

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

LEILA RODRIGUES CALDEIRA

**NANOEMULSÕES CARREGADAS COM ANFOTERICINA B PARA O  
TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES: UMA NOVA ABORDAGEM**

Belo Horizonte – MG

2011

LEILA RODRIGUES CALDEIRA

**NANOEMULSÕES CARREGADAS COM ANFOTERICINA B PARA O  
TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES: UMA NOVA ABORDAGEM**

Dissertação, como requisito parcial,  
para obter o grau de mestre em  
Ciências Farmacêuticas, submetida  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas da  
Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Minas Gerais.  
Orientador: Prof. Dr. Lucas Antônio  
Miranda Ferreira – UFMG.  
Co-orientadora: Profa. Dra. Renata  
Barbosa de Oliveira – UFMG

Belo Horizonte – MG

2011

Este trabalho contou com a colaboração de:

Amanda Braga de Figueiredo  
Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso  
Laboratório de Imunoparasitologia, NUPEB, UFOP.

Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard  
Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas,  
UFMG.

Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira  
Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG.

Dedico este trabalho a todos aqueles que sofrem ou sofreram das leishmanioses ou de qualquer outra doença negligenciada.

*“Seja a mudança que você quer ver no mundo”*

*Dalai Lama*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e à espiritualidade que são meus mentores, meus guias, minha força e minha proteção.

Aos meus pais, por investirem em meus sonhos e em meus estudos. Agradeço pelo apoio e pelo amor incondicional que estiveram presentes durante toda a minha vida.

Às minhas amadas irmãs, Bruninha e Paulinha, pelo suporte e pela amizade.

Agradeço aos meus avós. Em especial à vovó Toninha, por sempre sonhar comigo nessa profissão e por todos os “mimos”.

A toda a minha família, que eu muito amo, por sempre torcer por mim e me auxiliar no que eu precisar.

À professora Renata, minha co-orientadora, pela participação nesse trabalho, pelo carinho e por todos os ensinamentos. Sua empolgação e sua alegria tornam nossos dias mais felizes. Toda vez que ela chegava ao laboratório e dizia “que lindo” quando via os resultados do projeto, positivos ou negativos, eu sentia que cada esforço não era em vão.

Ao Samu, pela amizade sincera e pela cumplicidade. Agradeço por toda ajuda em me introduzir ao mundo “nano”, sendo essencial para que eu pudesse desenvolver este trabalho e, principalmente, por me colocar no seu mundo, onde nossa amizade se fortalece a cada dia. Tenho muito orgulho desse meu amigo genial e sei que ainda verei muitos artigos MUSSI *et al.* por aí.

Ao Elton, meu querido amigo, retribuo suas carinhosas palavras a mim referidas, presentes na sua dissertação: agradeço por ser tão doce e tão meigo e por compartilhar inúmeros momentos e dificuldades. Além disso, agradeço por ter sido meu ilustre professor de HPLC, pelos cafés e pelos momentos “Bubblé”.

Ao Gui, pelas inúmeras vezes em que me ajudou com toda a disposição, por todo o ensinamento, pelo carinho e pelos momentos de descontração.

A todas as “Armandetes”, especialmente à Lili. Sua presença no LTF no primeiro ano do mestrado foi marcada por momentos divertidos e inesquecíveis. Obrigada por se tornar essa amiga tão essencial na minha vida. À querida Lorena pelo companheirismo, uma sempre apoiando a outra. Também à Arianne, Gabi, Ju Saliba e Dani, todas companhias muito agradáveis.

Ao Mateus pela ajuda inicial no Zeta, pelos ótimos momentos, pelo sorriso constante e por ser um amigo muito querido.

Ao Daniel Cristian por ser sempre tão prestativo e amigo.

Ao Dani pela amizade, por todo o carinho sincero e pelo companheirismo.

Ao Diego por estar sempre presente para qualquer coisa que eu precisasse e pela amizade.

À Sávia pela meiguice, pela companhia, por todo o auxílio e pelos conselhos sempre bons. É uma pessoa que eu admiro e muito considero e acredito que essa admiração é algo unânime por todos do laboratório. Tenho muito orgulho de compartilharmos o mesmo sobrenome!

À Valquíria que me ajudou imensamente no início do projeto.

Aos amigos Ana Paula, André, Angélica, Betânia, Camila Filizzola, Camila Monteiro, Cláudia, Cris Giuberti, Eduardo, Gustavo, Isadora, Juçara, Júlia, Laíssa, Léo Fuscaldi, Lidi, Livinha, Luciana, Luciene, Marcela, Marcus Vinícius, Ricardo, Talita, Tati e todos os demais amigos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e do Laboratório de Radioisótopos.

À professora Mônica por ser uma pessoa tão agradável, prestativa e sempre disposta a auxiliar no que precisarmos. Aos professores Gisele, Gilson, André e Armando pelo

apoio e pelo carinho. Agradeço a todos pelos ensinamentos e por fazer do LTF um ambiente de trabalho tão produtivo.

Ao Eduardo e à Luísa, pelo apoio técnico que torna nosso trabalho possível e, o laboratório, um lugar melhor para se trabalhar.

Ao professor Luís Carlos pela colaboração no desenvolvimento das análises *in vitro* das formulações, “abrindo as portas” de seu laboratório para que eu pudesse cumprir essa etapa do trabalho. Agradeço a todos do Laboratório de Imunoparasitologia da UFOP que foram tão receptivos comigo. Em especial ao Tiago, Maurício, Ricardo, Marcorélio, Leandro, Hellem e, principalmente, Amanda. Agradeço a ela por me receber não apenas no laboratório, mas em sua casa e pela ajuda e ensinamentos nos ensaios biológicos.

Ao Vilela e à Cynthia do CETEC pelo auxílio nas análises de microscopia das formulações, pela disposição e gentileza.

À Flaviana e ao professor Frédéric Frézard pela parceria nas análises de dicroísmo circular que foram de imensa importância para o fechamento dos dados finais desse trabalho. Agradeço também à Flaviana por ser sempre essa pessoa positiva e meiga, que nos faz ter imenso prazer em trabalhar em conjunto.

À Marta cujo trabalho serviu de inspiração e cuja preciosa participação será de imensa contribuição nesse projeto no futuro.

Agradeço às minhas grandes amigas e iniciadoras da pesquisa nos tempos de IC: Renata Labanca, Sérgia, Alessandra, Rose e Rossi. Também ao Gustavo Viana e à Flaviane. Por me espelhar em pesquisadores tão exemplares e éticos, eu quis dar o melhor de mim nesse projeto.

Agradeço aos professores da Hematologia, ao Jarbas e ao Márcio por disponibilizarem o laboratório para que eu pudesse usar o microscópio ótico.



Aos professores da graduação, em especial o professor Márcio e o professor Ricardo, grandes exemplos para nós, por todo o ensinamento.

Agradeço aos funcionários da Faculdade de Farmácia que tornam nosso ambiente de trabalho possível, nos ajudando a mantê-lo limpo e preservado. Em especial, ao Batista, sempre tão prestativo e educado.

Ao Eduardo, ao Silas e à Ludimila, da secretaria de Pós-Graduação, pelo suporte e gentileza.

A todos os meus amigos. Em especial aos meus queridos Ariany, Carlinha, Cleverson, Iara, Ju Costa, Júlia, Nathália, Niara, Ricardo, Ritinha, Samantta e Vivi por estarem sempre comigo. Agradeço pelos momentos divertidos que passamos juntos e que me ajudaram a superar os momentos difíceis e estressantes. Às minhas amigas da faculdade: Alessandra Loures, Alessandra Domingos, Amanda, Bella, Clarice, Laurinha e Paula Lana. Aos demais amigos da graduação. Aos amigos do COLTEC. Aos amigos do Batista: Patrícia, Cibele, Sérgio e Tiago Rosa. Agradeço a todos pela amizade que, apesar da distância ou dos poucos encontros, consegue manter-se forte pelo enorme carinho e admiração que tenho por cada um.

Por fim, deixo meu agradecimento, mais que especial e sincero, ao meu orientador Lucas, que cumpriu seu papel com perfeição. Agradeço por estar sempre presente durante todo esse trabalho, pelo respeito, pelo carinho e pela confiança em mim depositada. Sua dedicação à pesquisa e ética profissional é contagiante. Nossa amizade e, quem sabe, nossa parceria na pesquisa não termina junto com essa dissertação!

## RESUMO

O tratamento das leishmanioses inclui a abordagem tópica ou sistêmica. A terapia parenteral convencional baseia-se na utilização de antimonias pentavalentes. A anfotericina B (AmB), fármaco de segunda escolha, pode ser utilizada quando o tratamento com os antimoniais não é indicado ou no caso de falha terapêutica. A estrutura química peculiar da AmB torna o fármaco praticamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. A formulação convencional da AmB é uma dispersão coloidal na qual o fármaco associa-se ao desoxicolato de sódio (AmB-D). Embora efetivo, o tratamento com essa formulação é acompanhado de toxicidade frequente. As formulações lipídicas comercialmente disponíveis surgem como forma de superar esse inconveniente. É conhecido que tais sistemas diminuem a toxicidade relacionada à AmB, porém seu alto custo e dificuldades de preparo em escala industrial impedem seu amplo uso. As nanoemulsões (NE) são uma alternativa atraente para carreamento de AmB, uma vez que são sistemas lipídicos, capazes de reduzir a toxicidade do fármaco, além de serem de baixo custo e fácil obtenção. A estratégia de incorporação da AmB nas NE sem o uso de solventes orgânicos faz uso do perfil de pH-solubilidade do fármaco. Este trabalho tem por objetivo desenvolver NE carregadas com AmB com e sem o lípide catiônico estearilamina (STE). A influência da STE sobre as características físico-químicas e biológicas das NE foi investigada. As NE foram preparadas pelo método de homogeneização a quente, utilizando sonda de ultrassom. O diâmetro médio dos glóbulos foi menor na presença de STE do que na sua ausência. O potencial zeta foi positivo e aumentou em função do teor de STE, contrastando com as formulações sem esse lípide, que apresentaram valores negativos de potencial zeta. A eficiência de encapsulação (EE) da AmB foi alta, independente da presença de STE. Estudos de estabilidade de NE carregadas com AmB, com e sem STE, indicaram que ambas as formulações são estáveis. Análises de dicroísmo circular mostraram que a AmB presente nas NE encontra-se predominantemente na forma monomérica, que é a forma menos tóxica para o hospedeiro e mais ativa contra células do parasita, em contraste com a formulação comercial AmB-D, na qual há uma grande proporção de

fármaco livre na forma oligomérica. Os resultados dos estudos de citotoxicidade *in vitro*, por meio do ensaio de MTT em macrófagos da linhagem J774, indicaram que as NE carregadas com AmB sem STE e contendo STE 0,1% p/v são menos citotóxicas do que a formulação comercial AmB-D. Além disso, o aumento da concentração do lípide catiônico nas formulações induz aumento de citotoxicidade. Estudos de eficácia *in vitro* em macrófagos J774 infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mostraram que a NE carregada com AmB com STE 0,1% p/v apresenta eficácia comparável à AmB-D. Embora a NE carregada com AmB sem STE tenha apresentado eficácia estatisticamente inferior à formulação convencional, essa redução não é expressiva, tendo em vista o ganho que tal formulação traz em termos de seletividade entre células do hospedeiro e do parasita, sendo, portanto, uma alternativa atrativa para o tratamento das leishmanioses.

**Palavras-chave:** Leishmanioses, anfotericina B, estearilamina, nanoemulsões, emulsões submicrônicas; nanotecnologia.

## ABSTRACT

The treatment of leishmaniasis includes topical and systemic approach. The conventional parenteral therapy is based on the use of pentavalent antimonials. Amphotericin B (AmB), the second drug of choice, can be used when treatment with antimonials is not indicated or in the case of therapeutic failure. The particular chemical structure of AmB makes it practically insoluble in water and in most organic solvents. The conventional formulation of AmB is a colloidal dispersion in which the drug is associated with sodium deoxycholate (AmB-D). Although effective, treatment with this formulation is often accompanied by toxicity. The commercially available lipid formulations appear as a way to overcome this drawback. It is known that such systems reduce AmB-related toxicity, but its high cost and difficulty of manufacturing impede its widespread use. Nanoemulsions (NE) are attractive carriers of AmB, since they are lipid systems, which are able to reduce the drug-related toxicity, in addition to being inexpensive and easy to manufacture. The strategy of incorporation of AmB in the NE droplets, without organic solvents, makes use of the pH-solubility profile of the drug. This work aims to develop AmB-loaded NE with and without the cationic lipid stearylamine (STE). The influence of STE on the physico-chemical and biological properties of NE was investigated. The NE were prepared by hot homogenization method using ultrasound probe. The average diameter of the droplets was lower in the presence of STE than in its absence. The zeta potential was positive and increased as a function of STE content, in contrast to the formulations without this lipid, which showed negative zeta potential. The encapsulation efficiency (EE) of AmB was high despite the presence of STE. Stability studies of AmB-loaded NE, with and without STE, indicated that both formulations are stable. Analysis of circular dichroism showed that AmB present in NE is predominantly in monomeric form, which is the least toxic to the host cells and more active against the parasite, in contrast with commercial AmB-D, in which there is a large proportion of free drug in oligomeric form. The results of *in vitro* cytotoxicity studies, by MTT assay in J774 macrophage lineage, indicated that the NE loaded with AmB, without STE and 0.1 % w/v STE, are

less cytotoxic than the commercial formulation AmB- D. In addition, increasing concentration of cationic lipid leads to an increase in cytotoxicity. *In vitro* efficacy studies in J774 macrophages infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* showed that AmB loaded-NE with 0.1% w/v STE shows efficacy comparable to AmB-D. Although AmB loaded-NE without STE had shown statistically lower efficacy than the conventional formulation, this reduction is not significant in view of the gain that such a formulation brings in terms of selectivity between cells of the host and parasite, therefore, an attractive option for the treatment of leishmaniasis.

**Keywords:** Leishmaniasis, amphotericin B, stearylamine, nanoemulsions, submicron emulsions, nanotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

- 1 À esquerda: *Leishmania* - forma promastigota. À direita: *Leishmania* - forma amastigota. Adaptado do Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (2007).....26**
- 2 Fêmea de flebotomíneo ingurgitada. Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (2007).....26**
- 3 Ciclo de vida das *Leishmanias*. Adaptado de REINTHINGER *et al.*, 2007.....27**
- 4 Distribuição geográfica da Leishmaniose Tegumentar no mundo com destaque para as áreas onde se concentram a maioria dos casos.. Fonte: REINTHINGER *et al.*, 2007.....28**
- 5 Leishmaniose cutânea localizada apresentando uma única úlcera na perna. Adaptado de GOTO & LINDOSO, 2010.....29**
- 6 Leishmaniose cutânea difusa em criança de 4 anos de idade, evoluindo há cerca de 18 meses, com lesões cutâneas nódulo-infiltradas amplamente disseminadas. Adaptado de SILVEIRA, 2009.....29**
- 7 Forma mucocutânea. À esquerda: Forma mucosa tardia - lesão ulcerada do palato mole, com bordas infiltradas recoberta por exsudato. À direita: Forma mucosa tardia – Edema nasal com áreas de ulceração, crostas no local e edema no lábio superior. Adaptado de Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (2007).....30**
- 8 Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no mundo com destaque para as áreas endêmicas. Fonte: CHAPPUIS *et al.*, 2007.....31**
- 9 Hepatoesplenomegalia em paciente com Leishmaniose Visceral. Fonte: MURRAY *et al.*, 2005.....32**
- 10 A esquerda: Administração local de estibogluconato de sódio. À direita: Administração intralésional de estibogluconato de sódio em Kabul (Afeganistão). Adaptado de RENTHINGER *et al.*, 2007 e NEUBER, 2008.....33**
- 11 Fórmula estrutural da anfotericina B.....36**
- 12 Perfil do espectro de absorção dos diferentes estados de agregação da AmB. (A) Espécie monomérica. (B) Espécie oligomérica. (C) Agregados de oligômeros. Adaptado de TORRADO *et al.*, 2008.....38**

<b>13</b>	<b>Formulações lipídicas comerciais de anfotericina B. Adaptado de BOSWELL <i>et.al.</i>, 1998.....</b>	<b>40</b>
<b>14</b>	<b>Estrutura do Fungizone® e comportamento após administração endovenosa. Adaptado de ROMERO &amp; MORILLA, 2008.....</b>	<b>42</b>
<b>15</b>	<b>Diversas vias nas quais formulações lipídicas de anfotericina B (AmB) podem alcançar células de mamíferos. Adaptado de VYAS &amp; GUPTA, 2006.....</b>	<b>43</b>
<b>16</b>	<b>Estrutura do AmBisome® e comportamento após administração endovenosa. Adaptado de ROMERO &amp; MORILLA, 2008.....</b>	<b>44</b>
<b>17</b>	<b>Diversas vias nas quais formulações lipídicas de anfotericina B (AmB) podem alcançar células de parasitas. Adaptado de VYAS &amp; GUPTA, 2006.....</b>	<b>45</b>
<b>18</b>	<b>Fórmula estrutural da estearilamina.....</b>	<b>54</b>
<b>19</b>	<b>Representação esquemática da preparação das nanoemulsões branco pelo método de homogeneização a quente utilizando ultrassom com sonda de alta potência.....</b>	<b>69</b>
<b>20</b>	<b>Representação esquemática da metodologia para determinação do teor de anfotericina B (AmB) nas nanoemulsões (NE) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>72</b>
<b>21</b>	<b>Componentes do campo elétrico da luz não polarizada (A), linearmente polarizada ou plano-polarizada (B) e circularmente polarizada (C). Adaptado de RANJBAR &amp; GILL, 2009.....</b>	<b>74</b>
<b>22</b>	<b>Esquema de Dicroísmo Circular no qual a diferença de absorvância é medida. Adaptado de RANJBAR &amp; GILL, 2009.....</b>	<b>74</b>
<b>23</b>	<b>Reação de oxi-redução do MTT em células metabolicamente ativas.....</b>	<b>76</b>
<b>24</b>	<b>Curva analítica média para avaliação da linearidade do método analítico de quantificação da anfotericina B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....</b>	<b>81</b>
<b>25</b>	<b>Cromatograma com o perfil do pico de absorção da anfotericina B (AmB).....</b>	<b>82</b>
<b>26</b>	<b>Cromatogramas obtidos a partir da injeção das nanoemulsões branco (A) e nanoemulsões de anfotericina B (AmB) (B).....</b>	<b>83</b>
<b>27</b>	<b>Cromatograma obtido a partir da injeção de solução 0,2 µg/ mL de anfotericina B (AmB).....</b>	<b>85</b>
<b>28</b>	<b>À esquerda - Nanoemulsão de anfotericina B sem alcalinização prévia para incorporação do fármaco. À direita - Nanoemulsão de anfotericina B com incorporação do fármaco baseada no perfil pH-solubilidade.....</b>	<b>90</b>

<b>29 Nanoemulsão de anfotericina B sem alcalinização prévia para incorporação do fármaco (A). Nanoemulsão de anfotericina B com incorporação do fármaco baseada no perfil pH-solubilidade (B). Aumento de 200 vezes.....</b>	<b>90</b>
<b>30 Nanoemulsão branco sem fármaco. Aumento de 200 vezes.....</b>	<b>91</b>
<b>31 Estrutura química do colesterol e do ergosterol. Adaptado de CHARBONNEAU <i>et al.</i>, 2001.....</b>	<b>95</b>
<b>32 Representação esquemática da interação da anfotericina B (AmB) com a bicamada fosfolipídica de membranas de esteróis. As linhas pontilhadas entre as cadeias hidrocarbônicas representam as forças de van-der-Waals. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio formadas entre a AmB e as moléculas de esteróis. Adaptado de GOLENSER &amp; DOMB, 2006.....</b>	<b>95</b>
<b>33 Espectro de DC para as diversas formulações de anfotericina B (AmB): solução aquosa de AmB, Anforicin<sup>®</sup>, NE carregadas com AmB (0,2%) e STE (0,1%) ou sem STE.....</b>	<b>98</b>
<b>34 Espectro UV-Vis para as diversas formulações de anfotericina B (AmB ): solução aquosa de AmB, Anforicin<sup>®</sup>, NE carregadas com AmB (0,2%) e STE (0,1%) ou sem STE.....</b>	<b>100</b>
<b>35 Curvas de viabilidade celular das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B (AmB) e estearilamina (STE), e da formulação comercial Anforicin<sup>®</sup>, obtidas pelo ensaio de MTT.....</b>	<b>102</b>
<b>36 Curvas de viabilidade celular das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B (AmB) e estearilamina (STE), e suas respectivas formulações branco, obtidas pelo ensaio de MTT.....</b>	<b>102</b>
<b>37 Comparação dos valores de CC<sub>50</sub> de diferentes formulações obtidos no teste de MTT em macrófagos da linhagem J774.....</b>	<b>103</b>
<b>38 Curvas de inibição de crescimento de amastigotas versus logaritmo da concentração de anfotericina B (AmB) nas nanoemulsões (NE) em comparação à formulação comercial.....</b>	<b>106</b>
<b>39 Comparação dos valores de CI<sub>50</sub> contra amastigotas de <i>L. L. amazonensis</i> de diferentes formulações obtidos no teste de eficácia <i>in vitro</i>.....</b>	<b>106</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>1</b> Fármacos usados no tratamento das leishmanioses. Adaptado de SANTOS <i>et al.</i> , 2008.....	35
<b>2</b> Sinônimos e características mais importantes dos diferentes estados de agregação da AmB. Adaptado de TORRADO <i>et al.</i> , 2008.....	37
<b>3</b> Preparações comerciais de anfotericina B. Adaptado de BRAJTBURG & BOLARD, 1996 e IMAN <i>et al.</i> , 2011.....	41
<b>4</b> Condições cromatográficas do método analítico desenvolvido para doseamento de anfotericina B.....	61
<b>5</b> Composição da nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B (AmB).....	68
<b>6</b> Resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade do método de quantificação da anfotericina B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	84
<b>7</b> Resultados obtidos para a avaliação da precisão intermediária do método de quantificação da anfotericina B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	84
<b>8</b> Resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método de quantificação da anfotericina B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	85
<b>9</b> Resultados do teste de degradação forçada da anfotericina B (AmB) em meio ácido e alcalino.....	86

<b>10 Caracterização das nanoemulsões carregada com anfotericina B 0,2% p/v quanto ao diâmetro das partículas, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e teor de encapsulação (TE).....</b>	<b>87</b>
<b>11 Influência da concentração de anfotericina B (AmB) sobre o diâmetro dos glóbulos e índice de polidispersão (IP) das nanoemulsões.....</b>	<b>89</b>
<b>12 Estabilidade à 4° C das nanoemulsões (NE) carregadas com de anfotericina B 0,2% com ou sem estearilamina (STE).....</b>	<b>91</b>
<b>13 Estabilidade à temperatura ambiente das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B 0,2% com ou sem estearilamina (STE).....</b>	<b>93</b>
<b>14 Estabilidade à 4° C das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B 0,2% p/v contendo lecitina como emulsionante.....</b>	<b>97</b>
<b>15 Valores de CI<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e Índice de Seletividade (IS) das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B 0,2% p/v e da formulação comercial.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCD	Dispersão coloidal de AmB (Amphocil <sup>®</sup> )
ABLCL	Complexo lipídico de AmB (Abelcet <sup>®</sup> )
AmB	Anfotericina B
AmB-D	Associação entre anfotericina B e desoxicolato de sódio
ANOVA	Análise de Variância
A/O	Água em Óleo
ASC	Área Sob a Curva
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAC	Concentração de Agregação Crítica
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica 50%
Chol	Colesterol
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico

CV	Coeficiente de Variação
C8	Octilsilano
DC	Dicroísmo Circular
DI	Dado inexistente
DL <sub>50</sub>	Dose Letal 50%
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dose Máxima Tolerável
DODAB	Brometo de dioctadecildimetilamônio
DP	Desvio Padrão
DP <sub>a</sub>	Desvio Padrão do Intercepto com o Eixo Y
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DSHemsPC	1,2-diestigmasterilhemisuccinoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG	Diestearoilfosfatidiletanolamina peguilada
DSPG	Diestearoilfosfatidilglicerol
ED <sub>50</sub>	Dose Efetiva 50%
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EE	Eficiência de Encapsulação
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fase Aquosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLmix	Mistura Fungizone <sup>®</sup> - Lipofundin <sup>®</sup>
FM	Fase Móvel
FO	Fase Oleosa
g	Grama
G	Giros
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
H <sup>1</sup> -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
HSPC	Fosfatidilcolina hidrogenada de soja
IC	Inclinação da Curva de Calibração
i.p.	Intraperitoneal
IP	Índice de Polidispersão
IS	Índice de Seletividade
K <sub>af</sub>	Constante de Afinidade
Kcps	1000 contagens por segundo
Kg	Kilograma
L	Litro
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Limite de Detecção
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
<i>L. (L.)</i>	<i>Leishmania (Leishmania)</i>
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LQ	Limite de Quantificação
LT	Leishmaniose Tegumentar
Ltda.	Limitada
LV	Leishmaniose Visceral
<i>L. (V.)</i>	<i>Leishmania Viannia</i>
M	Concentração Molar
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MM	Massa Molecular

mM	Concentração Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil)-2H-tetrazólio
mV	Milivolt
NaCl	Cloreto de sódio
NAD <sup>+</sup>	Dicotinamida Adenina Dinucleotídeo no estado oxidado
NADH	Dicotinamida Adenina Dinucleotídeo no estado reduzido
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Nanoemulsão/ Nanoemulsões
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
nm	Nanômetro
O/A	Óleo em Água
OH <sup>-</sup>	Íons hidróxido
p	Valor p
PBS	Solução Tampão Fosfato Salina
PC	Fosfatidilcolina
PCS	Espectroscopia por correlação de fótons
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Porcentagem de Inibição
pKa	Potencial Constante de Acidez
PTFE	Politetrafluorietileno
p/v	Relação peso por volume
PVDF	polivinilideno
q.s.p	Quantidade suficiente para
r	Coeficiente de correlação
RE	Resolução
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sb <sup>+5</sup>	Íon antimônio pentavalente
SFM	Sistema Fagocitário Mononuclear
STE	Estearilamina
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas

TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
TE	Teor de Encapsulação
THF	Tetraidrofurano
TLE	Emulssomas de AmB sem ligante o-palmitoil-manose
TLE-OPM	Emulssomas de AmB contendo ligante o-palmitoil-manose
U	Unidade
U.A.	Unidade de Absorvância
U.S.	<i>United States</i>
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$^{\circ}$	graus
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\text{\textcircled{R}}$	marca registrada
$\%$	por cento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	25
<b>2.1 Leishmanioses</b> .....	25
<b><u>2.1.1 Leishmaniose Tegumentar</u></b> .....	27
<b><u>2.1.2 Leishmaniose Visceral</u></b> .....	31
<b><u>2.1.3 Tratamento das Leishmanioses</u></b> .....	32
<b>2.2 Anfotericina B</b> .....	36
<b><u>2.2.1 Formulações de anfotericina B comercialmente disponíveis</u></b> .....	39
<b><u>2.2.1.1 Estudos de toxicidade</u></b> .....	46
<b><u>2.2.1.2 Estudos de eficácia</u></b> .....	48
<b><u>2.2.2 AmB-D e emulsões de nutrição parenteral</u></b> .....	50
<b><u>2.2.3 Novas formulações de AmB</u></b> .....	52
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	58
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	58
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	58
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	59
<b>4.1 Materiais</b> .....	59
<b>4.2 Métodos</b> .....	61
<b><u>4.2.1 Desenvolvimento e validação de método analítico</u></b> .....	61
<b><u>4.2.1.1 Preparo da fase móvel</u></b> .....	62
<b><u>4.2.1.2 Linearidade da curva analítica</u></b> .....	62
<b><u>4.2.1.3 Seletividade do método analítico</u></b> .....	63
<b><u>4.2.1.4 Precisão do método analítico</u></b> .....	64
<b><u>4.2.1.5 Exatidão do método analítico</u></b> .....	65
<b><u>4.2.1.6 Limite de detecção e limite de quantificação</u></b> .....	66
<b><u>4.2.1.7 Teste de degradação forçada da AmB</u></b> .....	67
<b><u>4.2.2 Preparação das NE</u></b> .....	68



<b><u>4.2.3</u></b> Caracterização das NE.....	70
<b><u>4.2.3.1</u></b> Determinação do pH.....	70
<b><u>4.2.3.2</u></b> Diâmetro dos glóbulos.....	70
<b><u>4.2.3.3</u></b> Potencial zeta.....	70
<b><u>4.2.3.4</u></b> Teor da AmB.....	71
<b><u>4.2.3.5</u></b> Teor de Encapsulação da AmB.....	72
<b><u>4.2.3.6</u></b> Microscopia Ótica.....	73
<b><u>4.2.3.7</u></b> Dicroísmo Circular.....	73
<b><u>4.2.4</u></b> Estudo de estabilidade.....	75
<b><u>4.2.5</u></b> Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	76
<b><u>4.2.6</u></b> Ensaio de eficácia <i>in vitro</i> .....	78
<b><u>4.2.6</u></b> Análise Estatística.....	80
<b>5</b> RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
<b>5.1</b> Desenvolvimento e validação de método analítico.....	81
<b><u>5.1.1</u></b> Linearidade da curva analítica.....	81
<b><u>5.1.2</u></b> Seletividade do método analítico.....	82
<b><u>5.1.3</u></b> Precisão do método analítico.....	83
<b><u>5.1.4</u></b> Exatidão do método analítico.....	84
<b><u>5.1.5</u></b> Limite de detecção e limite de quantificação.....	85
<b><u>5.1.6</u></b> Teste de degradação forçada da AmB.....	86
<b>5.2</b> Caracterização das NE.....	87
<b><u>5.2.1</u></b> Influência da STE e da AmB.....	87
<b><u>5.2.2</u></b> Influência do método de incorporação do fármaco.....	89
<b>5.3</b> Estudo de estabilidade.....	91
<b>5.4</b> Dicroísmo Circular.....	98
<b>5.5</b> Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	101
<b>5.6</b> Ensaio de eficácia <i>in vitro</i> .....	105
<b>6</b> CONCLUSÃO.....	109
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	111

## 1 INTRODUÇÃO

Os protozoários parasitas obrigatórios do gênero *Leishmania* são propagados por vetores flebotomíneos e causam um espectro de doenças conhecidas coletivamente como leishmanioses. Esse grupo de doenças pode variar de lesões cutâneas, as quais se curam espontaneamente, até a forma visceral, que pode ser fatal.

A terapia convencional das leishmanioses inclui a utilização parenteral de antimoniais pentavalentes como o antimoniato de N-metilglucamina. As taxas de cura são altas, no entanto o tratamento é acompanhado por diversas dificuldades como toxicidade relativamente frequente e possibilidade de falha terapêutica.

A anfotericina B, fármaco de segunda escolha, também possui elevada incidência de reações adversas quando administrada na forma convencional (complexo de anfotericina B e desoxicolato de sódio). As formulações lipídicas baseadas na nanotecnologia contornam tais obstáculos, mas seu alto custo e dificuldades relacionadas ao preparo em escala industrial limitam o amplo uso dessas preparações. Embora as formulações comercialmente disponíveis tenham demonstrado redução de toxicidade em comparação à formulação convencional, esses produtos apresentam, geralmente, atividade similar. Aumento de eficácia das formulações lipídicas pode ser obtido quando doses maiores são empregadas.

Assim, o desenvolvimento de novos sistemas carreadores de anfotericina B menos tóxicos e de custo viável é emergente. A relevância desse assunto pode ser avaliada pelo número de preparações referentes às formulações alternativas para o fármaco encontradas na literatura.

Nesse trabalho foram desenvolvidas e caracterizadas nanoemulsões contendo anfotericina B associada ou não ao lípide catiônico estearilamina. A eficácia leishmanicida dessas formulações foi avaliada *in vitro* em macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Além disso, estudos de citotoxicidade *in vitro* contra células de mamíferos também foram desenvolvidos.

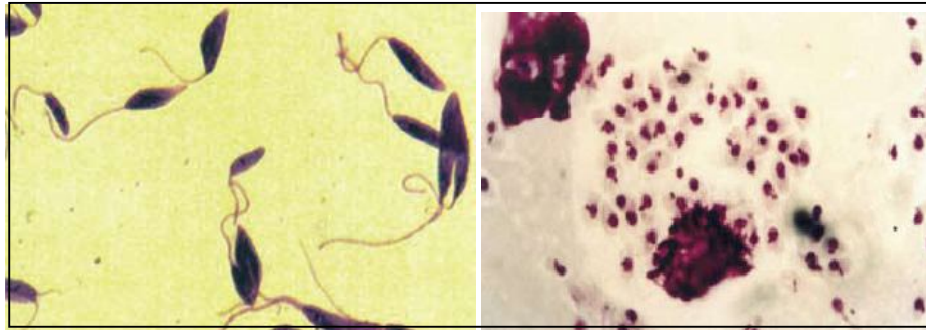
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Leishmanioses

As leishmanioses representam um conjunto de doenças com uma grande diversidade clínica e epidemiológica, sendo classificadas em duas formas principais, leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) ou calazar (DESJEUX, 2004).

As leishmanioses são prevalentes em áreas tropicais e subtropicais e são endêmicas em mais de oitenta países do Velho Mundo (África, Ásia e sul da Europa) e do Novo Mundo (América Latina) (AMEEN, 2010; GOTO & LINDOSO, 2010; MOUGNEAU *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2008). Estima-se uma prevalência de doze milhões de casos em todo o mundo e esse número continua a aumentar, com 1,5 a dois milhões de novos casos por ano. A doença também vem ocorrendo em focos não endêmicos em decorrência das mudanças ecológicas e de habitat do inseto vetor, à urbanização e ao aumento do trânsito de pessoas (AMEEN, 2010).

As leishmanioses são doenças causadas pela infecção de protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. Esses parasitas apresentam-se de duas formas principais: promastigota, que é flagelada e extracelular, e amastigota, que é aflagelada e intracelular (**Figura 1**). A doença é transmitida pela picada de flebotomíneos (**Figura 2**) contaminados pertencentes aos gêneros *Phlebotomus sp.* no Velho Mundo e *Lutzomyia sp.* no Novo Mundo (SANTOS *et al.*, 2008). As leishmanioses podem ser causadas por mais de vinte espécies de *Leishmania* e podem ser transmitidas aos humanos por mais de trinta espécies diferentes de flebotomíneos (AMEEN, 2010; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

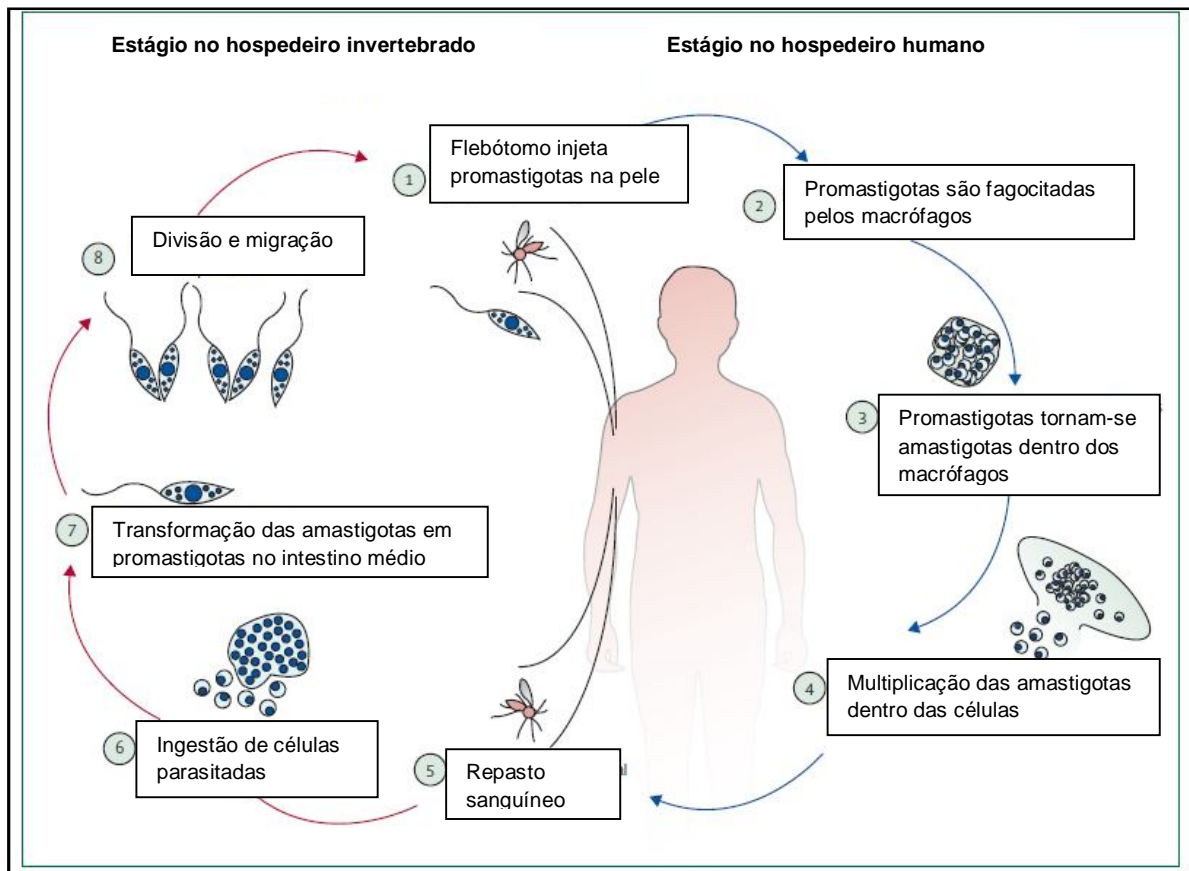


**Figura 1** – À esquerda: *Leishmania* - forma promastigota. À direita: *Leishmania* - forma amastigota. Adaptado do Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (2007).



**Figura 2** – Fêmea de flebotomíneo ingurgitada. Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (2007).

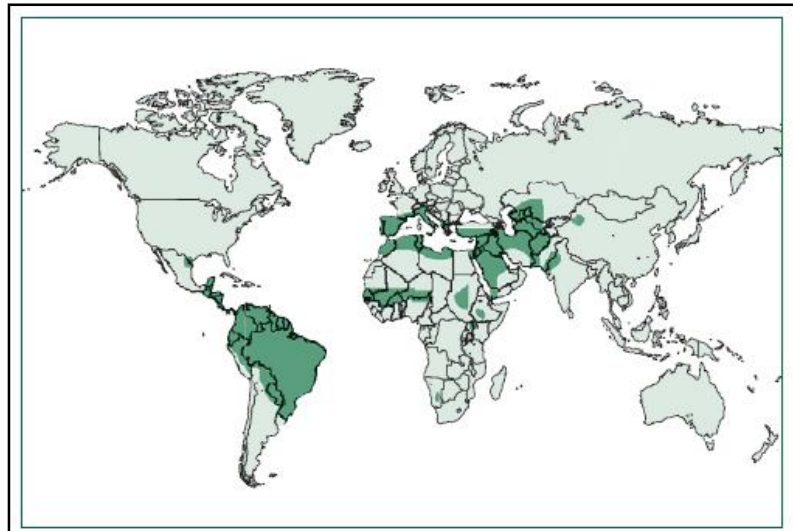
A forma promastigota da *Leishmania*, encontrada no tudo digestivo do inseto vetor, é inoculada no hospedeiro vertebrado no ato da picada do vetor fêmea durante o repasto sanguíneo e, então, é fagocitada por diferentes células fagocíticas no hospedeiro. Esses protozoários parasitam células do sistema fagocitário mononuclear humano (SFM) e de outros mamíferos, especialmente os macrófagos. Dentro delas, as promastigotas se diferenciam em amastigotas, se multiplicam e, então, destroem as células do hospedeiro e infectam outras, estabelecendo a infecção. A capacidade de tornar-se intracelular confere ao parasita a habilidade de escapar da resposta imune do hospedeiro devido à ativação do complemento. A recuperação da infecção envolve a morte intracelular do parasita como resultado da ativação do macrófago (CHAPPUIS *et al.*, 2007; GOLENSER & DOMB, 2006; GOTO & LINDOSO, 2010; MAUËL, 1990; MOUGNEAU *et al.*, 2011; PEREIRA & ALVES, 2008; REINTHINGUER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2009). A Figura 3 ilustra o ciclo de vida do parasita.



**Figura 3 – Ciclo de vida das *Leishmanias*. Adaptado de REINTHINGER *et al.*, 2007.**

### **2.1.1 Leishmaniose Tegumentar**

A LT é prevalente em 82 países e sua incidência é estimada em 1,5 milhões de casos por ano. A maioria (noventa por cento) dos casos é reportada na África (Argélia), no Oriente Médio (Afeganistão, Irã, Iraque, Árabia Saudita e Síria) e na América Latina (Brasil e Peru) (GOTO & LINDOSO, 2010; HEPBURN, 2000). A Figura 4 ilustra a distribuição geográfica da LT.



**Figura 4 – Distribuição geográfica da Leishmaniose Tegumentar no mundo com destaque para as áreas onde se concentram a maioria dos casos. Fonte: REINTHINGER *et al.*, 2007.**

Nas Américas, as espécies envolvidas são numerosas e compreendem os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. As três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LT no Brasil são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, espécie mais prevalente, seguida pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (BARRALNETO *et al.*, 1995; GOTO & LINDOSO, 2010).

Dependendo da espécie infectante de *Leishmania* e da resposta imune mediada por células T dos indivíduos infectados, um espectro de formas clínicas da doença pode se desenvolver (SILVEIRA *et al.*, 2009). A LT em humanos é geralmente dividida em leishmaniose cutânea localizada (LCL; **Figura 5**), leishmaniose cutânea difusa (LCD; **Figura 6**) e leishmaniose mucocutânea (LMC; **Figura 7**) (REINTHINGER *et al.*, 2007).



**Figura 5** – Leishmaniose cutânea localizada apresentando uma única úlcera na perna. Adaptado de GOTO & LINDOSO, 2010.



**Figura 6** – Leishmaniose cutânea difusa em criança de 4 anos de idade, evoluindo há cerca de 18 meses, com lesões cutâneas nódulo-infiltradas amplamente disseminadas. Adaptado de SILVEIRA, 2009.



**Figura 7 – Forma mucocutânea. À esquerda: Forma mucosa tardia - lesão ulcerada do palato mole, com bordas infiltradas recoberta por exsudato. À direita: Forma mucosa tardia – Edema nasal com áreas de ulceração, crostas no local e edema no lábio superior. Adaptado de Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (2007).**

A LCL, ou simplesmente de leishmaniose cutânea (LC), é a forma mais frequente da doença e é causada principalmente por espécies dermatrópicas de *Leishmania*. As lesões aparecem numa área exposta da superfície corporal, variando em número de um a dez. Após um período de incubação de um a três meses, uma pápula vermelha aparece, a qual se estende como uma placa ou nódulo. A lesão frequentemente desenvolve como uma úlcera circular e indolor, bem delimitada, com crosta central que, às vezes, é hemorrágica. Ela pode se curar de forma espontânea, deixando uma cicatriz suave e hipopigmentada. Dependendo da relação parasita/ hospedeiro e outros fatores, ela pode evoluir para outras formas da doença (GOTO & LINDOSO, 2010; PEREIRA & ALVES, 2008).

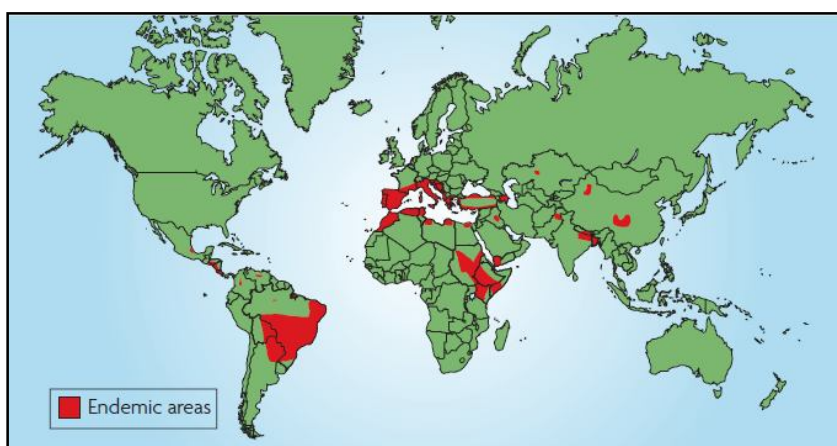
A LCD é uma condição rara e as espécies envolvidas, nas Américas, são *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*. É caracterizada pela presença de lesões nodulares, ricas em parasitas, que não ulceram e podem se espalhar por todo o corpo do paciente. Não tem tendência à cura espontânea (GOTO & LINDOSO, 2010; PEREIRA & ALVES, 2008).

A LMC ou “espundia” é causada principalmente por *L. (V.) braziliensis*, mas outras espécies podem ocorrer como *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. Essa forma ocorre anos após o início da LC e é caracterizada pela destruição das cavidades oral, nasal e faríngea, podendo evoluir para lesões desfigurantes (GOTO & LINDOSO, 2010).



### 2.1.2 Leishmaniose Visceral

Estima-se que quinhentos mil novos casos de LV e cinquenta mil mortes por essa forma da doença surgem a cada ano. A maioria (noventa por cento) dos casos de LV ocorre na Índia, Bangladesh, Nepal, Etiópia, Sudão e Brasil (**Figura 8**). A doença é principalmente endêmica em países menos desenvolvidos e em regiões pobres (CHAPPUIS *et al.*, 2007; DESJEUX, 2004).

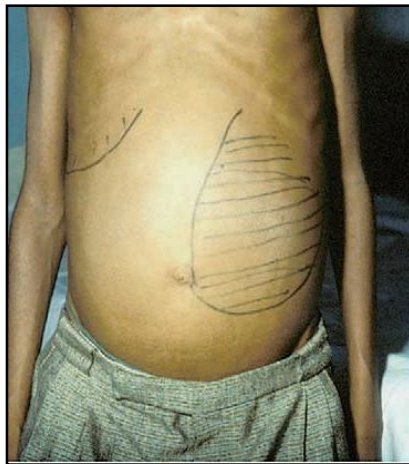


**Figura 8** – Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no mundo com destaque para as áreas endêmicas. Fonte: CHAPPUIS *et al.*, 2007.

A LV é causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* no leste da África e no subcontinente indiano e *Leishmania (Leishmania) infantum* na Europa, norte da África e América Latina. No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, espécie semelhante à *Leishmania (Leishmania) infantum* (CHAPPUIS *et al.*, 2007; GONTIJO & MELO, 2004).

Seguindo um período de incubação, que geralmente dura entre dois a seis meses, os pacientes com LV apresentam sinais e sintomas de infecção sistêmica persistente, incluindo febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso. Ocorre invasão do parasita no sangue e no SFM, aumentando o tamanho de linfonodos, baço e fígado. A febre geralmente se associa com calafrios e pode ser intermitente. Fadiga e fraqueza podem ser agravadas por anemia, que é causada pelo estado inflamatório persistente,

hiperesplenismo (destruição periférica de eritrócitos no baço inchado) e, algumas vezes, hemorragia. À medida que a doença avança, pode ocorrer agravamento da esplenomegalia, causando distensão abdominal e, algumas vezes, agravamento concomitante da hepatomegalia (**Figura 9**) (CHAPPUIS *et al.*, 2007).



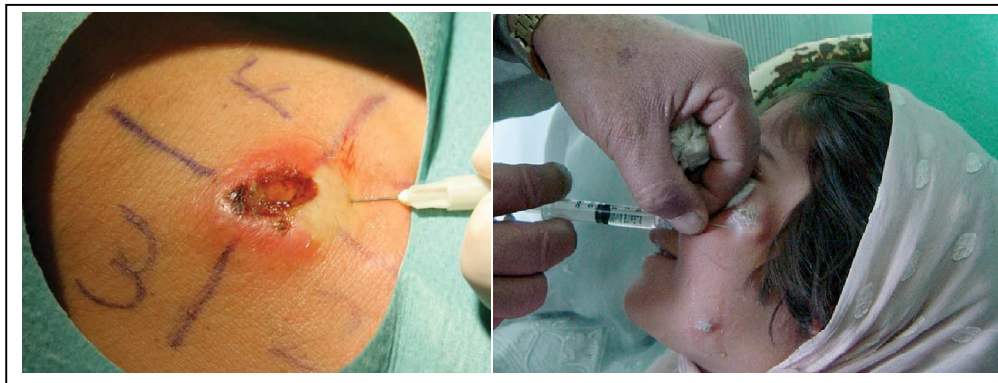
**Figura 9** – Hepatoesplenomegalia em paciente com Leishmaniose Visceral. Adaptado de MURRAY *et al.*, 2005.

### **2.1.3 Tratamento das Leishmanioses**

A LV é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar dez por cento quando não se institui o tratamento adequado. Embora, noventa por cento das lesões de LT possam se curar espontaneamente (entre três a dezoito meses), o tratamento é importante, principalmente nas lesões recentes, lesões múltiplas e disseminadas, em pacientes portadores de significativa imunossupressão e no caso de ocorrência de lesões localizada nas articulações (DAVIES *et al.*, 2003; MURRAY *et al.*, 2005). O tratamento é feito para acelerar a cura, reduzir aparecimento de cicatrizes, minimizar a progressão da doença, prevenir sua disseminação ou seu reaparecimento e prevenir a evolução para a forma mucocutânea no caso de determinadas espécies infectantes (AMEEN, 2010; HEPBURN, 2000; MURRAY *et al.*, 2005; PISCOPO & AZZOPARDI, 2006). Acredita-se que a LMC geralmente resulta da

evolução da leishmaniose cutânea não tratada ou com tratamento inadequado (BARRAL-NETO *et al.*, 1995).

O tratamento da LT pode ser local ou sistêmico. O critério a favor da abordagem sistêmica é se as lesões têm envolvimento da mucosa ou dos linfonodos e/ ou se são refratárias ao tratamento local (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006). Modalidades físicas de tratamento, incluindo crioterapia e aquecimento local por infravermelho vem sendo utilizadas, com índice de sucesso variável. Pomada de paramomicina associada ao cloreto de metilbenzetônio apresenta taxa de cura de 74 a 85%, sendo mais efetiva do que o mesmo fármaco associado à uréia, entretanto com maior incidência de reações inflamatórias locais severas. Infiltração intra-lesional na derme ou na base da lesão com antimoniais pentavalentes pode ser feita (**Figura 10**). Esse procedimento é relativamente doloroso e necessita de ser feito a cada uma ou duas semanas, de três a oito vezes. O índice de cura com esse procedimento é 75%. Se não efetivo, deve-se considerar a abordagem sistêmica (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006).



**Figura 10 – À esquerda: Administração local de estibogluconato de sódio. À direita: Administração intra-lesional de estibogluconato de sódio em Kabul (Afeganistão). Adaptado de REINTHINGER *et al.*, 2007 e NEUBER, 2008.**

A abordagem de tratamento sistêmico compreende a terapia da LV e dos casos de LT não responsivos ou não indicados ao tratamento tópico. Nesse contexto, a terapia convencional das leishmanioses é a administração parenteral de antimoniais pentavalentes: estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) (GOTO & LINDOSO, 2010; MURRAY *et al.*, 2005). Pentostam<sup>®</sup> é usado principalmente em países de língua inglesa e Glucantime<sup>®</sup> é

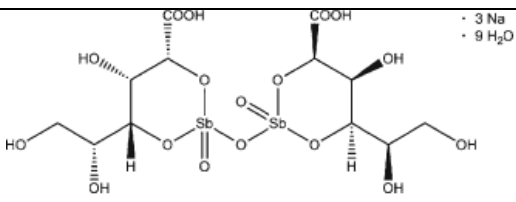
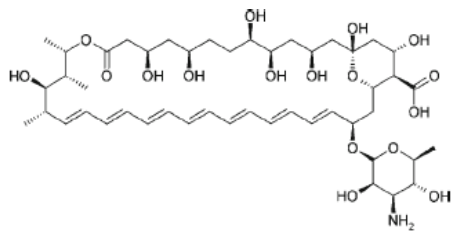
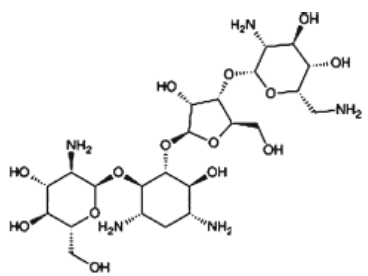
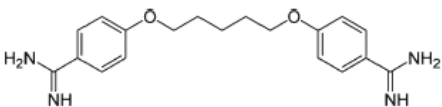
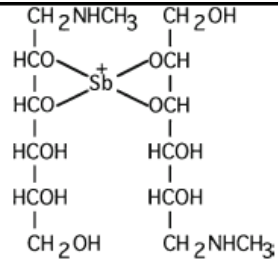
usado no Brasil e em outros países da América Latina (SANTOS *et al.*, 2008). Na LV, a dose é de 20 mg/ kg/ dia de antimonial pentavalente ( $Sb^{+5}$ ) durante vinte a trinta dias. (MURRAY *et al.*, 2005). A dose recomendada é de 10 a 20 mg/ kg/ dia de  $Sb^{+5}$  durante vinte dias na LCL, 20 mg /kg/ dia de  $Sb^{+5}$  durante vinte dias na LCD e 20 mg/ kg/ dia de  $Sb^{+5}$  durante trinta dias na LMC (GOTO & LINDOSO, 2010).

A eficácia dos antimoniais é variável, dependendo da região geográfica, espécie de *Leishmania* e apresentação clínica. Infelizmente, aumento de casos de falha terapêutica tem sido reportado em várias regiões do mundo, sendo que no Brasil observa-se em 16% dos pacientes em tratamento de LT (GOTO & LINDOSO, 2010). Esse regime de tratamento é ainda acompanhado por toxicidade relativamente frequente, manifestada por dores, artralgia, mialgia, náusea, edema e eritema. Essas queixas são geralmente discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento. Entretanto, efeitos adversos severos como cardiotoxicidade e falência renal podem ocorrer, principalmente em pacientes idosos (GOTO & LINDOSO, 2010; MURRAY *et al.*, 2005).

Assim, o fármaco atualmente considerado como primeira escolha está longe de ser satisfatório. Ressalta-se ainda que os antimoniais pentavalentes não podem ser administrados a gestantes (GOTO & LINDOSO, 2010). O aparecimento de resistência de espécies de *Leishmania* aos antimoniais é relatado, principalmente onde seu uso foi indiscriminado como na Índia (AMEEN, 2010; MANANDHAR *et al.*, 2008; PISCOPO & AZZOPARDI, 2006). Além disso, os antimoniais não são efetivos no tratamento da LMC, especialmente na manifestação severa (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006).

Nos casos em que o tratamento preconizado com antimoniais pentavalentes não é efetivo ou não pode ser empregado, agentes de segunda escolha podem ser empregados, tais como anfotericina B (AmB), pentamidina e paramomicina (SANTOS *et al.*, 2008). A Tabela 1 traz os diferentes fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses.

**Tabela 1 – Fármacos usados no tratamento das leishmanioses. Adaptado de SANTOS *et al.*, 2008.**

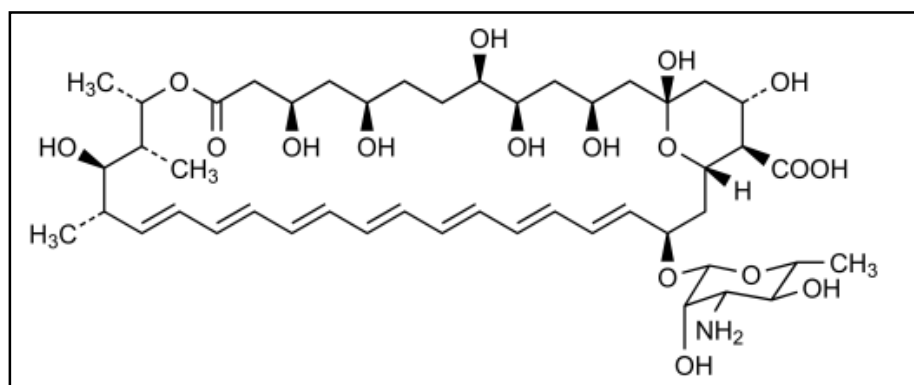
Nome		Fórmula Estrutural	Fórmula Química	MM* (g/mol)
Comercial	Químico			
Pentostam®	Estibogluconato de sódio		$C_{12}H_{38}Na_3O_{26}Sb_2$	910,90
Fungizone®	Anfotericina B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924,08
Humatin®	Sulfato de paramomicina		$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$	615,63
Pentamidina	Isotionato de pentamidina		$C_{19}H_{24}N_4O_2$	340,42
Glucantime®	Antimoniato de meglumina		$C_{14}H_{29}O_{10}N_2Sb$	507,01

\*MM = Massa Molecular

## 2.2 Anfotericina B

A AmB é um antibiótico poliênico heptaeno de amplo espectro obtido de culturas de *Streptomyces nodosus*. No final dos anos 50, a AmB já era utilizada em alguns casos clínicos e em 1965 foi o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) (DISMUKES, 2000).

O fármaco é um pó amarelo a alaranjado, inodoro ou quase inodoro e quase insípido. A AmB tem uma estrutura química bastante complexa (**Figura 11**).



**Figura 11 – Fórmula estrutural da anfotericina B.**

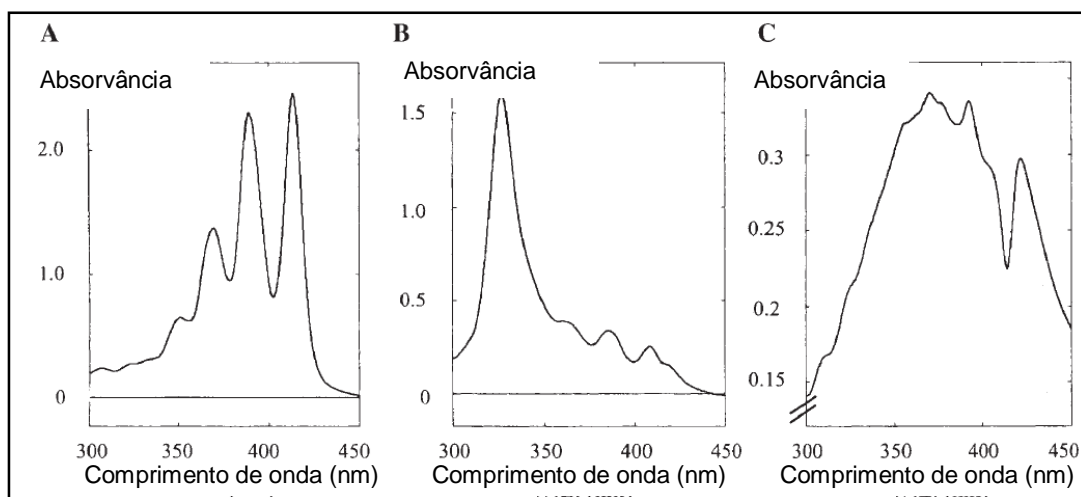
A AmB apresenta características hidrofóbicas, em decorrência da parte apolar de sua molécula, caracterizada pela presença de sete duplas conjugadas carbono-carbono; e características hidrofílicas, decorrentes da presença de inúmeros grupos hidroxila. Além disso, ela possui os grupos carboxílico e amino, que lhe conferem propriedades anfífilas (DAMASCENO, 2010), sendo solúvel em água em pH abaixo de 2 ou acima de 11, porém nessas condições extremas, o fármaco não é estável (TORRADO *et al.*, 2008). Já em meio neutro, a AmB se apresenta como um “zwitterion” (GOLENSER & DOMB, 2006), uma vez que os valores de pKa para o grupo amino protonado e para o grupo carboxílico são 10 e 5,7, respectivamente (LARABI *et al.*, 2004). A solubilidade da AmB em água em pH fisiológico (6 a 7) é muito baixa, sendo inferior a 1 mg/ L (TORRADO *et al.*, 2008). Ressalta-se ainda que a AmB é insolúvel em grande parte de solventes orgânicos (EGITO *et al.*, 2002). O fármaco é solúvel em dimetilsulfóxido

(DMSO), levemente solúvel em dimetilformamida, muito levemente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em álcool (BRITISH Pharmacopoeia, 2005).

Essa insolubilidade da AmB em água leva à formação de agregados em concentrações definidas. A proporção relativa das diferentes espécies depende da concentração e é possível determinar o estado de agregação do fármaco pelo seu espectro de absorção no ultravioleta-vísível (UV-Vis). Em concentrações abaixo de  $10^{-6}$  M, concentração de agregação crítica (CAC), o espectro de absorção é característico da forma monomérica solúvel, responsável por uma intensa banda a 409 nm. Em contraste, em altas concentrações, as moléculas auto-associadas de AmB formam oligômeros e, então, agregados de oligômeros e observa-se um novo espectro (EGITO *et al.*, 2002; TORRADO *et al.*, 2008). A Figura 12 ilustra os espectros de absorção dos diferentes estados de agregação da AmB e a Tabela 2 contém um sumário de suas características.

**Tabela 2 – Sinônimos e características mais importantes dos diferentes estados de agregação da anfotericina B. Adaptado de TORRADO *et al.*, 2008.**

<b>Estado de agregação da AmB</b>	<b>Aparência</b>	<b>Máximos de absorção do espectro</b>	<b>Sinônimos</b>
Monômero	Amarelo transparente	363, 383, 406 a 409 nm	
Oligômero	Translúcido	328 a 340 nm	Dímeros, agregados pequenos auto-associados, AmB auto-associada solúvel em água
Agregado de oligômeros	Amarelo opaco	360 a 363, 383 a 385 e 406 a 420 nm	Multi-agregados, super-agregados, AmB auto-associada insolúvel em água



**Figura 12 – Perfil do espectro de absorção dos diferentes estados de agregação da anfotericina B. (A) Espécie monomérica. (B) Espécie oligomérica. (C) Agregados de oligômeros. Adaptado de TORRADO *et al.*, 2008.**

A AmB é recomendada como segunda linha de tratamento da LT e LV, especialmente quando há falha terapêutica com os fármacos antimoniais e no caso de pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (YARDLEY & CROFT, 1997). Além disso, é o fármaco de escolha para o tratamento de infecções fúngicas progressivas potencialmente graves (SHADKHAN *et al.*, 1997).

O tempo de meia-vida da AmB é de 24 a 48 horas, entretanto a eficácia do antibiótico não está relacionada aos seus níveis plasmáticos, uma vez que a AmB é fortemente ligada às lipoproteínas. Após 24 horas, grande parte do fármaco é acumulada em vários órgãos, especialmente o fígado. Apenas cinco por cento do fármaco é metabolizado diretamente pelos rins e a dose remanescente é excretada pela bile e fezes (GOLENSER & DOMB, 2006).

A AmB interage com o ergosterol, constituinte da membrana celular de fungos ou espécies de *Leishmania*, ou com o colesterol que constitui a membrana celular dos mamíferos, sendo que o antibiótico possui maior afinidade pelo ergosterol. A ligação ao ergosterol altera a permeabilidade celular seletiva, uma vez que há formação de poros e conseqüente extravasamento de íons (principalmente íons potássio) e substâncias vitais. Distúrbios na atividade enzimática das membranas também ocorrem, provocando a morte celular (GOLENSER & DOMB, 2006).



Embora a AmB apresente maior afinidade pelo ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos decorrem da sua capacidade em se ligar ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos. As reações adversas agudas da AmB, tais como febre, calafrios, tremores, náusea, vômitos e dor de cabeça, ocorrem frequentemente e estão relacionadas, principalmente, à infusão. Alterações cardiovasculares como hipotensão, hipertensão e arritmias cardíacas foram observadas com menor frequência. Hipocalemia, hipernatremia, diurese aumentada, hipomagnesemia, disfunção renal e efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) são associados com administrações repetidas (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

A toxicidade está mais relacionada com a forma agregada da AmB, que é mais tóxica que a monomérica. A forma AmB auto-associada solúvel em água propicia mudanças de permeabilidade nas membranas de células vermelhas e induz eventos citotóxicos (LEGRAND *et al.*, 1992).

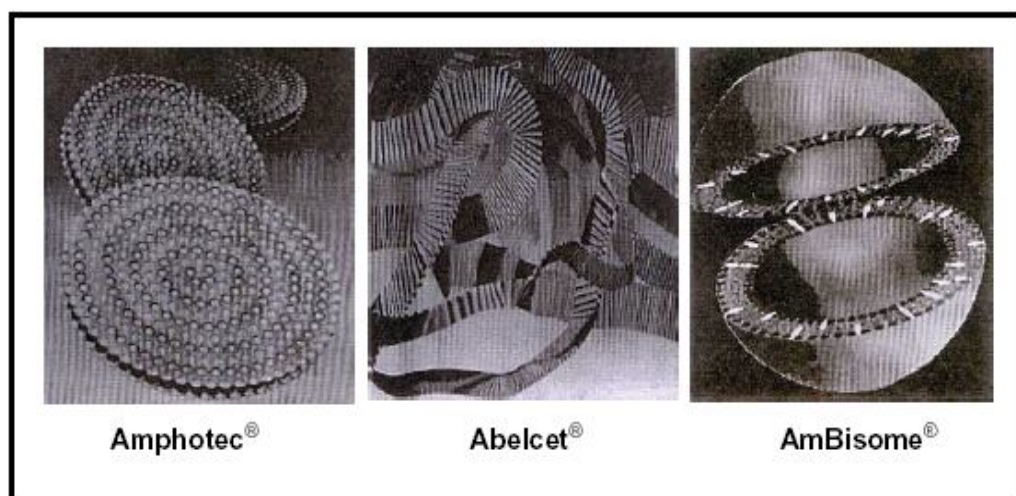
### **2.2.1 Formulações de AmB comercialmente disponíveis**

Sendo praticamente insolúvel em água, a AmB possui baixa biodisponibilidade por via oral e, portanto, deve ser administrada por via endovenosa. O fármaco se tornou comercialmente disponível como Fungizone<sup>®</sup> (Bristol-Myers-Squibb, EUA) em 1960, como uma suspensão coloidal na qual o sal biliar desoxicolato de sódio é utilizado como agente solubilizante, formando um complexo micelar com a AmB (VYAS & GUPTA, 2006). Essa associação entre AmB e desoxicolato de sódio é a chamada formulação convencional de AmB e será abreviada no presente trabalho como AmB-D. A formulação é administrada por infusão intravenosa lenta em uma solução contendo cinco por cento de dextrose (SHADKHAN *et al.*, 1997). Atualmente, no Brasil, encontra-se comercialmente disponível o Anforicin B<sup>®</sup> (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Brasil) como formulação convencional. O produto é comercializado como um pó liofilizado que é disperso no momento do uso. Para o

tratamento da LT, recomenda-se a infusão de vinte doses em dias alternados de 1 mg/ kg do fármaco reconstituída em 500 mL de solução de glicose durante quatro horas, sendo a dose total do tratamento 1 a 1,5 gramas de AmB (GOTO & LINDOSO, 2010; HEPBURN, 2000). Para o tratamento da LV recomenda-se infusão lenta de quinze doses em dias alternados de 1 mg/ kg ou vinte doses de 1 mg/ kg diariamente (MURRAY *et al.*, 2005).

Infelizmente, o excipiente desoxicolato de sódio é hemolítico e a formulação convencional é altamente nefrotóxica. A redução da nefrotoxicidade da AmB é o principal objetivo das formulações lipídicas que surgiram na década de 1990 (TORRADO *et al.*, 2008; VYAS & GUPTA, 2006).

Além da formulação convencional, três preparações lipídicas de AmB estão disponíveis comercialmente: AmB lipossomal (AmBisome<sup>®</sup>), complexo lipídico de AmB (Abelcet<sup>®</sup>, ABLC) e dispersão coloidal de AmB (Amphotec<sup>®</sup>, ABCD) (VYAS & GUPTA, 2006). Todas essas formulações apresentam eficácia semelhante (GOTO & LINDOSO, 2010) e diferem quanto à estrutura, forma, tamanho, composição e conteúdo de AmB (**Figura 13 e Tabela 3**).



**Figura 13** – Formulações lipídicas comerciais de anfotericina B. Adaptado de BOSWELL *et al.*, 1998.

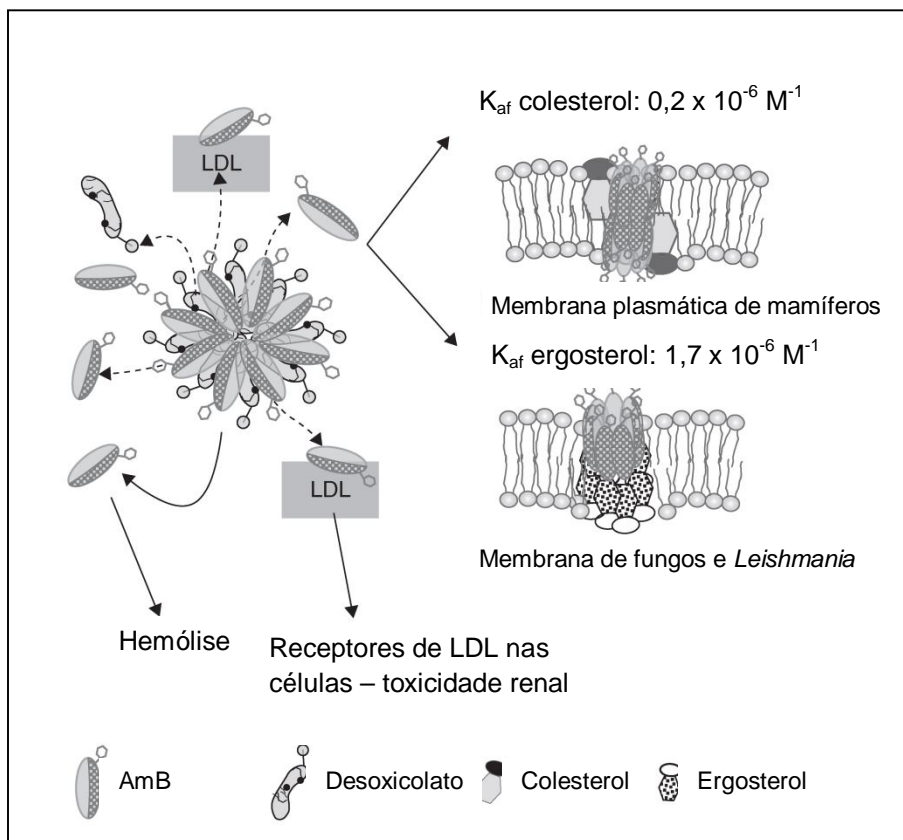
**Tabela 3 - Preparações comerciais de anfotericina B. Adaptado de BRAJTBURG & BOLARD, 1996 e IMAN *et al.*, 2011.**

Preparação	Estrutura	Composição	Tamanho	Carga superficial
Fungizone <sup>®</sup>	Dispersão coloidal (micelas)	Desoxicolato, AmB	≈ 1 µm (diâmetro)	Negativa
AmBisome <sup>®</sup>	Lipossomas SUV	HSPC-Chol-DSPG-AmB (2:1:0,8:0,4)	< 100 nm (diâmetro)	Negativa
Abelcet <sup>®</sup>	Complexo lipídico (forma de fita)	DPMC- DMPG-AmB (7:3:3)	1 a 6 µm (diâmetro)	Negativa
Amphotec <sup>®</sup> / Amphocil <sup>®</sup>	Dispersão coloidal (forma de disco)	Colesterilsulfato de sódio- AmB (1:1)	≈ 100 nm (diâmetro) x < 10 nm (espessura)	Negativa

AmB= anfotericina B; HSPC= fosfatidilcolina hidrogenada de soja; Chol = colesterol; DSPG= diestearoilfosfatidilglicerol; DMPC= dimiristoilfosfatidilcolina; DMPG= dimiristoilfosfatidilglicerol; SUV= Vesículas Unilamelares Pequenas.

As formulações lipídicas comercialmente disponíveis têm indicação regulamentada apenas para LV (VYAS & GUPTA, 2006). A AmB lipossomal não tem sido extensamente usada na LT, mas relatos isolados de seu uso *off-label* em casos de resistência têm mostrado efetividade. A AmB e sua formulação lipossomal vem sendo utilizadas com sucesso em casos difíceis de LMC (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006).

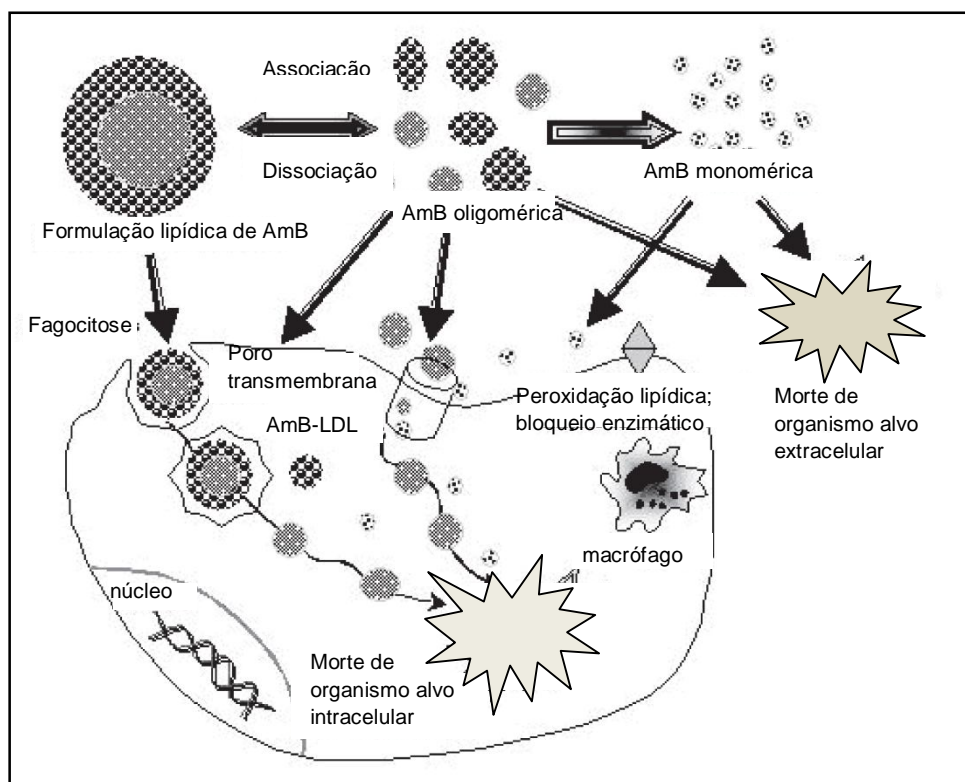
Após administração endovenosa, o Fungizone<sup>®</sup> é diluído no sangue, o que leva à completa dissociação da dispersão coloidal composta de AmB e desoxicolato de sódio. A AmB convencional causa hemólise e se associa extensamente a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo captada pelas células que exibem receptores de LDL, por exemplo, as células renais (**Figura 14**) (ROMERO & MORILLA, 2008).



AmB = anfotericina B; HDL = lipoproteína de alta densidade;  $K_{af}$  = constante de afinidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade

**Figura 14 – Estrutura do Fungizone® e comportamento após administração endovenosa. Adaptado de ROMERO & MORILLA, 2008.**

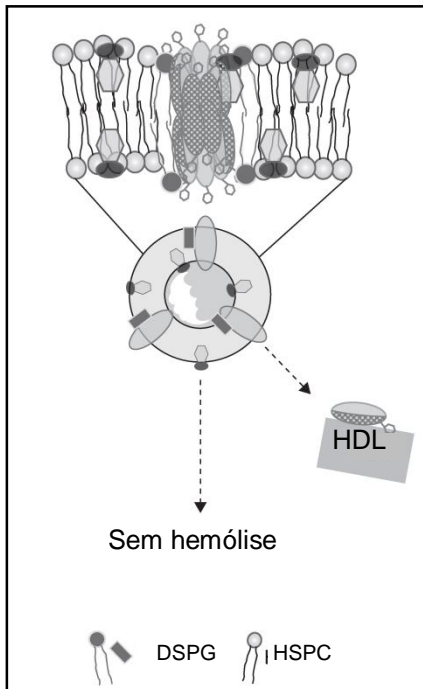
Sistemas lipídicos são capazes de interagir fortemente com as moléculas de AmB, formando uma entidade molecular nova, na qual o fármaco está associado aos lipídes, que apresenta propriedades físico-químicas distintas da AmB isolada. Se a ligação entre a AmB e o carreador é fraca e lábil, quando o complexo é diluído no sangue, a AmB irá se dissociar do carreador lipídico e se ligará às LDL, assim como faz o fármaco ao se dissociar do desoxicolato na formulação convencional. O complexo LDL-AmB pode ser internalizado nas células carregando os receptores de LDL e, então, efeitos tóxicos comparados aos observados com AmB-D irão ocorrer (**Figura 15**) (VYAS & GUPTA, 2006).



**Figura 15 – Diversas vias nas quais formulações lipídicas de anfotericina B (AmB) podem alcançar células de mamíferos. Adaptado de VYAS & GUPTA, 2006.**

Já quando o complexo AmB-carreador é forte e inerte, ele permanece intacto após introdução na circulação sanguínea, mas pode se ligar a lipoproteínas. ABLC pode se ligar a lipoproteínas de alta densidade (HDL) e permanecer na circulação sanguínea, não induzindo toxicidade. Por outro lado, ABCD e AmB lipossomal não se ligam a lipoproteínas e são ambas relativamente não tóxicas (VYAS & GUPTA, 2006).

Dentre as formulações comerciais, AmBisome® é significativamente menos tóxico do que as outras formulações. No AmBisome®, a AmB se ancora fortemente na bicamada lipídica devido a interações favoráveis com os lípides ao redor. Essa forte associação faz com que a AmB não seja liberada prontamente quando entra na circulação sanguínea, o que modifica a biodistribuição do fármaco, diminuindo sua captação por células renais e, assim, reduzindo a toxicidade (**Figura 16**) (IMAN *et al.*, 2011; ROMERO & MORILLA, 2008; VYAS & GUPTA, 2006).



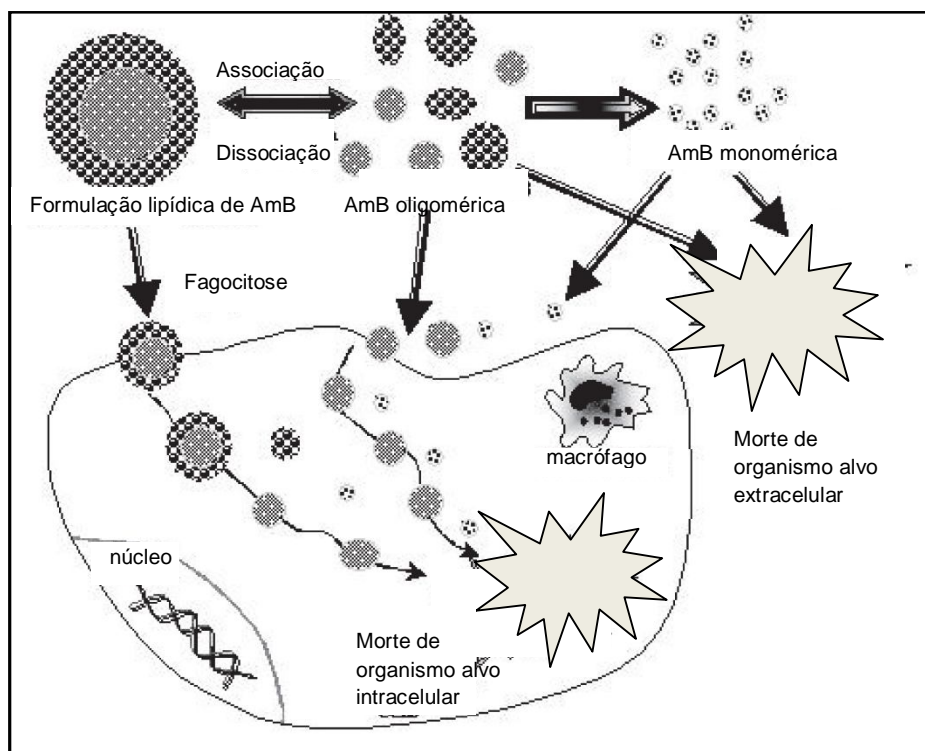
**Figura 16 – Estrutura do AmBisome® e comportamento após administração endovenosa.**  
Adaptado de ROMERO & MORILLA, 2008.

Nas formulações de lipossomas SUV em baixas concentrações de AmB, o fármaco existe na forma monomérica. Todavia, quando a concentração de AmB aumenta acima de uma concentração crítica na bicamada lipídica, o fármaco passa a existir na forma agregada. Na formulação de referência Fungizone®, a AmB está predominantemente na forma de oligômeros (forma solúvel em água auto-associada), que é a forma mais tóxica (TORRADO *et al.*, 2008). Certamente, no AmBisome®, o fármaco não está disponível na forma livre tóxica, já que o valor da dose letal capaz de matar cinquenta por cento de uma população em estudo ( $DL_{50}$ ) é maior do que 160 mg/ kg, enquanto que para AmB-D esse valor é de 2,3 mg/ kg (VYAS & GUPTA, 2006).

Devido à natureza coloidal das formulações lipídicas, elas são removidas da circulação pelas células do SFM, levando a alterações no perfil farmacocinético. Esse direcionamento passivo ao alvo é útil para diminuir a toxicidade renal da AmB e, além disso, pode servir como estratégia de tratamento de infecções de células fagocíticas do SFM causadas por parasitas, como ocorre, por exemplo, na LV (TORRADO *et al.*, 2008). Em comparação às outras formulações lipídicas, maiores concentrações

plasmáticas de AmB podem ser obtidas com AmBisome® porque ele é removido menos rapidamente pelas células do SFM (TORRADO *et al.*, 2008).

Quando formulações lipídicas são direcionadas aos macrófagos ou monócitos, elas podem inibir os parasitas presentes dentro dessas células ou a AmB pode se dissociar do complexo lipídico, dentro da célula fagocítica, e existir como AmB livre para inibir parasitas extracelulares. O sistema age como um reservatório de AmB, sendo que se a ligação entre AmB e os lípides é forte, o fármaco se dissociará lentamente como espécies monoméricas, as quais são menos tóxicas às células de mamíferos, mas altamente ativas contra células de parasitas (**Figura 17**) (ARAÚJO *et al.*, 2005; VYAS & GUPTA, 2006).



**Figura 17 – Diversas vias nas quais formulações lipídicas de anfotericina B (AmB) podem alcançar células de parasitas. Adaptado de VYAS & GUPTA, 2006.**

### **2.2.1.1 Estudos de toxicidade**

Em um estudo comparativo entre Fungizone<sup>®</sup> e AmBisome<sup>®</sup>, a formulação lipossomal foi administrada com segurança, por via endovenosa, em vinte coelhos nas doses variando de 0,5 a 10 mg/ kg. Por outro lado, doze coelhos receberam AmB-D, por via endovenosa, nas doses 0,5; 1,0 e 1,5 mg/ kg e dois deles morreram de toxicidade cardíaca aguda na maior dose. No estudo de toxicidade crônica, nefrotoxicidade ocorreu em apenas um dos quatro animais tratados com AmBisome<sup>®</sup> e em todos os quatro animais tratados com Fungizone<sup>®</sup> (LEE *et al.*, 1994).

O estudo clínico de Davidson e colaboradores (1996) mostrou que o tratamento de LV com AmBisome<sup>®</sup> não foi tóxico quando administrado em curto período (cinco ou seis doses em dez dias), sendo que a metade do tempo final do tratamento pôde ser feita fora do hospital, pois os pacientes geralmente apresentavam recuperação do apetite, bem-estar e rápida cessão da febre. Outros estudos clínicos relataram tolerância satisfatória com o uso de AmBisome<sup>®</sup> no tratamento de LV (BERMAN *et al.*, 1998; BOLETIS *et al.*, 1999).

Um estudo clínico aberto foi desenvolvido para comparar a segurança do tratamento com AmB-D e AmB lipossomal em pacientes neutropênicos. Concluiu-se que AmBisome<sup>®</sup> foi significativamente mais seguro, nas doses 1 e 3 mg/ kg, comparado à formulação convencional na dose de 1 mg/ kg. A incidência de nefrotoxicidade foi de 3% e 23% no grupo tratado com AmBisome<sup>®</sup> 3 mg/ kg e AmB-D 1 mg/ kg, respectivamente. Não foi observada toxicidade renal no grupo tratado com a formulação lipossomal na menor dose (1 mg/ kg) (PRENTICE *et al.*, 1997). Outros estudos clínicos apontam para menor toxicidade induzida pelas formulações lipídicas em comparação à formulação convencional (SUNDAR *et al.*, 2004; WALSH *et al.*, 1999).

Em um estudo de LV em modelo murino, Fungizone<sup>®</sup> teve que ser excluído do estudo de doses múltiplas em decorrência de toxicidade, enquanto as demais formulações lipídicas (AmBisome<sup>®</sup>, Abelcet<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup>, e um niossoma experimental) foram usadas



na dose de 8 mg/ kg (MULLEN *et al.*, 1997). A maior dose tolerada de AmB, nas formulações lipídicas comerciais, foi de 8 mg/ kg, já que em doses acima dessa, os camundongos mostraram sinais de toxicidade (MULLEN *et al.*, 1998). Esse resultado é contrário ao encontrado por Gangneux e colaboradores (1996) que administraram doses de 50 mg/ kg de AmB, até um total de 300 mg/ kg, sem observação de reações adversas.

Um estudo foi feito para estabelecer o perfil farmacocinético e toxicológico de AmBisome<sup>®</sup> em ratos por um período de administração de trinta dias. Mínima nefrotoxicidade foi observada com infusões da formulação lipossomal até 20 mg/ kg, porém observou-se hepatotoxicidade moderada, principalmente na maior dose administrada (BOSWELL *et al.*, 1998).

Em um modelo de infecção de camundongos BALB/c, a dose máxima tolerada de Fungizone<sup>®</sup>, por via endovenosa, foi 1 mg/ kg, enquanto que as formulações lipídicas puderam ser administradas na dose de 50 mg/ kg (AmBisome<sup>®</sup>) ou 25 mg/ kg (Abelcet<sup>®</sup> e Amphocil<sup>®</sup>) sem sinais de toxicidade (YARDLEY & CROFT, 2000).

Larabi e colaboradores (2003) avaliaram a toxicidade de formulações lipídicas de AmB contra dois tipos de células diferentes e, *in vivo*, pela administração de dose única em camundongos. O estudo *in vitro* indicou que a concentração de Fungizone<sup>®</sup> que causa cinquenta por cento de hemólise foi de 5 µg/ mL, enquanto que para as formulações lipídicas essa concentração foi acima de 100 µg/ mL. Na avaliação *in vivo*, Fungizone<sup>®</sup> apresentou valor de DL<sub>50</sub> igual a 3,5 mg/ kg, enquanto que Abelcet<sup>®</sup> apresentou valor de 40 mg/ kg, o que indica que a formulação convencional foi marcadamente mais tóxica.

A diminuição de toxicidade do tratamento com o uso das formulações lipídicas de AmB, comparado ao tratamento convencional é bem estabelecida na literatura. As formulações lipídicas apresentam vantagens em relação à formulação convencional, incluindo maior concentração nos órgãos primários do SFM (baço, fígado e pulmões) e menor concentração nos rins, com marcante redução da nefrotoxicidade, além da diminuição dos efeitos adversos relacionados à infusão (DISMUKES, 2000; LEE *et al.*, 1994; VYAS & GUPTA, 2006).

### 2.2.1.2 Estudos de eficácia

A eficácia de Fungizone<sup>®</sup> foi comparada à de AmBisome<sup>®</sup> num modelo murino de LV induzida por *L. (L.) infantum*. O estudo demonstrou que nas doses de 5 a 50 mg/ kg de AmB foi possível a erradicação completa de parasitas no fígado, baço e pulmões com o uso de AmBisome<sup>®</sup>. Na dose de 0,8 mg/ kg, AmBisome<sup>®</sup> mostrou ser mais eficaz que Fungizone<sup>®</sup> administrado na mesma dose. Os autores sugerem que a acumulação da AmB nos tecidos e o aumento da distribuição do fármaco ao vacúolo parasitóforo dentro dos macrófagos são os responsáveis pela maior atividade leishmanicida observada com a preparação lipossomal (GANGNEUX *et al.*, 1996).

Yardley e Croft (1997) observaram que a AmB na forma lipossomal é menos ativa contra *L. (L.) major* nos estudos *in vitro* do que a AmB na forma convencional (Fungizone<sup>®</sup>). Eles sugerem que a explicação para esse comportamento se deve ao fato de que no AmBisome<sup>®</sup> a AmB é associada aos componentes da bicamada fosfolipídica do lipossoma e, então, está menos disponível para interagir com membranas de ergosterol dos parasitas. No modelo *in vivo* de infecção cutânea em camundongos BALB/c, AmBisome<sup>®</sup> apresentou efeito dose-resposta na faixa de 6,25 a 50 mg/ kg de AmB por via endovenosa, enquanto Fungizone<sup>®</sup> foi ineficaz na dose não tóxica (1 mg/ kg). A administração subcutânea de AmBisome<sup>®</sup> próxima à lesão não foi efetiva.

A atividade leishmanicida de quatro formulações comerciais (Fungizone<sup>®</sup>, AmBisome<sup>®</sup>, Abelcet<sup>®</sup> e Amphocil<sup>®</sup>) e de um niossoma contendo AmB foram comparadas num modelo murino de LV. Todas as formulações levaram à significativa supressão de crescimento dos parasitas no baço e fígado comparadas ao grupo controle. Além disso, ocorreu supressão do crescimento dos parasitas na medula óssea com todas as formulações comparadas ao controle, exceto Abelcet<sup>®</sup>. A eficácia das formulações foi classificada como: Amphocil<sup>®</sup> = AmBisome<sup>®</sup> > niossoma com AmB > Abelcet<sup>®</sup>. Fungizone<sup>®</sup> foi omitido dos estudos de doses múltiplas em decorrência de toxicidade (MULLEN *et al.*, 1997).

O mesmo grupo de pesquisa avaliou a eficácia de uma vesícula não iônica (niossoma) contendo estibogluconato de sódio comparada às formulações lipídicas comerciais de AmB. Tratamento com AmBisome<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup> e niossoma carregado com estibogluconato de sódio foram igualmente ativos em suprimir significativamente o crescimento de parasitas no fígado e baço, comparado ao controle, sendo que a eficácia do Abelcet<sup>®</sup> foi menor. Apenas Abelcet<sup>®</sup> não foi capaz de suprimir o crescimento de parasitas na medula óssea de forma significativa em relação ao controle. A eficácia das formulações foi classificada como: niossoma com estibogluconato de sódio > Amphocil<sup>®</sup> = AmBisome<sup>®</sup> > Abelcet<sup>®</sup> (MULLEN *et al.*, 1998).

Berman e colaboradores (1998) desenvolveram um estudo clínico aberto fase II para determinação simultânea da eficácia e segurança de AmBisome<sup>®</sup> no tratamento de LV. Na Índia e no Keyna uma dose total de 6 mg/ kg e 14 mg/ kg de AmB, respectivamente, foi capaz de levar à cura de todos os pacientes. No Brasil, o uso de uma dose total de 20 mg/ kg levou à cura em 87% dos pacientes. Outros ensaios mostraram que pacientes com LV foram tratados com sucesso pela administração de AmB lipossomal (BOLETIS *et al.*, 1999; DAVIDSON *et al.*, 1996; MEYERHOFF, 1999).

Yardley e Croft (2000) compararam a atividade leishmanicida do Fungizone<sup>®</sup> e das três formulações lipídicas comercialmente disponíveis em modelo de LC, causada por *L. (L.) major*, e LV, por *L. (L.) donovani*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os resultados dos estudos *in vitro*, em macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*, mostraram que Fungizone<sup>®</sup> foi significativamente mais efetivo contra as amastigotas intracelulares do que AmBisome<sup>®</sup> e Abelcet<sup>®</sup>, sendo que apenas Amphocil<sup>®</sup> apresentou nível similar de atividade. No modelo *in vivo* de LV, a dose média efetiva (ED<sub>50</sub>) para Fungizone<sup>®</sup>, AmBisome<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup> e Abelcet<sup>®</sup>, quando administrados via endovenosa, foi 0,21 ± 0,10; 0,73 ± 0,16; 0,32 ± 0,12 e 2,70 ± 1,20 mg/ kg, respectivamente. Entretanto, para o modelo *in vivo* de LC, o AmBisome<sup>®</sup>, na dose de 25 mg/ kg, foi a formulação que obteve maior sucesso na diminuição do tamanho da lesão, Amphocil<sup>®</sup> apresentou atividade mais baixa e Abelcet<sup>®</sup> e Fungizone<sup>®</sup> foram inativos. O maior valor de ED<sub>50</sub> no modelo de LC comparado ao modelo de LV reflete a dificuldade dos sistemas distribuidores de fármacos em alcançar o alvo no caso na LC, ou seja, as

células infectadas localizadas no estrato espinhoso da pele (ROMERO & MORILLA, 2008).

Larabi e colaboradores (2003) avaliaram a atividade leishmanicida de novas formulações lipídicas de AmB em comparação às formulações comercialmente disponíveis. Na avaliação *in vitro* contra cepas de *Leishmania donovani* sensíveis à AmB, Abelcet<sup>®</sup> e a nova formulação foram mais ativos do que Fungizone<sup>®</sup>, já Amphotec<sup>®</sup> e AmBisome<sup>®</sup> foram menos ativos do que Fungizone<sup>®</sup>.

Para comparar a eficácia de AmB-D às das formulações lipídicas, pacientes indianos com LV foram randomizados em três grupos de tratamento: Fungizone<sup>®</sup>, AmBisome<sup>®</sup> e Abelcet<sup>®</sup>. Menor quantidade de AmB foi administrada no caso de AmBisome<sup>®</sup> e Abelcet<sup>®</sup>, pois foram necessárias menor número de infusões. O índice final de cura foi similar para todos os tratamentos, porém os autores ressaltam que o número de pacientes no estudo não foi suficiente para se afirmar que a eficácia das três formulações é estatisticamente igual (SUNDAR *et al.*, 2004).

Como exposto, diversos estudos avaliaram a eficácia das formulações lipídicas comerciais. Os resultados são variáveis, e, algumas vezes, conflitantes. A superioridade clínica não é bem definida, o que se observa é que a redução de toxicidade permite a administração de maiores doses de AmB nas formulações lipídicas, fato que pode contribuir para a melhora de parâmetros clínicos. A dose máxima tolerável de AmB é cerca de 1 mg/ kg/ dia, entretanto as formulações lipídicas permitem os clínicos aumentar essa dose em até cinco vezes, sem aumento nos eventos tóxicos relacionados à infusão (VYAS & GUPTA, 2006).

### **2.2.2 AmB-D e emulsões de nutrição parenteral**

Em decorrência do alto custo das formulações lipídicas comercialmente disponíveis de AmB, tornou-se comum, na prática hospitalar, misturar o Fungizone<sup>®</sup> com emulsões

lipídicas de uso parenteral, como Lipofundin<sup>®</sup> e Intralip<sup>®</sup>. Tal procedimento diminui a toxicidade da AmB (EGITO *et al.*, 2002 ; SHADKHAN *et al.*, 1997).

Ranchère e colaboradores (1996) relataram que o tamanho dos glóbulos formados por diferentes formas de preparações de misturas de AmB-D com emulsões parenterais Intralip<sup>®</sup> sofreu grandes mudanças após cinco horas de estocagem, com a consequente formação de precipitados de AmB.

Estudos de estabilidade de misturas Fungizone<sup>®</sup> e Intralip<sup>®</sup> indicaram que a AmB permaneceu quimicamente estável. No entanto, a estabilidade física das emulsões foi insatisfatória, sendo observada separação de fases, indicando que a AmB não foi adequadamente inserida na interface da emulsão. Além disso, tais estudos não incluíram determinação do tamanho de partículas da emulsão, o que é essencial para a segurança de produtos administrados por via endovenosa (WALKER *et al.*, 1998).

No estudo de Shadkhan e colaboradores (1997) observou-se que as misturas de Fungizone<sup>®</sup> - Intralipid<sup>®</sup> e Fungizone<sup>®</sup> - Lipofundin<sup>®</sup> (FLmix) são menos tóxicas do que AmB-D em ensaio de liberação de potássio por células vermelhas humanas. O principal resultado desse estudo é que agitação vigorosa de Fungizone<sup>®</sup> com várias emulsões lipídicas (Intralipid<sup>®</sup> 10%, Intralipid<sup>®</sup> 20% e Lipofundin<sup>®</sup> 20%), contrariamente às misturas feitas com agitação suave, levou à obtenção de preparações estáveis com tamanhos de glóbulos similares aos das emulsões originais.

Os resultados de redução de toxicidade que ocorre ao se misturar Fungizone<sup>®</sup> e emulsões de nutrição parenteral também foram constatados em outros estudos (ARAÚJO *et al.*, 2005; EGITO *et al.*, 2002). Egito e colaboradores (2002) avaliaram a toxicidade *in vitro* por meio do ensaio de liberação de potássio em eritrócitos humanos do Fungizone<sup>®</sup> e FLmix e observaram que a mistura apresentou menor toxicidade. Esse fato foi atribuído à inserção de moléculas de AmB na interface das gotículas da emulsão e posterior liberação lenta dos monômeros. Assim, a emulsão pode ser considerada como um reservatório da forma monomérica de AmB, que libera apenas quantidades limitadas de fármaco livre no meio aquoso.

### **2.2.3 Novas formulações de AmB**

Como já foi exposto, embora as formulações lipídicas comercialmente disponíveis tenham demonstrado redução de toxicidade em comparação à formulação convencional, esses produtos apresentam, geralmente, atividade similar. Aumento da eficácia foi obtido quando doses maiores foram usadas. Além disso, o uso mais abrangente das formulações lipídicas comerciais é limitado pelo seu alto custo. Sendo assim, diversos estudos têm sido conduzidos com intuito de desenvolver formulações alternativas. O foco destes foi o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados que propiciem maior eficácia e menor toxicidade em comparação à formulação convencional. Entretanto, como será visto com mais detalhes abaixo, este objetivo foi raramente alcançado.

Nanodiscos encapsulados com AmB foram avaliados em modelo de LC experimental, causada por *L. (L.) major*, em camundongos BALB/c. Os nanodiscos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) em dose cinco vezes abaixo da necessária para que AmBisome<sup>®</sup> tenha efeito terapêutico pela via endovenosa (25 mg/ kg) (YARDLEY & CROFT, 2000). Os nanodiscos de AmB apresentaram efeito a longo prazo, uma vez que o crescimento de parasitas continuou a decair por mais de cem dias após a administração, e observou-se eliminação completa de parasitas, sem lesões remanescentes e sem isolamento de parasitas nos dias 140 a 250 pós-infecção. O AmBisome<sup>®</sup>, entretanto, foi inativo em regime terapêutico equivalente. (NELSON *et al.*, 2006).

A eficácia de AmB-D e nanopartículas de AmB-D foi testada *in vitro*, em macrófagos J774 infectados com *L.donovani*, e *in vivo*, em modelo de LV experimental em hamsters. As nanopartículas de AmB-D foram mais eficazes do que a dispersão coloidal original tanto no modelo *in vitro* como *in vivo*. Os autores assumem que, provavelmente, o resultado *in vivo* se deve ao direcionamento do fármaco aos tecidos infectados (MANANDHAR *et al.*, 2008).

Gupta e colaboradores (2007) desenvolveram emulssomas contendo AmB com ligante de macrófagos na superfície, o-palmitoil-manose (TLE-OPM), ou sem ligante (TLE). A sua eficácia foi comparada à de AmB-D em modelo *in vitro*, em macrófagos J774 infectados com *L. (L.) donovani*, e *in vivo*, em modelo de LV experimental em hamsters. A eficácia *in vitro* e *in vivo* das formulações foi classificada como TLE-OPM > TLE > AmB-D. Os autores atribuem à maior eficácia dos emulssomas TLE-OPM a distribuição facilitada do fármaco aos macrófagos pela ligação de o-palmitoil manose aos receptores de manose presente nessas células. Os autores não estudaram o uso dos emulssomas em modelo de LT, assim não é possível saber se esses sistemas seriam igualmente eficazes em tal condição, uma vez que na LT o alvo está localizado na pele.

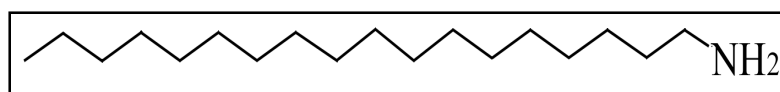
Foram preparadas 32 formulações lipossomais de AmB com matriz lipídica composta de 1,2-diestigmasterilhemisuccinoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSHemsPC), fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol. Os valores de concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) das diferentes formulações foram bem variáveis no ensaio de toxicidade *in vitro* por liberação de potássio em células vermelhas, com algumas formulações apresentando CI<sub>50</sub> comparáveis ou maiores do que AmBisome<sup>®</sup>. No ensaio de citotoxicidade *in vitro* em amastigotas de *L. major* residindo em macrófagos J774, algumas formulações de lipossomas teste apresentaram valores de CI<sub>50</sub> comparáveis ao AmBisome<sup>®</sup> e Fungizone<sup>®</sup>, sendo que este apresentou o menor valor de CI<sub>50</sub> dentre todas as formulações testadas. Foram ainda testadas as doses máximas toleráveis (DMT) das formulações em camundongos BALB/c saudáveis. Não foram observadas mortes nos camundongos com a administração de AmBisome<sup>®</sup> a 140 mg/ kg e Fungizone<sup>®</sup> a 2 mg/ kg. Para a maioria das formulações lipossomais teste, a DMT foi menor do que 10 mg/ kg, porém uma delas apresentou valor de 60 mg/ kg e atividade leishmanicida similar ao AmBisome<sup>®</sup> (IMAN *et al.*, 2011).

A associação dos lipossomas catiônicos com agentes leishmanicidas tem sido descrita. Avaliou-se o efeito terapêutico da associação de AmB em lipossomas compostos por fosfatidilcolina (PC) e carregados com um lípido catiônico, estearilamina (STE), em modelo de infecção por *L. (L.) donovani* em camundongos BALB/c. Foi demonstrado que a terapia de dose única dessa formulação causou eliminação dos parasitas do

fígado e do baço. A combinação de AmB com lipossomas contendo STE e PC foi superior à AmB livre e ao AmBisome<sup>®</sup> na diminuição do número de parasitas nos órgãos analisados, assim como em termos de prevenção da doença e diminuição da recorrência da infecção (BANERJEE *et al.*, 2008b).

A associação de STE com estibogluconato de sódio também é descrita. Animais infectados com *L. donovani* e tratados com lipossomas carregados com STE e estibogluconato de sódio (concentração subterapêutica) tiveram eliminação de parasitas no fígado e baço. A dose equivalente de estibogluconato de sódio não carregado em lipossoma e do lipossoma STE-PC foi apenas parcialmente efetiva (PAL *et al.*, 2004).

A STE (**Figura 18**), ou octadecilamina, é uma amina lipofílica que possui uma cadeia hidrocarbonada contendo 18 carbonos. Diversos estudos mostram que lipossomas catiônicos carregados com STE apresentam atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Estes lipossomas branco (sem fármaco), contendo apenas STE e PC, mostraram atividade significativa contra a *L. donovani* (BANERJEE *et al.*, 2008a; DEY *et al.*, 2000). A ação leishmanicida deste lípido catiônico tem sido atribuída à sua capacidade de induzir desestabilização da membrana das *Leishmanias*, através de uma interação específica com a fosfatidilserina, fosfolípido negativamente carregado da membrana do parasita, o qual não é encontrado nas células do hospedeiro.



**Figura 18** – Fórmula estrutural da estearilamina.

Há autores que utilizam da estratégia do uso de solvente orgânico na incorporação de AmB ao nanocarreador, os quais devem ser evitados, pois acarretam problemas toxicológicos e ambientais. Nessa estratégia, diversos sistemas podem ser citados: lipossomas (ETTEN *et al.*, 1995), micelas poliméricas (LAVASANIFAR *et al.*, 2001), emulsões submicrônicas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; FILIPPIN & SOUZA, 2008; FUKUI *et al.*, 2003), microemulsões (DAROLE *et al.*, 2008) e nanopartículas lipídicas (MORIBE



*et al.*, 2010). Em alguns desses estudos foram feitos testes de toxicidade e, como já é bem conhecido, os resultados apontam para a redução de toxicidade do tratamento alcançada pela encapsulação da AmB comparado ao uso do fármaco livre (DAROLE *et al.*, 2008; LAVASANIFAR *et al.*, 2001; MORIBE *et al.*, 2010).

A incorporação de AmB em nanoemulsões (NE) constitui uma alternativa interessante para a administração endovenosa do fármaco. NE são sistemas heterogêneos de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), estabilizadas por um terceiro componente, o tensoativo, ou mistura de tensoativos (BENITA & LEVI, 1993). Essas formulações têm sido utilizadas como carreadoras e solubilizadoras de fármacos de baixa solubilidade (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000).

As emulsões injetáveis de AmB devem ser produzidas com a inserção do fármaco na camada interfacial, uma vez que o fármaco é pouco solúvel tanto na fase oleosa (FO) quanto na fase aquosa (FA). Isso é feito usualmente por meio da dissolução da lecitina e da AmB em solvente orgânico, seguido da posterior evaporação deste e utilização da mistura AmB-lecitina para a produção da emulsão. Entretanto, a utilização de solvente orgânico é um fator limitante destes processos (MÜLLER *et al.*, 2004).

Sendo assim, Lance e colaboradores (1995, 1996) desenvolveram um procedimento inédito para a incorporação da AmB em emulsões lipídicas que pode ser conduzido de forma satisfatória com o uso de uma solução alcalina do fármaco. Esse método é baseado no perfil de pH-solubilidade. Evidências da incorporação da AmB na interface foram apresentadas e estudos de toxicidade mostraram que tais formulações são menos tóxicas em comparação à preparação convencional. A atividade destas formulações para o tratamento das leishmanioses não foi investigada.

Um procedimento similar foi conduzido para incorporação da AmB na interface de microemulsões graças ao uso de uma solução alcalina do fármaco sem emprego de solvente orgânico (BRIME *et al.*, 2002 ; MORENO *et al.*, 2001). Moreno e colaboradores (2001) mostraram que a toxicidade aguda das microemulsões carregadas com AmB, em camundongos CD-1, foi menor do que a toxicidade do Fungizone<sup>®</sup> (DL<sub>50</sub> de 1 mg/

kg e 4 mg/ kg para Fungizone<sup>®</sup> e microemulsão de AmB, respectivamente). Estudos de estabilidade das microemulsões não foram satisfatórios, apontando a necessidade de liofilização do sistema. Os dados de redução de toxicidade com o uso da microemulsão em comparação ao Fungizone<sup>®</sup> estão em consonância com estudos posteriores (BRIME *et al.*, 2002, 2004). Porém, ressalta-se que as microemulsões são potencialmente mais tóxicas do que as NE devido à maior concentração dos tensoativos, sendo, dessa forma, menos interessantes para o uso endovenoso da formulação.

Em parte devido à alta variabilidade dos estudos, nem diferença e nem equivalência de eficácia entre as diversas formulações de AmB pode ser inferida. Todavia, todos os estudos estão de acordo que as formulações lipídicas são significativamente menos tóxicas do que AmB-D e essa menor toxicidade permite a administração de maiores doses.

Observa-se maior presença de estudos que avaliam a eficácia de formulações lipídicas em modelo de LV e menos estudos para LT. Na LV, os sistemas lipídicos carreadores de fármacos podem trazer um benefício mais fácil de ser alcançado. Isso porque após administração endovenosa, essas partículas são fagocitadas pelas células do SFM e, então, direcionadas, principalmente, ao fígado e baço, órgãos nos quais as células infectadas residem. Dentro destas, o sistema carreador deve alcançar os fagolisossomos, onde as amastigotas se localizam. Na LT, entretanto, o acesso dos sistemas carreadores ao estrato espinhoso é dificilmente alcançado. Acredita-se que uma pequena fração das nanopartículas, administradas pela via endovenosa, pode extravasar da circulação sistêmica e alcançar o alvo. Assim, mais estudos focados em modelo de LT são necessários (ROMERO & MORILLA, 2008).

O objetivo do presente trabalho se insere nesse contexto, com a proposta de desenvolvimento de NE carregadas com AmB para o tratamento das leishmanioses, visando a administração endovenosa. A estratégia de incorporação do fármaco baseado em seu perfil pH-solubilidade, proposta por Lance e colaboradores (1995), é adotada no presente trabalho, em decorrência das vantagens já expostas comparativamente ao uso de solventes orgânicos. Modificações de composição e

método de preparo das NE serão estudadas, tendo em vista que a estabilidade das formulações propostas por Lance e colaboradores (1995) foi baixa. Essa instabilidade pode ser devido a uma eventual hidrólise das lecitinas, tensoativos usados no preparo das NE, sendo que a substituição desses surfactantes não foi investigada pelos autores. A obtenção de NE estáveis, carregadas com AmB, é uma alternativa atraente para o tratamento das leishmanioses, uma vez que tais sistemas diminuem a toxicidade do tratamento e são de baixo custo, o que as tornam acessíveis para o uso em países em desenvolvimento, locais onde as leishmanioses predominam. Além disso, elas possuem muitas propriedades biológicas e farmacêuticas de interesse, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, estabilidade física e fácil preparo, facilitando assim sua produção em larga escala (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar NE carregadas com AmB e avaliar sua atividade leishmanicida *in vitro*.

### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método para determinação da AmB através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Determinar o teor total e o teor de encapsulação (TE) da AmB nas NE preparadas;
- Determinar o diâmetro (nm) e o potencial zeta (mV) das diferentes formulações desenvolvidas;
- Avaliar a influência da AmB nas características físico-químicas das NE;
- Avaliar a influência da STE nas características físico-químicas das NE;
- Desenvolver estudo de estabilidade das formulações com e sem STE;
- Avaliar o estado de agregação da AmB encapsulada nas NE desenvolvidas comparado ao da formulação comercial Anforicin B<sup>®</sup> e da AmB livre, por meio de dicroísmo circular (DC)
- Avaliar a citotoxicidade das NE, carregadas ou não com AmB, sem ou com diferentes níveis de STE, comparadas à formulação comercial Anforicin B<sup>®</sup>;
- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* das formulações de NE carregadas com AmB e da formulação comercial Anforicin B<sup>®</sup>.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

O Crodamol GTCC<sup>®</sup> (triglicerídeos de cadeia média; TCM) e o polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) foram obtidos da Croda Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil). O colesterol, o  $\alpha$ -tocoferol e a octadecilamina foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O glicerol foi obtido da Casa da Química Indústria & Comércio Ltda. (São Paulo, Brasil). As lecitinas Lipoid E 80<sup>®</sup> e Lipoid S 75<sup>®</sup> foram obtidas da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). A anfotericina B e o Anforicin B<sup>®</sup> foram obtidos do Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. (São Paulo, Brasil). O tetrahydrofurano (THF) grau CLAE e a acetonitrila grau CLAE foram obtidos da Tedia (Rio de Janeiro, Brasil). O metanol grau CLAE foi obtido de J. T. Baker (EUA). O dimetilsulfóxido foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil). O sal dissódico de EDTA dihidratado foi obtido da Isofar (Rio de Janeiro, Brasil). O meio “Roswell Park Memorial Institute médium 1640” (RPMI 1640), o meio “Grace’s insect”, a solução de piruvato de sódio 100 mM e o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil)-2H-tetrazólio (MTT) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). A solução de aminoácidos não essenciais 100 x foi obtida da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O soro fetal bovino foi obtido da LGC Biotecnologia (São Paulo, Brasil). A L-glutamina foi obtida da Gibco-BRL (Nova Iorque, EUA). A penicilina G potássica foi obtida de USB Corporation (Ohio, EUA). O laurilsulfato de sódio foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O kit de coloração rápida Panótico foi obtido de Renylab-Química e Farmacêutica Ltda. (Minas Gerais, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico

A solução Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,20 foi preparada dissolvendo-se 8,18 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,98 g de fosfato dibásico de sódio heptaidratado e 0,36 g de fosfato monobásico de sódio monohidratado em água bidestilada (Milli-Q). Após a dissolução dos sais, o pH foi ajustado para 7,20. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água bidestilada. A

solução foi envasada em frasco limpo e esterilizada por calor úmido em autoclave vertical.

O meio RPMI foi preparado dissolvendo-se o todo o pó contido no frasco de RPMI 1640 (10,4 g) em aproximadamente 900 mL de água bidestilada. O sistema foi colocado em agitação magnética, o pH do meio foi ajustado a 4,00 com solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M e manteve-se a agitação por cinco minutos. Em seguida, o pH foi neutralizado a 7,20 com adição de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água bidestilada. O meio foi submetido à filtração esterilizante em membrana de éster de celulose 0,22 µm (GSW04700, Millipore, EUA) e acondicionado em frasco limpo estéril.

O meio RPMI completo foi preparado misturando-se o meio RPMI com 20% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ mL de penicilina G potássica, 1% de solução de piruvato de sódio 100 mM, 1% de solução de aminoácidos não essenciais 100x e 2,7% de solução de bicarbonato de sódio a 7,5%. O pH foi ajustado para 7,20. O meio foi submetido à filtração esterilizante em membrana de éster de celulose 0,22 µm (GSW04700, Millipore, EUA) e acondicionado em frasco limpo estéril.

O meio Grace base foi preparado dissolvendo-se todo o pó contido no frasco de meio *Grace's insect* (44,0 g) em aproximadamente 900 mL de água destilada. O pH foi ajustado a 6,50. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água bidestilada. Foi feita uma pré-filtração em funil com papel de filtro e, em seguida, a solução foi submetida à filtração esterilizante em membrana de éster de celulose 0,22 µm (GSW04700, Millipore, EUA) e envasada em frasco limpo estéril.

O meio Grace completo foi preparado misturando-se o meio "Grace's insect" com 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de L-glutamina e 100 U/ mL de penicilina G potássica). O pH foi ajustado para 6,50. O meio foi submetido à filtração esterilizante em membrana de éster de celulose 0,22 µm (GSW04700, Millipore, EUA) e envasado em frasco limpo estéril.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Desenvolvimento e validação de método analítico

O método de análise para a determinação da concentração da AmB por CLAE foi uma modificação do trabalho de Eldem e Arica-Cellat (2001). A proporção da fase móvel (FM), a fase estacionária, o comprimento de onda de detecção e o fluxo sofreram modificações. As condições cromatográficas adotadas no presente trabalho são descritas na Tabela 4:

**Tabela 4 - Condições cromatográficas do método analítico para doseamento de anfotericina B.**

<b>Fase móvel</b>	Edetato dissódico 20 mM: Acetonitrila (65:35) – pH 5
<b>Fluxo</b>	1,2 mL/ min
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Detecção</b>	405 nm
<b>Temperatura</b>	25° C
<b>Equipamento</b>	Módulo de bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA); injetor automático Waters 717 Plus (Milford, EUA) e detector UV-Vis Waters TM 486 (Milford, EUA).
<b>Coluna</b>	Fase reversa C8 (ACE <sup>®</sup> HPLC Columns, EUA). 25 cm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro interno; tamanho de partícula de 5 µm.

#### **4.2.1.1 Preparo da fase móvel**

A solução de edetato dissódico 20 mM foi preparada dissolvendo-se 7,45 g de edetato dissódico dihidratado em aproximadamente 900 mL de água recentemente destilada. O pH da solução foi ajustado para 5,00 com solução de NaOH 1 M. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico com capacidade de 1 L e adicionou-se água recentemente destilada em quantidade suficiente para completar o volume do balão.

A FM foi preparada misturando-se solução de edetato dissódico 20 mM recentemente preparada e acetonitrila grau CLAE na proporção indicada de 65 partes para 35 partes, respectivamente. A FM preparada foi filtrada em membrana de politetrafluorietileno (PTFE) de 0,45 µm (HVLPO4700, Millipore, EUA) e degaseificada durante vinte minutos em banho de ultrassom (USC 1400, Unique, Brasil).

#### **4.2.1.2 Linearidade da curva analítica**

A linearidade da curva analítica corresponde à capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Em uma balança analítica, pesou-se 25,0 mg de AmB em um béquer. O pó do fármaco foi dissolvido em 10 mL de uma mistura contendo metanol: DMSO 75:25. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL com auxílio de metanol. A partir desta foram preparadas soluções-padrão em FM com as seguintes concentrações: 10; 5,0; 2,0; 1,0 e 0,5 µg/ mL. Após estabilização da coluna, nas



condições do ensaio, as soluções-padrão filtradas (Millex HV - 0,45 µm de diâmetro de poro, Millipore, EUA) foram injetadas no cromatógrafo.

A curva analítica foi realizada em quintuplicata. A partir das médias das áreas absolutas dos picos correspondentes a cada concentração do padrão, construíram-se cinco curvas analíticas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. As inclinações e os interceptos com o eixo Y, de cada curva, foram determinados e estatisticamente comparados. Uma vez que esses valores não foram considerados significativamente diferentes, construiu-se a equação da reta média para a representação gráfica da curva analítica. A linearidade da curva analítica foi avaliada pela variância em torno da inclinação da linha de regressão, por meio do coeficiente de correlação (r). A faixa de variação corresponde ao intervalo entre a concentração inferior e a superior da substância analisada que atenda aos requisitos de linearidade. Neste caso, o intervalo linear de concentração foi de 0,5 a 10 µg/ mL.

#### **4.2.1.3 Seletividade do método analítico**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Para a avaliação da seletividade foram comparados os perfis dos cromatogramas das NE contendo ou não AmB para verificar se a formulação contém excipientes e/ ou impurezas que interferem no pico de absorção referente ao fármaco, ou seja, verificou-se a presença de picos de absorção interferentes no comprimento de onda de 405 nm.

Para o preparo das amostras, 1,0 mL da NE carregada com AmB 0,2% p/v foi medido em pipeta volumétrica e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de DMSO e o volume foi completado com THF. Em seguida, 1,0 mL dessa solução foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume

com FM (concentração final teórica de 4,0 µg/ mL de AmB). A solução foi homogeneizada e filtrada através de unidades filtrantes descartáveis compostas de membrana *Durapore* polivinilideno (PVDF) não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, Millipore, EUA). O mesmo procedimento de diluição foi feito para a NE branco. As soluções finais foram injetadas no cromatógrafo para avaliação da seletividade.

#### **4.2.1.4 Precisão do método analítico**

A precisão é avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão do método foi avaliada quanto à repetibilidade e à precisão intermediária.

Na repetibilidade (precisão intra-corrída) avalia-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada; ou mínimo de seis determinações a cem por cento da concentração do teste (BRASIL, 2003).

Na precisão intermediária (precisão inter-corrída) avalia-se a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

Para a avaliação da repetibilidade do método, foram preparadas soluções com as concentrações de 0,5 µg/ mL (baixa), 5,0 µg/ mL (média) e 10,0 µg/ mL (alta) e os coeficientes de variação (CV) das áreas correspondentes aos picos foram analisados. Para a avaliação da precisão intermediária, este mesmo procedimento foi realizado em dois dias diferentes.

A precisão, expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou CV, foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$DPR = \left( \frac{DP}{ASC \text{ média determinada}} \right) \times 100$$

onde DP é o desvio padrão. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

#### **4.2.1.5 Exatidão do método analítico**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro. A exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada (BRASIL, 2003).

Foram preparadas soluções padrões de AmB para obtenção das ASC dos picos nos cromatogramas que correspondem à concentração teórica de cem por cento. Para o preparo das soluções, pesou-se 25,0 mg de AmB em um béquer O pó do fármaco foi dissolvido em 10 mL de uma mistura contendo metanol: DMSO 75:25. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL com auxílio de metanol e 1,0 mL dessa solução-estoque foi transferido, com auxílio de pipeta volumétrica, para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com metanol. A partir dessa solução resultante, 1,0; 2,0 e 4,0 mL foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com FM, obtendo-se, respectivamente, as soluções de concentração 2,0; 4,0 e 8,0 µg/ mL. Esse procedimento foi feito em triplicata, obtendo-se três soluções de cada uma das três concentrações. Após estabilização da coluna, nas condições do ensaio, as soluções-

padrão filtradas (Millex HV - 0,45 µm de diâmetro de poro, Millipore, EUA) foram injetadas no cromatógrafo.

Soluções de mesmas concentrações (baixa, média e alta) de AmB foram preparadas a partir da NE. Para isso 1,0 mL da NE carregada com AmB 0,2% p/v foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e 5 mL de DMSO foram adicionados. Após completa solubilização, completou-se o volume com THF. Foram transferidos 0,5; 1,0 e 2,0 mL dessa solução para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com FM, obtendo-se, respectivamente, soluções de concentração 2,0; 4,0 e 8,0 µg/ mL. Esse procedimento foi feito em triplicata, obtendo-se três soluções de cada uma das três concentrações. Após estabilização da coluna, nas condições do ensaio, as soluções-padrão filtradas (Millex HV - 0,45 µm de diâmetro de poro, Millipore, EUA) foram injetadas no cromatógrafo.

A exatidão do método analítico foi determinada avaliando-se a capacidade de recuperação da AmB a partir das NE através da equação especificada pela RE 899 (BRASIL, 2003):

$$Exatidão = \left( \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ média\ teórica} \right) \times 100$$

A concentração média experimental foi obtida pela ASC dos picos de absorção de AmB na NE. A concentração média teórica foi obtida pela ASC dos picos de absorção de AmB das soluções-padrão.

#### **4.2.1.6 Limite de detecção e limite de quantificação**

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do

analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

A estimativa do LD e do LQ foram feitas com base nas equações:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

em que: DP<sub>a</sub> é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

A confirmação do LD foi feita injetando-se soluções de AmB, em triplicata, na concentração obtida pelo cálculo através da fórmula acima.

#### **4.2.1.7 Teste de degradação forçada da AmB**

Para saber se o método analítico desenvolvido é capaz de diferenciar o pico de absorção da AmB de seus produtos de degradação, foi feito um teste desafio na qual o fármaco foi intencionalmente degradado e dosado por CLAE.

Para a execução do teste, pesou-se 10,0 mg de AmB em um béquer e adicionou-se 1,0 mL de solução de NaOH 0,1 M para solubilizá-la. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água destilada. A partir dessa solução-estoque, foram preparadas duas outras soluções, uma ácida e outra alcalina, transferindo-se 1,0 mL para dois balões volumétricos de 10 mL. Para preparar a solução alcalina, adicionou-se 2,0 mL de solução de NaOH 0,1 M e, para a solução ácida, adicionou-se 5,0 mL de solução de HCl 0,1 M. O volume de ambas as soluções foi completado com água destilada. As duas soluções foram transferidas para frascos de vidro transparente e mantidas em banho-maria com água mantida à temperatura de 80° C. Assim, a AmB estava exposta a condições de pH e temperatura extremos e luz, com intuito de forçar sua degradação. Alíquotas de 1,0 mL das soluções foram retiradas (antes da exposição ao calor e com uma hora de aquecimento), transferidas para

balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com FM. Uma solução padrão de AmB também foi injetada no cromatógrafo para determinar o tempo de retenção relativo ao fármaco. Todas as soluções foram filtradas (Millex HV - 0,45 µm de diâmetro de poro, Millipore, EUA) e injetadas no cromatógrafo. Os cromatogramas obtidos foram analisados quanto à presença de picos novos e/ ou alterações na área ou perfil do pico de AmB original.

#### **4.2.2 Preparação das NE**

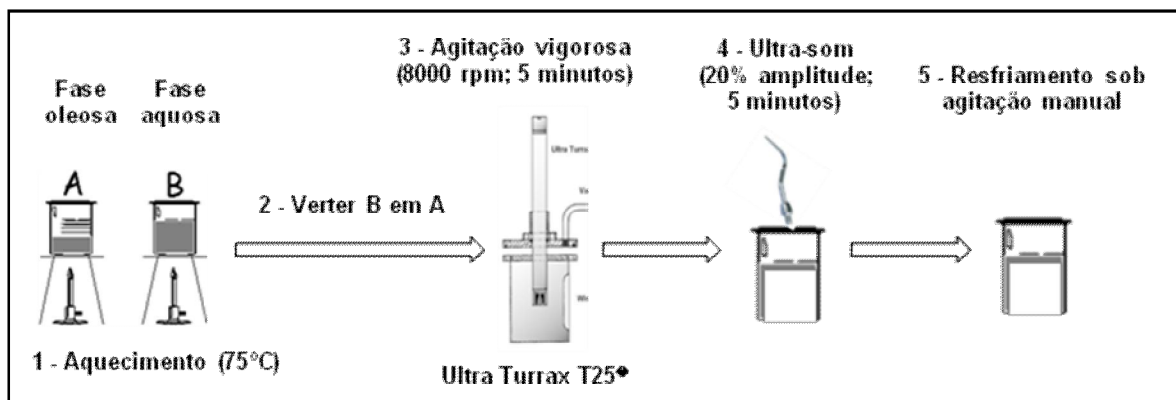
A composição das diferentes NE preparadas está descrita na Tabela 5. As diversas NE variam quanto ao teor de AmB e/ ou STE. A incorporação da AmB no sistema foi baseada no método do perfil pH-solubilidade (BRIME *et al.*, 2002; LANCE *et al.*, 1995) com modificações.

**Tabela 5 - Composição da nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B (AmB).**

Fase	Componentes	Proporção (% p/v)				
		NE 1	NE 2	NE 3	NE 4	NE 5
Fase Oleosa	STE	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2
	TCM	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	Polissorbato 80 (Tween 80 <sup>®</sup> )	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	Colesterol	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	α-tocoferol	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Fase Aquosa	Glicerol	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
	Água destilada q.s.p.	100	100	100	100	100
Fármaco	AmB	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
	Solução de NaOH 0,1 M	-	-	5,0	-	-
	Solução de NaOH 0,2 M	5,0	5,0	-	5,0	5,0

As NE branco foram preparadas pelo método da homogeneização a quente. A FO foi pesada e aquecida à 75° C. Paralelamente, a FA também foi aquecida à mesma temperatura. Mantendo-se a temperatura em 75° C, a FA foi lentamente vertida sobre a

FO sob uma agitação de 8.000 rotações por minuto (rpm) no agitador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Alemanha) durante cinco minutos. Em seguida, a emulsão foi homogeneizada durante cinco minutos utilizando ultrassom com sonda de alta potência, utilizando 20% de amplitude (Ultra-cell 750W; Sonics Materials Inc., EUA). Após este tempo, a NE formada foi resfriada em banho de água com agitação manual (**Figura 19**).



**Figura 19** - Representação esquemática da preparação das nanoemulsões branco pelo método de homogeneização a quente utilizando ultrassom com sonda de alta potência.

Na etapa de incorporação do fármaco, adicionou-se quantidade previamente determinada de solução de NaOH 0,1 ou 0,2 M. A quantidade de solução de NaOH adicionada foi suficiente para solubilizar a AmB. Em seguida, a NE alcalina foi resfriada em banho de gelo. Quando a mesma atingiu 10 °C, foi adicionada sobre o pó de AmB presente em um béquer, o qual foi mantido em banho de gelo sob agitação magnética. Após observar-se completa solubilização do fármaco no sistema, mantendo-se o resfriamento, adicionou-se quantidade previamente padronizada de solução de HCl 0,1 ou 0,2 M, para que a NE tenha pH dentro ou muito próximo ao da faixa desejada (7,0 a 7,5). Após cerca de trinta segundos, retirou-se o sistema de resfriamento e esperou-se que a NE atingisse a temperatura ambiente, quando, então, foi feito o ajuste fino de pH com auxílio de pHmetro. O pH final foi ajustado entre 7,0 e 7,5, se necessário, com solução de NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 M. Para finalizar, o volume da NE foi completado com água destilada q.s.p. 100%.

Foram também preparadas NE branco (sem fármaco). O pH também foi ajustado a valores entre 7,0 e 7,5 e completou-se o volume final com água destilada.

### **4.2.3 Caracterização das NE**

#### **4.2.3.1 Determinação do pH**

O pH da dispersão das NE foi aferido utilizando um medidor de pH (Digimed DM 20, Ribeirão Preto, Brasil). Em virtude da baixa viscosidade do sistema não foram realizadas diluições para a determinação e o ajuste do pH.

#### **4.2.3.2 Diâmetro dos glóbulos**

O diâmetro médio das NE foi determinado por espectroscopia de correlação de ftons (PCS) utilizando um Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Inglaterra) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25° C. As dispersões de NE foram diluídas em solução aquosa de cloreto de sódio 1 mM previamente filtrada através de membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (HAWPO4700, Millipore, EUA), até a contagem de 50 a 300 Kcps (1000 contagens por segundo). Os resultados foram fornecidos como diâmetro efetivo (diâmetro médio avaliado pela intensidade). O valor máximo aceitável para o IP foi 0,25. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, sendo cada replicata correspondente à média de dez medidas.

#### **4.2.3.3 Potencial zeta**

O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das NE. As medidas de potencial zeta foram realizadas utilizando um Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Inglaterra) à temperatura de



25° C. As dispersões das NE foram diluídas em solução aquosa de cloreto de sódio 1 mM previamente filtrada através de membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (HAWPO4700, Millipore, EUA), até a contagem de 100 a 1000 Kcps. Todas as medidas foram realizadas em duplicata, sendo cada replicata o resultado médio de três medidas.

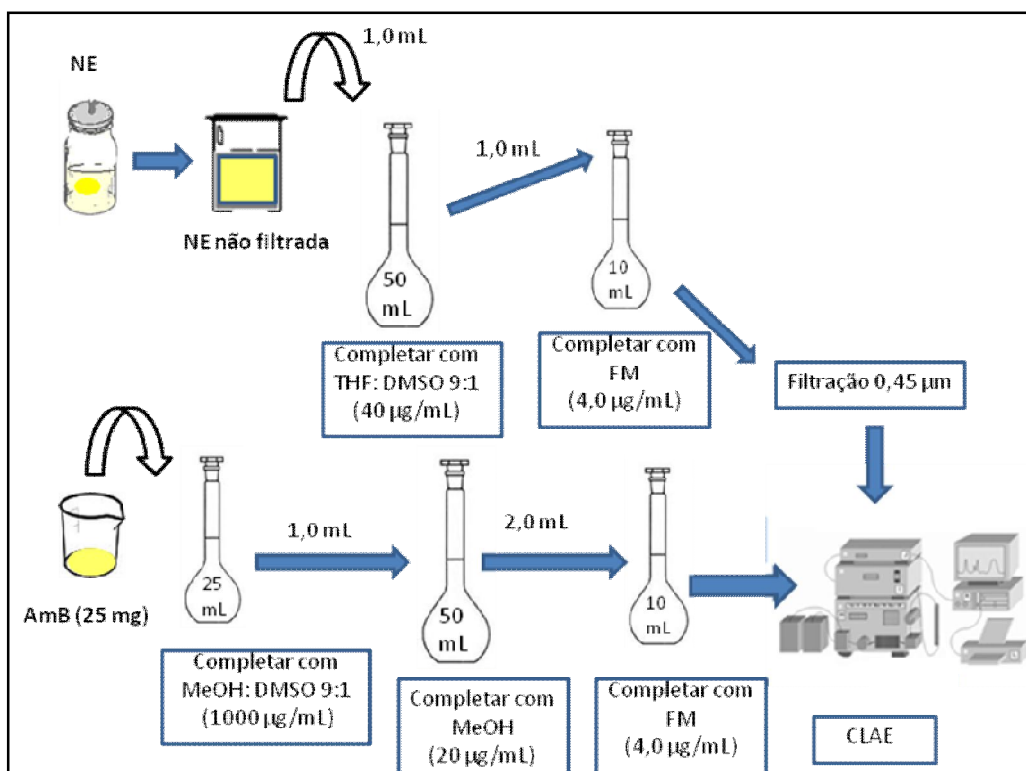
#### **4.2.3.4 Teor da AmB**

O teor de AmB nas NE foi avaliado pelo método de CLAE desenvolvido e validado. A concentração de AmB nas NE foi obtida pela comparação entre a ASC dos picos de absorção de AmB, obtidos das soluções preparadas a partir das NE, e a ASC dos picos de absorção de AmB, obtido a partir das soluções-padrão do fármaco na mesma concentração teórica. O procedimento para análise do teor, feito em duplicata, está descrito a seguir e ilustrado na Figura 20.

Para o preparo das soluções-padrão, pesou-se 25,0 mg de AmB em um béquer. O pó do fármaco foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 2,5 mL de DMSO e o volume foi completado com metanol. Transferiu-se 1,0 mL da solução-estoque para um balão volumétrico de 50 mL e o completou-se o volume com metanol. A partir dessa solução, transferiu-se 2,0 mL para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com FM, obtendo-se a solução de injeção de concentração 4,0 µg/ mL. Soluções de mesma concentração teórica de AmB foram preparadas a partir das NE. Após estabilização da coluna, nas condições do ensaio, as soluções preparadas foram filtradas (Millex HV - 0,45 µm de diâmetro de poro, JBR610222, Millipore, EUA) e injetadas no cromatógrafo.

O teor de AmB foi calculado segunda a fórmula:

$$\text{Teor (\%)} = \left( \frac{\text{ASC do pico de AmB a partir da NE}}{\text{ASC do pico de AmB a partir da solução padrão}} \right) \times 100$$



Esquema considerando NE carregada com AmB na concentração 0,2% p/v

**Figura 20** - Representação esquemática da metodologia para determinação do teor de anfotericina B (AmB) nas nanoemulsões (NE) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

#### **4.2.3.5 Teor de Encapsulação da AmB**

O TE da AmB nas NE foi avaliado pelo método de CLAE desenvolvido e validado. O TE foi obtido pela relação da ASC dos picos de absorção de AmB obtidos de soluções preparadas a partir das NE filtradas, em membranas Durapore PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA), e da ASC dos picos de absorção de AmB obtidos de soluções preparadas a partir das NE não filtradas. A AmB insolúvel, que não foi incorporada apropriadamente ao sistema, é removida nesse procedimento. A influência da concentração do fármaco na fase aquosa externa das formulações foi considerada insignificante devido à solubilidade

aquosa da AmB ser muito baixa (MORENO *et al.*, 2001; MULLER *et al.*, 2004). O TE foi calculado pela fórmula:

$$TE (\%) = \left( \frac{ASC \text{ do pico de AmB a partir da NE filtrada}}{ASC \text{ do pico de AmB a partir da NE não filtrada}} \right) \times 100$$

#### **4.2.3.6 Microscopia Ótica**

Com objetivo de demonstrar a importância da estratégia pH-solubilidade para incorporação da AmB nas NE, duas formulações foram preparadas e, na etapa de incorporação do fármaco, apenas uma foi alcalinizada previamente à adição do fármaco. A aparência final das formulações foi registrada por fotografia.

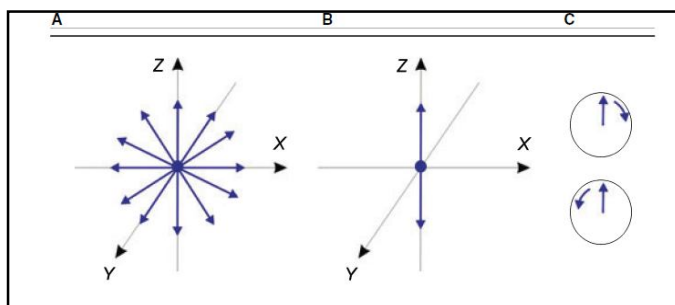
As NE carregadas com AmB (com e sem adição de NaOH para incorporação do fármaco) e uma NE branco foram caracterizadas por microscopia ótica de luz polarizada. Para isso, uma gota de cada formulação foi colocada sobre uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula. As NE foram observadas sob microscópio ótico de luz polarizada (LEICA DML Microscópio; Suplementos DMLP e DMLM; Leica Microsistemas, Alemanha) equipado com um software apropriado (LEICA IM 1000 Software, Alemanha) e uma câmera digital JVC (Modelo TK-C1480U, Tailândia).

#### **4.2.3.7 Dicroísmo Circular**

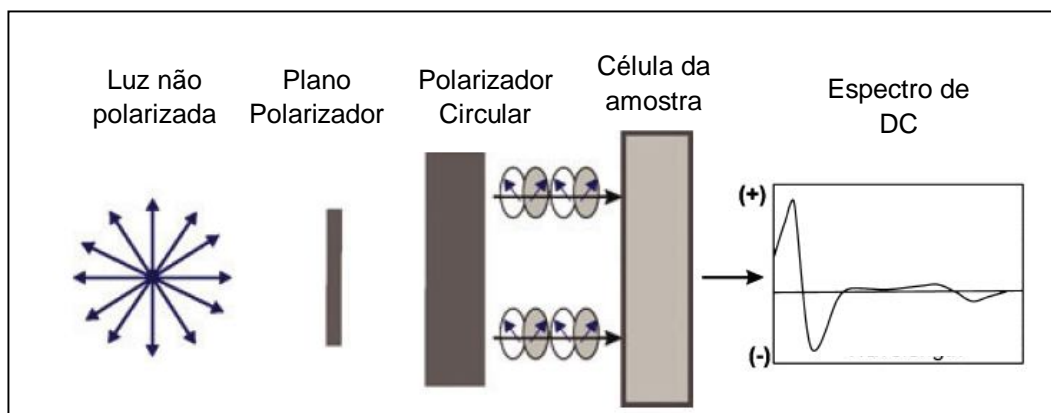
A AmB se organiza de várias formas ao nível molecular; monomérica, dimérica e multimétrica; e essas formas podem coexistir num mesmo sistema. (EGITO *et al.*, 2002; HARGREAVES *et al.*, 2006; JAIN & KUMAR, 2010). É relatado que a diferente proporção desses estados de agregação afeta a toxicidade e a seletividade do fármaco,

sendo que a forma livre dimérica é a maior causa de toxicidade exibida pela formulação AmB-D. Consequentemente, o estudo estrutural e a quantificação das espécies de AmB constituem etapas essenciais para o entendimento do mecanismo molecular desse agente leishmanicida em relação à seletividade e citotoxicidade. As duas técnicas relatadas na literatura para identificar essas formas são espectroscopia UV-Vis e espectro de DC (EGITO *et al.*, 2002; JAIN & KUMAR, 2010).

O dicroísmo é definido como a propriedade possuída por alguns materiais de absorver a luz em diferentes extensões dependendo da forma de polarização do feixe de luz incidente (**Figura 21**). Quando a absorção da luz circularmente polarizada em uma direção (sentido horário) é diferente da absorção da mesma na direção oposta (sentido anti-horário), diz-se que o material exibe DC (**Figura 22**) (RANJBAR & GILL, 2009).



**Figura 21** - Componentes do campo elétrico da luz não polarizada (A), linearmente polarizada ou plano-polarizada (B) e circularmente polarizada (C). Adaptado de RANJBAR & GILL, 2009.



**Figura 22** - Esquema de Dicroísmo Circular no qual a diferença de absorvância é medida. Adaptado de RANJBAR & GILL, 2009.

As formulações analisadas por DC, acompanhado de espectros UV-Vis, foram as NE com e sem STE (brancas e carregadas com AmB 0,2% p/v), Anforicin B<sup>®</sup> e uma solução aquosa de AmB.

A solução aquosa de AmB foi obtida dissolvendo-se 5,0 mg de AmB em DMSO em balão volumétrico de 10 mL e 100 µL dessa solução foram transferidos para outro balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com água destilada. As NE e o Anforicin B<sup>®</sup> foram diluídos em água destilada até a concentração final de 5,0 µg/ mL.

Foram feitas análises de DC da água destilada para descontar os valores de absorvância e sinal de DC do solvente em relação aos espectros da AmB livre e do Anforicin B<sup>®</sup>. A varredura das NE branco também objetivou eliminar a contribuição dos componentes da formulação nos espectros das NE carregadas com AmB.

As soluções foram colocadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Os espectros de DC foram feitos no equipamento Espectropolarímetro Chirascan<sup>™</sup> à temperatura de 25° C. Foram feitas cinco varreduras na região compreendida entre 300 e 450 nm, em atmosfera de nitrogênio, para obtenção do espectro de cada preparação de AmB.

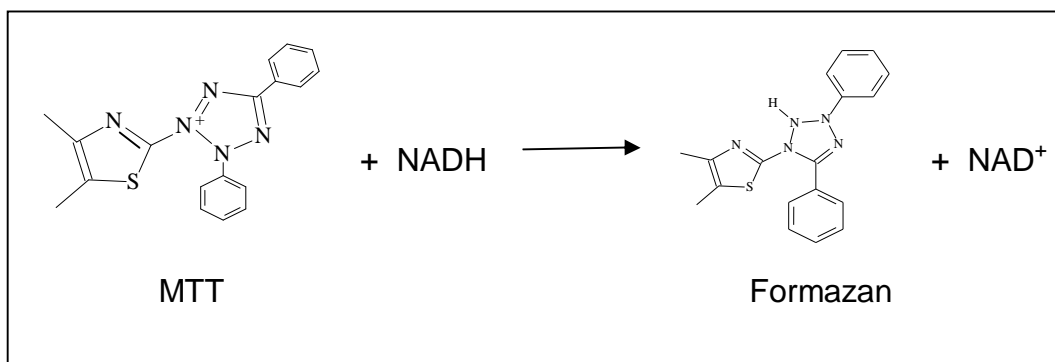
#### **4.2.4 Estudo de estabilidade**

Foram conduzidos estudos de estabilidade das NE carregadas com AmB (0,2% p/v) na ausência e na presença de STE (0,2% p/v) a fim de avaliar o impacto dessa amina lipofílica nas propriedades físico-químicas do sistema. Após o preparo, as formulações foram acondicionadas em frascos de penicilina e armazenadas à 4° C ou à temperatura ambiente. Em intervalos de tempo regulares, uma amostra foi removida para avaliação das características da NE (tamanho, IP, potencial zeta, TE e teor total de fármaco).

#### 4.2.5 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Os ensaios de viabilidade metabólica foram executados utilizando-se o ensaio de MTT. Esse ensaio não mede a sobrevivência celular de forma direta, mas sim a continuidade da atividade metabólica das células, a qual é atribuída à viabilidade celular. Nesse caso, a sobrevivência é definida como a retenção da habilidade metabólica de uma população celular após a retirada de uma influência tóxica (FRESHNEY, 2005). O ensaio de MTT foi feito em macrófagos murinos da linhagem J774 a fim de se determinar a citotoxicidade de diferentes formulações.

O MTT é um sal de coloração amarelada que, na presença de células metabolicamente ativas, é capaz de captar elétrons, em uma reação de oxi-redução, formando um precipitado insolúvel de coloração roxa, o Formazan (**Figura 23**). A determinação da absorvância a 570 nm desse produto é uma medida da viabilidade metabólica celular, sendo as duas grandezas diretamente proporcionais (MORGAN, 1998).



**Figura 23** – Reação de oxi-redução do MTT em células metabolicamente ativas.

Os macrófagos da linhagem J774 (ATCC / TIB-67<sup>TM</sup>) foram descongelados e cultivados em monocamadas, em garrafas de cultura, mantidos em meio de cultura RPMI completo. As garrafas foram alocadas em estufa com atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 37° C (5% CO<sub>2</sub> – NUAIRE US Autoflow) (CHÉRON *et al.*, 2003; ORDÓNËZ -GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

Para os experimentos, as células foram desprendidas da superfície da garrafa,

centrifugadas (centrífuga Forma Scientific, Inc.) a 210 G (1100 rpm) e 5° C por dez minutos e, então, ressuspensas em meio de cultura. Uma alíquota da suspensão de células foi apropriadamente diluída em solução de Azul de Tripán para contagem em Câmara de Neubauer. As células J774 foram colocadas em microplacas de 96 poços na densidade de  $5 \times 10^4$  macrófagos por poço (CHÉRON *et al.*, 2003; ORDÓNÉZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2007) presentes em 90  $\mu$ L de meio. As microplacas foram deixadas em estufa (37° C; 5% de CO<sub>2</sub>) por trinta minutos para os macrófagos aderirem ao fundo dos poços quando, então, as formulações foram adicionadas. Foram incluídos poços controle contendo células não submetidas a tratamento e poços contendo apenas meio de cultura. As formulações foram diluídas em PBS pH 7,20 nas seguintes concentrações: 10,00; 5,00; 2,50; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0,08; 0,04; 0,02  $\mu$ g/ mL. Cada concentração das formulações foi testada em duplicata e adicionada em volume fixo de 10  $\mu$ L, totalizando o volume final de 100  $\mu$ L por poço. Adicionou-se 10  $\mu$ L de PBS pH 7,20 nos poços controle. As NE branco foram testadas nas mesmas diluições que suas respectivas formulações contendo fármaco. Considerando que as NE sem STE, carregadas ou não com AmB, não apresentaram citotoxicidade nas concentrações previamente avaliadas, testou-se também concentrações maiores (40 a 200  $\mu$ g/ mL).

Após adição das formulações, as microplacas foram mantidas em estufa (37° C; 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 horas. Decorrido esse tempo, retirou-se o meio de cultura dos poços e adicionou-se 100  $\mu$ L de solução de MTT em PBS 0,5 mg/ mL. As placas foram mantidas novamente em estufa por quatro horas (GIUDICE *et al.*, 2007; PASSERO *et al.*, 2007), quando então adicionou-se 100  $\mu$ L de solução de laurilsulfato de sódio a 10% p/v em HCl 0,1 M. Essa solução solubiliza o composto azul de formazan formado (PASSERO *et al.*, 2007). Após 16 horas de incubação em estufa (37° C; 5% de CO<sub>2</sub>), fez-se a leitura da absorvância a 570 nm em leitor de microplaca (Molecular Devices). Os valores de absorvância foram corrigidos, subtraindo-se o valor da absorvância dos poços sem células (contendo apenas meio). Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular em relação ao controle (células não tratadas).

As concentrações que causam efeito citotóxico em 50% da população celular (CC<sub>50</sub>), de cada formulação, foram determinadas. Para isso foram construídas curvas de

viabilidade celular em função do logaritmo das concentrações testadas e os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5 Demo. Os valores de  $CC_{50}$  foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de, no mínimo, três experimentos independentes.

#### **4.2.6 Ensaio de eficácia *in vitro***

Ensaio de contagem direta após coloração têm sido empregados para avaliação da atividade de fármacos contra amastigotas intracelulares em macrófagos experimentalmente infectados. Estes são corados e a atividade do fármaco é avaliada microscopicamente pela determinação da percentagem de células infectadas e número de amastigotas por célula através da observação de cinquenta a trezentos macrófagos. Determina-se a concentração inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) pela relação do número médio de amastigotas por macrófago (FUMAROLA *et al.*, 2004).

Os macrófagos da linhagem J774 (ATCC / TIB-67<sup>TM</sup>) foram cultivados em garrafas de cultura mantidos em meio de cultura RPMI completo. As garrafas de cultura foram alocadas em estufa com atmosfera úmida de  $CO_2$  a 37° C (5%  $CO_2$  – NUAIRE US Autoflow) (CHÉRON *et al.*, 2003; ORDÓNÉZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/ BR/ 1967/ PH-8) foram cultivadas em meio Grace completo e mantidas em estufa (Lab-Line Instruments, Inc.) a 25 °C. Para os ensaios, utilizou-se promastigotas em fase estacionária de crescimento e com, no máximo, dez passagens em meio de cultura.

Para os experimentos, os macrófagos foram desprendidos da superfície da garrafa, centrifugados (centrífuga Forma Scientific, Inc.) a 210 G (1100 rpm) e 5° C por dez minutos e ressuspensos em meio de cultura. Uma alíquota da suspensão de células foi apropriadamente diluída em solução de Azul de Tripán para contagem em Câmara de Neubauer. Os macrófagos foram colocados em placas de 24 poços, contendo



lamínulas circulares no fundo, na densidade de  $1 \times 10^6$  células diluídas em 1 mL de meio de cultura por poço. As placas foram mantidas em estufa ( $37^\circ \text{C}$ ; 5% de  $\text{CO}_2$ ) para os macrófagos aderirem às lamínulas por uma hora e trinta minutos.

Durante esse tempo preparou-se a suspensão de *L. (L.) amazonensis* para infecção. As promastigotas, presentes em meio Grace completo, foram centrifugadas (centrífuga Forma Scientific Inc.) a 1540 G (3000 rpm) e  $5^\circ \text{C}$  por 10 minutos, lavadas com PBS e, então novamente centrifugadas. Foram feitas mais duas lavagens com PBS. Uma alíquota da suspensão de parasitas foi adequadamente diluída em formalina 4% e fez-se a contagem das promastigotas em Câmara de Neubauer. Após contagem, os parasitas foram diluídos em meio RPMI completo, sendo o volume ajustado de forma que  $1 \times 10^7$  promastigotas estivessem presentes em 500  $\mu\text{L}$  de meio .

Na etapa de infecção, o meio presente nos poços foi substituído por 500  $\mu\text{L}$  de meio novo e os macrófagos foram infectados pela adição de 500  $\mu\text{L}$  da suspensão de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em meio RPMI completo. A proporção de dez promastigotas para cada macrófago encontra-se descrita na literatura (ESCOBAR *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2007; MANANDHAR *et al.*, 2008; ORDÓNĒZ -GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). As placas foram mantidas em estufa ( $37^\circ \text{C}$ ; 5% de  $\text{CO}_2$ ) por três horas, quando, então, as promastigotas não internalizadas pelos macrófagos foram eliminadas por lavagem com PBS (duas lavagens) e o meio de cultura foi substituído por meio novo. A percentagem média de infecção de macrófagos após decorrido as 3 horas foi de ( $59 \pm 13$ )%. Duas lamínulas referentes a dois poços foram retiradas nessa etapa para controle de infecção. As placas foram novamente colocadas em estufa ( $37^\circ \text{C}$ ; 5% de  $\text{CO}_2$ ) e mantidas de um dia para o outro.

No dia seguinte, duas lamínulas referentes a dois poços foram retiradas e nos demais poços iniciou-se o tratamento. O meio neles presente foi retirado e substituído por 900  $\mu\text{L}$  de meio novo. Cada concentração das formulações testadas foi adicionada aos poços em volume fixo de 100  $\mu\text{L}$  e testada em duplicata. As diluições das formulações foram feitas em PBS pH 7,20. Seis concentrações foram testadas para a NE carregada com AmB 0,2% p/v com STE 0,1% p/v e para a formulação comercial (0,02; 0,04; 0,08;

0,16; 0,31 e 0,63 µg/ mL). A NE carregada com AmB 0,2% p/v sem STE foi testada também na concentração 1,25 µg/ mL, além das seis concentrações anteriores. No caso dos poços controle (sem tratamento) adicionou-se 100 µL de PBS pH 7,20. As placas foram mantidas em estufa (37° C; 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 horas quando, então, o tratamento foi finalizado. Todas as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS, retiradas cuidadosamente dos poços, fixadas com metanol, coradas com Giemsa (kit de coloração rápida Panótico) e montadas em lâminas de microscópio.

Em microscópio de imersão (100x), contou-se o número de macrófagos observados (de cinquenta a duzentos), a quantidade dentre essas células que estavam infectadas e o número de amastigotas totais presentes em cada lamínula referente a cada poço.

Calculou-se a percentagem de inibição (PI), para cada concentração de tratamento:

$$PI (\%) = 100 - \left( \frac{\frac{N^{\circ} \text{ de amastigotas totais}}{N^{\circ} \text{ de macrófagos totais}} \text{ grupo tratamento}}{\frac{N^{\circ} \text{ de amastigotas totais}}{N^{\circ} \text{ de macrófagos totais}} \text{ grupo controle}} \times 100 \right)$$

Foram construídas curvas de PI versus logaritmo da concentração testada e os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5 Demo. O resultado foi expresso em Cl<sub>50</sub> ± desvio padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Os valores de Cl<sub>50</sub> das NE carregadas com AmB (0,2% p/v), na ausência ou na presença de STE (0,1% p/v), foram comparados ao da formulação comercial Anforicin B<sup>®</sup>.

#### **4.2.7 Análise Estatística**

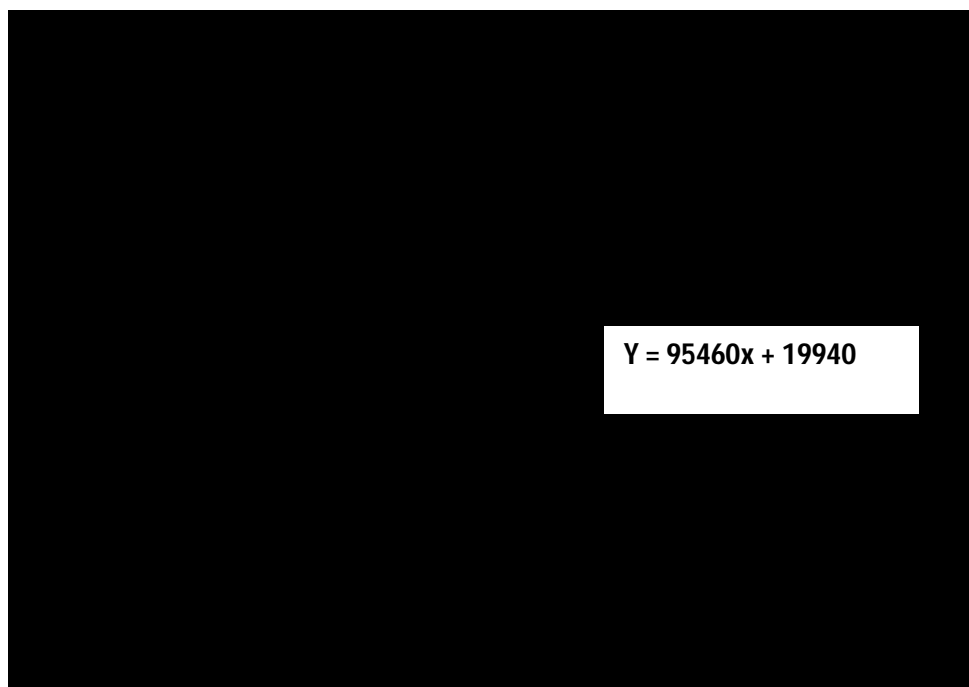
As análises estatísticas foram feitas por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

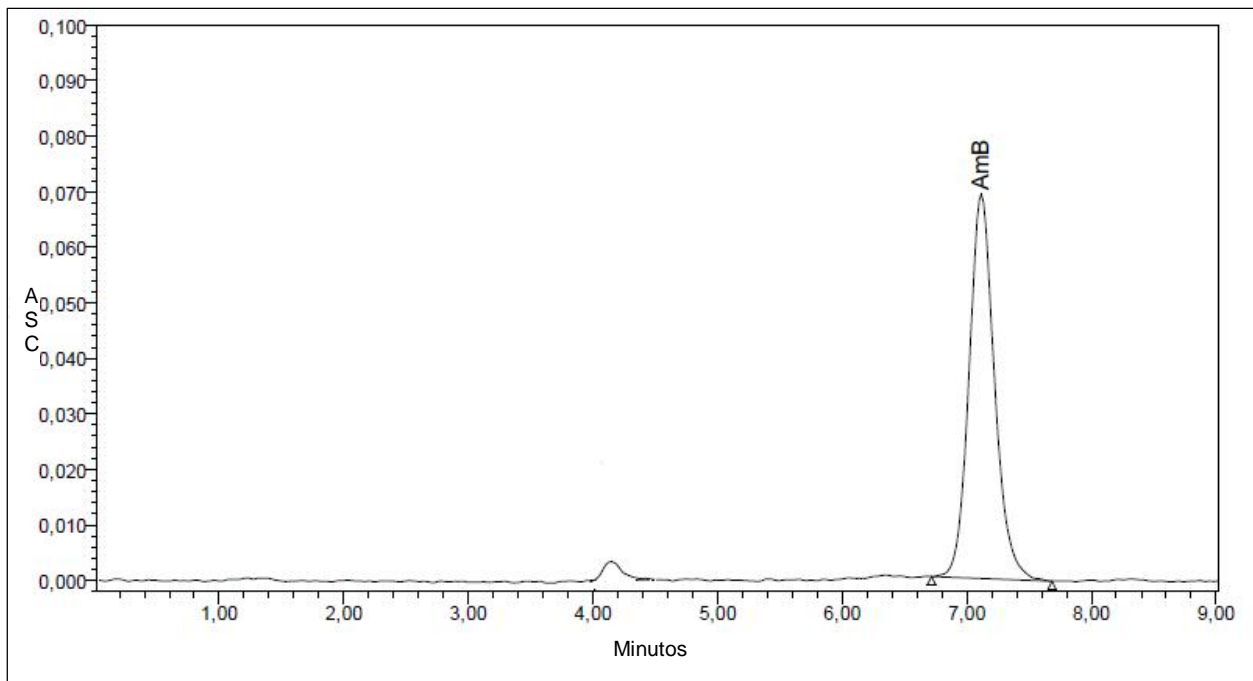
### 5.1 Desenvolvimento e validação de método analítico

#### 5.1.1 Linearidade da curva analítica

A curva construída para a avaliação da linearidade do método analítico apresentou coeficiente de correlação linear satisfatório ( $r = 0,9961$ ) após análise de regressão linear dos cinco pontos analisados (**Figura 24**). Assim, o método analítico mostrou linearidade dentro da faixa de trabalho proposta. A equação da reta obtida da análise de regressão linear foi:  $Y = 19940 + 95460x$ , e o tempo de retenção médio encontrado foi de 7,15 minutos (**Figura 25**).



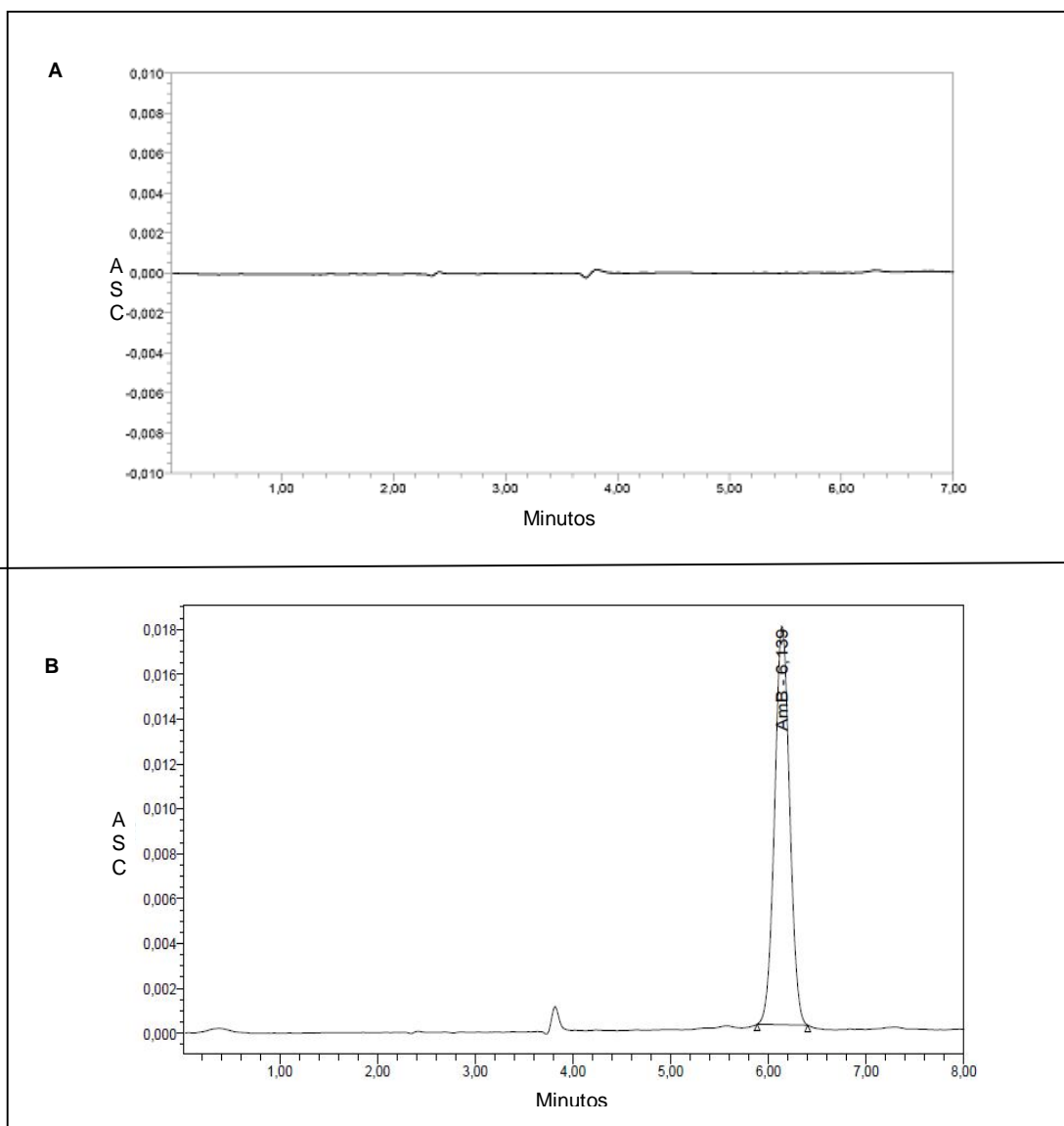
**Figura 24** - Curva analítica média para avaliação da linearidade do método analítico de quantificação da anfotericina B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.



**Figura 25 – Cromatograma com o perfil do pico de absorção da anfotericina B (AmB).**

### **5.1.2 Seletividade do método analítico**

Após a injeção da amostra de NE branco submetida às mesmas condições da NE carregada com fármaco, não se observa a presença de picos de absorção (**Figura 26A**) que possam interferir com o pico de absorção da AmB, observado no cromatograma da NE contendo o fármaco (**Figura 26B**). Dessa forma, pode-se dizer que o método é seletivo para a AmB.



**Figura 26 - Cromatogramas obtidos a partir da injeção das nanoemulsões branco (A) e nanoemulsões de anfotericina B (AmB) (B).**

### **5.1.3 Precisão do método analítico**

As Tabelas 6 e 7 mostram os valores médios das ASC para as concentrações de 0,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e seus respectivos DP determinados no mesmo dia e em dias diferentes. Como pode ser observado nas tabelas, o CV das amostras de cada concentração foi inferior a 5%, estando de acordo com o valor máximo aceitável especificado pela RE 899 (BRASIL, 2003).

**Tabela 6 - Resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade do método de quantificação da anfotericina B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.**

Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ASC (Média $\pm$ DP)	Fator de resposta (Média $\pm$ DP)	CV (%)
0,5	45960 $\pm$ 747	91920 $\pm$ 1494	1,6
5,0	477668 $\pm$ 17876	95534 $\pm$ 3575	3,7
10,0	942838 $\pm$ 10032	94284 $\pm$ 1003	1,1

**Tabela 7 - Resultados obtidos para a avaliação da precisão intermediária do método de quantificação da anfotericina B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.**

Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Dia	ASC (Média $\pm$ DP)	Fator de resposta (Média $\pm$ DP)	CV (%)
0,5	1	45960 $\pm$ 747	91920 $\pm$ 1494	1,6
	2	42875 $\pm$ 1619	85750 $\pm$ 3238	3,8
5,0	1	477668 $\pm$ 17876	95534 $\pm$ 3575	3,7
	2	451649 $\pm$ 12348	90330 $\pm$ 2470	2,7
10	1	942838 $\pm$ 10032	94284 $\pm$ 1003	1,1
	2	914990 $\pm$ 34406	91499 $\pm$ 3441	3,8

#### **5.1.4 Exatidão do método analítico**

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos na avaliação da recuperação da AmB a partir de amostras de NE contendo AmB nas concentrações de 2,0, 4,0 e 8,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como pode ser observado, o valor médio da recuperação da AmB foi superior a 100%, sendo considerada satisfatória para o método utilizado. Valores acima de 100% se justificam devido a erros inerentes ao método, como devido às vidrarias volumétricas, pesagem, diluições e erros instrumentais.

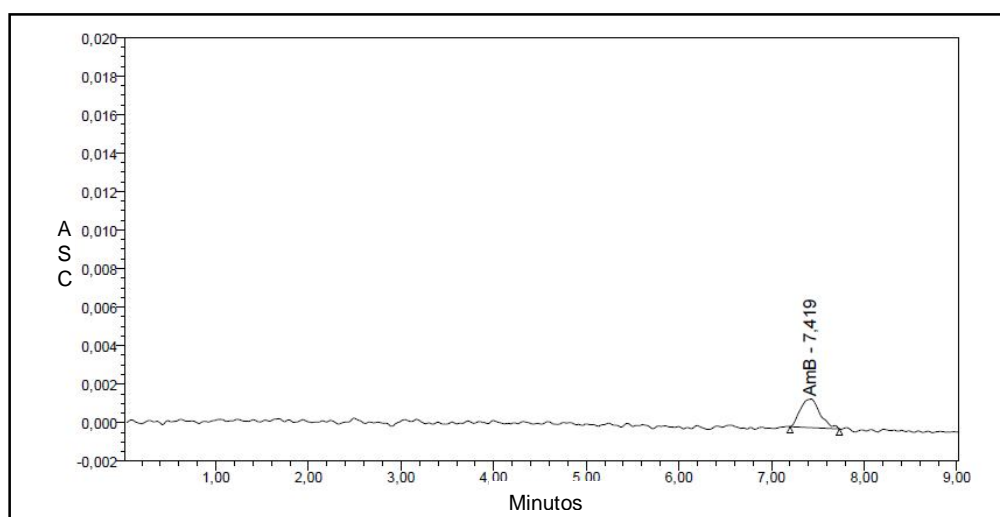
**Tabela 8 - Resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método de quantificação da anfotericina B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.**

Concentração teórica ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentração real (Média $\pm$ DP) ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Recuperação (%)
2,0	2,2 $\pm$ 0,0	112
4,0	4,5 $\pm$ 0,1	113
8,0	8,7 $\pm$ 0,1	109
Média $\pm$ desvio padrão	-	111 $\pm$ 2

### **5.1.5 Limite de detecção e limite de quantificação**

O LD calculado do método foi igual a 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A Figura 27 apresenta um perfil cromatográfico obtido por uma das replicatas da injeção de solução de AmB na concentração 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , confirmando que o método é capaz de detectar o fármaco nessa concentração.

O LQ do método, calculado, foi igual a 0,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

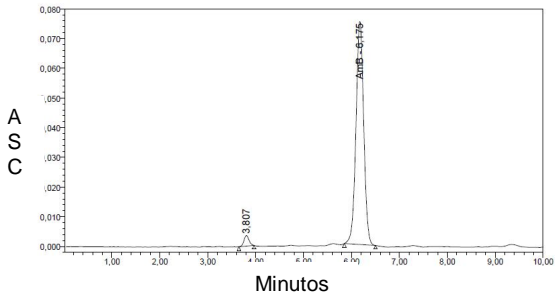
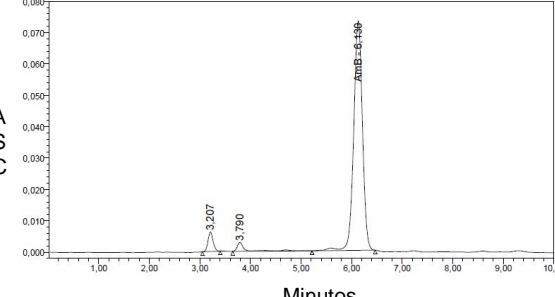
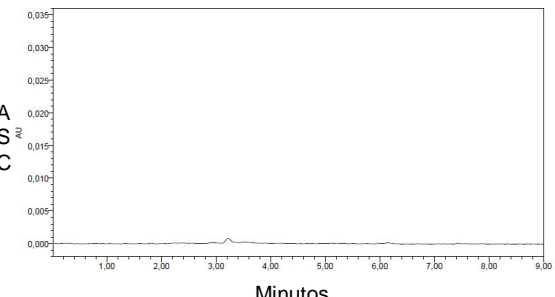
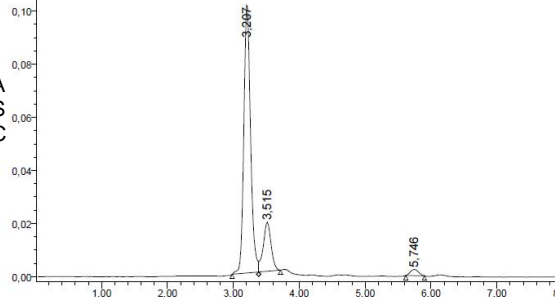


**Figura 27 - Cromatograma obtido a partir da injeção de solução 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anfotericina B (AmB).**

### 5.1.6 Teste de degradação forçada da AmB

Os perfis dos cromatogramas das soluções analisadas no teste de degradação forçada de AmB estão ilustrados na Tabela 9.

**Tabela 9 - Resultados do teste de degradação forçada da anfotericina B (AmB) em meio ácido e alcalino.**

Hora	Meio Ácido	Meio Alcalino
0 h	 <p style="text-align: center;">ASC = 841.327</p>	 <p style="text-align: center;">ASC = 881.673</p>
1 h		

**Tabela 9 (continuação) - Resultados do teste de degradação forçada da anfotericina B (AmB) em meio ácido e alcalino.**

Várias interpretações podem ser obtidas desse experimento. Primeiramente, observa-se que o meio ácido é capaz de levar à degradação da AmB de forma mais rápida e mais expressiva. Antes da exposição ao aquecimento, a ASC do pico de absorção da AmB em meio ácido é menor do que em meio alcalino, já indicando uma degradação



inicial superior. Com uma hora de aquecimento resta uma quantidade residual de AmB em meio alcalino, enquanto que, em meio ácido, o fármaco não é mais detectado.

Pode-se observar que o método desenvolvido detecta o(s) produto(s) de degradação presente(s) em meio alcalino e que os picos de absorção deste(s) não interferem no pico da AmB, pois são eluídos em tempo de retenção inferior. Em meio ácido, o método analítico é capaz de detectar a diminuição do teor do fármaco, porém o(s) produto(s) de degradação não é (são) identificado(s) por ele.

## 5.2 Caracterização das NE

### 5.2.1 Influência da STE e da AmB

A Tabela 10 mostra os resultados da caracterização das NE carregadas com AmB sem STE e com STE nas concentrações 0,1% e 0,2% p/v.

**Tabela 10**– Caracterização das nanoemulsões carregada com anfotericina B 0,2% p/v quanto ao diâmetro das partículas, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e teor de encapsulação (TE).

Parâmetros	Formulações		
	0% STE	0,1% STE	0,2% STE
<b>Diâmetro (nm)</b>	184 ± 3	173 ± 2	169 ± 0
<b>IP</b>	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,11 ± 0,02
<b>Potencial Zeta (mV)</b>	-46 ± 2	40 ± 3	53 ± 2
<b>TE (%)</b>	98 ± 1	99 ± 3	99 ± 1

É digno de nota que o TE foi alto para todas as formulações com valores próximos a 100% e isto foi observado tanto para NE com ou sem a amina lipofílica (STE). Estes dados estão em consonância com dados previamente descritos (SANTOS *et al.*, 2011).

A PCS fornece o diâmetro médio das partículas e o IP como uma medida da extensão da distribuição do diâmetro das partículas. Valores de IP inferiores a 0,1 indicam sistemas considerados monodispersos e valores superiores a 0,7 indicam preparações com partículas de diâmetro heterogêneo, portanto, polidispersos (MALVERN INSTRUMENTS, 2000; SOUTO *et al.*, 2004). Basicamente, para emulsões a serem administradas por via endovenosa valores de IP até 0,250 são aceitáveis (MÜLLER *et al.*, 2004). Observa-se uma tendência à redução de tamanho dos glóbulos com o aumento da concentração de STE, porém essa redução só é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando se compara as formulações com STE (0,1 ou 0,2%) à formulação sem STE. Apesar do sistema não ser considerado monodisperso, todas as formulações apresentaram valores baixos de IP e, principalmente, inferiores ao valor de 0,250, sendo consideradas adequadas para finalidade de administração endovenosa.

A medida do potencial zeta permite prever a estabilidade da dispersão durante a estocagem. Para que a repulsão eletrostática seja suficiente para manter uma partícula afastada da outra, evitando a aproximação/ fusão, é necessário que o potencial zeta seja pelo menos 25 mV (negativo ou positivo) (The Zeta Potential, 1999). Verifica-se que todas as formulações apresentam potencial zeta acima desse valor de referência. O potencial zeta positivo das formulações se deve à presença do grupo amino da STE que se encontra protonado no pH da formulação (7,0 - 7,5). Deve-se ressaltar que na ausência de STE, a NE tem potencial zeta negativo. Esse valor negativo pode ser devido à presença de ácidos graxos ionizados, ácidos graxos livres provenientes do TCM e tensoativo da formulação (polissorbato 80). Não se pode descartar também a ionização do grupo carboxílico da AmB na interface do sistema.

A Tabela 11 mostra a influência da concentração da AmB sobre o tamanho dos glóbulos e IP das NE.

**Tabela 11 – Influência da concentração de anfotericina B (AmB) sobre o diâmetro dos glóbulos e índice de polidispersão (IP) das nanoemulsões**

Parâmetros	Formulações *			
	Sem AmB	AmB 0,1%	AmB 0,2%	AmB 0,5%
Diâmetro (nm)	174 ± 3	167 ± 2	169 ± 0	185 ± 2
IP	0,13 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,30 ± 0,04

\*NE contendo STE 0,2% p/v

Embora as preparações não sejam monodispersas, os valores de IP são considerados satisfatórios para o contexto da aplicação endovenosa, exceto para a NE carregada com AmB a 0,5%. Como pode ser observado na tabela, a adição da AmB nas menores concentrações (0,1 e 0,2%) não levou a aumento no tamanho dos glóbulos da NE. Esses dados complementam achados previamente descritos, os quais mostraram um aumento expressivo de tamanho dos glóbulos após incorporação da AmB em NE. Isso pode ser explicado pela menor concentração de fármaco (0,1 e 0,2%) no presente estudo em comparação ao previamente relatado (0,5%) (LANCE *et al.*, 1995). De fato, no presente estudo, a NE carregada com AmB a 0,5% foi a única que apresentou aumento significativo de tamanho ( $p < 0,05$ ), em concordância com dados publicados por LANCE e colaboradores (1995). Outro fator que pode ter impacto no tamanho dos glóbulos é a presença da amina lipofílica (STE) nas formulações, o que pode favorecer a incorporação de AmB na interface dos glóbulos.

### **5.2.2 Influência do método de incorporação do fármaco**

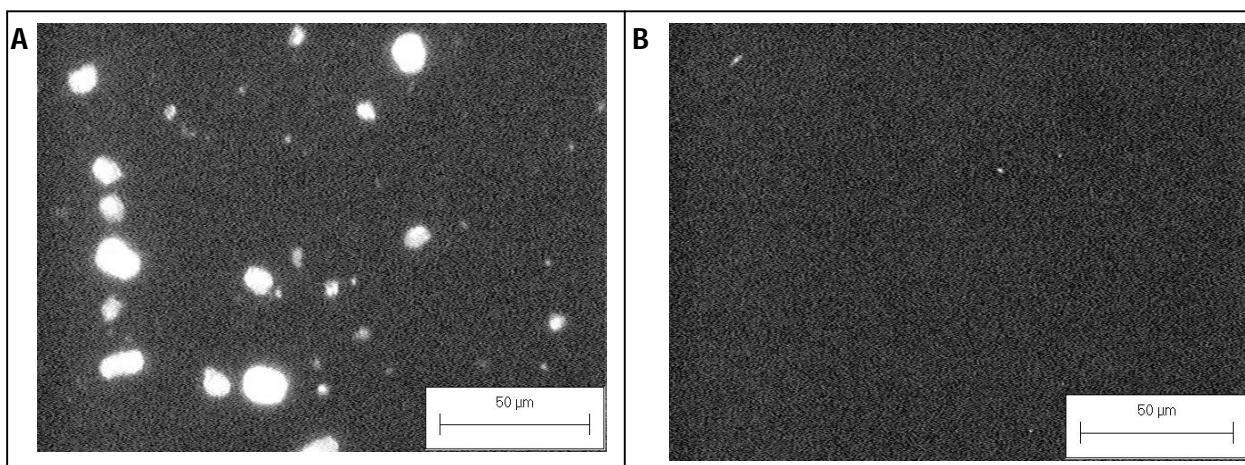
A fim de evidenciar a relevância do método de incorporação da AmB na NE, duas formulações foram preparadas. Quando se adiciona a NE que não foi previamente alcalinizada sobre o pó de AmB, o fármaco não consegue se associar adequadamente aos glóbulos. Esse fato é evidenciado pela formação de uma camada amarelada ao fundo do recipiente, mostrando a separação da AmB. No entanto, a incorporação do

fármaco sobre a NE previamente alcalinizada, devido à adição do NaOH, produz uma formulação homogênea de cor amarelo leitosa sem separação de fases (**Figura 28**).

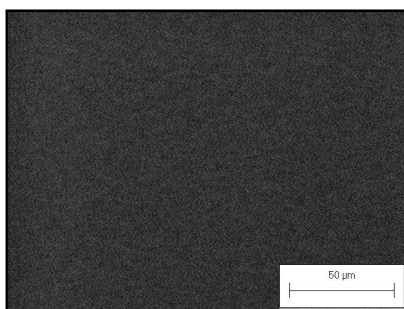


**Figura 28** – À esquerda - Nanoemulsão de anfotericina B sem alcalinização prévia para incorporação do fármaco. À direita - Nanoemulsão de anfotericina B com incorporação do fármaco baseada no perfil pH-solubilidade.

Análises de microscopia ótica de luz polarizada mostram claramente a presença dos cristais de AmB na NE que não foi alcalinizada (**Figura 29A**). Estes cristais não foram observados na NE previamente alcalizada, na qual o fármaco foi adequadamente incorporado pela estratégia pH-solubilidade (**Figura 29B**). Além disso, uma formulação sem fármaco também foi observada na microscopia para evidenciar que os cristais são de AmB, e não de algum excipiente da formulação (**Figura 30**).



**Figura 29** – Nanoemulsão de anfotericina B sem alcalinização prévia para incorporação do fármaco (A). Nanoemulsão de anfotericina B com incorporação do fármaco baseada no perfil pH-solubilidade (B). Aumento de 200 vezes.



**Figura 30** – Nanoemulsão branco sem fármaco. Aumento de 200 vezes.

### 5.3 Estudo de estabilidade

A fim de investigar a influência da STE sobre a estabilidade da NE um estudo foi conduzido. Os resultados dos estudos de estabilidade, conduzidos à 4° C, para as NE carregadas com AmB 0,2% p/v com ou sem STE estão expressos na Tabela 12.

**Tabela 12** – Estabilidade à 4° C das nanoemulsões (NE) carregadas com de anfotericina B 0,2% com ou sem estearilamina (STE).

Pârametros	NE sem STE				
	1 dia	30 dias	60 dias	90 dias	180 dias
Tamanho (nm)*	184 ± 3	191 ± 2	195 ± 3	196 ± 4	198 ± 2
IP*	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,05
Potencial zeta (mV)*	-46 ± 2	-39 ± 1	-33 ± 0	-41 ± 1	-27 ± 0
pH	7,25 ± 0,01	-	-	-	6,37 ± 0,01
Teor (%)	97 ± 2	105 ± 0	101 ± 2	103 ± 14	98 ± 0
TE (%)	98 ± 1	90 ± 2	87 ± 1	82 ± 6	95 ± 2
Pârametros	NE com STE**				
	1 dia	30 dias	60 dias	90 dias	180 dias
Tamanho (nm)*	169 ± 0	167 ± 3	170 ± 2	167 ± 4	166 ± 3
IP*	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,03
Potencial zeta (mV)*	53 ± 2	52 ± 2	38 ± 4	36 ± 7	44 ± 3
pH	7,44 ± 0,21	-	-	-	6,22 ± 0,01
Teor (%)	99 ± 1	107 ± 2	100 ± 0	99 ± 0	100 ± 0
TE (%)	99 ± 1	87 ± 0	88 ± 2	94 ± 4	89 ± 0

\*Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Inglaterra); \*\* Concentração de STE 0,2%

Os dados de TE confirmam os achados prévios mostrando alta taxa de incorporação do fármaco na NE e isto foi observado para as duas formulações (com e sem STE). Esses valores de TE permaneceram elevados ao longo do estudo. A manutenção dos valores de tamanho e o IP também foram observados.

Observa-se que os valores de pH apresentam tendência decrescente ao longo do tempo. Esse fato pode ser atribuído à hidrólise dos TCM e/ ou dos tensoativos da formulação. Essa diminuição de pH é algo comum de ser observado nas NE que tem TCM, como núcleo oleoso, e tensoativos contendo grupos ésteres. Ressalta-se que o pH final encontrado não compromete a estabilidade da NE e também permite a administração endovenosa. Na NE sem STE, a diminuição de pH da formulação, leva a um aumento da acidez na fase externa, o que pode suprimir a ionização dos ácidos graxos presentes na superfície dos glóbulos, levando à diminuição do potencial zeta. Na NE com STE a diminuição do potencial zeta das NE não foi significativa. É importante ressaltar que a diminuição de potencial zeta não impacta negativamente na estabilidade da NE e que os valores se mantêm acima de 25 mV em módulo, valor referência como capaz de assegurar repulsão eletrostática entre os glóbulos, evitando sua aproximação/ fusão.

Os dados do estudo de estabilidade indicam que as NE desenvolvidas neste trabalho são estáveis independentemente da presença da STE. Este achado está aparentemente em desacordo com dados prévios do grupo (SANTOS *et al.*, 2011), os quais apontam a necessidade da presença desse lípido catiônico para a obtenção de preparações estáveis. Com intenção de tentar explicar essa diferença, algumas hipóteses podem ser consideradas.

A primeira delas poderia ser o fato de o estudo de estabilidade ter sido conduzido em menores temperaturas (4° C) em comparação ao estudo prévio (SANTOS *et al.*, 2011), o que poderia ter reduzido a velocidade de processos de degradação. Para investigar essa hipótese, um estudo à temperatura ambiente foi conduzido (**Tabela 13**).

**Tabela 13 – Estabilidade à temperatura ambiente das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B 0,2% com ou sem estearilamina (STE)**

Parâmetros	NE sem STE			NE com STE**		
	1 dia	30 dias	60 dias	1 dia	30 dias	60 dias
Tamanho (nm)*	184 ± 3	187 ± 1	199 ± 4	169 ± 0	181 ± 2	194 ± 1
IP*	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,06 ± 0,07
Potencial Zeta (mV)*	-46 ± 2	-22 ± 2	-31 ± 4	53 ± 2	67 ± 5	63 ± 5
pH	7,24 ± 0,31	-	7,78 ± 0,06	7,40 ± 0,08	-	6,74 ± 0,02
Teor (%)	97 ± 2	110 ± 1	100 ± 0	99 ± 1	108 ± 3	101 ± 1
TE (%)	98 ± 1	90 ± 3	89 ± 1	99 ± 1	90 ± 3	85 ± 2

\*Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra); \*\* Concentração de STE 0,2%

A influência do tempo na variação de tamanho e IP das formulações é pouco expressiva. O teor de AmB mantém-se estável durante todo o estudo. Não há diferença de TE para ambas as formulações, com ou sem STE, independentemente do tempo analisado. Apesar das NE apresentarem uma diminuição estatisticamente significativa de TE, seu valor permanece alto em ambas as formulações.

Novamente, o pH teve tendência decrescente e não observou-se variação significativa no potencial zeta da NE com STE. Por outro lado, a NE sem STE apresentou diminuição, em módulo, de potencial zeta. Nesse caso, o potencial zeta menos negativo não pode ser explicado pela supressão da ionização dos ácidos graxos, presentes na superfície dos glóbulos, uma vez que se observa ligeiro aumento de pH do meio. Pode-se inferir que a saída de AmB da interface, confirmada pela diminuição de TE, pode levar valores menos negativos de potencial zeta.

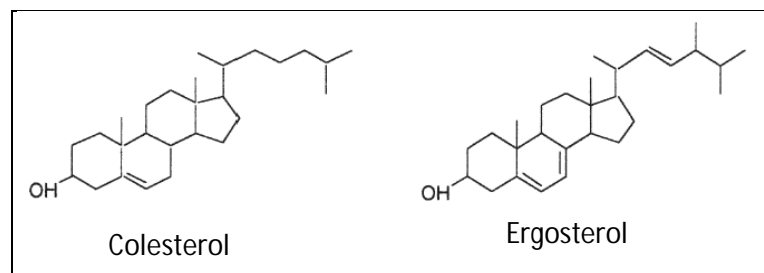
Como pode ser observado, apesar dos resultados do estudo conduzido à temperatura ambiente não ser idêntico àquele conduzido a 4° C, percebe-se que as NE se mantêm estáveis em ambos os casos. Isso contrasta com achados prévios do grupo, os quais mostraram que as NE com STE foram estáveis por mais de noventa dias, o que não foi observado para as NE sem STE. Neste caso, o TE decresceu drasticamente e em sessenta dias não havia mais AmB encapsulada (SANTOS *et al.*, 2011).

A segunda hipótese poderia ser a mudança no método de incorporação da AmB nas NE. Antes também se utilizava a estratégia de pH-solubilidade, porém a AmB era adicionada diretamente em 1 mL de solução de NaOH 0,1 M e, então, essa solução era adicionada sobre a NE à temperatura ambiente (SANTOS *et al.*, 2011). No presente trabalho, a NE alcalina foi adicionada sobre a AmB. Este procedimento diminui o contato do fármaco com íons OH<sup>-</sup>, uma vez que a quantidade de NaOH adicionada está diluída no volume da NE. Além disso, o processo foi conduzido sob baixa temperatura (10° C) e o pH foi imediatamente ajustado à neutralidade. Todas essas modificações visavam reduzir o tempo de contato do fármaco com condições extremas de pH, de forma a minimizar uma possível ocorrência de processos de hidrólise.

A outra hipótese, que consideramos a mais provável, é a mudança do sistema emulsionante da formulação que era composto por polissorbato 80/ monooleato de sorbitano por polissorbato 80/ colesterol. O colesterol atua como co-surfactante e pode ser a causa da melhora de estabilidade obtida para as NE, uma vez que se encontra na literatura diversos estudos que mostram as interações de AmB e colesterol. Estas poderiam contribuir para manter a AmB na interface das NE, mesmo nas formulações sem STE. Comportamento similar foi descrito para a forma lipossomal da AmB (AmBisome<sup>®</sup>), no qual o colesterol é incorporado para aumentar a estabilidade e manter o fármaco na bicamada fosfolipídica (TORRADO *et al.*, 2008).

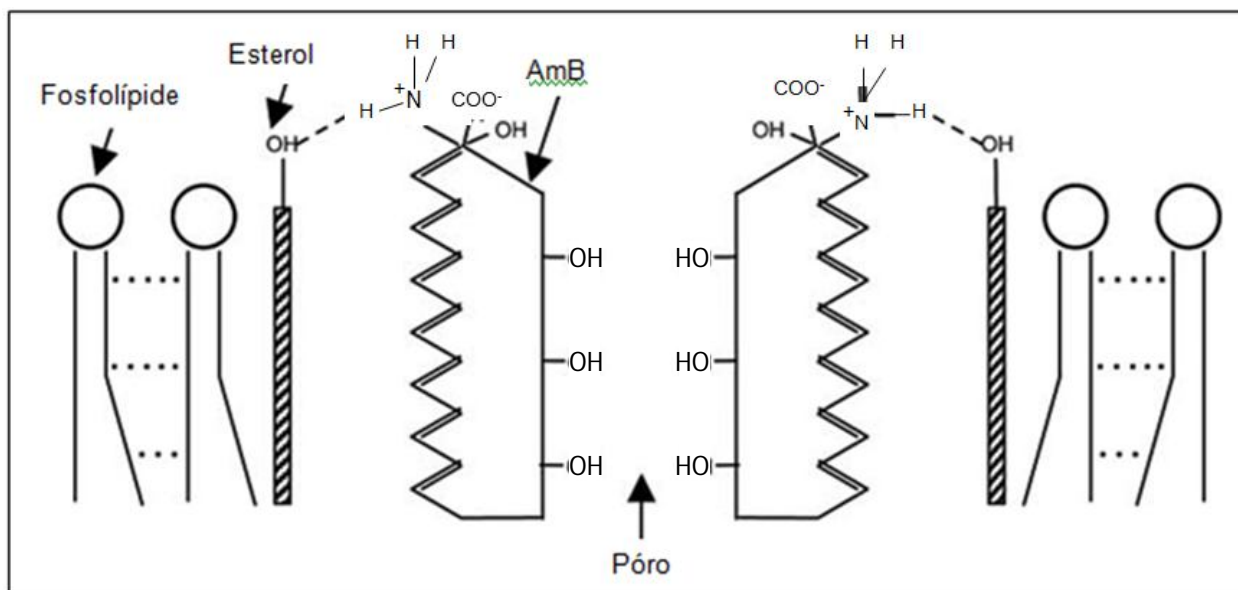
O estudo das interações AmB e colesterol tem origem no conhecimento do modo de ação do fármaco. A hipótese mais aceita do mecanismo de ação da AmB é a de que a molécula de AmB forma complexos com os esteróis de membrana, ergosterol ou colesterol (**Figura 31**), o que leva à formação de canais iônicos hidrofílicos, ocasionando eventos letais para a célula. A AmB tem maior afinidade pelo ergosterol do que pelo colesterol, o que explica a relativa seletividade do fármaco pela membrana do parasita, em detrimento da membrana de mamíferos (BAGINSKI *et al.*, 2002; CHARBONNEAU *et al.*, 2001; FOURNIER *et al.*, 1998; GOLENSER & DOMB, 2006; KAWABATA *et al.*, 2001; MOURI *et al.*, 2008; NEUMANN *et al.*, 2009).





**Figura 31** – Estrutura química do colesterol e do ergosterol. Adaptado de CHARBONNEAU *et al.*, 2001.

A formação de complexos entre a AmB e os esteróis ocorre através de interações de van der Waals entre a porção heptaênica da AmB com o esqueleto esteroidal e a cauda alquílica dos esteróis. Outra possibilidade de interação é a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo amino protonado da AmB, como doador de hidrogênio, e o grupo  $\beta$ -OH do esterol, como acceptor (**Figura 32**) (BAGINSKI *et al.*, 2002; GOLENSER & DOMB, 2006; KAWABATA *et al.*, 2001; SAKA & MITA, 1998; SEOANE *et al.*, 1998; SILBERSTEIN, 1998).



**Figura 32** - Representação esquemática da interação da anfotericina B (AmB) com a bicamada fosfolipídica de membranas de esteróis. As linhas pontilhadas entre as cadeias hidrocarbônicas representam as forças de van-der-Waals. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio formadas entre a AmB e as moléculas de esteróis. Adaptado de GOLENSER & DOMB, 2006.

A formação de complexos entre AmB e esteróis foi simulada em modelos computacionais de modelagem molecular e concluiu-se que eles são possíveis e

prováveis de se formar, sendo que os complexos nos quais a AmB interage com o ergosterol são mais estáveis do que aqueles com colesterol (NEUMANN *et al.*, 2009; SILBERSTEIN, 1998).

Filmes lipídicos contendo AmB e esteróis foram estudados pela técnica de monocamada e observou-se que os componentes interagem entre si (SEOANE *et al.*, 1998).

A formação de complexos também foi estudada em modelos de vesículas lipídicas e observou-se a presença de interações entre AmB e ergosterol/ colesterol (BAGINSKI *et al.*, 2002; FOURNIER *et al.*, 1998; GABRIELSKA *et al.*, 2006; MOURI *et al.*, 2008).

Saka e Mita (1998) investigaram a formação de complexos entre AmB e colesterol em monocamadas, soluções aquosas e vesículas lipídicas. Quando a AmB é misturada com colesterol, ela forma uma monocamada estável e os autores atribuem esse fato à presença desse esteróide, que previne a dessorção da AmB pela interação com ela. Em solução aquosa, o colesterol influi no estado de agregação da AmB devido à formação de complexo com o fármaco. O estudo da interação em vesículas lipídicas foi feito por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e as mudanças no espectro das vesículas lipídicas contendo colesterol, induzidas pela adição de AmB ao sistema, foram atribuídas à formação de tais complexos.

A interação entre AmB e vários esteróis foi estudada pela técnica de espectroscopia UV-Vis e DSC. Os espectros UV-Vis das soluções de AmB e colesterol não foram superponíveis ao espectro da AmB pura, sendo as mudanças atribuídas às interações entre eles (CHARBONNEAU *et al.*, 2001).

Kawabata e colaboradores (2001) também investigaram mudanças no espectro de absorção UV-Vis da AmB em micelas de lisofosfatidilcolina com e sem colesterol. O aumento da concentração de colesterol levou a mudanças no espectro de absorção da AmB, o que pode indicar a formação de complexos.

Vakil e Kwon (2007) estudaram micelas de AmB formadas por DSPE-PEG com e sem colesterol. As medidas de  $H^1$ -RMN indicaram menor mobilidade das micelas com colesterol e a liberação do fármaco foi mais lenta nestas. O espectro de absorção UV-Vis da AmB nas micelas, com ou sem colesterol, foram diferentes, o que pode indicar diferenças de interação fármaco-micela. Todos esses achados podem indicar interação da AmB com o esteróide e essa associação influi no microambiente do fármaco.

Os resultados de caracterização físico-química e do estudo de estabilidade obtidos para as NE desenvolvidas são satisfatórios. A fim de investigar ainda mais a influência dos emulsionantes, NE com lecitinas foram preparadas e comparadas aos dados obtidos na NE com a mistura polissorbato/ colesterol. As lecitinas utilizadas foram lecitina de ovo insaturada (Lipoid E 80<sup>®</sup>) ou lecitina de soja insaturada (Lipoid S 75<sup>®</sup>), ambas a 1% e a composição da NE foi similar àquela descrita para a NE com polissorbato/ colesterol. O uso das lecitinas foi descrito em trabalhos prévios (BRIME *et al.*, 2002; LANCE *et al.*, 1995, 1996). Os resultados estão descritos na Tabela 14.

**Tabela 14 – Estabilidade à 4° C das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B 0,2% p/v contendo lecitina como emulsionante.**

Parâmetros	NE com lecitina de ovo (Lipoid E 80 <sup>®</sup> )		NE com lecitina de soja (Lipoid S 75 <sup>®</sup> )	
	1 dia	30 dias	1 dia	30 dias
Tamanho (nm)	237 <sup>a</sup>	258 ± 13 <sup>c</sup>	447 <sup>a</sup>	439 ± 32 <sup>c</sup>
IP	0,25 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,19 <sup>c</sup>
pH	7,49 <sup>a</sup>	DI	7,29 <sup>a</sup>	DI
Teor (%) <sup>*</sup>	DI	89 ± 8 <sup>b</sup>	DI	86 ± 0 <sup>b</sup>
TE (%) <sup>*</sup>	115 ± 3 <sup>b</sup>	103 ± 14 <sup>b</sup>	97 ± 0 <sup>b</sup>	86 ± 13 <sup>b</sup>

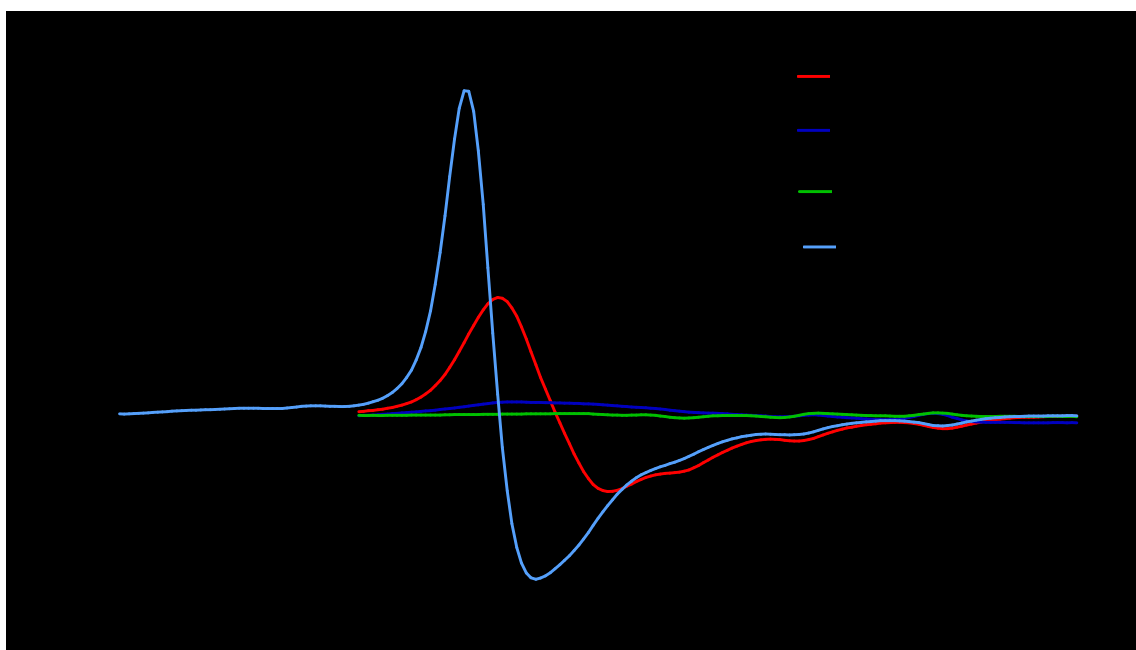
\*Concentração de injeção (CLAE) = 0,8 µg/ mL de AmB; <sup>a</sup> n=1; <sup>b</sup> n=2; <sup>c</sup> n=3; DI = Dado Inexistente

Observa-se que a NE com lecitina de soja apresenta maior tamanho de glóbulo do que a NE com lecitina de ovo e ambas maiores do que as NE com polissorbato 80/ colesterol. O IP da formulação com lecitina de soja apresenta-se muito elevado e inaceitável para a abordagem de administração endovenosa. Esses achados estão em consonância com dados previamente relatados (LANCE *et al.*, 1995, 1996).

Considerando que as NE preparadas com polissorbato 80/ colesterol apresentaram propriedades físico-químicas apropriadas para a administração endovenosa, com tamanho de partícula pequeno e estabilidade, elas foram selecionadas para os estudos subsequentes.

#### 5.4 Dicroísmo Circular

O espectro de DC para a AmB livre, NE carregada com AmB (com e sem STE) e Anforicin B<sup>®</sup> está apresentado na Figura 33.



**Figura 33** – Espectro de DC para as diversas formulações de anfotericina B (AmB): solução aquosa de AmB, Anforicin B<sup>®</sup>, NE carregadas com AmB (0,2%) e STE (0,1%) ou sem STE.

A presença de um intenso sinal dicróico a 340 nm indica a presença de fármaco livre em espécies auto-associadas (JAIN & KUMAR, 2010; JOLY *et al.*, 1992, 1994; LEGRAND *et al.*, 1992). Considerando que quando a AmB está ligada aos lípidos o sinal a 340 nm não é exibido, a intensidade deste sinal nas formulações lipídicas

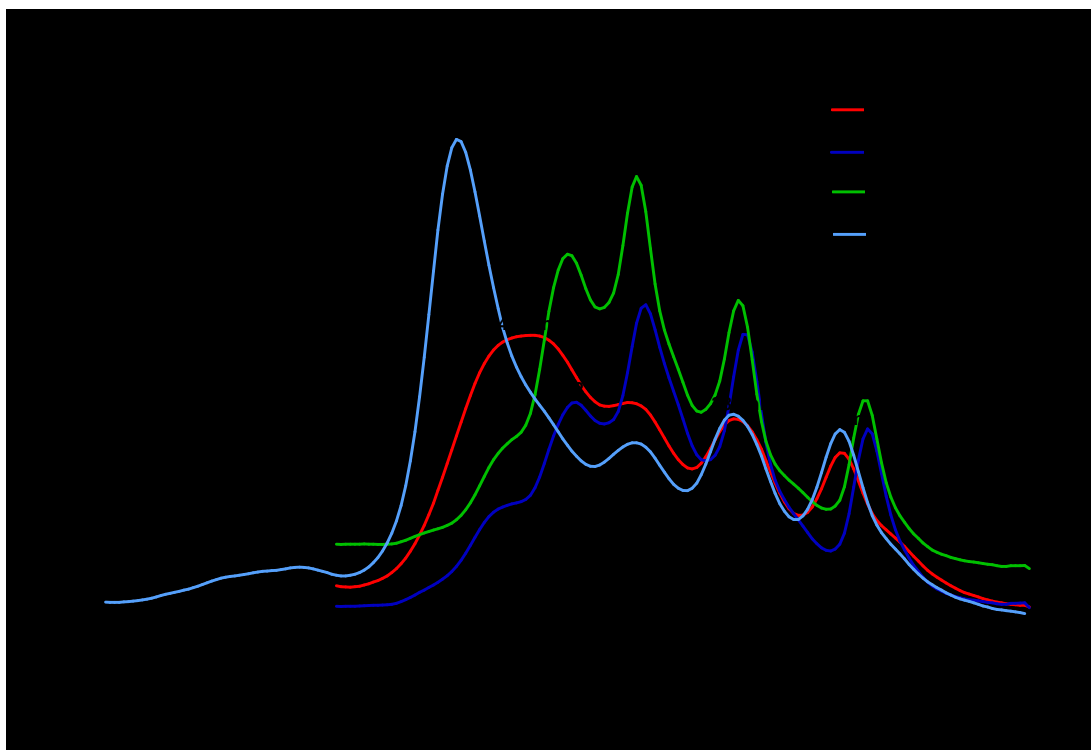
permite estimar a quantidade de fármaco não ligado presente na formulação (JOLY *et al.*, 1992, 1994).

Na concentração de 5 µg/ mL, o espectro da AmB livre e do Anforicin B<sup>®</sup> consistem em um intenso sinal dicróico centrado em 340 nm, o que está de acordo com espectros apresentados na literatura da AmB livre ou associada ao desoxicolato de sódio, indicando a presença de fármaco livre na forma auto-associada (BARWICZ *et al.*, 2002; EGITO *et al.*, 1996; JAIN & KUMAR, 2010; JOLY *et al.*, 1994).

Já nos espectros de AmB a partir das NE, esse sinal é expressivamente reduzido, sendo praticamente ausente na formulação sem STE. A redução desse sinal em sistemas lipídicos é relatada na literatura, indicando a associação da AmB aos lípidos da formulação, o que diminui a proporção de AmB agregada (BARWICZ *et al.*, 2002; DAMASCENO, 2010; EGITO *et al.*, 1996; JOLY *et al.*, 1994; MÉNEZ *et al.*, 2007).

O espectro de absorvância UV-Vis para as mesmas formulações está apresentado na Figura 34.

É relatado na literatura que os picos do espectro de absorção UV-Vis da AmB indicam a existência dos seus diferentes estados de agregação. O pico em torno de 408/ 409 nm é típico de espécies monoméricas (DAMASCENO, 2010; EGITO *et al.*, 2002; MÉNEZ *et al.*, 2007). A presença de uma banda alargada entre 326 a 328 nm e/ ou 340 nm evidencia mudanças estruturais da AmB devido a fenômenos de agregação, evidenciando a presença de oligômeros (DAMASCENO, 2010; EGITO *et al.*, 2002; HARGREAVES *et al.*, 2006; MÉNEZ *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001; TORRADO *et al.*, 2008).



**Figura 34 – Espectro UV-Vis para as diversas formulações de anfotericina B (AmB): solução aquosa de AmB, Anforicin B<sup>®</sup>, NE carregadas com AmB (0,2%) e STE (0,1%) ou sem STE.**

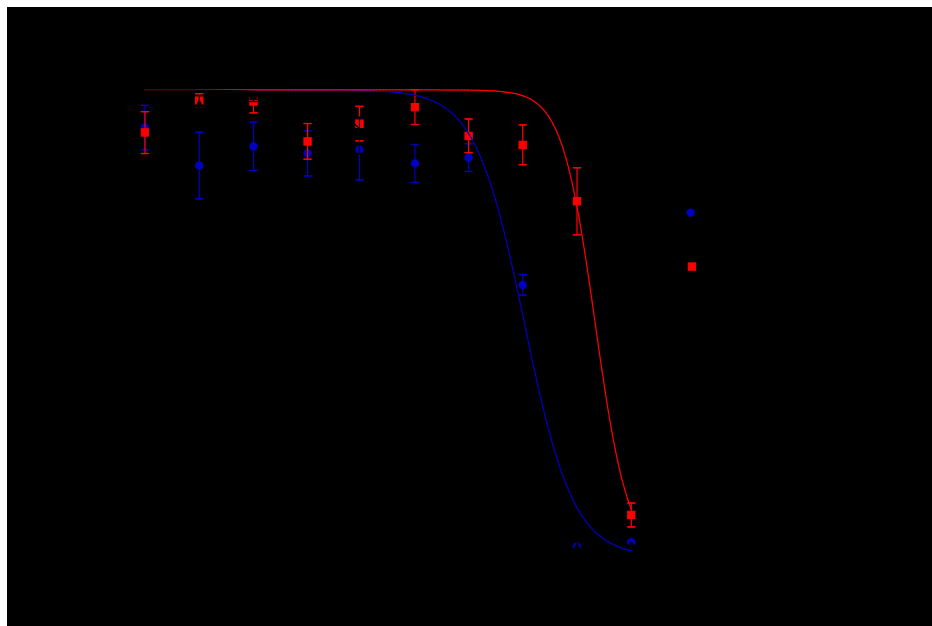
Os espectros de absorção da solução de AmB livre e do Anforicin B<sup>®</sup> mostram a presença de picos de absorção nas regiões em torno de 410, 388 e 365 nm. Essas bandas são típicas da AmB na forma monomérica (EGITO *et al.*, 2002; HARGREAVES *et al.*, 2006). Os picos em torno de 340 nm, na AmB livre, e em 327 nm, no Anforicin B<sup>®</sup>, se referem à forma auto-associada da AmB (EGITO *et al.*, 2002; HARGREAVES *et al.*, 2006; MÉNEZ *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001; TORRADO *et al.*, 2008). O fato da banda de agregação no Anforicin B<sup>®</sup> ser deslocada a um comprimento de onda levemente inferior, comparada à banda clássica em torno de 340 nm, observada para AmB livre, indica que as moléculas de AmB estão complexadas com o desoxicolato de sódio (DAMASCENO, 2010; EGITO *et al.*, 2002).

Observam-se algumas mudanças nos espectros de absorção da AmB a partir das NE. Os picos próximos a 388 e 366 nm são mantidos, mas eles se tornam mais pronunciados, sugerindo uma maior proporção da forma monomérica. Além disso, surgem picos mais bem pronunciados na região em torno de 350 nm e o pico ao redor

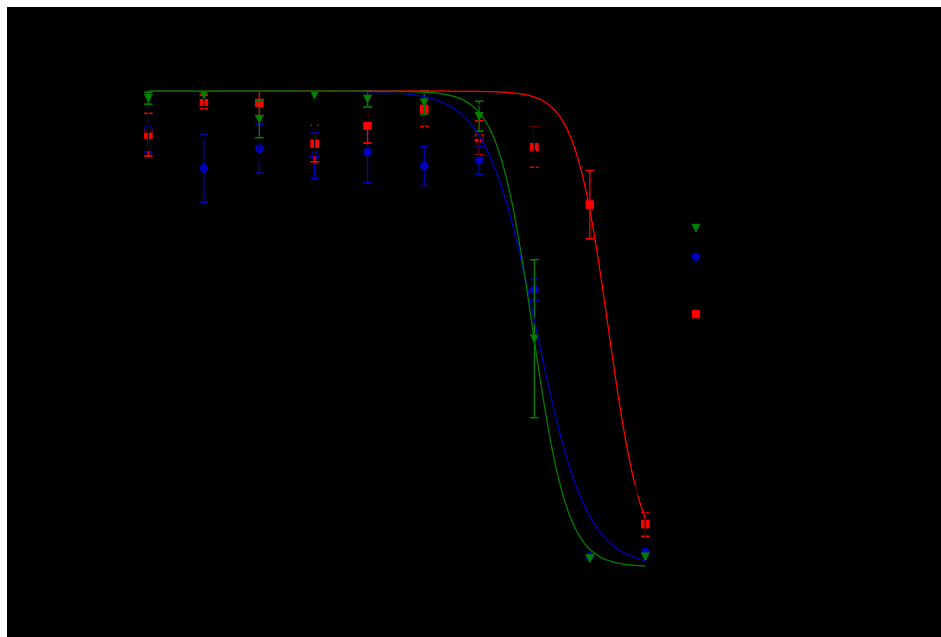
de 410 nm é deslocado para em torno de 415 nm. As mudanças no espectro de absorção de AmB podem ser devido à formação de complexos com os lípides da formulação (SAKA & MITA, 1998). O deslocamento da banda típica a 410 nm é indicativo de que a forma aquosa monomérica de AmB foi significativamente alterada e isso pode sugerir a inserção da AmB num sistema carreador (CHARBONNEAU *et al.*, 2001; MÉNEZ *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2001; SAKA & MITA, 1998). A banda em torno de 415 nm é identificada na literatura como característica da interação de AmB e esteróis (CHARBONNEAU *et al.*, 2001; FOURNIER *et al.*, 1998; SAKA & MITA, 1998; VAKIL & KWON, 2007). Saka e Mita (1998) relatam que o desaparecimento do pico de absorção em torno de 408 nm e o aparecimento de picos em torno de 350 nm e 413 nm é atribuído à formação de complexos entre AmB e colesterol. Além disso, ressalta-se que o pico próximo a 340 nm é expressivamente reduzido e o pico em 327 nm é ausente nas NE, indicando que as formas auto-associadas são reduzidas nessas formulações, o que está de acordo com os resultados dos espectros de DC.

### **5.5 Ensaio de citotoxicidade *in vitro***

A Figura 35 apresenta as curvas de viabilidade celular das diferentes NE carregadas com AmB e da formulação comercial Anforicin B<sup>®</sup> e a Figura 36 mostra as curvas das NE contendo AmB e suas respectivas NE branco. A viabilidade celular das células expostas às NE branco está representada em função do logaritmo da concentração. Embora esse não seja o termo mais adequado, uma vez que não faz sentido falar em concentração de AmB nesse caso, isso significa que as formulações branco seguiram as mesmas diluições de suas respectivas formulações contendo fármaco. A Figura 37 mostra a influência da concentração da STE sobre os valores de CC<sub>50</sub> das NE com e sem AmB (NE branco) em comparação com o Anforicin B<sup>®</sup>.

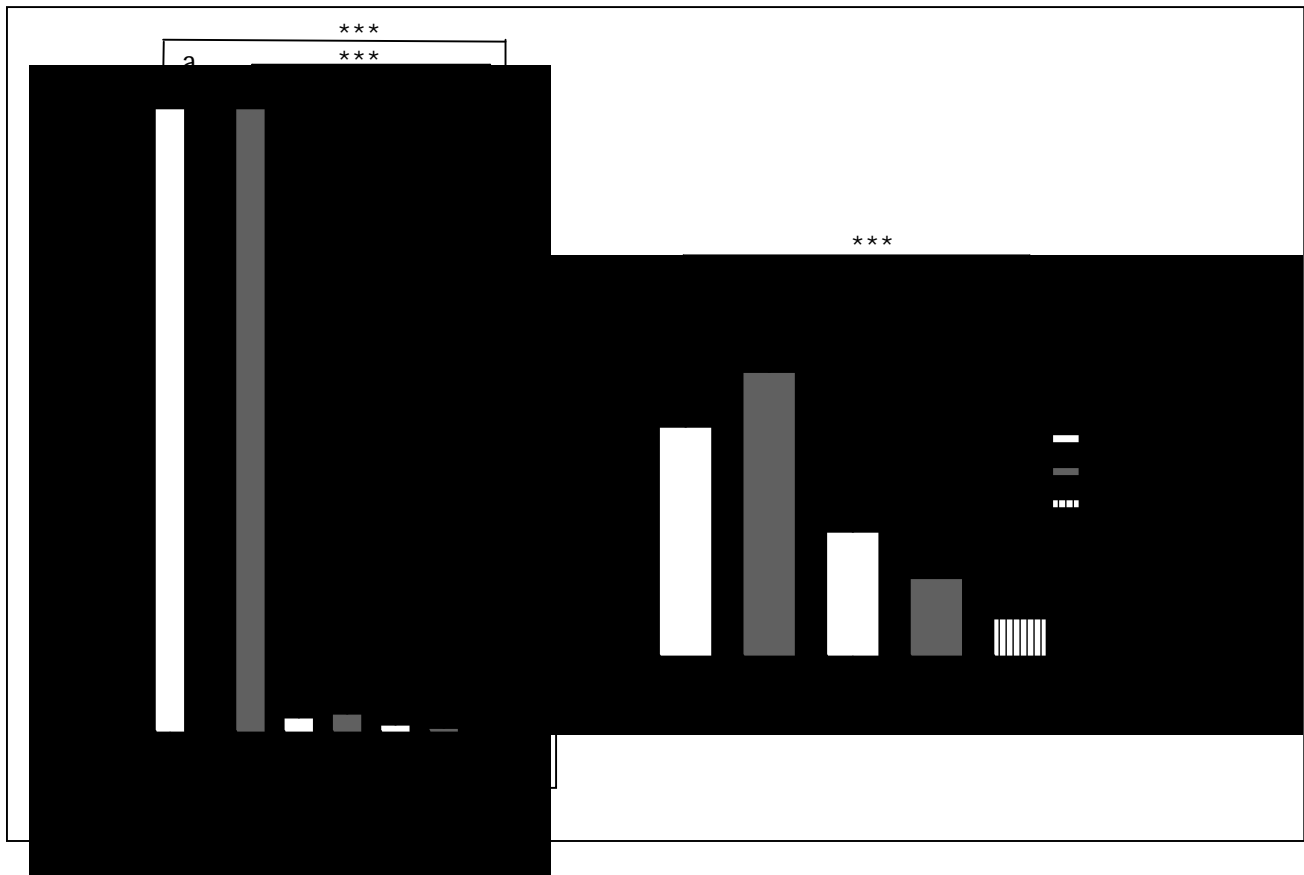


**Figura 35** – Curvas de viabilidade celular das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B (AmB) e estearilamina (STE), e da formulação comercial Anfotericin B<sup>®</sup>, obtidas pelo ensaio de MTT.



**Figura 36** – Curvas de viabilidade celular das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B (AmB) e estearilamina (STE), e suas respectivas formulações branco, obtidas pelo ensaio de MTT.





a = > 200 µg/mL; \*\*\* Extremamente significativo (valor p < 0,001)

**Figura 37 – Comparação dos valores de CC<sub>50</sub> de diferentes formulações obtidos no teste de MTT em macrófagos da linhagem J774.**

O valor de CC<sub>50</sub> encontrado para a formulação convencional AmB-D nesse estudo (1,0 ± 0,1 µg/ mL) foi inferior do que aquele descrito por Chéron e colaboradores (2003). Esse grupo testou AmB-D em macrófagos murinos da linhagem J774 em ensaio MTT e relataram que citotoxicidade foi observada acima de 10 µM (9,2 µg/ mL). Porém, ressalta-se que eles utilizaram menor tempo de incubação com a formulação (4 horas) do que o usado no presente trabalho (24 horas), o que pode ser um dos fatores que contribuíram para essa diferença de citotoxicidade.

As NE sem STE, contendo ou não o fármaco, não induziram citotoxicidade nas células J774 até 10 µg/ mL. Então, foi feito um ensaio de MTT testando essa formulação em uma faixa mais ampla de concentração, de 0,02 µg/ mL até 200 µg/ mL, sendo que esta foi obtida pela aplicação da NE diretamente aos poços (sem diluição). As NE sem STE não apresentaram citotoxicidade em nenhuma concentração testada, não sendo

possível estabelecer um valor de  $CC_{50}$ . Por outro lado, os dados mostram claramente que o aumento da concentração da STE induz um aumento bastante expressivo na citotoxicidade tanto para as NE carregadas quanto para as não carregadas com AmB (NE branco). Quando se compara as NE carregadas com AmB com o Anforicin B<sup>®</sup>, observa-se que as NE induziram uma menor citotoxicidade e que as diferenças foram significativas, exceto para a NE com 0,2% de STE. A título de comparação, o valor estimado do  $CC_{50}$  para a NE carregada com AmB sem STE foi mais de 200 vezes maior do que aquele observado para o Anforicin B<sup>®</sup>. Na formulação convencional, a AmB está presente principalmente na forma auto-associada solúvel em água, que é a forma mais tóxica para células de mamíferos, além de conter o sal biliar desoxicolato de sódio, que também pode gerar efeitos tóxicos em decorrência de sua ação surfactante (TORRADO *et al.*, 2008; VYAS & GUPTA, 2006).

Os dados em conjunto indicam que a citotoxicidade das NE em macrófagos J774 se deve à presença da STE, uma vez que as formulações sem essa amina não apresentaram citotoxicidade no ensaio de MTT. Nossos dados sugerem também que citotoxicidade das NE não foi devido à AmB, uma vez que não se observou diferença entre as formulações branco e aquelas contendo o fármaco. Apenas as NE carregadas com AmB que apresentaram baixa citotoxicidade (sem STE e com STE 0,1%) foram selecionadas para os estudos de eficácia *in vitro*.

O aumento de citotoxicidade das NE com carga superficial catiônica não era inesperado. Embora Benita (1999) não tenha observado toxicidade nos estudos *in vitro* e *in vivo* (via tópica, ocular e endovenosa) de NE contendo STE, existem muitos relatos na literatura indicando a influência de lípidos catiônicos na toxicidade de sistemas carreadores (HEYDENREICH *et al.*, 2004; HUNG *et al.*, 2005; LINCOPAN *et al.*, 2006; WEYENBERG *et al.*, 2007).

Weyenberg e colaboradores (2007) estudaram a citotoxicidade de NE e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), com diferentes composições de surfactantes e co-surfactantes, em três linhagens celulares (macrófagos J774, fibroblastos murinos 3T3 e queratinócitos HaCaT). Eles observaram que a viabilidade de todos os tipos celulares

foi significativamente reduzida na presença de STE e destacaram que a sobrevivência, principalmente dos macrófagos J774, foi expressivamente afetada pela presença do lípide catiônico.

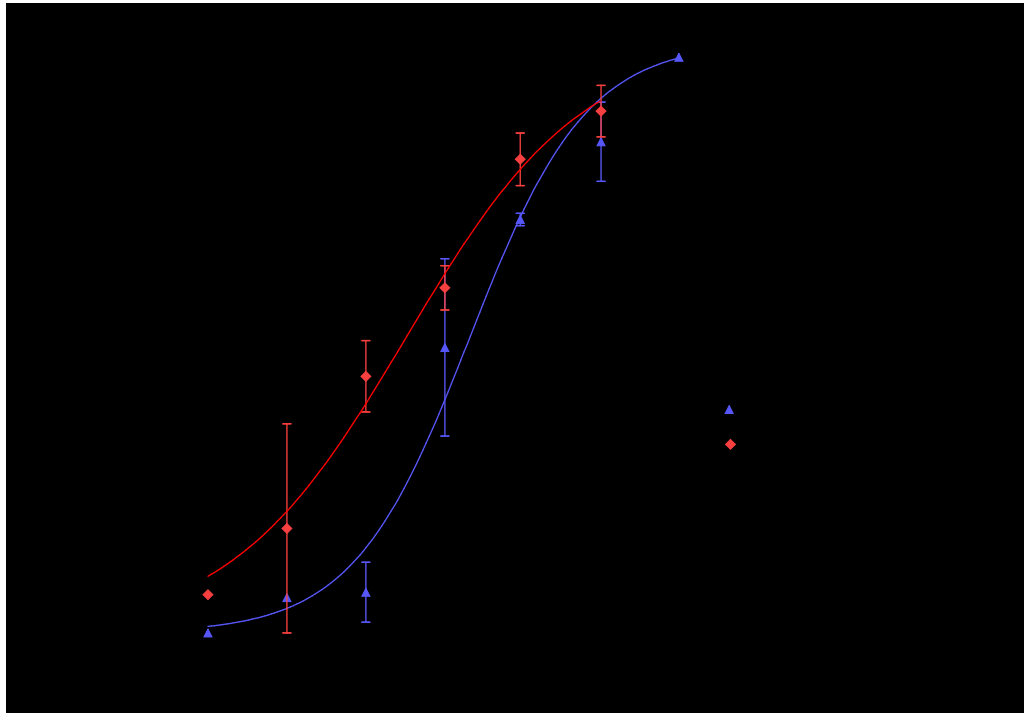
Heydenreich e colaboradores (2004) desenvolveram NLS catiônicas e estudaram a toxicidade dos sistemas nas linhagens de células pequenas de câncer humano CPH54A, fibroblastos NR6 e células de rim embrionário humano HEK293. Os dados mostraram que a formulação que continha apenas STE foi a mais tóxica. Entretanto, os autores argumentaram que a diminuição da concentração desse lípide pode levar a doses totais aceitáveis.

Hung e colaboradores (2005) também testaram a citotoxicidade de NE em linhagem de fibroblastos COS-1 e observaram baixa viabilidade celular nos sistemas carregados com STE.

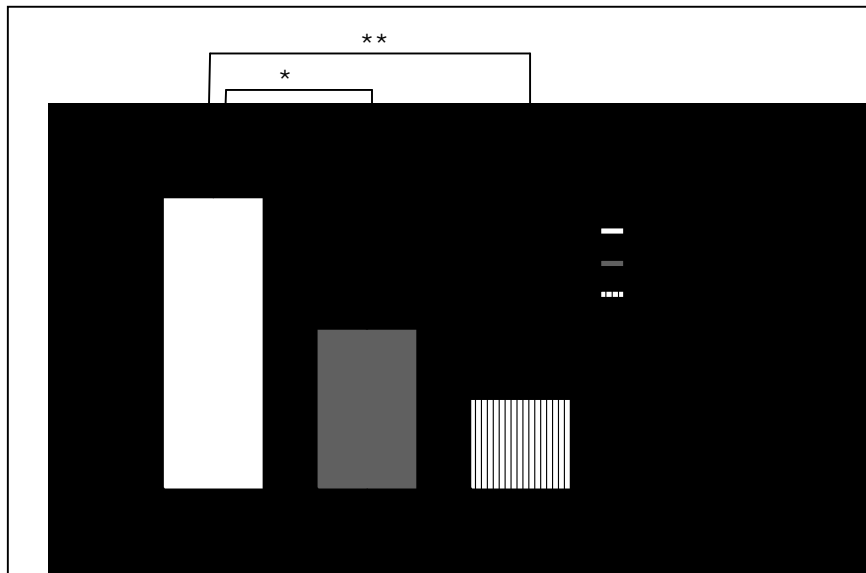
Foram desenvolvidos estudos *in vivo* em camundongos, que avaliaram a citotoxicidade de fragmentos de bicamadas, as quais associavam AmB ao lípide catiônico brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB). Todas as reações adversas observadas com DODAB associado à AmB, também foram observadas com DODAB sozinho. Assim, os autores afirmam que os principais efeitos tóxicos da nova formulação se deve ao uso de DODAB na concentração de 10 mg/ mL e que estudos posteriores, empregando menor quantidade do lípide catiônico, podem levar a formulações aceitáveis (LINCOPAN *et al.*, 2006).

## **5.6 Ensaio de eficácia *in vitro***

A Figura 38 apresenta as curvas de porcentagem de inibição de crescimento de amastigotas versus logaritmo da concentração de AmB e a Figura 39 apresenta os resultados de  $CI_{50}$  para cada formulação testada.



**Figura 38 –** Curvas de inibição de crescimento de amastigotas versus logaritmo da concentração de anfotericina B (AmB) nas nanoemulsões (NE) em comparação à formulação comercial.



\* Significativo (valor p entre 0,01 e 0,05); \*\* Muito significativo (valor p entre 0,001 e 0,01)

**Figura 39 –** Comparação dos valores de  $CI_{50}$  contra amastigotas de *L. L. amazonensis* de diferentes formulações obtidos no teste de eficácia *in vitro*.

Determinou-se o índice de seletividade (IS) de cada formulação, que mede o quanto um composto é ativo contra o parasita sem causar danos à viabilidade das células dos mamíferos. Para calcular o IS divide-se a CC<sub>50</sub> (para as células) pela CI<sub>50</sub> (para os protozoários). Quanto maior essa razão, mais seletiva é a formulação sobre o parasita e, conseqüentemente, menor efeito ela tem sobre a célula hospedeira do mamífero. A Tabela 15 apresenta os resultados de CC<sub>50</sub>, CI<sub>50</sub> e IS para as formulações que foram testadas no ensaio de eficácia *in vitro*.

**Tabela 15 – Valores de CI<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e Índice de Seletividade (IS) das nanoemulsões (NE) carregadas com anfotericina B 0,2% p/v e da formulação comercial.**

Formulações	CC <sub>50</sub> ± DP (µg/ mL)	CI <sub>50</sub> ± DP (µg/ mL)	IS
NE sem STE	>200	0,21 ± 0,03	> 952
NE com STE 0,1% p/v	6,3 ± 0,8	0,11 ± 0,03	57
Anforicin B <sup>®</sup>	1,0 ± 0,1	0,06 ± 0,01	16

Os valores de CI<sub>50</sub> (**Tabela 15**) mostram que a NE carregada com AmB contendo STE 0,1% tem eficácia leishmanicida estatisticamente igual ao da formulação comercial Anforicin B<sup>®</sup>, enquanto que a NE sem STE apresentou eficácia estatisticamente inferior às demais.

Apesar da NE contendo AmB 0,2% p/v sem STE ter apresentado menor eficácia frente às demais, isso não parece ser relevante tendo em vista o ganho que essa formulação traz em relação à diminuição de toxicidade contra células de mamíferos. O valor de IS é expressivamente maior do que o das demais formulações, o que indica que a NE carregada com AmB 0,2% p/v sem STE tem potencial de seletividade entre células do parasita e células do hospedeiro muito maior.

Essa diminuição de eficácia leishmanicida para formulações lipídicas comparadas à formulação convencional não era inesperada. Há relatos na literatura de estudos nos quais isso foi observado (IMAN *et al.*, 2011; YARDLEY & CROFT, 1997, 2000). Uso de maiores doses de AmB do que àquelas comumente empregadas com AmB-D pode levar à eficácia satisfatória (NELSON *et al.*, 2006).

É conhecido que a formação de complexos entre AmB e carreadores lipídicos induz redução de atividade. Isso geralmente relaciona-se a um “efeito de depósito” promovido por tais carreadores. O sistema micelar AmB-D tem uma organização estrutural mais dinâmica do que sistemas lipídicos, como microemulsões e NE, pois nestes as moléculas de surfactantes estão ancoradas nos glóbulos oleosos da fase interna. Assim, nos sistemas lipídicos, as moléculas de AmB permanecem mais imobilizadas na superfície da fase oleosa. Nesse caso, o processo de liberação do fármaco envolve uma etapa adicional para disponibilizar a AmB. Dessa forma, um “efeito de depósito” é gerado, assim o efeito aparecerá depois (DAMASCENO, 2010).

## 6 CONCLUSÃO

NE carregadas com AmB para o tratamento das leishmanioses foram desenvolvidas, caracterizadas e avaliadas.

O método desenvolvido para determinação da concentração de AmB nas NE por CLAE mostrou-se adequado, atendendo as especificações necessárias.

O diâmetro das NE preparadas sem adição de STE ficou em torno de 185 nm e, com adição de STE, em torno de 170 nm. O IP das formulações foi inferior a 0,25, sendo adequadas para administração endovenosa. A adição de quantidades crescentes de AmB levou à obtenção de NE com características similares de tamanho e IP, sendo que a NE carregada com 0,2% de AmB (2 mg/ mL) foi selecionada para estudos subseqüentes, uma vez que manteve características adequadas (tamanho e IP) para administração endovenosa. O estudo de estabilidade mostrou que as NE carregadas com AmB com ou sem STE foram estáveis, sendo capazes de manter um alto valor de TE de AmB ao longo do tempo.

Dados das análises de DC mostraram que o perfil de agregação da AmB nas NE é diferente da formulação convencional AmB-D. Nas NE, predomina a forma monomérica da AmB, mais ativa contra parasitas e menos tóxica ao hospedeiro, e evidencia-se alterações do espectro UV-Vis condizentes com associação do fármaco aos lípidos da formulação. Em contraste, na formulação convencional, há grande proporção da forma livre oligomérica de AmB, a forma mais tóxica.

Estudos *in vitro* em macrófagos J774 mostraram que a citotoxicidade das NE foi muito menor do que aquela observada para o Anfotericin B<sup>®</sup> (AmB-D). Os dados mostraram também que o aumento da concentração da STE aumenta a citotoxicidade das NE. Em consonância com esses achados e com dados previamente publicados, os estudos de eficácia *in vitro* em macrófagos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mostraram que o aumento da concentração da STE na NE carregada com AmB aumenta a atividade leishmanicida. Em contraste, quando os valores de IS foram

calculados, observa-se que a NE carregada com AmB sem STE apresenta um valor consideravelmente maior do que aquele observado para as demais formulações (AmB-D e NE com 0,1% de STE).

Esses achados sugerem que as NE têm grande potencial para o tratamento parenteral das leishmanioses. Em especial, a NE carregada com AmB e 0% STE parece ser uma opção mais atrativa, uma vez que ela é expressivamente menos citotóxica e consegue manter eficácia leishmanicida considerável, sendo altamente seletiva, capaz de diferenciar as células do hospedeiro e do parasita. Além disso, apresenta características físico-químicas adequadas e estabilidade satisfatória.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BAGINSKI, M.; RESAT, H.; BOROWSKI, E. Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1567, p. 63-78, 2002.

BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, J.; ALI, N. Sterylamine-bearing cationic liposomes kill *Leishmania* parasites through surface exposed negatively charged phosphatidylserine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 103-110, 2008a.

BANERJEE, A.; DE, M.; ALI, N. Complete cure of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in liposomes involves down-regulation of IL-10 and favorable T cell responses. *The Journal of Immunology*, v. 181, p. 1386-1398, 2008b.

BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P.; BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. *European Journal of Dermatology*, v. 5, p. 104-113, 1995.

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

BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.53, p. 193-206, 1999.

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

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

BOLETIS, J.N.; PEFANIS, A.; STATHAKIS, C.; HELIOTI, H.; KOSTAKIS, A.; GIAMARELLOU, H. Visceral leishmaniasis in renal transplant recipients: successful treatment with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clinical Infectious Diseases*, v. 28, p. 1308-1309, 1999.

BOSWELL, G.W.; BUELL, D.; BEKERSKY, I. AmBisome (liposomal amphotericin b): a comparative review. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 38, p. 583-592, 1998.

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

BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, p. 512-531, 1996.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRIME, B.; MORENO, M.A.; FRUTOS, G.; BALLESTEROS, M.P.; FRUTOS, P. Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 91, p. 1178-1185, 2002.

BRIME, B.; MOLERO, G.; FRUTOS, P.; FRUTOS, G. Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and

deoxycholate-amphotericin B in immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 22, p. 451-458, 2004.

BRITISH Pharmacopoeia 2005. London: Her Majesty's Stationary Office, 2005.

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

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

CHÉRON, M.; PETIT, C.; BOLARD, F. Heat-induced formulation of amphotericin B-deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 904-910, 2003.

DAMASCENO, B.P.G.L. Sistema microemulsionado como carreador lipídico para fármacos insolúveis. 130 f. (Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2010.

DAROLE, P.S.; HEDGE, D.D.; NAIR, H.A. Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 9, p. 122-128, 2008.

DAVIDSON, R.N.; MARTINO, L.di; GRADONI, L.; GIACCHINO, R.; GAETA, G.B.; PEMPINELLO, R.; SCOTTI, S.; CASCIO, A.; CASTAGNOLA, E.; MAISTO, A.; GRAMICCIA, M.; CAPRIO, D.di; WILKINSON, R.J.; BRYCESON, A.D.M. Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clinical Infectious Diseases*, v. 22, p. 939-943, 1996.

DAVIES, C.R.; KAYE, P.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, v. 326, p. 377-82, 2003.

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

DEY, T.; ANAM, K.; AFRIN, F.; ALI, N. Antileishmanial activities of stearylamine-bearing liposomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, p. 1739-1742, 2000.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. *Clinical Infectious Disease*, v. 30, p. 653-657, 2000.

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

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

ELDEM, T.; ARICAN-CELLAT, N. Determination of amphotericin B in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 25, p. 53-64, 2001.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S.L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, v. 81, p. 151-157, 2002.

ETTEN, E.W.M.; KATE, M.T.; STEARNE, E.T.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Amphotericin B liposomes with prolonged circulation in blood: in vitro antifungal activity, toxicity and efficacy in systemic candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 1954-1958, 1995.

FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 167-192, 2006.

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

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

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells – A manual of basic technique. 5 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 580 p., 2005.

FUKUI, H.; KOIKE, T.; SAHEKI, A.; SONOKE, S.; SEKI, J. A novel delivery system for amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS<sup>®</sup>). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 265, p. 37-45, 2003.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology*, v. 155, p. 224-230, 2004.

GABRIELSKA, J.; GAGOS, M.; GUBERNATOR, J.; GRUSZECKI, W. Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: a <sup>1</sup>H-RMN study. *FEBS Letters*, v. 580, p. 2677-2685, 2006.

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

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.T.G.; PEREIRA, J.M.B.; RILEY, L.W.; WILSON, M.E.; HO, J.L.; de JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia)*

*braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*, v. 7, p. 7, 2007.

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

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 338-349, 2004.

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

GUPTA, S.; DUBE, A.; VYAS, S.P. Antileishmanial efficacy of amphotericin B bearing emulsomes against experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Drug Targeting*, v. 15, p. 437-444, 2007.

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

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

HEYDENREICH, A.V.; WESTMEIER, R.; PEDERSEN, N.; POULSEN, H.S.; KRISTENSEN, H.G. Preparation and purification of cationic solid lipid nanospheres – effects on particle size, physical stability and cell toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 254, p. 83-87, 2003.

HUNG, C.F.; HWANG, T.L.; CHANG, C.C.; FANG, J.Y. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 289, p. 197-208, 2005.

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

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

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

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

KAWABATA, M.; ONDA, M.; MITA, T. Effect of aggregation of amphotericin B on lysophosphatidylcholine micelles as related to its complex formation with cholesterol or ergosterol. *Journal of Biochemistry*, v. 129, p. 725-732, 2001.

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

LANCE, M.R.; WASHINGTON, C.; DAVIS, S.S. Evidence for the formation of amphotericin B-phospholipid complexes in Langmuir monolayers. *Pharmaceutical Research*, v. 13, p. 1008-1014, 1996.

LARABI, M.; YARDLEY, V.; LOISEAU, M.; APPEL, M.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BORIES, C.; CROFT, S.L.; BARRATT, G. Toxicity and antileishmanial activity of a new

stable lipid suspension of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 3774-3779, 2003.

LARABI, M.; GULIK, A.; DEDIEU, J.P.; LEGRAND, P.; BARRATT, G.; CHERON, M. New lipid formulation of amphotericin b: spectral and microscopic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1664, p. 172-181, 2004.

LAVASANIFAR, A.; SAMUEL, J.; KWON, G.S. Micelles self-assembled from poly(ethylene oxide)-block- poly (N-hexyl stearate l-aspartamide) by a solvent evaporation method: effect on the solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *Journal of Controlled Release*, v. 77, p. 155-160, 2001.

LEE, J. W.; AMANTEA, M. A.; FRANCIS, P. A.; NAVARRO, E. E.; BACHER, J.; PIZZO, P. A.; WALSH, T.J. Pharmacokinetics and safety of a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 713-718, 1994.

LEGRAND, P.; ROMERO, E.A.; COHEN, B.E.; BOLARD, J. Effects of the aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, p. 2518-2522, 1992.

LINCOPAN, N.; BORELLI, P.; FOCK, R.; MAMIZUK, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Toxicity of na effective amphotericin B formulation at high cationic lipid to drug molar ratio. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 58, p. 175-183, 2006.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Size measurements - Manual of Zetasizer 3000HS*. Malvern, UK. MAN 0149 Issue 2, p 7.5, 2000.

MANANDHAR, K.D.; YADAV, T.P.; PRAJAPATI, V.K.; KUMAR, S.; RAI, M.; DUBE, A.; SRIVASTAVA, O.N.; SUNDAR, S. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, p. 376-380, 2008.



MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE REGUMENTAR AMERICANA. Secretaria de Vigilância e Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, Editora MS, 2ª edição, 182 p., 2007.

MAUËL, J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, v.47, p.187-193, 1990.

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

MEYERHOFF, A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 28, p. 42-48, 1999.

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

MORGAN, D.M.L. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods in Molecular Biology*, v. 79, p. 179-183, 1998.

MORIBE, K.; MARUYAMA, S.; INOUE, Y.; SUZUKI, T.; FUKAMI, T.; TOMONO, K.; HIGASHI, K.; TOZUKA, Y.; YAMAMOTO, K. Ascorbyl dimalmitate/PEG-lipid nanoparticles as a novel carrier for hydrophobic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 387, p. 236-243, 2010.

MOUGNEAU, E.; BIHI, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunological Reviews*, v. 240, p. 286-296, 2011.

MOURI, R.; KONOKI, K.; MATSUMORI, N.; OISHI, T.; MURATA, M. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface Plasmon resonance. *Biochemistry*, v. 47, p. 7807-7815, 2008.

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

MULLEN, A.B.; BAILLIE, A.J.; CARTER, K.C. Visceral leishmaniasis in BALB/c mouse: a comparison of the efficacy of a nonionic surfactant formulation of sodium stibogluconate with those of three proprietary formulations of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 2722-2725, 1998.

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

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

NELSON, G.G.; BISHOP, J.V.; RYAN, R.O.; TITUS, R. Nanodisk-associated amphotericin B clears leishmaniasis major cutaneous infection in susceptible balb/c mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 1238-1244, 2006.

NEUBER, H. Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v.9, p. 754-765, 2008.

NEUMANN, A.; CZUB, J.; BAGINSKI, M. On the possibility of the amphotericin B-sterol complex formation in cholesterol- and ergosterol-containing lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry*, v. 113, p. 15875-15885, 2009.

ORDÓNÑEZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M.A.; TORRADO, J.J.; BOLÁS-FERNANDEZ, F.; ALUADA, J.M. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 325-329, 2007.

PAL, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. Combination therapy using sodium antimony gluconate in stearylamine-bearing liposomes against established and chronic

*Leishmania donovani* infection in BALB/c mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 3591-3593, 2004.

PASSERO, L.F.F.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D.; TOYAMA, M.H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* spp. venoms. *Parasitological Research*, v. 101, p. 1365-1371, 2007.

PEREIRA, B.A.S.; ALVES, C.R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Veterinary Parasitology*, v. 158, p. 239-255, 2008.

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

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

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

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analysis – a review. *Chemical biology and drug design*, v. 74, p. 101-120, 2009.

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

ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 5, p. 805-823, 2008.

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

SANTOS, C.M.; OLIVEIRA, R.B.; ARANTES, V.T.; CALDEIRA, L.R.; OLIVEIRA, M.C.; EGITO, E.S.T.; FERREIRA, L.A.M. Amphotericin B-loaded nanocarriers for topical treatment of cutaneous leishmaniasis: development, characterization, and in vitro permeation studies. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2011. *Artigo aceito para publicação.*

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

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, p. 71-80, 2000.

SEOANE, R.; MIÑONES, J.; CONDE, O.; CASAS, M.; IRIBARNEGARAY, E. Molecular organisation of amphotericin B at the air-water interface in the presence of sterols: a monolayer study. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1375, p. 73-83, 1998.

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

SILBERSTEIN, A. Conformational Analysis of Amphotericin B – Cholesterol Channel Complex. *Journal of Membrane Biology*, v. 162, p. 117-126, 1998.

SILVEIRA, F.T. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: Aspectos clínicos e epidemiológicos. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 79, p.25-29, 2009.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; GOMES, C.M.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.31, p.423-431, 2009.

SUNDAR, S.; MEHTA, H.; SURESH, A.V.; SINGH, S.P.; RAI, M.; MURRAY, H.W. Amphotericin B treatment for indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, p. 377-383, 2004.

SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MÜLLER, R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 83–90, 2004.

THE ZETA POTENTIAL. *Colloidal dynamics: eletroacustics tutorials*. 1999. Disponível em: <<http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDEITut1.pdf>>. Acesso em: 15 de janeiro 2011.

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

VAKIL, R.; KWON, G.S. Effects of cholesterol on the release of amphotericin B from PEG-Phospholipid Micelles. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, p. 98-104, 2007.

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

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

WALSH, T.J.; FINBERG, R.W.; ARNDT, C.; HIEMENZ, J.; SCHWARTZ, C.; BODENSTEINER, D.; PAPPAS, P.; SEIBEL, N.; GREENBERG, R.N.; DUMMER, S.;

SCHUSTER, M.; HOLCENBERG, J.S. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *The New England Journal of Medicine*, v. 340, 9. 764-771, 1999.

WEYENBERG, W.; FILEV, P.; VAN DEN PLAS, D.; VANDERVOORT, J.; DE SMET, K.; SOLLIE, P.; LUDWIG, A. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 337, p. 291-298, 2007.

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

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

.