

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

DANIELLE SÓTER DO NASCIMENTO DAMASIO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SISTEMA AUTO
EMULSIONÁVEL CONTENDO FEXINIDAZOL NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL EXPERIMENTAL**

BELO HORIZONTE – MG

2021

DANIELLE SÓTER DO NASCIMENTO DAMASIO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SISTEMA AUTO
EMULSIONÁVEL CONTENDO FEXINIDAZOL NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira

Coorientadora: Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar

BELO HORIZONTE – MG

2021

D155d Damasio, Danielle Sóter do Nascimento.
Desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia de sistema auto emulsionável contendo fexinidazol no tratamento da leishmaniose visceral experimental / Danielle Sóter do Nascimento Damasio. – 2021.

105 f. : il.

Orientador: Lucas Antônio Miranda Ferreira.

Coorientadora: Marta Marques Gontijo de Aguiar.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

1. Emulsões (Farmácia) – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Teses. 3. Liberação controlada de fármacos – Teses. I. Ferreira, Lucas Antônio Miranda. II. Aguiar, Marta Marques Gontijo de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.9364



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

*“DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SISTEMA AUTO EMULSIONÁVEL
CONTENDO FEXINIDAZOL NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL”*

DANIELLE SÓTER DO NASCIMENTO DAMASIO

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

Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Profa. Dra. Délia Chaves Moreira dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Prof. Dr. Frederic Jean Georges Frezard
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 16 de junho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Délia Chaves Moreira dos Santos, Usuário Externo**, em 16/06/2021, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior**, em 16/06/2021, às 12:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marta Marques Gontijo de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 16/06/2021, às 12:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Carla Furtado Mosqueira, Usuário Externo**, em 16/06/2021, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Antônio Miranda Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 18/06/2021, às 08:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederic Jean Georges Frezard, Professor do Magistério Superior**, em 18/06/2021, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0779950** e o código CRC **2E17C71E**.

COLABORADORES

Dra. Eliane de Moraes Teixeira

Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz/Minas

Dra. Simone Odília Antunes Fernandes

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia,
UFMG*

Msc. Kátia Duarte Vital

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia,
UFMG*

Eduardo Burgarelli Lages

Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia, UFMG

Patrícia Andrade Antunes

Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia, UFMG

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus pela força e direção e à minha família por sempre acreditar no meu potencial

AGRADECIMENTOS

A Deus por plantar em mim o desejo de dar seguimento na minha carreira, pela força para conciliar todas as minhas tarefas e pelas bençãos diárias.

Aos meus pais Vicente e Marli pela torcida costumeira, pelas orações e apoio com Esther; aos meus irmãos Rodrigo e Alexandre por participarem com admiração e alegria pelas minhas conquistas; à minha cunhada Chris pela torcida e à Bella que ouviu minhas apresentações e sempre opinou com tanto interesse. Aos meus queridos sobrinhos Sofia, Laura e Léo pela alegria que trazem. À minha prima Mirelle, também farmacêutica, pela torcida, confiança e pelo convite para apresentar meu trabalho no Congresso de Farmácia da Unilavras. A todos os familiares que sempre torceram por mim.

Faço um agradecimento especial ao meu marido Marcelo que sempre apoiou minhas ideias, acompanhou minhas dificuldades, compreendeu minhas ausências e cuidou tão bem da nossa Esther para que eu pudesse me dedicar em dias e horários, as vezes tão adversos. Muito obrigada. Esta conquista é nossa. Também agradeço a minha Teté, minha mini cientista, sua alegria me impulsiona!

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Lucas Antônio Miranda Ferreira. Sua orientação começou na iniciação científica. Fase que foi muito importante na minha formação pois desde aquele tempo comecei adquirir um perfil de organização e um olhar mais detalhista. Estas características foram e são fundamentais na minha vida profissional. Obrigada por me receber tantos anos depois para a orientação no doutorado. Sua experiência, gentileza e primazia pela qualidade científica de todos os planejamentos, execução dos ensaios, análise dos resultados e rigor na escrita me ensinaram muito.

À minha co-orientadora, Prof. Marta Marques Gontijo Aguiar por ter sempre uma palavra otimista, pelas muitas contribuições científicas e pelos conselhos. Sua participação em todos os momentos e nos ensaios animais foram fundamentais e me ensinaram demais. Obrigada pelo rigor necessário, pelas análises estatísticas e pela parceria. Aliás, eu, você e o Lucas trabalhamos sempre planejando e analisando todos os resultados juntos. Este compartilhamento de ideias em conjunto foi fundamental para as decisões. Agradeço aos dois por compreenderem a divisão do meu tempo entre a docência e o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do LTF e do PFA/FAFAR pela gentileza e compartilhamento de conhecimento. Obrigada à professora Dra. Simone Odília (ACT/FAFAR) pela receptividade e parceria no ensaio de permeabilidade intestinal e qualificação de tese. Aos professores: André Augusto Gomes Faraco (UFMG), Frederic Jean Georges Frezard (UFMG) e Gisele Assis Castro Goulart (UFMG) pelas contribuições na banca da minha qualificação de tese.

A todos os alunos do LTF, sempre gentis e solidários em compartilhar experiências científicas, de vida e por tantos favores durante todo o tempo.

Ao Gabriel que sempre trocou informações tão valiosas comigo. Agradeço também pela amizade e companhia.

Ao Eduardo Burgarelli que me ajudou tanto durante os ensaios com HPLC. Tornou se um amigo especial. Tem minha admiração por sua inteligência, disponibilidade incondicional e pela sua maneira tão agradável de ser.

À Larissa e Raphaella. Que prazer em conviver com vocês. Nossa passagem pelo Congresso MedTrop juntas foi demais. Obrigada por toda ajuda que me deram nos ensaios, pela amizade e convivência.

À Kátia Vital pela parceria nos ensaios animais. Aprendi muito com a sua experiência, eficiência e agilidade. Obrigada pela amizade e confiança.

A Patrícia Antunes por partilhar dos ensaios de estabilidade e me dar a oportunidade de co orientar seu TCC.

A todos os alunos que tive contato durante a realização das disciplinas, em especial à Lara Rinco, Flávia Lima, André Nascimento, Gabriel Borges e Líndicy na parceria durante os trabalhos. Sou grata por conhecer pessoas que compartilharam seus projetos e ideias e que contribuíram também para minha formação. Foi muito interessante poder fazer a disciplina Diagnóstico clínico-laboratorial e tratamento das leishmanioses no Centro de Pesquisa René Rachou pois conheci profissionais tão excelentes. Foi fundamental acompanhar os atendimentos no ambulatório e entender como a doença afeta a vida do paciente e quão importantes são as pesquisas para promoção de saúde.

Aos funcionários da faculdade de farmácia: Marton, sempre com informações acadêmicas precisas. Ao Batista e Adelaide por suas contribuições e ensinamentos no trato com animais. Aos funcionários do LTF: Eduardo e Ernane pela disponibilidade, e mais recentemente à Nazaré com sua energia boa, disponibilidade e eficiência. Agradeço também ao farmacêutico Vinícius pela gentileza e treinamentos em diversos equipamentos.

Ao Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC), René Rachou (Fiocruz). Obrigada à Dr^a. Eliane Moraes por disponibilizar o LPC para um dos ensaios com animais, por toda ajuda, amizade e compartilhamento de experiência.

Aos meus amigos da IBL Concórdia que me apoiam, incentivam e oram por mim. À querida Carla Aguilar que sempre me inspira, instrui com palavras assertivas vindas do Alto, e me faz prosseguir.

Por fim, a todas as pessoas que torceram e colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho. Obrigada!

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”

Sócrates

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento são antimoniais, anfotericina B, paromomicina e miltefosina, todos com limitações. Como alternativa aos fármacos convencionais foi demonstrada atividade antileishmanicida de um nitroimidazol, de baixa solubilidade em água, o fexinidazol (FEX). Para incorporação de FEX foi desenvolvido um sistema auto emulsionável de liberação de fármacos (em inglês, self emulsifying drug delivery systems, SEDDS) que é um sistema administrado por via oral. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um SEDDS contendo FEX, caracterizar e avaliar a eficácia de SEDDS FEX para utilização no tratamento da leishmaniose visceral experimental. Após estudo de solubilidade do FEX em diversos excipientes desenvolveu-se uma formulação composta por Tween 80[®], Span 80[®], Kolliphor RH 40[®] e triglicérides do ácido cáprico caprílico. SEDDS FEX 10 mg/mL apresentou-se como líquido amarelado, límpido. Após diluição em água gerou nanoemulsão com tamanho médio de partícula 79 ± 3 nm, índice de polidispersão (IP) $0,237 \pm 0,016$, potencial zeta $-21,9 \pm 4,5$ e em fluido gástrico simulado pH 1,2 (94 ± 9 nm) e fluido intestinal simulado pH 6,8 (97 ± 2 nm), sem precipitação de FEX na avaliação por microscopia ótica de luz polarizada. A formulação apresentou-se robusta à diluição com tamanhos de partícula médio de 81 ± 3 nm, 78 ± 1 nm, 88 ± 4 nm e 86 ± 3 nm, quando diluído 100, 200, 500 e 1000 vezes em água, respectivamente. Para estudos de eficácia antileishmania, o tratamento de camundongos infectados por *Leishmania infantum* com SEDDS FEX na dose de 50 mg/Kg/dia foi o único que levou a uma redução significativa da carga parasitária ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos SEDDS branco e controle, nos dois avaliados órgãos (baço e fígado) em 10 dias. Não houve aumento da permeabilidade intestinal nas condições de teste. Esses achados sugerem que o SEDDS FEX pode ser uma alternativa oral promissora para o tratamento da leishmaniose visceral causada por *L. infantum*.

Palavras-chave: fexinidazol; leishmaniose visceral; sistema auto-emulsionável de liberação de fármacos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The drugs currently available for treatment are antimonials, amphotericin B, paromomycin and miltefosine, all with limitations. As an alternative to conventional drugs was demonstrated antileishmanicidal activity of a nitroimidazole, with low solubility in water, fexinidazole (FEX). For FEX incorporation, a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) was developed, which is an orally administered system. The objective of this work was to develop a SEDDS containing FEX, to characterize and evaluate the effectiveness of FEX SEDDS for use in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. After studying the solubility of FEX in different excipients, a formulation composed of Tween 80®, Span 80®, Kolliphor RH 40® and caprylic caprylic acid triglycerides was developed. FEX SEDDS 10 mg/mL appeared as a clear, yellowish liquid. After dilution in water the nanoemulsion have mean particle size 79 ± 3 nm, polydispersion index (IP) 0.237 ± 0.016 , zeta potential -21.9 ± 4.5 and in simulated gastric fluid pH 1.2 (94 ± 9 nm) and simulated intestinal fluid pH 6.8 (97 ± 2 nm), without FEX precipitation in the evaluation in the evaluation by polarized light optical microscopy. The formulation was robust to dilution with mean particle sizes of 81 ± 3 nm, 78 ± 1 nm, 88 ± 4 nm, and 86 ± 3 nm, when diluted 100, 200, 500 and 1000 times in water, respectively. For studies of antileishmania activity, the treatment of mice infected with *Leishmania infantum* with FEX SEDDS at dose of 50 mg/Kg/day was the only one that led to a significant reduction in the parasitic load ($p < 0.05$) when compared to the white and control SEDDS groups, in the two evaluated organs (spleen and liver) in 10 days. There was no increase in intestinal permeability under the test conditions. These findings suggest that SEDDS FEX may be a promising oral alternative for the treatment of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum*.

Keywords: fexinidazole; visceral leishmaniasis; self-emulsifying drug delivery system.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	25
Figura 2. Taxa de Letalidade de Leishmaniose Visceral de 2012 a 2019	27
Figura 3. Fórmula estrutural do fexinidazol e seus metabólitos	30
Figura 4. Solubilização micelar de fármaco hidrofóbico no duodeno	34

Capítulo 1

Figura 5. Obtenção de filtrado contendo FEX em excipientes para SEDDS	48
Figura 6. Rota de diluição para doseamento de FEX por espectrofotometria	49
Figura 7. Preparo de SEDDS FEX	50
Figura 8. Curva analítica média, gerada a partir de três replicatas, para avaliação da linearidade do método de doseamento de FEX por espectrofotometria no ultravioleta	54
Figura 9. Representação gráfica da curva analítica média para avaliação da linearidade do método de doseamento de FEX por CLAE	57
Figura 10. Cromatogramas de amostras de SEDDS, SEDDS FEX e padrão de FEX em 320 nm	58
Figura 11. Efeito da concentração de surfactantes no tamanho de glóbulos e IP	64
Figura 12. Microscopia de luz polarizada para visualização de FEX	66
Figura 13. Microscopia SEDDS FEX 10 mg/mL diluída em diversas proporções	67
Figura 14. Microscopia SEDDS FEX em MSG pH 1,2 e MSI pH 6,8	68
Figura 15. Teor de FEX em MSG e MSI antes e após filtração em membrana 0,45 µm	69
Figura 16. Microscopia de luz polarizada nos tempos inicial (T0) e após 3 (T3) e 6 (T6) meses de armazenamento dos SEDDS à temperatura ambiente	71

Figura 17. Cromatogramas de SEDDS FEX no tempo inicial e após 6 meses de estudo de estabilidade	72
Capítulo 2	
Figura 18. Esquema da fita de Whatman	78
Figura 19. Avaliação da carga parasitária no baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> após 5 dias de tratamento	83
Figura 20. Massa dos animais no início e fim do estudo	84
Figura 21. Carga parasitária no baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> utilizada como parâmetro de avaliação de eficácia <i>in vivo</i> de SEDDS FEX com tratamento de 10 dias.....	85
Figura 22. Massa dos animais durante o período do estudo de 10 dias de tratamento	86
Figura 23. Permeabilidade intestinal determinada em % dose / g de ^{99m} Tc-DTPA no sangue	88
Figura 24. Massa dos animais durante o período do estudo de 10 dias	88

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1. Sistema de Classificação de Formulações lipídicas: componentes, características, vantagens e desvantagens	35
--	----

Capítulo 1

Tabela 2. Condições cromatográficas de análise	45
---	----

Tabela 3. Absorbâncias das diluições dos excipientes em DMSO, em 320 nm	55
--	----

Tabela 4. Valores de absorbância e DPR estimados para precisão intra-corrída e inter-corrídas de método de doseamento de FEX por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (n=3)	56
--	----

Tabela 5. Recuperação média e Desvio Padrão Relativo (DPR) para determinação da exatidão	59
---	----

Tabela 6. Determinação da repetibilidade (precisão intra-dia)	60
--	----

Tabela 7. Recuperação média frente a alteração de condições de parâmetros para análise de robustez	61
---	----

Tabela 8. Solubilidade de FEX em diferentes excipientes	62
--	----

Tabela 9. Composição das formulações dos SEDDS branco (% p/p) e efeito da variação de óleo, emulsionante, co emulsionante nas propriedades físico-químicas	63
---	----

Tabela 10. Caracterização de SEDDS FEX 10 mg/mL F08, F10, F14 e F16	65
--	----

Tabela 11. Tamanho e IP de SEEDS-FEX 10 mg/mL diluída em diversas proporções	67
---	----

Tabela 12. Características de SEDDS-FEX em fluido gástrico simulado (pH 1,2) e fluido intestinal simulado (pH 6,8)	68
---	----

Tabela 13. Estabilidade do SEDDS (10 mg/mL) após 6 meses em temperatura ambiente (25°C)	70
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
Sb ⁺⁵	Antimônio pentavalente
DAD	Arranjo de diodo
AUC _{0-t}	Área abaixo da curva
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BCS	Biopharmaceutics Classification System
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
b	Coefficiente angular
r	Coefficiente de correlação linear
r ²	Coefficiente de determinação
c	Coefficiente linear
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CEUA/UFMG	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais
λ	Comprimento de onda
C _{max}	Concentração máxima
C _{MD}	Concentração média determinada
cpm	Contagem de radioatividade por minuto
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
DP	Desvio Padrão
σ	Desvio padrão do intercepto com eixo Y
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTPA	Dietilenoaminopentacético
^{99m} Tc-DTPA	Dietilenoaminopentacético marcado com tecnécio
DMSO	Dimetilsulfóxido

ΔG	Energia livre associada ao processo
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
FEX	Fexinidazol
F1 a F16	Formulações F1 a F16
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
GI	Gastrointestinais
GpP	Glicoproteína P
IP	Índice de polidispersão
DND <i>i</i>	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
IC	Inclinação da reta ou da curva de calibração
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
®	Marca Registrada
mV	Milivolts
MMQO	Mínimo Múltiplos Quadrados Ordinários
Min	Minuto
MSG	Meio simulado gástrico
MSI	Meio simulado intestinal
O/A	Óleo em Água
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Padrão analítico
% dose/g	Porcentagem da dose de radiação/grama de sangue

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada.
SEDDS	Self emulsifying drug delivery systems
SEDDS FEX	Self emulsifying drug delivery systems contendo FEX
SNEDDS	Self nanoemulsifying drug delivery systems
SFB	Soro bovino fetal
TCM	Triglicéride de cadeia média
TGI	Trato Gastrointestinal
UR	Umidade Relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 GERAL	22
2.2 ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Leishmanioses.....	24
3.1.1 Leishmaniose Tegumentar	25
3.1.2 Leishmaniose Visceral	26
3.2 Tratamento das leishmanioses	27
3.2.1 Fexinidazol (FEX)	28
3.3 Modelos Experimentais na Leishmaniose visceral	31
3.4 Sistema Auto Emulsionável de liberação de fármacos	32
3.5 Permeabilidade Intestinal	37
4 TRABALHO EXPERIMENTAL	39
CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE SEDDS FEX	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Materiais	42
2.2 Métodos.....	42
2.2.1 Validação de método para quantificação do FEX por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência	42
2.2.2 Estudo de solubilidade do FEX em diferentes excipientes	48
2.2.3 Desenvolvimento das formulações.....	49
2.2.4 Preparação dos SEDDS e suspensão contendo FEX	49
2.2.5 Caracterização das formulações.....	50
2.2.5.1 Determinação do tamanho do glóbulo, índice de polidispersão e potencial zeta e microscopia	50
2.2.5.2 Robustez à diluição	51
2.2.5.3 Avaliação da dispersibilidade do SEDDS FEX em meio simulado gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8).	51

2.2.5.4 Dispersibilidade de FEX em SEDDS após diluição em fluidos gastrintestinais simulados.....	52
2.2.6 Estudo de estabilidade de SEDDS FEX	52
3 RESULTADOS	54
3.1 Validação de método para quantificação do FEX por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência	54
3.2 Estudo de solubilidade do FEX em diferentes excipientes	61
3.3 Desenvolvimento das formulações.....	62
3.4 Caracterização dos SEDDS	64
3.4.1 Tamanho, IP, Potencial zeta e microscopia	65
3.4.2 Robustez à diluição	66
3.4.3 Avaliação da dispersibilidade do SEDDS-FEX em meio simulado gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8).....	68
3.4.4 Dispersibilidade de FEX em SEDDS após diluição em fluidos gastrintestinais simulados.....	69
3.5 Estudo de estabilidade de SEDDS-FEX	70
CAPÍTULO 2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS DE EFICÁCIA E PERMEABILIDADE INTESTINAL	
1 INTRODUÇÃO	73
2 MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1 Materiais	75
2.2 Métodos.....	75
2.2.1 Avaliação da eficácia de SEDDS FEX em animais infectados com <i>L. infantum</i> ...75	
2.2.1.1 Parasitos e inculação dos parasitos nos animais	75
2.2.1.2 Tratamento dos animais	76
2.2.1. 3 Ensaio de diluição limitante	76
2.2.1. 4 Análises Estatísticas	77
2.2.2 Permeabilidade intestinal	77
2.2.2.1 Tratamento dos animais.....	77
2.2.2.2 Marcação do DTPA com ^{99m} Tc	78
2.2.2.3 Avaliação da permeabilidade intestinal.....	80
2.2.2. 4 Análises Estatísticas	80

3 RESULTADOS	82
3.1 Avaliação da eficácia de SEDDS-FEX em animais infectados com <i>L. infantum</i>	82
3.2 Permeabilidade intestinal	86
3.2.1 Marcação do DTPA com ^{99m} Tc	87
3.2.2 Avaliação da permeabilidade intestinal.....	87
5 DISCUSSÃO GERAL	89
6 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1 INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e da família *Trypanosomatidae*. São transmitidas por insetos vetores flebotomíneos conhecidos no Brasil como mosquito palha, cangalhinha, birigui. São endêmicas em grandes áreas dos trópicos, subtropicais e bacia do Mediterrâneo, abrangendo mais de 98 países. Existe aproximadamente 1 bilhão de pessoas que vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e estão sob risco de infecção. Estima-se que 30 mil novos casos de leishmaniose visceral (LV) e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) ocorram anualmente, sendo portanto, um importante problema de saúde pública. Em 2017, mais de 94% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2021).

Os principais fármacos atualmente disponíveis para o tratamento são antimonial pentavalentes, anfotericina B, paromomicina e miltefosina. No entanto, eles não estão desprovidos de limitações relativas à eficácia, toxicidade, custo, duração do tratamento, aumento da resistência parasitária e dificuldade de administração, tornando o tratamento uma questão complexa (BRUNI *et al.*, 2017). Assim sendo, alternativas terapêuticas têm sido investigadas. O Fexinidazol (FEX), um nitroimidazol, originalmente desenvolvido na década de 1980, pela Hoechst, com atividade contra tripanosomas, foi redescoberto pela *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi), através de uma revisão sistemática de moléculas ativas contra protozoários. Estudo conduzido *in vivo* mostrou a atividade de uma suspensão contendo este fármaco, na dose de 300 mg/kg/dia, administrada por via oral, em camundongos infectados com *L. infantum* (DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2019). Entretanto, o FEX apresenta baixa solubilidade em água (48,3 mg/L) (PUBCHEM, 2013), o que pode ser um fator limitante para sua absorção quando administrado *in vivo*.

O Sistema auto emulsionável de liberação de fármacos (em inglês, *self emulsifying drug delivery systems*, SEDDS) é uma alternativa interessante para incorporação do FEX, sistema tradicionalmente utilizado para aumento da biodisponibilidade oral de fármacos de baixa solubilidade. SEDDS são definidos como misturas isotrópicas de óleos, surfactantes, co-surfactantes e co-

solventes. Ao serem liberados no lúmen do intestino, encontram o meio aquoso e se dispersam para formar uma emulsão de aspecto fino e nanométrico, de tal maneira que o fármaco permanece em forma de dispersão melhorando assim a velocidade de dissolução do fármaco (KOHLI *et al.*, 2010). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar SEDDS contendo FEX, e avaliar sua eficácia no tratamento por via oral da LV experimental, assim como a influência na permeabilidade intestinal.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver, caracterizar um sistema auto emulsionável de liberação de fármaco contendo FEX e avaliar sua eficácia no tratamento oral em modelo experimental da LV.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar solubilidade do FEX em óleos, surfactantes e co-surfactantes.
- Desenvolver um sistema auto emulsionável de liberação de fármaco (SEDDS) contendo FEX para administração por via oral.
- Caracterizar a nanoemulsão obtida após diluição do SEDDS contendo FEX quanto tamanho dos glóbulos, índice de polidispersão, potencial zeta, robustez e microscopia.
- Avaliar a capacidade de formação de nanoemulsões em meio simulado estomacal (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8).
- Avaliar a estabilidade físico-química do SEDDS FEX por um período de 6 meses.
- Avaliar a retenção do FEX a partir do SEDDS após diluição em meios simulados fisiológicos em comparação à suspensão do fármaco;
- Avaliar a eficácia *in vivo* do SEDDS FEX no tratamento de LV experimental causada por *Leishmania infantum* (= *Leishmania chagasi*).
- Avaliar a permeabilidade intestinal de sistema auto emulsionável de liberação fármacos (SEDDS) contendo FEX pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de ^{99m}Tc -DTPA.

3.REVISÃO DA LITERATURA

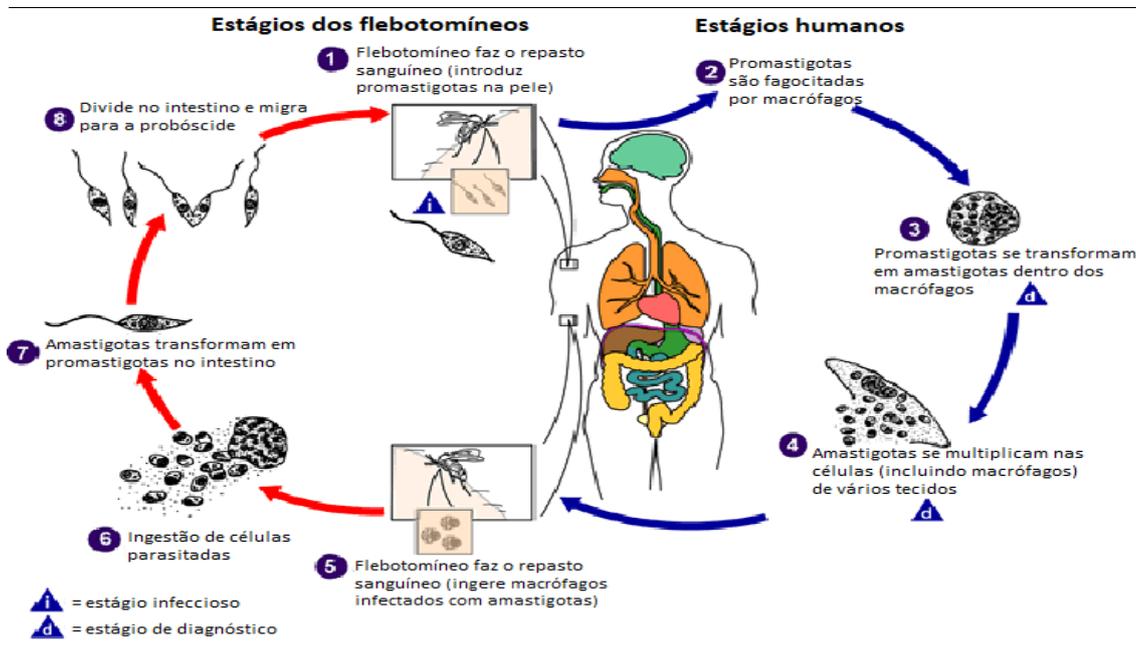
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias com amplo espectro de manifestação clínica e epidemiológica, causadas por protozoários intracelulares da família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*, sendo conhecidas mais de 20 espécies, que diferem em sua distribuição geográfica (WHO, 2021).

Existe atualmente aproximadamente um bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas e com risco de infecção. Há uma forte associação da doença com a pobreza, fatores como 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 (WHO, 2021; ALVAR *et al.*, 2006). Pelo seu considerável impacto sobre a saúde mundial, as leishmanioses são consideradas uma das mais importantes doenças infecciosas pela Organização Mundial da Saúde – OMS (WHO, 2021).

A *Leishmania* é um parasita heterogênico, possuindo hospedeiros vertebrados (humanos, cães e alguns animais silvestres) e hospedeiros invertebrados, os insetos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomya* (Novo Mundo), sendo as fêmeas hematófagas responsáveis pela transmissão para humanos (STOCKDALE; 2013; SANTOS *et al.*, 2008). A **Figura 1** apresenta o ciclo biológico da *Leishmania*.

Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Fonte: CDC, 2021

A evolução da doença após a inoculação do parasita está associada à espécie de *Leishmania* e a susceptibilidade do hospedeiro. As leishmanioses são classificadas em duas formas clínicas: LT e LV (também conhecida kala-azar), esta última sendo a forma mais grave da doença, que pode ser fatal se não for tratada (ALVAR *et al.*, 2012; BRUNI *et al.*, 2017).

3.1.1 Leishmaniose Tegumentar

A LT, que pode acometer a pele e mucosas, é causada no Velho Mundo pela *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) major*. Nas Américas, 12 espécies são reconhecidas e dessas, sete já foram identificadas no Brasil, das quais as três com maior relevância epidemiológica são *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A LT pode ser classificada em leishmaniose cutânea localizada (LCL); leishmaniose cutânea difusa (LCD); e leishmaniose mucocutânea (LMC). A LCL é a forma de maior prevalência e é caracterizada por uma ou mais lesões

cutâneas ulcerosas ou não, porém limitadas. A LCD é encontrada em indivíduos anérgicos ou em pacientes que já tiveram LV. É caracterizada por múltiplos nódulos, pápulas, ou tubérculos com infiltração cutânea e sem ulceração. Já a LMC ocorre geralmente após a aparente cura da infecção cutânea, embora possa coexistir com envolvimento da pele. As lesões normalmente aparecem dentro de 2 anos após a cura clínica da lesão primária, mas pode demorar até 30 anos. A LMC é caracterizada pelo aparecimento de lesões ulcerosas destrutivas nas mucosas da faringe, boca e nariz (PACE, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

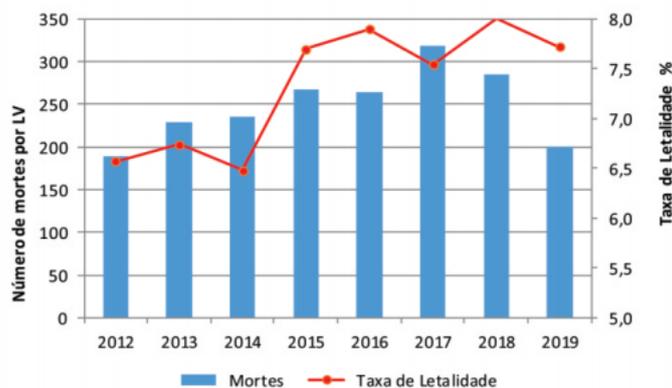
3.1.2 Leishmaniose Visceral

A LV é considerada a forma mais grave podendo ser fatal, se não tratada adequadamente. Resulta em infecção sistêmica acometendo principalmente órgãos como o baço, fígado e medula óssea. É causada por espécies pertencentes ao complexo *L. (L.) donovani* no leste da África e no subcontinente indiano; e *L. (L.) infantum* na Europa, norte da África e América Latina. No Brasil, o agente etiológico é a *L. (L.) chagasi* (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Entretanto, com base em diferentes abordagens, as subespécies *infantum* e *chagasi* não são claramente distinguidas. Portanto, deve-se adicionar o nome *L. chagasi*, entre parênteses, após o nome de *L. infantum*, quando nos referirmos ao parasita isolado desta área (MAURÍCIO *et al.*, 1999; DANTAS-TORRES, 2006).

O desenvolvimento da LV pode levar meses a anos após a inoculação dos parasitos pelo vetor. Essa forma clínica é caracterizada por febre prolongada, hepatoesplenomegalia, perda de peso significativa, pancitopenia, anorexia, fraqueza, palidez, tosse, diarreia, mal-estar e atraso no crescimento em crianças (GRIENSVEN e DIRO, 2012; KEVRIC *et al.*, 2015).

A LV é endêmica em 13 países das Américas, onde 65.934 casos novos foram registrados de 2001 a 2019, com uma média de 3.470 casos por ano. Em 2019, do total de casos, 97% (2.529) foram notificados no Brasil, e os demais casos na Argentina, Bolívia (Estado Plurinacional da), Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela (República Bolivariana da) e Uruguai. A taxa de letalidade em 2019 foi de 7,7% (**Figura 2**) (OPAS, 2020).

Figura 2 – Taxa de Letalidade de Leishmaniose Visceral de 2012 a 2019



Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância.

3.2 Tratamento das leishmanioses

As terapias disponíveis para as leishmanioses estão longe do ideal devido à alta toxicidade, alto custo, falta de eficácia, falta de acesso em certas áreas, e resistência emergente aos medicamentos. Estes fatores tornam complexa a terapêutica. A escolha do tratamento deve ser individualizada e depende de fatores como espécie causadora, estado clínico do paciente e relação custo-efetividade (BRUNI *et al.*, 2017, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os fármacos preconizados pelo Ministério da Saúde, para o tratamento da LV no Brasil são o antimoniato de meglumina, a anfotericina B (desoxicolato e lipossomal), as pentamidinas e os imunomoduladores (interferon gama e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), sendo que os dois últimos se encontram ainda em fase de investigação e só devem ser utilizados em hospitais de referência. A escolha de cada um deles depende da faixa etária, da presença de gravidez e comorbidades. O antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) é considerado o medicamento de primeira escolha na maioria dos casos, sendo distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde, no Brasil (BRASIL, 2013). Aronson *et al.*, (2016) descrevem outras opções terapêuticas de uso oral, tais como antifúngicos azólicos e a miltefosina.

Vale ressaltar que esses fármacos induzem severos efeitos adversos. O antimoniato de meglumina, por exemplo, induz artralgia, mialgia, anorexia,

náuseas, vômitos, azia, dor abdominal, erupção cutânea, febre, fraqueza, dor de cabeça, tontura, insônia, alterações nos testes de função hepática (elevação das transaminases e fosfatase alcalina), níveis de lipase e amilase, leucopenia, anormalidades no eletrocardiograma (prolongamento do intervalo QT e inversão da onda T), choque pirogênico e edema. Com o uso da anfotericina B os efeitos adversos mais comuns são febre, náuseas, vômitos, anemia hipocaliemia, flebite no local da infusão, insuficiência renal e alterações cardíacas, além do fato de ser administrado por via endovenosa, o que limita o seu uso fora do ambiente ambulatorial. Com o uso da pentamidina pode ocorrer o endurecimento e formação de abscessos no local da injeção, além de náuseas, vômitos, tonturas, mialgia, dor de cabeça, hipotensão, hipoglicemia e ou hiperglicemia. Os antifúngicos azólicos apresentam reações gastrintestinais como náusea, vômito, dor abdominal, dor de cabeça e hepatotoxicidade. Já a miltefosina apresenta náusea, vômito, diarreia, tontura de movimento, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (ARONSON *et al.*, 2016).

Infelizmente para os antimoniais da primeira linha, o desenvolvimento de resistência é uma barreira primária para o sucesso do tratamento. Estudos *in vitro* mostraram que o possível mecanismo primário de resistência é a redução da concentração do fármaco no parasita, pela diminuição da entrada ou pelo aumento do efluxo. Outros possíveis mecanismos incluem: a inibição da ativação do fármaco, a inativação da forma ativa, ou serem sequestrados para o interior de vesículas através de transportadores da superfamília ABC (ATP-binding cassette transportes) (CROFT *et al.*, 2006; BRUNI *et al.*, 2017). O Programa de Pesquisa em Doenças Tropicais (TDR) tem recomendado o desenvolvimento de tratamentos alternativos. Fármacos eficazes administradas por via oral são altamente desejáveis no tratamento da leishmaniose e, assim sendo, alternativas terapêuticas têm sido investigadas.

3.2.1 Fexinidazol (FEX)

O FEX, um nitroimidazol, originalmente desenvolvido na década de 1980, pela Hoechst, com atividade contra tripanosomas, foi redescoberto pela

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), por meio de uma revisão sistemática de moléculas ativas contra protozoários (TORREELE *et al.*, 2010).

Sanofi, DNDi e organizações não governamentais estabelecerem uma parceria público privada para desenvolver o primeiro tratamento oral com FEX para a doença do sono. O tratamento mostrou-se eficaz para os dois estágios da doença (DEEKS, 2019; NEAU *et al.*, 2020). Na África ocidental e central, *Trypanosoma brucei gambiense* causa uma forma crônica de doença do sono, enquanto que na África Oriental e Austral *T. b. rhodesiense* causa uma forma aguda da doença. Ambas ocorrem em dois estágios: estágio 1 (precoce, hemolinfático), caracterizado por alterações clínicas inespecíficas e sintomas como mal-estar, dor de cabeça, febre e edema, enquanto que o estágio 2 (tardio, meningoencefálico) é caracterizado por sintomas neurológicos, incluindo alterações comportamentais, distúrbios do sono graves e convulsões que, se não tratada, pode levar ao coma e morte (TORREELE *et al.*, 2010).

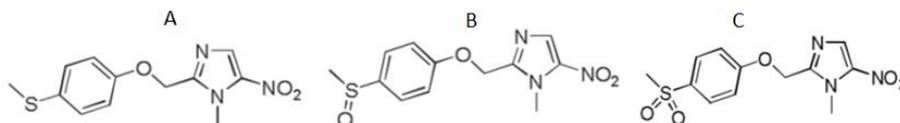
O FEX (**Figura 3**) possui forma molecular $C_{12}H_{13}N_3O_3S$, peso molecular 279,31g/mol, log P 2,38 e baixa solubilidade em água (48,27 mg/L) (CHEMICALIZE, 2018; PUBCHEM, 2013). O FEX é um pró fármaco que é rapidamente metabolizado por enzimas do complexo CYP 450 *in vivo* originando metabólitos sulfóxido e sulfona (**Figura 3**) que provavelmente representam uma porção significativa do efeito terapêutico. Exerce seu efeito ao causar danos ao DNA, lipídios e proteínas de protozoários (RAETHER, HANEL, 2003; SUNDAR, SINGH, 2016).

Torreele e colaboradores (2010) conduziram estudos pré-clínicos, em camundongos, ratos e cães, para avaliação farmacocinética e de segurança de uma suspensão aquosa de FEX (5% de Tween 80 + 0,5% de hidroxipropilmetilcelulose). Os resultados destes estudos mostraram que a biodisponibilidade absoluta do FEX após administração oral foi de 41% em camundongos, 30% em ratos e 10% em cães.

Este mesmo estudo avaliou o potencial de absorção oral do fexinidazol em modelo de células Caco-2 para permeabilidade epitelial intestinal. Neste ensaio, o FEX apresentou alto potencial de absorção (permeabilidade aparente $P_{app} = 57,2 \cdot 10^{-6}$ cm/s e sem efluxo significativo), mostrando que a

permeabilidade intestinal do FEX não deve, portanto, ser um fator limitante absorção em humanos.

Figura 3 - Fórmula estrutural do fexinidazol e seus metabólitos



A – FEX; B – Sulfóxido; C- Sulfona

Fonte: WYLLIE et al., 2012

A influência da forma farmacêutica (comprimido ou suspensão), assim como da alimentação foram avaliadas em estudo clínico conduzido com adultos saudáveis do sexo masculino. A biodisponibilidade do FEX administrado na forma de comprimido foi aproximadamente 25 % menor do que a obtida após administração da suspensão, enquanto que a ingestão de alimentos levou a um aumento da absorção e da concentração plasmática do FEX e dos seus dois principais metabólitos em aproximadamente 200%. É provável que a absorção reduzida do FEX, na forma de comprimido, reflita a influência do tempo necessário para desintegração e dissolução, de modo que a taxa de dissolução do fármaco provavelmente seja o fator determinante para o grau de absorção dentro de um dado período de trânsito gástrico. O efeito da ingestão alimentar promover maior absorção foi explicada pelos autores por supor a ocorrência de um retardo no tempo do esvaziamento gástrico, isto é, há um prolongamento do tempo de contato do princípio ativo com a superfície de absorção e um aumento do metabolismo inicial do FEX convertendo-o em seus metabólitos ativos e disponibilizando os na circulação sistêmica (TARRAL *et al.*, 2014).

A atividade de FEX (em suspensão) para LV foi investigada em camundongos infectados com *L. donovani*, tratados por cinco dias consecutivos por via oral com as doses 25, 50, 100 e 200 mg/Kg/dia, sendo que a dose mais alta foi capaz de levar a uma redução de 98,4% carga parasitária no fígado (WYLLIE *et al.*, 2012). Em outro estudo conduzido por DE MORAIS-TEIXEIRA, *et al.* (2019), a suspensão foi administrada por gavagem nas doses de 50, 100, 200 e 300 mg/kg/dia, uma vez por dia, durante cinco dias consecutivos. Com a

dose de 100 mg/kg/dia houve redução da carga parasitária para *L. infantum* no fígado e com a dose de 300 mg/kg/dia no baço e no fígado. Estes resultados demonstram o potencial do FEX no tratamento da leishmaniose como fármaco de uso oral.

3.3 Modelos Experimentais na Leishmaniose visceral

A maioria dos conhecimentos provenientes de estudos realizados em modelos experimentais utilizando animais para o estudo da LV tem por base quatro modelos animais (camundongos, hamsters, cães e primatas não humanos). Diversos fatores influenciam na suscetibilidade das diferentes espécies animais às leishmanias viscerotrópicas, entre os quais estão via e quantidade de inóculo, cepas do parasito e fatores genéticos do hospedeiro. O modelo animal de escolha para ensaios deve induzir mecanismos patológicos similares àqueles da doença humana e conseguir avaliar de maneira acurada os fenômenos biológicos que se pretende abordar (CONCEIÇÃO-SILVA *et. al.*, 2014).

Os hamsters são sensíveis à infecção por espécies de leishmania, e o *Mesocricetus auratus* estabelece uma infecção síncrona no fígado e baço que pode evoluir para uma infecção crônica semelhante à LV humana. Para avaliação *in vivo* de agentes quimioterapêuticos, geralmente os hamsters são infectados intra-cardicamente (SUMAN, 2011).

De acordo com Oliveira (2012), em modelos usando BALB/c são necessárias altas doses (10^7 ou mais) intravenosas (IV) ou intraperitoniais (IP) de amastigotas ou promastigotas para estabelecer a infecção. Conforme procedimento adotado por Santos *et. al.* (2018), a infecção se estabelece após cerca de 7 dias, mas a despeito da espécie de Leishmania utilizada (*L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi*), ocorre no fígado uma infecção aguda e autorresolutiva, em que os parasitos se multiplicam rapidamente durante as quatro primeiras semanas e a infecção se resolve ao fim de oito semanas (WILSON & WEINSTOCK, 1996).

Diferentes linhagens de camundongos isogênicos, nocautes e transgênicos permitiram o conhecimento da imunopatogênese da LV. Em linhagens geneticamente suscetíveis como BALB/c e C57BL/6 ocorre um

crescimento parasitário cerca de 50 a 100 vezes maior no fígado (VIDAL *et al.*, 1995).

3.4 Sistema Auto Emulsionável de liberação de fármacos

Os sistemas auto emulsionantes de liberação de fármacos (em inglês, *self emulsifying drug delivery systems, SEDDS*) são definidos como misturas isotrópicas de óleos, surfactantes, co-surfactantes e co-solventes. Estes sistemas, ao serem liberados no lúmen do intestino, encontram o meio aquoso e se dispersam para formar uma emulsão de aspecto fino, de tal maneira que o fármaco permanece em forma de dispersão melhorando assim a velocidade de dissolução do fármaco (KOHLI *et al.*, 2010).

A auto emulsificação ocorre quando a mudança de entropia que favorece a dispersão é maior que a energia necessária para aumentar a área de superfície da dispersão. A energia livre da emulsão convencional é uma função direta da energia necessária para criar uma nova superfície entre as fases oleosa e aquosa e pode ser descrita pela equação abaixo (NEWALE *et al.*, 2015).

$$\Delta G = \Sigma N \pi r^2 \sigma$$

Onde ΔG = Energia livre associada ao processo; N = número de gotas; r = raio das gotículas; σ = energia interfacial

As duas fases da emulsão tendem a separar com o tempo para reduzir a área interfacial e o uso de agentes emulsificantes forma uma monocamada na superfície dos glóbulos da emulsão, e, portanto, reduzem a energia interfacial e fornecem uma barreira para prevenir coalescência (CONSTANTINIDES, 1995).

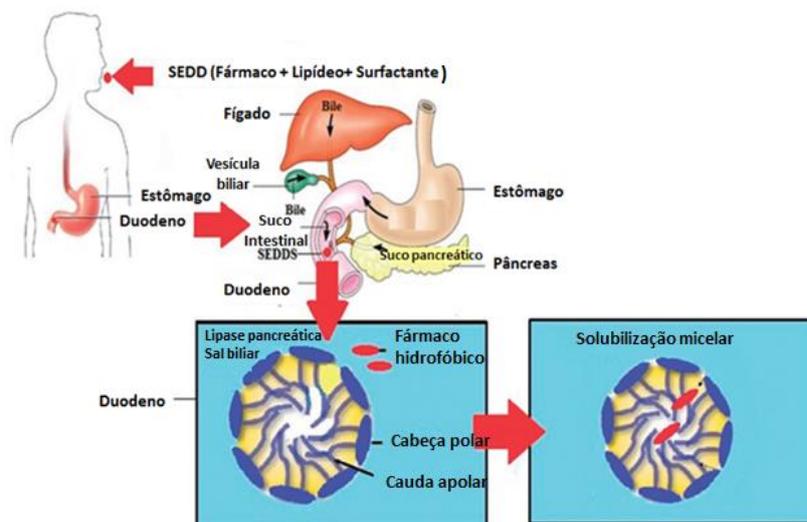
Quando diluídos, os SEDDS formam glóbulos de 10 a 100 nm, o que auxilia no aumento da biodisponibilidade por aumentar a área de superfície para absorção. Além disso, protegem os fármacos da hidrólise enzimática no trato gastrointestinal, reduzem a interação de fármacos com os alimentos e podem ser usados na forma líquida ou sólida (cápsulas gelatinosas). Deve-se tomar cuidado com fármacos que possuem instabilidade devido à alta concentração de

surfactantes e alguns co-solventes, bem como em relação ao potencial dos SEDDS para irritar o trato gastrointestinal (NAWALE, 2015).

As formulações lipídicas oferecem a possibilidade de melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos, especialmente aqueles pertencentes as classes II (baixa solubilidade, alta permeabilidade) e IV (baixa solubilidade, baixa permeabilidade) do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, do inglês: Biopharmaceutics Classification System, BCS) (SHARMA *et al.*, 2016). O FEX é um composto da classe II, uma vez que possui baixa solubilidade em água e em estudos de permeabilidade em células Caco-2 demonstrou alta permeabilidade (TORREELE *et. al.*, 2010). Para compostos lipofílicos que exibem a dissolução como fator limitante para a absorção, os SEDDS podem levar a melhora da taxa e extensão de absorção pois tem a vantagem de aumentar o carreamento do fármaco quando comparado a soluções lipídicas. Fármacos com coeficiente de partição entre 2 e 4 possuem baixa solubilidade em lipídeos naturais e solubilidade muito maior em emulsionantes anfifílicos, co-emulsionantes e co-solventes. O principal objetivo deste tipo de formulação é manter fármacos lipofílicos em estado dissolvido como uma dispersão coloidal em todo o trato gastrointestinal (POUTON, 2000). A motilidade gástrica e intestinal promove a agitação necessária para auto emulsificação (NAWALE, 2015).

Para explicar o aumento de solubilidade de um fármaco lipofílico no intestino, é importante ressaltar o processo de digestão lipídica no intestino delgado (**Figura 4**). A secreção de colesterol e sais biliares no duodeno é estimulada pela presença de lipídeos e seus produtos de digestão e então ocorre o processo de formação de micela. Os grupos polares de micela permanecem do lado aquoso, enquanto os grupos hidrofóbicos permanecem no núcleo. Quando um fármaco lipofílico chega ao duodeno juntamente com algum componente lipídico o processo de solubilização micelar acontece. Isto resulta no aprisionamento do fármaco em micela coloidal e aumenta de solubilidade efetiva (CHATTERJEE *et al.*, 2016).

Figura 4 – Solubilização micelar de fármaco hidrofóbico no duodeno.



Fonte: CHATTERJEE *et al.*, 2016

Para o desenvolvimento de SEDDS, os fármacos devem ser incorporados em uma mistura apropriada de excipientes. O início do desenvolvimento se dá com a seleção destes. O estudo para seleção preliminar considera a toxicidade, capacidade solvente, miscibilidade, estado físico à temperatura ambiente, digestibilidade, pureza, estabilidade química e custo dos excipientes (POUTON, PORTER, 2008).

Os surfactantes não iônicos geralmente são os escolhidos por sua menor toxicidade e possuem equilíbrio hidrófilo lipófilo (EHL) alto (POUNTON, 1997). Os óleos geralmente são ésteres de ácidos graxos, saturados ou insaturados, de cadeia média ou longa, líquidos, semissólidos ou sólidos à temperatura ambiente e auxiliam na dissolução do fármaco. Óleo mineral, óleos vegetais, lanolina, álcoois graxos e mono, di ou triglicerídeos são alguns exemplos. Os co-solventes mais comuns (álcool, propilenoglicol e polietilenoglicol) auxiliam na dissolução do fármaco. As emulsões estáveis são formadas pela combinação de surfactantes, nas quais um deles atua como surfactante e o outro como co-surfactante. Os co-surfactantes estabilizam as gotículas formadas e auxiliam na redução da tensão interfacial entre água e óleo. Exemplos de co-surfactantes são glicerídeos polioxietilados, glicerídeos oléicos polioxietilados (CERPNJAK *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2016).

O comportamento *in vivo* esperado da formulação pode ser conhecido conforme o Sistema de Classificação de Formulações lipídicas. Este sistema classifica os SEDDS em 4 tipos: I, II, III (A ou B) e IV. A **Tabela 1** resume os principais componentes, características, vantagens e desvantagens de cada tipo (POUTON; PORTER, 2008).

Tabela 1 – Sistema de Classificação de Formulações lipídicas: componentes, características, vantagens e desvantagens

	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
Componentes	Óleos (100%) sem emulsionantes (ex. tri, di e monoglicerídeos)	Óleos (40-80%) e emulsionantes insolúveis em água (20-60%)	Óleos (40-80%), emulsionantes e co-solventes hidrofílicos (20-50%)	Emulsionantes solúveis em água (20-80%) e co-solventes (0-80%); sem óleo
Características	Não dispersante, requer digestão, tamanho de partícula grosseiro	SEDDS formado sem componentes solúveis em água; facilmente digerido; tamanho de partícula entre 100 e 250 nm	SEDDS formado com componentes solúveis em água; digestão não se faz necessária; tamanho de partícula entre 100 e 250 nm	Dispersa tipicamente para formar uma solução micelar; tamanho de partícula menor que 50 nm. Digestão limitada.
Vantagens	GRAS status, simples, excelente compatibilidade com cápsulas	Improvável que perca a capacidade solvente na dispersão	Dispersão transparente ou quase	Boa capacidade solvente para vários fármacos.
Desvantagens	Baixa capacidade solvente (a não ser que o fármaco seja altamente lipofílico)	Dispersão O/A turva	Possibilidade de perda de capacidade solvente na dispersão; menos facilmente digerido	Perda da capacidade solvente na dispersão; possivelmente não será digerido.

Fonte: Adaptado de POUTON; PORTER, 2008

A maioria dos produtos comercializados são sistemas do tipo III, com uma gama de fármacos solúveis em óleo e em água. Portanto, este grupo foi dividido em

tipo IIIA (solúveis em óleo) e tipo IIIB (solúveis em água) com base na proporção de óleos e substâncias solúveis em água (MAURYA *et al.*, 2017).

SEDDS é um termo geral para sistemas de liberação que propõe formação de emulsões de tamanho variado após diluição. Esses sistemas podem ser classificados em SMEDDS (sistema auto microemulsificante de liberação de fármacos) e SNEDDS (sistema auto nanoemulsificante de liberação de fármacos) (LEFFLEUR & KECKEIS, 2020). Para alguns autores (CHATTERJEE *et al.*, 2016), é melhor usar a terminologia SNEDDS ao invés de SMEDDS quando a emulsão gerada após a diluição em água não é termodinamicamente estável de forma similar ao observado para as nanoemulsões.

As microemulsões, por sua vez, são sistemas termodinamicamente estáveis, formam glóbulos <100 nm e são mais transparentes devido ao tamanho pequeno dos glóbulos. As microemulsões podem alterar o tamanho do glóbulo quando diluídas. Já as nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, formam glóbulos >100 nm e podem apresentar certa turbidez. No entanto, podem manter o tamanho de glóbulo após diluição (MCCLEMENTS, 2012)

Buya e colaboradores (2020) relatam ensaios pré-clínicos de farmacocinética com SEDDS. Fármacos de diversas classes terapêuticas (anticancerígenos anti-hipertensivos, antidiabéticos, antioxidantes, antivirais, dentre outros) foram avaliados e aumento de biodisponibilidade em relação ao fármaco livre foi demonstrado.

Sandhu *et al.*, (2015) mostraram que a área abaixo da curva (AUC_{0-t}) e a concentração máxima (C_{max}) foram 2,7 e ~ 4 vezes, respectivamente, maiores no Self nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) carregados com paclitaxel em comparação com o fármaco em suspensão; Beg *et al.*, (2019) observaram AUC_{0-t} e C_{max} 1,8 e 5,7 vezes, respectivamente, maiores que a rosuvastatina livre. Os autores concluem que houve aumento da absorção dos fármacos quando carregados em SNEDDS e que este sistema é promissor para os respectivos tratamentos por via oral.

Além disto, outros autores descrevem SEDDS carregando tretinoína, isotretinoína, ciclosporina, sanquinarvir (KOHLI *et al.*, 2010), sinvastatina,

celecoxib (NEWALE *et al.*, 2015), dexibuprofeno (BALAKRISHNAN *et al.*, 2009). Esta diversidade de fármacos lipossolúveis carregados em SEDDS demonstra a utilidade deste sistema na busca de tratamentos mais efetivos.

Vários testes de avaliação dos SEDDS são propostos. Para avaliação físico-química, Newale *et al.* (2015) descrevem: observação visual, medida do potencial zeta, determinação do tempo de emulsificação, da estabilidade termodinâmica, avaliação da turbidez, teste de dispersibilidade, determinação da viscosidade, tamanho dos glóbulos e IP, transmitância e índice de refração, diagrama de equilíbrio de fase, tempo de liquefação. Para testes pré-clínicos *in vitro* e avaliação *ex vivo* Buya *et al.*, (2020) relatam os testes de lipólise, distribuição de fármaco nas fases aquosa e oleosa, permeação através de barreira intestinal e citotoxicidade. Para avaliação pré-clínica *in vivo*, os ensaios de farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade.

3.5 Permeabilidade Intestinal

Normalmente, a concentração de emulsionantes/tensoativos varia entre 30 e 60% para formar SEDDS estáveis. No entanto, os tensoativos apresentam potencial para causar irritação gastrointestinal (MAURYA *et al.*, 2017). Por outro lado, estudos em células Caco-2 demonstram que lipídeos, tensoativos ou uma mistura de ambos está associada a um aumento da absorção de fármacos devido a interrupções ocasionadas nas junções comunicantes entre as células, processo conhecido como absorção paracelular. Formulações contendo 30% de Tween 80[®] e 70% de Capmul 708G[®] ou Capmul MCM[®] apresentaram boa tolerância das células, sem citotoxicidade (BU *et al.*, 2017).

A barreira epitelial e produtos de células epiteliais, como muco e defensinas são mecanismos inatos do intestino que regulam a flora intestinal, impedindo a translocação bacteriana, além de afetar a flora microbiana presente. Um defeito em um ou mais destes mecanismos está relacionado ao desenvolvimento de colite ulcerosa, com possível risco de translocação bacteriana (ANDRADE *et al.*, 2016). Chassaing *et al.*, (2015) descreveu que alimentos contendo emulsificantes podem perturbar a relação microbiota-

hospedeiro, o que pode levar à uma microbiota com atividade mucolítica e pró inflamatória que promove inflamação intestinal. Uma vez que os SEDDS possuem alta concentração de surfactantes, há uma possibilidade de ocorrência de processos inflamatórios e a observação de translocação bacteriana.

Para a avaliação de alterações no perfil de permeabilidade a partir da mucosa intestinal, De Barros *et al.*, (2018) utilizaram o método da quantificação sanguínea de ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio-99m (^{99m}Tc -DTPA). O ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) é uma macromolécula hidrofílica que raramente atravessa a barreira intestinal, no entanto, quando a barreira do epitélio intestinal está danificada, a permeação pode ocorrer principalmente por rota paracelular e maiores concentrações desta macromolécula podem ser observadas na corrente sanguínea. Este procedimento apresenta vantagens sobre os métodos convencionais, como polímeros de manitol, lactulose e glicol, uma vez que é rápido, preciso e apresenta fácil manuseio.

O ^{99m}Tc -DTPA é um radiofármaco hidrofílico capaz de ser eliminado rapidamente do organismo na sua forma livre. Segundo Abdel Dayem *et al.*, (1988), o ^{99m}Tc -DTPA pode acumular-se em lesões inflamatórias do trato intestinal e poderia ser utilizado para localizar focos de sangramento. Um aumento da captação do radiotraçador pode ser visto nos segmentos afetados do intestino imediatamente após a injeção em “bolus”, persistindo por horas.

4. TRABALHO EXPERIMENTAL

**CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E
ESTABILIDADE DE SEDDS FEX**

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os principais fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses são o antimoniato pentavalente e a anfotericina B. Esses são administrados por via parenteral, o que muitas vezes é inconveniente para o paciente. Além do desconforto da administração, ainda deve-se considerar várias reações adversas. Ensaios clínicos apontam que a administração de FEX em pacientes provocou efeitos adversos leves e moderados em sua grande maioria (DEEKS, 2019). Reações bem menos graves do que as que ocorrem com a terapêutica atualmente recomendada (ARONSON *et al.*, 2016). Assim sendo, a busca de novas alternativas terapêuticas para as leishmanioses, notadamente formulações de uso oral, é altamente recomendável.

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica fármacos de classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e fármacos de classe IV (baixa solubilidade e permeabilidade) mostram comportamento errático de absorção, o que pode limitar a biodisponibilidade oral e, conseqüentemente, a efetividade do tratamento (CHATTERJEE *et al.*, 2016). Uma vez que o FEX é hidrofóbico justifica-se concentrar esforços para o desenvolvimento de um sistema que o mantenha dissolvido como uma dispersão coloidal em todo o trato gastrointestinal. Os componentes utilizados no SEDDS solubilizam o fármaco, o que favorece a dissolução quando comparado ao fármaco livre. Além disso, o SEDDS disponibiliza o fármaco em nanoglobulos oferecendo maior área de superfície para absorção com maior probabilidade de aumento da biodisponibilidade (DATE *et al.*, 2010).

Isto posto, neste capítulo será apresentado o desenvolvimento, caracterização e o estudo de estabilidade do SEDDS FEX.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Triglicéride de cadeia média (Lipoid), Óleo de soja (Lipoid), mistura de mono, di e triglicérides do óleo de milho - Maisine CC[®] (Gattefossé), mono, di e triglicérides associados a PEG-8 e diésteres do ácido cáprico caprílico - Labrasol[®] (Gattefossé), monooleato de sorbitano etoxilado - Tween 80[®] (Croda), óleo de mamona PEG 35 - Cremophor EL[®] (Sigma-Aldrich), Monooleato de Sorbitano - Span 80[®] (Sigma-Aldrich), Óleo de mamona hidrogenado e etoxilado - Kolliphor RH 40[®] (Sigma-Aldrich), Etanol 96° GL (Synth), Fexinidazol (Centipharm). Dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth), acetonitrila (LS Chemicals), ácido clorídrico 37% PA (Synth). A água de Milli-Q foi obtida utilizando um sistema Milli-Q[®] Direct-Q3 Millipore (Billerica, EUA) e foi utilizada para diluição do SEDDS.

2.2 Métodos

2.2.1 Validação de método para quantificação do FEX por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência

O método analítico para quantificação do FEX foi validado para determinação espectrofotométrica quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação, limite de detecção. A validação foi realizada de acordo com as recomendações da Resolução RDC 166/17 (BRASIL, 2017).

Preparo da solução padrão de FEX

A solução padrão estoque foi preparada pesando-se 10 mg de FEX em balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, completou-se o volume do balão com DMSO e homogeneizou-se. Obteve-se uma solução a 0,1 mg/mL. As diluições subsequentes foram realizadas também com DMSO.

Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se uma curva analítica para a FEX com cinco níveis de concentração na faixa de 2,5 a 40 µg/mL. Para a construção da curva, a solução padrão estoque de FEX (0,1 mg/mL) foi preparada conforme descrito no item *Preparo da solução padrão de FEX*.

Em seguida, prepararam-se as soluções de 10, 20 e 40 µg/mL por meio da diluição da solução padrão FEX (0,1 mg/mL) utilizando-se pipetas volumétricas. Transferiram-se, respectivamente, os volumes de 1, 2 e 4 mL para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com DMSO. Para obtenção da solução 5 µg/mL, pipetou-se 5 mL da solução de concentração 10 µg/mL para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com DMSO e homogeneizou-se. Para obtenção da solução 2,5 µg/mL, pipetou-se 5 mL da solução de concentração 5 µg/mL para balão volumétrico (10 mL), completou-se o volume com DMSO e homogeneizou-se. Esse procedimento foi feito em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta em λ 320 nm, imediatamente após o preparo das soluções, utilizando-se DMSO para ajuste do zero.

Ao final dos experimentos, construiu-se uma curva única, a partir dos resultados das três réplicas, relacionando as absorbâncias obtidas em função das diferentes concentrações de FEX. 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 avaliada pelo do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e a linearidade avaliada por meio destes parâmetros.

A estatística foi analisada conforme Guia para tratamento estatístico da validação analítica (ANVISA, 2017). Foi realizada a análise de normalidade dos resíduos (teste Kolmogorov–Smirnov).

Seletividade

Para comprovar a seletividade do método, foi determinada a absorbância de soluções de cada excipiente em DMSO. O preparo das amostras foi realizado pipetando 250 µL de cada excipiente para balão volumétrico de 25 mL.

Completou-se o volume com DMSO e homogeneizou-se. Transferiram-se 1 mL da solução para balão de 10 mL e completou-se o volume com DMSO e homogeneizou-se e a leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 320 nm. O DMSO foi utilizado como branco.

Precisão

A precisão intra-dia do método (repetibilidade), foi determinada por meio da quantificação de FEX em três níveis de concentração: 2,5 (baixo), 10 (médio) e 40 $\mu\text{g/mL}$ (alto). Para cada concentração foram preparadas três réplicas. A precisão inter-dia, ou intermediária, foi realizada pela repetição do mesmo procedimento em outro dia.

Em cada dia de análise, foi preparada uma solução padrão estoque de FEX (0,1 mg/mL), conforme descrito no item *Preparo da solução padrão de FEX* e, a partir dela, as soluções amostras foram preparadas conforme descrito no item *linearidade*. Os valores médios das respostas e os desvios padrões relativos (DPR) de cada nível de concentração foram calculados.

Limites de detecção e de quantificação

Os Limites de detecção e de quantificação foram realizados utilizando-se as equações abaixo (BRASIL, 2017):

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

Em que:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

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

IC = a inclinação da curva de calibração.

A validação do método CLAE para quantificação do FEX avaliado quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez, seguindo

os valores estabelecidos pela RDC 166/2017 e pelo manual da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) de 2016.

A validação do método analítico foi realizada no equipamento CLAE Waters 717 plus – Injetor automático e detector Waters - Modelo: 2996 DAD. As condições cromatográficas são apresentadas na **Tabela 2**:

Tabela 2 – Condições cromatográficas de análise

Condições cromatográficas	
Comprimento de onda	320 nm
Coluna	Fase reversa ACE [®] C8 (250 mm x 4,6 mm)
Temperatura	25°C
Fase móvel	Água ultrapurificada:Acetonitrila (30:70)
Tempo de corrida	7 minutos
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,0 mL/minuto

Linearidade

Para a determinação da linearidade, foi construída uma curva de calibração com 5 pontos na faixa de 80 à 120% em relação à concentração teórica da análise. Para isso, inicialmente foi preparado uma solução estoque, contendo o equivalente a 250 mg de FEX, o qual foi solubilizado em cerca de 10 mL de acetonitrila, transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 25,0 mL e completado o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma concentração final de 1 mg/mL.

Posteriormente, 1,0 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume completado com fase móvel. A concentração obtida com a solução padrão estoque final foi de 10 µg/mL.

A partir da solução estoque, foram transferidas alíquotas de 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 mL para balões de 50 mL. Os volumes foram completados com fase móvel, obtendo-se concentrações de 0,2; 0,5; 1; 1,5 e 2 µg/mL respectivamente. Na sequência, as soluções foram homogeneizadas e filtradas em filtro PVDF 0,45

μm . A linearidade foi avaliada por da determinação do coeficiente de correlação linear (r) (BRASIL, 2017).

Seletividade

Na análise de seletividade foram utilizadas solução de fexinidazol, SEDDS FEX e SEDDS branco. A solução de FEX foi preparada conforme descrito em linearidade, na concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$. Para o preparo da solução SEDDS FEX, uma vez que a densidade da formulação é cerca de 1 g/mL , foram pesados o equivalente a 250 mg de SEDDS FEX 10 mg/mL e solubilizados em cerca de 2 mL de acetonitrila.

Posteriormente, o volume foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de $25,0 \text{ mL}$, e completado o volume com acetonitrila (concentração $100 \mu\text{g/mL}$). A partir dessa solução, foram transferidos 5 mL para um balão volumétrico de $50,0 \text{ mL}$, e após o volume completado com acetonitrila obteve-se uma solução de concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. Por fim, foram transferidos novamente 5 mL da solução anterior para um outro balão de 50 mL . O volume foi completado com acetonitrila e obtido uma solução de concentração $1,0 \mu\text{g/mL}$. A solução foi homogeneizada e filtrada em filtro $0,45 \mu\text{m}$.

Para o preparo da solução SEDDS branco foi pesado cerca de 250 mg de SEDDS branco e procedido conforme o preparo de SEDDS FEX. A seletividade foi definida por meio de um gráfico de resposta x concentração sobrepondo cromatogramas para verificação da resposta analítica exclusivamente do analito, sem interferência dos excipientes ou produtos de degradação (BRASIL, 2017).

A pureza de pico foi verificada no software do próprio equipamento de CLAE através da observação do ângulo de pureza (Purity angle) e o ângulo limite (Purity Threshold). A verificação foi realizada na faixa espectral de 200 a 400 nm , no tempo de retenção característico do FEX.

Exatidão

Na análise de exatidão foram preparadas, amostras de placebo contaminado com uma concentração conhecida de padrão de FEX, com concentrações de $0,2$; $1,0$ e $2,0 \mu\text{g/mL}$ em triplicata para cada nível. Em um balão de 50 mL , foram

pesados 100 mg de SEDDS branco, 1 mL de solução padrão estoque de 10 µg/mL e o volume completado com fase móvel. A solução amostra 1,0 µg/mL foi preparada utilizando um balão de 10 mL, no qual foi pesado 100 mg de SEDDS branco e pipetado 1 ml da solução estoque de 10 µg/mL e o volume completado com fase móvel. Em outro balão de 10 mL, foram pesados 100 mg de SEDDS branco e pipetado 2 mL da solução padrão estoque de 10 µg/mL, tendo o volume completado fase móvel. As soluções foram homogeneizadas e filtradas com membranas 0,45 µm.

Os resultados foram obtidos por meio do cálculo da média, desvio padrão (DP), DPR e recuperação (%) de acordo com a equação abaixo (BRASIL, 2017):

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

Precisão

Para análise de precisão foram preparadas em triplicata soluções padrões de concentração de 0,2, 1,0 e 2,0 µg/mL. O preparo foi realizado de forma similar ao descrito para os padrões de linearidade, de forma independente e em triplicata para cada concentração. A precisão foi avaliada como o DPR da concentração média determinada (CMD), utilizando a equação abaixo para cálculo:

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Robustez

A análise de robustez foi realizada através da variação dos parâmetros de fluxo, variação da proporção da fase móvel e variação no volume de injeção. As soluções foram preparadas em duplicata com 3 injeções em cada análise.

Na variação do fluxo de fase móvel, as amostras foram analisadas nos fluxos de 0,9 mL/min, 1,0 mL/min e 1,1 mL/min. Para verificação da robustez em relação à proporção da fase móvel, analisou-se a influência das seguintes proporções: 72:28, 70:30 e 68:32 de acetonitrila/ água ultrapurificada. A análise do volume de injeção da amostra foi realizada utilizando os volumes de 19 µL,

20 μL e 21 μL . Após as injeções, foram analisados possíveis alterações no tempo de retenção, área e concentração obtida.

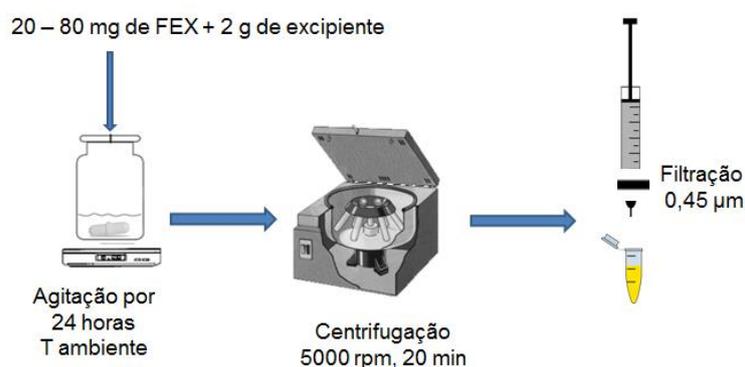
O FEX foi quantificado por CLAE nos ensaios de retenção de FEX em SEDDS após diluição em fluidos gastrointestinais (GI) simulados, estudo de estabilidade e após a produção de cada lote de SEDDS FEX.

2.2.2 Estudo de solubilidade do FEX em diferentes excipientes

A solubilidade do FEX foi determinada em diversos veículos incluindo óleos (óleo de soja, triglicéride de cadeia média, Maisine CC[®]), surfactantes (Tween 80[®], Labrasol[®], Cremophor EL[®], Kolliphor RH 40[®]), co-surfactante (Span 80[®]) e co-solvente (etanol).

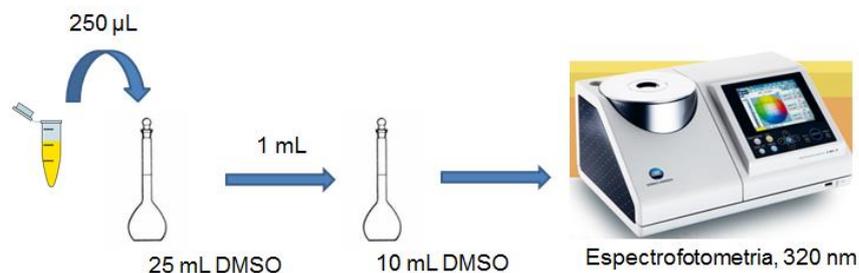
Foram adicionadas as quantidades de 20 a 80 mg de FEX e 2 g de cada um dos excipientes em frascos de penicilina. As misturas foram deixadas em agitador magnético por 24 ± 2 horas, à temperatura ambiente. Após o término do tempo de agitação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente para separar o fármaco não dissolvido e o sobrenadante foi filtrado utilizando filtro de $0,45 \mu\text{m}$ (**Figura 5**). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão apresentados como média \pm DP.

Figura 5 – Obtenção de filtrado contendo FEX em excipientes para SEDDS



Para determinação da quantidade de FEX solubilizada nos diversos excipientes foram preparadas diluições do filtrado em DMSO conforme apresentado **na Figura 6**. A seguir foi feita leitura em espectrofotômetro a 320 nm. O DMSO foi utilizado como branco (**Figura 6**).

Figura 6 – Rota de diluição para doseamento de FEX por espectrofotometria



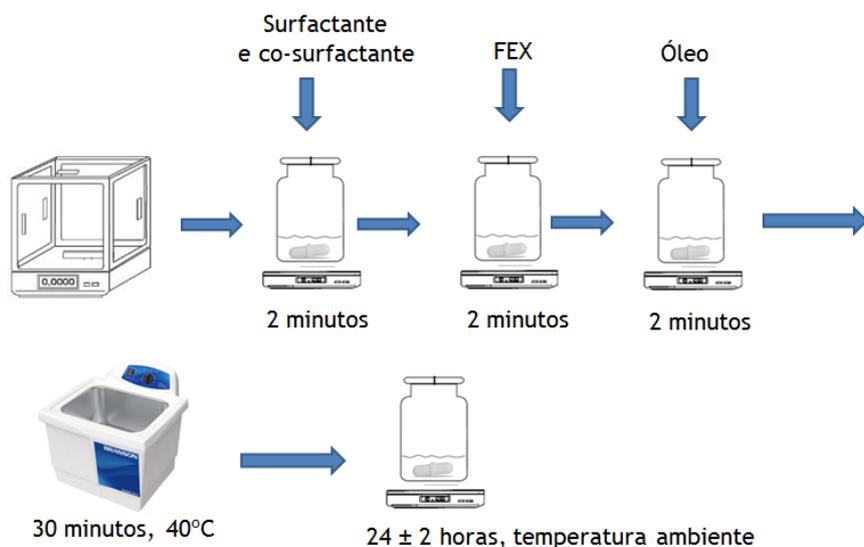
2.2.3 Desenvolvimento das formulações

Inicialmente, SEDDS branco (sem fármaco) foram preparados. As proporções de óleo, surfactante, co-surfactante variaram de 20% a 70% de óleo, 10 a 70% de surfactante e 0 a 30% de co-surfactante, conforme descrito na **Tabela 9**. Cada componente (óleo e surfactantes) foi pesado, feita agitação em vórtex por cerca de 20 segundos. Em seguida, as formulações foram agitadas em banho de ultrassom por 30 minutos, à 40 °C. Foi observado o aspecto quanto à homogeneidade no momento do preparo. As amostras foram armazenadas por 24 horas e nova observação foi feita para verificação da limpidez e separação de fases. As formulações selecionadas foram avaliadas quanto ao tamanho do glóbulo e índice de polidispersão (IP) após diluição 1:200 em água Milli-Q.

2.2.4 Preparação dos SEDDS e suspensão contendo FEX

Para incorporação do FEX, primeiramente foram pesados surfactantes e co-surfactantes e homogeneizados sob agitação magnética por 2 minutos. Em seguida, o FEX foi adicionado e o frasco submetido à nova agitação por mais 2 minutos. Após homogeneização, o óleo foi adicionado aos poucos e o frasco foi submetido por mais 2 minutos de agitação. Como etapas finais do preparo, as formulações foram agitadas em banho de ultrassom por 30 minutos, à 40 °C e então, mantidas em agitador magnético por 24 ± 2 horas, à temperatura ambiente (**Figura 7**).

Figura 7 – Preparo de SEDDS FEX



Nos ensaios de retenção (item **2.2.5.4**) e biológicos (**Capítulo II**, itens **2.2.1.2** e **2.2.2.1**) foi utilizada, para comparação com SEDDS FEX, uma suspensão de FEX onde o fármaco encontra-se livre. Para o preparo da suspensão (FEX 5 mg/mL) foram pesados em um tubo Falcon, contendo esferas de vidro, o FEX seguido pelo Tween 80[®] em uma concentração de 1,5%. O tubo foi agitado em vórtex até a umectação total do pó. Posteriormente, o volume foi completado com água purificada e novamente agitado em vórtex. Foi armazenado sob refrigeração até o momento do uso.

2.2.5 Caracterização das formulações

A suspensão foi caracterizada quanto ao aspecto visual e densidade. O teste de aspecto foi realizado por observação das características físicas. A densidade foi realizada após agitar a preparação. 1 mL da formulação foi pipetada com pipeta calibrada e a seguir pesado. Foi realizado o cálculo através da equação de densidade ($d = m/v$).

2.2.5.1 Determinação do tamanho do glóbulo, IP, potencial zeta e microscopia

O diâmetro hidrodinâmico dos glóbulos e o IP foram determinados pelo método de espalhamento dinâmico da luz utilizando-se o Zetasizer. Para a realização das medidas, os SEDDS foram diluídos 1:200 em água Milli-Q e

agitados em vórtex por 20 segundos. As medidas foram efetuadas à temperatura de 25°C e em ângulo de 90°. Todos os estudos foram conduzidos em triplicata.

O potencial zeta foi determinado pela análise da mobilidade eletroforética das vesículas e do espalhamento de luz das vesículas. As medidas são feitas em triplicata em alíquotas diluídas 1:200, empregando-se o Zetasizer na temperatura de 25 °C, a um ângulo de 90°.

Para verificação da quantidade de fármaco que poderia ser incorporado em SEDDS foram preparadas formulações contendo diferentes concentrações de FEX (10, 20 e 40 mg/mL). Em seguida, as amostras foram avaliadas por microscopia de luz polarizada (aumento de 100 x). O objetivo da visualização foi verificar a presença ou não de cristais de FEX nos SEDDS.

2.2.5.2 Robustez à diluição

Os SEDDS FEX foram diluídos (100, 200, 500 e 1000 vezes em água Milli-Q) e homogeneizados em vórtex por 20 segundos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tamanho do glóbulo, IP e potencial zeta. Sinais de precipitação foram analisados por microscopia de luz polarizada. Todos os estudos foram conduzidos em triplicata.

2.2.5.3 Avaliação da dispersibilidade do SEDDS FEX em meio simulado gástrico e intestinal.

Meio simulado gástrico (MSG) sem enzimas foi preparado ao dissolver 2,0 g de cloreto de sódio em parte da água, adicionou-se 7,0 mL de ácido clorídrico 37% PA e, em seguida, completou-se volume com água para 1000 mL. O pH foi verificado e feito o ajuste para pH $1,2 \pm 0,1$ (USP 35, 2013).

Para o preparo do meio simulado intestinal (MSI) sem enzimas, 6,8 g de fosfato monobásico de potássio foi dissolvido em 250 mL de água. Em seguida, adicionou-se a essa mistura, 77 mL de solução de hidróxido de sódio 0,2 N e 500 mL de água. O ajuste do pH foi realizado com solução de NaOH 0,2 N para pH $6,8 \pm 0,1$ e, em seguida, completou-se volume para 1000 mL (USP 35, 2013).

Para avaliação da dispersibilidade de SEDDS FEX nos meios simulados, os SEDDS FEX foram diluídos 1:200 em MSG pH 1,2 e MSI pH 6,8. O tamanho dos

glóbulos, IP e potencial zeta foram determinados. Sinais de precipitação nos diferentes meios foram analisados por microscopia. Os estudos foram conduzidos em triplicata.

2.2.5.4 Dispersibilidade de FEX em SEDDS após diluição em fluidos gastrointestinais (GI) simulados

O estudo de retenção foi conduzido a fim de avaliar a retenção do FEX nos glóbulos formados após a dispersão dos SEDDS em MSG e MSI. O procedimento também foi realizado utilizando suspensão de FEX previamente preparada. Em um béquer contendo 10 mL de meio (MSG ou MSI), foi adicionado 50 mg de SEDDS FEX (10 mg/mL), resultando numa concentração teórica de 50 µg/mL. De forma similar, foram adicionados 50 mg de suspensão de FEX (10 mg/mL) a um béquer contendo 10 mL de meio (MSG ou MSI). Os sistemas foram mantidos sob agitação magnética a 100 rpm e banho maria a 37°C. Após 2 (MSG) ou 6 (MSI) horas, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada meio e concentração de FEX foi determinada por HPLC antes (FEX Total) e depois (FEX filtrado) da filtração em filtro de 0,45 µm (Merck Millipore, Germany), que foi utilizado para reter cristais de FEX. Para comparação, a suspensão de FEX (10 mg/mL) foi diluída em MSG e MSI e submetida ao mesmo ensaio. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

O percentual de retenção foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Teor \%} = \frac{\text{Filtrado} \times 100}{\text{Total (concentração teórica)}}$$

2.2.6 Estudo de estabilidade de SEDDS FEX

Foram preparados 3 lotes de SEEDS FEX, fracionados em frascos de penicilina transparente. As amostras foram armazenadas ao abrigo da luz à 25 ± 2°C e umidade 30 a 60%. Temperatura e umidade foram monitoradas e registradas. Cada frasco de amostra foi avaliado nos tempos 0 (dia do preparo dos lotes de formulação), 3 e 6 meses quanto ao aspecto físico, tamanho, IP, e potencial zeta conforme descrito no item **2.2.5.1**. O ensaio foi realizado em triplicata. O teor de FEX foi realizado por CLAE.

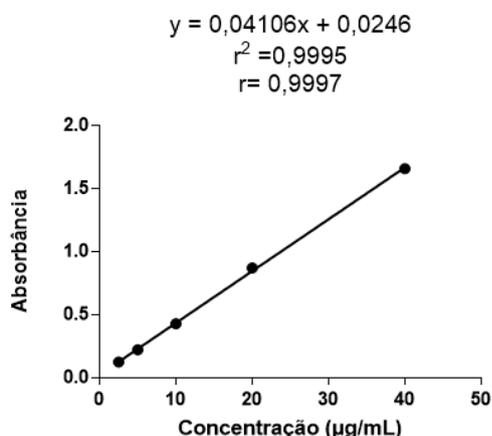
Para quantificação de FEX em SEDDS, foram pesados cerca de 250 mg de SEDDS FEX 10 mg/mL e solubilizados em 5 mL de acetonitrila. Transferiu-se quantitativamente para um balão de 25,0 mL e completou o volume com o mesmo solvente. Desta solução, foram pipetados 5 mL para um balão de 50,0 mL e o volume completado com acetonitrila. Por fim pipetou-se 1 mL desta para um balão de 10,0 mL e o volume completado com fase móvel. A solução final foi filtrada em membrana 0,45 μm e injetada no equipamento com as condições cromatográficas previamente descritas (**Tabela 2**).

3 RESULTADOS

3.1 Validação de método para quantificação do FEX por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência

A linearidade do método de quantificação de FEX por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi verificada por meio da análise de três curvas analíticas no intervalo de concentração de 2,5 a 40 µg/mL. A **Figura 8** apresenta a curva média obtida da triplicata de curvas realizadas em diferentes dias.

Figura 8 - Curva analítica média, gerada a partir de três replicatas, para avaliação da linearidade do método de doseamento de FEX por espectrofotometria no ultravioleta



Após análise estatística foi verificado que os resíduos atendem a todas as premissas necessárias para utilização MMQO e que os dados são adequados para o modelo linear. A curva analítica média apresentou coeficiente de determinação (r^2) de 0,9995 indicando boa qualidade do modelo e coeficiente de correlação (r) 0,9997 maior que o critério mínimo aceitável pela Resolução RDC 166/17 de 0,990 (**Figura 8**). Assim sendo, a linearidade do método de quantificação de FEX é adequada para o intervalo de concentração de 2,5 a 40 µg/mL por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

A **Tabela 3** apresenta dos resultados da absorbância das diluições dos excipientes em DMSO utilizados no desenvolvimento do SEDDS.

Tabela 3- Absorbâncias diluições dos excipientes em DMSO, em 320 nm.

Excipiente	Resposta (absorbância)
Óleos	
Triglicéride de cadeia média	0,004
Óleo de soja	0,064
Maisine CC [®]	0,082
Surfactantes	
Labrasol [®]	0,025
Tween 80 [®]	0,036
Cremophor EL [®]	0,056
Kolliphor RH 40 [®]	0,006
Co-surfactante	
Span 80 [®]	0,036
Co solvente	
Etanol	0,036

Como os valores de todas as absorbâncias encontradas foram próximos de zero, o método foi considerado com seletividade adequada para determinação da solubilidade do FEX nestes excipientes.

Os valores médios das absorbâncias referentes as soluções de FEX 2,5; 10,0 e 40,0 µg/mL, baixa, média e alta concentração, respectivamente, obtidos nos dois dias de análise, os DP e os DPR encontrados para cada nível de concentração estão apresentados na **Tabela 4**. Os valores de DPR obtidos foram inferiores a 5%, indicando boa precisão intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrída (precisão intermediária) do método de doseamento de FEX por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (BRASIL, 2017).

Tabela 4 – Valores de absorvância e DPR estimados para precisão intra-corrída e inter-corrídas de método de doseamento de FEX por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (n=3)

	Concentração teórica (µg/mL)	Absorvância média ± DP	DPR (%)
1º dia	2,5	0,116 ± 0,003	2,8
	10,0	0,420 ± 0,008	1,8
	40,0	1,682 ± 0,070	4,2
2º dia	2,5	0,118 ± 0,005	4,7
	10,0	0,430 ± 0,017	4,0
	40,0	1,657 ± 0,013	0,8
Inter-corrídas	2,5	0,117 ± 0,001	1,0
	10,0	0,425 ± 0,007	1,6
	40,0	1,670 ± 0,017	1,0

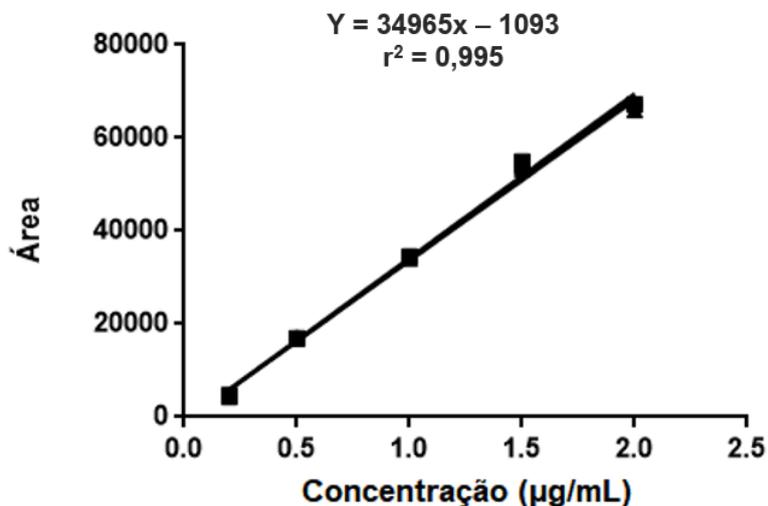
DP = desvio padrão; DPR (%) = desvio padrão relativo

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 **2.2.1**. Os valores de LD e LQ encontrados foram de 0,9 e 2,7 µg/mL, respectivamente.

Portanto, o método apresentou seletividade, linearidade e precisão adequadas e foram determinados os limites teóricos de detecção e quantificação como estabelecido pela RDC nº 166/17. O método foi validado quanto a estes parâmetros, podendo ser utilizado para o doseamento do FEX nos testes de solubilidade.

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (BRASIL, 2017). Através da análise de três curvas analíticas com intervalo de concentração igual a 0,2 a 2 µg/mL, obteve-se a curva analítica média do método cromatográfico, que é exibida na **Figura 9**.

Figura 9 - Representação gráfica da curva analítica média para avaliação da linearidade do método de doseamento de FEX por CLAE.

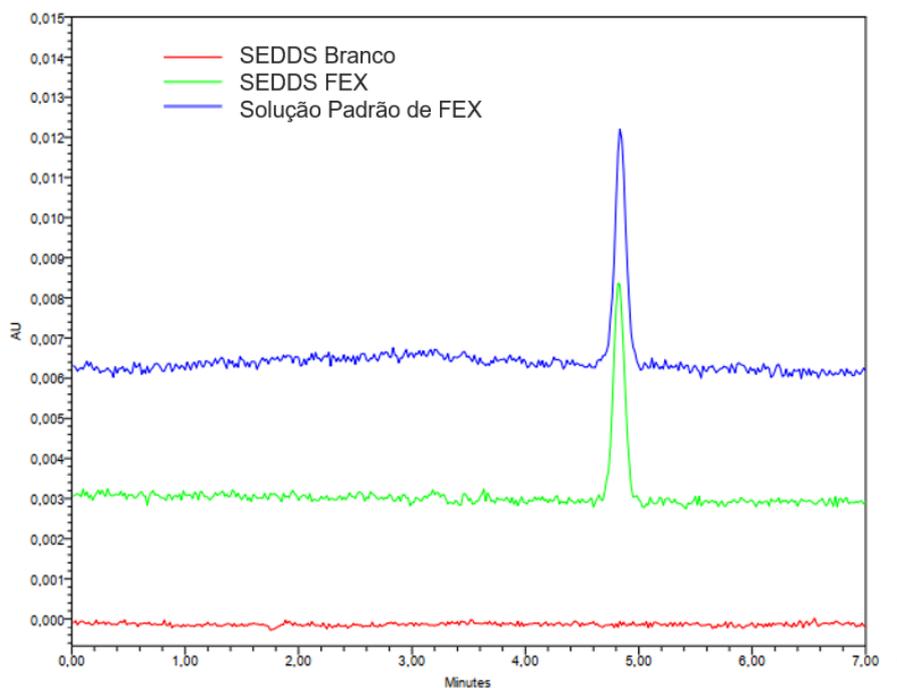


A equação da reta obtida apresentou coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,997 e determinação linear (r^2) igual a 0,995.

Os valores obtidos indicam que, dentro da faixa de trabalho pré-estabelecida, há uma correlação direta e linear entre as concentrações das soluções e as respostas apresentadas na análise. É preconizado pela RDC 166/2017 que o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,990 (BRASIL, 2017). Sendo assim o valor obtido obedece ao estabelecido pela legislação.

Para avaliação da seletividade, foram preparados SEDDS branco (sem FEX) e SEDDS FEX e, após diluição, alíquotas foram injetadas no CLAE. As respostas correspondentes a SEDDS branco, SEDDS FEX e padrão de FEX são mostradas na **Figura 10**:

Figura 10 – Cromatogramas de amostras de SEDDS, SEDDS FEX e padrão de FEX em 320 nm.



A seletividade do método analítico é demonstrada através da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, mesmo na presença de outros componentes presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017). O cromatograma referente a amostra SEDDS FEX apresentou pico com máximo de absorção no tempo de retenção próximo a 5 minutos correspondente ao apresentado no cromatograma de FEX padrão. Após a injeção do branco no cromatógrafo, a amostra não apresentou absorção neste mesmo comprimento de onda. Não foram observados interferentes na amostra analisada, portanto, o método é seletivo para quantificação de FEX.

O valor do ângulo de pureza verificado foi de 1,037 e o ângulo limite de 1,162 indicando que FEX pode ser determinado na presença de outros componentes.

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017). Para tal, analisou-se a recuperação do FEX em amostras de placebo contendo padrão da substância

ativa em três níveis de concentrações. Os valores obtidos estão representados na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Recuperação média e Desvio Padrão Relativo (DPR) para determinação da exatidão.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental	Recuperação	Recuperação média ± DP	DPR (%)
0,21	0,24	114	109 ± 4,5	4,3
	0,23	109		
	0,22	105		
1,03	1,07	104	103 ± 2,6	2,5
	1,03	100		
	1,08	105		
2,06	2,05	100	101 ± 1,53	1,5
	2,13	103		
	2,09	101		

Para as concentrações de trabalho, consideram-se aceitáveis valores de recuperação média de 80-110% no parâmetro da exatidão (AOAC, 2016). Em todas as faixas de concentrações, os valores de recuperação obtidos encontram-se dentro do critério estabelecido pela norma. Dessa forma, infere-se que o método se apresenta exato, reproduzindo valores reais adequadamente próximos dos valores teóricos.

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos através de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (BRASIL, 2017). Neste estudo, o parâmetro foi avaliado por meio da repetibilidade, definida como avaliação dos resultados obtidos dentro de um curto período, com amostras feitas em nosso laboratório, no mesmo dia. As análises foram feitas em níveis de baixa, média e alta concentração e os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 6**.

De acordo com o Guideline da AOAC (2016), os valores de DPR máximos permitidos variam com a concentração dos pontos de análise. Dessa forma, as

concentrações na faixa de 0,20 e 1,0 µg/mL podem apresentar um valor máximo de máximo de 11%. Já para a concentração de 2,0 µg/mL, o DPR máximo permitido é de 7,3%. Uma vez que os valores de DPR obtidos foram inferiores aos valores preconizados, define-se que o método apresentou precisão adequada para as faixas de concentrações analisadas.

Tabela 6 – Determinação da repetibilidade (precisão intra-dia).

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental	CMD ± DP	DPR (%)
0,22	0,25	0,26 ± 0,02	5,8
	0,26		
	0,28		
1,08	1,06	1,10 ± 0,04	3,6
	1,14		
	1,10		
2,16	2,10	2,12 ± 0,02	0,72
	2,13		
	2,12		

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017). Neste estudo, a robustez foi avaliada através de alterações nos parâmetros de volume de injeção, fluxo e composição da fase móvel. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 7**.

Observa-se que as alterações nas condições dos parâmetros analisados não apresentaram impacto na quantificação do FEX, em que foram mantidas recuperações médias dentro do preconizado de 80-110%. Portanto, o método desenvolvido foi considerado robusto frente às alterações dos parâmetros analisados e adequado para a utilização na rotina.

Tabela 7 – Recuperação média frente a alteração de condições de parâmetros para análise de robustez.

Parâmetro	Condições	Recuperação média \pm DP	DPR (%)
Volume de injeção	19 μ L	94 \pm 4,2	4,3
	20 μ L	97 \pm 3,5	3,6
	21 μ L	100 \pm 1,0	1,0
Fluxo de fase móvel	0,9 mL/min	104 \pm 2,6	2,8
	1,0 mL/min	97 \pm 3,2	3,4
	1,1 mL/min	82 \pm 2,4	2,6
Composição de fase móvel	65:35 (ACN:H ₂ O)	89 \pm 1,0	1,1
	70:30 (ACN:H ₂ O)	91 \pm 2,9	3,2
	75:35 (ACN:H ₂ O)	92 \pm 0,7	0,8

3.2 Estudo de solubilidade do FEX em diferentes excipientes

Excipientes comumente utilizados no preparo dos SEDDS foram investigados para avaliar sua capacidade de dissolver a maior quantidade de FEX. Na **Tabela 8** observa-se a solubilidade de FEX (mg/mL) nos diferentes excipientes. Entre os óleos testados (triglicéride de cadeia média, óleo de soja e Maisine CC[®]) o triglicérideo de cadeia média foi o óleo que solubilizou maior quantidade de FEX (4,9 \pm 0,3 mg/mL).

A solubilidade do FEX nos surfactantes Labrasol[®], Tween 80[®] e Kolliphor RH 40[®] foi alta (variou de 20 a 24 mg/mL), sendo similar entre esses excipientes (**Tabela 8**). A solubilidade do FEX no Cremophor EL[®] (17,8 \pm 0,7 mg/mL) foi menor do que aquela observada nos demais surfactantes. A exceção do Cremophor EL[®], todos os demais surfactantes foram selecionados para desenvolvimento do SEDDS.

O FEX apresentou baixa solubilidade em etanol e além disto possui uma séria limitação do seu uso que é o fato de evaporar de dentro das cápsulas de gelatina, levando à precipitação de fármacos (BORHADE *et al.*, 2009).

Tabela 8 - Solubilidade de FEX em diferentes excipientes

Excipiente	Solubilidade (mg/mL)
Óleos	
Triglicéride de cadeia média	4,9 ± 0,3
Óleo de soja	3,7 ± 0,5
Maisine CC [®]	3,0 ± 0,4
Surfactantes	
Labrasol [®] (EHL14)	23,9 ± 0,9
Tween 80 [®] (EHL 15)	23,4 ± 1,5
Cremophor EL [®] (EHL14)	17,8 ± 0,7
Kolliphor RH 40 [®] (EHL 14-16)	20,3 ± 1,9
Co-surfactante	
Span 80 [®] (EHL 4,3)	6,4 ± 0,1
Co solvente	
Etanol	3,4 ± 0,2
Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3)	

A solubilidade do FEX no Span 80[®], um tensoativo lipofílico, foi menor do que aquela observada nos tensoativos hidrofílicos (EHL alto). Entretanto, a presença de tensoativos lipofílicos (co-surfactantes) diminui a tensão interfacial e confere ao filme interfacial flexibilidade suficiente para ocupar diferentes curvaturas para nanoemulsões (NEWALE *et al.*, 2015). Assim sendo, o Span 80[®] foi selecionado com este objetivo.

3.3 Desenvolvimento das formulações

Várias formulações de SEDDS branco foram preparadas para verificação inicial da limpidez e homogeneidade. Foram preparadas 32 formulações, entretanto, somente aquelas que apresentaram aspecto límpido foram selecionadas para os estudos subsequentes. A **Tabela 9** descreve a composição das formulações selecionadas.

As composições utilizando 45 a 60% de óleo de soja com 20 a 32% de surfactantes (Tween 80[®] e Kolliphor RH 40[®]) e 8% de co-surfactante (Span 80[®]), foram testadas, mas houve separação de fases. O Labrasol[®] também foi testado

sendo utilizado como único surfactante, associado com Tween 80[®] e Span 80[®] e TCM, entretanto, não houve homogeneidade das preparações. Formulações utilizando etanol como co-solvente, refletiram em glóbulos de tamanho superior a 500 nm e IP > 0,2 e, portanto, foram descartadas da seleção de formulações.

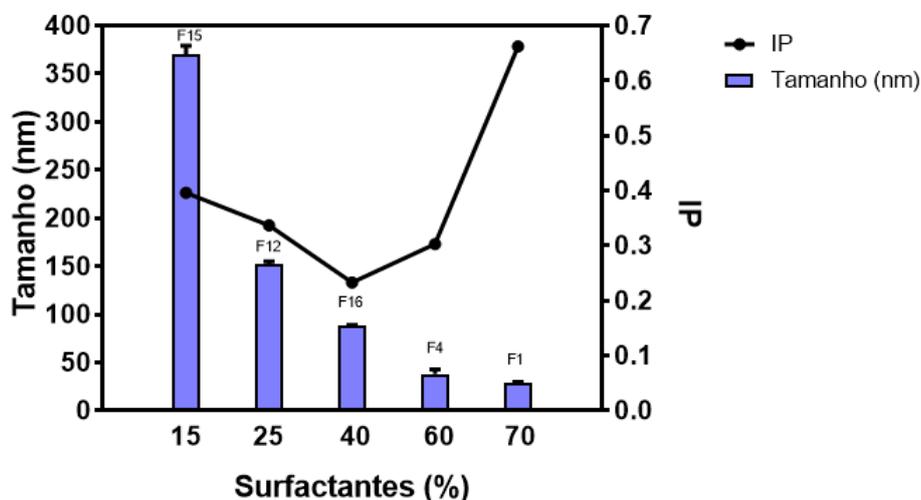
Tabela 9 – Composição das formulações dos SEDDS branco (% p/p) e efeito da variação de óleo, emulsionante, co emulsionante nas propriedades físico-químicas.

Formulação	TCM	Tween 80	Span 80	Kolliphor RH 40	Tamanho, nm*	IP
F1	20	70	10		29 ± 1	0,662 ± 0,016
F2	20	60	20		291 ± 3	0,329 ± 0,054
F3	20	50	30		351 ± 9	0,311 ± 0,135
F4	30	60	10		38 ± 5	0,303 ± 0,076
F5	30	50	20		231 ± 7	0,425 ± 0,079
F6	30	40	30		362 ± 4	0,386 ± 0,164
F7	40	30	30		528 ± 54	0,323 ± 0,233
F8	50	40	10		129 ± 2	0,246 ± 0,010
F9	50	30	20		130 ± 1	0,551 ± 0,033
F10	50	20	10	20	88 ± 1	0,255 ± 0,008
F11	60	32	8		181 ± 8	0,310 ± 0,008
F12	60	25	15		152 ± 3	0,337 ± 0,042
F13	60	20	20		152 ± 8	0,537 ± 0,007
F14	60	16	8	16	153 ± 2	0,249 ± 0,006
F15	70	15	15		370 ± 9	0,396 ± 0,082
F16	50	30	10	10	88 ± 1	0,233 ± 0,009

Notas: * SEDDS branco diluído em água Milli-Q (1:200 v/v). Todos os dados são expressos como média ± desvio padrão (n=3).

A observação da **Figura 11** mostra a influência do aumento da concentração dos surfactantes (utilizados na composição dos SEDDS) sobre o tamanho dos glóbulos. Pode ser observado que aumentando a concentração de surfactantes (15 até 70%) nos SEDDS, diminui o tamanho dos glóbulos, entretanto, houve um aumento do IP quando a concentração foi 70%.

Figura 11 – Efeito da concentração de surfactantes no tamanho de glóbulos e IP



Efeito da porcentagem de surfactantes no tamanho dos glóbulos e IP. As formulações foram diluídas 1:200 em água Milli-Q.

Ao observar a **Tabela 9**, o efeito da concentração do co-surfactante Span 80[®] e sua interferência no tamanho de glóbulo pode ser verificado nas formulações F1 a F3 e F4 a F6. O aumento da concentração de Span 80[®] de 10 até 30% promove um aumento no tamanho de glóbulo. Comparando os testes F8, F10 e F16 obteve-se SEDDS estáveis e quando diluídos em água os glóbulos apresentaram baixos valores de tamanho e IP (próximo a 0,2), o que infere na homogeneidade e estabilidade. Entretanto, a inclusão do Kolliphor RH 40[®] refletiu em menor tamanho de F10 e F16. Fato semelhante foi observado por Zupančič *et al.* (2016) que concluiu que formulações com Cremophor RH 40[®] apresentaram glóbulos menores do que as formulações contendo apenas Tween 80[®]. Assim sendo, as formulações F8, F10, F14 e 16 foram selecionadas para continuidade dos estudos.

3.4 Caracterização das formulações

A seguir estão descritos testes de caracterização referentes ao SEDDS carregados com FEX (SEDDS-FEX).

3.4.1 Tamanho, IP, Potencial zeta e microscopia

Na **Tabela 10** observamos os dados de tamanho, IP e potencial zeta dos SEDDS contendo FEX a 10 mg/mL após diluição 1:200 em água. Os dados referentes ao IP e potencial zeta foram similares entre as formulações e não houve precipitação de FEX, conforme avaliação microscópica das formulações.

Tabela 10 – Caracterização de SEDDS FEX 10 mg/mL F08, F10, F14 e F16

SEDDSFEX	Tamanho (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Microscopia
F08	190 ± 3	0,267 ± 0,018	-19,8 ± 0,5	Sem precipitado de FEX
F10	79 ± 3	0,237 ± 0,016	-21,9 ± 4,5	Sem precipitado de FEX
F14	146 ± 4	0,238 ± 0,012	-22,8 ± 0,6	Sem precipitado de FEX
F16	91 ± 3	0,242 ± 0,005	- 16,7 ± 0,2	Sem precipitado de FEX

(n=3) Diluição 1:200 em água Milli-Q; precipitação verificada por microscopia de luz polarizada

Segundo Kohli *et al.* (2010), SEDDS é um sistema que produz emulsões com tamanho de glóbulos de alguns nanômetros até vários micrômetros. F8, F10, F14 e F16 apresentaram resultados de tamanho abaixo de 200 nm, embora os tamanhos dos glóbulos das formulações F10 e F16 tenham sido menores do que aqueles observados para as demais (F08 e F14). Nas quatro formulações testadas obteve-se IP menor que 0,3. Este parâmetro fornece informações sobre o grau de homogeneidade de uma amostra. Quanto menor o seu valor, maior será a homogeneidade do diâmetro dos glóbulos no sistema. Valores de IP inferiores a 0,3 são aceitáveis e dependendo da via de administração podem ser aceitos até valores maiores (DAS; CHAUDHURY, 2011). O potencial zeta (mV) para as formulações F8, F10, F14 e F16 foi -19,8 ± 0,5; -21,9 ± 4,5; -22,8 ± 0,6 e - 16,7 ± 0,2, respectivamente. Portanto, os valores encontrados foram abaixo do valor de 30 mV, em módulo.

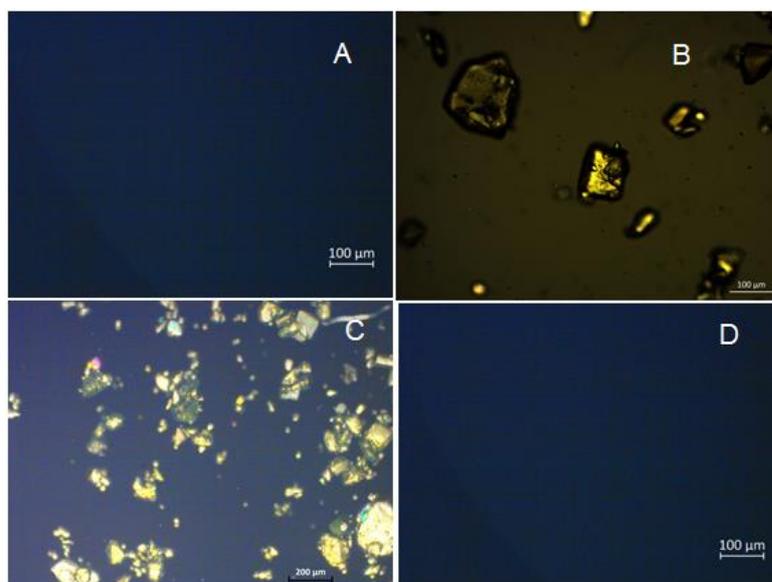
Após 24 horas, F10 apresentou turvação e, portanto, essa formulação mostrou-se inadequada. F16 foi selecionada para estudos posteriores devido ao seu menor tamanho de glóbulos e IP da nanoemulsão formada após diluição dos SEDDS e adequação dos parâmetros de estabilidade e potencial zeta, bem como isotropia após 24 horas.

Conforme observado na **Figura 12** não houve precipitação de FEX quando a concentração do fármaco no SEDDS foi igual a 10 mg/mL (SEDDS FEX 10). Entretanto, a precipitação do fármaco foi claramente observada quando a concentração de FEX nos SEDDS foi equivalente a 20 ou 40 mg/mL (SEDDS FEX 20 e SEDDS FEX 40). Esses dados sugerem que a concentração máxima de FEX nos SEDDS deve ser de 10 mg/mL.

3.4.2 Robustez à diluição

A robustez foi monitorada após diluição do SEDDS FEX em água Milli-Q nas seguintes diluições: 100, 200, 500 e 1000 vezes. Conforme a **Tabela 11**, todas emulsões resultantes possuem tamanho nanométrico (tamanho médio inferior a 100 nm). Demonstra-se, então, sua robustez à diluição.

Figura 12 – Microscopia de luz polarizada para visualização de FEX



A - SEDDS FEX 10 mg/mL B - SEDDS FEX 20 mg/mL C- SEDDS FEX 40 mg/mL D- SEDDS branco

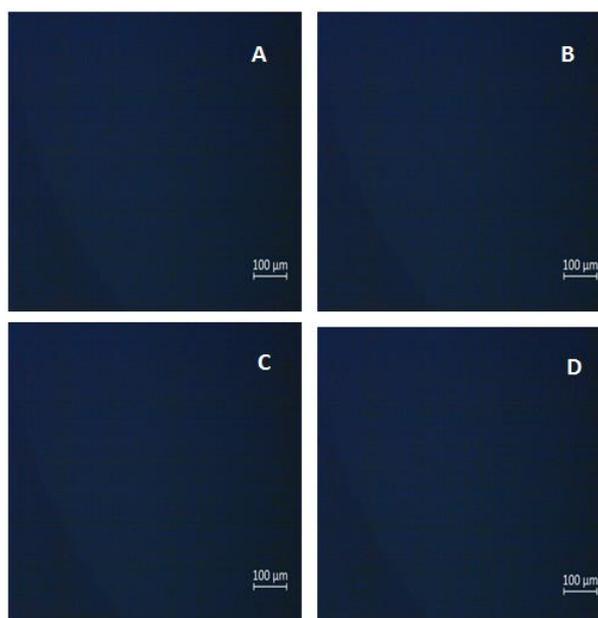
Tabela 11 - Tamanho e IP de SEDDS FEX 10 mg/mL diluída em diversas proporções

SEDDS FEX F10	Diluição 1:100	Diluição 1:200	Diluição 1:500	Diluição 1:1000
Tamanho (nm)	95 ± 1	77 ± 1	108 ± 1	110 ± 3
IP	0,240 ± 0,012	0,187 ± 0,006	0,244 ± 0,005	0,231 ± 0,011
Potencial Zeta	- 23,2 ± 1	-24,8 ± 1,2	-17,3 ± 0,7	-16,0 ± 0,4

(n=3); Diluição em água Milli-Q

A **Figura 13** mostra a ausência de precipitação na avaliação microscópica de todas as diluições. Este resultado é importante pois a ocorrência de precipitação ao diluir o fármaco poderia retardar sua absorção, o que não é desejável.

Figura 13- Microscopia SEDDS FEX 10 mg/mL diluída em diversas proporções



A – SEDDS FEX 1:100 B – SEDDS FEX 1:200 C – SEDDS FEX 1:500 D – SEDDS FEX 1:1000
Diluição em água Milli-Q

3.4.3 Avaliação da dispersibilidade do SEDDS FEX em MSG e MSI.

As condições de variação de pH dos meios MSG (pH 1,2) e MSI (pH 6,8) visam simular o que acontece no trânsito gastrointestinal. Os dados de tamanho, IP, potencial zeta e microscopia após diluição (1:200) do SEDDS FEX nos meios MSG (pH 1,2) e MSI (pH 6,8) estão apresentados na **Tabela 12**.

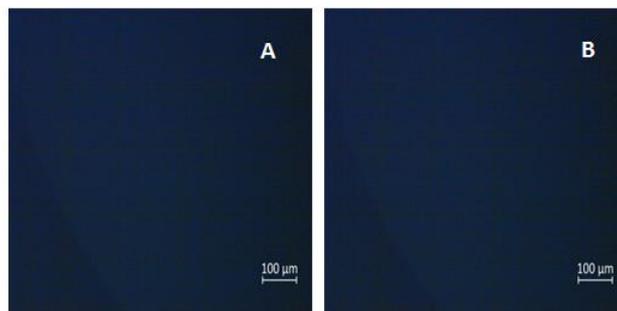
Tabela 12 - Características de SEDDS FEX em fluido gástrico simulado (pH 1,2) e fluido intestinal simulado (pH 6,8)

SEDDS FEX F10	Tamanho (nm)	IP	Potencial Zeta	Microscopia
MSG pH 1,2	94 ± 9	0,250 ± 0,034	- 0,19 ± 0,13	Sem precipitado*
MSI pH 6,8	97 ± 2	0,242 ± 0,013	- 2,64 ± 1,15	Sem precipitado*

(n=3) * Diluído 1:200 em água Milli-Q

Segundo Gupta *et al.* (2011), o pH do meio pode influenciar consideravelmente o comportamento de sistemas auto emulsionáveis na emulsificação espontânea. SEDDS FEX (F16) diluído nos meios simulados apresentou tamanho de glóbulos e IP inferiores a 100 nm e 0,3, respectivamente. O potencial zeta aproximou-se de zero pelo fato dos meios simulados gástrico e intestinal possuírem eletrólitos, o que neutraliza as cargas de superfície. Esses achados sugerem que o pH não teria influência na emulsificação e, provavelmente, no desempenho *in vivo* do SEDDS. Na **Figura 14** observa-se ausência de precipitação de FEX nos meios. A ausência de precipitação do fármaco demonstra que possivelmente o FEX se manteve solúvel e associado aos glóbulos da nanoemulsão.

Figura 14- Microscopia SEDDS FEX em MSG pH 1,2 e MSI pH 6,8



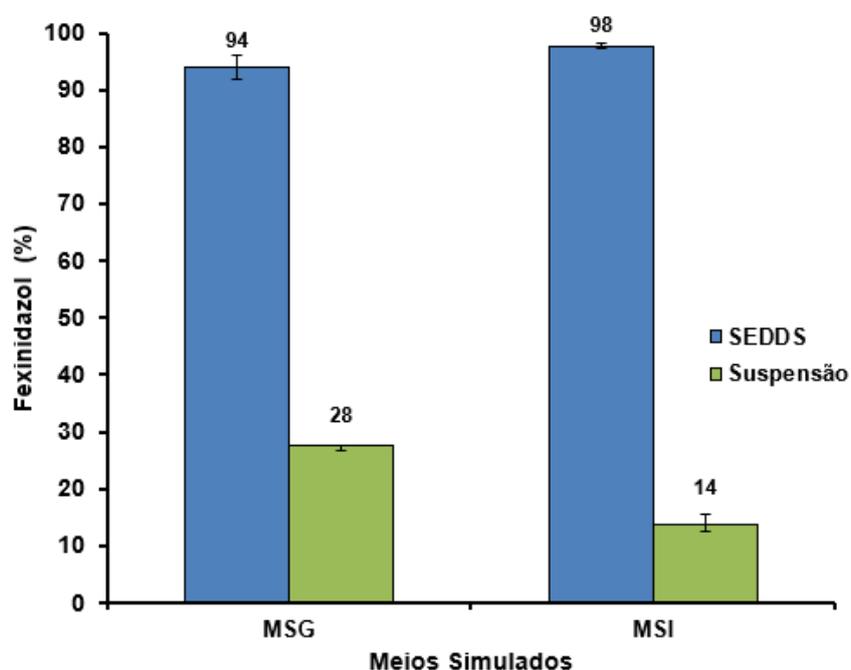
A - MSG pH 1,2; B - MSI pH 6,8

3.4.4 Dispersibilidade de FEX em SEDDS após diluição em fluidos gastrointestinais simulados

Sabe-se que os SEDDS são formulações que otimizam a solubilização de fármacos de baixa solubilidade em água. Assim sendo, um estudo foi conduzido a fim de avaliar a retenção do FEX nos glóbulos formados após a diluição dos SEDDS em meios biológicos simulados. Dessa forma, alíquotas do meio foram quantificadas antes e depois da filtração em membrana de 0,45 μm . Os dados obtidos são apresentados na **Figura 15**.

A porcentagem de FEX retido após diluição do SEDDS nos meios MSG e MSI foi de $94 \pm 2\%$ e $98 \pm 1\%$, respectivamente e esses valores foram significativamente maiores do que aqueles observados para a suspensão ($28 \pm 1\%$ e $14 \pm 2\%$, respectivamente). Estes dados sugerem que SEDDS forma nanoemulsões prevenindo a precipitação de FEX após diluição.

Figura 15 – Teor de FEX em MSG e MSI antes e após filtração em membrana 0,45 μm .



Porcentagem de FEX solúvel em MSG e MSI quando carregado em SEDDS ou na suspensão.

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$) nas formulações emulsificadas após diluição em MSG (após 2 horas) e MSI (após 6 horas).

Finalmente, a suspensão de FEX também foi avaliada e apresentou-se como líquido amarelado com finas partículas suspensas. A densidade encontrada foi de 0,9920 g/mL.

3.5 Estudo de estabilidade

SEDDS FEX foi armazenado em frascos de vidro lacrados a 25 °C e protegidos da luz por um período de 6 meses. A temperatura ambiente e a umidade relativa (UR) foram monitoradas semanalmente (valores de 25 ± 2 °C e 30 a 60 % UR, respectivamente). Após 0, 3 e 6 meses de armazenamento, o diâmetro dos glóbulos, após diluição dos SEDDS, foi de 114 ± 6 nm, 104 ± 4 nm e 116 ± 3 nm, respectivamente, enquanto que os valores para o IP foram de 0,254 ± 0,006, 0,247 ± 0,002 e 0,243 ± 0,014. Os valores para potencial zeta foram de -15,5 ± 2,7 mV, -11,6 ± 0,9 mV e -14,8 ± 1,9 mV após 0, 3 e 6 meses, respectivamente. O conteúdo do FEX permaneceu praticamente constante durante o período de estudo. Os valores foram 96 ± 3%, 96 ± 3% e 96 ± 5% após 0, 3 e 6 meses, respectivamente (**Tabela 13**). Os cristais de FEX estavam ausentes no SEDDS durante o período de avaliação (**Figura 16**). O FEX SEDDS permaneceu homogêneo e isotrópico.

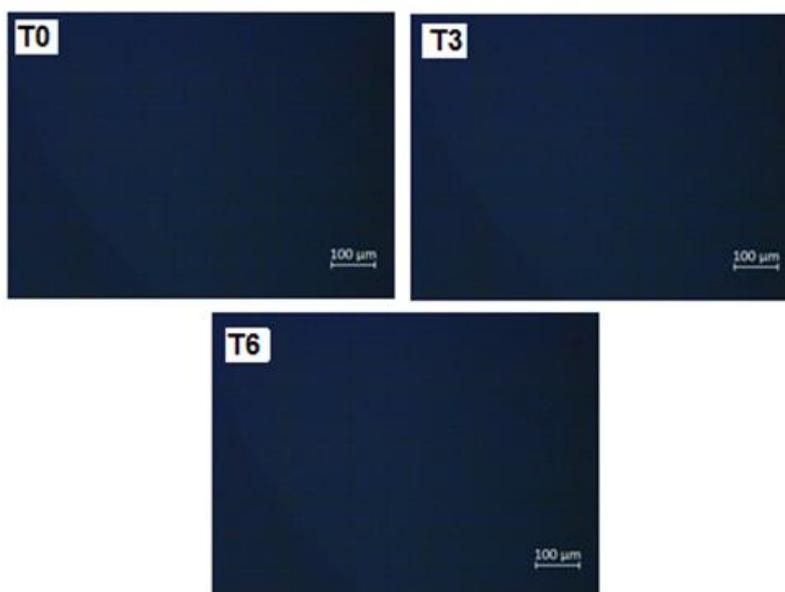
Tabela 13 – Estabilidade do SEDDS (10 mg/mL) após 6 meses em temperatura ambiente (25°C).

Parâmetro analisado	T0	T3	T6
Tamanho de glóbulos (nm)*	114 ± 6	104 ± 4	116 ± 3
Polidispersão*	0,254 ± 0,006	0,247 ± 0,002	0,243 ± 0,014
Potencial zeta (mV)*	-15,5 ± 2,7	-11,6 ± 0,9	-14,8 ± 1,9
Presença de precipitado	Ausente	Ausente	Ausente
Teor (%)	96 ± 3	96 ± 3	96 ± 5
Aspecto Macroscópico	Límpido amarelado	Límpido amarelado	Límpido amarelado

Os valores foram expressos como média ± DP. (n=3) *Diluído 1:200 em água Milli-Q

Os lotes preparados se mantiveram com tamanho de glóbulo inferior a 200 nm, IP próximo a 0,3. O potencial zeta encontrado, ainda que inferior ao módulo ± 30 mV pode desfavorecer a agregação de gotículas devido à repulsão eletrostática. O fato de não haver precipitado sugere que o FEX se manteve solúvel. Estes achados favorecem a estabilidade da formulação, conforme anteriormente discutido no item 3.4.1. De acordo com a RDC 318/2019, é aceitável diferenças no teor de até 5% em relação ao valor inicial. Sendo assim, a formulação foi estável durante o estudo sem variações significativas da concentração da substância.

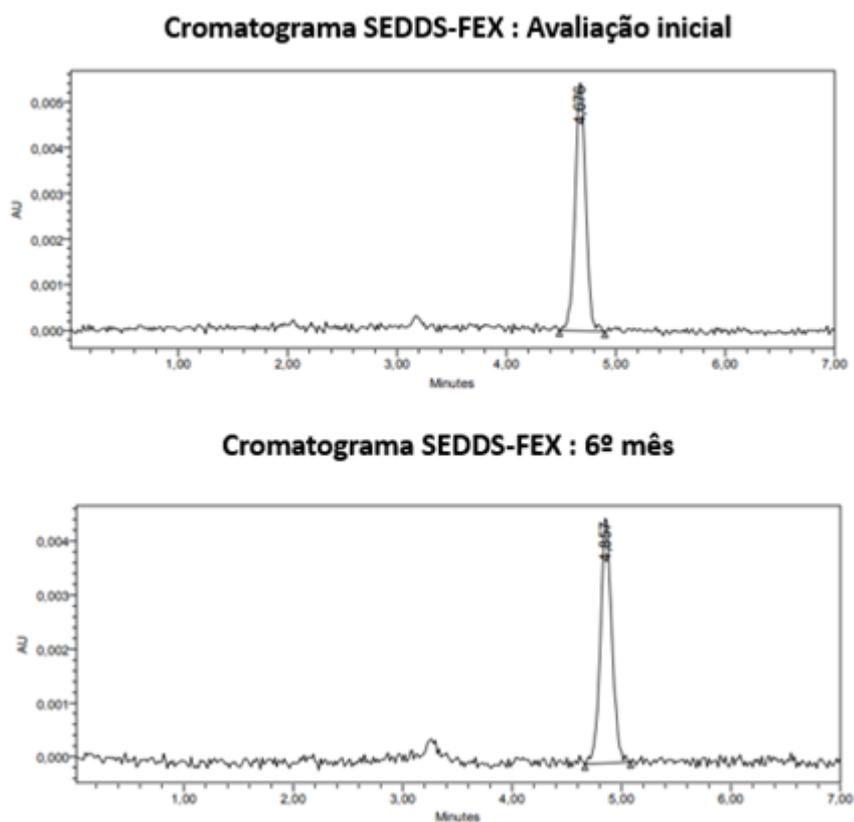
Figura 16 – Microscopia de luz polarizada nos tempos inicial (T0) e após 3 (T3) e 6 (T6) meses de armazenamento dos SEDDS à temperatura ambiente.



As análises foram realizadas em Microscópio Óptico Zeiss®, através de luz polarizada de aumento 100x.

Também é possível verificar através da análise dos cromatogramas, do tempo inicial do estudo e do 6º mês, que não houve degradações significativas do FEX uma vez que não houve formação de picos adicionais (**Figura 17**), indicando a estabilidade da formulação.

Figura 17 – Cromatogramas de SEDDS FEX no tempo inicial e após 6 meses de estudo de estabilidade



Análises foram feitas em triplicata e os cromatogramas apresentados são semelhantes

**CAPÍTULO II – ENSAIOS
BIOLÓGICOS DE EFICÁCIA E
PERMEABILIDADE INTESTINAL**

1 INTRODUÇÃO

O tratamento oral das leishmanioses é uma alternativa interessante que pode diminuir a toxicidade aguda associada à administração endovenosa, reduzir custo de tratamento e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Assim, o desenvolvimento de novos medicamentos de administração oral eficazes e seguros é desejável (PHAM *et al.*, 2013).

Estudos pré-clínicos são precursores para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de diferentes doenças, sendo amplamente utilizados para doenças infecciosas e parasitárias (WYLLIE *et al.*, 2012). Em nosso estudo a eficácia do SEDDS FEX para o tratamento da LV causada por *L. infantum* foi avaliada através da determinação da carga parasitária no baço e fígado em dois tempos de tratamento distintos.

Vários modelos animais são utilizados para os estudos *in vivo* da LV, sendo estes dotados de características específicas que devem ser consideradas, pois nenhum dos modelos reproduz fielmente a doença humana. Isto se deve as diferenças fisiológicas entre as espécies e as diferenças entre a infecção natural e artificial. Entretanto, vários autores conseguem garantir a confirmação da infecção e avaliar o impacto dos tratamentos realizados. Podemos considerar o modelo animal mais apropriado aquele que reproduz melhor os mecanismos patológicos similares aos da doença humana (CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 2014).

Isto posto, o objetivo deste capítulo é avaliar a eficácia *in vivo* de SEDDS FEX no tratamento experimental da LV causada por *L. infantum* em dois tempos de tratamento, assim como verificar se a administração da formulação causaria irritação gastrointestinal através do ensaio de permeabilidade intestinal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Triglicerídeo de Cadeia Média (Lipoid), Polissorbato 80 (Tween 80[®], Croda), Span 80[®] (Sigma), óleo de rícino hidrogenado PEG-40 (Kolliphor RH 40[®], Sigma-Aldrich), Fexinidazol (Centipharm). Meio Schineider (Merck, Alemanha), suplementado com soro fetal bovino a 10% (Gibco, Eggenstein, Alemanha), solução contendo 100 UI penicilina potássica e 100 µg/ mL de sulfato de estreptomicina. (Sigma-Aldrich, EUA). Solução de ácido dietilenotriamina pentacético marcada com tecnécio-99m (^{99m}Tc-DTPA) usada para avaliar as alterações na permeabilidade intestinal (PI).

2.2 Métodos

2.2.1 Avaliação da eficácia de SEDDS-FEX em animais infectados com *L. infantum*

Após o preparo e caracterização das formulações, conforme descrito no **Capítulo I, itens 2.2.4 e 2.2.5 e 2.2.6**, foram realizados dois estudos de eficácia antileishmania. No primeiro estudo, os animais foram tratados por 5 dias consecutivos, enquanto que no segundo os animais foram tratados por 10 dias consecutivos. Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA / UFMG: 67/2018 e 261/2018) e atenderam às diretrizes institucionais e nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório.

2.2.1.1 Parasitos e inculcação nos animais

Para propagação *in vitro* de promastigotas da *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) foi utilizado o meio Schneider, completo, enriquecido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado e 10 µL/ mL de solução de antibióticos contendo penicilina potássica (100 U/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL). As promastigotas foram mantidas em cultivo (estufa BOD – 23^o C) até atingirem a fase estacionária de crescimento. A curva de crescimento foi monitorada por contagem realizada em câmara de Neubauer.

Camundongos fêmeas BALB/c (idade: cerca de 6-7 semanas) foram inoculados com com 2×10^7 de promastigotas de *L. infantum*, via intravenosa (0,2 mL), na veia lateral da cauda.

2.2.1.2 Tratamento dos animais

Sete dias após a inoculação, os animais foram separados em grupos (n = 7) pesados e tratados por via oral (gavagem, 0,2 mL): suspensão FEX (50 mg / kg / dia), FEX SEDDS (50 mg / kg / dia - uma mistura de SEDDS FEX com água na proporção 1:1) e SEDDS em branco, (sem FEX - uma mistura de SEDDS com água na proporção 1:1). Os outros dois grupos foram: Glucantime® 150 Sb⁵⁺ mg/kg/dia foi administrado por via intraperitoneal (0,2 mL), e controle (animais infectados e não tratados). Todos os tratamentos foram realizados por 5 ou 10 dias consecutivos. Os animais foram alojados em gaiolas e submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, com temperatura controlada, e com livre acesso a comida e água. Três dias após o fim do tratamento, todos os animais foram eutanasiados e a carga parasitária no fígado e no baço foi determinada por um ensaio de diluição limitante.

Para avaliação da toxicidade foi realizada avaliação da massa corporal dos animais no início do tratamento e no dia da eutanásia; observação de pilo ereção; diarreia e mudança no comportamento.

2.2.1.3 Ensaio de diluição limitante

Para avaliação da eficácia do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ no terceiro dia após o fim do tratamento e determinada a carga parasitária no fígado e no baço.

O fígado e o baço foram pesados, triturados com agitador Ultra-turrax (IK, Alemanha) em meio Schneider contendo 20% de soro fetal bovino e 10 µL/mL de solução contendo 100 UI penicilina potássica e 10 µg/mL de sulfato de estreptomicina. Dois mL de sobrenadante do homogeneizado do fígado foram transferidos para um novo tubo estéril contendo 6 mL de meio. Em seguida, o tecido foi centrifugado a 52 g (fígado) ou 45 g (baço) por dois minutos para sedimentação. Os sobrenadantes foram separados e centrifugados a 1900 g por

10 min (fígado) ou 1620 g por 2 min (baço). Os peletes formados foram suspensos em 1 mL de meio de Schneider contendo 20% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As diluições foram realizadas em triplicata (1:10) e incubadas a 26 °C por sete dias. Cada poço foi examinado em um microscópio de inversão para a presença de parasitas, e a carga do parasita foi determinada a partir da maior diluição em que o crescimento foi observado (SANTOS *et al.*, 2018).

2.2.1.4 Análises Estatísticas

Os dados foram processados no software Graph Prism. A normalidade e a homogeneidade de variância dos dados foram avaliadas usando os testes de Kolmogorov–Smirnov e Bartlett, respectivamente. As análises para eficácia antileishmania *in vivo* foram avaliadas usando o teste de análise de variância (ANOVA) de um passo, seguido pelo teste de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi menor que 0,05. Os dados de carga parasitária foram transformados em \log_{10} . Todos os valores são expressos como média \pm DP.

2.2.2 Avaliação da permeabilidade intestinal

Após o preparo e caracterização das formulações, conforme descrito no **Capítulo 1, itens 2.2.4 e 2.2.5 e 2.2.6**, o estudo de permeabilidade intestinal foi conduzido para investigar se a administração oral de SEDDS FEX causou danos à mucosa intestinal. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA / UFMG: 232/2019) e atendeu às diretrizes institucionais e nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório.

2.2.2.1 Tratamento dos animais

Camundongos Swiss fêmeas saudáveis (20-22 g) foram divididos em três grupos (n = 10): suspensão FEX 50 mg/kg/dia, FEX-SEDDS 50 mg/kg/dia e controle (não tratado, água). As formulações (0,2 mL) foram administradas por gavagem uma vez ao dia durante 10 dias consecutivos. Para o grupo SEDDS

FEX, o SEDDS foi disperso em água ultrapura (1:1) antes da administração. Os animais foram alojados em gaiolas e submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, em temperatura controlada, com livre acesso a comida e água.

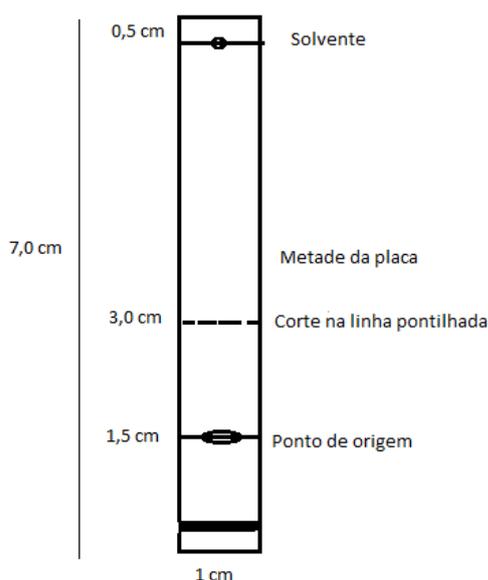
2.2.2.2 Marcação do DTPA com ^{99m}Tc

O ^{99m}Tc utilizado no ensaio foi obtido de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (disponibilizado pelo centro de medicina nuclear do Hospital das Clínicas da UFMG), e o DTPA fornecido pelo laboratório de radioisótopos da UFMG.

Para a reconstituição do DTPA liofilizado foi adicionado ao frasco 1,0 mL de ^{99m}Tc -Pertecnetato de sódio, com atividade de 10,75 mCi (397,75 MBq). O composto foi agitado suavemente por 10 vezes até a total solubilização do liofilizado e mantido sob repouso à temperatura ambiente por 15 minutos.

Para a determinação da pureza radioquímica do ^{99m}Tc -DTPA, uma gota do reagente recém preparado foi aplicada na região inferior de duas fitas de papel filtro Whatman (1 cm largura x 7 cm de comprimento), conforme esquema da **Figura 18**.

Figura 18 – Esquema da fita de Whatman



Uma das fitas foi colocada em 1 frasco de vidro contendo 500 μL de salina e a outra fita em outro frasco com 500 μL de acetona. Foi feito um pequeno ponto

de caneta no fim da fita para visualizar quando o deslocamento da salina e da acetona chegasse ao local. Aguardou-se a eluição dos solventes até o ponto final das fitas. As fitas foram removidas e secas sobre um papel toalha em temperatura ambiente, cortadas na metade e inseridas (cada metade) em tubos de ensaio para a monitoração da radioatividade em um curiômetro. O estado de valência ideal para o Tc se associar ao DTPA é o +7. A presença de TcO_4^- e TcO_2 são considerados impurezas e precisam ser quantificadas. Para a realização dos cálculos de impureza foi determinada a radiação e adotadas as equações abaixo:

$$\text{Placa 1 (Acetona): } \frac{\% \text{ } ^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- \text{ (Atividade da parte superior)}}{\text{(atividade da parte inferior + parte superior)}} \times 100$$

$$\text{Placa 2 (Salina): } \frac{\% \text{ } ^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \text{ (Atividade da parte superior)}}{\text{(atividade da parte inferior + Parte superior)}} \times 100$$

O $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ migra para a parte superior da fita e TcO_2 fica retido na parte inferior e então detecta-se radiação nestas respectivas partes da fita.

A pureza radioquímica pode ser obtida pela equação abaixo:

$$\text{Pureza radioquímica} = 100 - (\% \text{ } ^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \% \text{ } ^{99\text{m}}\text{TcO}_2).$$

Para a aprovação da pureza radioquímica do $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ foi considerado o valor acima de 90%.

Após a realização dos testes de pureza, o $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ foi diluído em 3 mL de salina para posterior administração dos animais. Para comparação com a radioatividade encontrada no sangue dos animais, foi preparado um padrão da seguinte forma: 0,1 mL de $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ foi adicionado em um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água.

2.2.2.3 Avaliação da permeabilidade intestinal

Para a avaliação de alterações no perfil de permeabilidade a partir da mucosa intestinal foi empregada o método da quantificação sanguínea de ^{99m}Tc -ácido dietilenoaminopentacético (^{99m}Tc -DTPA) (BARROS *et. al.*, 2017). Vinte e quatro horas após o término dos tratamentos, todos os animais receberam 0,1 mL de ^{99m}Tc -DTPA (20,2 MBq) por gavagem. Após 4 h da gavagem, os animais foram anestesiados (100 mg/kg de cetamina + 10 mg/kg de xilazina, por via intraperitoneal), o sangue foi coletado por incisão do plexo braquial (300 μL) e adicionado em frascos Eppendorf contendo 50 μL EDTA 0,1 M, como anticoagulante. O sangue foi pesado em tubos apropriados para determinação da radioatividade.

Os níveis de radioatividade no sangue foram determinados usando um contador gama automatizado (Perkin Elmer Wallac Wizard 1470–020 Gamma Counter; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). Os resultados foram apresentados como a porcentagem da dose de radiação, que foi calculada usando a equação abaixo:

$$\% \text{ dose/g} = \frac{\text{cpm/g de sangue}}{\text{cpm do padrão}} \times 100$$

onde cpm representa a contagem de radioatividade por minuto.

A toxicidade do tratamento também foi avaliada determinando-se o peso dos animais no início, durante (5 dias) e ao final do tratamento. Outros sinais como piloereção e sobrevivência foram observados como indicadores de toxicidade sistêmica.

2.2.2.4 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados no software Graph Prism. A normalidade e homogeneidade da variância dos dados foram avaliadas usando os testes de Kolmogorov – Smirnov e Bartlett, respectivamente. As análises para a permeabilidade intestinal foram avaliadas usando o teste de análise de variância

(ANOVA) de uma via, seguido do teste de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi inferior a 0,05. Todos os valores são expressos como a média \pm DP.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da eficácia de SEDDS FEX em animais infectados com *L. infantum*

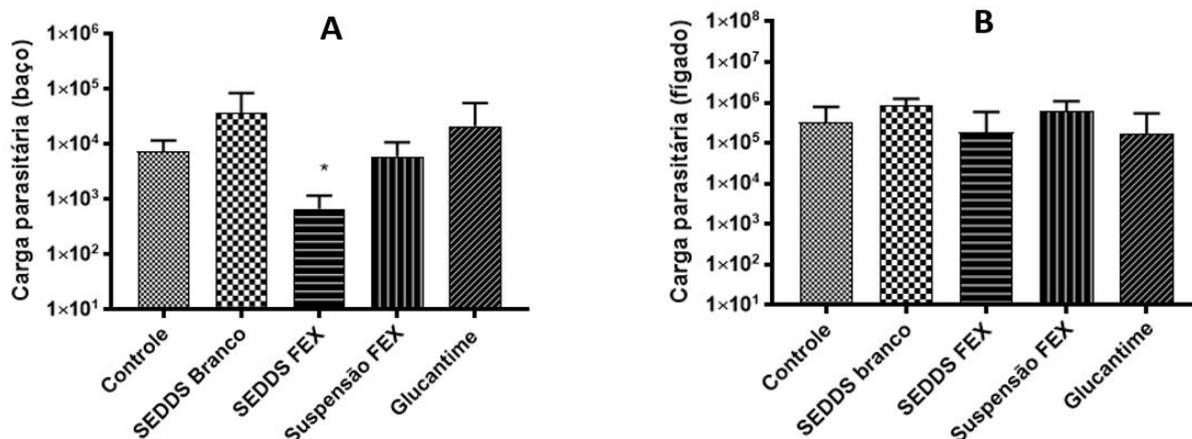
Os estudos de eficácia antileishmania foram conduzidos em camundongos infectados experimentalmente por *L. infantum*. A eficácia do SEDDS FEX foi avaliada através da determinação da carga parasitária no baço e fígado. Foram realizados dois estudos de eficácia, no primeiro os animais foram tratados por 5 dias consecutivos, enquanto, no segundo a duração do tratamento foi de 10 dias.

DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.* (2019) administraram, por via oral, uma suspensão de FEX nas doses de 50, 100, 200 e 300 mg/kg/dia, uma vez por dia, durante cinco dias consecutivos, entretanto, foi apenas com a dose de 100 mg/kg/dia houve redução da carga parasitária para *L. infantum* no fígado e com a dose de 300 mg/kg/dia no baço e no fígado. Conhecidos estes dados, a dose de 50 mg/kg/dia foi selecionada para o presente trabalho, uma vez que uma das vantagens do SEDDS é aumentar a solubilidade de fármacos lipofílicos e promover aumento de biodisponibilidade. Desejávamos observar se seria possível obter alta eficácia de FEX utilizando uma dose baixa.

No primeiro estudo, a carga parasitária no baço foi significativamente reduzida em animais tratados com SEDDS FEX 50 mg/kg/dia quando comparado aos grupos controle sem tratamento e SEDDS branco ($p < 0,05$) (**Figura 19A**). Já os grupos tratados com a suspensão de FEX 50 mg/kg/dia e Glucantime 150 mg/kg/dia não foram capazes de reduzir a carga parasitária quando comparados ao grupo controle, sem tratamento ($p > 0,05$).

Entretanto, nenhum dos grupos tratados (SEDDS FEX, suspensão de FEX ou Glucantime®) foi capaz de levar a redução significativa da carga parasitária no fígado quando comparado ao grupo controle sem tratamento ($p > 0,05$) (**Figura 19B**).

Figura 19- Avaliação da carga parasitária no baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* após 5 dias de tratamento



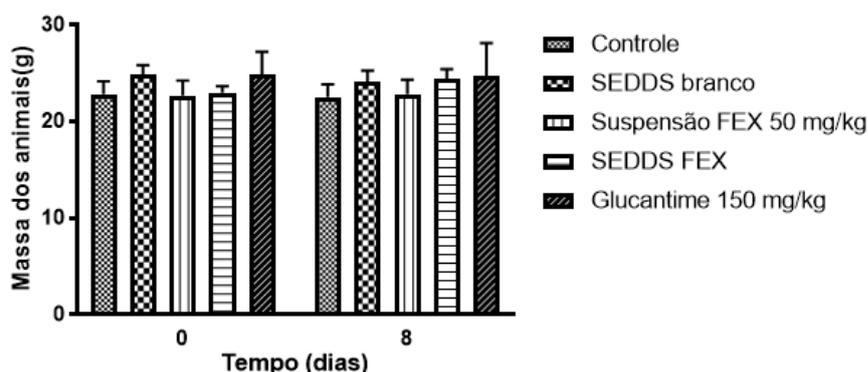
Camundongos BALB/c fêmeas (n = 7) foram infectados com promastigotas de *L. infantum* na veia lateral da cauda e tratados por 5 dias com SEDDS FEX (50 mg/kg/dia de FEX), SEDDS branco (sem FEX), suspensão de FEX (50 mg/kg/dia FEX), Glucantime® (Sb⁺ 5 150 mg/kg/dia) e controle (não tratado). Três dias após o fim do tratamento, a carga parasitária que foi determinada no baço (A) e no fígado (B) através do método de diluição limitante. Uma diferença significativa foi observada para SEDDS FEX em comparação aos grupos SEDDS branco e controle (* p <0,05).

Modelos murinos de leishmaniose são amplamente utilizados no estudo de novos agentes terapêuticos. Camundongos BALB/c apresentam carga parasitária no fígado e no baço quando infectados com *L. infantum* e, nos estágios iniciais da infecção, os parasitas multiplicam-se, sendo a carga parasitária do fígado muito maior que no baço (15 dias após inoculação) (OLIVEIRA *et al.*, 2012). De fato, em nosso estudo nós observamos uma carga parasitária muito maior no fígado (**Figura 19B**) que no baço (**Figura 19A**) para o grupo controle sem tratamento, o que pode ter impactado na menor eficácia do SEDDS FEX no fígado.

Para a avaliação da segurança do tratamento, os animais foram acompanhados durante todo período do estudo e não foi verificada nenhuma alteração no comportamento (agitação, prostração) nem pilo ereção ou diarreia. Não foi observada perda significativa de massa corporal em nenhum dos grupos

quando comparada a massa dos animais no início do tratamento e no dia da eutanásia (**Figura 20**). Estes achados estão em consonância com dados publicados previamente, os quais mostraram que o FEX administrado por via oral é seguro (WYLLIE *et al.*, 2012).

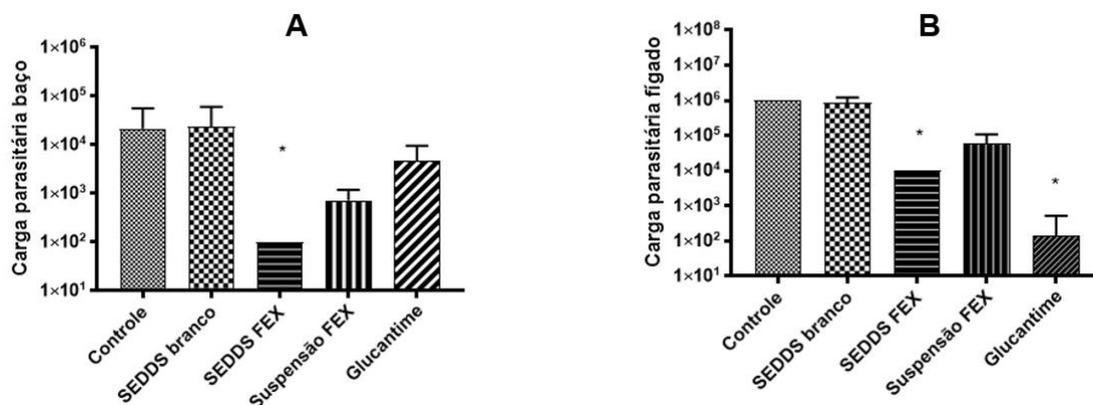
Figura 20 – Massa dos animais no início e fim do estudo



Avaliação da massa corporal dos animais no início do tratamento e no dia da eutanásia (três dias após o fim do tratamento)

Um segundo estudo foi realizado aumentando o tempo de tratamento para 10 dias consecutivos, uma vez ao dia. O SEDDS FEX foi o único tratamento que levou a uma redução significativa da carga parasitária ($p < 0,05$) quando comparado ao SEDDS branco e grupo controle, em ambos os órgãos avaliados (fígado e baço). O tratamento com Glucantime® (150 mg/kg/dia) resultou em redução significativa da carga parasitária apenas no fígado ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (**Figuras 21A e B**).

Figura 21- Carga parasitária no baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* utilizada como parâmetro de avaliação de eficácia *in vivo* de SEDDS FEX com tratamento de 10 dias



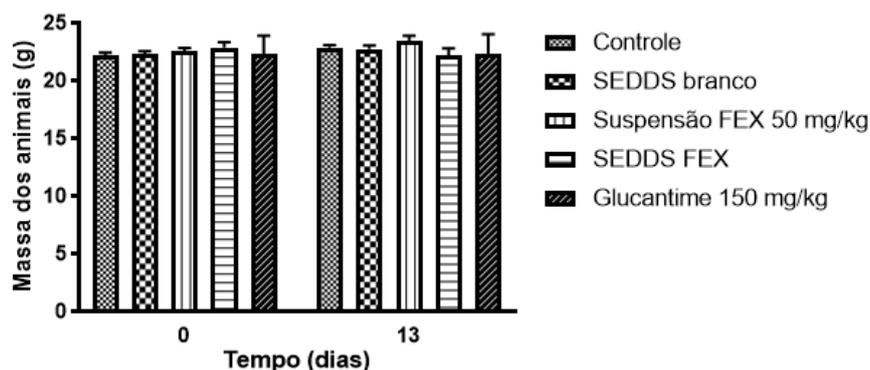
Camundongos BALB/c fêmeas (n = 7) foram infectados com promastigotas de *L. infantum* na veia lateral da cauda e tratados por 10 dias com SEDDS FEX (50 mg/kg/dia de FEX), SEDDS branco (sem FEX), suspensão de FEX (50 mg/kg/dia FEX), Glucantime® (Sb⁺ 5 150 mg/kg/dia) e controle (não tratado). Três dias após o fim do tratamento, a carga parasitária que foi determinada no baço (A) e no fígado (B) através do método de diluição limitante. Uma diferença significativa foi observada para SEDDS FEX em comparação aos grupos SEDDS branco e controle (* p < 0,05).

É interessante observarmos que o aumento no tempo de tratamento para 10 dias levou a uma maior eficácia do SEDDS FEX, com redução significativa da carga parasitária nos dois órgãos avaliados (p < 0,05). Em contraste, não houve mudança na eficácia do tratamento com a suspensão FEX (p > 0,05). É possível que essa maior eficácia observada para SEDDS FEX possa ser explicada por uma maior solubilização do FEX, favorecendo sua absorção devido aos componentes usados no preparo dessa formulação.

Para a avaliação da segurança do tratamento, os animais foram acompanhados durante todo período do estudo e não foi verificada nenhuma alteração no comportamento dos animais (agitação, prostração) nem pilo ereção ou diarreia. Ao comparar a massa dos animais no início do tratamento e no dia da eutanásia, não foi observada perda de peso significativa em nenhum dos grupos (**Figura 22**). Ao incluirmos o grupo SEDDS branco avaliamos também

possível toxicidade dos excipientes utilizados, sendo que não houve alteração de comportamento nem perda de massa dos animais.

Figura 22- Massa dos animais durante o período do estudo de 10 dias de tratamento



Avaliação da massa corporal dos animais no início do tratamento e no dia da eutanásia (13º dia)

3.2 Permeabilidade intestinal

Em condições normais, o sistema gastrointestinal tem várias linhas de defesa contra toxinas, antígenos e microrganismos para regular a passagem de tais agentes, com mecanismos que incluem sistemas de proteção inespecífica no lúmen intestinal, células epiteliais e sistema imunológico. A permeabilidade intestinal refere-se à propriedade das membranas do trato intestinal de controlarem a passagem de diferentes macromoléculas (BISCHOFF *et al.*, 2014).

A permeabilidade intestinal pode ser alterada em diversas condições, como processos inflamatórios, utilização de medicamentos e condições fisiológicas, permitindo a passagem de forma indiscriminada de agentes tóxicos e até mesmo a translocação de bactérias do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. A alteração da permeabilidade intestinal é um indicativo de injúrias no sistema gastrointestinal e a sua monitorização é uma ferramenta importante

para a avaliação das condições clínicas do modelo de análise (ANDRADE *et al.*, 2016).

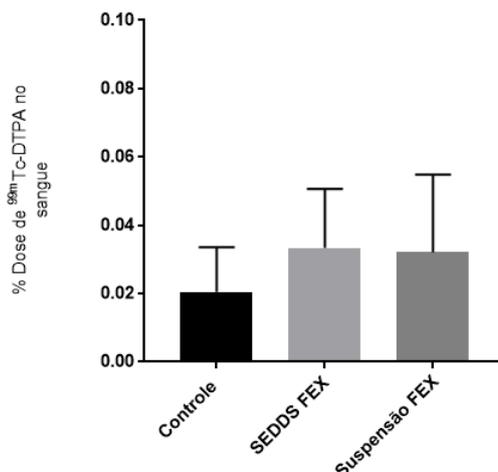
3.2.1 Marcação do DTPA com ^{99m}Tc

A pureza radioquímica do ^{99m}Tc -DTPA encontrada foi 98%, ou seja, no mínimo 98% dos átomos de ^{99m}Tc se ligaram às moléculas de DTPA. Segundo Saha (2004), a pureza radioquímica obtida deve ser maior que 95%. Portanto, a eficiência de marcação do radiofármaco está dentro dos parâmetros determinados na literatura.

3.2.2 Avaliação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada pelo método do ^{99m}Tc -DTPA. O estudo foi conduzido com a administração oral de SEDDS FEX 50 mg/kg/dia, suspensão de FEX 50 mg/kg/dia e grupo controle (água) por 10 dias e avaliação do efeito das formulações na permeabilidade intestinal. A %dose/g de ^{99m}Tc -DTPA no sangue para o grupo controle, SEDDS FEX e suspensão FEX foi de $0,021 \pm 0,01\%$; $0,033 \pm 0,017\%$ e $0,032 \pm 0,023\%$, respectivamente (**Figura 23**). Não houve diferença significativa entre os grupos SEDDS FEX, suspensão de FEX e controle ($P > 0,05$). Em um epitélio íntegro, apenas 2% da fração administrada do radiofármaco (^{99m}Tc -DTPA) atravessa o epitélio intestinal, sendo essa fração aumentada consideravelmente após lesões na mucosa intestinal (BARROS, *et. al.*, 2017). Esses dados sugerem ausência de danos à mucosa intestinal quando o SEDDS FEX e a Suspensão de FEX foram administrados por via oral por 10 dias.

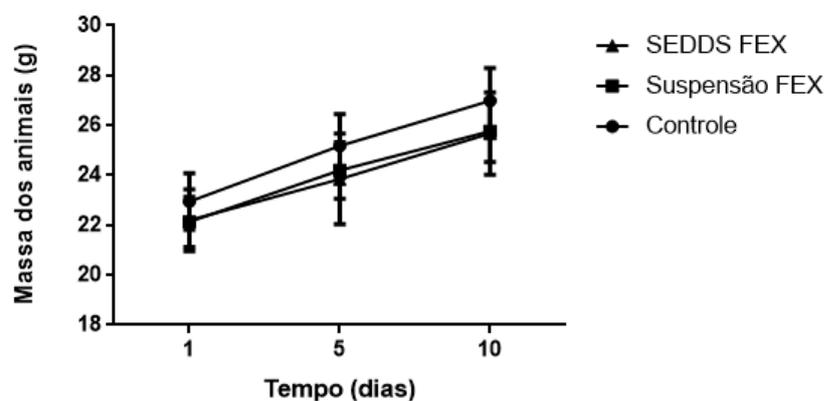
Figura 23 - Permeabilidade intestinal determinada em % dose / g de ^{99m}Tc -DTPA no sangue.



Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (n = 10).

Para a avaliação da segurança, os animais foram acompanhados durante todo o período de estudo e não foi verificada nenhuma alteração no comportamento dos animais (agitação, prostração) nem pilo ereção ou diarreia. Ao comparar a massa dos animais no início do tratamento, 5 dias e no dia 10, houve ganho de peso nos animais de todos os grupos (**Figura 24**).

Figura 24 - Massa dos animais durante o período do estudo de 10 dias



Avaliação da massa corporal dos animais no início do tratamento, em 5 e 10 dia do início do tratamento

5. DISCUSSÃO GERAL

5 DISCUSSÃO GERAL

A LV é considerada a forma mais grave das leishmanioses e pode ser fatal se não tratada adequadamente. As terapias disponíveis para as leishmanioses estão longe de ser ideais devido à toxicidade, alto custo, falta de eficácia, falta de acesso em certas áreas e resistência emergente aos medicamentos (BRUNI, *et al.*, 2017). O tratamento oral para LV é uma proposta atraente que poderia atenuar a toxicidade aguda associada à administração parental, reduzir e controlar os efeitos colaterais, reduzir o custo do tratamento, melhorar a qualidade de vida dos pacientes e também por ser mais fácil de gerenciar em países em desenvolvimento (PHAM, *et al.*, 2013). O FEX é uma alternativa terapêutica que demonstrou eficácia *in vitro*, assim como *in vivo* no tratamento oral de LV (WYLLIE *et al.*, 2012; DE MORAES *et al.*, 2019). No entanto, FEX é um fármaco hidrofóbico que apresenta baixa solubilidade (PUBCHEM, 2013; CHATTERJEE *et al.*, 2016). Portanto, SEDDS contendo FEX foram desenvolvidos neste trabalho, uma vez que esses sistemas são uma alternativa para superar esse obstáculo melhorando a biodisponibilidade e eficácia dos fármacos hidrofóbicos (BINDHANI, *et al.*, 2019; MAZZETI, *et al.*, 2020).

A seleção de excipientes para a composição do SEDDS foi baseada na capacidade de solubilizar o FEX. A solubilidade FEX em TCM foi maior do que a observada para outros óleos testados. Esses dados estão de acordo com dados previamente publicados, os quais mostraram que o TCM apresenta boa capacidade de solubilização de fármacos lipofílicos (MAURYA, *et al.*, 2017). Os triglicerídeos de cadeia média são amplamente utilizados no desenvolvimento dos sistemas auto-emulsionáveis e possuem boa capacidade de dispersão nos meios biológicos devido a sua capacidade de auto emulsificação e boa estabilidade química (CERPNIJAK *et al.*, 2013).

Em relação aos surfactantes, a solubilidade do FEX em Labrasol[®], Tween 80[®] e Kolliphor RH 40[®] foi alta. No entanto, embora Labrasol[®] seja um excipiente farmacêutico amplamente utilizado para dissolver fármacos lipofílicos (SHA, *et al.*, 2005), esse surfactante não foi selecionado, pois SEDDS contendo esse excipiente não apresentaram isotropia. Tween 80[®] e Kolliphor RH 40[®] foram selecionados e o SEDDS contendo esta combinação apresentou, após

diluição, nanoemulsão com tamanho pequeno de glóbulos e IP próximos a 0,2. ZUPANČIČ, *et al.*, (2016) também relataram dados similares. Além disso, esses surfactantes não iônicos têm sido usados em SEDDS carregados com fármacos hidrofóbicos, tais como ácido retinóico (MARQUES BORGES *et al.*, 2020), mesilato de eprosartam (BINDHANI *et al.*, 2019), paclitaxel (CHO *et al.*, 2016) e artemisinina (MEMVANGA, 2012). Alguns surfactantes não iônicos como Cremophor EL[®], Cremophor RH 40[®], Span 80[®], Tween 80[®] inibem a GpP (glicoproteína-P), que é um dos transportadores de efluxo comumente conhecido, o que seria vantajoso em relação à absorção do fármaco (ZHANG *et al.*, 2003).

A incorporação do FEX na formulação selecionada (F16) resultou em um SEDDS classificado como tipo III e produziu resultados interessantes. O tamanho (nm), IP e potencial zeta (mV) para o SEDDS branco e SEDDS FEX foi de 88 ± 1 ; $0,233 \pm 0,009$ e $-21,8 \pm 3,5$ e 91 ± 3 ; $0,242 \pm 0,005$ e $-16,7 \pm 0,2$. Esses valores similares mostram que a incorporação do FEX não alterou as características do SEDDS e sugerem que o fármaco está associado aos glóbulos formados após diluição do SEDDS. Além disso, a formulação selecionada não apresentou cristais de fármaco, sugerindo a retenção do FEX nos glóbulos após a diluição. Esses achados estão em consonância com dados previamente publicados (Cho *et al.*, 2016), os quais mostraram, por meio de análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e difração de Raios X, que o fármaco (paclitaxel) estaria disperso molecularmente na formulação SEDDS ou distribuído em um estado amorfo ou cristalino com tamanho muito pequeno.

Vale ressaltar que o tamanho do SEDDS FEX após diluição foi muito pequeno (<100 nm). Chatterjee *et al.* (2016) discutem que é comum considerar que a formação de dispersão em escala nanométrica afeta a absorção do fármaco e que quanto menor tamanho dos glóbulos maior biodisponibilidade. Entretanto, outros fatores tais como suscetibilidade do sistema à lipólise e realização de estudo *in vivo* devem ser considerados para concluir sobre a influência do tamanho no aumento de biodisponibilidade

As características do SEDDS FEX foram mantidas após diferentes diluições em água ou em meio simulado. É importante garantir que a nanoemulsão formada tenha propriedades similares em diferentes diluições para atingir um perfil de liberação uniforme do ingrediente farmacêutico ativo,

garantindo que o mesmo não seja precipitado em diluições mais altas, o que pode retardar significativamente a absorção (ČERPŇJAK, *et al.*, 2013; GUPTA, *et al.*, 2011). Mazzeti *et al.* (2020) e Sposito *et al.* (2017), também encontraram glóbulos de tamanho nanométrico de IP próximo a 0,25 após diferentes diluições de SEDDS branco em água.

O potencial zeta é um indicador da carga elétrica total da superfície das partículas, podendo corresponder à dissociação de grupos funcionais. Este parâmetro pode auxiliar nas informações sobre a estabilidade, pois geralmente há uma menor agregação dos glóbulos quando há repulsão eletrostática entre eles. Para garantir a estabilidade, acredita-se que o potencial zeta deve ser superior ao módulo de 30 mV (FREITAS; MULLER, 1998). Porém, existem algumas formulações com estabilizantes que possuem um potencial zeta menor e nem por isso são instáveis (MUÈLLER *et al.*, 2000). Os valores negativos obtidos podem ser explicados pela presença de ácidos graxos de surfactantes derivados de ésteres de ácidos graxos, como Tween 80[®] e Span 80[®] (SALVIA-TRUJILLO, *et al.*, 2013). Embora esses valores sejam baixos, surfactantes etoxilados como Tween 80[®] e Kolliphor RH 40[®] também agem por meio de impedimento estérico, contribuindo para aumentar a estabilidade da nanoemulsão formada após a diluição do SEDDS.

A próxima etapa foi investigar a retenção de FEX nos glóbulos da nanoemulsão após diluição de SEDDS em meio simulado. Nossos dados mostraram claramente que a retenção de FEX quando carregado em SEDDS foi marcadamente maior do que a obtida para suspensão em ambos os meios simulados, MSG e MSI. Espera-se que a substância ativa seja solubilizada nos glóbulos das nanoemulsões formados após a diluição do SEDDS, uma vez que esse sistema otimiza a solubilização de fármacos com baixa solubilidade em água (SHEHATA, *et al.*, 2016). Maurya *et al.* (2017) descrevem que a formação espontânea de uma emulsão no trato gastrointestinal apresenta o fármaco na forma solubilizada e que o tamanho nanométrico dos glóbulos fornece grande área interfacial, facilitando absorção do ingrediente ativo. Marques Borges *et al.*, 2020 e Shehata *et al.*, 2016 também encontraram alta retenção de fármacos hidrofóbicos em glóbulos após diluição de SEDDS em meio simulado.

O estudo de estabilidade é uma parte importante do processo de desenvolvimento e aprovação de uma formulação. O SEDDS FEX desenvolvido apresentou-se quimicamente estável por 6 meses a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 30 a 60% UR. Zaghoul *et. al.* (2019) destaca a importância do estudo de estabilidade na garantia da segurança e integridade do ativo presente em uma formulação.

A fim de avaliar a eficácia *in vivo* desta nova formulação SEDDS FEX no tratamento da LV, foi inicialmente realizado um estudo utilizando o protocolo similar ao adotado por De Moraes-Teixeira *et al.* (2019). É interessante notar que, como naquele estudo, também não observamos a eficácia da suspensão de FEX em relação aos parâmetros avaliados: carga parasitária no baço e fígado. No entanto, os dados do presente estudo mostraram que o SEDDS FEX foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária no baço ($p < 0,05$), em comparação aos grupos controle (sem tratamento) e SEDDS branco, resultando em 91% de supressão da infecção.

Em nosso segundo estudo, os animais foram tratados (SEDDS FEX 50 mg/kg/dia) durante 10 dias, com uma dose total administrada de 500 mg/kg. O aumento do tempo de tratamento levou ao aumento da eficácia do SEDDS FEX, com redução significativa da carga parasitária no baço e no fígado, quando comparados com aos grupos SEDDS branco e controle (não tratado) ($p < 0,05$), resultando em 99,5% e 99% de supressão da infecção em ambos os órgãos, respectivamente. No entanto, não houve aumento na eficácia da suspensão de FEX. De Moraes-Teixeira *et al.* (2019) mostraram que apenas a suspensão de FEX na maior dose avaliada (300 mg/kg/dia - dose total administrada de 1500 mg/kg) foi eficaz na redução da carga parasitária no baço e no fígado.

Uma suspensão de FEX também foi avaliada em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani*, nas doses 25, 50, 100 e 200 mg/kg/dia, exigindo uma dose de 200 mg/kg/dia (dose total administrada de 1000 mg/kg) para supressão de 98,4% da infecção no fígado (WYLLIE, *et. al.*, 2012). Entretanto, é importante ressaltar que diferentes métodos para análise da carga parasitária podem refletir na obtenção de resultados diferentes, assim como, diferentes espécies de *Leishmania* possuem características bioquímicas e moleculares

específicas, o que pode refletir em diferentes graus de sensibilidade perante os fármacos (ESCOBAR *et al.*, 2002; YARDLEY & CROFT, 1997).

Outro fato interessante a ser destacado nos dois estudos *in vivo* realizados, o Glucantime[®], medicamento de referência no tratamento da LV, foi administrado na dose de 150 mg Sb⁵⁺/kg/dia, uma dose cerca de 10 vezes superior àquela recomendada para tratamento humano (BRASIL, 2017). No entanto, esse medicamento foi eficaz apenas na redução da carga parasitária no fígado ($p < 0,05$), quando os animais foram tratados por 10 dias, resultando em supressão de 99% da infecção nesse órgão.

O aumento da eficácia observada para SEDDS FEX pode ser explicado por uma melhora na absorção do FEX quando administrado por via oral. Foi demonstrado que a forma farmacêutica utilizada para a administração do FEX afeta sua biodisponibilidade (TARRAL, *et. al.*, 2014). Os excipientes usados na formulação do SEDDS podem facilitar a solubilização do FEX, favorecendo sua absorção. Por outro lado, o SEDDS disponibiliza o fármaco em nanoestruturas com alta área de superfície para absorção (DATE, *et. al.*, 2010).

Por fim, vale ressaltar que, nossos dados de permeabilidade intestinal, obtidos por meio de DTPA, macromolécula que raramente atravessa a barreira intestinal, mas que pode ser absorvida quando a barreira epitelial está danificada, sugerem que SEDDS FEX não mostrou evidência de lesão na mucosa intestinal. A literatura relata aumento da permeabilidade intestinal associada à administração oral de surfactantes (CHASSAING, *et. al.*, 2015), entretanto, em nosso estudo não observamos aumento. Portanto, a eficácia melhorada para SEDDS não poderia ser associada à toxicidade na barreira intestinal e, muito provavelmente, pode ser atribuída ao aumento da absorção, do fármaco.

Como perspectivas deste trabalho poderiam ser realizados outros estudos tais como: farmacocinética para que possam ser verificadas diferenças na biodisponibilidade do FEX quando administrado em SEDDS ou em suspensão; ensaio de toxicidade aguda; estudo de dose plena; usar outros fármacos como controle no ensaio de eficácia (ex. Miltefosina). Finalmente, a formulação poderia ser otimizada com intuito de aumentar a solubilidade do FEX no SEDDS.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível desenvolver e caracterizar um SEDDS carregado com FEX. Avaliamos vários parâmetros físico-químicos do SEDDS (aspecto, tamanho de partícula, IP, potencial zeta). A formação da nanoemulsão após diluição em meio simulado de estômago (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8) e a ausência de precipitação do fármaco no meio simulado demonstra que o FEX permaneceu solúvel. O tratamento de animais infectados experimentalmente por *L. infantum* com SEDDS FEX levou a uma redução significativa da carga parasitária no fígado e baço, quando comparados aos grupos SEDDS branco e controle. Não houve dano à mucosa intestinal. O conjunto de resultados mostra que o SEDDS FEX pode ser uma alternativa oral promissora para o tratamento da LV causada por *L. infantum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-DAYEM, H.; MAHAJAN, K.; OWUWANNE, A.; ERICSSON, S.; NAWAZ, K.; KOURIS, K.; ITIGAZY, E.; AWDEH, M. The use of ^{99m}Tc-DTPA for detection and localization of site of acute gastrointestinal bleeding. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 14, p. 98-104, 1988.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVAR, Jorge; YACTAYO, Sergio; BERN, Caryn. Leishmaniasis and poverty. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
- ANDRADE, Maria Emília Rabelo et al. Pretreatment and Treatment With L-Arginine Attenuate Weight Loss and Bacterial Translocation in Dextran Sulfate Sodium Colitis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 40, n. 8, p. 1131-1139, 2016.
- ANVISA, GUIA nº 10, versão 1, de 30 de agosto de 2017. <http://portal.Anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/%281%29Guia+10+v1+Tratamento+estatistico+validacao+analitica.pdf/85b0e965-d72f-4b7c-bd2e-17de13af1976>, especialmente a seção F, disponível na página 13, 2017. Acesso em 10/06/2020
- AOAC INTERNATIONAL. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016.
- ARONSON, Naomi et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical infectious diseases**, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.
- BALAKRISHNAN, Prabagar *et al.* Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 539-545, 2009.
- BARROS, Patrícia Aparecida Vieira de et al. Effect of conjugated linoleic acid-enriched butter after 24 hours of intestinal mucositis induction. **Nutrition and cancer**, v. 69, n. 1, p. 168-175, 2017.

- BEG, Sarwar et al. Chylomicron mimicking nanocolloidal carriers of rosuvastatin calcium for lymphatic drug targeting and management of hyperlipidemia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 541-549, 2019.
- BINDHANI, Sabitri et al. INTERNATIONAL JOURNAL OF RESEARCH IN PHARMACEUTICAL SCIENCES. 2019.
- BISCHOFF, Stephan C. et al. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. **BMC gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 1-25, 2014.
- BORHADE VB, Nair HA, Hegde DD 2009. Development and Characterization of SelfMicroemulsifying Drug Delivery System of Tacrolimus for Intravenous Administration. **Drug DevInd Pharm** 35(5):619-630
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília; 2013. Acesso em 25/07/2018. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf.
- BRUNI, N. et al. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 5289–5311, 2017.
- BU, Pengli et al. Assessment of cell viability and permeation enhancement in presence of lipid-based self-emulsifying drug delivery systems using Caco-2 cell model: Polysorbate 80 as the surfactant. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 350-360, 2017.
- BUYA, Aristote B. et al. Self-Nano-Emulsifying Drug-Delivery Systems: From the Development to the Current Applications and Challenges in Oral Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 12, p. 1194, 2020.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> acesso em 27/01/2021

- ČERPŇAK, Katja et al. Lipid-based systems as promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Actapharmaceutica**, v. 63, n. 4, p. 427-445, 2013.
- CHAPPUIS, François et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.
- CHASSAING, Benoit et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, n. 7541, p. 92, 2015.
- CHATTERJEE, Bappaditya et al. Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view. **Drug delivery**, v. 23, n. 9, p. 3639-3652, 2016.
- CHO, Hea-Young et al. Preparation and evaluation of solid-self-emulsifying drug delivery system containing paclitaxel for lymphatic delivery. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.
- CONCEIÇAO-SILVA, Ftima; ALVES, Carlos Roberto. **Leishmanioses do continente americano**. Editora Fiocruz, 2014.
- CONSTANTINIDES, Panayiotis P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 11, p. 1561-1572, 1995.
- CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Memrias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101 n.1, p. 117-118, 2006.
- DAS, Surajit; CHAUDHURY, Anumita. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **Aaps Pharmscitech**, v. 12, n. 1, p. 62-76, 2011
- DATE, Abhijit A. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, n. 10, p. 1595-1616, 2010.
- DE BARROS, Patrcia Aparecida Vieira et al. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1567-1576, 2018.

DE MORAIS-TEIXEIRA, Eliane; RABELLO, Ana; AGUIAR, Marta Marques Gontijo. In vitro activity and in vivo efficacy of fexinidazole against New World Leishmania species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 8, p. 2318-2325, 2019.

DEEKS, Emma D. Fexinidazole: first global approval. **Drugs**, v. 79, n. 2, p. 215-220, 2019.

DNDi – Best Science for the Most Neglected. Disponível em:

<<https://www.dndi.org/>> acesso em 20/08/2021

ESCOBAR, Patricia et al. Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. **Acta tropica**, v. 81, n. 2, p. 151-157, 2002.

FREITAS, Chrysantha; MÜLLER, Rainer H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221-229, 1998

GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, p. 309-322, 2012

GUPTA, Shweta; CHAVHAN, Sandip; SAWANT, Krutika K. Self-nanoemulsifying drug delivery system for adefovirdipivoxil: design, characterization, in vitro and ex vivo evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p. 145-155, 2011.

Instant Cheminformatics Solutions. Disponível em: <https://chemicalize.com/> acesso em 17/02/2021

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: a Practical Review. **Dermatologic Clinics**. v. 33, p. 579-593, 2015.

KOHLI, K. et al. Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 21-22, p. 958–965, 2010.

LEFFLEUR, Flavia; KECKEIS, Valérie. Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed?. **International Journal of Pharmaceutics: X**, p. 100050, 2020.

MARQUES BORGES, Gabriel Silva et al. Novel self-nanoemulsifying drug-delivery system enhances antileukemic properties of all-trans retinoic acid. **Nanomedicine**, v. 15, n. 15, p. 1471-1486, 2020.

- MAURÍCIO, I.L. *et al.* Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, v. 119, p. 237-246, 1999
- MAURYA, Sheo Datta *et al.* Self-micro emulsifying drug delivery systems (SMEDDS): a review on physico-chemical and biopharmaceutical aspects. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 7, n. 3, p. 55-65, 2017.
- MAZZETI, Ana Lia *et al.* Benznidazole self-emulsifying delivery system: A novel alternative dosage form for Chagas disease treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 145, p. 105234, 2020.
- MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.
- MEMVANGA, Patrick B.; PRÉAT, Véronique. Formulation design and in vivo antimalarial evaluation of lipid-based drug delivery systems for oral delivery of β -arteether. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 82, n. 1, p. 112-119, 2012.
- MUÈLLER, Rainer H.; MAÈDER, Karsten; GOHLA, Sven. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.
- NAWALE, R. B.; SALUNKE, P. B.; JADHAV, A. B. SELF EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM: A REVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 8, p. 3198, 2015.
- NEAU, Philippe *et al.* Innovative partnerships for the elimination of Human African Trypanosomiasis and the development of fexinidazole. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 5, n. 1, p. 17, 2020.
- OLIVEIRA, Dulcilene M. *et al.* Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. **Parasitology research**, v. 110, n. 3, p. 1277-1285, 2012.
- Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2020 Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis acesso em 28/01/2021.
- PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, p. S10-S18, 2014.
- PHAM, T. T. H.; LOISEAU, P. M.; BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. **International journal of pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 539-552, 2013.

- POUTON, Colin W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 25, n. 1, p. 47-58, 1997.
- POUTON, Colin W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 11, p. S93-S98, 2000.
- POUTON, Colin W.; PORTER, Christopher JH. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 6, p. 625-637, 2008.
- RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology research**, v. 90, n. 1, p. S19-S39, 2003.
- SAHA, G.B. **Fundamental of Nuclear Pharmacy**. 5 ed. New York: Springer-Verlag, 2004. 383 p.
- SALVIA-TRUJILLO, Laura et al. Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1472-1480, 2013.
- SANDHU, Premjeet Singh et al. Novel dietary lipid-based self-nanoemulsifying drug delivery systems of paclitaxel with p-gp inhibitor: implications on cytotoxicity and biopharmaceutical performance. **Expert opinion on drug delivery**, v. 12, n. 11, p. 1809-1822, 2015.
- SANTOS, Délia Chaves Moreira dos et al. A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. **Journal of drug targeting**, v. 26, n. 4, p. 357-364, 2018.
- SANTOS, D.O. *et al.* Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.*, v.103, p.1-10, 2008.
- SHA, Xianyi et al. Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 24, n. 5, p. 477-486, 2005.
- SHARMA, Vijay K. et al. Self-Micro Emulsifying Drug Delivery Systems: A Strategy to Improve Oral Bioavailability. 2016.
- SHEHATA, Eman MM et al. Self-emulsifying phospholipid pre-concentrates (SEPPs) for improved oral delivery of the anti-cancer genistein: development, appraisal and ex-vivo intestinal permeation. **International journal of pharmaceutics**, v. 511, n. 2, p. 745-756, 2016.

- SPÓSITO, Pollyanna Álvaro et al. Ravuconazole self-emulsifying delivery system: in vitro activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and in vivo toxicity. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 3785, 2017.
- STOCKDALE, L; NEWTON R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, p. 1-15 v. 7, 2013.
- SUMAN GUPTA, Nishi. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. **The Indian journal of medical research**, v. 133, n. 1, p. 27, 2011.
- SUNDAR, Shyam; SINGH, Anup. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 3, n. 3-4, p. 98-109, 2016.
- TARRAL, Antoine et al. Determination of an optimal dosing regimen for fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of human African trypanosomiasis: first-in-human studies. **Clinical pharmacokinetics**, v. 53, n. 6, p. 565-580, 2014.
- THE PUBCHEM PROJECT**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> acesso em 20/02/2021
- TORRELE, Els et al. Fexinidazole—a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e923, 2010.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA; The National Formulary - USP 35. Rockville: United States Pharmacopoeial convention, 2013.
- VIDAL, Silvia et al. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 3, p. 655-666, 1995.
- WHO (2021). **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>> Acesso em 27/01/2021
- WILSON, Mary E.; WEINSTOCK, Joel V. Hepatic Granulomas in Murine Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania chagasi*. **Methods**, v. 9, n. 2, p. 248-254, 1996.
- WYLLIE, S. The Anti-Trypanosome Drug Fexinidazole Shows Potential for Treating Visceral Leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 119, Jan. 2012.
- YARDLEY, V.; CROFT, S.L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 41, n. 4, p. 752-756, 1997.

ZAGHLOUL, Abdelazim et al. ProbucoI Self-Emulsified Drug Delivery System: Stability Testing and Bioavailability Assessment in Human Volunteers. **Current drug delivery**, v. 16, n. 4, p. 325-330, 2019.

ZHANG, Hongjian et al. Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. **Archives of pharmacal research**, v. 26, n. 9, p. 768-772, 2003.

ZUPANČIČ, Ožbej et al. Development and in vitro evaluation of an oral SEDDS for desmopressin. **Drug delivery**, v. 23, n. 6, p. 2074-2083, 2016.