



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Gabriela Muniz Felix Araújo

**NANOEMULSÕES DE ANFOTERICINA B: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

Campina Grande – PB

2013

Gabriela Muniz Felix Araújo

**NANOEMULSÕES DE ANFOTERICINA B: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

Co-orientador: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva

Campina Grande – PB

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

A658n Araújo, Gabriela Muniz Felix.
Nanoemulsões de Anfotericina B. [manuscrito] :
desenvolvimento, caracterização e atividade leishmanicida /
Gabriela Muniz Felix Araújo. – 2013.
57 f. : il. color.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-
Graduação e Pesquisa, 2013.

“Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de
Lima Damasceno, Departamento de Farmácia”.

“Co-Orientação: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva,
Departamento de Farmácia”.

1. Anfotericina B. 2. Leishmaniose visceral. 3.
Nanoemulsões. I. Título.

21. ed. CDD 616.936 4

Gabriela Muniz Felix Araújo

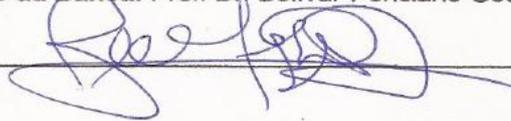
**NANOEMULSÕES DE ANFOTERICINA B: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos.

Data de aprovação: 07/05/2013

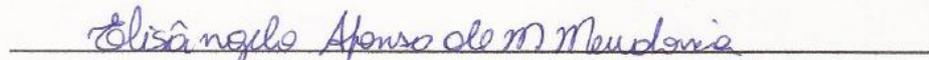
BANCA EXAMINADORA

Presidente da Banca: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno



Membros Titulares:

Membro Interno: Prof. Dra. Elisângela Afonso de Moura Mendonça (Universidade Estadual da Paraíba - UEPB)



Membro Externo: Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga (Universidade de Pernambuco - UPE)



Aos meus pais, Robson e Socorro;

Aos meus irmãos, Felipe, Caio e Vinícius;

Ao meu esposo, Jeanderson,

DEUSCO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Criador dos céus e da terra, meu Pai, que esteve e sempre estará ao meu lado, me protegendo e me guiando por toda vida. Por todas as bênçãos, ensinamentos e revelações. Sem Ele, eu não teria realizado este trabalho. Ao Senhor, toda honra e toda glória!

Aos meus amados pais, Robson e Socorro, por todo amor, dedicação e apoio incondicionais. Vocês são minhas essências, meu porto seguro, minhas fontes de inspiração. O mínimo que posso fazer, além de amá-los, é procurar trazer-lhes alegria e sei que se orgulham quando nos comprometemos com os estudos. Portanto, essa é mais uma etapa da minha vida, em especial, para vocês.

Aos meus irmãos, Felipe, Caio e Vinícius, por serem verdadeiros presentes de Deus na minha vida. Não saberia viver sem vocês!

Ao meu esposo, Jeanderson, por todos esses anos juntos, pelo amor, pelo apoio e incentivo em todas as horas, pela paciência nas horas difíceis, por aceitar e respeitar minhas decisões, por suportar a distância e a minha ausência, necessárias para concretização deste trabalho e por cuidar de mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, por me receber no seu laboratório, por acreditar no meu potencial e confiar em mim. Pelos ensinamentos, dedicação e compromisso com o nosso trabalho. Pela paciência, pelo seu ar sereno e amigável que tornam o ambiente acolhedor, por toda compreensão, por estar sempre disposto a nos ajudar, meu muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Alexsandro da Silva, por fazer parte desse trabalho, pelos ensinamentos e, especialmente, pela dedicação com que conduziu o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter se empenhado para que o mesmo fosse aprovado pela CAPES, fato imprescindível para que nós pudessemos estar, hoje, agradecendo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela dedicação em transmitir-nos o conhecimento.

A minha amiga e colega de bancada, Alexandra Apolinário, por me honrar com sua amizade, pelo companheirismo e auxílio sempre que precisei. Você, sua cientista nata, me mostrou o que é ser uma pesquisadora, me revelou como pode ser simples fazer ciência e me ensinou que nada é impossível para aqueles que amam e acreditam no que fazem.

Às minhas alunas de iniciação científica, Alana Albuquerque, Ana Cláudia Gonçalves, Jéssica Ohanna, pela amizade e dedicação, pelo auxílio sempre que necessitei. Vocês foram essenciais na construção desse trabalho.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), por compartilharem comigo momentos tão agradáveis, por todo carinho e amizade.

A todos os meus colegas do mestrado, em especial, a Danielle Rocha, Jamilly Kelly, Michelle Pedrosa, João Paulo Malheiro, Geovani Pereira, Josenildo Segundo Chaves, Juliana Luna, Ravelly Lucena, Cynthia Layse, Katharina Porto, Jéssica Almeida, Gilzie Késsia, Yuri Basílio, Natan Emanuell, Airla Laana, que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente com as minhas pesquisas, que compartilharam momentos de alegria, ansiedade e/ou aflições, quer seja na preparação para as provas e seminários, nas viagens para os congressos e para realização dos experimentos, quer na bancada do laboratório. Com vocês, essa jornada se tornou mais fácil.

A Prof. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, pelos conselhos e orientações concedidos quando a procurei, antes mesmo de haver seleção para o mestrado, e pela gentileza de abrir as portas do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios em Medicamentos (LABDEM) sempre que precisamos.

A minha prima-irmã, Andressa Muniz, pelo exemplo de garra e determinação, pelo apoio, carinho e companheirismo.

À equipe do Laboratório de Certificação de Biomateriais (CERTBIO) da UEPB, em especial, a Lidiane Correia e Paulo Dantas, pela amizade e por terem conduzido os ensaios de análise térmica.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), na pessoa da Prof. Dra. Karina Saraiva, pela sempre simpática disposição em receber nossas amostras e por ter obtido as imagens por microscopia eletrônica de transmissão.

A Prof. Dra. Louisianny Guerra da Rocha, do Laboratório de Ensaaios Antiparasitários e de Radiobiologia Experimental da UFRN, por ter aceitado participar desse trabalho, pela gentileza com que nos recebeu em seu laboratório e pela paciência com que nos orientou nos ensaios de atividade leishmanicida.

À equipe do Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) da UFRN, em especial, a Walteçá Silveira e Nednaldo Dantas, pela recepção amigável e por terem cooperado com a técnica do espalhamento dinâmico de luz.

Aos que compõem o Laboratório Multiusuário de Imagens da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pelas análises das formulações através da técnica de microscopia de luz polarizada;

A todos os servidores da UEPB, especialmente a Aldeangela Gama, atual secretária do PPGCF, e a Gizelda Ferreira, pela amizade e por sempre terem se disposto a ajudar nos assuntos acadêmicos.

A CAPES, pela bolsa de estudos.

Resumo

A leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo. Sua forma clínica mais grave, denominada visceral, se não tratada, pode ser fatal. A terapia convencional baseia-se na utilização de antimoniais pentavalentes e inclui a anfotericina B (AmB) como fármaco de segunda escolha. A formulação micelar de AmB, embora efetiva está associada a relatos de toxicidade aguda e crônica. Formulações lipídicas surgiram para contornar tais inconvenientes, porém o alto custo envolvido limita o amplo uso dessas preparações. Sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados, como as nanoemulsões (NE), possuem comprovada habilidade em solubilizar compostos hidrofóbicos, melhorar absorção e biodisponibilidade, incrementar a eficácia e reduzir a toxicidade dos fármacos encapsulados. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de NE para incorporação de AmB. As NE foram formuladas pelo método de sonicação, através do emprego da mistura dos tensoativos Kolliphor[®] HS 15 e Brij[®] 52 com o óleo miristato de isopropila. Adicionou-se a AmB diretamente nas amostras, sob agitação magnética, com o emprego de soluções básicas e ácidas para solubilização do fármaco e ajuste do pH final. Todas as NE tiveram pH neutro e condutividade condizente com sistemas óleo em água, além de comportamento isotrópico. As NE apresentaram estruturas de formato esférico, com potencial zeta negativo e distribuição de tamanho monomodal. O diâmetro médio das gotículas com o fármaco variou de 33 a 132nm. A análise térmica revelou que a AmB não foi capaz de alterar o comportamento térmico do sistema, possivelmente por estar dispersa na fase interna. Com relação aos testes de estabilidade preliminar, a centrifugação provocou a precipitação do fármaco. O estresse térmico levou à turvação das amostras. Ao final do ciclo gelo-degelo todas as amostras mantiveram sua transparência. A AmB-NE mostrou eficácia leishmanicida estatisticamente igual a da formulação de AmB micelar, o que a habilita para futuros ensaios para avaliar sua toxicidade e comprovar sua eficácia também sobre formas amastigotas, com a finalidade de torná-la uma alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Anfotericina B. Leishmaniose visceral. Nanoemulsões.

Abstract

Leishmaniasis is one of the most neglected diseases in the world. Its most severe clinical form, called visceral, if left untreated, can be fatal. Conventional therapy is based on the use of pentavalent antimonials and includes amphotericin B (AmB) as a second choice drug. The micellar formulation of AmB, although effective, is associated acute and chronic toxicity. Commercially available lipid formulations emerged to overcome such drawbacks, but the high cost involved limits widespread use of these preparations. Nanosized drug delivery systems, such as nanoemulsions (NE), have proven ability to solubilize hydrophobic compounds, to improve absorption and bioavailability, to increase efficacy and to reduce toxicity of the encapsulated drug. NE become even more attractive because they are inexpensive and easily produced. The aim of this work was to develop NE to incorporate AmB. NE were made by sonication method, through a mixture of surfactants, Kolliphor® HS 15 and Brij® 52, with the oil isopropyl myristate. AmB was added directly to the samples under magnetic stirring, using acidic and basic solutions to solubilize the drug and for adjustment of final pH. All NE showed neutral pH, values of conductivity were consistent with oil in water systems, and isotropic behavior. NE presented spherical structures with negative zeta potential value, monomodal size distribution and average diameter of the droplets with drug ranged from 33 to 132nm. Thermal analysis showed that AmB was not able to modify the behavior of the system, possibly to be dispersed in the internal phase. With respect to preliminary stability tests, centrifugation caused precipitation of the drug, heat stress led to turbidity of samples and at the end of the freeze-thaw cycle all samples maintained their transparency. AmB-NE showed similar statistically antileishmanial activity to AmB micellar formulation, which enables those systems to further tests, to assess their toxicity and also prove its effectiveness on amastigotes, in order to offer them as an alternative for the treatment of visceral leishmaniasis.

Keywords: Amphotericin B. Nanoemulsions. Visceral leishmaniasis.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura química da molécula de AmB	19
Figura 2 – Estruturas químicas das moléculas do colesterol e ergosterol.....	22
Figura 3 – Estrutura química do Kolliphor [®] HS 15.....	27
Figura 4 – Estrutura química da molécula do miristato de isopropila	30
Figura 5 – Diagramas de fases pseudoternários dos sistemas contendo KHS15/Brij [®] 52 nas proporções 1:9 (A), 3:7 (B), 5:5 (C) e 7:3 (D)	42
Figura 6 – Diagrama de fases pseudoternário do sistema contendo KHS15/Brij [®] 53 na proporção 9:1 destacando os pontos selecionados numerados de 1 a 5.....	43
Figura 7 – Fotomicrografias dos sistemas nanoemulsionados (Blank-NE)	49
Figura 8 – Fotomicrografias dos sistemas nanoemulsionados contendo o fármaco (AmB-NE).....	49
Figura 9 – Fotomicrografia obtida por MET da Blank-NE 5 com destaque para <i>zoom</i> <i>da gotícula</i>	50
Figura 10 – Fotomicrografia obtida por MET da AmB-NE 5 com destaque para <i>zoom</i> <i>de uma das gotículas</i>	51
Figura 11 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 1.....	54
Figura 12 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 2.....	55
Figura 13 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 3.....	55
Figura 14 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 4.....	55
Figura 15 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 5.....	56
Figura 16 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do KHS15.....	60
Figura 17 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do Brij [®] 52	60
Figura 18 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do miristato de isopropila	61
Figura 19 – Curva DSC (A) e curva TG (B) da AmB	62
Figura 20 – Curvas DSC da Blank-NE 5 (A) e da NE-AmB 5 (B).....	63
Figura 21 – Curvas TG da Blank-NE 5 (A) e da NE-AmB 5 (B).....	63
Figura 22 – Fotografia das formulações após centrifugação a 1000rpm (70g) por 15min	65
Figura 23 – Fotografia das formulações após centrifugação a 2500rpm (440g) por 15min	65
Figura 24 – Fotografia das formulações Blank-NE após centrifugação a 3500rpm (863g) por 15min	66

Figura 25 – Fotografia das formulações AmB- NE após centrifugação a 3500rpm (863g) por 15min	66
Figura 26 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE antes de serem submetidas ao estresse térmico.....	68
Figura 27 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 40°C por 30min	68
Figura 28 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 50°C por 30min	69
Figura 29 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 60°C por 30min	69
Figura 30 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 70°C por 30min	70
Figura 31 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 80°C por 30min	70
Figura 32 – Fotografia das formulações antes de serem submetidas ao ciclo gelo-degelo	71
Figura 33 – Fotografia das formulações Blank-NE ao final do ciclo gelo-degelo.....	71
Figura 34 – Fotografia das formulações AmB-NE ao final do ciclo gelo-degelo.....	72
Figura 35 – Curvas da concentração de AmB micelar (A) e AmB-NE 5 (B) versus logaritmo do número de células viáveis por mL	73

Lista de tabelas

Tabela 1 – Valor de EHL para cada proporção de tensoativos utilizada nos diagramas de fase pseudoternários	44
Tabela 2 – Composição percentual (p/p) das formulações de nanoemulsões	45
Tabela 3 – Eficiência de incorporação (EI) da AmB nas nanoemulsões antes e após filtração.....	46
Tabela 4 – Eficiência de incorporação (EI) da AmB nas nanoemulsões antes e depois da centrifugação a 11000g por 10min.....	47
Tabela 5 – pH das nanoemulsões antes (Blank-NE) e após incorporação da AmB (AmB-NE).....	47
Tabela 6 – Condutividade das nanoemulsões antes (Blank-NE) e após incorporação da AmB (AmB-NE)	48
Tabela 7 – Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por espalhamento dinâmico de luz	52

Lista de abreviaturas

A/O	Água em óleo
ABCD	Dispersão coloidal de AmB
ABLC	Complexo lipídico de AmB
AmB	Anfotericina B
ASC	Área sob a curva
CE ₅₀	Concentração efetiva mediana
DE ₅₀	Dose efetiva média
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	Dimetilformamida
DMPC	Diesteroilfosfatidilcolina
DMPG	Diesteroilfosfatidilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
EI	Eficiência de incorporação
FDA	<i>U.S Food and Drug Administration</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IP	Índice de polidispersão
KHS15	Kolliphor [®] HS 15
LV	Leishmaniose visceral
MCT	Triglicerídeos de cadeia média
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MIP	Miristato de isopropila
NE	Nanoemulsões
O/A	Óleo em água
OMS	Organização Mundial da Saúde
PF	Ponto de fusão
p-HEMA	Poli-hidroxietil metacrilato
PIT	<i>Phase Inversion Temperature</i>
PTA	Ácido fosfotúngstico
TG	Termogravimetria

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão de literatura	17
2.1 Leishmaniose	17
2.2 Anfotericina B	19
2.3 Nanoemulsões	24
2.3.1 Constituintes das nanoemulsões	26
2.3.1.1 Tensoativos	26
2.3.1.2 Fase oleosa	29
3. Objetivos	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. Materiais e métodos	32
4.1 Materiais	32
4.1.1 Matérias-primas, reagentes e solventes	32
4.1.2 Equipamentos	32
4.2 Métodos	33
4.2.1 Construção dos diagramas de fase pseudoternários	33
4.2.2 Incorporação da anfotericina B nas nanoemulsões	33
4.2.3 Eficiência de incorporação da anfotericina B nas nanoemulsões	34
4.2.4 Caracterização físico-química das nanoemulsões	34
4.2.4.1 Determinação do pH	34
4.2.4.2 Determinação da condutividade	34
4.2.4.3 Microscopia de luz polarizada	34
4.2.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	35
4.2.4.5 Determinação do diâmetro, índice de polidispersão e potencial Zeta das gotículas por espalhamento dinâmico de luz	35
4.2.4.6 Análise térmica	36
4.2.4.6.1 Termogravimetria (TG)	36
4.2.4.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	36
4.2.5 Avaliação da estabilidade preliminar	37
4.2.5.1 Centrifugação	37

4.2.5.2 Estresse térmico.....	37
4.2.5.3 Ciclo gelo-degelo.....	37
4.2.6 Atividade leishmanicida	38
4.2.7 Análises estatísticas	38
<u>5. Resultados e discussão</u>	40
5.1 Construção dos diagramas de fase pseudoternários	40
5.2 Incorporação da AmB nas nanoemulsões	45
5.3 Eficiência de incorporação da AmB nas nanoemulsões	46
5.4 Caracterização físico-química das nanoemulsões.....	47
5.4.1 Determinação do pH	47
5.4.2 Determinação da condutividade	48
5.4.3 Microscopia de luz polarizada	48
5.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	49
5.4.5 Determinação do diâmetro, índice de polidispersão e potencial Zeta das gotículas por espalhamento dinâmico de luz	52
5.4.6 Análise térmica.....	59
5.5 Avaliação da estabilidade preliminar.....	63
5.6 Atividade leishmanicida.....	72
<u>6. Conclusão</u>	75
<u>7. Referências</u>	76

1. Introdução

A leishmaniose, doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*, se manifesta através de várias formas clínicas: desde lesões cutâneas, as quais podem se curar espontaneamente, até a forma visceral, que se não tratada é fatal. A leishmaniose visceral é a forma mais severa, pois os parasitos migram para órgãos vitais e provocam febre prolongada, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (BRASIL, 2006).

A doença é transmitida através da picada da fêmea dos mosquitos, conhecidos como flebotomíneos, infectados com o protozoário em sua forma promastigota. O parasito é então internalizado via macrófagos no fígado, baço e medula óssea, onde encontra as condições apropriadas para se transformar na forma amastigota (BURCHMORE & BARRET, 2001).

O arsenal terapêutico para esta doença é escasso, sendo representado por fármacos, em geral, tóxicos e pouco tolerados como os antimoniais pentavalentes, a miltefosina, a paromomicina, pentamidina e anfotericina B.

A anfotericina B (AmB), fármaco de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose, possui elevada incidência de reações adversas quando administrada na forma convencional (micelas de desoxicolato de sódio contendo AmB). Formulações lipídicas, baseadas na nanotecnologia, foram desenvolvidas para contornar tais obstáculos, mas seu alto custo tem limitado o amplo uso dessas preparações, especialmente, em países como o Brasil (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

Nanocarreadores coloidais proporcionam a liberação do fármaco no sítio de ação desejado (célula, tecido ou órgão), minimizando os efeitos colaterais que, geralmente, acompanham os medicamentos convencionais (MOGHIMI *et al.*, 2001; NAKAOKA *et al.*, 1997). Além disso, o uso de tais sistemas de liberação tem proporcionado melhorias nas características de solubilidade, estabilidade, absorção e biodisponibilidade dos fármacos encapsulados (BARRAT & BRETAGNE, 2007; BRIME *et al.*, 2002; DAMASCENO *et al.*, 2012; DAS & SURESH, 2011; GAO *et al.*, 2011; KHANDAVILLI & PANCHAGNULA, 2007).

Dentre os vários sistemas nanoestruturados atualmente conhecidos, as nanoemulsões (NE) têm sido utilizadas com sucesso como veículos para uma grande variedade de fármacos, inclusive para os de solubilidade limitada nas

formulações convencionais, como os hidrofóbicos. Além de possuírem propriedades farmacêuticas e biológicas bem atraentes como biodegradabilidade, biocompatibilidade, estabilidade física e facilidade de produção (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000). NE podem ser classicamente definidas como uma dispersão nanométrica de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa [NE óleo em água (NE O/A)], estabilizada por um sistema tensoativo adequado, cujo tamanho das gotículas varia entre 20-500nm (PEY *et al.*, 2006). O fármaco veiculado encontra-se, nesse caso, incorporado e/ou adsorvido no núcleo oleoso da nanoestrutura. Sistemas nanoemulsionados do tipo água em óleo (A/O) também existem, quando a fase dispersante é o óleo (ARAÚJO *et al.*, 2011; BHATT *et al.*, 2013; CONSTANTINIDES *et al.*, 2008).

Com base nestas considerações, percebemos a necessidade do desenvolvimento de novos sistemas carreadores de AmB menos tóxicos e de custo viável e, com esse intuito, acreditamos no potencial das NE como seu promissor carreador. Nesse trabalho foram desenvolvidas e caracterizadas NE contendo AmB. A eficácia leishmanicida dessas formulações foi avaliada *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania chagasi*. Além disso, estudos de estabilidade preliminar também foram realizados.

2. Revisão de literatura

2.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente os mais pobres. A doença pode apresentar uma ampla variedade de formas clínicas, que caracterizam as formas cutânea, mucocutânea ou visceral. É considerada primariamente como uma zoonose, podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave e quando não tratada, a taxa de mortalidade pode chegar a 100% em 2 anos (WHO, 2010). Esta doença tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde também é denominada leishmaniose visceral americana ou calazar neo-tropical (BRASIL, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas apresentem risco de contrair leishmaniose. A cada ano, ocorrem dois milhões de novos casos, sendo 500 mil de leishmaniose visceral, 90% desses casos concentrados no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2007). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que a maior parte dos casos ocorre no Brasil, especialmente na Região Nordeste (BRASIL, 2006).

Os seus agentes etiológicos são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocitário mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados. No continente americano, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com LV (BRASIL, 2006).

As opções de tratamento da leishmaniose visceral são limitadas. No Brasil, o antimoniato pentavalente N-metil glucamina (Glucantime[®]) é o fármaco de escolha para o tratamento da LV em virtude de sua comprovada eficácia terapêutica. A AmB é a única opção no tratamento de gestantes e está indicada como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou tenham apresentado toxicidade

ou refratariedade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2006).

O principal efeito colateral do antimoniato-N-metil glucamina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Portanto, é contra-indicado em pacientes que fazem uso de beta-bloqueadores e antiarrítmicos, pacientes com insuficiência renal ou hepática, em mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres da gestação (BRASIL, 2006).

Outros fármacos, como pentamidina, miltefosina e paromomicina, foram introduzidas no tratamento da leishmaniose visceral, principalmente na Europa, Ásia e África.

O isotianato de pentamidina foi inicialmente utilizado, na Índia, nos casos de calazar resistente aos antimoniais pentavalentes. Sua eficácia é inferior a dos antimoniais pentavalentes e AmB e seus efeitos colaterais maiores. Apresenta uma desvantagem considerável, já que causa diabetes mellitus dependente de insulina, de forma irreversível. Além disso, apresenta baixos níveis de eficácia (apenas 70%), o que tem levado ao seu abandono na Índia (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006).

A entrada da miltefosina no arsenal terapêutico da leishmaniose foi considerada como um marco, pois pela primeira vez um agente leishmanicida de uso oral foi identificado. Estudos clínicos fase I e II na Índia tem confirmado sua eficácia. Algumas limitações incluem a indução de distúrbios gastrointestinais, como vômitos e diarreia (em 40% e 15-20% dos pacientes, respectivamente) e toxicidade renal. Como a miltefosina é teratogênica, está contra-indicada na gravidez. Sua meia-vida prolongada (150-200 horas) pode contribuir para o advento de resistência (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006).

Paromomicina tem sido empregada isolada ou em combinação com antimoniais pentavalentes tendo, esta última opção, demonstrado superioridade em vários estudos realizados na Índia. Um estudo multicêntrico fase III na Índia mostrou que a paromomicina é uma opção de tratamento eficaz, acessível e segura e, por isso, foi aprovada para leishmaniose visceral naquele país (MUSA *et al*, 2010). Efeitos adversos que foram mais comuns entre pacientes recebendo paromomicina do que entre aqueles que receberam AmB (6% vs. 2%, $P=0,02$) incluíram elevação transitória dos níveis de aspartato aminotransferase (3 vezes maior do que o limite superior da faixa normal); ototoxicidade transitória reversível (2% vs.0, $P=0,2$) e dor no local da injeção (SUNDAR *et al*, 2007). Musa *et al*. (2010) afirmam que a eficácia

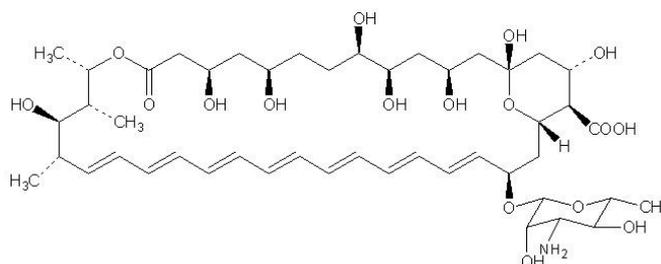
da paromomicina pode variar bastante entre as regiões geográficas e, assim, diferentes doses podem ser necessárias para se obter níveis de eficácia semelhantes.

2.2 Anfotericina B

A AmB foi descoberta em 1953 por Gold e colaboradores, que estudavam uma cepa de *Streptomyces nodosus*, um actinomiceto obtido no vale do rio Orinoco, na Venezuela. Pertence à classe dos compostos macrolídicos poliênicos, sendo considerada a melhor opção de fármaco para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e tem excelente atividade leishmanicida (BENNETT, 2005; CHATTOPADHYAY & JAFURULLA, 2011; COHEN, 1998).

A molécula da AmB apresenta uma estrutura química complexa (Figura 1). Ela exibe um caráter lipofílico devido à cadeia constituída de sete duplas ligações conjugadas não-substituídas e um caráter hidrofílico relacionado à presença de sete hidroxilas livres em sua estrutura. Portanto, a AmB exibe propriedades anfifílicas. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina, ligado ao anel principal por uma ligação glicosídica, com um aminogruppo livre. Por outro lado, é anfotérica devido à existência dos grupos carboxila e amina, que apresentam carga em pH neutro. O nome anfotericina deriva desta característica anfotérica de sua estrutura molecular, formando sais solúveis tanto em meio ácido como em meio básico. A AmB apresenta um perfil de solubilidade limitado, sendo praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em alcoóis e solúvel em solventes orgânicos, como dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF). Pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, que abrange os fármacos de reduzidas solubilidade e permeabilidade (BARRATT & BRETAGNE, 2007; BHATTACHARYYA & BAJPAI, 2012; FILIPPIN & SOUZA, 2006; MAZERSKI *et al.*, 1990).

Figura 1 – Estrutura química da molécula de AmB



Fonte: DAMASCENO, 2010.

Na água, a AmB se agrega, primeiramente, pela formação de dímeros por aposição de duas faces hidrofóbicas, e assim, progressivamente, formando agregados maiores (MAZERSKI *et al.*, 1990). Esta insolubilidade em meio aquoso é a causa de sua baixa biodisponibilidade por via oral. A formulação convencional de AmB (Fungizone[®]), disponível desde 1958, consiste em um sistema micelar associado ao desoxicolato de sódio, tensoativo capaz de aumentar a solubilidade do fármaco. O medicamento, na forma de pó liofilizado, é reconstituído em 10mL de soro glicosado 5%, formando uma dispersão micelar. Entretanto, o sistema não é homogêneo, podendo apresentar em sua constituição três formas estruturais diferentes: monomérica, oligomérica e agregados de AmB e desoxicolato. A administração intravenosa deve ser lenta, de 4 a 6 horas de duração, para prevenir reações adversas associadas à própria infusão. As doses administradas variam de 0,5 a 1 mg/kg/dia. A AmB após reconstituição é estável por 24 horas à 25°C e por uma semana a 4°C. Contudo, efeitos colaterais limitantes de dose são frequentes, sendo a nefrotoxicidade um dos mais graves (BARRATT & BRETAGNE, 2007; FILIPPIN & SOUZA, 2006; PESTANA, 2009).

A AmB exibe toxicidade aguda, relacionada à infusão, e toxicidade crônica, manifestada pela nefrotoxicidade (ANTONIADOU & DUPONT, 2005). Os efeitos adversos relacionados à infusão incluem febre, calafrios, náuseas, hipotensão ou hipertensão e arritmias cardíacas. Essas reações podem ser consequência da ação do fármaco sobre o sistema imunológico, especialmente devido à modulação das funções dos macrófagos (BARRATT & BRETAGNE, 2007; HANN & PRENTICE, 2001; INSELMANN *et al.*, 2002; MISTRO *et al.*, 2012). Estudos apontam que a incidência de nefrotoxicidade é bastante alta, variando entre 49-65%, sendo definida pela elevação, em duas vezes, dos níveis séricos de creatinina (ANTONIADOU & DUPONT, 2005; DERAY, 2002; WINGARD *et al.*, 1999).

São apontados dois mecanismos básicos envolvidos no desencadeamento da nefrotoxicidade. O primeiro é um mecanismo vascular, causando vasoconstrição, com disfunção do fluxo sanguíneo renal, e o segundo é resultado de lesão estrutural direta à célula tubular. Da ação conjunta desses dois processos resultam a redução da taxa de filtração glomerular, os distúrbios hidroeletrolíticos e ácido-básicos (BERDICHEVSKI, 2003; DERAY, 2002).

Infelizmente, ambos os efeitos terapêuticos e tóxicos da AmB advêm de sua interação com os esteróis das membranas celulares: ergosterol nos fungos e

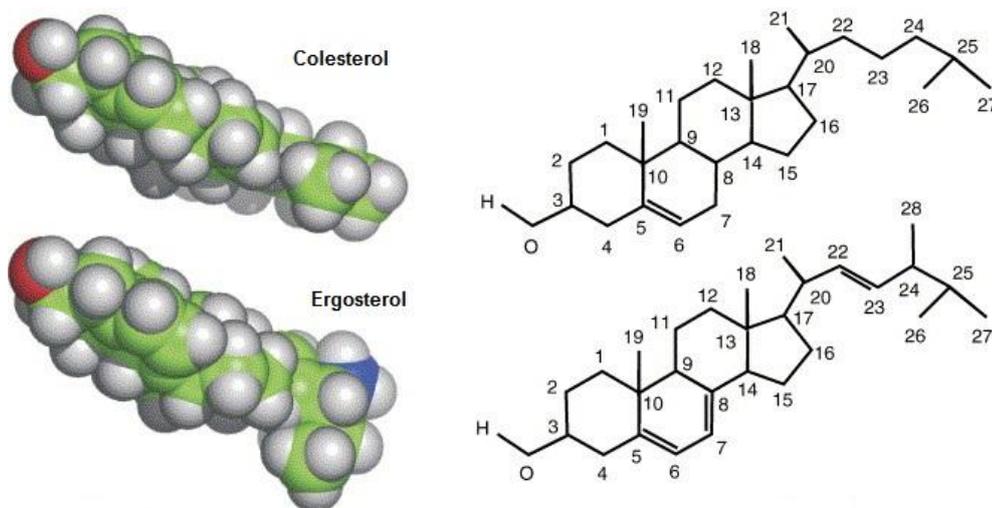
colesterol nos mamíferos, resultando na formação de estruturas semelhantes a canais (poros) transmembrana que alteram a permeabilidade celular, permitindo o escape de íons e metabólitos, principalmente íons potássio, provocando um desequilíbrio eletrolítico e homeostático, resultando em morte celular (BOLARD *et al.*, 1991; BRAJTBURG *et al.*, 1990). O complexo AmB-esteróides tem sido descrito como um arranjo circular de, aproximadamente, oito moléculas de AmB interagindo com igual número de moléculas do esteróide. A parte externa do complexo é hidrofóbica, sendo formada pelas cadeias poliênicas em contato com os lipídeos da membrana, e o seu interior é hidrofílico devido à presença dos grupos hidroxila das moléculas de AmB (CHATTOPADHYAY & JAFURULLA, 2011; KLEINBERG, 2006).

Em estudo com membranas bilamelares, comparou-se a capacidade de formação de canais iônicos de AmB frente a membranas contendo ergosterol, colesterol e na ausência destes esteróides. Constatou-se que AmB, tanto na forma monomérica quanto agregada, pode formar canais em membranas contendo ergosterol, mas somente a forma auto-associada originou tais canais em membranas contendo colesterol. Bolard *et al.* (1991) afirmam que os monômeros de AmB são muito curtos para interagir com o colesterol e formar canais transmembrana, por sua vez o arranjo cabeça-cauda dos oligômeros aumenta o comprimento do conjunto e permite a formação dos poros. Portanto, a forma estrutural da AmB apresenta um papel-chave na formação de canais nas membranas (FILIPPIN & SOUZA, 2006; HUANG *et al.*, 2002).

Colesterol e ergosterol são moléculas muito semelhantes (Figura 2), diferindo apenas pela presença, no ergosterol, de um grupo metila adicional, além de uma dupla ligação na cadeia lateral e outra dupla ligação no núcleo esteroide (HUANG *et al.*, 2002).

A maior afinidade da AmB por ergosterol é explicada pela existência da ligação dupla no carbono 22 do esteroide, o que lhe confere uma forma plana, que favoreceria o contato com o antibiótico, através das forças de van der Waals. Em contraste, a forma plana é apenas uma das possíveis conformações assumidas para o colesterol, já que a inexistência da dupla ligação na sua cadeia lateral torna a molécula mais flexível, dificultando as interações entre os compostos (BARRATT & BRETAGNE, 2007; BRAJTBURG *et al.*, 1990).

Figura 2 – Estruturas químicas das moléculas do colesterol e ergosterol



Fonte: Adaptado de PENCER *et al.*, 2005

Sabendo que a forma de associação monomérica da AmB apresenta uma capacidade muito pequena de formar poros em membranas constituídas de colesterol, podemos inferir que a AmB no estado de associação monomérico deve apresentar menor toxicidade. Portanto, uma formulação que assegure que o fármaco seja liberado apenas como monômeros, certamente, promoverá um índice terapêutico maior.

Antes do advento de novas formulações de AmB, os médicos frequentemente reduziam as doses diárias de AmB convencional ou passavam a administrá-la em dias alternados, para mitigar as chances de ocorrência de nefrotoxicidade naqueles pacientes que apresentavam aumento dos níveis séricos de creatinina no decorrer do tratamento. Porém, a redução da dosagem de AmB aumentava os riscos de falhas na terapia antifúngica. Outras estratégias, sem sucesso, para prevenir nefrotoxicidade também foram documentadas, como a mistura de AmB com emulsões lipídicas (Intralipid[®]), co-administração de diuréticos e aumento da taxa de infusão (DERAY, 2002; KLEINBERG, 2006).

Dessa forma, por mais de vinte anos, as pesquisas tem sido direcionadas para reformular a AmB, pela substituição do desoxicolato de sódio por outros constituintes que melhorem sua tolerabilidade e eficácia (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

No final da década de 90, três formulações lipídicas tiveram seus registros aprovados pelo *U.S Food and Drug Administration* (FDA). Essas formulações lipídicas compartilham a característica primordial de reduzirem a incidência de nefrotoxicidade, quando comparadas com a formulação convencional, porém o

mecanismo exato ainda é desconhecido. Presume-se que com o uso das formulações lipídicas, as quantidades do fármaco livre e, por conseguinte, disponível para se ligar às células epiteliais renais, sejam menores, levando-se em consideração que as células dos mamíferos são afetadas somente por altas concentrações de AmB livre (KLEINBERG, 2006). Além disso, sabe-se que a forma agregada é a grande responsável pela toxicidade da AmB e nos sistemas lipídicos a AmB apresenta-se incorporada em sua forma monomérica acarretando em uma menor toxicidade (BARRAT & BRETAGNE, 2007; TORRADO *et al.*, 2007).

ABLC, a primeira formulação lipídica aprovada pelo FDA, em 1995, consiste num complexo lipídico com AmB de estrutura multilamelar “*ribbon-like*”, constituído de diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) em razão molar de 7:3 com 36 mol% de AmB (Abelcet[®]).

Piñero *et al.* (2002) compararam a suscetibilidade de cepas de *Leishmania infantum* isoladas de pacientes HIV-positivos a Abelcet[®] e Fungizone[®]. Os experimentos mostraram que Abelcet[®] teve uma maior atividade leishmanicida do que Fungizone[®] sobre as formas promastigotas, como também sobre as amastigotas.

Hooshmand-Rad *et al.* (2005) analisaram mais de 500 casos de pacientes idosos imunocomprometidos em tratamento de infecção fúngica invasiva. Os autores puderam demonstrar que ABLC e AmB convencional foram igualmente efetivas, mas a formulação lipídica provocou menor incidência de toxicidade renal.

ABCD, uma dispersão coloidal de AmB em sulfato de coleslerila sódica em razão molar 1:1, formulada em partículas discoides, obteve sua aprovação pelo FDA em 1996, sob o nome comercial de Amphocil[®]. No ano seguinte, Ambisome[®], uma preparação lipossômica de vesículas unilamelares pequenas, constituídas de fosfatidicolina de soja, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol e AmB, em razão molar de 2:1:0,8:0,4, também foi aprovada (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

Um estudo clínico randomizado comparando a segurança e eficácia de Ambisome[®] e Abelcet[®] foi publicado por Wingard *et al.* (2000). Duzentos e quarenta e quatro pacientes neutropênicos e com estado febril constante foram tratados com AmBisome[®] (3 ou 5mg/kg/dia) ou Abelcet[®] (5mg/kg/dia). O tratamento empírico foi bem sucedido em todos os grupos avaliados, mas os pacientes tratados com AmBisome[®] apresentaram menos efeitos colaterais relacionados à infusão como febre, calafrios, tremores, além da significativa redução da incidência de

nefrotoxicidade. Maior ocorrência de efeitos colaterais relatados para Abelcet[®] também foi observado por Fleming et al. (2001), em estudo com 75 pacientes leucêmicos que foram divididos em grupos para tratamento com Abelcet[®] ou AmBisome[®]. Porém, este último grupo apresentou anormalidades na função hepática no final do tratamento.

Uma comparação das atividades das três formulações lipídicas de AmB na leishmaniose visceral concluiu que Ambisome[®] e Amphocil[®] foram mais ativas com dose efetiva média (DE₅₀) de 0,3 e 0,7mg/kg, respectivamente, do que Abelcet[®] (DE₅₀ de 2,7mg/kg) contra *L. donovani* em camundongos. Já no teste com macrófagos peritoneais, Fungizone[®] e Amphocil[®] foram significativamente mais ativos (DE₅₀ de 0,013 e 0,02µg/ml, respectivamente) do que Ambisome[®] e Abelcet[®] (DE₅₀ de 1,5 e 2,6µg/ml). Os autores comentam que essas diferenças podem ser resultantes das interações das formulações com o meio biológico e sua captura pelos diferentes tipos de células. E alertam para o fato que as atividades *in vitro*, nem sempre, são preditivas das atividades *in vivo* (YARDLEY & CROFT, 2000).

A baixa solubilidade da AmB em meio aquoso, sua alta toxicidade nas dispersões convencionais e os elevados custos das formulações lipídicas tem estimulado o desenvolvimento de novos sistemas de liberação para este fármaco. Somado a isto, a solubilização de fármacos de reduzida hidrossolubilidade visando sua administração parenteral representa um grande desafio na área de desenvolvimento de medicamentos. Limitações relacionadas à biocompatibilidade dos adjuvantes empregados, ocorrência de dor e de possível precipitação dos fármacos durante a administração são relatados para algumas das estratégias comumente empregadas. Neste contexto, sistemas nanoestruturados tem se mostrado promissores.

2.3 Nanoemulsões

NE do tipo óleo em água tem sido empregadas há mais de 40 anos como fonte de calorias e ácidos graxos essenciais e, mais recentemente, como sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade, relativa estabilidade, habilidade de solubilizar compostos hidrofóbicos, reduzir a toxicidade e proteger os fármacos de hidrólise e degradação enzimática nas condições fisiológicas (ARAÚJO *et al.*, 2011; BRUXEL *et al.*, 2012; FLOYD, 1999; KELMANN *et al.*, 2007).

As NE, também referidas na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas, submicroemulsões, microemulsões instáveis, representam uma classe de emulsões de aparência transparente ou translúcida, com tamanho de gotículas entre 20-500 nm (ARAÚJO *et al.*, 2011; BHATT *et al.*, 2013; PEY *et al.*, 2006).

Sob o ponto de vista termodinâmico, assim como as emulsões convencionais (tamanho em μm), as NE são consideradas sistemas instáveis ou metaestáveis (diferentemente das emulsões). Como a cinética de desestabilização das NE é muito lenta, cerca de meses, elas são consideradas cineticamente estáveis. Devido principalmente ao tamanho diminuto das gotículas, que previne os fenômenos de instabilidade (ANTON & VANDAMME, 2011; TADROS *et al.*, 2004).

Ao contrário das microemulsões que se formam espontaneamente, as NE requerem a aplicação de energia ao sistema, proveniente de dispositivos mecânicos ou do potencial químico dos componentes, sendo necessária para romper as gotículas maiores em tamanhos menores (MASON *et al.*, 2006; SOLANS *et al.*, 2005).

Vários métodos podem ser utilizados para obtenção de NE, os quais têm sido classificados em métodos de alta energia e de baixa energia. Os métodos que empregam alta energia incluem a microfluidização, homogeneização a alta pressão e sonicação, que requerem equipamentos específicos para obtenção de diâmetros reduzidos. Métodos de baixa energia fazem uso de transições de fase que tomam lugar durante o processo de emulsificação como resultado de uma alteração na curvatura espontânea do tensoativo, seja por uma alteração da temperatura, no caso do método da temperatura de transição de fases, como pela alteração da composição do sistema, no método do ponto de inversão da emulsão. Também descrito como método de baixa energia, a emulsificação espontânea ocorre pela solubilização dos constituintes da fase interna em um solvente orgânico, que em seguida são vertidos na fase aquosa, com posterior retirada do solvente, geralmente por destilação sob pressão reduzida (BRUXEL *et al.*, 2012; PEY *et al.*, 2006; SOLANS *et al.*, 2005).

A técnica de emulsificação por ultrassom, também conhecida como sonicação, é descrita como método rápido e eficiente para formulação de NE estáveis com pequeno diâmetro de gotículas e com reduzida polidispersão. Durante a sonicação, ondas sonoras produzidas pelo sonotrodo causam vibrações mecânicas, seguidas pelo processo de cavitação acústica, no qual as gotículas da

emulsão sofrem violentos colapsos, gerando gotículas menores. O diâmetro das gotículas também pode ser controlado pela otimização de outros parâmetros como a proporção de óleo e tensoativos, viscosidade da fase contínua, tempo de emulsificação e energia aplicada (GHOSH *et al.*, 2013; NAKABAYASHI *et al.*, 2011).

2.3.1 Constituintes das nanoemulsões

2.3.1.1 Tensoativos

A seleção de emulsificantes adequados, capazes de formar mono ou multicamadas em torno das gotículas oleosas, de forma a reduzir a tensão interfacial e/ou aumentar a repulsão entre as gotículas, é um dos principais fatores relacionados à estabilidade do sistema de liberação (BRUXEL *et al.*, 2012).

Os tensoativos são substâncias caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares. Podem formar emulsões do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), as quais são definidas, principalmente, pelo equilíbrio apresentado entre a parte polar e a apolar do tensoativo empregado, denominado tecnicamente de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL). Existem quatro principais categorias para os tensoativos, dependendo do grau de ionização em solução aquosa: aniônico, catiônico, não-iônico e anfótero (BILLANY, 2005).

Os tensoativos não-iônicos mostram vantagens particulares devido a suas baixas toxicidade e irritabilidade, sendo alguns, conseqüentemente, utilizados em preparações orais e parenterais. Possuem também maior grau de compatibilidade com diversas substâncias, quando comparados aos tensoativos catiônicos e aniônicos e são menos sensíveis às alterações de pH ou à adição de eletrólitos (BILLANY, 2005).

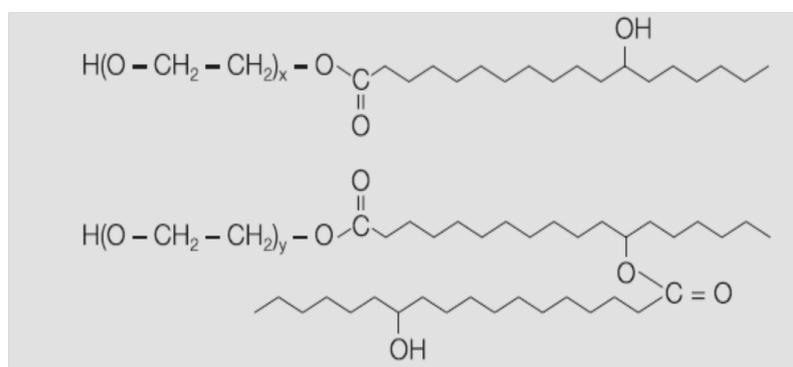
Na grande maioria dos tensoativos não-iônicos, a parte polar é formada por uma cadeia de um poliéter consistindo de um grupo de unidades de óxido de etileno polimerizadas (cadeia polioxi-etilênica) ligadas a uma parte apolar (DALVIN, 2011).

Kolliphor[®] HS 15 (KHS15, Sigma-Aldrich, Alemanha), nome comercial anterior Solutol[®] HS 15, é um tensoativo não-iônico hidrossolúvel, desenvolvido para emprego em formulações parenterais. É sintetizado pela reação de um mol do ácido

12-hidróxiesteárico com 15 mols de óxido de etileno. Apresenta valor de EHL de 14-16 (BASF, 2012).

Cerca de 70% de sua estrutura (Figura 3) é lipofílica, podendo apresentar-se como mono- e di-ésteres de poliglicol do ácido 12-hidróxiesteárico, combinados com moléculas de polietilenoglicol (30%), que representam a porção hidrofílica do tensoativo (ILLUM *et al*, 2012; STRICKLEY, 2004).

Figura 3 – Estrutura química do Kolliphor® HS 15



Fonte: STRICKLEY, 2004

Este tensoativo tem aplicação em formulações orais e parenterais produzidas em vários países e atende às especificações das Farmacopeias Americana (*Polyoxyl 15 Hydroxystearate*) e Europeia (*Macrogol 15 Hydroxystearate*) (BASF, 2012).

Para administração intravenosa, KHS15 é empregado em concentrações de até 50% para solubilizar propanidid no Panitol® (Cryopharma, México) e a 7% para fitomenadiona no Vitamin K1® (Sabex, Canadá). Outras preparações comerciais incluem o diclofenaco no Oxadisten® (Laboratórios Beta, Argentina), formulações parenterais de fármacos lipofílicos (miconazol, alfadolona, alfaloxona, nifedipino e piroxicam) e formulações orais, como os comprimidos revestidos Salvysat® (Ysatfabrik, Alemanha) (BASF, 2012; ILLUM *et al*, 2012; STRICKLEY, 2004).

Existem vários relatos na literatura de nanocarreadores para administração parenteral contendo KHS15. Corswant *et al*. (1998) foram os primeiros a divulgar o desenvolvimento de microemulsões baseadas na combinação KHS15, lecitina de soja, PEG 400 e triglicerídeos de cadeia média (MCT). Estudos em ratos indicaram que essas microemulsões não afetaram, significativamente, o

equilíbrio ácido-base, os eletrólitos do plasma, a pressão sanguínea ou a frequência cardíaca. E concluíram que o sistema poderia solubilizar com sucesso fármacos como o felodipino. Darole *et al.* (2008) desenvolveram microemulsões de AmB a base de KHS15, Peceol e Myrj-52, que apresentaram maior DL₅₀ do que o medicamento convencional (Fungizone[®]). Um composto altamente lipofílico, o éster de ibuprofeno-eugenol, foi incorporado em sistema microemulsionado contendo KHS15, etanol e MCT por Zhao *et al.* (2005). Os autores observaram que esse sistema alcançou melhor perfil farmacocinético em comparação com a solução, quando analisados os parâmetros área sob a curva e tempo de circulação. Microemulsões de propofol, KHS15 e Tween[®] 80 propiciaram menos dor à injeção do que a emulsão (Propovan[®]) disponível no mercado (DATE & NAGARSENKER, 2008). Hirsjärvi *et al.* (2013) desenvolveram nanocápsulas furtivas com KHS15, Lipoid[®], Labrafac[®], cloreto de sódio e água. Schwarz *et al.* (2012) associaram os tensoativos KHS15 e Span 20, com Miglyol 812 e água para preparar NE múltiplas A/O/A de aciclovir para liberação transdérmica. Borhade *et al.* (2012) também empregaram o tensoativo nas suas NE de clotrimazol para tratamento da malária por via oral e demonstraram que as formulações foram eficazes, seguras e se mantiveram estáveis. Gao *et al.* (2011) conseguiram melhorar a absorção oral de candesartana cilexetila através da incorporação em NE formuladas com KHS15, Tween 80, óleo de soja e água.

As moléculas Brij[®] (Sigma-Aldrich, Alemanha) são tensoativos não-iônicos, conhecidos como éteres do polioxietileno e representados pela fórmula geral C_nEO_m, na qual EO representa as unidades de óxido de etileno (OCH₂CH₂). Estão disponíveis comercialmente com vários comprimentos de cadeia acila (parte hidrofóbica) e da cadeia de polioxietileno (parte hidrofílica) (PARK *et al.*, 2000; TAGAMI *et al.*, 2011). Polioxietileno (2) cetil éter, nome comercial Brij[®] 52, tem fórmula molecular C₁₆H₃₃(OCH₂CH₂)₂OH e valor de EHL de 5,3.

Os compostos da família Brij[®] tem sido empregados em várias preparações farmacêuticas como carreadores não-iônicos e de baixa toxicidade (JIAO, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012; SOWMIYA *et al.*, 2010).

Microemulsões para liberação transdérmica de fármacos hidrofóbicos foram desenvolvidas por Junyaprasert *et al.* (2007) utilizando Brij 97 como tensoativo. Pardakhty *et al.* (2007) prepararam niossomas com cada um de sete tipos de Brij[®], para comparar a eficácia das formulações na proteção da insulina

contra degradação enzimática, concluindo que os sistemas são promissores carreadores para administração por via oral desta proteína.

Kapoor *et al.* (2009) demonstraram as vantagens do Brij 78 como constituinte de carreadores para liberação prolongada de ciclosporina A a partir de lentes de contato p-HEMA (poli-hidroxietil metacrilato). Saettone *et al.* (1996) avaliaram a permeabilidade através da córnea de vários antagonistas de receptores β -adrenérgicos para o tratamento do glaucoma, na presença de Brij 35, Brij 78 ou Brij 98, chegando à conclusão que os tensoativos polioxetilados são eficazes e seguros como promotores de permeação.

Formulações com Brij[®] para aplicação por via parenteral também já foram objeto de alguns estudos. Tagami *et al.* (2011) desenvolveram lipossomas para liberação do antineoplásico doxorubicina, utilizando um total de doze integrantes da família Brij[®] como tensoativos, sendo um para cada formulação. Foi comparada a eficiência de encapsulação do fármaco pelas formulações lipossomais, com base no comprimento da cadeia acila e da cadeia de polioxietileno, como também no peso molecular de cada Brij[®] selecionado, obtendo variação de 3-100%. Todas as formulações submetidas ao teste de compatibilidade sanguínea *in vitro* apresentaram baixa atividade hemolítica. Fato também observado por Wang *et al.* (2006) para as NE de nalbufina preparadas com Brij 30 ou Brij 98. Os autores relataram atividade analgésica significativamente prolongada pela incorporação do fármaco, especialmente, nas NE formuladas com Brij 98.

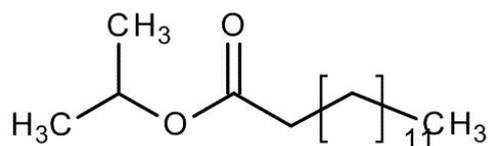
2.3.1.2 Fase oleosa

A maioria dos óleos usados em sistemas nanoemulsionados para uso farmacêutico são volumosos e semi-polares, ao contrário dos óleos hidrocarbônicos (alcanos) que são comumente utilizados em outras aplicações. Dessa forma, os triglicerídeos de cadeia média e longa, como o Miglyol, e os ésteres de ácido graxo, como o palmitato e o miristato de isopropila são farmacologicamente aceitáveis e bastante utilizados na obtenção de micro e nanoemulsões (GOMES, 2010).

Na Figura 4, podemos observar a estrutura química do miristato de isopropila (MIP), fórmula molecular $C_{17}H_{34}O_2$, também conhecido por éster isopropílico do ácido mirístico ou tetradecanoato de isopropila. O óleo é obtido pela

reação do cloreto de miristila com 2-propanol. É um líquido de baixa viscosidade, inodoro e praticamente incolor (GENNARO, 2005).

Figura 4 – Estrutura química da molécula do miristato de isopropila



Fonte: MERCK, 2013

Alguns estudos utilizaram o MIP como fase oleosa nas micro e nanoemulsões de AmB. Brime *et al.* (2002) desenvolveram microemulsões de AmB através da combinação de MIP, lecitina, Brij 96 e água. A formulação demonstrou ser menos tóxica que o Fungizone[®] nos estudos de toxicidade aguda realizado em camundongos e bastante eficaz na incorporação do fármaco, com taxa de encapsulação de 98%. Qing-Ping *et al.* (2009) propuseram a liberação transdérmica de AmB através das microemulsões de MIP, Tween[®] 80, álcool isopropílico e água. NE de AmB foram obtidas por Salerno *et al.* (2013) ao associar MIP, lecitina, Brij 97 e água. Os autores relataram que, para as mesmas concentrações de lecitina, as NE foram superiores às dispersões de lecitina na solubilização do fármaco e, assim, concluíram que a estrutura da formulação, e não os componentes individuais, seria responsável por essa maior solubilização da AmB.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento e caracterização de NE de AmB de uso parenteral visando sua atividade leishmanicida.

3.2 Objetivos específicos

- Construção de diagramas de fase pseudoternários para identificação das regiões de NE;
- Desenvolvimento e caracterização físico-química das formulações;
- Determinação da eficiência de incorporação da AmB nas NE;
- Avaliação dos estudos de estabilidade preliminar das formulações;
- Análise da atividade das NE contendo AmB sobre as formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.

4. Materiais e métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas, reagentes e solventes

- Ácido clorídrico P.A, Vetec, Brasil;
- Álcool metílico P.A – ACS, Sol-Tech, Brasil;
- Anfotericina B, Pharma Nostra, Brasil;
- Brij[®] 52, Sigma-Aldrich, Alemanha;
- Hidróxido de sódio P.A – ACS, Dinâmica, Brasil;
- Kolliphor[®] HS 15, Sigma-Aldrich, Alemanha;
- Miristato de isopropila, Plam Oleo, Malásia;

4.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético RH basic 1, IKA, Alemanha;
- Analisador de espalhamento dinâmico de luz ZetaPlus, Brookhaven, U.S.A;
- Balança analítica Adventurer, Ohaus, México;
- Banho-maria SL 155/10, Solab, Brasil;
- Condutivímetro mCA 150, MS Tecnopon, Brasil;
- Desruptor de células ultrasônico (Sonicador), Unique, Brasil;
- Espectrofotômetro UV-Vis 1240, Shimadzu, Japão;
- Estufa microprocessada de secagem Q317M-32, Quimis, Brasil;
- Filtros de seringa com porosidade de 0,45µm (membrana de celulose regenerada, Minisart[®] RC 25, Sartorius, Alemanha) e de 0,22µm (membrana de polietersulfona, Minisart[®] High Flow, Sartorius, Alemanha);
- Geladeira CFC 28A, Consul, Brasil;
- Incubadora B.O.D TE-391, Tecnal, Brasil;
- Lavadora ultrasônica, Unique, Brasil;
- Medidor de pH mPA 210, MS Tecnopon, Brasil;
- Microscópio de luz polarizada Leitz DM RXE (Leica, Weitzlar, Alemanha), acoplado com câmera 2M Pixel Moticam 2000 e Software analisador de imagem Motic Images Advanced 3.2;
- Microscópio eletrônico de transmissão Morgagni, FEI, E.U.A;
- Mini centrífuga de bancada NI1801, Nova Instruments, Brasil;

- Módulo calorimétrico exploratório diferencial DSC Q20, TA Instruments, E.U.A;
- Módulo termogravimétrico TG Q600, TA Instruments, E.U.A;
- Sistema purificador de água OS10LX, Gehaka, Brasil;
- Vórtex V1, IKA, Alemanha.

4.2 Métodos

4.2.1 Construção dos diagramas de fase pseudoternários

A partir da mistura dos tensoativos (KHS15 e Brij[®] 52), nas proporções de 1:9; 3:7; 5:5; 7:3; 9:1, foram preparadas amostras de 5g, compostas de 10 a 90% da mistura. A esta combinação, foi adicionada a fase oleosa (MIP) em concentrações decrescentes correspondentes de 90 a 10%. A fase aquosa (água destilada) foi adicionada com uma pipeta automática, à temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi homogeneizado com bastão de vidro. Após cada adição da fase aquosa, o produto final era homogeneizado e submetido a ciclos de agitação no sonicador, com potência de 250 Watts, durante 1min, seguido de banho de ultrassom, por 1min, à temperatura ambiente.

As alterações ocorridas nos sistemas após adição de cada alíquota de água foram analisadas visualmente. Considerando as proporções dos componentes (tensoativos, fase oleosa e fase aquosa), foi possível plotar todas as alterações do produto final em diagrama de fases, por meio do Software Origin[®] Pro 8.

Esse diagrama em forma de triângulo equilátero apresenta em cada um de seus vértices: proporção de 100% em massa de fase oleosa, 100% em massa de fase aquosa e 100% em massa de mistura de tensoativos.

A partir destes dados foram selecionados sistemas nanoemulsionados, em função do volume de fase interna (fase oleosa), da percentagem de tensoativos e de fase externa (fase aquosa), para caracterização físico-química, incorporação da AmB e testes de atividade leishmanicida.

4.2.2 Incorporação da anfotericina B nas nanoemulsões

AmB, na concentração de 2,5mg/mL foi incorporada nas NE sob agitação contínua, em agitador magnético, à temperatura ambiente. Após 1min, o pH da NE

foi aumentado através da adição de uma solução de hidróxido de sódio 1N, até completa dissolução da AmB, o que ocorre por volta do pH 12. Subsequentemente, o pH foi reduzido a 7,0-7,5, usando uma solução de ácido clorídrico 1N (DAMASCENO *et al.*, 2012).

4.2.3 Eficiência de incorporação da anfotericina B nas nanoemulsões

O conteúdo de AmB nas NE foi avaliado após centrifugação a 11000g por 10min e após filtração com filtros de seringa com tamanhos de poro de 0,45 e 0,22 μ m. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis na absorvância de 405nm. Para este experimento, as NE foram diluídas em metanol, de modo a atingirem a concentração de 5x10⁻⁶mg/mL (DAMASCENO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; SILVEIRA, 2009).

4.2.4 Caracterização físico-química das nanoemulsões

4.2.4.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado sem diluição prévia, através do mergulho do eletrodo diretamente na amostra. O equipamento havia sido previamente calibrado com soluções padrão pH 4,0 e pH 7,0. Os resultados foram expressos como a média de três determinações.

4.2.4.2 Determinação da condutividade

A condutividade das formulações foi determinada através do mergulho da célula de vidro diretamente na amostra. O equipamento havia sido previamente calibrado com solução padrão 146,9 μ S/cm. Os resultados foram expressos como a média de três determinações.

4.2.4.3 Microscopia de luz polarizada

As formulações selecionadas com e sem AmB foram examinadas sob luz polarizada e não-polarizada. Uma alíquota de cada amostra foi colocada sobre uma lâmina e observada ao microscópio modelo Leitz DM RXE (Leica, Weitzlar, Alemanha), acoplado com câmera 2M Pixel modelo Moticam 2000 e Software

analisador de imagem Motic Images Advanced 3.2. As fotomicrografias foram obtidas sob ótica normal, com e sem filtro polarizador, para determinar se as amostras exibiam birrefringência ótica. Esta análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Imagens da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP).

4.2.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para determinar a morfologia das formulações. Volumes de 5-10 μ L das NE foram adicionados em grades cobertas com filme de *holey carbon*. O excesso de líquido foi retirado com papel de filtro e as amostras foram coradas com ácido fosfotúngstico (PTA) a 2%. As grades foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni. Experimento realizado no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.2.4.5 Determinação do diâmetro, índice de polidispersão e potencial Zeta das gotículas por espalhamento dinâmico de luz

O diâmetro médio das gotículas, o índice de polidispersão e o potencial Zeta foram obtidos através de análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*) usando o equipamento ZetaPlus (Brookhaven, Holtsville, NY, USA), localizado no Núcleo de Ensino e Pesquisa em Petróleo e Gás (NUPEG) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Cinco gramas de cada formulação foram preparados e armazenados em frascos de cintilação isentos de poeira. Antes do teste, as amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:20. Cada amostra foi transferida para uma cubeta, a qual foi colocada na câmara de análise, onde as determinações do tamanho das gotículas foram realizadas sob um ângulo fixo de 90° e com correlator operando em modo paralelo. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C, o comprimento de onda do laser foi de 659nm. Foram realizadas 5 determinações do diâmetro, índice de polidispersão e potencial Zeta das gotículas, com duração de 2min e 30s para cada amostra (SILVEIRA, 2009).

4.2.4.6 Análise térmica

Os ensaios da análise térmica foram realizados no Laboratório de Análise Térmica da unidade do Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste, localizado no Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba – CERTBIO/UEPB.

4.2.4.6.1 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um módulo termogravimétrico TG modelo Q600 (TA - *Instruments*), na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 900°C . Foi utilizada atmosfera de nitrogênio, com fluxo de $20\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e massa de $5,00\pm 0,05\text{mg}$ acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra.

A calibração do SDT TG/DTA Q600 foi realizada com padrão de oxalato de cálcio.

4.2.4.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um módulo Calorimétrico Exploratório Diferencial DSC modelo Q20 (TA - *Instruments*). Foram utilizadas amostras de $2,00\pm 0,05\text{mg}$, acondicionadas em cadinho de alumínio hermeticamente fechados. A razão de aquecimento variou da seguinte forma:

- Para os tensoativos Brij[®] 52 e KHS15: razão de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 200°C ;
- Para o miristato de isopropila: as amostras foram inicialmente submetidas ao resfriamento (25 a -50°C) a uma taxa de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, mantidas por 3min a -50°C . Em seguida, foram aquecidas até a temperatura de 250°C (a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$);
- Para a AmB: razão de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 400°C ;
- Para as NE (Blank-NE e AmB-NE): as amostras foram inicialmente submetidas ao resfriamento (25 a -70°C) a uma taxa de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, mantidas por 1min a -70°C . Em seguida, foram aquecidas até a temperatura de 250°C (a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$);

O DSC Q20 foi calibrado para a temperatura utilizando como padrões os pontos de fusão do índio (PF= $156,6^{\circ}\text{C}$) e zinco metálico (PF= $419,5^{\circ}\text{C}$) com pureza de $99,99^{\circ}\text{C}$. A calibração para energia foi feita com base na entalpia de fusão do índio metálico ($\Delta H_{\text{Fusão}} = 28,54\text{Jg}^{-1}$).

As curvas TG e DSC foram analisadas pelo programa TA *Instruments Universal Analysis* 2000, versão 4.7A, da TA *Instruments*, a fim de caracterizar as transições de fase, etapas de decomposição e perda de massa das mesmas.

4.2.5 Avaliação da estabilidade preliminar

Para avaliação da estabilidade preliminar, as amostras foram submetidas aos testes de centrifugação, estresse térmico e ciclo gelo-degelo.

4.2.5.1 Centrifugação

Um mL de cada formulação foram distribuídos em tubos do tipo Eppendorf e submetidos a ciclos de 1000, 2500 e 3500rpm (70, 440 e 863g, respectivamente) por 15 minutos em cada rotação, à temperatura ambiente.

4.2.5.2 Estresse térmico

Cinco mL de cada formulação foram transferidos para tubos de ensaio. As amostras, em triplicata, foram submetidas ao estresse térmico, em banho-maria termostaticado, no intervalo de temperatura controlada entre 40-80°C, com progressão de elevação de 10°C a cada 30 min. As formulações foram avaliadas ao término do processo, quando atingiram a temperatura de 80°C, por observação visual, como também foram aferidos o pH e a condutividade. Após repouso, até retornarem à temperatura ambiente (25,0±2,0°C), foi observado se houve separação de fases das formulações.

4.2.5.3 Ciclo gelo-degelo

Cinco mL de cada amostra foram submetidos a seis ciclos gelo-degelo. Cada ciclo consistindo de 24h à temperatura de 4,0±2,0°C (Geladeira Consul, CFC 28A) seguido de 24 horas à 45,0±2,0°C (Estufa Quimis, Q317M-32). As observações quanto à existência de separação de fases, as determinações do pH e da condutividade foram realizadas antes do início do teste e ao final do 6º ciclo (duração total do teste: 12 dias).

4.2.6 Atividade leishmanicida

Os ensaios de atividade leishmanicida foram realizados no Laboratório de Ensaios Antiparasitários e de Radiobiologia Experimental, localizado no Centro de Biociências da UFRN.

As formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/2000/merivaldo2) foram gentilmente cedidas pelas Prof^a Dr^a Louisianny Guerra da Rocha do referido laboratório da UFRN. As cepas foram cultivadas em meio bifásico NNN/LIT suplementado com 20% de SFB em uma proporção de 3:2 e incubadas em estufa B.O.D na temperatura de 27°C (ROCHA, 2006).

Diluições das amostras das NE (com e sem AmB) e da AmB micelar (Anforicin[®] B, Cristália) foram realizadas para obter sistemas nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,5; 2,5 e 5,0 µg/mL.

Vinte microlitros de cada amostra foram transferidas para placas tipo ELISA de 96 poços, contendo 80µL do meio de cultura com o inóculo com densidade 1×10^6 células/poço. O experimento foi executado em triplicata. Após seis horas de incubação das placas em estufa B.O.D a 27°C, a contagem das formas viáveis de *Leishmania chagasi* foi realizada em câmara hemocitométrica de Neubauer. A parte da câmara utilizada para contagem dos parasitos foi a mesma utilizada para contagem de leucócitos. A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Foram contados os quatro quadrantes e calculada a média.

Não foram contados rosetas ou emaranhados. Foi contado como uma unidade as formas no início da divisão. Formas que estavam em cima da linha e muito próximas dos quadrantes também foram contadas.

A atividade leishmanicida foi expressa como a concentração efetiva mediana (CE₅₀), ou seja, aquela que causou 50% do efeito nos micro-organismos testados, após seis horas de incubação, sendo determinada por análises de regressão linear das curvas de concentração-resposta.

4.2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão e analisados através do emprego da análise de variância (ANOVA), seguido do teste t de Student.

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 Construção dos diagramas de fase pseudoternários

A adsorção da molécula do emulsionante à superfície das fases aquosa e oleosa formando o filme interfacial é dependente da presença simultânea de grupos hidrofílicos e lipofílicos na molécula. O equilíbrio entre a hidrofília e lipofília na molécula, por sua vez, deve ser suficientemente adequado para evitar que o emulsionante se solubilize completamente em apenas uma das fases do sistema, inviabilizando assim a formação do filme interfacial e, conseqüentemente, a estabilização do sistema (SOUZA, 2007).

O conceito de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) foi introduzido por Griffin em 1948, quando ele classificou as propriedades hidrofílicas-lipofílicas dos emulsionantes segundo uma escala numérica de 1 a 50, onde o valor de EHL aumenta conforme a hidrofília da substância.

Substâncias de EHL muito baixo, ou menor que 3, são acentuadamente lipofílicas, apresentando apenas propriedades antiespumantes. Substâncias de EHL entre 3 e 9 já apresentam propriedades emulsificantes dando origem a emulsões do tipo A/O. Substâncias de EHL entre 9 e 16 começam a apresentar características hidrofílicas dando origem a emulsões do tipo O/A. Substâncias de EHL acima de 16 já apresentam características acentuadamente hidrofílicas passando a atuar como solubilizantes (PRISTA *et al.*, 1990).

Do mesmo modo que às substâncias emulsionantes, também são atribuídos valores de EHL aos óleos e substâncias oleosas. Por conseqüência, para cada emulsão pode-se atribuir um valor particular de EHL, que é dependente da sua composição e do tipo de emulsão formada: O/A ou A/O, e serve para orientar a escolha do tensoativo a ser utilizado. O escolhido deve possuir EHL igual ou o mais próximo possível da fase oleosa, podendo-se fazer a combinação de dois ou mais emulsionantes de modo a obter-se um EHL resultante semelhante ao da fase oleosa (ANSEL *et al*, 2000).

Para sistemas emulsionados com fase externa aquosa, um valor de EHL entre 8 e 14 é primordial. Valores menores ou maiores induzirão a solubilidade do tensoativo no óleo ou na água, respectivamente (MACEDO *et al.*, 2006).

A fase oleosa desempenha um papel importante tanto na formação da nanoemulsão como na solubilização do fármaco. Nem sempre o mesmo tipo de óleo gera condições favoráveis para ambos os casos (SOUZA, 2007).

Com base no conceito de EHL da fase oleosa, podemos direcionar a procura pelo sistema de tensoativos ideal para estabilizar a formulação pretendida (DALVIN, 2011). A partir da seleção dos tensoativos, diferentes formulações são preparadas, variando-se a concentração de cada componente, de modo a conhecer e avaliar as consequências dessas combinações.

Já que Brime *et al.* (2002) e Qing-Ping *et al.* (2009) desenvolveram sistemas nanoemulsionados empregando o MIP como fase oleosa e obtiveram sucesso na incorporação da AmB, o presente trabalho optou pelo mesmo óleo.

Já que o valor de EHL do MIP é igual a 12, foi determinada a escolha de um tensoativo que tivessem um EHL mais alto, ou seja, com caráter mais hidrofílico, e outro tensoativo com EHL mais baixo, mais lipofílico. De forma que, ao serem misturados pudessem resultar no EHL ideal da formulação, mais próximo do EHL da fase oleosa, teoricamente.

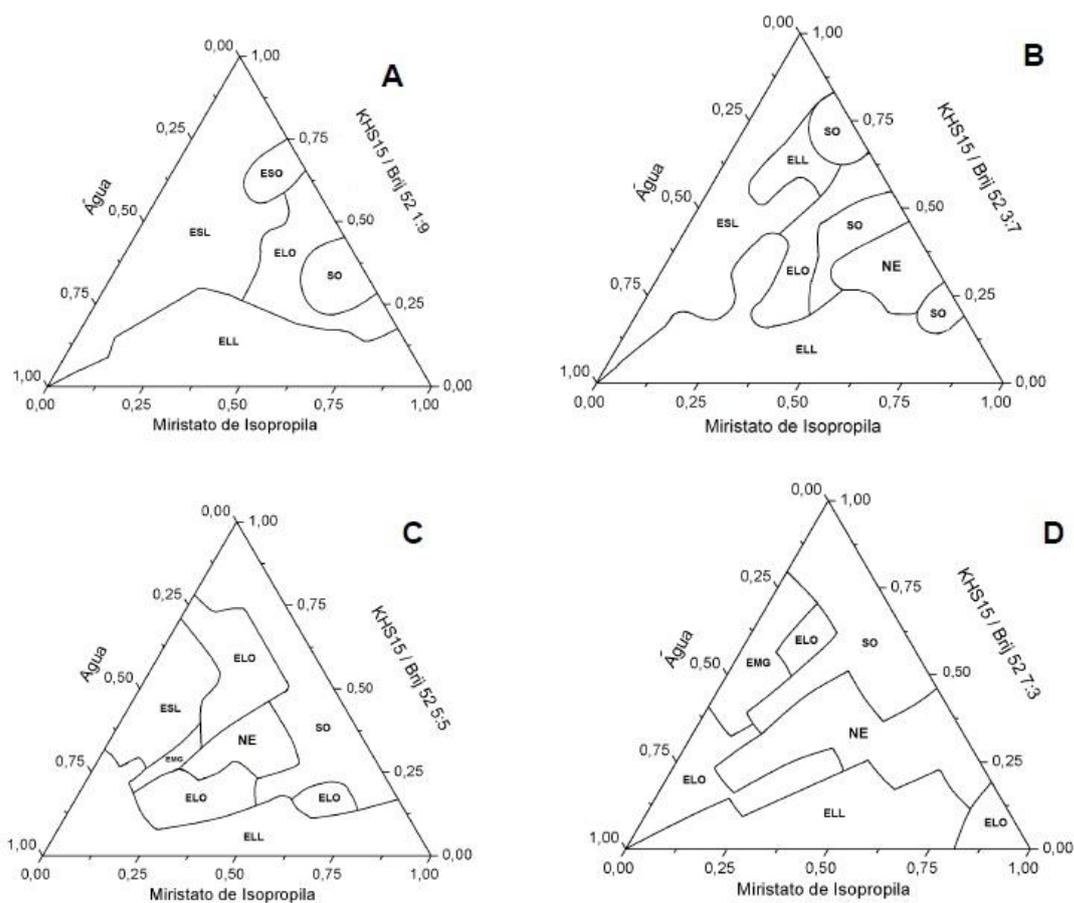
Após ampla pesquisa na literatura, apoiando-se, especialmente, em dados de segurança para administração parenteral e de eficácia na formação de sistemas nanoemulsionados, foram selecionados os tensoativos KHS15 (EHL: 14-16) e Brij[®] 52 (EHL: 5,3). Sendo essa associação de tensoativos inédita para formulação de nanocarreadores.

Definidos os componentes necessários, diagramas de fase pseudoternários foram construídos para identificar as regiões de formação de NE e, conseqüentemente, para selecionar as proporções ideais de tensoativos e óleo da formulação.

Através das Figuras 5 e 6, pode-se observar uma relação diretamente proporcional entre a área de NE formada e a proporção do tensoativo KHS15 em relação ao Brij[®] 52. Nota-se também que à medida que a proporção de KHS15 aumenta, em detrimento da concentração de Brij[®] 52, a região de NE cresce em direção a maiores concentrações de fase aquosa. Observações coerentes com a propriedade de solubilidade dos tensoativos. KHS15 por ter maior valor de EHL e, portanto, ser mais hidrofílico, tem mais afinidade pela fase aquosa do sistema, sendo o oposto válido também para o Brij[®] 52, que tem um baixo valor de EHL. E, de

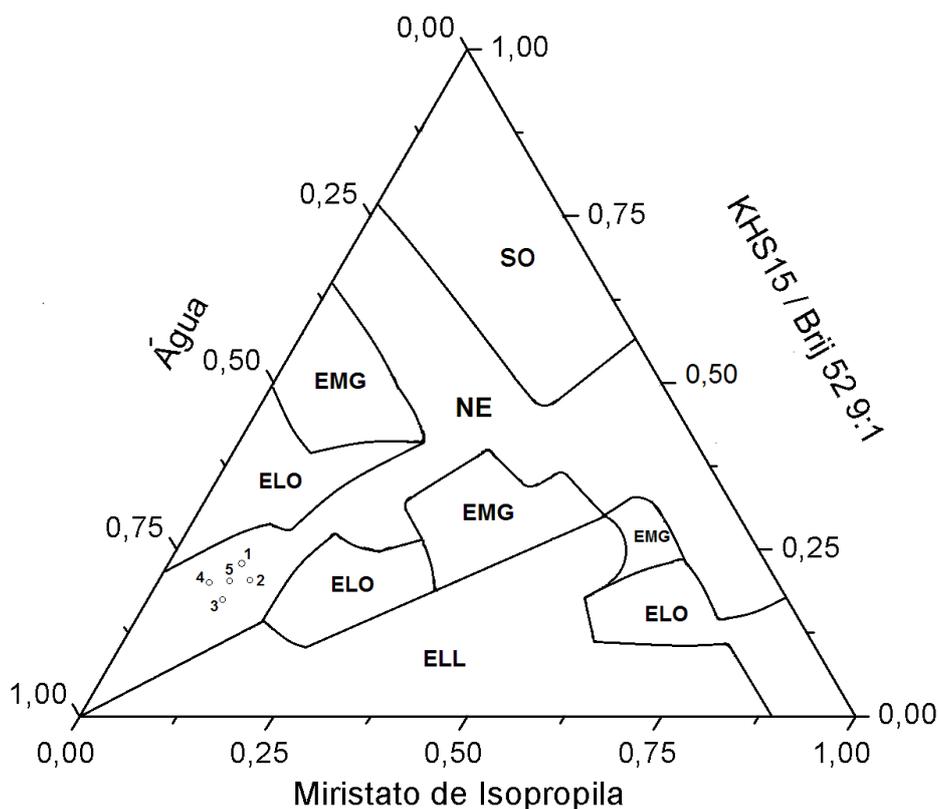
acordo com o que explicaremos adiante, a fase em que o tensoativo é mais solúvel tende a ser a fase contínua ou externa da emulsão.

Figura 5 – Diagramas de fases pseudoternários dos sistemas contendo Kolliphor[®] HS 15/Brij[®] 52 nas proporções 1:9 (A), 3:7 (B), 5:5 (C) e 7:3 (D)



Legenda: SO – sistema opaco; ELO – emulsão líquida opaca; ELL – emulsão líquida leitosa; EMG – emulgel; ESO – emulsão semissólida opaca; ESL – emulsão semissólida leitosa; NE – nanoemulsão.

Figura 6 – Diagrama de fases pseudoternário do sistema contendo Kolliphor® HS15/Brij® 52 na proporção 9:1 destacando os pontos selecionados numerados de 1 a 5



Legenda: SO – sistema opaco; ELO – emulsão líquida opaca; ELL – emulsão líquida leitosa; EMG – emulgel; NE – nanoemulsão.

Para cálculo do EHL de um sistema emulsionado, conforme a teoria de Griffin, são levados em consideração o valor de EHL de cada tensoativo e sua percentagem em peso no sistema, através da seguinte fórmula:

$$EHL_{\text{mistura}} = \frac{(EHL_{\text{tensoativo A}} \times \%D_{\text{tensoativo A}}) + (EHL_{\text{tensoativo B}} \times \%D_{\text{tensoativo B}})}{100}$$

Para facilitar os cálculos, estabelecemos o valor de EHL do KHS15 em 15 e o EHL do Brij® 52 igual a 5 e obtivemos o EHL de cada diagrama de fases pseudoternário, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valor de EHL para cada proporção de tensoativos utilizada nos diagramas de fase pseudoternários

Proporção Kolliphor [®] HS15 / Brij [®] 52	EHL
1:9	6
3:7	8
5:5	10
7:3	12
9:1	14

A teoria da cunha orientada propõe que os tensoativos se orientam na superfície e no interior de cada fase conforme as suas propriedades químicas. Como o tensoativo possui na mesma molécula uma porção hidrofílica e outra porção lipofílica, será preferencialmente solúvel em uma das fases, penetrando com maior profundidade na fase pela qual tem maior afinidade. Dependendo da forma, do tamanho da molécula e de suas características de solubilidade, o tensoativo formará uma estrutura com arranjo em cunha, que circundará as gotículas da fase dispersa estabilizando a emulsão. Tensoativos cuja porção hidrofílica seja maior que a porção lipofílica penetrarão mais profundamente na fase aquosa, que se curvará envolvendo a fase oleosa, formando uma emulsão O/A. Já os tensoativos cuja porção lipofílica é maior que a porção hidrofílica penetrarão mais profundamente na fase oleosa, que se curvará envolvendo a fase aquosa, formando uma emulsão A/O (ANSEL *et al*, 2000; PRISTA *et al.*, 1990).

Assim os valores de EHL encontrados para os diagramas de fase e as respectivas regiões de NE formadas estão em concordância com a literatura. Para o diagrama de fases KHS15/Brij[®] 52 1:9, com EHL igual a 6, muito inferior ao EHL do MIP que é 12, não foi possível consolidar o filme interfacial necessário para formação das NE. O diagrama 3:7 com EHL igual a 8 apresentou uma região de nanoemulsão mais localizada no vértice que representa a fase oleosa, indicando que os sistemas formados tem o óleo como fase externa. Fato que pode ser explicado pela maior afinidade da mistura de tensoativos desse diagrama pela fase oleosa, devido ao seu baixo valor de EHL. A localização centralizada da região de nanoemulsão observada no diagrama de fases 5:5 corresponde, provavelmente, a sistemas com microestruturas bicontínuas, as quais podem indicar uma área de transição gradual de sistemas A/O para O/A, devido ao EHL do diagrama ser igual a 10, próximo do EHL 12 do MIP e, nesse caso, favorecendo a formação daquelas

estruturas. Maiores regiões de NE foram formadas nos diagramas que empregaram misturas de tensoativos com EHL maior ou igual ao do óleo, correspondendo aos diagramas KHS15/Brij[®] 52 7:3 e 9:1, indicando a eficiência desses sistemas na formação do filme interfacial e estabilização das NE contendo o MIP como fase oleosa.

O diagrama de fases composto pelos tensoativos KHS15/Brij[®] 52 na proporção 9:1, por ter a maior região de NE O/A, foi escolhido para seleção dos pontos a serem formulados e caracterizados (Figura 8 e Tabela 2).

Tabela 2 – Composição percentual (p/p) das formulações de nanoemulsões

	NE 1	NE 2	NE 3	NE 4	NE 5
Fase aquosa	67,6	67,6	75	75	71,6
Miristato de isopropila	8,5	12,5	8,5	5,1	8,5
Kolliphor[®] HS15/ Brij[®] 52 (9:1)	23,9	19,9	16,5	19,9	19,9
Razão óleo/tensoativo	0,35	0,62	0,51	0,25	0,42

5.2 Incorporação da AmB nas nanoemulsões

Devido ao caráter anfotérico da molécula de AmB, a sua incorporação nos sistemas representa um desafio, pela sua insolubilidade tanto em meio aquoso como oleoso. Contudo, alguns trabalhos tem descrito o uso de pH alcalino para solubilizá-la (DAMASCENO *et al.*, 2012; SILVEIRA, 2009).

A adição da AmB às Blank-NE reduziu drasticamente a transparência das formulações, situação que foi revertida após adição da solução de NaOH 1N aos sistemas, indicando o favorecimento da incorporação da AmB.

Uma vez que o fármaco foi dissolvido, os sistemas foram neutralizados para faixa de pH entre 7,0-7,5 através da adição de solução de HCl 1N. Este ajuste diminuiu um pouco a transparência das formulações, em virtude, provavelmente, de alguma interferência na tensão interfacial, já que em pH neutro, a molécula de AmB é anfotérica, pois apresenta uma carboxila e um grupamento amino na sua estrutura, com pKa de 5,5 e 10, respectivamente (PESTANA, 2009).

5.3 Eficiência de incorporação da AmB nas nanoemulsões

A eficiência de incorporação (EI) da AmB nas NE foi avaliada através de dois métodos: filtração e centrifugação. A EI, expressa em porcentagem, foi obtida pela comparação da concentração da AmB antes e após cada teste.

No primeiro método, a determinação da EI foi baseada na leitura das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro UV-Vis antes e após passagem pelos filtros com porosidade de 0,45 μ m (membrana de celulose regenerada, Minisart[®] RC 25, Sartorius, Alemanha) e de 0,22 μ m (membrana de polietersulfona, Minisart[®] High Flow, Sartorius, Alemanha). Os resultados mostram que há perda de AmB (Tabela 3). A análise de variância ratificou que as diferenças nas leituras antes e após cada filtração são significativas ($p < 0,05$). A primeira filtração, de 0,45 μ m, remove a AmB suspensa nas formulações, que não se encontra incorporada. Não obstante, também foi observada remoção de AmB após filtração esterilizante, fato que pode ser atribuído à retenção por adsorção no filtro, considerando a natureza coloidal da fase dispersa da amostra. Perda de AmB após filtração das formulações já foi relatada na literatura. A influência da concentração de AmB na fase aquosa das NE não foi considerada, devido à sua baixa hidrossolubilidade (BRIME *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2001; SILVEIRA, *et al.*, 2013).

Tabela 3 – Eficiência de incorporação (EI) da AmB nas nanoemulsões antes e após filtração

Amostra	Fase oleosa + tensoativos (%p/p)	EI (%) antes da filtração	EI (%) 0,45 μ m	EI (%) 0,22 μ m
AmB-NE 1	32,4	68,36	48,46	21,06
AmB-NE 2	32,4	66,16	48,86	22,36
AmB-NE 3	25	58,26	33,36	29,76
AmB-NE 4	25	59,06	40,46	15,06
AmB-NE 5	28,4	60,86	46,86	21,16

Comparando-se os dados da Tabela 3, referentes à EI da AmB antes da filtração das NE com a composição percentual de fase oleosa e tensoativos, podemos inferir que quanto maior a porcentagem de óleo e tensoativos da formulação, maior conteúdo de AmB é registrado. O que indica, por sua vez, a maior importância desses componentes na incorporação da AmB, em relação à fase aquosa, conforme discutido anteriormente.

O objetivo do teste de centrifugação na avaliação da EI não era desestabilizar as NE; pelo contrário, a proposta era separar os cristais de AmB não incorporados aos sistemas. Todavia, como podemos perceber na Tabela 4, a centrifugação das NE provocou uma redução drástica do conteúdo de AmB. Todas as amostras apresentaram um sedimento amarelo e sobrenadante quase límpido. Uma explicação para esta ocorrência será dada mais adiante quando discutirmos os resultados dos testes de estabilidade preliminar (Item 5.5)

Tabela 4 – Eficiência de incorporação (EI) da AmB nas nanoemulsões antes e depois da centrifugação a 11000g por 10min

AMOSTRA	EI (%) antes	EI (%) depois
AmB-NE 1	62,16	0,06
AmB-NE 2	62,86	0,04
AmB-NE 3	60,66	0,04
AmB-NE 4	60,86	0,05
AmB-NE 5	61,86	0,04

5.4 Caracterização físico-química das nanoemulsões

5.4.1 Determinação do pH

Tanto as formulações Blank-NE como as AmB-NE apresentaram pH neutro (Tabela 5), que é o pH ideal para administração parenteral (FLOYD, 1999). Além disso, a AmB possui máxima atividade terapêutica na faixa de pH entre 6,0 e 7,5 (KAUR & KAKKAR, 2010). Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) no pH das NE após incorporação da AmB, resultado concordante com outros estudos (COHEN *et al.*, 1996; NARS *et al.*, 2012).

Tabela 5 – pH das nanoemulsões antes (Blank-NE) e após incorporação da AmB (AmB-NE)

AMOSTRA	pH antes \pm DP	pH AmB-NE \pm DP	Valor de p
BLANK-NE 1	7,05 \pm 0,4	7,34 \pm 0,29	0,08
BLANK-NE 2	7,13 \pm 0,5	7,24 \pm 0,3	0,83
BLANK-NE 3	7,02 \pm 0,75	7,06 \pm 0,02	0,93
BLANK-NE 4	7,2 \pm 0,6	7,01 \pm 0,08	0,66
BLANK-NE 5	6,97 \pm 0,64	7,43 \pm 0,08	0,28

DP: desvio-padrão

5.4.2 Determinação da condutividade

De acordo com os valores obtidos para condutividade das amostras (Tabela 6) podemos classificá-las como NE O/A (MASMOUDI *et al.*, 2005). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a condutividade das NE antes e após adição do fármaco. O aumento dos valores na condutividade após adição da AmB pode ser explicado pela uso das soluções iônicas (NaOH e HCl), necessárias para incorporar o fármaco nos sistemas (SILVEIRA, 2009).

Tabela 6 – Condutividade das nanoemulsões antes (Blank-NE) e após incorporação da AmB (AmB-NE)

AMOSTRA	Condutividade antes \pm DP	Condutividade AmB-NE \pm DP	Valor de p
BLANK-NE 1	256,67 \pm 12,05	1542 \pm 195,95	0,0075
BLANK-NE 2	229,73 \pm 14,82	1376,33 \pm 94,13	0,0016
BLANK-NE 3	216,63 \pm 8,66	1464,33 \pm 55,08	0,0006
BLANK-NE 4	235,07 \pm 6,31	1561,33 \pm 122,74	0,0029
BLANK-NE 5	233,77 \pm 9,48	1339,67 \pm 92,2	0,0019

DP: desvio-padrão

5.4.3 Microscopia de luz polarizada

Uma maneira de classificar os sistemas é através da determinação da isotropia óptica através da técnica de microscopia de luz polarizada. Trata-se de um microscópio comum, no qual, junto ao condensador, existe um polarizador, que orienta as ondas luminosas provenientes da fonte de luz em uma só direção, em um só plano. Sob um plano de luz polarizada a amostra é considerada anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz (FORMARIZ, 2008; PESTANA, 2009).

A microscopia de luz polarizada é útil para detecção e diferenciação dos cristais líquidos liotrópicos dos sistemas micro/nanoemulsionados, porque os primeiros apresentam birrefringência, revelando texturas típicas pretas e brancas (“cruzes de Malta”), enquanto que as micro/nanoemulsões revelam apenas um campo escuro (CHANG & BODMEIER, 1997; FORMARIZ *et al.*, 2007; HATHOUT *et al.*, 2010; KHANDAVILLI & PANCHAGNULA, 2007; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

As Figuras 7 e 8 mostram as fotomicrografias das amostras que diferem entre si pela proporção de tensoativos e de fase interna oleosa utilizada para obter

as NE. A composição de cada NE está descrita na Tabela 2. Nota-se que todas as amostras apresentaram um comportamento isotrópico, representado pelo campo escuro, ou seja, sob o plano de luz polarizada, não desviam a luz.

Figura 7 – Fotomicrografias dos sistemas nanoemulsionados (Blank-NE)

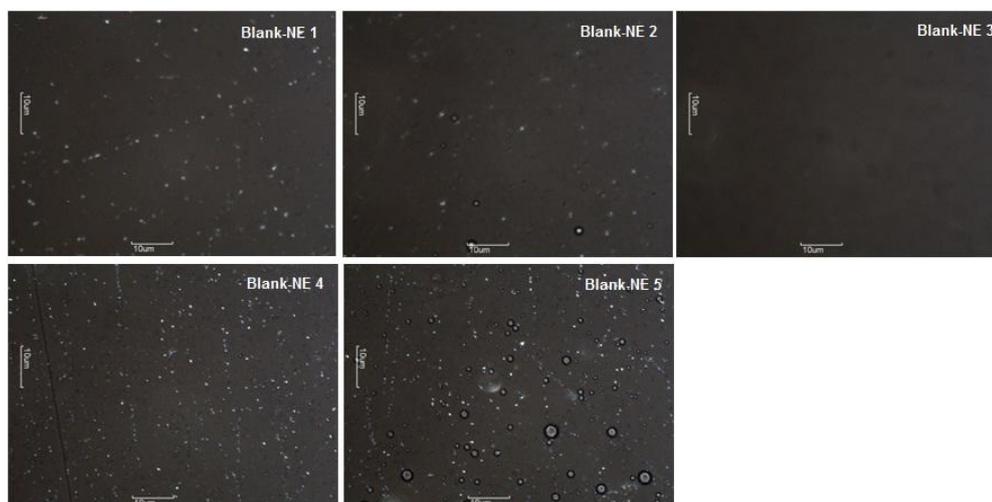
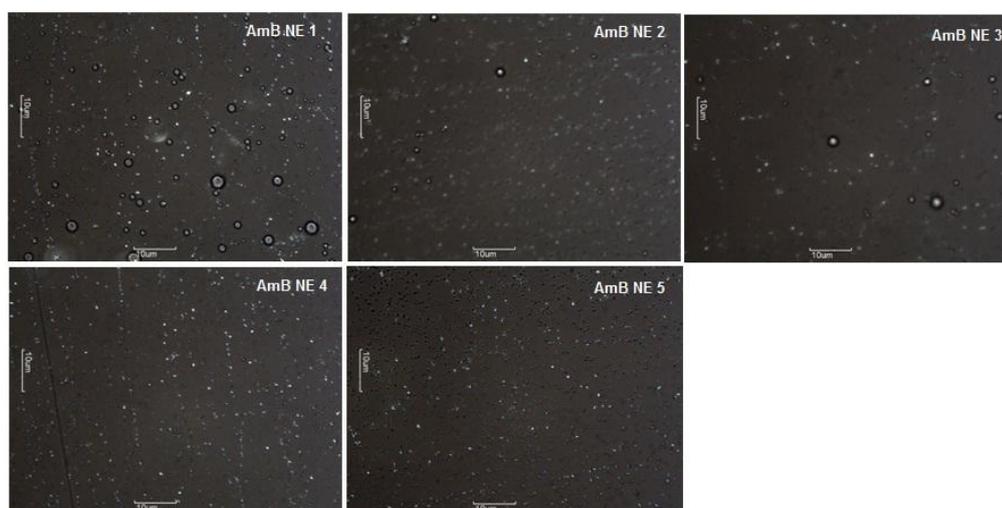


Figura 8 – Fotomicrografias dos sistemas nanoemulsionados contendo o fármaco (AmB-NE)

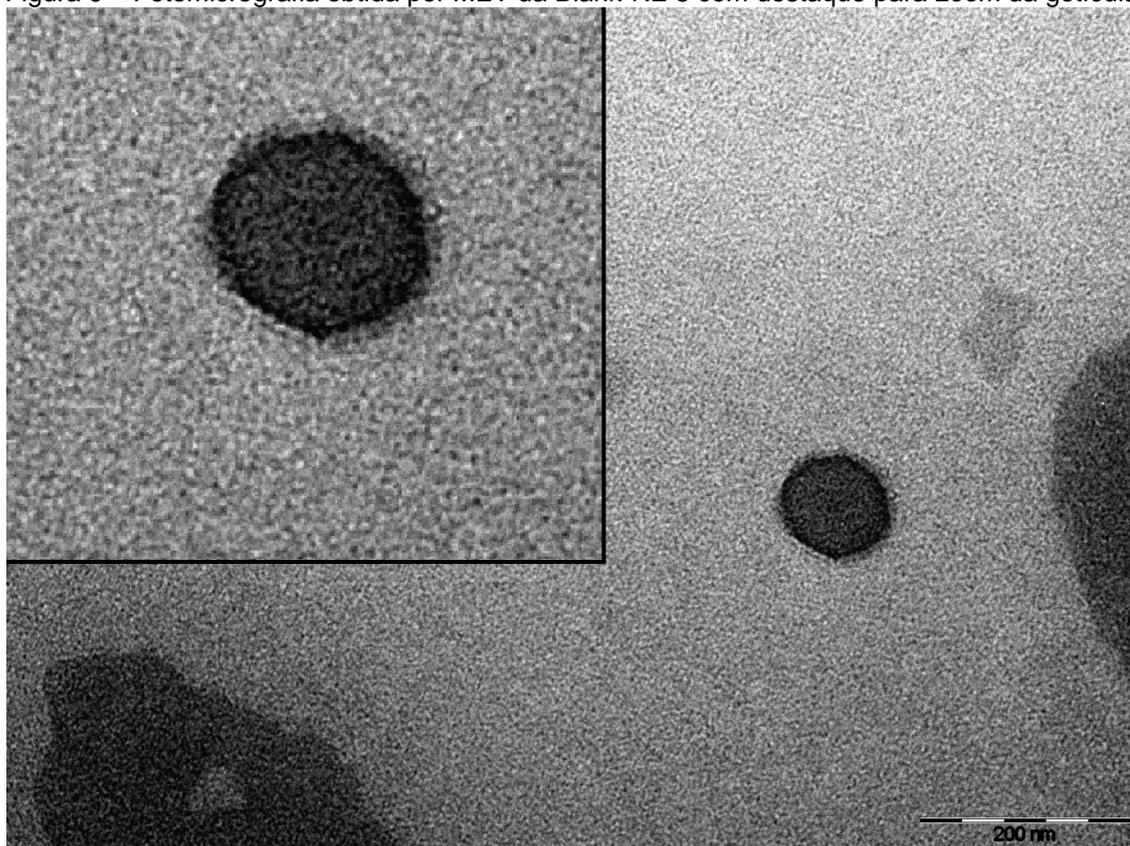


5.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica largamente utilizada para o estudo das NE, pois permite a captação de imagens de boa resolução, que revelam a estrutura e ajudam na determinação do tamanho dos sistemas analisados (BALI *et al.*, 2010).

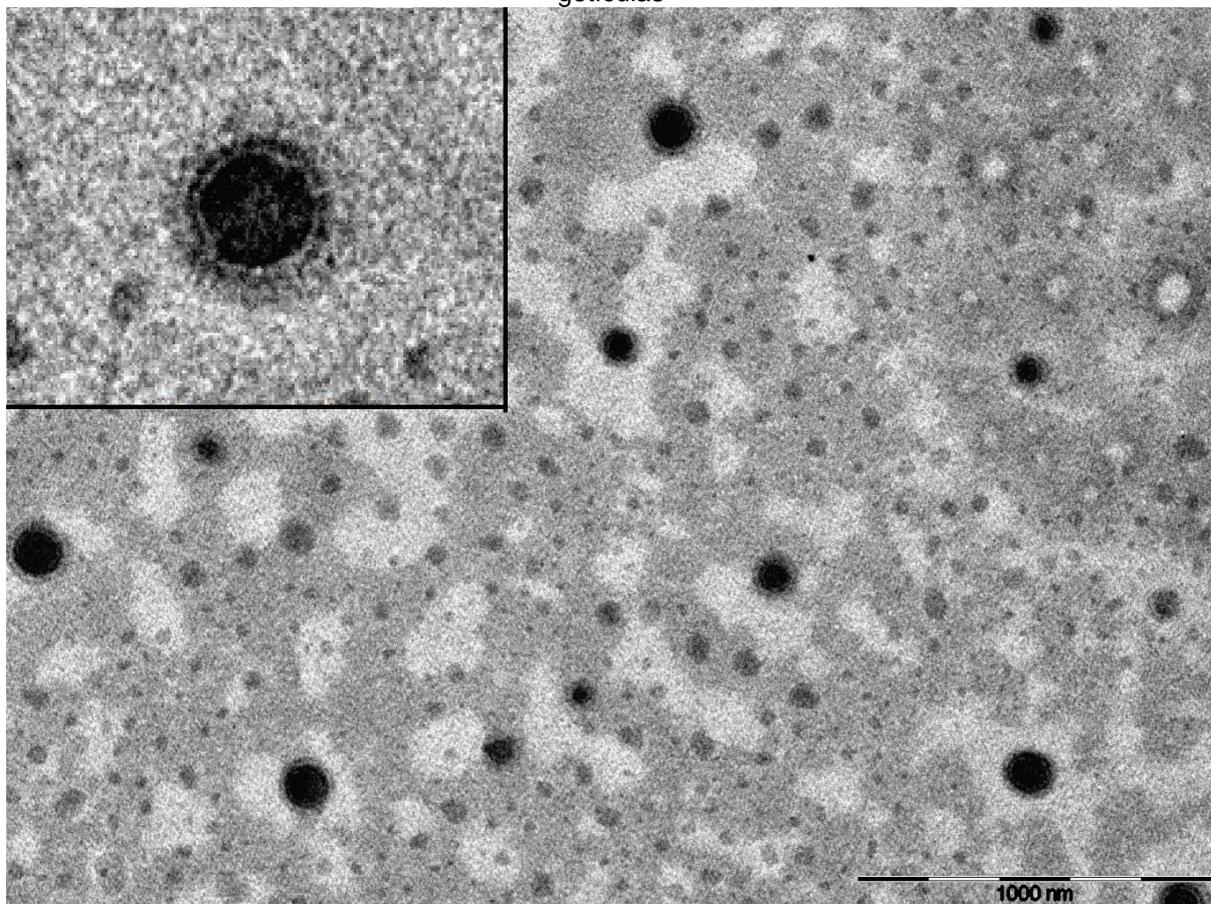
As fotomicrografias obtidas por MET das amostras Blank-NE 5 e AmB-NE 5 são mostradas nas Figuras 9 e 10. Percebe-se que ambas as NE, com ou sem o fármaco, exibem estruturas de formato predominantemente esférico e de tamanho nanométrico. As imagens claramente revelam regiões de densidade diferentes, ou seja, um núcleo escuro e um revestimento, provavelmente constituído pelas moléculas dos tensoativos que se encontram adsorvidas à superfície das gotículas.

Figura 9 – Fotomicrografia obtida por MET da Blank-NE 5 com destaque para zoom da gotícula



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 10 – Fotomicrografia obtida por MET da AmB-NE 5 com destaque para *zoom* de uma das gotículas



Fonte: Arquivo pessoal

As gotículas apresentaram, praticamente, o dobro do tamanho determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (resultados a serem apresentados no item 5.4.5), corroborando com estudos anteriores que relatam a possibilidade de haver discrepâncias no tamanho das gotículas ao comparar os resultados obtidos com essas técnicas (GAUMET *et al.*, 2008). Por esse motivo, os estudiosos defendem que nenhum método isolado é plenamente satisfatório para caracterizar os sistemas em termos de tamanho, portanto uma combinação de pelo menos duas técnicas é recomendada, devendo uma delas ser microscópica (KLANG *et al.*, 2012).

Uma revisão recentemente publicada sobre microscopia eletrônica de NE alerta para o fato que os procedimentos de secagem e coloração, utilizados na MET para preparação da amostra, podem alterar sua estrutura e morfologia e, portanto, a interpretação das imagens obtidas deve ser feita com muita cautela. Para contornar esse entrave na obtenção de resultados totalmente fidedignos, os autores propõem

a aplicação de métodos criogênicos para preparar as amostras (KLANG *et al.*, 2012).

Mesmo que a MET tenha revelado um maior diâmetro de gotículas, as amostras ainda se enquadraram na faixa de tamanho característica de NE e, portanto, continuaram aptas para os estudos subsequentes.

5.4.5 Determinação do diâmetro, índice de polidispersão e potencial Zeta das gotículas por espalhamento dinâmico de luz

A análise do tamanho das gotículas é feita para verificar se as formulações apresentam tamanho nanométrico. O índice de polidispersão revela a homogeneidade da população de gotículas, caracterizando uma distribuição de tamanho monomodal ou polimodal. O potencial Zeta, por sua vez, é um fator importante na previsão da estabilidade das amostras e na interação com as células.

A técnica para determinação do diâmetro das NE, o espalhamento dinâmico de luz, utiliza a flutuação da intensidade da luz espalhada por gotículas em suspensão, sob movimento Browniano no tempo, para se obter a distribuição hidrodinâmica do tamanho (XU, 2008). A partir desse princípio, as gotículas maiores movimentam-se mais lentamente e, conseqüentemente, a intensidade da luz flutua lentamente, enquanto que gotículas menores movimentam-se mais rapidamente, resultando na flutuação mais rápida da intensidade da luz. O equipamento é responsável pela correlação desses dois parâmetros para o cálculo do diâmetro médio das gotículas (SOARES, 2009).

O tamanho médio, o índice de polidispersão e o potencial Zeta das amostras de NE estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por espalhamento dinâmico de luz

AMOSTRA	DIÂMETRO ± DP (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO ± DP	POTENCIAL ZETA ± DP (mV)
Blank-NE 1	26,2 ± 0,3	0,206 ± 0,009	-11,83 ± 1,58
Blank-NE 2	54,6 ± 0,3	0,25 ± 0,008	-13,27 ± 4,34
Blank-NE 3	31,8 ± 0,8	0,243 ± 0,019	-10,49 ± 2,28
Blank-NE 4	21,6 ± 0,2	0,167 ± 0,011	-14,07 ± 3,79
Blank-NE 5	31,2 ± 0,4	0,241 ± 0,009	-14,6 ± 3,35
AmB-NE 1	33,1 ± 0,4	0,274 ± 0,003	-10,57 ± 1,21
AmB-NE 2	62,9 ± 0,3	0,29 ± 0,004	-2,07 ± 1,04
AmB-NE 3	53,7 ± 1,3	0,323 ± 0,006	-4,49 ± 0,62
AmB-NE 4	132,5 ± 13,3	0,384 ± 0,011	-18,79 ± 1,5
AmB-NE 5	49,2 ± 0,7	0,317 ± 0,002	-16,14 ± 2,91

DP: desvio-padrão

O tamanho nanométrico pode ser explicado pela submissão das formulações ao processo de emulsificação por ultrassom, método de alta energia para o desenvolvimento de NE. Este método tem sido documentado como rápido e eficiente na produção de NE estáveis, com pequeno diâmetro de gotículas e baixa polidispersão (DAMASCENO *et al.*, 2012; GHOSH *et al.*, 2013; NAKABAYASHI *et al.*, 2011).

Análise mais aprofundada do diâmetro das NE mostra que os resultados estão em consonância com a literatura, que afirma que o tamanho das gotículas é inversamente proporcional à razão óleo/tensoativo. O processo de formulação de uma emulsão requer energia, sendo assim não-espontâneo. Tensoativos agem como emulsificantes por diminuírem a tensão na interface óleo-água e minimizando a energia requerida para estabilizar a emulsão (GHOSH *et al.*, 2013).

As Blank-NE 2, Blank-NE 5 e Blank-NE 4, que possuem a mesma composição percentual de tensoativos, apresentaram diâmetro médio de gotículas de 54,6; 31,2 e 21,6nm, respectivamente, o que se correlaciona com a percentagem de óleo na formulação, que é maior na Blank-NE 2 (12,5%), seguida da Blank-NE 5 (8,5%) e da Blank-NE 4 (5,1%).

A formulação Blank-NE 1 apresentou menor diâmetro de gotículas (26,2nm) comparando-se com a Blank-NE 3 (31,8nm). Essas NE possuem a mesma quantidade de óleo (8,5%), diferenciando-se na proporção de tensoativos, que é de 23,9% na primeira, contra 16,5% da segunda.

Sabendo-se que, matematicamente, para qualquer razão, quanto maior o valor do denominador, menor será o valor desta razão e comparando-se as razões óleo/tensoativo das NE formuladas, percebemos que os menores valores se correlacionam com as maiores percentagens de tensoativos nas formulações, o que por sua vez, resultou em um menor tamanho de gotículas.

Comparação estatística pelo teste t de *Student* para os valores de diâmetro médio revelou que as NE com e sem AmB apresentaram diferença significativa de tamanho ($p < 0,05$), sugerindo que a incorporação do fármaco alterou o tamanho das gotículas.

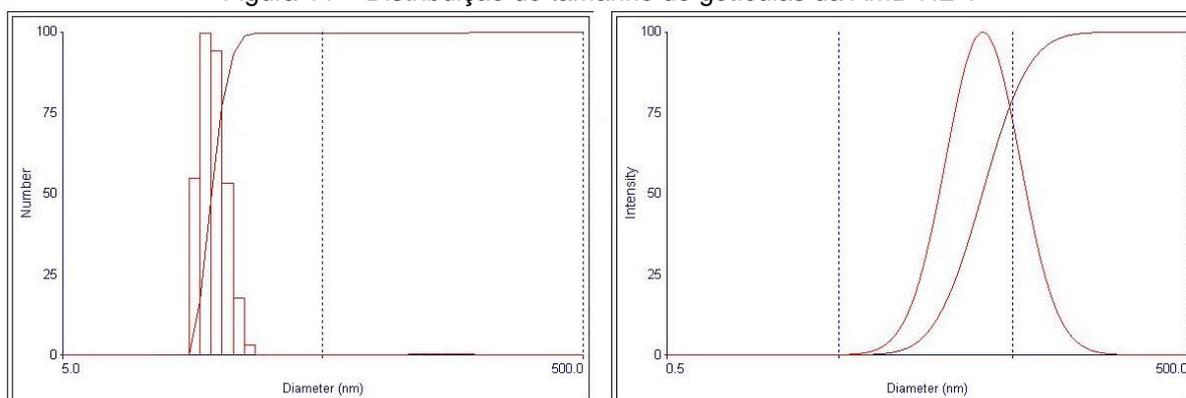
Além do diâmetro, foi obtido o índice de polidispersão (IP) das amostras. O cálculo do IP considera o tamanho médio da gotícula, o índice de refração do solvente, o ângulo de medida e a variação da distribuição. Embora não exista uma correlação linear entre um valor de IP e uma monodispersão da amostra verdadeira,

em uma escala de 0 a 1, IP menor que 0,1 tem sido associado a um sistema monodisperso, com alta homogeneidade na população de gotículas, sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal. Por outro lado, valores altos de IP sugerem uma distribuição de tamanho mais ampla ou polimodal. De modo geral, conforme exposto na Tabela 7, os sistemas preparados apresentaram uma distribuição de gotículas moderadamente homogênea (CALVO *et al.*, 1996; GAUMET *et al.*, 2008; GOVENDER *et al.*, 1999; SOARES, 2009).

O aumento no diâmetro das gotículas e no índice de polidispersão das AmB-NE quando comparadas com as Blank-NE indica a incorporação do fármaco nas NE. AmB, por ser uma molécula anfifílica, interagiria fortemente com a camada emulsionante do sistema, provocando esse aumento (NARS *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2011). De fato, Washington *et al.* (1988), por meio de técnicas baseadas no fenômeno da fluorescência, identificaram a localização da AmB na região interfacial das emulsões. Damasceno *et al.* (2012) afirmam que devido ao caráter anfotérico da molécula de AmB em pH neutro, o fármaco também poderia ser particionado no óleo, sendo considerada, portanto, uma fração adicional da fase oleosa do sistema, aumentando o volume das gotículas.

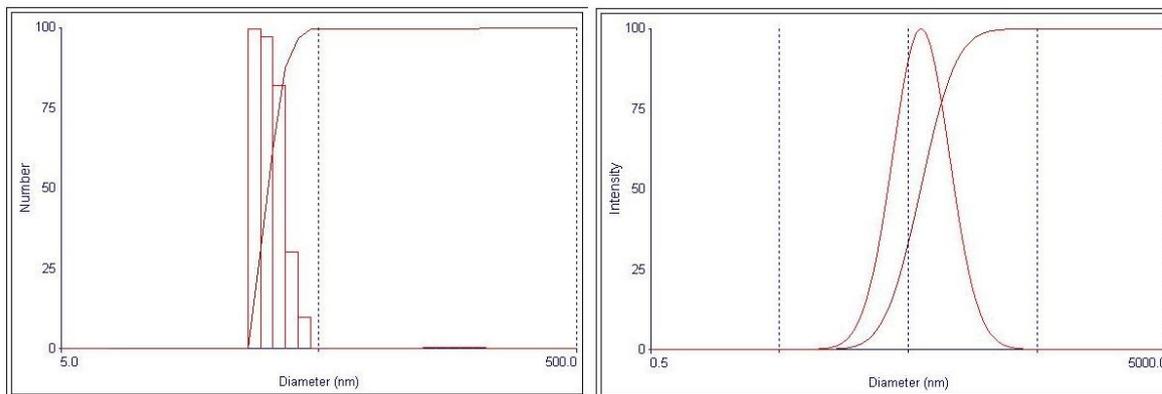
Mesmo apresentando índices de polidispersão mais elevados, as AmB-NE revelaram uma distribuição de tamanho monomodal e a presença de apenas uma população de gotículas, como mostrado nas Figuras 11 a 15.

Figura 11 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 1



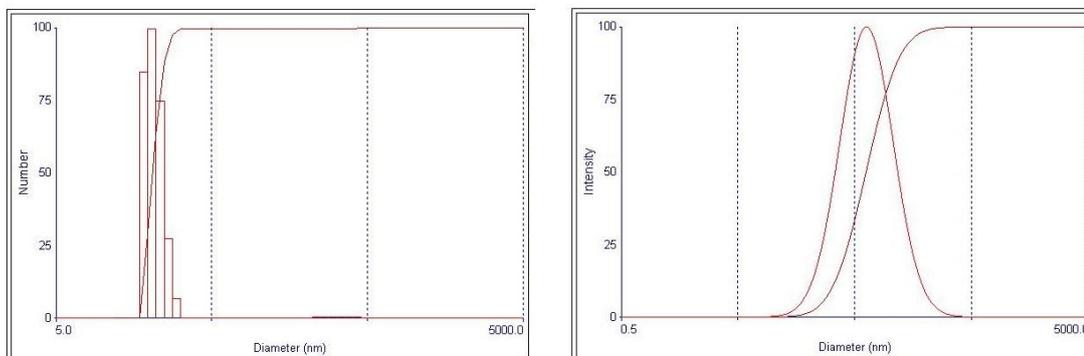
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 12 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 2



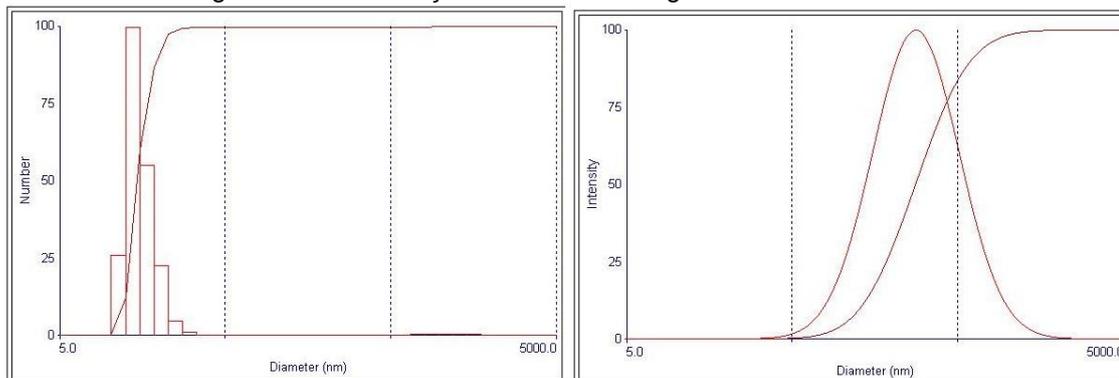
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 13 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 3



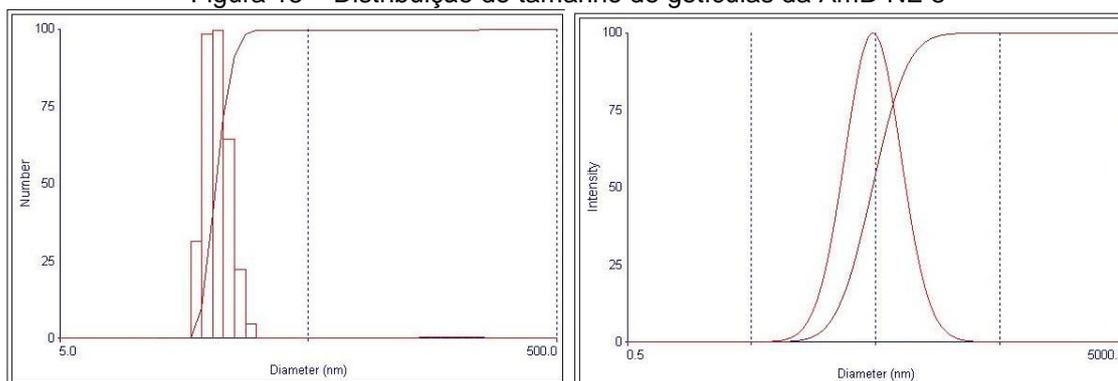
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 14 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 4



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 15 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-NE 5



Fonte: Arquivo pessoal

O desenvolvimento de um sistema de liberação enfrenta alguns desafios, pois após serem administrados no organismo, devem alcançar o sítio-alvo, permanecer no local de ação para liberar o fármaco, preferencialmente de forma controlada, limitando os efeitos adversos e garantindo biocompatibilidade (GAUMET *et al.*, 2008).

Tem sido enfatizado que o perfil de eliminação e a distribuição tissular dos sistemas carreadores de fármacos são amplamente influenciados por seu tamanho e características de superfície (GAUMET *et al.*, 2008; MOGHIMI *et al.*, 2001).

Os sistemas de liberação, ao serem administrados pela via intravenosa, antes de alcançar o sítio-alvo, passam por um processo de biodistribuição, logo após atravessarem as barreiras do epitélio e viajarem pelo leito vascular. A literatura afirma que, após a administração, partículas/gotículas pequenas (<20-30 nm) são, quase que prontamente, eliminadas por excreção renal. Enquanto que, partículas/gotículas maiores podem ser rapidamente capturadas pelas células do sistema fagocitário-mononuclear presentes no fígado, baço e, em menor extensão, na medula óssea (MOGHIMI *et al.*, 2001; NAKAOKA *et al.*, 1997).

Contatos entre os sistemas carreadores coloidais e os macrófagos ocorrem via reconhecimento das opsoninas na superfície dos transportadores ou através de interações com os receptores do tipo *scavenger* das células de Kupffer. O tamanho e o raio da curvatura dos coloides têm influência direta no contato e na internalização pelos macrófagos. Como as células de Kupffer tem uma superfície rugosa, interações privilegiadas e ótima fagocitose ocorrem quando os coloides apresentam tamanho entre 1 e 3 μm . Partículas/gotículas menores oferecem menor contato com a membrana celular e dependem de caminhos alternativos para

adentrar as células (pinocitose ou endocitose) (BERTRAND & LEROUX, 2012; CHAMPION *et al.*, 2008; DOSHI & MITRAGORI, 2010).

A propriedade dos macrófagos de fagocitar elementos estranhos ao organismo tem levantado estratégias com o intuito de evitar que os sistemas sejam logo reconhecidos por estas células, de forma que se propiciem altas concentrações plasmáticas do fármaco, fazendo com que o princípio ativo seja liberado no compartimento vascular de modo contínuo e controlado, o que teoricamente garantiria maior eficácia terapêutica e menos efeitos adversos. Outras estratégias, por sua vez, foram desenvolvidas para promover uma liberação direcionada de agentes terapêuticos para os macrófagos, especificamente no caso de doenças como leishmaniose visceral, esquistossomose, brucelose e salmonelose, através dos sistemas coloidais administrados por via parenteral, baseando-se na patogênese da infecção (GAUMET *et al.*, 2008; HEINEMANN *et al.*, 1997; MOGHIMI *et al.*, 2001; NAKAOKA *et al.*, 1997).

A localização intracelular dos patógenos faz necessária a administração de doses relativamente altas de fármacos citotóxicos para efetivamente eliminar os micro-organismos, elevando os riscos do aparecimento de efeitos adversos. Sendo assim, uma abordagem racional para o problema seria direcionar o fármaco para os macrófagos, de uma maneira que se diminuísse a interação do fármaco livre com os tecidos excluídos do seu sítio de ação (VYAS *et al.*, 2000).

Até hoje, os carreadores de fármacos direcionados aos macrófagos mais extensamente estudados são os lipossomas, as microesferas e nanopartículas. Várias propriedades físico-químicas desses carreadores de algum modo alteram sua eficácia e especificidade aos macrófagos, incluindo hidrofiliicidade, cargas de superfície, composição, concentração e a presença de ligantes (KUNJACHAN *et al.*, 2012).

Desde 1984, Roerdink *et al.* demonstraram que quanto menor o lipossoma (usualmente, 100 nm de diâmetro), maior é a contribuição dos hepatócitos na captação hepática total. O que, por sua vez, seria um reflexo do tamanho das fenestrações do endotélio sinusoidal hepático, que apresenta de 100 a 150 nm de diâmetro.

Levando em consideração apenas o tamanho das formulações lipídicas de AmB, Barratt & Bretagne (2007) resumem que: Ambisome[®] com diâmetro em torno de 80 nm apresenta meia-vida longa e boa penetração nos tecidos; os discos de

Amphocil[®] apesar do seu tamanho reduzido (120 nm), permanecem muito menos tempo na circulação que o Ambisome[®] e rapidamente liberam AmB para as células fagocíticas; Abelcet[®] composto por suas estruturas em forma de fita (*ribbon like*) com comprimento de 1 a 10 µm são prontamente percebidos e acumulados nas células do sistema fagocitário-mononuclear.

Essas diferenças no tamanho, entre outros fatores, contribuem para atividades diferenciadas nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, esperava-se que a atividade *in vivo* do Abelcet[®], no tratamento da leishmaniose visceral, fosse similar ou melhor do que Ambisome[®], já que o primeiro apresenta maior diâmetro e, portanto, seria mais rapidamente fagocitado pelos macrófagos. Contudo, os resultados na prática não se correlacionam com a teoria e podem ser explicados pelo perfil farmacocinético do Ambisome[®], que por alcançar uma maior área sob a curva (ASC), expõe mais tecidos a concentrações terapêuticas de AmB, e é também, eventualmente, fagocitado pelos macrófagos e direcionado para o fígado e baço. A presença de AmB na circulação também pode causar um efeito imunomodulador, promovendo a atividade inata dos macrófagos (BARRAT & LEGRAND, 2005; TORRADO *et al.*, 2007; YARDLEY & CROFT, 2000).

Romero & Morilla (2008), ao revisarem os sistemas de liberação de fármacos no tratamento da leishmaniose, destacam que, *in vitro*, a captação da formulação convencional de AmB pelos macrófagos é muito maior do que a do Ambisome[®]; e que o Fungizone[®] demonstrou ser de 3 a 6 vezes mais ativo que Ambisome[®] contra as formas promastigotas de *Leishmania major* e contra as amastigotas de macrófagos murinos. Já nos experimentos *in vivo*, Ambisome[®] demonstrou ser a formulação mais ativa e menos tóxica, manteve altas concentrações de AmB no sangue, fígado e baço, e diminuiu as concentrações nos rins e pulmões comparado-se com a formulação convencional.

O potencial elétrico em torno da gotícula no plano de cisalhamento é chamado de potencial Zeta, e pode ser quantificado através da observação da mobilidade eletroforética das gotículas submetidas a um campo elétrico (XU, 2008). De certo modo, o potencial Zeta é um indicador para prever e controlar a estabilidade dos sistemas coloidais. Quanto maior for o valor absoluto deste potencial, mais carregada estará a superfície da gotícula. Portanto, pode-se inferir que essa concentração de cargas favorecerá as interações repulsivas entre as gotículas, levando a formação de sistemas mais estáveis, por diminuir a tendência à

agregação, resultando em uma distribuição do tamanho das gotículas em suspensão mais uniforme (HANS & LOWMAN, 2002).

He *et al.* (2010) afirmam que a presença de cargas, positivas ou negativas, na superfície dos sistemas carreadores, é um fator favorável à captação pelos macrófagos, devido às interações eletrostáticas.

Todas as NE preparadas neste estudo (com e sem AmB) apresentaram valores de potencial Zeta negativos. Schaffazick *et al.* (2003) relatam que os fosfolípídeos, os poloxamers e os polímeros constituintes dos nanocarreadores são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial Zeta, e que os tensoativos não-iônicos tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro. Valores negativos e relativamente baixos de potencial Zeta também foram encontrados por Cai *et al.* (2012) e Gao *et al.* (2011), que desenvolveram microemulsão de propofol e nanoemulsão de candesartana, respectivamente, utilizando KHS15 como tensoativo. Jumaa & Müller (2002), no estudo de estabilidade de emulsões, concluíram que a diminuição da proporção de KHS15 leva ao aumento nos valores de potencial Zeta.

5.4.6 Análise térmica

A análise térmica compreende um grupo de técnicas, na qual a propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida, enquanto a amostra é submetida a uma programação de temperatura (MACKENZIE, 1979).

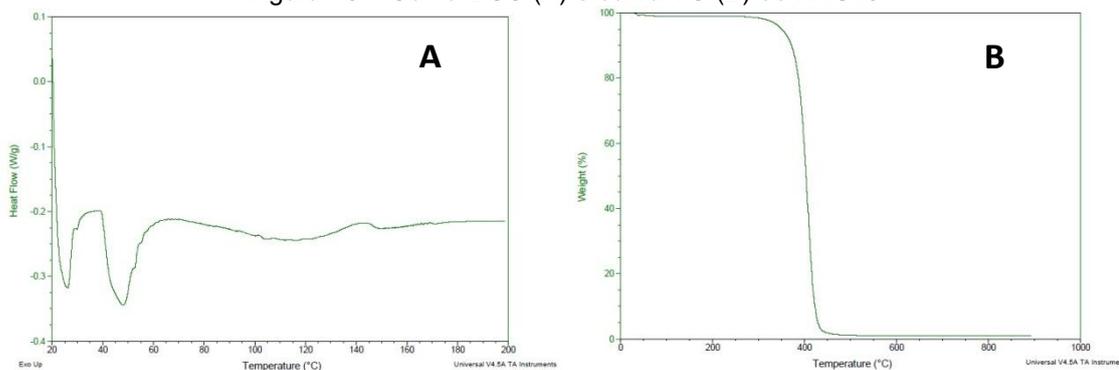
Dentre as técnicas termoanalíticas mais utilizadas encontram-se a termogravimetria, na qual se acompanha a variação de massa da amostra em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura, e a calorimetria exploratória diferencial (DSC - do inglês "Differential Scanning Calorimetry"), na qual se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência, em função da temperatura, também de acordo com uma programação controlada (MATOS *et al.*, 2009).

Estas técnicas têm sido amplamente utilizadas na área farmacêutica para o desenvolvimento, a produção e o controle de qualidade de medicamentos. As principais aplicações estão relacionadas aos estudos de interação entre princípio ativo e excipientes, avaliação da estabilidade de formas farmacêuticas e na

caracterização de matéria-prima e de produtos acabados (ARAÚJO *et al.*, 2010; BOONME *et al.*, 2006; DAS & SURESH, 2011; SANTANA *et al.*, 2008).

A Figura 16 ilustra as curvas DSC (A) e TG (B), respectivamente, do tensoativo KHS15:

Figura 16 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do KHS15

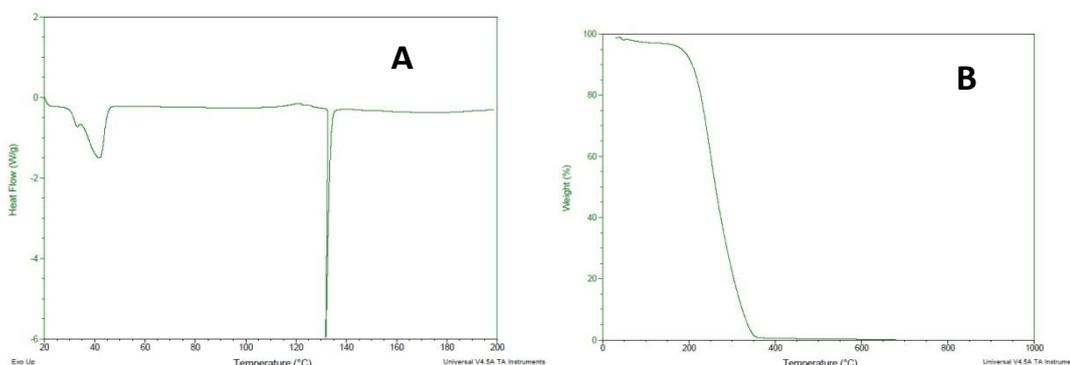


Fonte: Arquivo pessoal

Na curva DSC (Figura 16 A), pode-se observar um evento endotérmico a 25°C, correspondente ao ponto de fusão do KHS15 (SEO *et al.*, 2012; SIGMA-ALDRICH, 2013b). O segundo evento endotérmico, compreendendo a faixa de temperatura entre 40-55°C, pode estar relacionado à desidratação do composto, o qual resulta em pequena perda de massa, já que o processo de decomposição só teria início acima dos 350°C, como pode ser observado na curva TG (Figura 16 B).

Os gráficos da análise térmica do tensoativo Brij[®] 52 estão expostos na figura abaixo:

Figura 17 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do Brij[®] 52



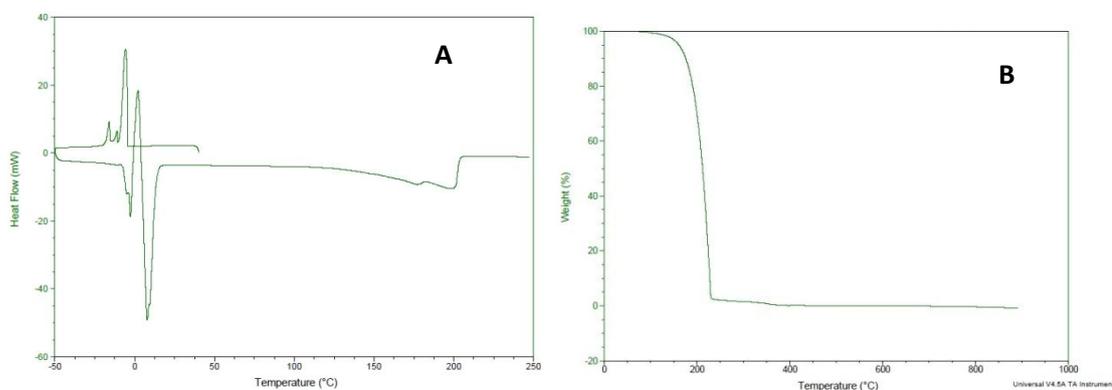
Fonte: Arquivo pessoal

Na Figura 17, curva DSC (A), observamos dois picos endotérmicos bem próximos e um terceiro pico por volta dos 130°C. O primeiro pico corresponderia à

temperatura de transição de fase (ou vítrea) do Brij® 52, que Pardakhty *et al.* (2007) reconheceram ocorrer em suas análises à temperatura de 32,5°C. Nesta temperatura, as cadeias poliméricas passam de um estado mais organizado para um mais frouxo, no qual adquirem mais mobilidade. Portanto, pode-se inferir que o próximo pico corresponderia ao ponto de fusão do tensoativo, que encontra respaldo na publicação de Tagami *et al.* (2011). O pico endotérmico mais acentuado, por volta dos 132°C, estaria relacionado ao processo de vaporização do composto (SIGMA-ALDRICH, 2013a). A curva TG (Figura 17 B) mostra um decaimento mais pronunciado da variação de massa a partir de 150°C, quando se inicia a decomposição do tensoativo, o que poderia acontecer após a etapa de vaporização.

A análise térmica do MIP por DSC (Figura 18 A) revelou um pico endotérmico por volta dos 10°C, correspondente ao seu ponto de fusão (ROOHPOUR *et al.*, 2009). O óleo demonstrou ser termicamente estável até temperaturas próximas a 150°C, quando possivelmente começaria a se decompor, como mostra a curva termogravimétrica abaixo (Figura 18 B):

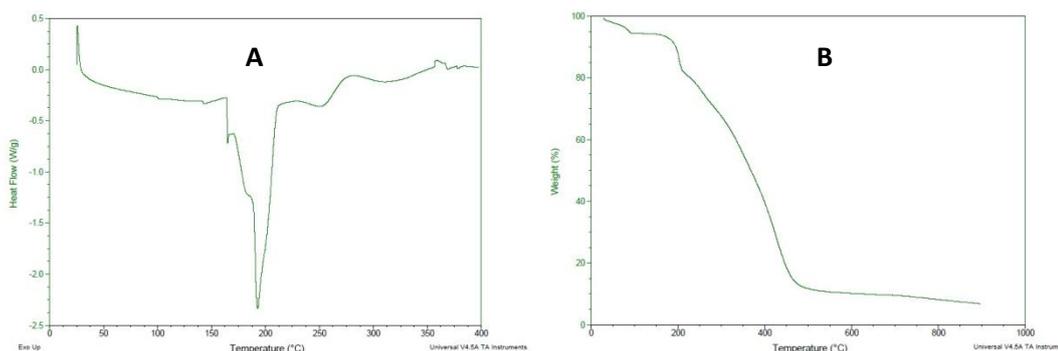
Figura 18 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do miristato de isopropila



Fonte: Arquivo pessoal

Analisando a curva DSC da AmB (Figura 19 A), podemos observar um largo pico endotérmico, compreendendo a faixa de temperatura que vai dos 160°C até 210°C, aproximadamente. Esse largo pico parece englobar dois eventos. A literatura relata que a AmB pode começar a se decompor antes do seu ponto de fusão, que é por volta dos 170°C, fato corroborado pelo decaimento em duas etapas da sua curva termogravimétrica (Figura 19 B) (CHUEALEE *et al.*, 2010; ESPUELAS *et al.*, 1997; SIGMA-ALDRICHc, 2013).

Figura 19 – Curva DSC (A) e curva TG (B) da AmB

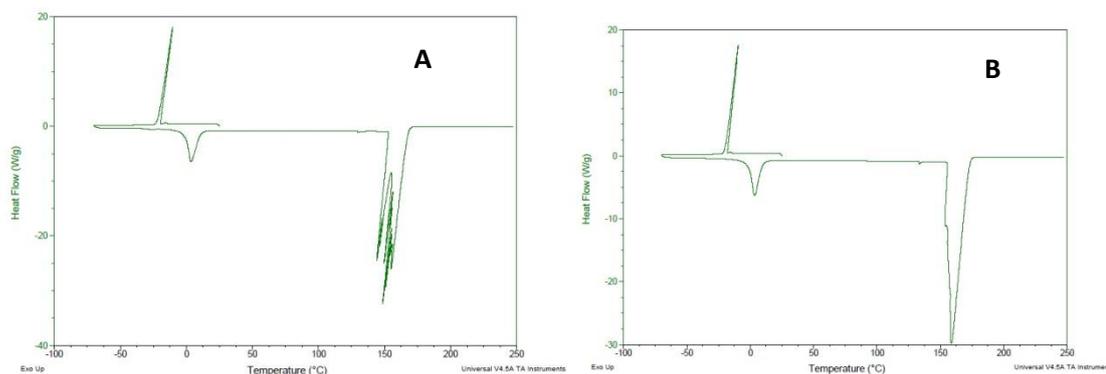


Fonte: Arquivo pessoal

Quando a proporção de fase aquosa de um sistema disperso é aumentada gradualmente, observa-se que os tensoativos, instantaneamente, interagem com a água adicionada e apenas depois de se hidratarem é que há a formação da água livre do sistema. Assume-se que a água livre possua propriedades físico-químicas similares àquelas da água pura. Já a água ligada ou interfacial apresenta alterações nas suas propriedades termodinâmicas, como ponto de congelamento, ponto de fusão, entalpia e capacidade calorífica, sendo essas variações detectadas por DSC. Desse modo, a presença de água livre no sistema pode ser visualizada através do pico endotérmico característico do seu ponto de fusão, ou seja, evento que ocorre na temperatura de 0°C (BOONME *et al.*, 2006; GARTI *et al.*, 2000).

Ambas as NE, formuladas com e sem fármaco, apresentaram pico endotérmico em 0°C e pico exotérmico por volta dos -20°C (Figura 20), que correspondem aos pontos de fusão e de congelamento da água livre do sistema, respectivamente (PODLOGAR *et al.*, 2004). O que está concordante com a proporção de água nos sistemas formulados (75%p/p), indicando a existência de água livre em altas concentrações, representando a fase externa ou contínua do sistema, o que caracteriza a formação de uma nanoemulsão O/A.

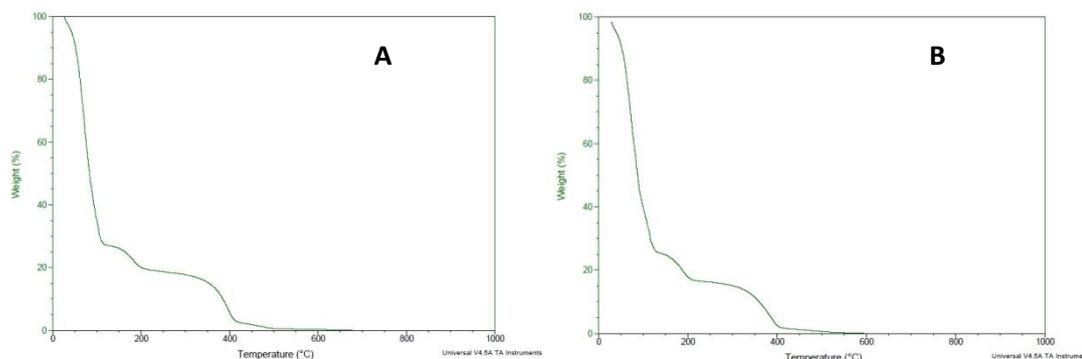
Figura 20 – Curvas DSC da Blank-NE 5 (A) e da AmB-NE 5 (B)



Fonte: Arquivo pessoal

Tanto as curvas DSC como as curvas termogravimétricas (Figura 21) das NE com ou sem AmB (Blank-NE e NE-AmB) são praticamente idênticas. Tal fato poderia predizer que a AmB não foi capaz de alterar o comportamento térmico do sistema no qual foi incorporada, possivelmente por estar dispersa na fase interna da nanoemulsão (MILOVIC *et al.*, 2012; PARDAKHTY *et al.*, 2007; SEO *et al.*, 2012).

Figura 21 – Curvas TG da Blank-NE 5 (A) e da AmB-NE 5 (B)



Fonte: Arquivo pessoal

5.5 Avaliação da estabilidade preliminar

Microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis. Entretanto, podem apresentar limitações para administração por via parenteral, pois suas propriedades são fortemente afetadas por alterações de temperatura e/ou diluições. Em contrapartida, as NE são cineticamente estáveis, mantendo sua integridade por anos (BRUXEL *et al.*, 2012).

O tamanho reduzido das NE confere estabilidade contra os processos de sedimentação ou cremagem, já que as gotículas estão sujeitas ao movimento Browniano e, conseqüentemente, a taxa de difusão será maior que a taxa de sedimentação induzida pela gravidade. Entretanto, as NE sofrem um processo de desestabilização, conhecido como amadurecimento de Ostwald, que advém da polidispersão da emulsão e da diferença de solubilidade entre gotículas menores e maiores (SOLANS *et al.*, 2005).

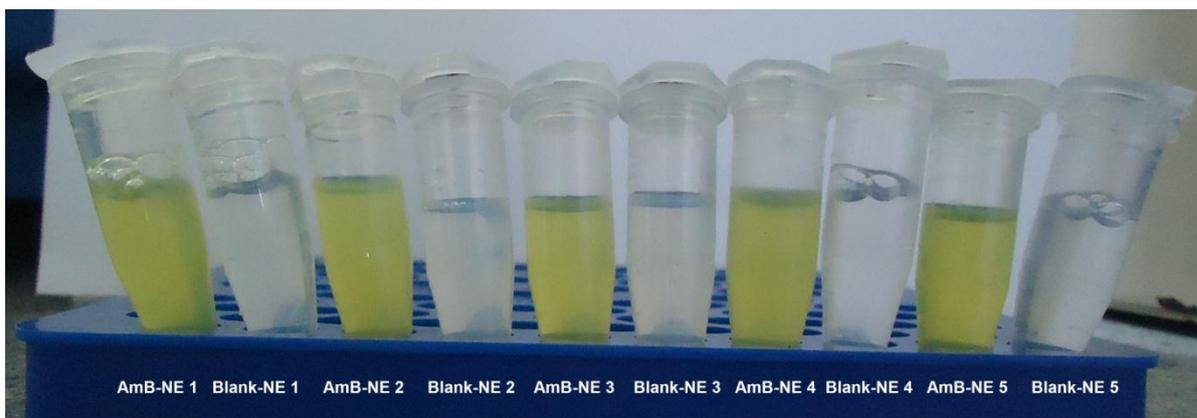
O amadurecimento de Ostwald resulta do crescimento de uma gotícula à custa de outra menor, devido à diferença no potencial químico dos constituintes das gotículas. A solubilidade (e, conseqüentemente, o potencial químico) da fase dispersa na fase contínua é dependente do raio de curvatura da gotícula, com a solubilidade aumentando com o decréscimo do raio. O que faz com que as gotículas menores, ao se dissolverem na fase contínua, se difundam e se redeponem sobre as maiores, levando ao aumento no tamanho médio da emulsão, com o decorrer do tempo, contribuindo para desestruturação do sistema (TAYLOR, 1998).

A centrifugação é uma ferramenta bastante utilizada nos estudos de estabilidade de sistemas dispersos, pois permite observar, em curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físico-químicas das formulações (BRIME *et al.*, 2002; GHOSH *et al.*, 2013; MORAIS, 2006).

A finalidade do teste de centrifugação é produzir estresse na amostra, e, assim, simular um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das gotículas e antecipando possíveis instabilidades, que podem aparecer como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto (*caking*) e coalescência, entre outras (BRASIL, 2008).

Todas as formulações submetidas ao teste de centrifugação permaneceram estáveis, sem evidência de separação de fases, ao final do ciclo de 1000rpm (70g), como observado na Figura 22.

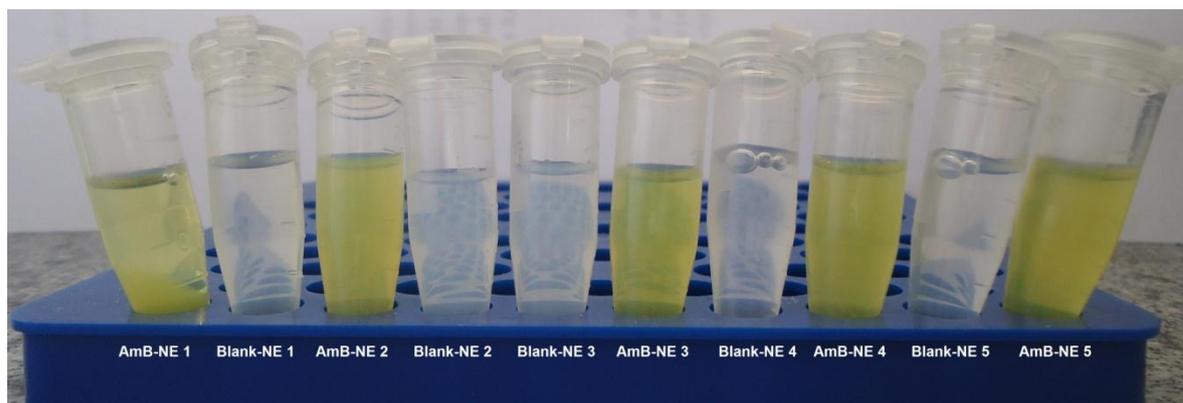
Figura 22 – Fotografia das formulações após centrifugação a 1000rpm (70g) por 15min



Fonte: Arquivo pessoal

Após o ciclo de 2500rpm (440g) apenas a AmB-NE 1 apresentou alteração, evidenciada pela provável sedimentação da AmB (Figura 23).

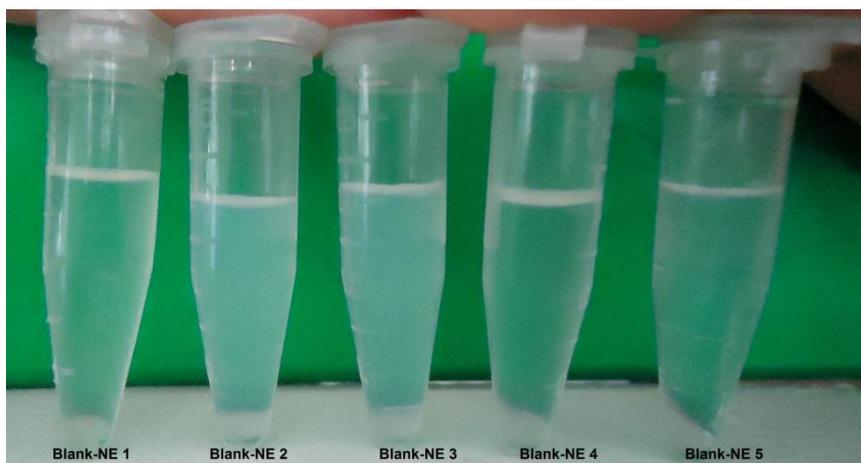
Figura 23 – Fotografia das formulações após centrifugação a 2500rpm (440g) por 15min



Fonte: Arquivo pessoal

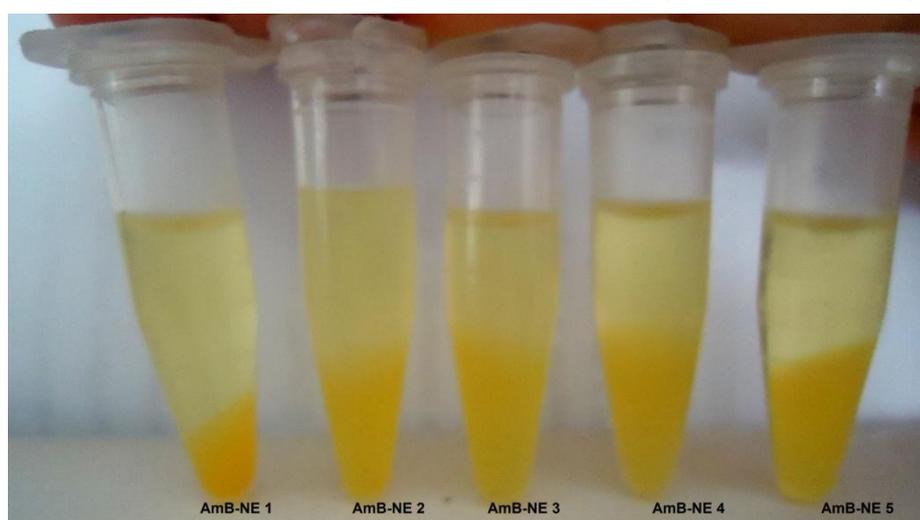
Nenhuma formulação Blank-NE apresentou alterações visuais após centrifugação a 3500rpm (863g) por 15min (Figura 24). Porém, todas as formulações AmB-NE apresentaram alterações visuais após centrifugação a 3500rpm (863g), evidenciada pela provável sedimentação do fármaco (Figura 25).

Figura 24 – Fotografia das formulações Blank-NE após centrifugação a 3500rpm (863g) por 15min



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 25 – Fotografia das formulações AmB- NE após centrifugação a 3500rpm (863g) por 15min



Fonte: Arquivo pessoal

Microemulsões de AmB, contendo MIP como fase oleosa, desenvolvidas por Brime *et al.* (2002) foram submetidas ao teste de centrifugação a 9000rpm por 20min, no qual foi observado que apenas uma das microemulsões preparadas apresentou precipitação do fármaco após o teste. Fato que os autores atribuíram a não utilização do método PIT (*Phase Inversion Temperature*) de incorporação da AmB para aquela amostra. Através deste método, o pH das formulações deve ser ajustado e, então, os autores optaram por mantê-lo entre 8,5-9,5, alegando que nesta faixa de pH a AmB ficaria completamente incorporada nas microemulsões, além de ser terapeuticamente aceitável para administração parenteral. Qing-Ping *et al.* (2009), baseando-se no mesmo artigo, desenvolveram microemulsões, também

utilizando MIP para liberação transdérmica de AmB, diferentemente do estudo anterior. Como menores valores de pH são mais apropriados para a pele, o efeito do pH no teor de AmB incorporado nos sistemas foi investigado. O estudo concluiu que na faixa de pH compreendida entre 5,2 a 8,5, grande quantidade de AmB precipitou e que fora dessa faixa a precipitação não excedeu 5%. Fato explicado pela característica anfotérica da molécula de AmB, que em soluções aquosas ácidas, se tornaria protonada o que, por sua vez, aumentaria a sua hidrossolubilidade. Os autores também concluíram que quando a AmB foi incorporada diretamente nas microemulsões, a taxa de incorporação foi muito baixa, devido à limitada solubilidade do fármaco em quaisquer das fases do sistema. Como já foi comentado, AmB tem um grupo -COOH na sua estrutura, que pode ser convertido em -COONa em soluções de NaOH, o que aumenta sua solubilidade na fase aquosa. Por esta razão, o estudo adotou o método de incorporação que emprega 2mL de uma solução 0,1mol/L de NaOH com quantidade apropriada de AmB às microemulsões, em temperatura acima de 80°C (PIT).

Feitas essas observações podemos concluir que a faixa de pH determinada para as formulações desenvolvidas no presente trabalho (pH 7,0-7,4) não favorece a hidrossolubilidade da molécula de AmB, já que nem estaria no seu estado protonado, que ocorre em pH ácido, nem na forma de sal encontrada em pH básico. Felizmente, outros fatores, como a capacidade intrínseca dos sistemas nanoemulsionados em solubilizar fármacos insolúveis, tornam possível sua veiculação para administração parenteral.

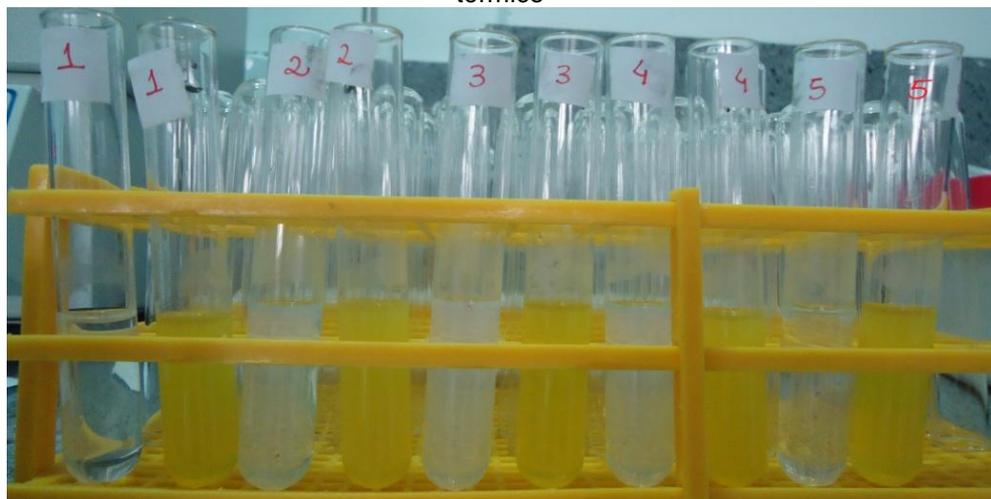
Como as Blank-NE mantiveram-se estáveis após todos os ciclos do teste de centrifugação, poderíamos adotar outros métodos de incorporação de AmB para tentar prevenir sua precipitação.

A elevação da temperatura, frequentemente, causa redução do valor da viscosidade, o que permite às gotículas da fase interna de um sistema emulsionado colidirem com maior magnitude devido a fatores como, por exemplo, intensificação da cinética e do movimento browniano destas, aumento da energia fornecida pelo aquecimento e resistência inadequada ao deslocamento das gotículas da fase interna da emulsão em consequência da diminuição da consistência da fase contínua. A partir das condições acima descritas, o teste do estresse térmico permite demonstrar mais rapidamente a tendência dos veículos emulsionados em apresentar

sinais de instabilidade como a cremagem, sedimentação e a separação de fases (RIEGER, 1996; VELASCO *et al.*, 2008).

Após o primeiro ciclo de aquecimento do teste do estresse térmico, pode-se observar que todas as formulações apresentaram discreta alteração na coloração, ficando mais opacas, em comparação à coloração que apresentavam antes do teste (Figuras 26 e 27).

Figura 26 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE antes de serem submetidas ao estresse térmico



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 27 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 40°C por 30min



Fonte: Arquivo pessoal

Ao final do aquecimento a 50°C por 30min, nota-se que as formulações Blank-NE 1, Blank-NE 4 e Blank-NE 5 mantiveram praticamente a mesma coloração do ciclo de aquecimento anterior, enquanto que a Blank-NE 2 e Blank-NE 3 ficaram ainda mais opacas (Figura 28). Estas últimas formulações são as que apresentam a

maior composição percentual de óleo (12,5%) e a menor composição percentual de tensoativos (8,5%), respectivamente, em relação às demais NE.

Figura 28 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 50°C por 30min



Fonte: Arquivo pessoal

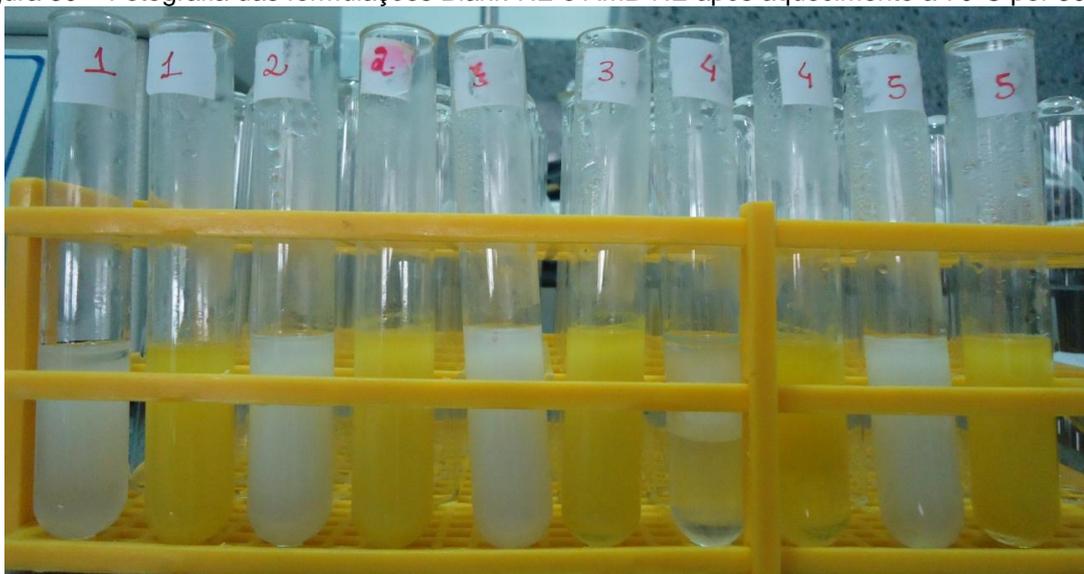
A sequência de aquecimento programado para o teste do estresse térmico culminou com o aumento progressivo da turvação e com a separação de fases das formulações, fato mais pronunciado ao final do ciclo de 80°C (Figura 29 a 31).

Figura 29 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 60°C por 30min



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 30 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 70°C por 30min



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 31 – Fotografia das formulações Blank-NE e AmB-NE após aquecimento a 80°C por 30min



Fonte: Arquivo pessoal

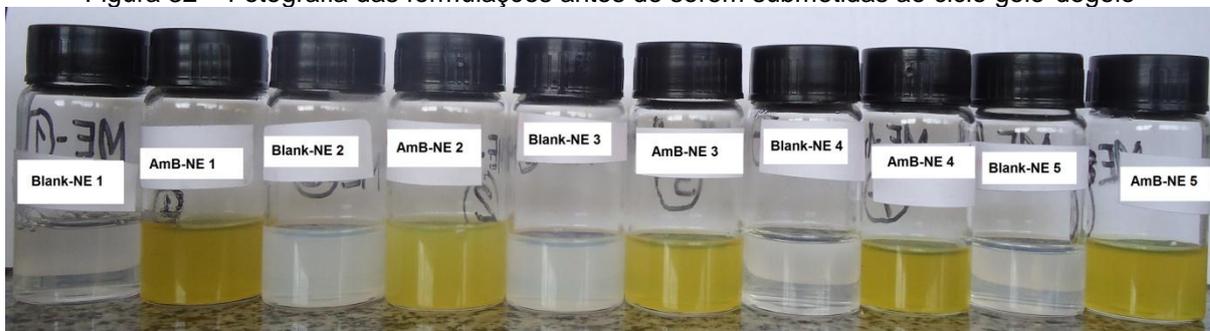
A progressiva turvação das amostras está relacionada a uma perturbação da propriedade intrínseca dos tensoativos empregados, que é influenciada pela temperatura. A solubilidade dos tensoativos etoxilados (KHS15 e Brij[®] 52, no presente trabalho) em água depende das interações de solvatação dos átomos de oxigênio da cadeia polioxietilênica pelas moléculas de água. Quando a temperatura do sistema aumenta, o movimento interno das moléculas de água pode sobrepujar essa força de atração, reduzindo a solvatação da cadeia e, conseqüentemente, a solubilidade na fase aquosa. Portanto, os tensoativos não-iônicos contendo óxido de

etileno apresentam comportamento de solubilidade reversa em água com o aumento da temperatura, resultando em turvação dos sistemas nos quais estão inseridos (DALTIM, 2011).

O emprego de condições extremas de temperatura, como programado para o teste do ciclo gelo-degelo, tem o propósito de aumentar a velocidade de degradação química e promover modificações físicas de substâncias e/ou alterações na forma farmacêutica ou cosmética, empregando condições drásticas de armazenamento. Esse teste tem sido utilizado com a finalidade de monitorar as reações de degradação e para prever o prazo de validade das preparações farmacêuticas (VELASCO *et al*, 2008).

Apesar de todas as formulações, ao final do ciclo gelo-degelo, não terem evidenciado, visualmente, indícios de instabilidade (Figuras 32 a 34), comparação estatística, através do teste t de *Student*, entre os valores de pH e condutividade das amostras aferidos antes e após submissão ao ciclo gelo-degelo revelou diferença significativa ($p < 0,05$). Apesar das condições drásticas a que foram submetidas, as amostras mantiveram a sua transparência.

Figura 32 – Fotografia das formulações antes de serem submetidas ao ciclo gelo-degelo



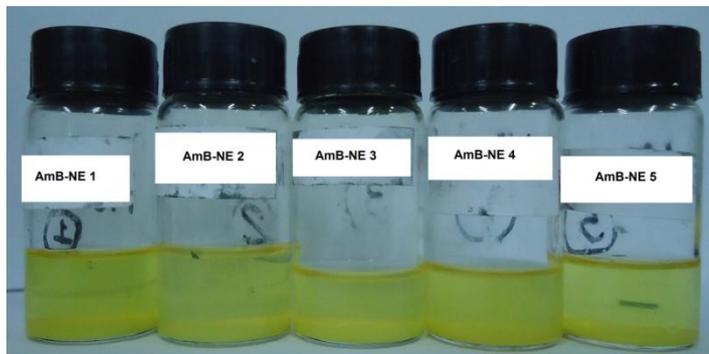
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 33 – Fotografia das formulações Blank-NE ao final do ciclo gelo-degelo



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 34 – Fotografia das formulações AmB-NE ao final do ciclo gelo-degelo



Fonte: Arquivo pessoal

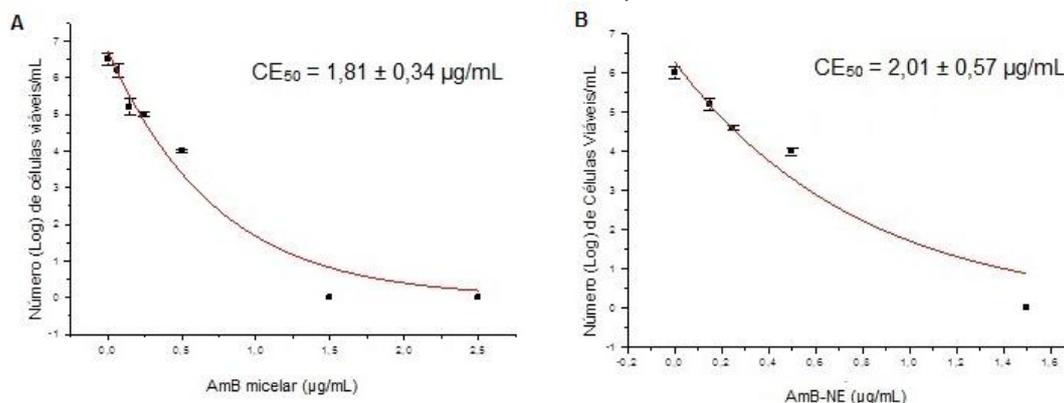
5.6 Atividade leishmanicida

Diferentes estágios de desenvolvimento do ciclo de vida do parasito *Leishmania* tem sido usados tanto para triagem e avaliação da atividade de extratos de plantas e/ou fármacos, como para determinação da resistência de isolados clínicos (PIÑERO *et al.*, 2002; VERMEERSCH *et al.*, 2009). A forma promastigota, cuja principal característica morfológica é a presença de flagelo, apresenta estrutura alongada e pode medir entre 16-40 μ m x 1,5-3 μ m (comprimento x largura), incluindo o flagelo que é sempre maior que o corpo do parasito. A motilidade conferida pelo flagelo é fator primordial para avaliação da atividade leishmanicida pelo método que se baseia na observação e contagem direta das formas viáveis do parasito com o auxílio de um microscópio óptico. Este método apesar de consumir um considerável tempo do analista, apresenta a vantagem de não requerer materiais ou equipamentos dispendiosos, além de ser uma técnica de fácil execução (FUMAROLA *et al.*, 2004).

A atividade leishmanicida das NE foi avaliada pela contagem do número total de parasitos vivos após seis horas de incubação e posterior comparação com o número de formas viáveis após incubação com a formulação de AmB micelar.

A Figura 35 apresenta as curvas da concentração de AmB micelar e AmB-NE 5 versus logaritmo do número de células viáveis por mL, bem como os resultados da CE₅₀ de cada amostra.

Figura 35 – Curvas da concentração de AmB micelar (A) e AmB-NE 5 (B) versus logaritmo do número de células viáveis por mL



Fonte: Arquivo pessoal

Os valores da CE₅₀ mostram que a NE incorporada com AmB tem eficácia leishmanicida estatisticamente igual a da formulação de AmB micelar (Anforicin®). Resultado que não é desanimador, já que há relatos na literatura de diminuição da eficácia leishmanicida das formulações lipídicas comparadas à formulação convencional de AmB, devido à formação de complexos entre o fármaco e os carreadores. Isso geralmente relaciona-se a um “efeito de depósito” promovido por tais carreadores. A formulação de AmB micelar tem uma organização estrutural mais dinâmica do que sistemas lipídicos, como microemulsões e NE, pois nestes as moléculas de tensoativos 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. Além do mais, com relação às formas promastigotas, a AmB livre é capaz de se associar diretamente com o ergosterol da membrana do parasito, pelo qual tem grande afinidade (DAMASCENO, 2010; YARDLEY & CROFT, 1997).

Apesar do presente trabalho não ter realizado teste de atividade leishmanicida sobre a forma amastigota, e mesmo ciente da existência de peculiaridades morfológicas e bioquímicas de cada uma das formas do parasito, espera-se que as AmB-NE desenvolvidas também possam demonstrar eficácia sobre o estágio intracelular do parasito, com base nos relatos de alguns estudos como veremos adiante. Vermeersch *et al.* (2009), ao analisarem a susceptibilidade de uma cepa de *Leishmania donovani* a AmB micelar (Fungizone®), observaram que o valor da concentração inibitória média (IC₅₀) para a forma promastigota foi maior

do que a encontrada para amastigota (0,7 μ M e 0,1 μ M, respectivamente) e, dessa forma, concluíram que as promastigotas tendem a ser menos sensíveis do que os outros estágios celulares. Fato também relatado por Piñero *et al.* (2002), que compararam a susceptibilidade de cepas de *Leishmania infantum* a Abelcet[®] e Fungizone[®], por Golenser *et al.* (1999) no estudo da atividade da AmB conjugada ao polissacarídeo arababinogalactana sobre cepas de *Leishmania infantum* e *Leishmania major* e por Yardley & Croft (1997) na comparação da atividade de Ambisome[®] versus Fungizone[®] sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania major*. Ordóñez-Gutiérrez *et al.* (2007) demonstraram que a AmB não encapsulada, em qualquer dos seus estados de agregação, não foi capaz de reduzir a população promastigota de *Leishmania infantum*, nas concentrações testadas. Todavia, as formulações de AmB incorporada em microesferas de albumina ou PGLA eliminaram completamente as formas promastigotas na concentração de 3,2 μ g/mL. Enquanto que, para as formas amastigotas, todas as formulações, inclusive as de AmB livre, apresentaram concentração bem menor para total eliminação (0,4 μ g/mL).

É importante frisar que os valores de CE₅₀ apresentados no presente trabalho foram obtidos pela leitura das placas após 6 horas de incubação das amostras com o inóculo. Enquanto que os estudos mencionados no parágrafo anterior empregaram 48 horas de incubação. Logo, se tivéssemos adotado este mesmo intervalo de tempo para iniciarmos a contagem das formas viáveis, poderíamos ter encontrado valores de CE₅₀ consideravelmente menores para as formulações.

6. Conclusão

Em virtude dos resultados obtidos pode-se concluir que a construção de diagramas de fase pseudoternários é uma ferramenta bastante simples e de grande utilidade na identificação das regiões de NE e posterior seleção dos pontos para caracterização. O método de sonicação das formulações constituídas de KHS15, Brij® 52, MIP e água mostrou-se favorável à obtenção dos sistemas nanoemulsionados. As gotículas das AmB-NE apresentaram formato esférico, com diâmetro médio de 33 a 132nm e distribuição de tamanho monomodal, potencial Zeta negativo, além de pH neutro, condutividade condizente com sistemas óleo em água e comportamento isotrópico, características adequadas para administração intravenosa. A análise térmica revelou que a AmB não foi capaz de alterar o comportamento térmico do sistema, possivelmente por estar dispersa na fase interna. Já que a centrifugação das AmB-NE provocou uma redução drástica do conteúdo de AmB das formulações, sugere-se que outros métodos de incorporação de AmB devam ser adotados para tentar prevenir sua precipitação. As Blank-NE aparentaram ser mais estáveis do que as formulações que continham o fármaco. AmB-NE mostrou eficácia leishmanicida estatisticamente igual a da formulação de AmB micelar, o que a habilita para futuros ensaios para avaliação da eficácia sobre formas amastigotas, como também testes de citotoxicidade, com a finalidade de torná-la uma alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral.

7. Referências

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., ALLEN JR. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568 p.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 5, p. 978-985, 2011.

ANTONIADOU, A.; DUPONT, B. Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? **Journal de Mycologie Médicale**, v. 15, n. 4, p. 230-238, 2005.

ARAÚJO, A.A.S.; BEZERRA, M.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determination of the melting temperature, heat of fusion, and purity analysis of different samples of zidovudine (AZT) using DSC. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, 2010.

ARAÚJO, F. A.; KELMANN, R. G.; ARAÚJO, B. V.; FINATTO, R.B.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 238-245, 2011.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 410-420, 2010.

BHATT, A.; BISHT, P.; TYAGI, S. Novel drug delivery system-nanoemulsions: a recent review. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 27-35, 2013.

BARRATT, B.; LEGRAND, P.; Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 527-530, 2005.

BARRATT, G.; BRETAGNE, S. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 301-313, 2007.

BASF. KOLLIPHOR™ HS 15. Technical Information. Disponível em:
<<http://www.pharmaingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/>

Pharma%20Solutions/03_111149e_Kolliphor%20HS%2015.pdf.>. Acesso em: 18 nov. 2012.

BHATTACHARYYA, A; BAJPAI, M. Development and evaluation of a self-emulsifying drug delivery system of amphotericin B. **Asian Journal of Pharmaceutics**, n. 6, p. 124-129, 2012.

BENNETT, J.E. Agentes anfúngicos. In: GILMAN AG, HARDMAN JG, LIMBIRD LE. Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**, 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005. cap. 49, p.971-983.

BERDICHEVSKI, R.H. **Nefrotoxicidade associada à anfotericina B em pacientes de baixo risco**. 2003. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul de Porto Alegre, Porto Alegre, 2003.

BERTRAND, N.; LEROUX, J.C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. **Journal of Controlled Release.**; v. 161, n. 2, p. 152-163, 2012.

BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.23, p. 353-356.

BOLARD, J.; LEGRAND, P.; HEITZ, F.; CYBULSKALL, B. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membrane is determined by its self-association in the medium. **Biochemistry**. v. 30, n. 23, p. 5707-5715, 1991.

BOONME, P.; KRAUEL, K.; GRAF, A.; RADES, T.; JUNYAPRASERT, V.B. Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, Article 45, 2006.

BORHADE, V.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part II: Stability assessment, in vivo pharmacodynamic evaluations and toxicological studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 431, n. 1-2, p. 149-160, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF; 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Gerência Geral de Cosméticos. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. Brasília: ANVISA, 2008.

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 Sciences**, v. 91, n. 4, p. 1178-1185, 2002.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BURCHMORE, R.J. & BARRETT, M. P. Life in vacuoles—nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal of Parasitology**, vol. 31, p.1311-1320, 2001.

CAI, W.; DENG, W.; YANG, H.; CHEN, X.; JIN, F. A propofol microemulsion with low free propofol in the aqueous phase: formulation, physicochemical characterization, stability and pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 536-44, 2012.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

CHAMPION, J.A.; WALKER, A.; MITRAGOTRI, S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1815-1821, 2008.

CHANG, C.M.; BODMEIER, R. Binding of drugs to monoglyceride-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 147, n. 2, p. 135-142, 1997.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M.D. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.416, n. 1-2, p. 7-12, 2011.

CHUEALEE, R.; WIEDMANN, T.S.; SUEDEE, R.; SRICHANA, T. Interaction of Amphotericin B with cholesteryl palmityl carbonate ester. **Journal of pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 11, p. 4593-4602, 2010.

COHEN, T.; SAUVAGEON-MARTRE, H.; BROSSARD, D.; D'HERMIERES, F.; BARDIN, C.; CHAST, F.; CHAUMEIL, J.C. Amphotericin B eye drops as a lipidic emulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 137, p. 249-254, 1996.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 162, n. 1-2, p. 95–106, 1998.

CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 757-767, 2008.

CORSWANT, C.V.; THOREN, P.; ENGSTROM, S. Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 2, p. 200-207, 1998.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

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

DAMASCENO, B.P.G.L.; DOMINICI, V.A.; URBANO, I.A.; SILVA, J.A.; ARAÚJO, I.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; SILVA, A.K.A.; MEDEIROS, A.C.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 290-300, 2012.

DAROLE, P.S.; HEDGE, D.D.; NAIR, H.A. Formulation and Evaluation of Microemulsion Based Delivery System for Amphotericin B. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 122-128, 2008.

DAS, S.; SURESH, P. Nanosuspension: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to amphotericin B. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.7, n. 2, p. 242-247, 2011.

DATE, A.A.; NAGARSENKER, M.S. Design and evaluation of microemulsions for improved parenteral delivery of propofol. **AAPS PharmSciTech**, v.9, n. 1, p.138-145, 2008.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 37-41, 2002.

DOSHI N.; MITRAGOTRI, S. Macrophages recognize size and shape of their targets. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. 1-6, 2010.

ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J-P.H.; YGARTU, P. Poly(e-caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.158, p. 19-27, 1997.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FLEMING, R.V.; KANTARJIAN, H.M., HUSNI, R.; ROLSTON, K.; LIM, J.; RAAD, I.; PIERCE, S.; CORTES, J.; ESTEY, E. Comparison of amphotericin B lipid complex (ABLC) vs. Ambisome in the treatment of suspected or documented fungal infections in patients with leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 40, p. 511-520, 2001.

FLOYD, A. G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharmaceutical science & technology today**, vol. 2, n.4, p. 134-143, 1999.

FORMARIZ, T.P. **Incorporação de doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa *in vitro* através de cultura de células.** 2004. 199f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI LA. SARMENTO, V.H.V.; SANTILLI, C.V.; TABOSA DO EGITO, E.S.; OLIVEIRA, A.G. Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 60, n. 1, p. 28-35, 2007.

FORMARIZ, T.P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de em microemulsões lipídicas contendo doxorrubicina.** 2008. 203f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2008.

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

GAO, F.; ZHIWEN, ZHANG.; HUIHUI, B.U.; YAN, HUANG. ZHIWEI, GAO. JIANAN, SHEN.CHUNJIE, ZHAO. YAPING, LI. Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: Performance and mechanism. **Journal of Controlled Release**, v.149, n. 2, p. 168–174, 2011.

GARTI, N.; ASERIN, A.; TIUNOVA, I.; FANUN, M. A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 170, n. 1, p. 1-18, 2000.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GENNARO, A. R.; REMINGTON: The Science and Practice of Pharmacy. 21st edition. Lippincott Williams e Wilkins, 2005. Disponível em:<
<http://books.google.com.br/books?id=NFGSSbaWjwC&pg=PA763&lpg=PA763&dq=isopropyl+myristate+parental+emulsions&source=bl&ots=V71UNhIrwv&sig=ul3al8OP0K-IWPPLfHs6cFx4qrc&hl=ptPT&sa=X&ei=eQRiUdyvKYGh0AGWt4HoDQ&ved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=myristate&f=false>>. Acesso em 07 abr. 2013.

GOLENSER, J.; FRANKENBURG, S.; EHRENFREUND, T.; DOMB, A. J. Efficacious Treatment of Experimental Leishmaniasis with Amphotericin B-Arabinogalactan Water-Soluble Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 43, n. 9, p. 2209-2214, 1999.

GOMES, F. E. S. **Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais bioativos**. 2010. 172f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do rio Grande do Norte, Natal, 2010.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M.C.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n.2, p. 171-185, 1999.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n.1, p. 338-344, 2013.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.105, p. 152-157, 2013.

HANN, I. M.; PRENTICE, H. G. Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 3, p. 161-169, 2001.

HANS, M.L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State & Material Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002.

HATHOUT, R. M.; WOODMAN, T.J.; MANSOUR, S.; MORTADA, N. D.; GENEIDI AS. GUY, R.H. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n.3, p.188-196, 2010.

HE, C.; YIPING, H. U.; LICHEN, Y.; CUI, T.; CHUNHUA, Y. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v.31, n. 13, p. 3657-3666, 2010.

HEINEMANN, V.; BOSSEA, D.; JEHNA, U.; DEBUSA, A.; WACHHOLZA, K.; FORST, H.; WILMANN, W. Enhanced pulmonary accumulation of liposomal amphotericin B (AmBisome) in acute liver transplant failure. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 295-297, 1997.

HIRSJÄRVI S. DUFORT, S.; GRAVIER, J.; TEXIER, I.; YAN, Q.; BIBETTE, J.; SANCEY, L.; JOSSERAND, V.; PASSIRANI, C.; BENOIT, J. P.; COLL, J. L. Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.9, n. 3, p. 375-387, 2011.

HOOSMAND-RADA, R.; CHUA, A.; GOTZA, V.; MORRISA, J.; BATTYB, S.; FREIFELDC, A. Use of amphotericin B lipid complex in elderly patients. **Journal of Infection**, v. 50, n. 4, p. 277-287, 2005.

ILLUM, L.; JORDAN, F.; LEWIS, A. L. CriticalSorb™: A novel efficient nasal delivery system for human growth hormone based on Solutol HS15. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n.1, p. 194-200, 2012.

INSELMANN, G.; INSELMANN, U.; HEIDEMANN, H. T. Amphotericin B and liver function. **European Journal of Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 288-292, 2002.

JIAO, J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1663-1673, 2008.

JUMAA, M.; MÜLLER, B.W. Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, n. 2, p. 207-212, 2002.

JUNYAPRASERT, V.B.; BOONMEA, P.; SONGKROB, S.; KRAUELC, K.; RADES, T. Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from o/w and w/o Brij 97-based microemulsions. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.10, n. 3, p. 288-298, 2007.

KAPOOR, Y.; THOMAS, J. C.; TAN, G.; JOHN, V. T.; CHAUHAN, A. Surfactant-laden soft contact lenses for extended delivery of ophthalmic drugs. **Biomaterials**, v. 30, n. 5, p. 867-878, 2009.

KAUR, I.P.; KAKKAR, S. Topical delivery of antifungal agents. **Expert Opinion on Drug Delivery**, vol. 7, n. 11, p. 1303-1327, 2010.

KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel Ddlivery: Peroral and dermal delivery studies in rats. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 1, p. 154-162, 2007.

KLANG, V.; MATSKO, N. B.; VALENTA, C.; HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, vol. 43, p. 85-103, 2012.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 342, p. 231-239, 2007.

KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n.1, p. 12-16, 2006.

KUNJACHAN, S.; JOSEA, S.; THOMAS, C. A.; JOSEPH, E.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Physicochemical and biological aspects of macrophage-mediated drug targeting in anti-microbial therapy. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 63-71, 2012.

MACKENZIE, R.C. Nomenclature in thermal analysis, part IV. **Thermochimica acta**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 1979.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, vol. 18, p. 635-666, 2006.

MASMOUDI, H.; DRÉAU, Y. L.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 289, n. 1–2, p. 117-131, 2005.

MATOS JR, MERCURI L, BARROS G. Análise térmica aplicada à fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. (Eds.). **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 32-65, 2009.

MAZERSKI, J.; GRZYBOWSKA, J.; BOROWSKI, E. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. **European Biophysics Journal**, v. 18, n. 3, p. 159-164, 1990.

MERCK. Miristato de isopropilo. Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-BR-Site/pt_BR/-/EUR/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=mzSb.s1Lc8AAAAE Wi.EfVhTI&ProductUUID=O4Gb.s1OdXcAAAEaN0NqKZLI&PortalCatalogUUID=t02b.s1LX0MAAAEWc9UfVhTI> Acesso em: 07 abr. 2013.

MILOVIĆ, M.; DJURIS, J.; DJEKIC, L.; VASILEVIC, D.; IBRIC, S. Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012.

MISTRO, S.; MACIEL, I. M.; MENEZES, R. G.; MAIA, Z.; SCHOOLEY, R. T.; BARDARÓ, R. Does lipid emulsion reduce amphotericin B nephrotoxicity? A systematic review and meta-analysis. **Clinical infectious diseases**, v. 54, n. 12, p. 1774-1777, 2012.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

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, n. 3, p.344-351, 2001.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343-356, 2004.

MUSA, A. M.; YOUNIS, B.; FADLALLA, A.; ROYCE, C.; BALASEGARAM, M.; WASUNNA, M.; HAILUS, A.; EDWARDS, T.; OMOLLO, R.; MUDAWI, M.; KOKWARO, G.; EL-HASSAN, A.; KHALIL, E. Paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized, open-label, dose-finding study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 10, p. e855, 2010.

NAKABAYASHI, K.; AMEMIYA, F.; FUCHIGAMI, T.; MACHIDA, K.; TAKEDA, S.; TAMAMITSUB, K.; ATOBE, M. Highly clear and transparent nanoemulsion preparation under surfactant-free conditions using tandem acoustic emulsification. **Chemical Communications**, v. 47, n. 20, p. 5765-5767, 2011.

NAKAOKA, R.; TABATA, Y.; YAMAOKA, Y.; IKADA, Y. Prolongation of the serum half-life period of superoxide dismutase by poly (ethylene glycol) modification. **Journal of Controlled Release**, v. 46, n. 3, p. 253-261, 1997.

NARS, M.; NAWAZ, S.; ELHISSI, A. Amphotericin B lipid nanoemulsion aerosols for targeting peripheral respiratory airways via nebulization. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 436, n. 1–2, p. 611-616, 2012.

ORDOÑÉZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M. A.; TORRADO J. J.; BOLÁS-FERNANDEZ, F.; ALUNDA, J. M. In vitro effect of new

formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 30, p. 325-329, 2007.

PARDAKHTY, A.; VARSHOSAZ, J.; ROUHOLAMINI, A. In vitro study of polyoxyethylene alkyl ether niosomes for delivery of insulin. **International journal of pharmaceuticals**, v. 328, n. 2, p. 130-141, 2007.

PARK, E. S.; CHANG, S. Y.; HAHN, M.; CHI, S. C. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. **International journal of pharmaceuticals**, v. 209, n. 1, p. 109-119, 2000.

PENCER, J.; NIEH, M. P.; HARROUN, T. A.; KRUEGER, S.; ADAMS, C.; KATSARAS, J. Bilayer thickness and thermal response of dimyristoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles containing cholesterol, ergosterol and lanosterol: a small-angle neutron scattering study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1720, n. 1, p. 84-91, 2005.

PESTANA, K. C.; FORMARIZ, T. P.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA M. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 253-259, 2008.

PESTANA, K. C. **Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral**: Estudo estrutural, liberação *in vitro* e farmacocinética pré-clínica. 2009. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" de Araraquara, Araraquara, 2009.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 144 -150, 2006.

PIÑERO, J. E.; MARTÍNEZ, S. D. C.; PORTÚS, M.; VALLADARES, B. In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* strains isolated from Spanish HIV-positive patients to Abelcet and Fungizone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 304-306, 2002.

PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; TOMSIC, M.; JAMNIK, A.; ROGAC, M. B. Structural characterisation of water-Tween 40®/Imwitor 308®-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. **International journal of pharmaceuticals**, v. 276, n. 1, p. 115-128, 2004.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. v. 2, 518p.

QING-PING, T.; PENG, L.; KE-CHANG, X. Investigation of Microemulsion System for Transdermal Drug Delivery of Amphotericin B. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 25, n.1, p. 86-94, 2009.

RIBEIRO, M. E. N. P.; MOURA, C. L.; VIEIRA M. G. S.; GRAMOSA, N. V.; CAIBUNDIT, C.; MATTOS, M. C.; ATTWOOD, D.; YEATES, S. G.; NIXON, S. K.; RICARDO, N. M. P. S. Solubilisation capacity of Brij surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012.

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics & Toiletries**, v. 8, n. 5, p. 47-53, 1996.

ROCHA, L. G. **Avaliação da Atividade Leishmanicida de Naftoquinonas Naturais Modificadas e desenvolvimento de Ensaio Biológico para avaliar a Potencia Relativa de 1-Aza-Antraquinonas Leishmanicidas**. 2006. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 7, p. 805-823, 2008.

ROOHPUR, N.; WASIKIEWICZ, J.M.; MOSHAVERINIA, A.; PAUL, D.; REHMAN, I.U.; VADGAMA, P. Isopropyl myristate-modified polyether-urethane coatings as protective barriers for implantable medical devices. **Materials**, v. 2, p. 719-733, 2009.

SAETTONI, M. F.; CHETON, P.; CERBAI, R.; MAZZANTI, G.; BRAGHIROLI, L. Evaluation of ocular permeation enhancers: in vitro effects on corneal transport of four β -blockers, and in vitro/in vivo toxic activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 144, p. 103-113, 1996.

SALERNO, C.; PEREZ, S.; MONTEAGUDO, E.; CARLUCCI, A.; BREGNI, C. Solubility amphotericin B in water-lecithin-dispersions and lecithin-based submicron emulsions. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 1, p.189-193, 2013.

SANTANA, D. P.; FONSECA, S. G. C.; BEDOR, D. C. G.; LEAL, L. B.; SILVA, J. A. Aplicação termoanalítica no desenvolvimento e caracterização de micropartículas de

PLGA contendo lapachol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 261-266, 2008.

SANTOS, C. M.; OLIVEIRA, R. B.; ARANTES, V. T.; CALDEIRA, L. R.; OLIVEIRA, M. C.; EGITO, E. S. T.; FERREIRA, L. A. M. Amphotericin B-loaded nanocarriers for topical treatment of cutaneous leishmaniasis: Development, characterization and *in vitro* skin permeation studies. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 1-8, 2012.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHWRZ, J.C.; KLANG, V.; KARALL, S.; MAHRHAUSE, D.; RESCH, G.P; VALENTA, C. Optimisation of multiple W/O/W nanoemulsions for dermal delivery of acyclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, p. 69-75, 2012.

SEO, S. W.; HAN, H. K.; CHUN, M. K.; CHOI, H. K. Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol® HS15 as a Carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 424, p. 18-25, 2012.

SIGMA-ALDRICHa. Brij® 52. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=388831&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F388831%3Flang%3Dpt.>>. Acesso em: 02 abr. 2013.

SIGMA-ALDRICHb. Kolliphor® HS 15. Safety data sheet. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=42966&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2F42966%3Flang%3Dpt.>>. Acesso em: 02 abr. 2013.

SIGMA-ALDRICHc. Amphotericin B. Product Information. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/a9528dat.Par.0001.File.tmp/a9528dat.pdf.>>. Acesso em: 02 abr. 2013.

SILVEIRA, W. L. L. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema microemulsionado contendo anfotericina B para uso oftalmológico.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

SILVEIRA, W. L. L.; DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, K. G. H.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Aspectos fundamentais no desenvolvimento de sistemas microemulsionados contendo anfotericina B para uso oftálmico. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, vol. 34, n. 1, p. 09-15, 2013.

SOARES, M. V. **Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona contendo zinco (II) ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 102-110, 2005.

SOUZA, F. L. C. **Desenvolvimento de Bases Emulsionadas de Silicone e Água e Avaliação Comparativa com Bases Emulsionadas de Óleo e Água Para Uso Externo de Uso Mais Comum em Manipulação.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SOWMIYA, M.; TIWARI, A. K.; SAHA, S. K. Fluorescent probe studies of micropolarity, premicellar and micellar aggregation of non-ionic Brij surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, p. 97-104, 2010.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 201-230, 2004.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 345-352, 2006.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; SINHA, P. K.; BHATTACHARYA, S. K. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 1571-1581, 2007.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol. 108, p.303-318, 2004.

TAGAMI, T.; ERNSTING, M. J; LI, S.D. Optimization of a novel and improved thermosensitive liposome formulated with DPPC and a Brij surfactant using a robust in vitro system. **Journal of Controlled Release**, v. 154, p. 290-297, 2011.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75, p. 107-163, 1998.

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

VERMEERSCH, M.; LUZ, R. I.; TOTÉ, K.; TIMMERMANS, J. P.; COS, P.; MAES, L. In Vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol. 53, n. 9, p. 3855-3859, 2009.

VELASCO, M. R. V.; MACIEL, C. P. M.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KENKO, T. M.; BABY, A. R. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 181-196, 2008.

VYAS, S.P.; KATARE, Y.K.; MISHRA, V.; SIHORKAR, V. Ligand directed macrophage targeting of amphotericin B loaded liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 210, p. 1-14, 2000.

WANG, J.; SUNG, K. C.; HU, O. Y.; YEH, C.; FANG, J. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. **Journal of Controlled Release**, v. 115, p. 140-149, 2006.

WASHINGTON, C.; TAYLOR, S. J.; DAVIS, S. S. The structure of colloidal formulations of amphotericin B. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 46, p. 25-30, 1988.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March

2010. Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em 24 abr. 2013

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em 24 abr. 2013

WINGARD, J. R.; KUBILIS, P.; LEE, L.; YEE, G.; WHITE, M.; WALSH, L.; BOWDEN, R.; ANAÏSSIE, E.; HIEMENZ, J.; LISTER, J. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1402-1407, 1999.

YARDLEY, V.; SIMON, L. C. 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.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, p. 112-115, 2008.

ZHANG, L. W.; AL-SUWAYEH, S.; HUNG, C. F.; CHEN, C. C.; FANG, J. Y. Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, vol.6, p. 693-704, 2011.

ZHAO, X.; CHEN, D.; GAO, P.; DING, P.; LI, K. Synthesis of ibuprofen eugenol ester and its microemulsion formulation for parenteral delivery. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 1246-1250, 2005.