



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ALANA RAFAELA ALBUQUERQUE BARROS**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DE MICROEMULSÕES O/A CONTENDO  
ANFOTERICINA B**

CAMPINA GRANDE – PB  
2013

ALANA RAFAELA ALBUQUERQUE BARROS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DE MICROEMULSÕES O/A CONTENDO  
ANFOTERICINA B**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Farmácia da Universidade  
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência  
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

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

Coorientadora: Profa. Dra. Raíssa Mayer Ramalho  
Catão

CAMPINA GRANDE – PB  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

B277d

Barros, Alana Rafaela Albuquerque.

Desenvolvimento, caracterização e atividade antifúngica de microemulsões o/a contendo Anfotericina b. [manuscrito] / Alana Rafaela Albuquerque Barros. – 2013.

f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2013.

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

1. Atividade antifúngica. 2. Farmacologia. 3. Microemulsões. I. Título.

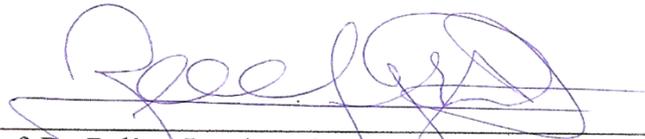
21. ed. CDD 615.1

ALANA RAFAELA ALBUQUERQUE BARROS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DE MICROEMULSÕES O/A CONTENDO  
ANFOTERICINA B**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Farmácia da Universidade  
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência  
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

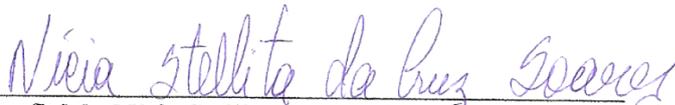
Aprovada em 22 / 07 / 2013.



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno / UEPB  
Departamento de Farmácia / CCBS  
Orientador



Prof. Dr. Harley da Silva Alves / UEPB  
Departamento de Farmácia / CCBS  
Examinador



Prof. Ms. Nícia Stellita da Cruz Soares / UEPB  
Departamento de Farmácia / CCBS  
Examinador

## DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MICROEMULSÕES O/A CONTENDO ANFOTERICINA B

BARROS, Alana Rafaela Albuquerque<sup>1</sup>; ARAÚJO, Gabriela Muniz Felix; DAMASCENO, Bolívar Ponciano Goulart de Lima.

### RESUMO

Microemulsões (ME) são sistemas semelhantes a soluções com um interior formado por gotículas nanométricas estabilizadas por um conjunto de agentes tensoativos. As ME são líquidos termodinamicamente estáveis e excelentes veículos para solubilização e transporte de compostos ativos insolúveis em água e/ou em óleo. Esta propriedade biológica permite o uso de ME como transportadores para diversas moléculas, tais como a anfotericina B (AmB), pela via intravenosa. AmB é um fármaco que apresenta caráter anfifílico, sendo altamente eficaz no tratamento antifúngico, no entanto, apresenta toxicidade importante. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar um novo sistema de transporte microemulsionado contendo AmB no seu interior, além de avaliar sua atividade antifúngica. As ME foram formuladas pelo método de sonicação, através do emprego da mistura dos tensoativos Kolliphor<sup>®</sup> HS 15 e Brij<sup>®</sup> 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 ME tiveram pH neutro e condutividade condizente com sistemas óleo em água, além de comportamento isotrópico. As ME apresentaram potencial zeta negativo. O diâmetro médio das gotículas com o fármaco variou de 33 a 132 nm. A análise térmica revelou que a AmB não foi capaz de alterar o comportamento térmico do sistema, possivelmente por estar dispersa na fase interna. A AmB-ME mostrou eficácia antifúngica estatisticamente igual a da formulação de AmB micelar. Consequentemente, a construção do diagrama de fases pseudoternário foi bastante útil para a identificação das regiões de microemulsão, a incorporação da AmB não alterou o sistema e a AmB-ME apresentou atividade antifúngica frente as espécies de *Candida* utilizadas.

**Palavras-Chave:** Anfotericina B. Atividade Antifúngica. Microemulsão.

---

<sup>1</sup> Graduação em Farmácia pela Universidade Estadual da Paraíba. alanapbcg@yahoo.com.br

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos sistemas transportadores de fármacos tem aumentado nos últimos anos. Inúmeros destes produtos apresentam a finalidade de melhorar o tratamento das doenças, no que diz respeito ao aumento da eficácia e redução da toxicidade dos fármacos, facilitando a adesão do paciente ao tratamento (DASMACENO, 2010).

Ao desenvolver sistemas de veiculação de moléculas com atividade terapêutica, a comunidade científica pretende resolver duas questões: por um lado, o transportador constitui uma barreira física e química que protege a molécula, no seu interior ou aprisionada na matriz, por outro, poderá direcionar o transportador e com isso restringir a atividade farmacológica ao órgão-alvo, limitando os efeitos adversos que podem advir da administração da forma livre (FERRARI, 2005).

Estudos mostram que a forma farmacêutica em que são veiculados os fármacos é de grande importância e tem responsabilidade pelos efeitos terapêuticos dos medicamentos, em razão de poderem modificar favoravelmente ou não, a biodisponibilidade dos mesmos (FRANZINI, 2006).

Microemulsões podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, transparentes, nos quais um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso no meio aquoso, contendo um tensoativo, associado ou não a um cotensoativo apropriado (OLIVEIRA et al., 2004).

Concomitantemente com a pesquisa de novos sistemas de liberação, surge a necessidade da pesquisa de novos fármacos antifúngicos devido ao aumento da importância clínica de infecções fúngicas, o aumento da resistência fúngica e o reduzido número de antifúngicos disponíveis, que muitas vezes possuem apenas atividade fungistática.

Segundo Klepser (2011), a população de pacientes sob o risco de micoses invasivas tem aumentado como resultado de infecções, neoplasias malignas e maior número de pacientes que se submetem a procedimentos de transplante, recebem terapias imunossupressoras agressivas e, em geral, tornam-se mais susceptíveis.

Devido a todas as dificuldades encontradas na terapêutica antifúngica, os pesquisadores tem buscado outras armas contra esses microrganismos. A anfotericina B incorporada em novas formas farmacêuticas apresenta-se como alternativa a ser estudada.

A anfotericina B (AmB), antibiótico poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, foi descoberta em 1953 e, até hoje, permanece como

substância fungicida de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos. Ainda que a AmB apresente toxicidade importante e mesmo com a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos na década de 1980, a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica asseguram sua efetividade tanto para o tratamento das infecções fúngicas, quanto para a profilaxia fúngica sistêmica em pacientes neutropênicos. O nome anfotericina deriva da característica anfotérica de sua estrutura molecular, formando tanto sais solúveis em meio ácido como em meio básico. A AmB é pouco solúvel na maioria dos solventes. Com exceção do dimetilsulfóxido (DMSO) e da dimetilformamida, ela é praticamente insolúvel em soluções aquosas de pH neutro (FILLIPIN; SOUZA, 2006).

Portanto, devido a toda essa problemática, procuramos desenvolver neste estudo sistemas microemulsionados para incorporação da AmB, sua caracterização e avaliação da atividade antifúngica.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Microemulsão (ME)

As microemulsões foram descobertas no ano de 1943 por Hoar e Schulman, sendo definidas como sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos de dois líquidos imiscíveis (óleo e água), estabilizados por um filme interfacial de tensoativos. A formulação de ME geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito. O tamanho da gotícula da ME é nanométrico, entre 10-300 nm. Por este motivo, microemulsões são relativamente translúcidas, ou seja, opticamente límpidas, fato que pode ser explicado pelo diâmetro médio das gotículas ser menor do que  $\frac{1}{4}$  do comprimento de onda da luz incidente. Logo, as mesmas não espalham luz e o sistema fica transparente (DAMASCENO, 2011; LANGEVIN, 1988; ROSANO, 1974).

Para a formação de uma ME, é necessário que ocorra a mistura de dois líquidos imiscíveis, mantendo-se a agitação constante. Quando esses líquidos são agitados mecanicamente, um deles é disperso no interior do outro. As duas fases tendem, inicialmente, a formar gotículas dispersas de um dos líquidos no interior do outro. No entanto, quando a agitação cessa, as gotículas tendem a coalescer e os líquidos separam-se novamente. Logo, se um tensoativo for adicionado ao sistema, o mesmo tende a se estabilizar, formando assim um sistema homogêneo com a formação de uma fase interna, dispersa ou descontínua circundada por uma fase externa, dispersante ou contínua. Sem a adição do tensoativo, o sistema tende a separar as fases, sendo possível visualizar novamente os dois líquidos separados (OLIVEIRA et al., 2004; DAMASCENO, 2011).

Numa abordagem microestrutural, as microemulsões podem ser classificadas em três tipos: água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas. As microemulsões do tipo A/O, estão organizadas da seguinte maneira: o componente hidrofílico está disperso na forma de gotículas coloidais no componente lipofílico. Já nas microemulsões do tipo O/A, esta organização se apresenta com o componente lipofílico disperso na forma de gotículas coloidais no componente hidrofílico e ambas podem ser invertidas de A/O para O/A ou vice-versa ao variar as condições de emulsificação. As microemulsões bicontínuas estão entre estes dois tipos, sua formação pode ser percebida quando se aumenta gradativamente, por titulação, o volume da fase interna do sistema. Estas microemulsões são constituídas praticamente da mesma quantidade de água e óleo (DAMASCENO, 2010; FORMARIZ et al., 2005).

A formação de uma ME está baseada em três teorias. A primeira delas é a teoria da solubilização, que é considerada a mais simples. Esta afirma que a formação de uma ME

ocorre por meio de um intumescimento simples de micelas, sendo a água solubilizada nas micelas reversas ou o óleo solubilizado em micelas normais. As outras duas teorias são consideradas mais complexas: a teoria da tensão interfacial e a teoria termodinâmica. A teoria da tensão interfacial relata que para a formação de uma ME é necessário que a tensão interfacial esteja muito baixa, isto resulta em um aumento da absorção do tensoativo na área interfacial resultando desta forma numa pressão bidimensional que ocasiona a diminuição da tensão interfacial. Logo a aproximação da tensão interfacial a zero resulta numa maior dispersão de uma fase na outra levando a formação da ME. A teoria termodinâmica está relacionada com a energia livre de Gibbs (G). Esta teoria diz que para a formação espontânea de uma ME termodinamicamente estável a energia livre de Gibbs deve se tornar negativa. Como a tensão interfacial tende a zero, a energia livre de Gibbs também tende a zero, logo o sistema se torna termodinamicamente estável. Assim quando a tensão interfacial for negativa, a variação da energia livre de Gibbs será menor que zero e a formação da ME será espontânea (DAMASCENO, 2010; DAMASCENO, 2011; OLIVEIRA et al., 2004).

A escolha dos tensoativos é de extrema importância para a formação de ME, logo é necessário conhecer as características dos tensoativos utilizados, como também suas propriedades levando sempre em consideração quais tensoativos são mais adequados para determinadas aplicações. O tensoativo pode ser utilizado puro, em forma de mistura ou em combinação com outros componentes, sendo sua função tornar uma ME estável pela diminuição da tensão interfacial. A escolha, proporção e característica do tensoativo a ser utilizado apresentam grande relevância dentro da formulação pretendida. Estes pontos podem ser verificados através da análise do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) dos componentes. O conceito de EHL foi introduzido por Griffin em 1948, quando ele classificou as propriedades hidrofílicas-lipofílicas dos tensoativos segundo uma escala numérica de 1 a 50, onde o valor de EHL aumenta conforme a hidrofilia da substância (FRANZINI, 2006; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

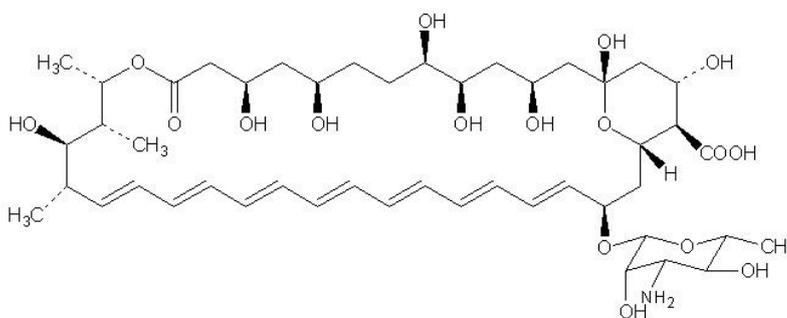
Os tipos de tensoativos comumente utilizados em uma ME são os não iônicos e os anfotéricos, por estes apresentarem baixa toxicidade às membranas, baixa irritabilidade, maior estabilidade, grande permeabilidade do fármaco incorporado e boa tolerância a mudanças de pH (DAMASCENO, 2010; FORMARIZ et al., 2005).

## 2.2 Anfotericina B (AmB)

A AmB, desde sua descoberta em 1953 por Gold e colaboradores, tem se tornado um dos fármacos mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas, sendo considerada a melhor opção para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e da leishmaniose visceral (BENNETT, 2005; CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011; COHEN, 1998).

A molécula da AmB apresenta uma estrutura química complexa. 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. A AmB possui uma solubilidade dependente do pH, fato este relacionado à sua complexidade molecular que faz com que ocorra uma variação interna do pKa (5,7 para  $-\text{COOH}$  e 10 para  $\text{NH}_2$ ) (BARRATT; BRETAGNE, 2007; DAMASCENO, 2010; FILIPPIN; SOUZA, 2006; MAZERSKI; GRZYBOWSKA; BOROWSKI, 1990).

Figura 1 – Estrutura química da molécula de AmB



Fonte: DAMASCENO, 2010.

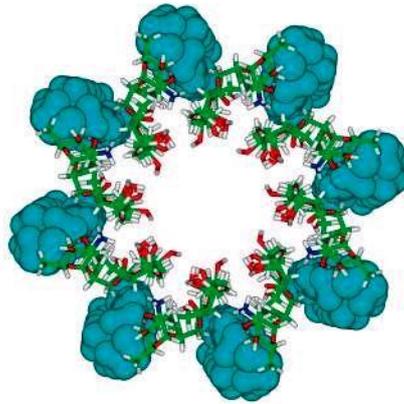
Na água, a AmB se agrega, primeiramente, pela formação de dímeros por aposição de duas faces hidrofóbicas, e assim, progressivamente, formando agregados maiores (MAZERSKI; GRZYBOWSKA; BOROWSKI, 1990). Esta insolubilidade em meio aquoso é a causa de sua baixa biodisponibilidade por via oral. Por isso, seu uso é limitado à infusão intravenosa e aplicação tópica. A formulação convencional de anfotericina B (Fungizone<sup>®</sup>), comercializada desde 1956, 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 anfotericina B 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).

Ambos os efeitos terapêuticos e tóxicos da anfotericina B 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 e o seu interior é hidrofílico devido à presença dos grupos hidroxila das moléculas de AmB (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011).

Em estudo com membranas bilamelares, comparou-se a capacidade de formação de canais iônicos de anfotericina B 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 anfotericina B apresenta um papel-chave na formação de canais nas membranas (FILIPPIN; SOUZA, 2006; HUANG et al., 2002).

Figura 2 – Modelo estrutural do canal AmB-esterol de membrana

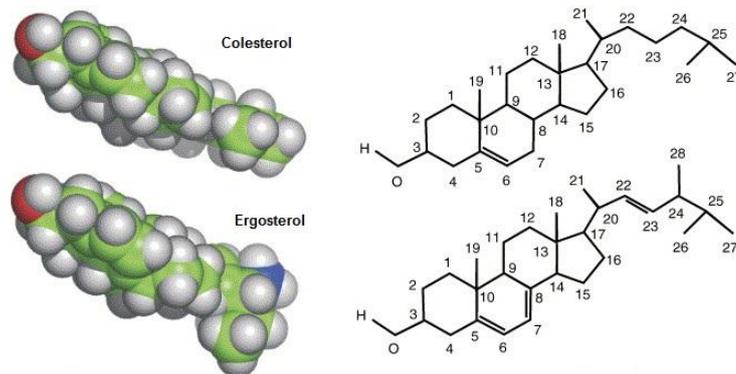


Fonte: BAGINSKI et al., 2005.

Colesterol e ergosterol são moléculas muito semelhantes, 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 esteróide (HUANG et al., 2002).

A maior afinidade da AmB por ergosterol é explicada pela existência da ligação dupla no carbono 22 do esteróide, 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 3 – Estruturas químicas das moléculas do colesterol e ergosterol



Fonte: Adaptado de PENCER et al., 2005

Sabendo que a forma de associação monomérica da anfotericina B 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.

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 deste fármaco. Diante disto, muita atenção tem sido dada às microemulsões. Estes sistemas são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biofarmacêuticas dos fármacos incorporados (FORMARIZ, 2004).

### **2.3 Atividade Antifúngica**

Desde sua descoberta, a AmB continua sendo o fármaco fungicida de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas que atacam pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes e na profilaxia fúngica sistêmica em pacientes neutropênicos. No final dos anos 1950, a AmB já era utilizada em alguns casos clínicos sendo o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) em 1956. A AmB é um fármaco que ao longo dos anos tem acumulado um histórico de toxicidade que acarretou no estudo e desenvolvimento de novos meios de se reduzir sua ação tóxica. O tratamento de micoses sistêmicas, por requerer o uso de altas doses, levou ao desenvolvimento de novos veículos para a administração de AmB (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

A AmB faz parte de um grupo complexo de compostos macrocíclicos bem conhecidos, pois em concentrações muito baixas eles induzem um efeito letal contra fungos e protozoários parasitas, tais como *Leishmania* sp. (COHEN, 1998). A terapêutica antifúngica da AmB está relacionada à sua atividade na membrana plasmática celular. Diversos dados experimentais revelam a capacidade de formar poros transmembranares, que acabam por alterar a permeabilidade da membrana, levando a saída de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, o que acarreta em morte celular (OLIVEIRA, 2008).

Os fungos são, de uma forma geral, organismos presentes no meio externo excetuando-se algumas espécies de *Candida*. Desta forma, os fungos que entram em contato com o ser humano e animais podem causar alguns danos, os quais podem variar de micoses superficiais benignas (e.g. *pedra nigra*) até micoses mais severas (e.g. murcomicoses) (LIMA et al., 2006)

Os fungos apresentam estrutura típica das células eucarióticas: complexo citosol que contém microvesículas, microtúbulos, ribossomos, mitocôndrias, complexo de Golgi, núcleo, retículo endoplasmático com dupla membrana, além de outras estruturas. O núcleo apresenta um nucléolo e contém praticamente todo o DNA. O citosol é envolvido por uma membrana: o plasmalema, composta de glicoproteínas, fosfolipídios e ergosterol. A presença de ergosterol nos fungos é de extrema importância, já que a maioria das estratégias antifúngicas se baseia em sua presença nas membranas. A parede celular complexa, do ponto de vista estrutural e bioquímico, contém quitina, um homopolímero da N-acetilglicosamina como sua base estrutural. Sobre esta base de quitina existem camadas de glucanos, manoproteínas e outros polissacarídeos complexos associados a outros polipeptídeos (FILHO, 2011).

Dentre as infecções humanas de natureza fúngica, a candidíase é a que apresenta uma maior predominância, sendo descrita como uma infecção oportunista, que está frequentemente envolvida com a alteração da microbiota, doenças sistêmicas e redução da imunidade do hospedeiro. As leveduras do gênero *Candida* são as responsáveis pela colonização, por infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos. Logo a variedade de apresentações da doença leva à necessidade de utilização de diferentes métodos de diagnósticos e esquemas terapêuticos. A *Candida albicans* é o patógeno mais comum nas candidíases, porém as espécies não *albicans* têm aumentado em número e em importância ao decorrer dos anos (CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011; CROCCO et al., 2004).

Uma vez rompido o equilíbrio biológico entre a microbiota e o organismo hospedeiro, as espécies de *Candida* apresentam a capacidade de provocar infecções, levando a quadros agudos, subagudos ou crônicos, superficiais ou profundos. A *Candida albicans* é reconhecida por sua alta patogenicidade, pois estas secretam proteinases e fosfolipases que são capazes de degradar, destruir ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro, induzindo a uma disfunção e/ou destruição física. Esta levedura apresenta dimorfismo: variação de antígeno de parede, expressão de adesinas na superfície e *switching* - variação fenotípica. A formação de micélio ou pseudo-micélio pelas espécies de *Candida* tem sido relacionada ao aumento da virulência em decorrência da variabilidade antigênica da superfície e do formato micelial que favorece maior aderência, dificultando a fagocitose extra e intracelular pelo sistema imune. O fungo manifesta maior poder invasivo em pacientes debilitados pelo tratamento com antimicrobianos e drogas imunossupressoras e no decorrer de doenças

crônicas, ou em pacientes com deficiência nutricional e imunodeprimidos (SANTANA et al., 2010).

A maioria das espécies de fungos que causam infecção em seres humanos são sensíveis a AmB, de modo que o fármaco permanece com um espectro de atividade mais abrangente entre todos os antifúngicos disponíveis. Como exceções, algumas espécies de *Candida* como *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* ou *C. tropicalis* *Pseudallescheria boydii*, e algumas estirpes de *Fusarium* e *Trichosporon* têm resistência clínica e/ou elevados valores de concentração inibitória mínima (CIM) para AmB (LUBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003).

Este fármaco ocupa uma posição de destaque frente aos outros agentes antifúngicos devido suas propriedades quimioterápicas únicas e a falta de outras alternativas melhores. As propriedades quimioterápicas únicas da AmB incluem: alta atividade e um largo espectro antifúngico. Embora este fármaco apresente grandes vantagens, seu uso ainda é limitado devido à alta toxicidade (OLIVEIRA, 2008).

Ao longo dos anos, várias estratégias têm sido desenvolvidas em um esforço para superar as desvantagens associadas com a utilização clínica de AmB (BRAJTBURG, et al. 1990).

### 3 REFERENCIAL METODOLÓGICO

#### 3.1 Construção dos Diagramas de Fases Pseudoternários (DFPT)

A partir da mistura dos tensoativos Kolliphor<sup>®</sup> HS 15 (KHS15) e Brij<sup>®</sup> 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. À esta combinação, foi adicionada a fase oleosa, miristato de isopropila (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<sup>®</sup> Pro 8.

Esse diagrama em forma de triângulo equilátero apresenta em cada um de seus vértices as seguintes proporções: 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 microemulsionados, 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 antifúngica.

#### 3.2 Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) dos diagramas de fases pseudoternários

Foi determinado o EHL dos diagramas de fases pseudoternários, adotando-se EHL igual a 15 para Kolliphor<sup>®</sup> HS 15 e EHL igual a 5 para o Brij<sup>®</sup> 52, através da seguinte fórmula:

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

### **3.3 Incorporação da AmB nas MEs**

AmB, na concentração de 2,5mg/mL foi incorporada nas MEs sob agitação contínua, em agitador magnético, à temperatura ambiente. Após 1min, o pH da ME 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. Subseqüentemente, o pH foi reduzido a 7,0-7,5, usando uma solução de ácido clorídrico 1N (DAMASCENO *et al.*, 2012).

### **3.4 Caracterização físico-química dos sistemas formados**

#### **3.4.1 Determinação do pH e condutividade**

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.

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  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Os resultados foram expressos como a média de três determinações.

#### **3.4.2 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 659 nm. Foram realizadas 5 determinações do diâmetro, índice de polidispersão e potencial Zeta das gotículas, com

duração de 2min e 30s para cada amostra de acordo com a técnica descrita por Silveira (2009).

### 3.5 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.

#### 3.5.1 Termogravimetria (TGA)

As curvas termogravimétricas (TG) 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  $900^{\circ}\text{C}$ . 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.

#### 3.5.2 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<sup>®</sup> 52 e KHS15: razão de  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $200^{\circ}\text{C}$ ;
  - Para o MIP: as amostras foram inicialmente submetidas ao resfriamento ( $25$  a  $-50^{\circ}\text{C}$ ) a uma taxa de  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , mantidas por  $3\text{min}$  a  $-50^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram aquecidas até a temperatura de  $250^{\circ}\text{C}$  (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  $400^{\circ}\text{C}$ ;
  - Para as ME (Blank-ME e AmB-ME): as amostras foram inicialmente submetidas ao resfriamento ( $25$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) a uma taxa de  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , mantidas por  $1\text{min}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram aquecidas até a temperatura de  $250^{\circ}\text{C}$  (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  $99,99\%$ . A calibração para energia foi feita com base na entalpia de fusão do índio metálico ( $\Delta H_{\text{Fusão}} = 28,54\text{Jg}^{-1}$ ).

## **3.6 Estudo de eficácia antifúngica**

### **3.6.1 Avaliação da atividade antifúngica**

#### **3.6.1.1 Microorganismos**

Para este estudo foram utilizadas 10 cepas leveduriformes do gênero *Candida* como discriminadas a seguir: uma cepa de *Candida albicans* ATCC 76485 recomendada para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2009) e outras nove cepas do gênero *Candida* obtidas da coleção do laboratório de Pesquisa de Atividade Antimicrobiana da UEPB, sendo estas, *C. albicans* LM 94, *C. albicans* LM 410, *C. albicans* LM 70, *C. albicans* LM 520, *C. albicans* LM 11, *C. albicans* LM 14, *Candida tropicalis* LM 32, *C. tropicalis* LM 282 e *C. tropicalis* LM 190.

#### **3.6.1.2 Meios de cultura**

Para garantir a viabilidade dos microorganismos em estoque, foi utilizado o Caldo Sabouraud. E para o cultivo foi utilizado o meio Ágar Sabouraud, preparado em placas de Petri, contendo uma camada de ágar de 4 mm de espessura. Os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante DIFCO®.

#### **3.6.1.3 Preparação dos inóculos**

Após o enriquecimento em Caldo Sabouraud, uma alíquota de cada crescimento foi semeada através da técnica de esgotamento por estrias em Ágar Sabouraud e incubado a 35°C por 24/48 horas, permitindo dessa forma que os microorganismos estivessem em crescimento exponencial, o que garante segurança maior durante a realização da análise. Após esse período de incubação, algumas colônias foram diluídas em solução salina estéril 0,85% até atingirem a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland (CLSI, 2009).

### **3.6.2 Determinação da atividade antifúngica**

#### **3.6.2.1 Difusão em disco**

Por meio desta técnica foi realizada uma triagem da atividade antimicrobiana da AmB-ME. Utilizando swabs estéreis que foram mergulhados na solução salina contendo o inóculo previamente padronizado, sendo posteriormente semeados por toda a superfície do meio de cultura em diversas direções o que permitiu um crescimento uniforme e confluyente. Em

seguida foram adicionados discos de papel de filtro (Whatman – tipo 3), de 6 mm de diâmetro, previamente impregnados com 20 uL do produto, sendo distribuídos uniformemente sobre a superfície do meio (Vlietinck, 1991), garantindo que haja espaço para formação de halos. Após o semeio e distribuição dos discos, as placas foram incubadas a 35°C por 24/48 horas, sendo observada a formação de halos de inibição, que foram medidos com auxílio de um halômetro (BAUER et al., 1966; CLSI, 2009).

O estudo foi realizado em duplicata, tendo os resultados expressos pela média aritmética dos halos obtidos nos ensaios e, considerado como suscetível, o halo com uma dimensão igual ou superior a 8 mm de diâmetro (PAREKH; CHANDA, 2007; CATÃO, 2007).

### **3.6.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima**

A determinação da CIM da AmB-ME também foi realizada pela técnica de difusão em disco (CLEELAND; SQUIRES, 1991; CLSI, 2009).

Tomando como a concentração inicial equivalente a 100%, o produto foi diluído nas concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% e 0,39% sendo novamente testados. A CIM foi considerada como a menor concentração dos produtos testados capazes de inibir o crescimento fúngico (presença de halo de inibição do crescimento), após incubação por 24-48h/35°C (FABRY; OKEMO; ANSORQ, 1998; COSENTINO et al., 1999; ALVES, 2000; CATÃO, 2007).

Os halos de inibição de crescimento formados foram medidos com auxílio de um halômetro, tendo os resultados expressos pela média aritmética dos halos obtidos nos dois ensaios e, considerado como suscetível, o halo com uma dimensão igual ou superior a 8 mm de diâmetro (PAREKH; CHANDA, 2007; CATÃO, 2007).

## **3.7 Análise Estatística**

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.

## 4 DADOS E ANÁLISE DA PESQUISA

### 4.1 Construção dos Diagramas de Fases Pseudoternários (DFPT) e Determinação do EHL

Os tensoativos podem ser classificados conforme seu valor de EHL. 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; ALVES; MORGADO, 1990).

Do mesmo modo que às substâncias emulsionantes, também são atribuídos valores de EHL aos óleos e substâncias oleosas. Por consequência, 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 tensoativos de modo a obter-se um EHL resultante semelhante ao da fase oleosa (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 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 ME 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 (DALTIM, 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.

Sabendo que autores, como Brime et al. (2002) e Qing-Ping, Peng e Ke-Chang (2009) obtiveram sucesso na incorporação de AmB em seus sistemas microemulsionados contendo MIP como fase oleosa, 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

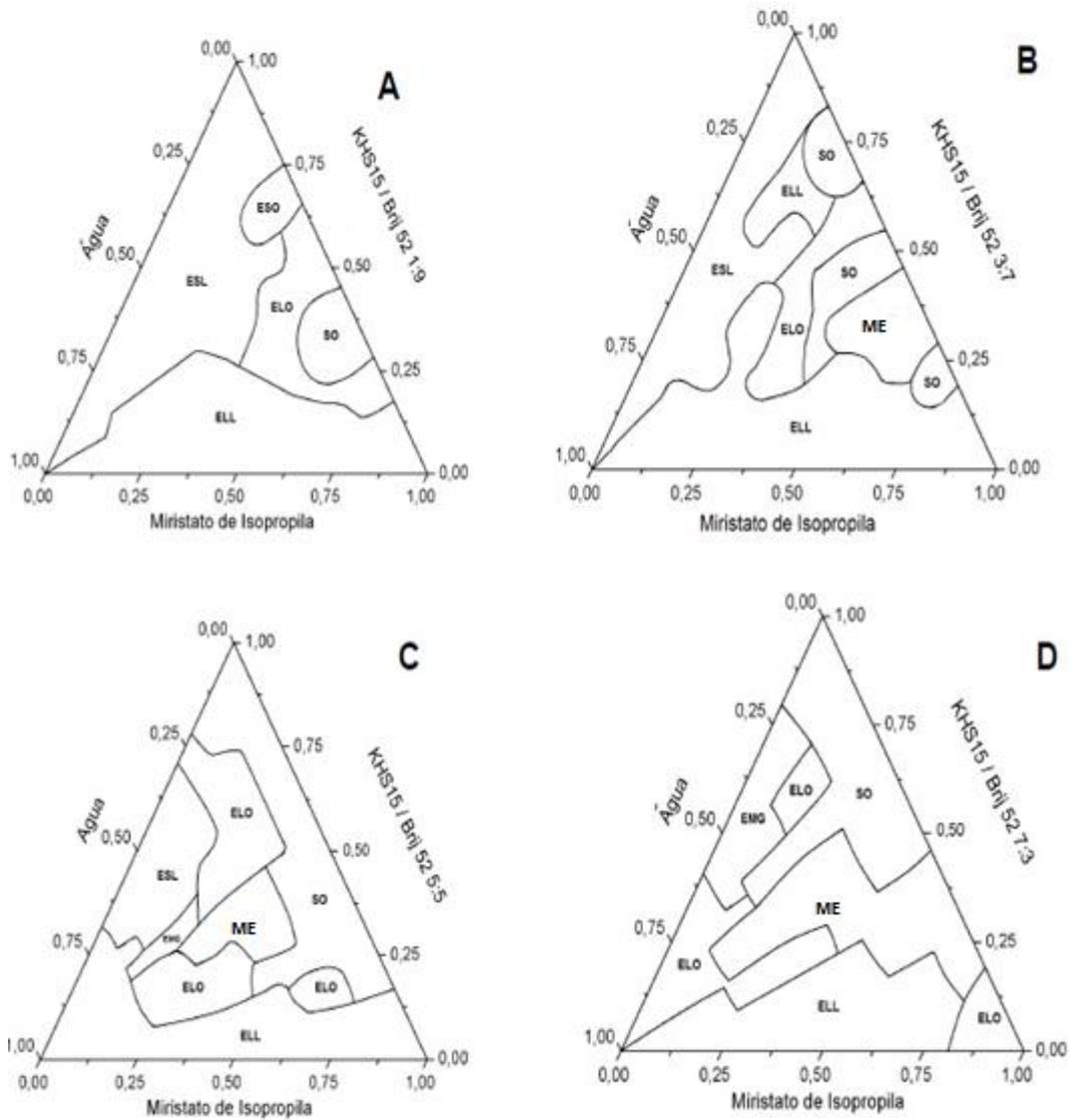
tensoativo com EHL mais baixo, mais lipofílico. De forma que, ao serem misturados pudessem resultar no EHL ideal da formulação, mais próximo do EHL da fase oleosa, teoricamente.

Após ampla pesquisa na literatura, apoiando-se, especialmente, em dados de segurança para administração parenteral e de eficácia na formação de sistemas microemulsionados, foram selecionados os tensoativos KHS15 (EHL: 14-16) e Brij<sup>®</sup> 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 ME e, conseqüentemente, para selecionar as proporções ideais de tensoativos e óleo da formulação.

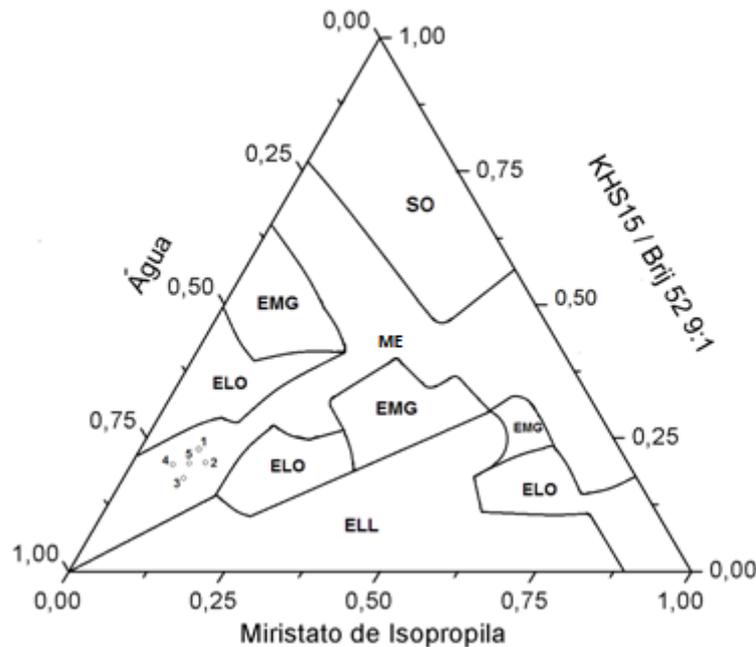
Através das Figuras 4 e 5, pode-se observar uma relação diretamente proporcional entre a área de ME formada e a proporção do tensoativo KHS15 em relação ao Brij<sup>®</sup> 52. Nota-se também que à medida que a proporção de KHS15 aumenta, em detrimento da concentração de Brij<sup>®</sup> 52, a região de ME 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<sup>®</sup> 52, que tem um baixo valor de EHL. Logo, a fase em que o tensoativo é mais solúvel tende a ser a fase contínua ou externa da emulsão.

Figura 4 – 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; ME – microemulsão.

Figura 5 – Diagrama de fases pseudoternário do sistema contendo Kolliphor<sup>®</sup> HS15/Brij<sup>®</sup> 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; ME – microemulsão.

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 massa no sistema, através da seguinte fórmula:

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

Para facilitar os cálculos, estabelecemos o valor de EHL do KHS15 em 15 e o EHL do Brij<sup>®</sup> 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; POPOVICH; ALLEN, 2000; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

Assim, os valores de EHL encontrados para os diagramas de fase e as respectivas regiões de ME 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 MEs. O diagrama 3:7 com EHL igual a 8 apresentou uma região de microemulsão 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 microemulsão 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 ME foram formadas nos diagramas que empregaram misturas de tensoativos com EHL maior ou igual ao

do óleo, correspondendo aos diagramas KHS15/Brij<sup>®</sup> 52 7:3 e 9:1, indicando a eficiência desses sistemas na formação do filme interfacial e estabilização das ME contendo o MIP como fase oleosa.

O diagrama de fases composto pelos tensoativos KHS15/Brij<sup>®</sup> 52 na proporção 9:1, por ter a maior região de ME O/A, foi escolhido para seleção dos pontos a serem formulados e caracterizados (Figura 5 e Tabela 2).

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

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

#### 4.2 Incorporação da AmB nas MEs

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-ME 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 por meio 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).

#### 4.3 Eficiência de incorporação da AmB nas MEs

A eficiência de incorporação (EI) da AmB nas ME 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 absorvâncias das amostras em espectrofotômetro UV-Vis antes e após passagem pelos filtros com porosidade de 0,45 µm (membrana de celulose regenerada, Minisart® RC 25, Sartorius, Alemanha) e de 0,22 µm (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 ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3 – Eficiência de incorporação (EI) da AmB nas microemulsões após filtração

Amostra	EI (%) 0,45µm	Desvio Padrão (%)	EI (%) 0,22µm	Desvio Padrão (%)
AmB-ME 1	73,83	14,94	33,79	1,05
AmB-ME 2	72,91	4,27	32,94	1,79
AmB-ME 3	68,92	6,21	25,71	3,17
AmB-ME 4	71,59	9,00	29,78	5,12
AmB-ME 5	60,72	6,82	51,06	1,92

O objetivo do teste de centrifugação na avaliação da EI não era desestabilizar as MEs; pelo contrário, a proposta era separar os cristais de AmB não incorporados aos sistemas. Todavia, como podemos perceber na Tabela 4, a centrifugação das ME provocou uma redução drástica do conteúdo de AmB.

Tabela 4 – Eficiência de incorporação (EI) da AmB nas microemulsões antes e depois da centrifugação

AMOSTRA	EI (%) antes	EI (%) depois	Desvio Padrão (%)
AmB-ME 1	100	7,43	0,51
AmB-ME 2	100	7,06	0,2
AmB-ME 3	100	8,81	0,22
AmB-ME 4	100	10,8	1,72
AmB-ME 5	100	7,19	0,57

#### 4.4 Caracterização físico-química dos sistemas formados

##### 4.4.1 Determinação do pH e condutividade

Tanto as formulações Blank-ME como as AmB-ME 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 ME após incorporação da AmB, resultado concordante com outros estudos (COHEN et al., 1996; NARS; NAWAZ; ELHISSI, 2012).

Tabela 5 – pH das microemulsões antes (Blank-ME) e após incorporação da AmB (AmB-ME)

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

DP: desvio-padrão

De acordo com os valores obtidos para condutividade das amostras (Tabela 6) podemos classificá-las como ME O/A (MASMOUDI et al., 2005). Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a condutividade das ME 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 microemulsões antes (Blank-ME) e após incorporação da AmB (AmB-ME)

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

DP: desvio-padrão

#### 4.4.2 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 ME, 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 ME estão apresentados na Tabela 7.

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

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

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 ME. Este método tem sido documentado como rápido e eficiente na produção de ME estáveis, com pequeno diâmetro de gotículas e baixa polidispersão (DAMASCENO et al., 2012; GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN., 2013a; NAKABAYASHI et al., 2011).

Análise mais aprofundada do diâmetro das ME mostra que os resultados estão em consonância com a literatura, que afirma que o tamanho das gotículas é inversamente proporcional à razão óleo/tensoativo (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013a).

As Blank-ME 1, Blank-ME 3 e Blank-ME 5, que possuem a mesma composição percentual de tensoativos, apresentaram diâmetro médio de gotículas de 21,6; 31,2 e 54,6 nm, respectivamente, o que se correlaciona com a percentagem de óleo na formulação, que é maior na Blank-ME 5 (12,5%), seguida da Blank-ME 3 (8,5%) e da Blank-ME 1 (5,1%).

A formulação Blank-ME 2 apresentou menor diâmetro de gotículas (26,2 nm) comparando-se com a Blank-ME 4 (31,8 nm). Essas ME 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 ME formuladas, percebe-se 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 ME com e sem AmB apresentaram diferença significativa de tamanho ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a incorporação do fármaco alterou o tamanho das gotículas.

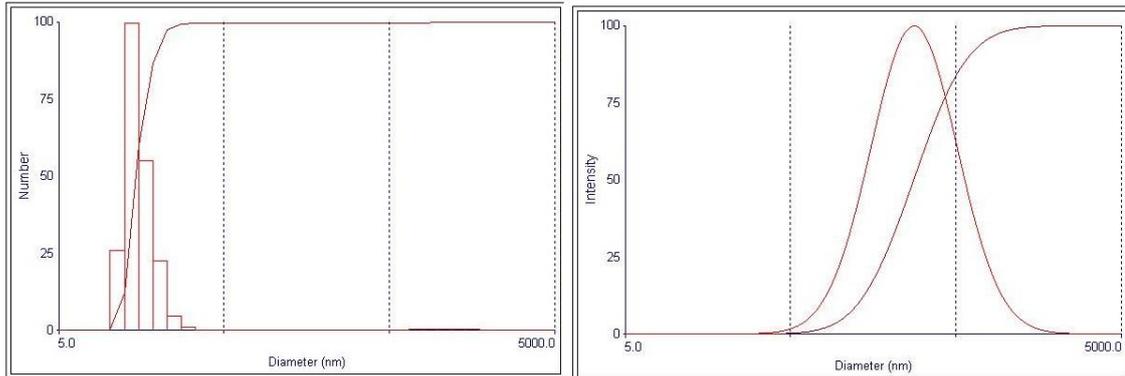
Além do diâmetro, foi obtido o índice de polidispersão (IP) das amostras. O cálculo do IP considera o tamanho médio da gotícula, o índice de refração do solvente, o ângulo de medida e a variação da distribuição. Embora não exista uma correlação linear entre um valor de IP e uma monodispersão da amostra 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; VILA-JATO; ALONSO, 1996; GAUMET et al., 2008; GOVENDER et al., 1999; SOARES, 2009).

O aumento no diâmetro das gotículas e no índice de polidispersão das AmB-ME quando comparadas com as Blank-ME indica a incorporação do fármaco nas ME. AmB, por ser uma molécula anfifílica, interagiria fortemente com a camada emulsionante do sistema, provocando esse aumento (NARS; NAWAZ; ELHISSI, 2012; ZHANG et al., 2011). De fato, Washington, Taylor e Davis (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.

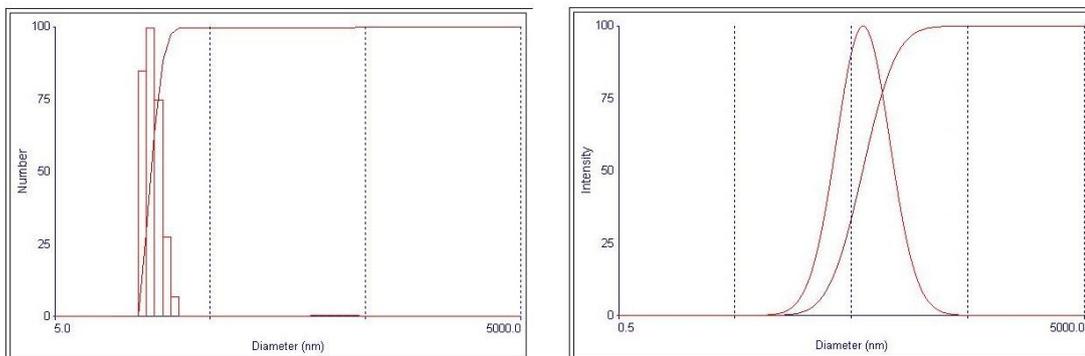
Mesmo apresentando índices de polidispersão mais elevados, as AmB-ME revelaram uma distribuição de tamanho monomodal e a presença de apenas uma população de gotículas, como mostrado nas Figuras 6 a 10.

Figura 6 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-ME 1



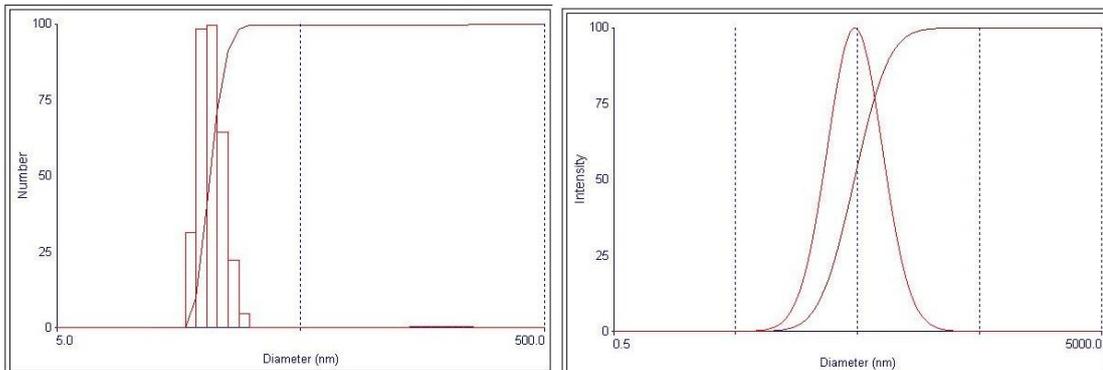
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 7 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-ME 2



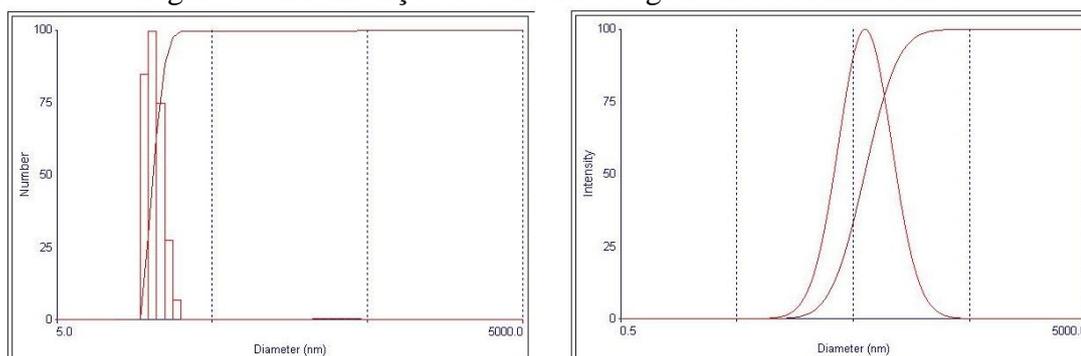
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 8 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-ME 3



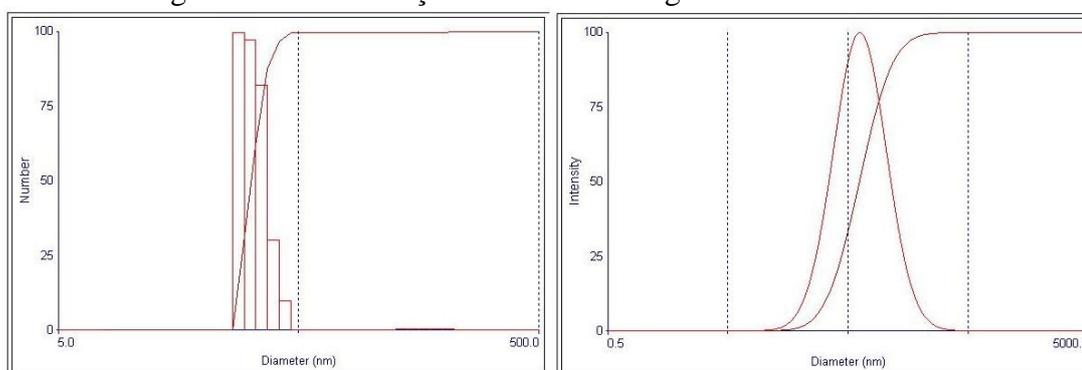
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-ME 4



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 10 – Distribuição do tamanho de gotículas da AmB-ME 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; HUNTER; MURRAY, 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; HUNTER; MURRAY, 2001; NAKAOKA et al., 1997).

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 ME 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 e Müller (2002), no estudo de estabilidade de emulsões, concluíram que a diminuição da proporção de KHS15 leva ao aumento nos valores de potencial Zeta.

## **4.5 Análise Térmica**

### **4.5.1 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

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).

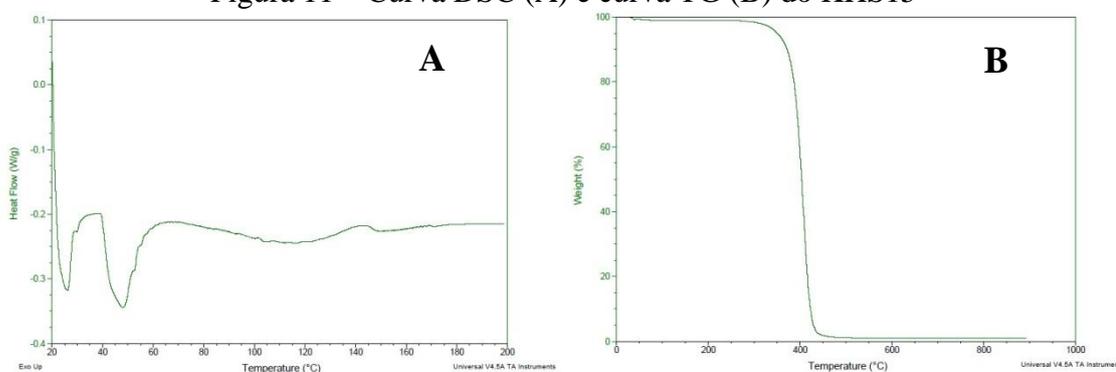
Dentre as técnicas termoanalíticas mais utilizadas encontram-se a termogravimetria, na qual se acompanha a variação de massa da amostra em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura, e a calorimetria exploratória diferencial (DSC - do 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; MERCURI; BARROS, 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 11 ilustra as curvas DSC (A) e TG (B), respectivamente, do tensoativo KHS15:

Figura 11 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do KHS15

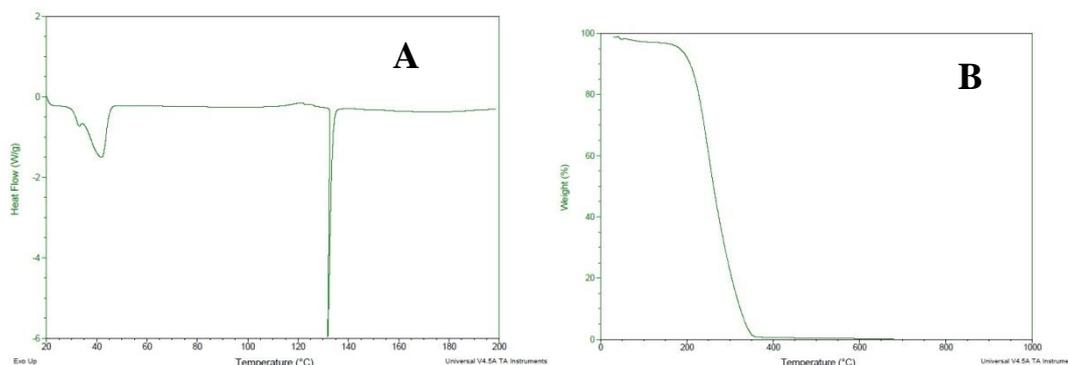


Fonte: Arquivo pessoal

Na curva DSC (Figura 11 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 11 B).

Os gráficos da análise térmica do tensoativo Brij<sup>®</sup> 52 estão expostos na figura abaixo:

Figura 12 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do Brij<sup>®</sup> 52

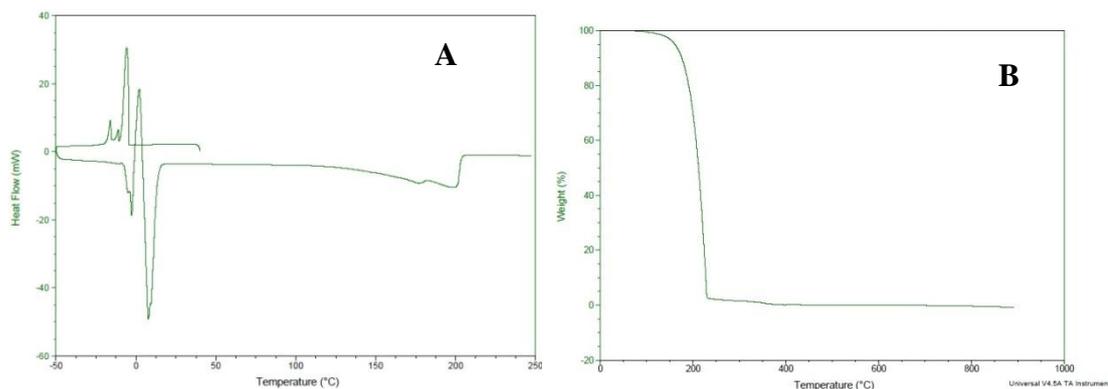


Fonte: Arquivo pessoal

Na Figura 12, curva DSC (A), observa-se 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<sup>®</sup> 52, que Pardakhty, Varshosaz e Rouholamini (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, Ernsting e Li (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 12 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 13 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 13 B):

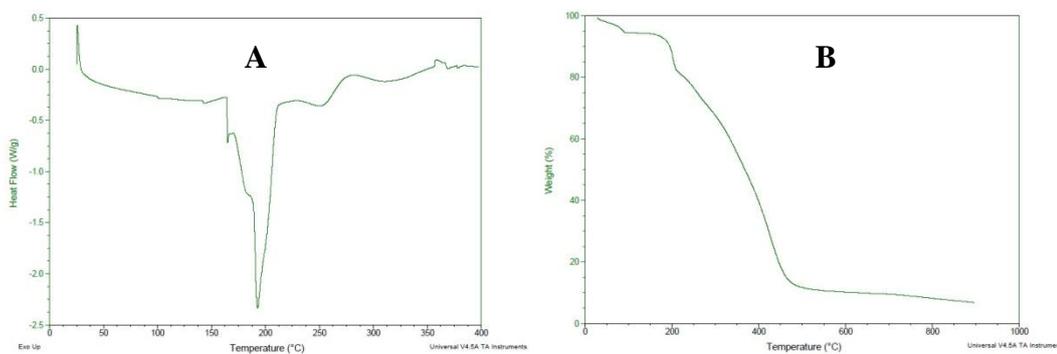
Figura 13 – Curva DSC (A) e curva TG (B) do miristato de isopropila



Fonte: Arquivo pessoal

Analisando a curva DSC da AmB (Figura 14 A), observa-se 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 14 B) (CHUEALEE et al., 2010; ESPUELAS et al., 1997; SIGMA-ALDRICH, 2013c).

Figura 14 – Curva DSC (A) e curva TG (B) da AmB



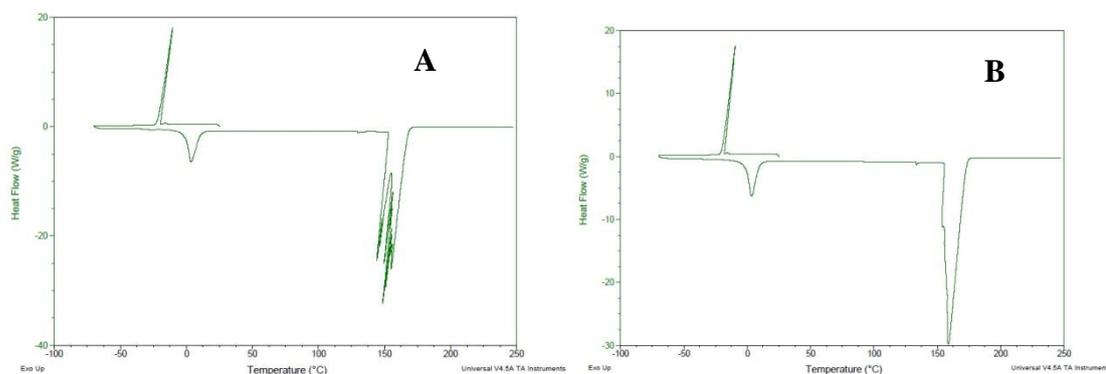
Fonte: Arquivo pessoal

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 ME, formuladas com e sem fármaco, apresentaram pico endotérmico em 0°C e pico exotérmico por volta dos -20°C (Figura 15), 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 microemulsão O/A.

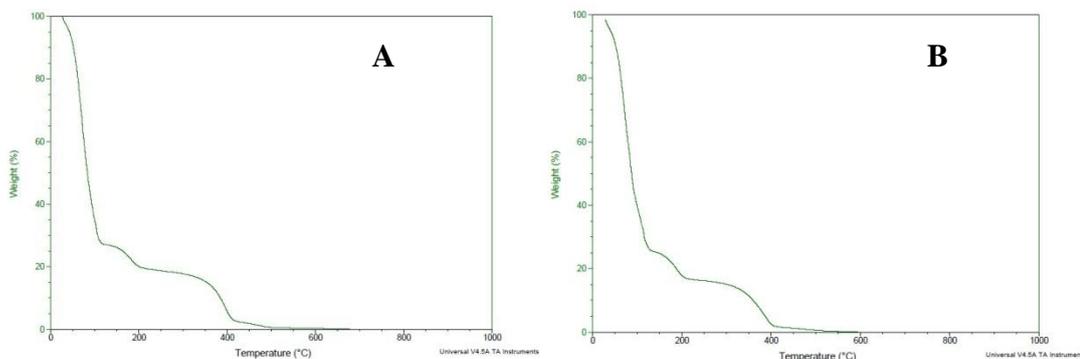
Figura 15 – Curvas DSC da Blank-ME (A) e da AmB-ME (B)



Fonte: Arquivo pessoal

Tanto as curvas DSC como as curvas termogravimétricas (Figura 16) das ME com ou sem AmB (Blank-ME e AmB-ME) 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 microemulsão (MILOVIC et al., 2012; PARDAKHTY; VARSHOSAZ; ROUHOLAMINI, 2007; SEO et al., 2012).

Figura 16 – Curvas TG da Blank-ME (A) e da AmB-ME (B)



Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.6 Eficácia antifúngica

A AmB é um fármaco utilizado no tratamento de grande parte das infecções fúngicas sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Este fármaco apresenta um largo espectro de ação agindo em fungos leveduriformes tais como: espécies de *Candida*, *Malassezia*, *Saccharomyces* e *Trichosporon*, além de filamentosos como *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*, *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Sporothrix*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Absidia*, *Apophysomyces*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Saksenaea*. No entanto algumas cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *T. beigelli*, *Malassezia furfur*, *Scedosporium apiospermum* e *S. prolificans*, *Fusarium ssp.* e *Sporothrix schenckii* apresentarem certa resistência a AmB, contudo, grande parte destas raramente são vistas clinicamente (DAMASCENO, 2010).

De acordo com o tamanho dos halos de inibição obtidos (tabela 8) pode-se afirmar que todas as leveduras se mostraram sensíveis a AmB-ME.

Tabela 8: Concentrações das diluições e diâmetro dos halos de inibição promovidas pela AmB-ME frente a cepas de *Candida*

CONCENTRAÇÕES DAS DILUIÇÕES (%) E MÉDIA DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO									
MICROORGANISMOS	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125%	1,56%	0,78%	0,39%
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	12	10	11	9	8	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> LM 94	16	14,5	14,5	12,5	12	10	9,5	8,5	0
<i>C. albicans</i> LM 410	13,5	11,5	12,5	11	11	10	8	8	0
<i>C. albicans</i> LM 70	15	14	13	12	12	11	8,5	8,5	0
<i>C. albicans</i> LM 520	14	14	12,5	12	12	12	9,5	8,5	0
<i>C. albicans</i> LM 11	15,5	14	12,5	12	12	11,5	10,5	8,5	0
<i>C. albicans</i> LM 14	13,5	13,5	12	11	11	10	10	8	0
<i>Candida tropicalis</i> LM 32	12	12,5	12	10	10,5	9,5	9,5	8	0
<i>C. tropicalis</i> LM 282	15	13	12,5	11	10,5	10	9,5	0	0
<i>C. tropicalis</i> LM 190	14	14	11,5	11,5	10	9,5	9,5	8	0

A *Candida albicans* ATCC 76485 mostrou-se resistente a AmB-ME a partir da diluição de 3,125%. Já em relação a todas as outras *Candidas*, estas se mostraram sensíveis a todas as proporções das diluições de AmB-ME, com exceção das diluição de 0,78% para a *Candida tropicalis* LM 282 e da 0,39% para todas as leveduras, que se mostraram resistentes para esta diluição.

A concentração inibitória mínima (CIM) obtida foi de uma diluição de 0,79% para todas as *Candidas*, com exceções da *Candida albicans* ATCC 76485 que mostrou uma CIM na diluição de 6,25% e da *Candida tropicalis* LM 282 que mostrou uma CIM na diluição de 1,56%.

A comparação do perfil de suscetibilidade de todos os isolados de *Candida albicans* com o grupo nomeado *Candida* não *albicans* não indicou diferenças significativas. Estudos de suscetibilidade de *Candidas* a antifúngicos, como a anfotericina B, têm sido realizados por todo o Brasil. Logo todos os isolados evidenciaram à anfotericina B com CIMs < 1µg/mL, portanto, estes foram considerados sensíveis. Já nos Estados Unidos, um estudo multicêntrico sobre candidemias, contendo aproximadamente 2000 isolados detectaram 0,8% de resistência envolvendo as espécies *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (BOFF et al., 2008).

## 5 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 ME e posterior seleção dos pontos para caracterização. O método de sonicação das formulações constituídas de KHS15, Brij<sup>®</sup> 52, MIP e água mostrou-se favorável à obtenção dos sistemas microemulsionados. As gotículas das AmB-ME apresentaram formato esférico, com diâmetro médio de 33 a 132 nm 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. AmB-ME mostrou-se eficaz frente aos testes antifúngicos em cepa ATCC e cepas clínicas de espécies de *Candida*.

## DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF O / W MICROEMULSIONS CONTAINING AMPHOTERICIN B

BARROS, Alana Rafaela Albuquerque<sup>1</sup>; ARAÚJO, Gabriela Muniz Felix; DAMASCENO, Bolívar Ponciano Goulart de Lima.

### ABSTRACT

Microemulsions (ME) are systems similar to solutions with an interior formed by nanosized droplets stabilized by a range of surfactants. ME are thermodynamically stable liquid and excellent vehicles for solubilization and transport of insoluble active compounds in water or oil. This biological property allows the use of ME as carriers for various molecules such as amphotericin B (AmB), by intravenous route. AmB is a drug with amphiphilic character and highly effective in antifungal therapy, however has significant toxicity. The aim of this work is to develop and to characterize a new microemulsion transport system containing AmB and to evaluate its antifungal activity. ME were made by sonication method, using a mixture of surfactants Kolliphor<sup>®</sup> HS 15 and Brij<sup>®</sup> 52 with isopropyl myristate. AmB was directly added to the samples, under magnetic stirring, using acidic and basic solutions for solubilizing the drug and for final pH adjustment. All ME had neutral pH and conductivity consistent with oil in water systems, and isotropic behavior. ME had negative zeta potential. Average diameter of droplets with the drug ranged from 33 to 132nm. Thermal analysis showed that AmB was not able to modify the thermal behavior of the system possibly to be dispersed in internal phase. AmB-ME showed antifungal efficacy statistically equal to the micellar formulation of AmB. Therefore, the construction of the pseudoternary phase diagrams was useful for identification of microemulsion regions, the incorporation of AmB did not change the system and the AmB-ME showed antifungal activity against *Candida* species used.

**Keyword:** Amphotericin B. Antifungal Activity. Microemulsion.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; JUNIOR, A. S.; ZANI, C. L. **Biological screening of brazilian medicinal plants**. Memorial Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., ALLEN JR. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 6. ed. São Paulo: Premier, 568 p. 2000.
- 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.
- BARRATT, G.; BRETAGNE, S. **Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification**. International Journal of Nanomedicine. v. 2, n. 3, p. 301-313, 2007.
- BAUER, A. W; KIRBY, W. M; SHERRIS, J. C; TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. American Journal of Clinical Pathology, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.
- 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; Cap. 49. p.971-983, 2005.
- BOFF, E.; LOPES, P.G.M.; SPADER, T.; SCHEID, L.A.; LORETO, E.; FORNO, N.F.D.; AQUINO, V.; SEVERO, L.C.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. **Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.v.41, n.1, p. 36-40, 2008.
- BANGINSKI, M.; STERNAL, K.; CZUB, J.; BOROWSKI, E. **Molecular modeling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic**. Acta Biochimica Polonica. v. 52, n. 3, p. 655-660, 2005.
- 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, 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.
- BRAJTBURG, J.; POWDERLY, W. G.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. **Amphotericin B: Current Understanding of Mechanisms of Action**. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. v. 34, n. 2, p. 183-188, 1990.

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.

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.

CATÃO, R. M. R. **Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes.** 2007, 127p. Tese (doutorado em Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). LTF/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

CAVANCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. **Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de cândida.** Odontol. Clín.-Cient. v.10, n. 3, p. 243-246, 2011.

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

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.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. **Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal in vivo** In: LORIAN, V. Antibiotics in laboratory medicine. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, p. 739-787, 1991.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing.** Document M100–S19. CLSI, Wayne, Pa, 2009.

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

COHEN, T.; SAUVAGEON-MARTRE, H.; BROSSARD, D.; D'HERMIES, 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.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B; SATTÀ, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. **In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils.** Letters in Applied Microbiology Reviews, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CROCCO, E. I.; SOUZA, V. M.; MIMICA, L. M. J.; RUIZ, L. R. B.; MURAMATU, L. H.; ZAITZ, C.; GARCIA, C. **Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade**

**antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais.** An bras Dermatol.v. 79, n. 6, p. 689-697, 2004.

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

DAMASCENO, B. P. G. L. **Sistemas microemulsionados como carreador lipídico para fármacos insolúveis.** 2010. 61f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010.

DAMASCENO, B.P.G.L. et al. **Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

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.

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.

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

FABRY, W; OKEMO, P. O; ANSORQ, R. **Antibacterial activity of east African medicinal plants.** Journal de Ethnopharmacology, v.60, p.79-84, 1998.

FERRARI, M.; **Nanovector therapeutics.** Curr Opin Chem Bio. v. 11 p.41, 2005.

FILHO, M. A. S. **Análise *in vitro* da Atividade Antifúngica e de Toxicidade da Anfotericina B Pré-aquecida.** [Dissertação]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, RN, 2011.

FILIPPIN, F. B; SOUZA, L.C. **Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B.** Rev. Bras. Cienc. Farm. v. 42, n.2, p. 167-194, 2006.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. **Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos.** Rev. Bras. Cienc. Farm. v. 41, n.3, p. 301-313, 2005.

FORMARIZ, T.P. **Incorporação de doxorubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa *in vitro* através de cultura de células [dissertação].** Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2004.

FRANZINI, C. M. **Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral.** 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

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.

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, 2013a.

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, 2013b.

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.

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.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J.; DONG, S.; WANG, E. **Ion Channel Behavior of Amphotericin B in Sterol-Free and Cholesterol Ergosterol-Containing Supported Phosphatidylcholine Bilayer Model Membranes Investigated by Electrochemistry and Spectroscopy.** Biophysical Journal, v. 83, p. 3245–3255, 2002.

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.

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

KLEPSEK, Michael PharmD. **The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections.** *Journal of Critical Care*, v. 26, p. 255, 2011.

LANGEVIN, D. **Microemulsions.** *Acc Chem Res.* v. 21, n. 7, p. 255-260, 1988.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LUBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. **Antifúngicos de uso sistêmico.** *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* v. 21, n. 7, p. 366-380, 2003.

MACEDO, J. P. F.; FERNANDES, L. L.; FORMIGA, F. R.; REIS, M. F.; JUNIOR, T. N.; SOARES, L. A. L.; EGITO, E. S. T. **Micro-emultocrit technique: A valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions.** *AAPS PharmSciTech*, v. 7, n. 1, p. 146-152, 2006.

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

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*, v. 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 behavior of amphotericin B and its derivatives in aqueous media.** *Eur Biophys J.* v. 18, p. 159-164, 1990.

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.

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.

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, v. 436, n. 1–2, p. 611-616, 2012.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. **Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos.** Quím. Nova, v. 27, n.1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, T. R. **Caracterização Estrutural de Agregados Formados pelo Antifúngico Anfotericina B e Lipídeos Catiônicos: Uma possível Formulação Farmacológica.** [Dissertação]. Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, 2008.

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

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. **In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants.** Turk J Biol.; v. 31, p.53, 2007.

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. **Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral: Estudo estrutural, liberação *in vitro* e farmacocinética pré-clínica** [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.

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 pharmaceutics, 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, v. 2, p. 518, 1990.

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.

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.

ROSANO, H.L. **Microemulsions.** J Soc Cosmet Chem. v. 25, n. 11, p. 609-619, 1974.

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.

SANTANA, D. P.; RODRIGUES, T.; SOUZA, S. O. NAVES, P. L. F.; RIBEIRO, E. L. **Prevalência de Fatores de Virulência de *Candida Albicans* Isoladas da Cavidade Bucal de Crianças Portadoras e Não Portadoras de Síndrome de Down.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico. v. 6, n.11, p. 1-10, 2010.

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.

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.

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.

SIGMA-ALDRICH. **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. 2013c.

SIGMA-ALDRICH. **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. 2013a.

SIGMA-ALDRICH. **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. 2013b.

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.

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.

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.

VLIETINCK, A .J.; PHILLIPSON, J. D.; WRIGHT, C. W. **Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents?** J. Ethonopharmacol. v.32, n. 1-3, p. 141-154, 1991.

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.

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.