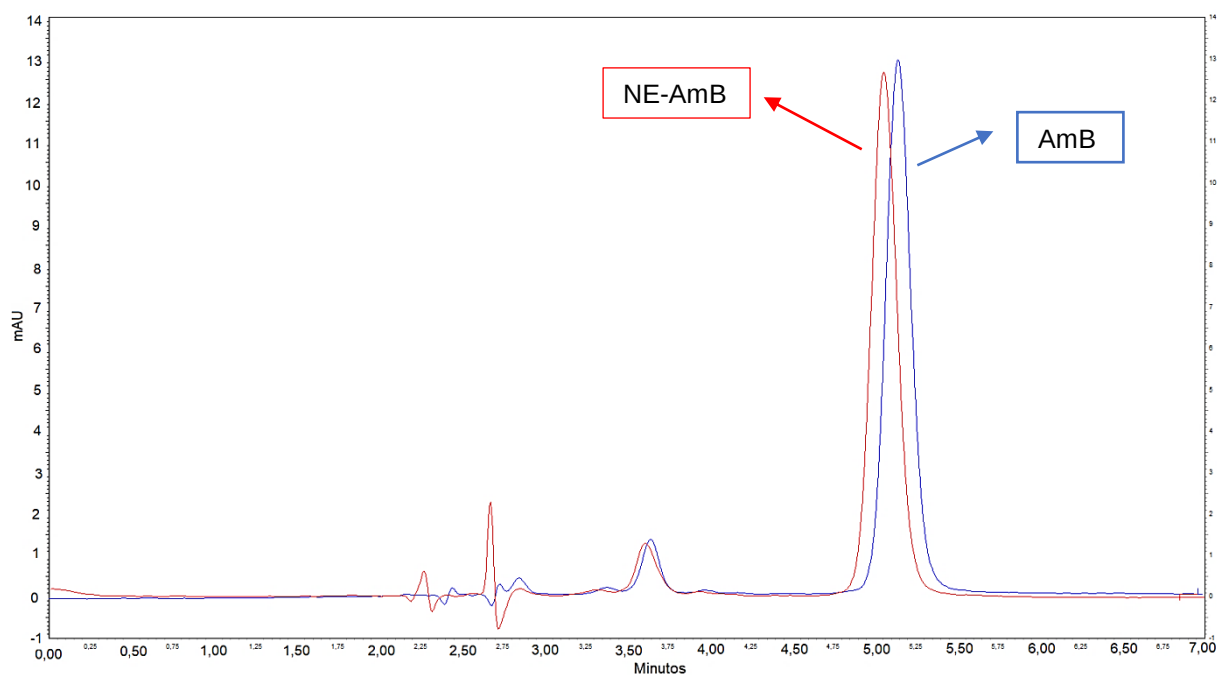


Figura 12 – Sobreposição dos perfis cromatográficos do padrão da AmB e da NE-AmB.



Ademais, os espectros de absorção dos cromatogramas do padrão (**Figura 13**) e da NE-AmB (**Figura 14**), no tempo de retenção do fármaco, possuem aspecto similar, sendo mais um indicativo da seletividade. Observaram-se, nos dois cromatogramas, três picos de absorção no espectro bem definidos, sendo os $\lambda_{\text{máx}}$ aproximadamente

363, 383 e 407 nm, compatível com o espectro da AmB relatado na literatura (TORRADO *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2011).

Figura 13 – Espectro de absorção no UV do cromatograma relativo ao padrão da AmB em dois ângulos: (A) frontal; (B) inclinado

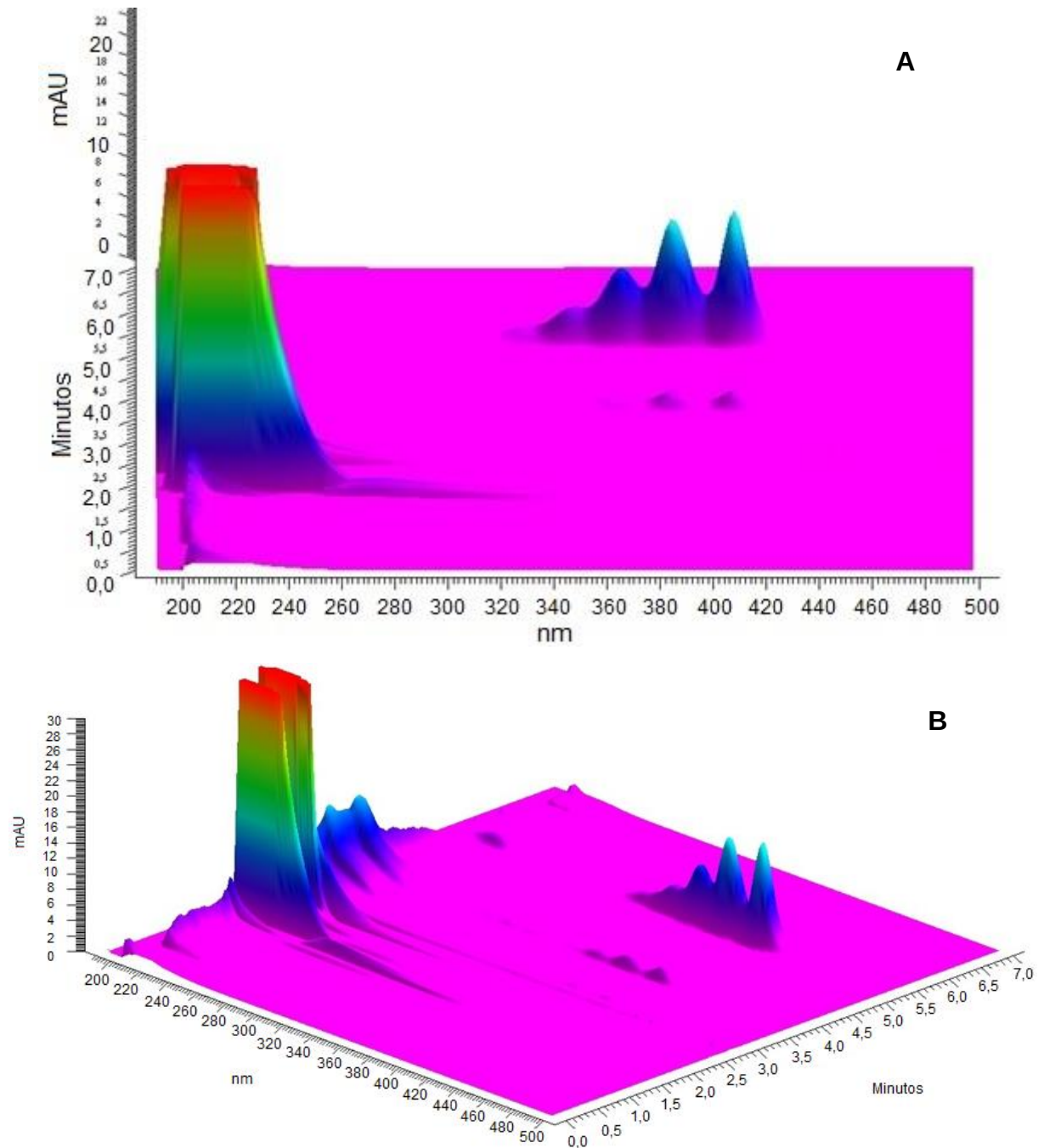
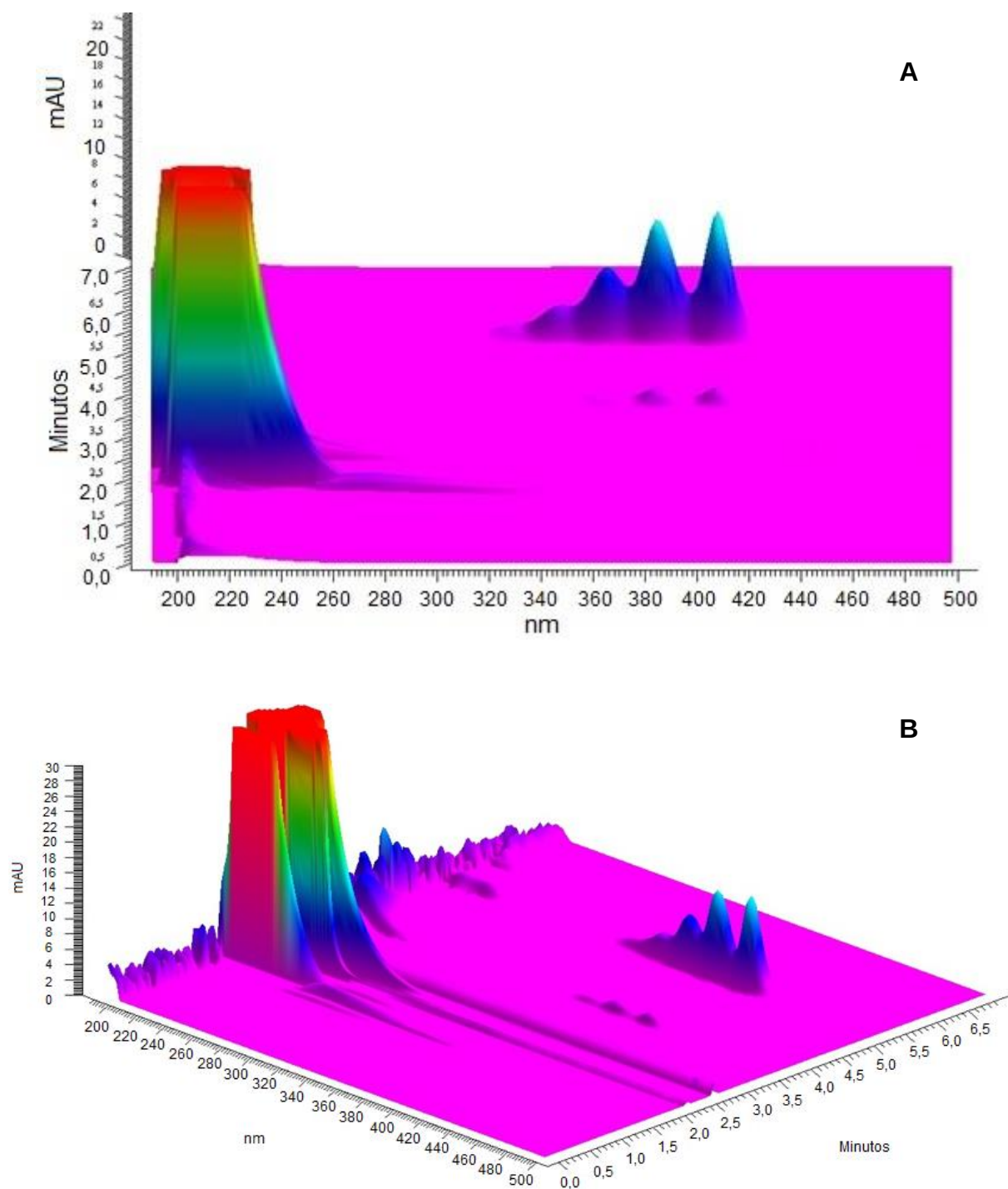


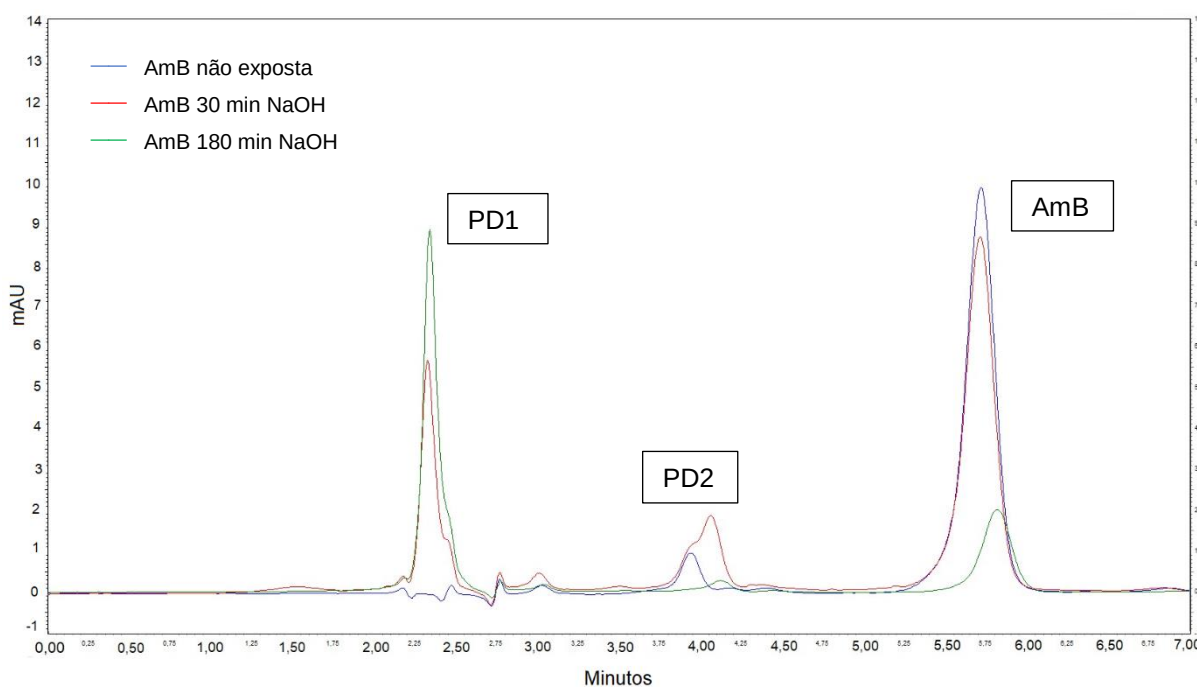
Figura 14 – Espectro de absorção no UV do cromatograma relativo à NE-AmB em dois ângulos: (A) frontal; (B) inclinado



No estudo de degradação alcalina, foram retiradas amostras nos tempos 2, 5, 30, 60, 120 e 180 minutos. Estão demonstrados na **Figura 15** os cromatogramas dos tempos 30 e 180 minutos, sobrepostos ao da AmB não exposta.

As porcentagens de AmB e dos produtos de degradação formados foram calculadas a partir da área do padrão AmB que não foi submetido à degradação alcalina e estão relacionadas na **Tabela 6**.

Figura 15 – Cromatogramas do padrão de AmB submetido à degradação alcalina (NaOH 0,2 mol/L) por 30 e 180 minutos sobrepostos ao da AmB não exposta.



Pela comparação dos cromatogramas da AmB não exposta e exposta por 30 minutos, pode-se observar a redução do pico da AmB, e o aumento dos picos em 2,3 minutos e próximo a 4 minutos, já existentes no cromatograma do padrão não submetido à degradação. Essa análise permite inferir o surgimento de dois produtos de degradação alcalina (PD1 e PD2) após 30 minutos de exposição alcalina, e a capacidade do método em separá-los do pico da AmB.

Já a observação do cromatograma relativo a 180 minutos de exposição em relação aos outros dois, mostra a redução tanto do pico da AmB quanto do produto de degradação 2 (PD2), enquanto há aumento do pico relativo ao produto de degradação 1 (PD1). Essa análise sugere que, mantendo-se a exposição ao ambiente alcalino, o PD2 anteriormente formado passa a ser degradado, enquanto há degradação progressiva da AmB. O mesmo pode ser inferido a partir dos dados da **Tabela 6**.

Considerando os cromatogramas e interpretação dos dados, pode-se dizer que os principais produtos de degradação formados se apresentam separados do pico da AmB e, assim, não interferem na sua determinação.

Tabela 6 – Porcentagem de AmB e seus produtos de degradação pelo tempo de exposição ao meio alcalino (NaOH 0,2 mol/L).

Tempo de exposição da AmB à solução de NaOH 0,2 mol/L	AmB (%)	PD1 (%)	PD2 (%)
Padrão (não exposto)	100	0,85	4,76
2 min	81,10	2,98	17,20
5 min	78,83	5,28	16,00
30 min	67,94	27,59	12,68
1h	55,85	47,35	9,07
2h	42,43	70,18	4,88
3h	32,37	78,31	3,08

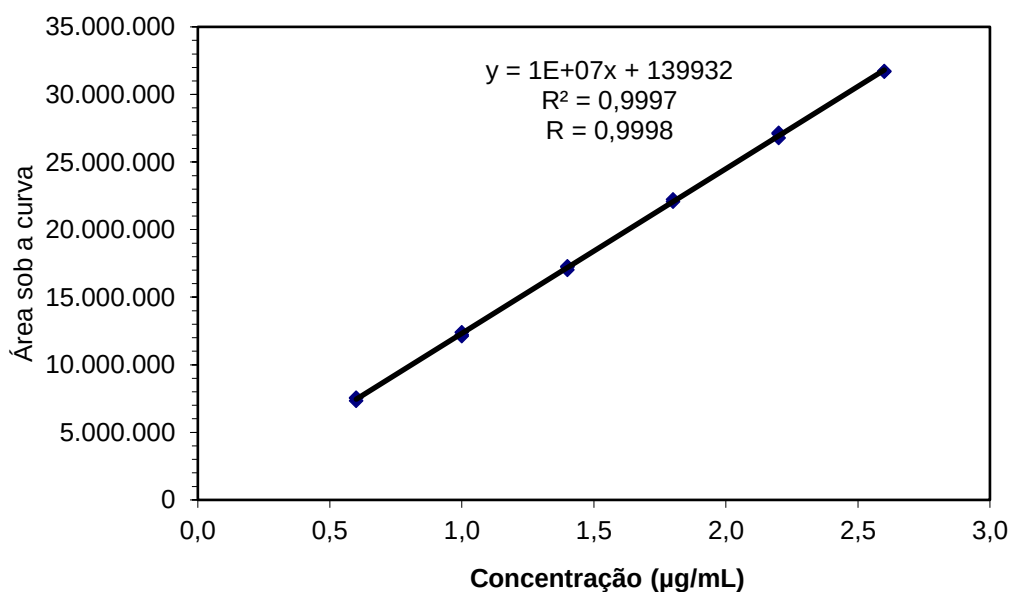
5.2.2 Linearidade

A linearidade do método de quantificação de AmB por CLAE foi verificada por meio da análise de três curvas analíticas no intervalo de concentração de 0,6 a 2,6 µg/mL, com seis níveis de concentração, igualmente espaçados.

Após a aplicação dos testes estatísticos, conclusão de que os resíduos atendem a todas as premissas necessárias para utilização dos métodos dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e de que os dados são adequados para o modelo linear, obteve-se uma curva analítica média, a equação da reta, o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de correlação (R), apresentados na **Figura 16**.

A linearidade do método de quantificação da AmB por CLAE foi confirmada no intervalo de concentração de 0,6 a 2,6 µg/mL. Conforme pode ser visto na **Figura 16**, o R^2 foi próximo de 1 (0,9997), indicando boa qualidade de ajuste do modelo, e o R foi maior que 0,99 (0,9998), estando em conformidade com a Resolução RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003), que preconiza como critério mínimo aceitável, um coeficiente de correlação (R) maior ou igual a 0,99.

Figura 16 – Curva analítica média, gerada a partir de três replicatas, para avaliação da linearidade do método de doseamento de AmB por CLAE.



5.2.3 Precisão

Os valores médios de área do pico referente à AmB, obtidos nos dois dias de análise, seus desvios padrão (DP) e os desvios padrão relativos (DPR) encontrados para cada nível de concentração analisado (0,6; 1,4 e 2,6 µg/mL) estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Valores de área e DPR estimados para precisão intra-corrida e inter-corridas de método de doseamento de AmB por CLAE (n=3).

	Concentração teórica (µg/ mL)	ASC Média ± DP	DPR (%)
1º Dia	0,6	7480145 ± 102311	1,4
	1,4	17181782 ± 120420	0,7
	2,6	31990359 ± 417690	1,3
2º Dia	0,6	7736836 ± 337066	4,3
	1,4	17406238 ± 120256	0,7
	2,6	33619754 ± 932187	2,8
Inter-corridas	0,6	7608490 ± 274449	3,6
	1,4	17294010 ± 167998	0,9
	2,6	32805056 ± 1101917	3,3

ASC = área sob a curva; DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo.

Os valores de DPR obtidos são inferiores a 5%, que é o valor máximo permitido pela Resolução RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003), indicando boa precisão intra-corrida (repetibilidade) e inter-corrida (precisão intermediária) do método de doseamento de AmB por CLAE.

5.2.4 Exatidão

De acordo com Green (1996) os valores de recuperação do fármaco em percentual, na avaliação da exatidão, devem variar entre 98-102%. A **Tabela 8** mostra que os resultados encontrados estão dentro desse intervalo, indicando que o método apresenta exatidão satisfatória para a quantificação da AmB presente na NE.

Tabela 8 – Porcentagem de recuperação de AmB adicionada ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento por CLAE (n=3).

Concentração teórica (µg/ mL)	Amostras	Concentração determinada (µg/ mL)	Recuperação (%)	Média de Recuperação (%)	DPR (%)
0,6	1	0,63	102,74	100,47	1,86
	2	0,58	97,08		
	3	0,61	101,64		
1,4	1	1,43	102,22	100,87	1,15
	2	1,4	100,12		
	3	1,4	100,29		
2,6	1	2,65	102,08	102,08	0,74
	2	2,65	101,88		
	3	2,66	103,27		
Média				101,15	-
DPR (%)				-	1,25

DPR = desvio padrão relativo.

5.2.5 Robustez

A robustez foi avaliada para os seguintes parâmetros: proporção de solvente orgânico na fase móvel, vazão de fase móvel, temperatura da coluna e marca da coluna. O teste estatístico aplicado aos dados de teor obtidos (**Tabela 9**) mostrou não haver diferença significativa entre os resultados dos parâmetros variados ($p > 0,05$). Ou seja, o método é robusto em relação às variações propostas das condições analíticas.

Tabela 9 – Teores de AmB obtidos com as variações dos parâmetros para o teste de robustez do método de doseamento por CLAE (n=3).

Condição	Teor AmB (%)			Média ± DP
	1	2	3	
Nominal	95,39	100,79	99,71	98,63 ± 2,86
30 °C	97,28	102,18	101,33	100,26 ± 2,62
Fluxo 0,9 mL/min	94,19	100,45	99,76	98,14 ± 3,43
Fluxo 1,1 mL/min	94,15	100,36	100,1	98,21 ± 3,51
FM=68:32 (SO:EDTA)	93,59	99,69	99,61	97,63 ± 3,49
FM=72:28 (SO:EDTA)	93,32	99,57	99,51	97,47 ± 3,59
Coluna	89,52	93,58	98,94	94,02 ± 4,72

DP = desvio padrão; FM = fase móvel; SO = solvente orgânico; EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

5.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação

A determinação dos limites de quantificação e de detecção foi realizada apenas de forma teórica, como uma estimativa a partir da curva analítica, segundo as equações do item 4.2.4.7. Os valores de LD e LQ encontrados foram de 0,0215 µg/mL e 0,0717 µg/mL, respectivamente. Conforme pode ser observado, as concentrações utilizadas na construção da curva analítica estão muito acima dos limites teóricos encontrados.

5.3 Avaliação da influência do colesterol na formulação

A fim de se investigar a influência do colesterol sobre as propriedades físico-químicas da NE, três NE contendo as concentrações de 0% (NE-AmB 0% Chol), 0,25% (NE-AmB 0,25% Chol) e 0,5% (NE-AmB 0,5% Chol) de colesterol foram preparadas.

Para avaliar a influência da concentração do colesterol no estado de agregação da AmB, foram obtidos os espectros no UV-Visível (**Figura 17**) e de dicroísmo circular (DC) (**Figura 18**) no tempo inicial (Tzero).

Figura 17 – Espectro UV-vis das NE-AmB nas diferentes concentrações de colesterol: 0%, 0,25% e 0,5%.

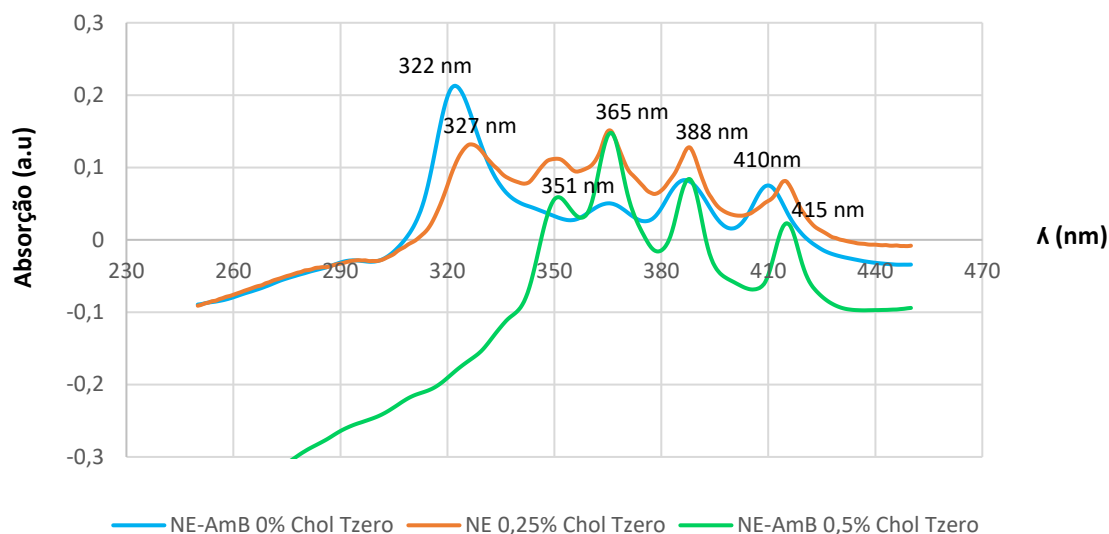
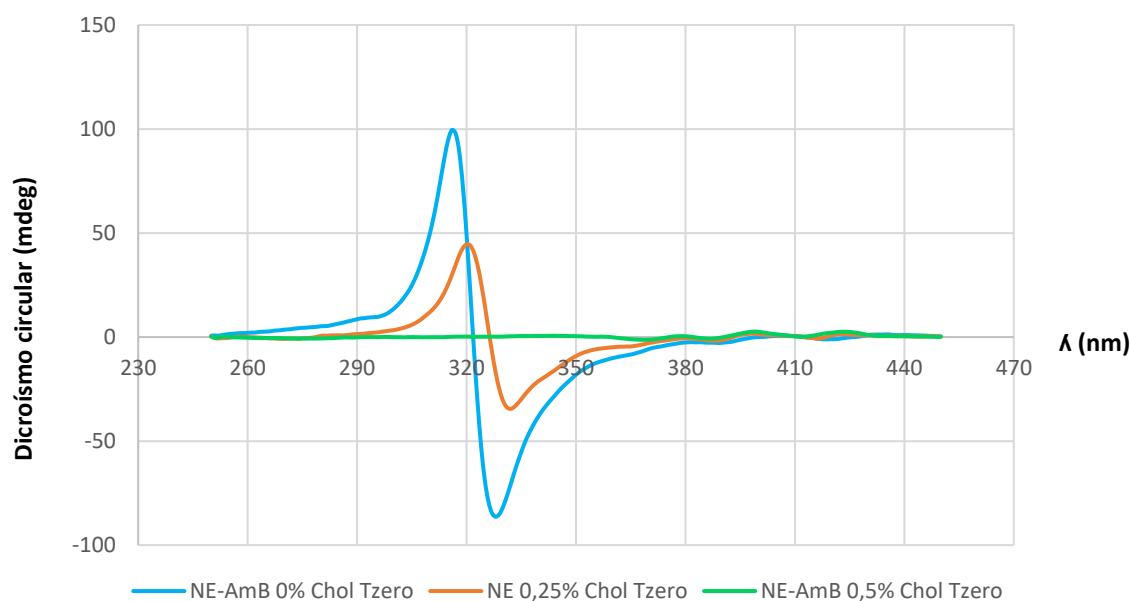


Figura 18 – Espectro de DC das NE-AmB nas diferentes concentrações de colesterol: 0%, 0,25% e 0,5%.



É descrito na literatura que a espectroscopia UV-Visível é sensível aos agregados da AmB, logo, os picos presentes no espectro indicam a existência dos seus diferentes estados de agregação (MÉNEZ *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2013). Espectros exibindo máximos em torno de 364, 383,5 e 407,5 nm, e ombro em 347 nm, são comumente atribuídos à espécie monomérica, enquanto a presença de pico em torno de 326 ou 340 nm é indicativa das espécies resultantes da autoassociação da

AmB (EGITO *et al.*, 2002; MÉNEZ *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2013).

Conforme pode ser visualizado na **Figura 17**, a NE-AmB 0,5% Chol possui somente quatro picos, que são próximos àqueles relatados para as espécies monoméricas (351, 365, 388 e 415 nm). As alterações nesses máximos de absorção em relação aos da literatura são esperadas para a AmB em formulação lipídica, uma vez que as características específicas do espectro dependem das mudanças conformacionais resultantes da associação do fármaco com outros compostos, como os lípides (SILVA *et al.*, 2013). Ao se diminuir pela metade a concentração do colesterol na formulação (NE-AmB 0,25% Chol) é observado o surgimento do pico indicativo de agregação em 327 nm, que inexistia para a NE-AmB 0,5% Chol. Para a NE-AmB 0% Chol o perfil do espectro se torna ainda mais diferente, com o desaparecimento do pico em 351 nm, deslocamento do pico de 415 para 410 nm, intensificação do pico em 322 nm e redução do pico em 365 nm. Essas modificações indicam aumento das formas autoassociadas, em detrimento das monoméricas, à medida que se reduz a concentração do colesterol.

Esses resultados são corroborados pelo experimento de DC. Espécies agregadas de AmB são caracterizadas pela presença de intenso sinal dicrótico entre 300 e 400 nm, esse sinal é drasticamente reduzido quando a AmB interage com os lípides e desaparece por completo quando ela está na forma monomérica (BARWICZ *et al.*, 2002; HARGREAVES *et al.*, 2006; JAMESON & DZYUBA, *et al.*, 2013; JOLY *et al.*, 1992, 1994; SILVA *et al.*, 2013). Consistente com a literatura, a **Figura 18** mostra intenso sinal em torno de 320 nm tanto para NE-AmB 0% Chol quanto para NE-AmB 0,25% Chol, indicando a presença de agregados. Entretanto, o sinal é visivelmente menor na presença de colesterol, o que sugere a interação do fármaco com este co-surfactante. Já para a NE-AmB 0,5% Chol este sinal está ausente, indicando que concentrações mais altas de colesterol levam a dissociação dos agregados, por formação de complexo AmB-colesterol, favorecendo a manutenção da forma monomérica (DIEZI & KWON, 2011; SAKA & MITA, 1998).

A presença do colesterol no ambiente em que se encontra a AmB parece favorecer a sua permanência na forma monomérica (DIEZI & KWON, 2011). Isso provavelmente

se deve à interação do fármaco com este componente da formulação. A esse respeito, cabe mencionar que a presença de picos em 350 e 415 nm (presentes para a NE-AmB 0,5% Chol e NE-AmB 0,25% Chol; **Figura 17**) tem sido associada à formação de complexos da AmB com os lípides presentes nas formulações. A banda de 415 nm, em particular, é identificada como característica da interação entre AmB e esteróis (CHARBONNEAU *et al.*, 2001; FOURNIER *et al.*, 1998). Portanto, a redução e desaparecimento do pico típico da forma agregada próximo a 320 nm, e o deslocamento do pico de 410 nm (na ausência de colesterol) para 415 nm, indicam a inserção da AmB no sistema carreador, quando o colesterol está presente (MÉNEZ *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001). Essa inserção parece aumentar à medida que se aumenta a concentração do colesterol, provavelmente como consequência da interação do fármaco com o esterol.

Dessa forma, considerando que a toxicidade observada na terapia é normalmente relacionada à presença do fármaco livre organizado na forma de agregados, a NE-AmB 0,5% Chol se mostrou a formulação mais promissora, a partir das análises de espectroscopia UV-Visível e de DC (EGITO *et al.*, 2002; JAIN & KUMAR, 2010).

Adicionalmente, estudos de estabilidade foram conduzidos. Os resultados para diâmetro médio, IP, potencial zeta, teor e TE são mostrados na **Tabela 10**.

A NE sem colesterol foi altamente instável, com separação de fases no dia seguinte ao de preparo (**Figura 19**), portanto, não foi avaliada a TE e os demais parâmetros só foram registrados no tempo inicial. O tamanho da AmB 0% Chol se mostrou maior que o das demais formulações. Houve redução pronunciada do teor total, uma vez que a AmB se precipitou no fundo do recipiente.

Tabela 10 – Estabilidade à 4° C das NE-AmB nas diferentes concentrações de colesterol: 0%, 0,25% e 0,5% (n=3).

Parâmetros	NE-AmB 0% Chol		
	1 dia	60 dias	120 dias
Diâmetro (nm)	213,8 ± 5,0	-	-
IP	0,19 ± 0,02	-	-
Potencial zeta (mV)	-27,5 ± 1,2	-	-
Teor (%)	68,9 ± 0,6	-	-
TE (%)	-	-	-
Parâmetros	NE-AmB 0,25% Chol		
	1 dia	60 dias	120 dias
Diâmetro (nm)	198,7 ± 4,2	205,6 ± 1,9	215,4 ± 3,5
IP	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,03
Potencial zeta (mV)	-28,7 ± 1,0	-26,3 ± 0,4	-26,2 ± 0,7
Teor (%)	85,3 ± 1,6	74,0 ± 4,4	64,2 ± 0,5
TE (%)	92,4 ± 2,5	80,3 ± 4,9	72,5 ± 4,6
Parâmetros	NE-AmB 0,5% Chol		
	1 dia	60 dias	120 dias
Diâmetro (nm)	189,2 ± 4,5	191,8 ± 1,2	192,5 ± 1,2
IP	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,135 ± 0,02
Potencial zeta (mV)	-30,9 ± 2,0	-28,5 ± 0,7	-27,2 ± 0,4
Teor (%)	89,4 ± 2,9	77,1 ± 2,5	78,4 ± 0,7
TE (%)	93,8 ± 0,4	87,6 ± 5,9	79,8 ± 0,1

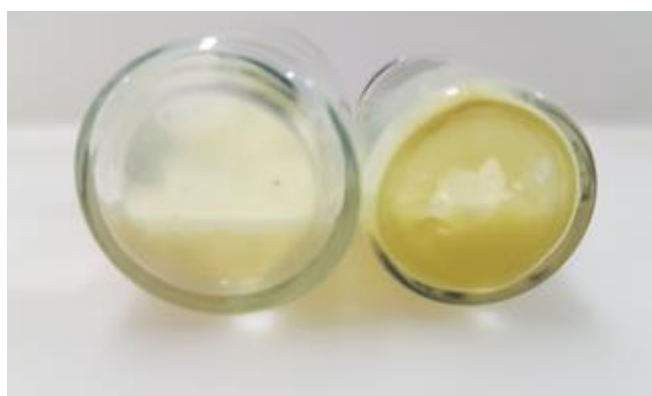
IP = Índice de polidispersão; TE = Teor de encapsulação. Os dados estão representados como média ± desvio padrão.

Figura 19 – NE-AmB 0% Chol após um dia de preparo.



Os dados são semelhantes para as NE-AmB 0,25% Chol e NE-AmB 0,5% Chol, observando-se ligeira diminuição do IP e tamanho de partícula com o aumento da concentração do colesterol. Não houve diferenças no potencial zeta. Entretanto, pode ser observada uma tendência de aumento de tamanho para a NE com menor concentração de colesterol, assim como maior redução do teor total, ao passar dos 120 dias. Ademais, cabe mencionar que, para a NE com 0,25% Chol, foi observado início de precipitação da AmB após 60 dias, sendo progressivo até os 120 dias avaliados. Não houve precipitação para a NE-AmB 0,5% Chol (**Figura 20**). A TE, todavia, manteve-se semelhante para as duas formulações. Isso pode ser explicado pela agitação manual anterior à amostragem que, provavelmente, favoreceu a ressuspensão de parte do fármaco e sua reassociação ao sistema, conforme indicado por outros autores para as emulsões lipídicas parenterais (SHADKHAN *et al.*, 1997; WALKER *et al.*, 1998).

Figura 20 – NE-AmB 0,5% Chol (à esquerda) e NE-AmB 0,25% Chol (à direita) após 120 dias de estabilidade.



Para investigar essa hipótese, o estudo foi repetido, adotando-se agitação mais branda antes da amostragem (**Tabela 11**).

A redução da TE na NE-AmB 0,5% Chol se mostrou semelhante à do estudo anterior. Para a NE-AmB 0,25% Chol, entretanto, a ação do tempo na variação da TE se mostrou mais expressiva, com maior redução desse parâmetro já em 90 dias de estabilidade, em comparação com o estudo anterior (120 dias). A queda da encapsulação ratifica a conjectura anteriormente levantada a respeito da influência da

homogeneização prévia à amostragem e revela maior instabilidade da formulação contendo concentração mais baixa de colesterol.

Tabela 11 – Estabilidade à 4° C das NE-AmB nas diferentes concentrações de colesterol (0,25% e 0,5%) adotando-se agitação mais branda anterior à amostragem (n=3).

Parâmetros	NE-AmB 0,25% Chol		
	1 dia	60 dias	90 dias
Teor (%)	82,3 ± 1,1	77,8 ± 0,9	76,8 ± 0,5
TE (%)	99,3 ± 3,8	69,0 ± 1,2	59,0 ± 1,6
Parâmetros	NE-AmB 0,5% Chol		
	1 dia	60 dias	90 dias
Teor (%)	86,1 ± 1,4	84,1 ± 3,3	82,9 ± 0,7
TE (%)	87,3 ± 3,1	80,8 ± 3,0	77,8 ± 1,6

IP = Índice de polidispersão; TE = Teor de encapsulação. Os dados estão representados como média ± desvio padrão.

Os dados da estabilidade são coerentes com aqueles encontrados para espectroscopia UV-Visível e de dicroísmo circular. Todos os experimentos mostram que com ausência do colesterol a NE exibe comportamento instável e o fármaco não se associa ao nanocarreador, resultando em grande quantidade de espécies agregadas. A adição do co-surfactante na concentração de 0,25% já proporciona melhora das características da formulação, evitando a separação de fases e reduzindo a autoassociação da AmB. Todavia, essa NE apresenta, mesmo logo após ao preparo, quantidade significativa de espécies relacionadas à toxicidade, que tendem a aumentar, uma vez que o sistema exibiu instabilidade ao longo do período avaliado. Somente a concentração de 0,5% de colesterol pareceu proporcionar ambiente favorável à devida inserção da AmB na partícula da NE, sem evidências de agregação do fármaco e com tendência de se manter estável. O modo provável pelo qual o colesterol atua na melhora das características da formulação é relacionado ao mecanismo de ação da AmB, que interage com os ergosteróis de membrana formando poros nas células. Na formulação, a AmB se liga ao colesterol presente na interface, que, por sua vez, serve como ancoragem ao fármaco, aumentando a estabilidade (TORRADO *et al.*, 2008; VAKIL & KWON, 2007).

Considerando que a NE-AmB 0,5% Chol apresentou as melhores características, essa formulação foi selecionada para dar prosseguimento aos estudos.

5.4 Estudo de estabilidade das nanoemulsões

Para esse estudo, a NE-AmB foi preparada utilizando-se homogeneizador de alta pressão e mantida sob refrigeração a 4 °C, conforme mencionado previamente.

Os resultados para diâmetro médio, IP, potencial zeta, teor total e TE nos períodos de 1, 60, e 180 dias estão mostrados na **Tabela 12**. Os valores médios foram comparados com aqueles obtidos logo após o preparo das formulações (Tempo 1 dia).

Tabela 12 – Estabilidade à 4° C da NE-AmB preparada utilizando-se o HAP (n = 3).

Parâmetros	NE-AMB		
	1 dia	60 dias	180 dias
Diâmetro (nm)	137 ± 0,8	144 ± 0,5	148 ± 2,5
IP	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02
Potencial zeta (mV)	-16,8 ± 0,1	-17,5 ± 1,5	-13,9 ± 3,2
Teor (%)	100,6 ± 2,4	97,2 ± 2,6	91,6 ± 1,5
TE (%)	101,9 ± 0,9	97,7 ± 2,8	93,0 ± 1,7

IP = Índice de polidispersão; TE = Teor de encapsulação. Os dados estão representados como média ± desvio padrão.

A NE-AmB demonstrou estabilidade adequada em termos de diâmetro médio, potencial zeta, teor total e TE durante o armazenamento por 180 dias, a 4°C. Esses dados estão em conformidade com os previamente descritos (CALDEIRA *et al.*, 2015).

O teor total e a TE, inicialmente próximos a 100%, mostraram redução de 8,9% e 8,7%, respectivamente, no tempo de 180 dias; entretanto, não foram observados aumentos dos picos de degradação. Esses parâmetros permaneceram elevados ao longo do estudo, com valores acima de 90%, estando em consonância com dados previamente descritos (CALDEIRA *et al.*, 2015). A título de comparação, a AmB foi incorporada em sistema micelar composto por TweenTM 80 a 2%. A TE já no dia seguinte ao de preparo se mostrou bastante reduzida (69,6%), com clara separação de fases. Esse dado está de acordo com a literatura, que indica a incorporação deficiente do fármaco em sistemas micelares, assim como sua rápida liberação (JUNG *et al.*, 2009).

O tamanho de partícula e IP são parâmetros de fundamental importância na caracterização da NE, tendo relação não só com a estabilidade, mas com a segurança desses sistemas em administrações parenterais (BENITA & LEVY, 1993). A NE em estabilidade demonstrou IP baixo (0,17) e dentro dos valores aceitáveis para a via endovenosa. Valores abaixo de 0,2 são indicativos de sistemas com pequena polidispersão e refletem, de forma geral, a estabilidade da formulação (BERNARDI *et al.*, 2011; MÜLLER *et al.*, 2004). Em relação ao diâmetro de partícula, observou-se pequeno aumento ao final dos 180 dias (de 137 para 148 nm). No entanto, esse tamanho pode ser considerado adequado para emulsões injetáveis (HIPPALGAONKAR *et al.*, 2010).

Em relação ao potencial zeta, é descrito na literatura que valores de módulo acima de 30 são desejáveis para garantir repulsão eletrostática entre as partículas, resultando em estabilização da emulsão (BENITA & LEVY, 1993). Todavia, a estabilização também pode ser alcançada por meio de impedimento estérico (GANTA *et al.*, 2014; TADROS *et al.*, 2004). Na NE em questão, o surfactante utilizado, Tween™ 80, proporciona o impedimento estérico por apresentar cadeia polimérica de óxido de etileno em sua composição. Portanto, embora os valores de potencial zeta tenham sido abaixo de 30, dados de IP e diâmetro comprovam estabilidade da NE, o que pode ser explicado pela estabilidade estérica conferida pelo Tween™ 80.

O estado de agregação da NE durante o período de armazenagem a 4 °C foi avaliado por espectroscopia UV-Visível (**Figura 21**) e DC (**Figura 22**). A NE-AmB se mostrou estável após 260 dias, sem o surgimento de picos indicativos de espécies agregadas.

Figura 21 – Espectro UV-visível da NE-AmB nos tempos zero (T0) e 260 dias (T260), em comparação com o Anforicin® e solução aquosa da AmB.

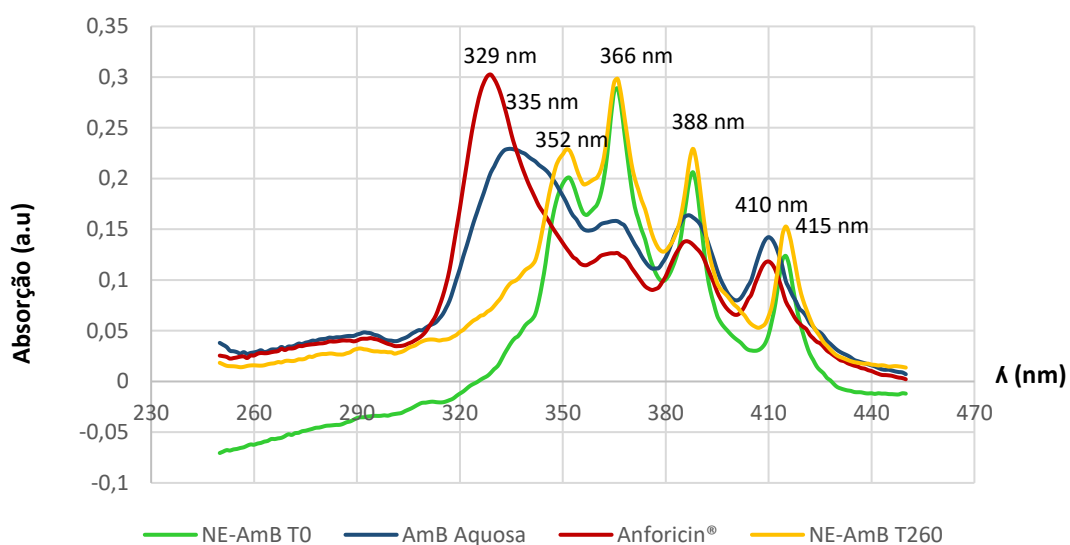
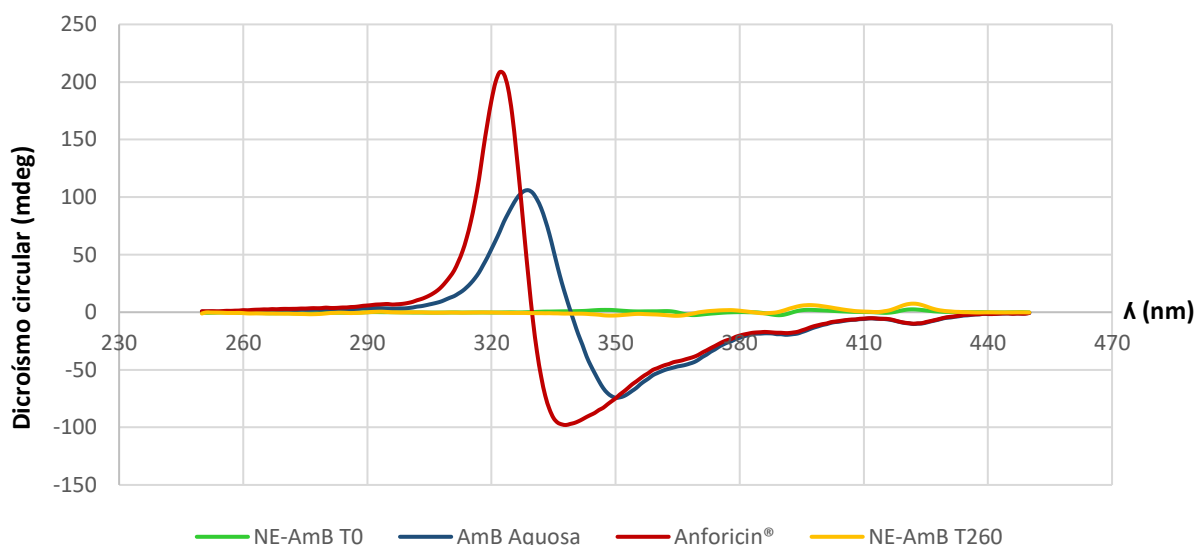


Figura 22 – Espectro de DC da NE-AmB nos tempos zero (T0) e 260 dias (T260), em comparação com o Anforicin® e solução aquosa da AmB.



Os espectros de UV-Visível do Anforicin® e da solução aquosa apresentam máximos de absorção em 366, 388 e 410 nm, esses picos, conforme discutido no item 5.3, representam a presença de espécie monomérica. No entanto, a ocorrência do fenômeno de associação da AmB é evidente para as duas formulações devido à presença de pico em 329 nm (Anforicin®) e 335 nm (AmB em solução aquosa) (EGITO *et al.*, 2002; MÉNEZ *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2013).

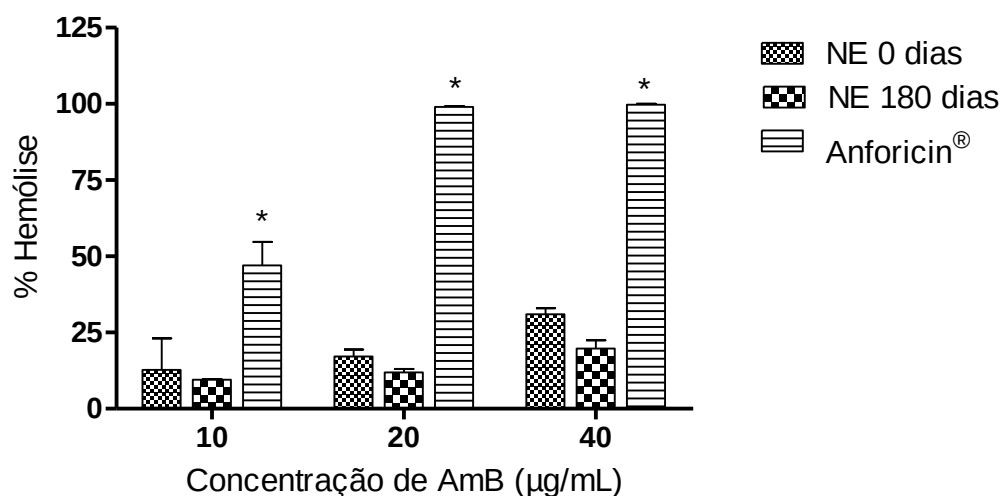
Para a NE-AmB, pode-se observar mudança do perfil dos espectros, em relação ao Anforicin® e solução aquosa. Os picos em 366 e 388 são mantidos, mas se tornam mais intensos, indicando maior proporção da forma monomérica. Percebe-se, ainda, o surgimento de ombro em 352 nm e deslocamento do pico de 410 para 415 nm. Conforme discutido no item **5.3**, espectros exibindo máximos em torno de 364, 383,5 e 407,5 nm, e ombro em 347 nm, são comumente atribuídos à espécie monomérica; a alteração nesses máximos de absorção (para 366, 388, 415 e ombro em 352 nm) é atribuída à associação do fármaco com os componentes da formulação, sendo que a presença de picos em 350 e 415 nm é característica da formação de complexos da AmB com os lípides da NE, especialmente com o colesterol. Outra mudança extremamente relevante no espectro é a inexistência de picos em 329 ou 335 nm, sugerindo a ausência de formas autoassociadas da AmB (CHARBONNEAU *et al.*, 2001; EGITO *et al.*, 2002; FOURNIER *et al.*, 1998; MÉNEZ *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001).

Esses dados são corroborados com os achados dos espectros de DC. O intenso sinal dicrótico em torno de 320 e 330 nm, característicos de espécies agregadas, são claramente observados para o Anforicin® e solução aquosa, respectivamente. Em contraste, esses sinais são virtualmente ausentes para a NE-AmB (**Figure 22**), indicando que o fármaco se encontra na forma monomérica, provavelmente associado aos lípides da formulação.

Deve ser enfatizado que mesmo após 260 dias em estabilidade a NE não apresenta indícios de agregação da AmB, enquanto esse fenômeno é evidente para o Anforicin®, logo após o preparo. A autoassociação da AmB é considerada como responsável pelos efeitos tóxicos da formulação convencional. Dessa forma, considerando os dados obtidos, espera-se observar menor toxicidade com a administração da NE-AmB, mesmo durante o período de estabilidade.

Para testar essa hipótese, foi realizado ensaio de atividade hemolítica *in vitro* com a NE em estabilidade a 4 °C, utilizando-se sangue de coelho. A hemólise induzida pela NE-AmB foi investigada no tempo zero e após 180 dias (**Figura 23**).

Figura 23 – Atividade hemolítica das formulações de AmB: NE-AmB nos tempos zero e 180 dias e Anforicin® (n=3).



* $p < 0,05$ quando comparado às NE-AmB, valores médios $\pm$ desvio padrão.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre a NE-AmB no tempo zero e após 180 dias sob refrigeração, para todas as concentrações avaliadas ($p > 0,05$), indicando, mais uma vez, que o sistema se manteve estável durante esse tempo. A hemólise induzida pela NE-AmB foi significativamente menor do que aquela induzida pela formulação convencional, em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$). A atividade hemolítica da formulação convencional é bem estabelecida, estando relacionada não só à presença do surfactante desoxicolato de sódio, que por si só já induz hemólise, mas também à presença de AmB na forma agregada (JAIN & KUMAR, 2010; SANTOS *et al.*, 2017). A inserção do fármaco no sistema lipídico, entretanto, está associada à redução da toxicidade às células vermelhas, uma vez que favorece a manutenção de espécies monoméricas. Esses resultados confirmam achados prévios, que indicam a capacidade da matriz lipídica de ancorar a AmB, especialmente por interação com o colesterol, possivelmente contribuindo para a redução da liberação de AmB e minimização do seu contato direto com os eritrócitos. Essa característica parece se manter durante o período de estabilidade avaliado (DIEZI & KWON, 2011; JUNG *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2017).

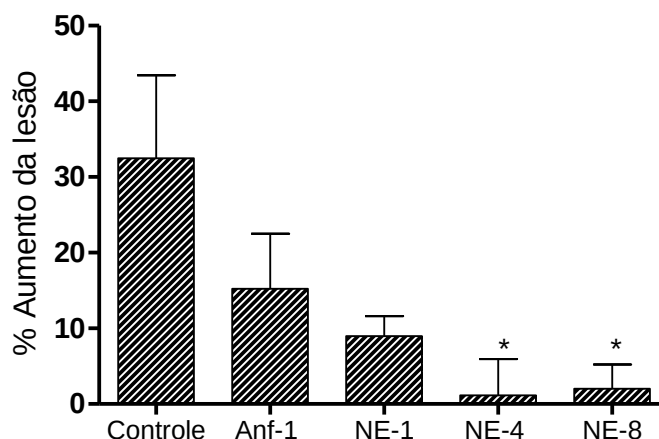
5.5 Avaliação da eficácia in vivo da NE-AmB

O estudo *in vivo* foi conduzido para avaliar a eficácia da NE-AmB em diferentes doses (1; 4 e 8 mg/kg) no tratamento de animais experimentalmente infectados com *L. (L.) major*, tendo como parâmetros a carga parasitária (na lesão e no baço) e o tamanho da lesão.

O tratamento iniciou seis semanas após a inoculação, sendo que os animais dos grupos controle, Anforicin®, NE-AmB 1 mg/kg/dia (NE-1), 4 mg/kg/dia (NE-4) e 8 mg/kg/dia (NE-8) apresentavam lesões com o tamanho médio de $5,7 \pm 1,4$; $5,6 \pm 1,2$; $6,1 \pm 1,0$; $5,5 \pm 1,5$ e $5,8 \pm 1,4$ mm, respectivamente. Ao fim do tratamento as lesões foram novamente medidas e determinado o percentual de aumento em relação à medida inicial. Os resultados mostraram uma tendência a estabilização das lesões nos animais dos grupos NE-4 e NE-8, o que pode ser observado na **Figura 24**, enquanto os animais dos outros grupos apresentaram um aumento da lesão. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle (32,5%), Anforicin® (15,2%) e NE-1 (9,0%) ($p > 0,05$). Os grupos NE-4 e NE-8 (1,2% e 2%, respectivamente) apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Não houve cicatrização completa das lesões em nenhum animal, uma vez que a avaliação foi realizada apenas até o término do tratamento, e esse processo é lento. Aguiar e colaboradores (2009) mostraram que animais infectados com *L. (L.) major*, utilizando o mesmo protocolo de inoculação, apresentaram a cicatrização completa da lesão apenas com 19 dias após o início do tratamento com paromomicina tópica associada à miltefosina oral ou 33 dias quando tratados apenas com paromomicina tópica.

A estabilização das lesões também foi observada para o Ambisome® administrado por via endovenosa, em seis dias alternados, em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* em dose igual ou superior a 12,5 mg/kg. Já o Anforicin® 1 mg/kg não foi considerado eficaz, assim como o Ambisome® na dose de 6,25 mg/kg (YARDLEY & CROFT, 1997). Esse dado é bastante interessante se compararmos aos resultados obtidos em nosso estudo, em que doses inferiores (4 e 8 mg/kg), por um período de tratamento menor (5 dias alternados), foram capazes de estabilizar a lesão dos animais.

Figura 24 – Avaliação da eficácia (% de aumento da lesão considerando-se o valor inicial) da NE-AmB em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*.

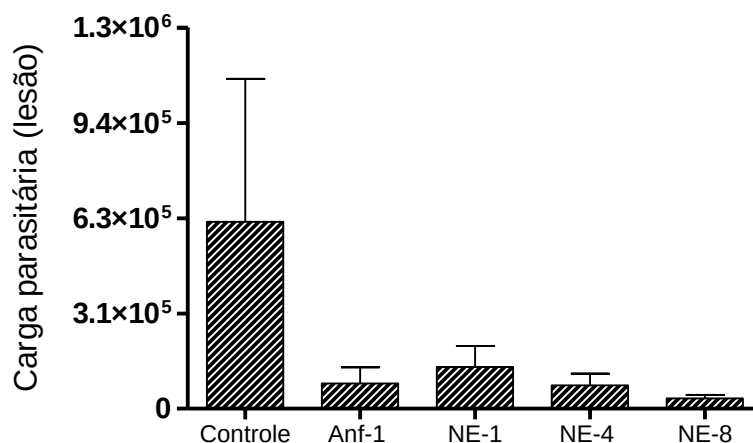


Após o desenvolvimento das lesões os animais foram tratados: solução estéril de glicose 5% (Controle), Anforicin® 1 mg/kg/dia (Anf-1), NE-AmB 1 mg/kg/dia (NE-1), NE-AmB 4 mg/kg/dia (NE-4), NE-AmB 8 mg/kg/dia (NE-8), por 5 dias alternados. As medições foram feitas no início e final do tratamento (* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle) (n=7).

Quando avaliada a carga parasitária no local de infecção (lesão), três dias após o fim do tratamento, o grupo controle ($6,1 \times 10^5$) apresentou uma média superior à observada nos grupos Anforicin® ($7,8 \times 10^4$), NE-1 ($9,3 \times 10^4$), NE-4 ($8,2 \times 10^4$) e NE-8 ($3,4 \times 10^4$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$), como apresentado na **Figura 25**.

Uma possível explicação para essa baixa eficácia, na redução da carga parasitária na lesão, seria a captação do sistema lipídico pelas células do SFM, proporcionando direcionamento passivo ao baço (TORRADO *et al.*, 2008). Essa captação pode reduzir a AmB disponível na corrente sanguínea, prejudicando sua chegada à derme. Assim, Yardley & Croft (1997) atribuem a redução/cicatrização das lesões a um efeito supressivo, porém não curativo. Os dados do presente estudo corroboram essa hipótese, já que, quando avaliada a carga parasitária na lesão, não há uma redução significativa em relação ao grupo controle, entretanto, há uma estabilização das lesões nas doses mais altas (4 e 8 mg/kg).

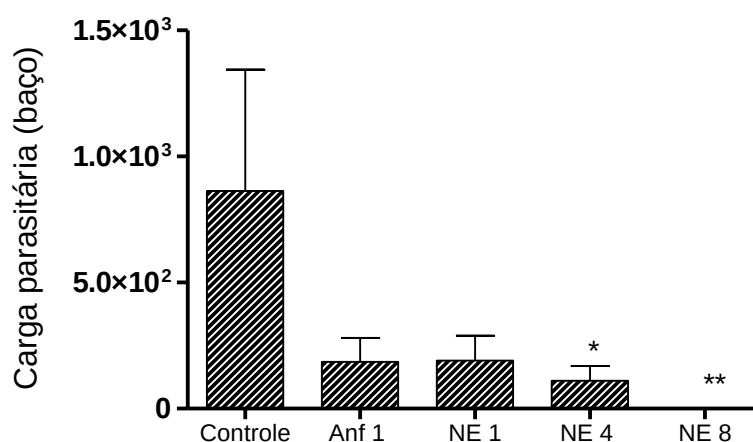
Figura 25 – Avaliação da eficácia (carga parasitária na lesão) da NE-AmB em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*.



Após o desenvolvimento das lesões os animais foram tratados: solução estéril de glicose 5% (Controle), Anforicin® 1 mg/kg/dia (Anf-1), NE-AmB 1 mg/kg/dia (NE-1), NE-AmB 4 mg/kg/dia (NE-4), NE-AmB 8 mg/kg/dia (NE-8), por 5 dias alternados. Três dias após o fim do tratamento, foi determinado o parasitismo tecidual (lesão), pelo método de diluição limitante (n = 7) (p<0,05).

Para investigar a eficácia sistêmica, a carga parasitária no baço foi avaliada. Conforme mostrado na **Figura 26**, a média de parasitos no grupo controle ($8,6 \times 10^2$) foi superior à observada nos demais grupos: Anforicin® ($1,9 \times 10^2$), NE- 1 ($1,9 \times 10^2$), NE-4 ($1,1 \times 10^2$) e NE-8 ($1,0 \times 10^0$). Os grupos Anforicin® e NE-1, não levaram à redução significativa da carga parasitária em relação ao grupo controle (p>0,05), também não houve diferença entre esses grupos (p>0,05). Em contraste, os animais tratados com a NE-4 e NE-8 apresentaram uma redução significativa da carga parasitária, quando comparado ao grupo controle (p<0,05). Esse resultado é condizente com a literatura, uma vez que as formulações lipídicas têm demonstrado eficácia principalmente em doses mais altas, em comparação com a formulação convencional (VYAS & GUPTA, 2006). A análise estatística dos dados mostrou, ainda, que a redução proporcionada pela NE-AmB à 8 mg/kg/dia foi significativa em comparação a todos os outros grupos, sendo, também, a única a demonstrar diferença significativa em relação ao Anforicin® (p<0,001). Cabe mencionar que para a dose de 8 mg/kg/dia não foi observada a presença de parasitos durante a avaliação das placas.

Figura 26 – Avaliação da eficácia (carga parasitária no baço) da NE-AmB em camundongos BALB/c infectados na base da cauda com *L. (L.) major*.



Após o desenvolvimento das lesões os animais foram tratados: solução estéril de glicose 5% (Controle), Anforicin® 1 mg/kg/dia (Anf-1), NE-AmB 1 mg/kg/dia (NE-1), NE-AmB 4 mg/kg/dia (NE-4), NE-AmB 8 mg/kg/dia (NE-8), por 5 dias alternados. Três dias após o fim do tratamento, foi determinada a carga parasitária no baço, pelo método de diluição limitante (*p < 0,05 quando comparado ao grupo controle; **p < 0,05 quando comparado aos grupos controle e Anf-1) (n = 7).

A ausência de parasitos no baço após a administração de sistemas lipídicos (Abelcet® e Ambisome®) também foi relatada por Gangneux e colaboradores (1996a; 1996b). Nesses estudos, entretanto, a espécie avaliada foi a *L. (L.) infantum*, sendo utilizada uma dose ainda maior, 12 mg/kg/dia por seis dias alternados. Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, também mostraram que a NE-AmB na dose de 1 mg/kg/dia apresentou eficácia no tratamento de animais infectados com *L. (L.) infantum chagasi* (p<0,05) (SANTOS *et al.*, 2017). Todavia, deve-se considerar que diferentes espécies e/ou cepas de *Leishmania* possuem características bioquímicas e moleculares específicas que refletem em diferentes graus de sensibilidade perante os fármacos, e, assim como a via de administração e protocolos de tratamento, podem ser considerados fatores importantes para a eficácia do tratamento (ESCOBAR *et al.*, 2002; YARDLEY & CROFT, 1997). De fato, essa influência pode ser observada por comparação com o presente estudo, em que o Anforicin® 1 mg/kg/dia não apresentou diferença estatística comparado ao grupo controle, enquanto redução significativa foi observada por Santos e colaboradores (2017).

É importante ressaltarmos que não foram administradas doses mais altas do Anforicin® nesse estudo, devido ao relato de toxicidade em doses superiores a 1 mg/kg/dia (YARDLEY & CROFT, 1997; SANTOS *et al.*, 2017). Não foram observados perda de peso ou outros sinais de toxicidade aguda (como agitação, prostração e pilereção) durante o tratamento dos animais, em todos os grupos.

6 CONCLUSÃO

Considerando o potencial das formulações lipídicas em reduzir a toxicidade associada à AmB, este trabalho buscou caracterizar NE relatada por Santos e colaboradores (2017) durante seu período de estabilidade e testar sua eficácia em modelo animal de LT, como alternativa para o tratamento endovenoso.

O método analítico para determinação quantitativa de AmB por CLAE foi otimizado e se mostrou adequado, atendendo às especificações preconizadas por Brasil (2003) e sendo capaz de promover a separação da AmB dos seus produtos de degradação alcalina resultantes da técnica de preparo.

Foi possível estabelecer a importância do colesterol na manutenção das características físico-químicas da formulação. A concentração de 0,5% colesterol favoreceu a presença de espécies monoméricas da AmB, relacionadas a menores índices de toxicidade, e proporcionou estabilidade à formulação. Os estudos seguintes confirmaram a estabilidade pelo período de 180 dias, em que os parâmetros se mantiveram apropriados para administração endovenosa e com valores de teor total e TE acima de 90%. Ademais, a formulação apresentou menor toxicidade hemolítica *in vitro* que a convencional, mesmo após 180 dias de preparo.

A atividade leishmanicida da NE-AmB foi similar àquela obtida para o Anforicin® em relação à redução da carga parasitária no sítio de infecção, quando administrados na mesma dose. Entretanto, a NE possibilitou a administração da AmB em maiores doses, o que resultou em inibição do desenvolvimento da lesão e redução significativa da carga parasitária no baço já na dose de 4 mg/kg. Aumento de dose, para 8 mg/kg, se mostrou tolerado proporcionando a eliminação dos parasitos no baço.

Assim, diante dos resultados encontrados, este trabalho indica o potencial das NE para o carreamento da AmB no tratamento parenteral da LT.

Perspectivas

Como perspectivas para a continuidade deste trabalho sugerem-se:

- Estudo de estabilidade acelerada e prolongada conforme a Resolução – RE nº 1, de 29 de julho de 2005.
- Estudo de liberação *in vitro* da AmB presente na NE, para se estimar o comportamento da formulação após administração e consequente diluição no após administração endovenosa.
- Estudo de biodistribuição a fim de se conhecer o comportamento da nanoestrutura *in vivo*, investigar a capacidade da NE-AmB atingir a lesão e confirmar sua maior captação pelo baço.
- Avaliação da eficácia da NE-AmB no tratamento experimental em espécies causadoras da LT no Novo Mundo.
- Estudo *in vivo* para avaliação da eficácia da NE-AmB associada a tratamento tópico da LT, por exemplo, com gel de paromomicina.
- Estudos de toxicidade crônica e aguda da NE-AmB em modelo animal, conforme guias da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. G.; SILVA, D. L.; NUNAN, F. A.; NUNAM, E. A.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. M. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, p. 1234–1240, 2009.

AKHTER, S.; ANWAR, M.; SIDDIQUI, M. A.; AHMAD, I.; AHMAD, J.; AHMAD, M. Z.; BHATNAGAR, A.; AHMAD, F. J. Improving the topical ocular pharmacokinetics of an immunosuppressant agent with mucoadhesive nanoemulsions: Formulation development, in-vitro and in-vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 148, p. 19-29, 2016.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, p. 497-506, 2011.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, v. 22, p. 552-557, 2006.

ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; DEN BOER, M.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J.-P.; GRADONI, L.; HORST, R. T.; LOPEZ-VELEZ, R.; MORENO, J. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 35, p. 699-705, 2010.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 31, p. 109-118, 2012.

ARAÚJO, I.B.; BRITO, C.R.N.; URBANO, I.A.; DOMINICI, V.A.; FILHO, M.A.S.; SILVEIRA, W.L.L.; DAMASCENO, B.F.G.I.; MEDEIROS, A.C.; EGITO, E.S.T. Similarity between the *in vitro* activity and toxicity of two different fungizone™/lipofundin™ admixtures. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 22, p. 451-458, 2005.

ARAÚJO, F. A.; KELMANN, R. G.; ARAÚJO, B. V.; FINATTO, R. B.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, p. 238-245, 2011.

BARWICZ, J.; BEAUREGARD, M.; TANCREDÉ, P. Circular dichroism study of interactions of Fungizone or AmBisome forms of amphotericin B with human low density lipoproteins. *Biopolymers*, v. 67, p. 49-55, 2002.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 82, n. 11, p.1069-1079, 1993.

BERMAN, J. D. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 16, p. 397-401, 2003.

BERMAN, J. D.; BADARO, R.; THAKUR, C. P.; WASUNNA, K. M.; BEHBEHANI, K.; DAVIDSON, R.; KUZOE, F.; PANG, L.; WEERASURIYA, F.; BRYCESSOM, A. D. M; Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 76, p. 25-32, 1998.

BHOSALE, R. R.; OSMAL, R. A.; GHODAKE, P. P.; SHAIKH, S. M.; CHAVAN, S. R. Nanoemulsion: A Review on Novel Profusion in Advanced Drug Delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, v. 2, n. 1, p. 122-127, 2014.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 2 jun 2003.

British Pharmacopeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2012, p. 7200.

CALDEIRA, L. R.; FERNANDES, F. R.; COSTA, D. F.; FRÉZARD, F.; AFONSO, L. C. C.; FERREIRA, L. A. M. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 70, p. 125-131, 2015.

CARNEIRO, G.; GONTIJO, M. A.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. M. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 9, p. 1-15, 2012.

Centers for disease control and prevention. Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: abril de 2017.

CHANG, Y.; WONG, Y-H.; HU, C-Q. Simultaneous determination of purity and potency of amphotericin B by HPLC. *The Journal of Antibiotics*, v. 64, p. 735-739, 2011.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOAELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews*, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHARBONNEAU, C.; FOURNIER, I.; DUFRESNE, S.; BARWICZ, J.; TANCREDE, P. The interactions of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy. *Biophysical Chemistry*, v. 91, p. 125-133, 2001.

CHATTOPADHYAY, A.& JAFURULLA, M.D. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 416, p. 7-12, 2011.

DAVIDSON, R. N. Leishmaniasis. *Medicine*, v. 33, p. 43-46, 2005.

DAROLE, P. S.; HEGDE, D. D.; NAIR, H. A. Formulation and Evaluation of Microemulsion Based Delivery System for Amphotericin B. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 9, n.1, p. 122-128, 2008.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIEZI, T. A.; KWON, G. Amphotericin B/Sterol Co-loaded PEG-Phospholipid Micelles: Effects of Sterols on Aggregation State and Hemolytic Activity of Amphotericin B. *Pharmaceutical research*, v. 29, p. 1737-1744.

DUPOND, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 31-36, 2002.

EGITO, E.S.T.; FESSI, H.; APPEL, M.; BARRATT, G.; LEGRAND, P.; BOLARD, J.A morphological study of an amphotericin B emulsion-based delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 145, p. 17-27, 1996a.

EGITO, E. S. T.; APPEL, M.; FESSI, H.; BARRATT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. In-vitro and in-vivo evaluation of a new amphotericin B emulsion-based delivery system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 38, p. 485-497, 1996b.

EGITO, E.S.T.; ARAÚJO, I.B.; DAMASCENO, B.P.G.L.; PRICE, J.C. Amphotericin B/emulsion admixture interactions: an approach concerning the reduction of amphotericin B toxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91, n. 11, p. 2354-2366, 2002.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S. L. Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, v. 81, p. 151-157, 2002.

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

FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Amphotericin B associated with triglyceride-rich nanoemulsions stability studies and *in vitro* antifungal activity. *Química Nova*, v. 31, p. 591-594, 2008.

FOGANHOLI, J. N.; ZAPPA, V. Importância da leishmaniose na saúde pública. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. Ano IX, Num. 17, 2011.

FOGLIA, F.; FRAGNETO, G.; CLIFTON, L. A.; LAWRENCE, M. J.; BARLOW, D. J. Interaction of Amphotericin B with Lipid Monolayers. *Langmuir*, v. 30, p. 9147-9156, 2014.

FOURNIER, I.; BARWICZ, J.; TANCREDE, P. The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1373, p. 76-86, 1998.

GANGNEUX, J-P.; SULAHIAN, A.; GARIN, Y.J-F.; FARINOTTI, R.; DEROUIN, F. Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, n. 5, p. 1214-1218, 1996a.

GANGNEUX, J-P.; SULAHIAN, A.; GARIN, Y.J-F.; DEROUIN, F. Lipid formulations of amphotericin B in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, p. 574-577, 1996b.

GANTA, S. TALEKAR, M.; SINGH, A.; COLEMAN, T. P.; AMIJI, M. M. Nanoemulsions in Translational Research—Opportunities and Challenges in Targeted Cancer Therapy. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 15, n.3, p. 694-708.

GOLSENER, J.; FRANKENBURG, S.; EHRENFREUND, T.; DOMB, A. J. Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with Amphotericin B Arabinogalactan water-soluble derivatives, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 9, p. 2209-2214, 1999.

GOLSENER, J.; DOMB, A. New formulations and derivatives of amphotericin B for treatment of leishmaniasis. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, v. 6, p. 153-162, 2006.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 71-80, 2003.

GOTO, H; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 8, p. 419-433, 2010.

GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry News & Features*, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GREVELINK, S. A.; LENER, E. A. Leishmaniasis. *Journal of the American Academic Dermatology*, v. 34, p. 257-272, 1996.

HARGREAVES, P.L.; NGUYEN, T-S.; RYAN, R.O. Spectroscopic studies of amphotericin B solubilized in nanoscale bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, p. 38-44, 2006.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 25, p. 363-370, 2000.

HU, Q.; GERHARD, H.; UPADHYAYA, I.; VENKITANARAYANAN, K.; LUO, Y. Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying Technologies. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 87, p. 130-140, 2016.

IMAN, M; HUANG, Z.; SZOKA JR, F. C.; JAAFARI, M. R. Characterization of the colloidal properties, *in vitro* antifungal activity, antileishmanial activity and toxicity in mice of a distigmasterylhemisuccinoyl-glicero-phosphocholine liposome-intercalated amphotericin B. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 408, p. 163-172, 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604-15, 2011.

JAIN, J. P.; KUMAR, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes on (PEG)₃PLA copolymers: factors affecting size and *in vitro* evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 20, p. 456-465, 2010.

JAIN, S.; VALVI, P. U.; SWARNAKAR, N. K.; THANKI, K. Gelatin Coated Hybrid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery of Amphotericin B. *Molecular Pharmaceutics*, v. 9, p. 2542-2553, 2012.

JAMESON, L. P.; DZYUBA, S. V. Circular Dichroism Studies on Intermolecular Interactions of Amphotericin B in Ionic Liquid-Rich Environments. *Chirality*, v. 25, p. 427-432, 2013.

JUNG, S. H.; LIM, H. D.; JUNG, S. H.; LEE, J. E.; JEONG, K-S.; SEONG, H.; SHIN, B. S. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, p.313-320, 2009.

JOLY, V.; BOLARD, J.; SAINT-JULIEN, L.; CARBON, C.; YENI, P. Influence of phospholipid/amphotericin B ratio and phospholipid type on *in vitro* renal cell toxicities and fungicidal activities of lipid-associated amphotericin B formulations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, p. 262-266, 1992.

JOLY, V.; FARINOTTI, R.; SAINT-JULIEN, L.; CHÉRON, M.; CARBON, C.; YENI, P. *In vitro* renal toxicity and *in vivo* therapeutic efficacy in experimental murine cryptococcosis of amphotericin B (Fungizone) associated with Intralipid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 177-183, 1994

LANCE, M.R.; WASHINGTON, C.; DAVIS, S.S. Structure and toxicity of amphotericin B/triglyceride emulsion formulations. *Journal of Antimicrobial Chemistry*, v. 36, p. 119-128, 1995.

LEGRAND, P.; ROMERO, E. A.; COHEN, B. E.; BOLARD, J. Effects of Aggregation and Solvent on the Toxicity of Amphotericin B to Human Erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n 11, p. 2518-2522, 1992.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. AMPHOTERICIN B. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 68, p. 151- 162, 2005.

LENIADO-LABORÍN, R. & CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 26, n.4, p. 223-227, 2009.

MALTEZOU, H. C.; Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 1-8, 2010.

MATLASHEWSK, G. Leishmania infection and virulence. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 190, p. 37-42, 2001.

MCCALL, L.I.; ZHANG, W. W, MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis. *PLoS Pathogens*, v. 9, p. 1-7, 2013.

MÉNEZ, C.; LEGRAND, P.; ROSILIO, V.; LESIEUR, S.; BARRATT, G. Physicochemical characterization of molecular assemblies of miltefosine and amphotericin B. *Molecular Pharmaceutics*, v. 4, p. 281-288, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Brasil, 1ª ed., 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Brasil, 1ª ed., 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual da leishmaniose tegumentar*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Brasil, 1ª ed., 2017.

MINODIER, P. & PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 5, p. 150-158, 2007.

MOHAMED-AHMED, A. H. A.; BROCCINI, S.; CROFT, S. L. Recent advances in development of amphotericin B formulations for the treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents*, v. 25, n. 6, p. 695-702, 2012.

MOHAMED-AHMED, A. H. A.; LES, K. A.; SEIFERT, K.; CROFT, S. L.; BROCCINI, S. Noncovalent Complexation of Amphotericin-B with Poly(α -glutamic acid). *Molecular pharmaceutics*, v. 10, p. 940-950, 2013.

MORENO, M.A.; FRUTOS, P.; BALLESTEROS, M.P. Lyophilized lecithin based oilwater microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 3, p. 344-351, 2001.

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

MÜLLER, R.H.; SCHIMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHIMITT, J.; BRÖMER, S. SolEmuls®-novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 269, p. 293-302, 2004.

MURRAY, H. W. Treatment of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar): A Decade of Progress and Future Approaches. *International Journal of Infectious Diseases* v.4, n. 3, p. 158-177, 2000.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *The Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) atlas: a manual for health workers*. Geneva, World Health Organization, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a manual for case management and control: report of a WHO consultative meeting, Kolkata, India, 2–3 July 2012*. Geneva, World Health Organization, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniasis Fact Sheet. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniasis – Situation and trends. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis: 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html>. Acesso em: 18 dez. 2017.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, p. S10-S18, 2014.

PAPAHADJOPOULOS, D. Fate of liposomes in vivo: a brief introductory review. *Journal of Liposome Research*, v. 6, n. 1, p. 3-17, 1996.

PAVLI, A. & MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, p. 1032-1039, 2010.

PHAM, C. T. N.; THOMAS, D. G.; BEISER, J.; MITCHELL, L. M.; HUANG, J. L.; SENPAN, A.; HU, G.; GORDON, M.; BAKER, N.A.; PAN, D.; LANZA, G. M.; HOURCADE, D. E. Application of a hemolysis assay for analysis of complement activation by perfluorocarbon nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 10, p. 651-660, 2010.

PRENTICE, H.G.; HANN, I.M.; HERBRECHT, R.; AOUN, M.; KVALOY, S.; CATOVSKY, D.; PINKERTON, C.R.; SCHEY, S.A.; JACOBS, F.; OAKHILL, A.; STEVENS, R.F.; DARBYSHIRE, P.J.; GIBSON, B.E.S. A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. *British Journal of Haematology*, v. 98, p. 711-718, 1997.

PISCOPO, T. V. & AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*, v. 82, p. 649-657, 2006.

RANCHÈRE, J.Y.; LATOUR, J.F.; FUHRMANN, C.; LAGALLARDE, C.; LOREUIL, F. Amphotericin B intralipid formulation: stability and particle size. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 37, p. 1165-1169, 1996.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v.7, p. 581-596, 2007.

RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; POZO-RODRÍGUEZ, A.; SOLINÍS, M. A. Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 1833- 1843, 2014.

ROMERO, G. A. S.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N.; ALMEIDA, R. P.; MELO, E. N.; CARVALHO, S. F. G.; RABELLO, A.; CARVALHO, A. L.; SOUSA, A. Q.; LEITE, R. D.; LIMA, S. S.; AMARAL, T. A.; ALVES, S. P.; RODE, J.; the Collaborative LV Brasil Group. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, p. 1-25, 2017.

SAKA, Y.; MITA, T. Interaction of amphotericin B with cholesterol in monolayers, aqueous solutions, and phospholipid bilayers. *Journal of Biochemistry*, v. 123, p. 798-805, 1998.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. *Parasitological Research*, v.103, p.1-10, 2008.

SANTOS, C. M.; OLIVEIRA, R. B.; ARANTES, V. T.; CALDEIRA, L. R.; OLIVEIRA, M. C.; EGITO, E. S. T.; FERREIRA, L. A. M. Amphotericin B-loaded Nanocarriers for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Development, Characterization, and In Vitro Skin Permeation Studies. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 1–8, 2012.

SANTOS, D. C. M. Avaliação da toxicidade e eficácia de nanoemulsões contendo anfotericina B para o tratamento da leishmaniose visceral. 130 p., Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2016a.

SANTOS, D. C. M.; LIMA, M. L.; TOLEDO, J. S.; FERNANDES, P. A.; AGUIAR, M. M. G.; LÓPEZ-GONZÁLVES, A.; FERREIRA, L. A. M.; FERNANDES, A. P.; BARBAS, C. Metabolomics as a tool to evaluate the toxicity of formulations containing amphotericin B, an antileishmanial drug. *Toxicology Research*, 2016b.

SANTOS, D. C. M.; SOUZA, M. L. S.; TEIXEIRA, E. M.; ALVES, L. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. M.; AGUIAR, M. M. G. A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. *Journal of Drug Targeting*, p. 1-10, 2017.

SHADKHAN, Y.; SEGAL, E.; BOR, A.; GOV, Y.; RUBIN, M.; LICHTENBERG, D. The use of commercially available lipid emulsion for the preparation of amphotericin B-lipid admixtures. *The British Society for Antimicrobial Chemotherapy*, v. 39, p. 655-658, 1997.

SILVA, A. E.; BARRATT, G.; CHÉRON, M.; EGITO, E. S. T. Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453, p. 641-648, 2013.

SOLOMONS, M.; BAUM, S.; BARZILAI A.; SCOPE, A.; TRAU, H.; SCHWARTZ, E. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 56, n. 4, p. 612-616, 2007.

SOLOMONS, M.; PAVLOTSKY, F.; LESHEM, E.; EPHROS, M.; TRAU, H.; SCHWARTZ, E. Liposomal amphotericin B treatment of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 25, p. 973-977, 2011.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos*. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2007.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, p. 1-10, 2017.

STOCKDALE, L.; NEWTON R.A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, p. 1-15, 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J; AGARWAL, D.; SHAH, A.; AGRAWAL, N. RAI, M. Safety of a pre-formulated amphotericin B lipid emulsion for the treatment of Indian Kala-azar. *Tropical Medicine and International Health*, v. 12, n. 9, p. 1208-1212.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 14, p. 53-63, 2013.

SUNDAR, S.; PANDEY, K.; THAKUR, C. P.; JAH, T. K.; DAS, V. N. R.; VERMA, N.; LAL, C. S.; VERMA, D.; ALAM, S.; DAS, P. Efficacy and Safety of Amphotericin B Emulsion versus Liposomal Formulation in Indian Patients with Visceral Leishmaniasis: A Randomized, Open-Label Study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, p. 1-7.

TAMILVANAM, S. Formulation of multifunctional oil-in-water nanosized emulsions for active and passive targeting of drugs to otherwise inaccessible internal organs of the human body. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 381, p. 62-76, 2009.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 7 ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), 2010.

THORNTON, S. J.; WASAN, K. M.; PIECUCH, A.; LYND, L. L. D.; WASA, E. K. Barriers to treatment for visceral leishmaniasis in hyperendemic areas: India, Bangladesh, Nepal, Brazil and Sudan. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 36, n.11, p. 1312-1319, 2010.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKUMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 15, p. e525–e532, 2011.

TORRADO, J. J.; ESPADA, R.; BALLESTEROS, M. P.; TORRADO-SANTIAGO, S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n.7, p. 2405-2425, 2008.

VAKIL, R.; KWON, G. S. Effect of Cholesterol on the Release of Amphotericin B from PEG-Phospholipid Micelles. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 1, p. 98-104, 2007.

VANLERBERGHE, V.; DIAP, G.; GUERIN, D. J.; MEHEUS, F.; GERSTL, S.; VAN DER STUYFT, P.; BOELAERT, M. Drug policy for visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis. *Tropical Medicine and International Health*, v.12, n. 2, p. 274-283, 2007.

VYAS, S.P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, n.4, p. 417-432, 2006.

YARDLEY, V.& CROFT, S. L. Activity of Liposomal Amphotericin B against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, n. 4, p. 752-756, 1997.

YARDLEY, V. & CROFT, S. L. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 13, p. 243–248, 2000.

WALKER, S.; TAILOR, S.A.N.; LEE, M.; LOUIE, L.; LOUIE, M.; SIMOR, A.E. Amphotericin B in lipid emulsion: stability, compatibility, and in vitro antifungal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n.4, p. 762-766, 1998.

WINGARD, J. R.; WHITE, M. H.; ANAÏSSIE, E.; RAFFALLI, J.; GOODMAN, J.; ARRIETA, A. A Randomized, Double-Blind Comparative Trial Evaluating the Safety of Liposomal Amphotericin B versus Amphotericin B Lipid Complex in the Empirical Treatment of Febrile Neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 31, p. 1155–1163, 2000.