



“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

**MICROEMULSÕES BIOCAMPATÍVEIS DE ANFOTERICINA B PARA
ADMINISTRAÇÃO ORAL. ESTUDO ESTRUTURAL, LIBERAÇÃO *IN*
VITRO E FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA.**

Kelly Chrystina Pestana

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara – SP

2009

**MICROEMULSÕES BIOCAMPATÍVEIS DE ANFOTERICINA B PARA
ADMINISTRAÇÃO ORAL. ESTUDO ESTRUTURAL, LIBERAÇÃO *IN*
VITRO E FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA.**

Kelly Chrystina Pestana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara – SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P476m Pestana, Kelly Chrystina Pestana
Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral:
Estudo estrutural, liberação *in vitro* e farmacocinética pré-clínica / Kelly
Chrystina Pestana. – Araraquara, 2009.
xxi, 109 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

Co-orientador: Rosangela Gonçalves Peccinini

1. Sistema de liberação de fármacos. 2. Microemulsões. 3. Anfotericina
B. 4. Farmacocinética. I. Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II. Peccinini,
Rosangela Gonçalves, co-orient. III. Título.

CAPES: 50700006

Candidato (a): Kelly Chrystina Pestana

Título da Tese:

Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral.

Estudo estrutural, liberação *in vitro* e farmacocinética pré-clínica.

A comissão julgadora do trabalho de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 20/08/2009, consideraram o (a) candidato (a):

Reprovado

Aprovado

- 1) Examinador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
- 2) Examinador: Prof. Dr. Newton Andreo Filho
- 3) Examinador: Profa. Dra. Maria Palmira Gremião
- 4) Examinador: Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista
- 5) Presidente: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Dedico este trabalho à minha Mãe,

Eu tenho tanto prá lhe falar, mas com palavras não sei dizer : Como é grande o meu amor por você...

E não há nada pra comparar, para poder lhe explicar : Como é grande o meu amor por você...

*Nem mesmo o céu, nem as estrelas, nem mesmo o mar e o infinito
Não é maior que o meu amor, nem mais bonito...*

Me desespero a procurar alguma forma de lhe falar : Como é grande o meu amor por você...

*Nunca se esqueça, nem um segundo, que eu tenho o amor maior do mundo
Como é grande o meu amor por você...*

Mãe obrigada pelo amor, apoio, incentivo e ativa participação em todos os momentos de minha vida.

TE AMO

Agradecimentos Especiais

À Deus, que me permitiu alcançar este sonho e colocou pessoas muito especiais que me ajudaram a completar essa jornada.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pela oportunidade, confiança e amizade.

“Ser mestre não é apenas lecionar. Ensinar não é apenas transmitir o conhecimento. Ser mestre é ser instrutor e amigo, guia e companheiro. Ser mestre é ser exemplo. Exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e, sobretudo, de amor.”

À Prof^a. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini pela co-orientação, amizade e incentivo.

*A amizade não se força, não se compra não se vende,
ela acontece, lentamente, em silêncio, devagar.
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,
porque é único para nós,mas não vai sozinho e nem nos deixa só.
Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo.
Essa é a mais bela responsabilidade de nossa vida,
a prova de que as almas não se encontram por acaso.
(Antoine de Saint-Exupéry)*

Ao meu irmão, Cezar, pelo apoio e pela referência que sempre foi em minha vida.

*E às vezes, quando o procuro, noto que ele não tem noção de como me é necessário, de como é indispensáveis ao meu equilíbrio vital, porque ele faz parte do mundo que eu, tremulamente, construí e se tornou o alicerce do meu encanto pela vida.
(Vinícius de Moraes)*

Agradecimentos

Aos queridos amigos do programa de pós-graduação, que se tornaram amigos pessoais e especiais, sendo que alguns deles continuaram sua caminhada e deixaram muita saudade: Ana Luiza (Velma), Arnóbio, Beatriz Cury, Bruna, Charlene, Cris Bruno, Cris Franzini, Fabrício, Fernanda, Fernandinha, Flávia, Flávio, Giselle, Gustavo, Hilris, Joceana, Ju Farinelli, Luana, Pricileila, Thalita, Thiago Francês...

Que eu não perca a vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que, com as voltas do mundo, um dia eles acabam indo embora de nossas vidas.

Aos amigos da Bioequivalência: Ana Paula, Daniel (Sashimi), Elias, Helen (Berê), Ju Assunção, Léo, Marcelo (Tereso), Michel, Rodrigo, Silvio (França) e Sandra pela amizade e pela ajuda indispensável. Sem vocês jamais conseguiria concluir este trabalho.

Aos meus amigos pessoais, que apesar de não participarem da minha vida acadêmica, compartilharam comigo as alegrias e angústias de cada etapa deste trabalho.

Cada novo amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos.

(Miguel Unamuno)

Ao Beto, pela força, carinho e dedicação.

“Uma parte que não tinha.”

Agradecimentos

Aos professores do departamento de Fármacos e Medicamentos pela ajuda, amizade e convivência tão agradável, em especial Profa. Ana Dóris, Profa. Palmira e Prof. Raul.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento pela grande amizade, além da colaboração indispensável na realização e compreensão das análises de reologia e SAXS. Uma pessoa indiscutivelmente apaixonada pelo que faz.

*O segredo da felicidade no trabalho reside em uma palavra: excelência. Faz bem
aquele que gosta do que faz!!!*

À Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci pelo auxílio na realização das análises de espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS) no Laboratório Nacional de Espalhamento de Luz Síncrotron – LNLS.

Aos funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, em particular às queridas Margareth, Fátima e Queila.

À secretaria do Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, Laura, Sônia e Cláudia, pela disposição e atenção constantes em todos os momentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Celso Santilli do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP - Araraquara pela disponibilização do seu laboratório para que fossem realizadas as análises de espalhamento dinâmico de luz e reologia.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa por permitir prontamente a utilização do microscópio de luz polarizada.

Ao laboratório Cristália que colaborou com material, possibilitando a realização deste trabalho.

Ao serviço técnico de Biblioteca e documentação e ao Serviço de apoio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), que me forneceu conhecimentos, formou meu espírito crítico, me deu oportunidade e me ensinou uma pequenina, mas importantíssima coisa, a responsabilidade.

Para ser grande, sê inteiro:

Nada teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és no mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

(Ricardo Reis)

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo.

Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira.

O rio não pode voltar.

Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência.

Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece.

Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano,

mas tornar-se oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.

Assim somos nós.

Só podemos ir em frente e arriscar.

Coragem!! Avance firme e torne-se Oceano!!!

(Osho)

Resumo

Anfotericina B (AmB) é o fármaco de escolha para o tratamento das infecções fúngicas invasivas, importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunodeprimidos. A toxicidade da AmB na forma convencional tem estimulado o desenvolvimento de novas formulações para a administração do fármaco. Neste trabalho foram estudadas microemulsões óleo/água, contendo fosfatidilcolina de soja/tween 20 como agentes tensoativos, CaptexTM 200 como fase oleosa e tampão fosfato 50mM pH 7,2 como fase aquosa, com o objetivo de reduzir a toxicidade e aumentar a absorção oral da AmB. Os sistemas obtidos com diferentes proporções dos componentes foram descritos através de um diagrama de fase pseudo-ternário. As microestruturas foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), reologia, microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). Foi desenvolvido e validado um método por CLAE para a determinação de AmB em plasma para aplicação em estudo do perfil farmacocinético do fármaco veiculado na ME em ratos. A nefrotoxicidade da AmB foi avaliada pela determinação da creatinina plasmática dos ratos após administração oral da nova formulação desenvolvida (50 mg/kg), e comparada à administração da formulação convencional na mesma dose. Foi observado que o tamanho das gotículas das microemulsões aumenta quando a AmB é incorporada ao sistema. As amostras apresentaram comportamento Newtoniano e, dependendo da composição do sistema, antitixotropia foi observada. Também foi observado que a viscosidade aumenta com o aumento da fase oleosa assim como a formação de estruturas lamelares ordenadas que são desfavorecidas com a adição do fármaco. A incorporação do fármaco depende das proporções de fase oleosa e tensoativo. As interações da AmB com os sistemas resultam em alterações na solubilidade do fármaco e no seu perfil de liberação. O método para quantificação das AmB por CLAE

Resumo

desenvolvido apresentou resposta linear na faixa de concentração de 0,05 to 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $r^2 = 0,9996$, e o ensaio demonstrou sensibilidade, seletividade e precisão adequadas para a aplicação na investigação da farmacocinética da AmB. A biodisponibilidade oral da AmB veiculada na microemulsão foi de aproximadamente 3 vezes maior que para a formulação comercial. Os parâmetros farmacocinéticos da AmB encontrados na administração da formulação convencional e da microemulsão, que demonstraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,01$, teste de Mann Whitney) foram, respectivamente: C_{max} 0,16 vs 0,87 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ASC 13,63 vs 37,52 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$. Os níveis de creatinina plasmática encontrados no grupo de animais que recebeu a microemulsão foram significativamente menores daqueles que receberam a formulação comercial (ANOVA, $p = 0,002$). Concluindo, o perfil farmacocinético e nefrotoxicidade da AmB mostrou diferenças significativas entre a formulação convencional e a microemulsão desenvolvida neste trabalho, que proporcionou aumento significativo da biodisponibilidade oral do fármaco sem observação de efeito nefrotóxico.

Palavras-chave: sistemas de liberação de fármacos, microemulsões, anfotericina B, farmacocinética.

Abstract

Amphotericin B (AmB) is the drug of choice for therapy of invasive fungal infections, an important cause of morbidity and mortality among immunodeficient patients. The high toxicity of AmB in its conventional formulation have induced the development of innovative formulations for the drug administration. In this work, oil-in-water microemulsions containing soya phosphatidylcholine/Tween[®] 20 (1:1) as surfactant, captex[™] 200 as oil phase, and phosphate buffer 50mM, pH 7.2 as aqueous phase were studied in order to reduce AmB toxicity and increase its oral absorption. Systems obtained with different proportions of the components were described by pseudo-ternary phase diagram. The microstructures of the system were characterized by dynamic light scattering (DLS), rheological behavior, polarized light microscopy and small angle X-ray scattering (SAXS). Was developed and validated a fast and selective HPLC method to determine AmB for application to study of pharmacokinetic profile of drug in rats. The nephrotoxicity of AmB was assessed by determining of rat plasma creatinine after oral administration of the novel formulation (50 mg/kg) and comparing with it a conventional formulation in the same dose. It was observed that the oil droplets size increase when AmB is incorporated into the system. The samples presented Newtonian behavior depending on the system composition. An anti-thixotropic behavior was found, as well, the viscosity increases with the oil phase. The data showed the formation of ordered structures with lamellar arrangements in the drug unloaded systems and that order decrease with the drug incorporation. The AmB incorporation into the system was dependent on both the oil phase and surfactant. The interactions of AmB with the systems can control both the drug solubility and release rate. A linear response of HPLC method over concentration range 0.05 to 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $r^2 = 0.9996$, was obtained and the assay shows sensitivity, selectivity and precision for the

Abstract

investigation of pharmacokinetics of AmB. The oral bioavailability of AmB in microemulsion was approximately 3 times higher than for the commercial formulation. The pharmacokinetics parameters found for AmB in typical and microemulsion formulation that showed statistically significant differences ($p < 0.01$, Mann Whitney test) were, respectively: C_{max} 0.16 vs 0.87 $\mu\text{g/mL}$; AUC 13.63 vs 37.52 $\mu\text{g/mL.h}$. The plasma creatinine for microemulsion group was significantly lower when compared with the elevated levels of creatinine in the commercial formulation group (ANOVA, $p = 0.002$). In conclusion, the pharmacokinetic profile and nephrotoxicity of AmB were found to be highly formulation dependent and the microemulsion showed be able to improve oral absorption of AmB without nephrotoxicity.

Keywords: drug delivery systems, microemulsion, amphotericin B, pharmacokinetics

Lista de Figuras

Figura 1: Fórmula química da Anfotericina B	03
Figura 2: Formação de poros pela AmB na bicamada lipídica das membranas celulares.....	04
Figura 3: Representação esquemática da organização das microemulsões.....	12
Figura 4: Esquema da célula de difusão adaptada ao dissolutor (a) abertura para coleta de amostra e reposição, (b) entrada do dispositivo para agitação do meio, (c) abertura para colocação do tubo com a membrana (à esquerda) e esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução.....	28
Figura 5: Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo FS/Tw (T), Captex TM (O) e sistema tampão (A).....	34
Figura 6: Variação do raio hidrodinâmico das gotículas em função da porcentagem de fase oleosa na presença e ausência de AmB.....	39
Figura 7: Variação do raio hidrodinâmico das gotículas em função da porcentagem de tensoativo na presença e ausência de AmB.....	40
Figura 8: Perfil reológico das MEs em função da proporção de fase oleosa, na ausência de AmB. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos cheios e vazios.....	44
Figura 9: Perfil reológico das MEs na presença da AmB, variando a porcentagem de fase oleosa. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos cheios e vazios. Para uma melhor visualização, a formulação com 17% de fase oleosa foi mostrada separadamente.....	45

Figura 10: Perfil reológico das MEs variando a porcentagem de tensoativo na ausência da AmB. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos cheios e vazios. Para uma melhor visualização, a formulação com 25% de fase oleosa foi apresentada separadamente.....46

Figura 11: Perfil reológico das MEs na presença da AmB, variando a porcentagem de fase oleosa. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos cheios e vazios. Para uma melhor visualização, a formulação com 25% de fase oleosa foi apresentada separadamente.46

Figura 12. Índice de consistência (K) para MEs na presença e ausência do fármaco em função da porcentagem de fase oleosa.....48

Figura 13. Índice de consistência (K) para MEs na presença e ausência do fármaco em função da porcentagem de tensoativo..49

Figura 14. Fotomicrografia dos sistemas preparados com porcentagem crescente de fase oleosa (**a**:3%; **b**:6%; **c**:10%; **d**:17%) e porcentagem fixa de tensoativo (20% m/m).....52

Figura 15. Fotomicrografia dos sistemas preparados com porcentagem crescente de tensoativo (**a**:10%; **b**:15%; **c**:20%; **d**:25%) e de fase oleosa fixa (10% m/m).....53

Figura 16. Fotomicrografia dos sistemas estabilizados por 20% FS:TW (1:1) 10% de fase oleosa (**a**) ausência do fármaco e (**b**) presença do fármaco.....54

Figura 17. Fotomicrografia das MEs estabilizadas por 25% FS:TW (1:1) 10% de fase oleosa (**a**) antes da aplicação da tensão de cisalhamento e (**b**) após aplicação da tensão de cisalhamento.....55

Figura 18: Representação esquemática da auto-organização de tensoativos em estruturas lamelares e hexagonais.....58

- Figura 19:** Curvas de SAXS para os sistemas preparados com porcentagem crescente de fase oleosa (3%, 10% e 17%) e porcentagem fixa de tensoativo (20% m/m). **A:** ausência de AmB; **B:** presença de AmB.....59
- Figura 20.** Curvas de SAXS para sistemas preparados com concentrações crescentes de tensoativo (10%, 20% e 25%) e fase oleosa constante (10% m/m). **A:** ausência de AmB; **B** presença de AmB.....61
- Figura 21** – Curva da intensidade de espalhamento **I(q)** em função do vetor de espalhamento (**q**) para amostras das formulações contendo: (a) ME-A; (b) ME-C; (c) ME-D; (d) ME-G.....63
- Figura 22:** Cromatogramas: (a) matriz biológica e (b) matriz biológica adicionada de AmB 5µg/mL na condição selecionada.....67
- Figura 23:** Cromatogramas: (a) metanol, (b) ME contendo AmB diluída em metanol e (c) formulação comercial de AmB diluída em metanol.....67
- Figura 24:** Cromatograma: (a) Tampão fosfato, pH 2,5, contendo laurilssulfato de sódio 0,15% e (b) AmB 5 ug/mL em tampão fosfato, pH 2,5 contendo laurilssulfato de sódio 0,15%.....68
- Figura 25:** Curva analítica da anfotericina B em metanol obtida por CLAE em 410nm.....69
- Figura 26:** Curva analítica da AmB em tampão fosfato pH 2,5 acrescido de 0,15% de laurilsulfato de sódio obtida por CLAE em 410nm.....70
- Figura 27:** Curva analítica de AMB em plasma obtida por CLAE em 410nm.....71
- Figura 28:** Efeito do volume de fase da ME, com tensoativo constante, na incorporação da AmB em pH fisiológico a 25°C.....77

Figura 29: Efeito da proporção concentração de tensoativo, com volume de fase constante, na incorporação da AmB, em pH fisiológico, a 25°C.....79

Figura 30: Perfil de liberação *in vitro* da AmB nos sistemas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 3%; B: 6%; C: 10%; D: 17%) e fixa de tensoativo em 20%, em comparação ao fármaco livre em tampão fosfato pH 2,5.....83

Figura 31: Perfil de liberação *in vitro* da AmB nos sistemas com proporções crescentes de tensoativo (E: 10%; F: 15%, C: 20% e G: 25%) e fase oleosa fixa em 10%, em comparação ao fármaco livre em tampão fosfato pH 2,5.....83

Figura 32: Efeito das proporções de fase oleosa (A) e de tensoativo (B) na relação entre as liberações da anfotericina B livre e incorporada nos sistema microemulsionados.....84

Figura 33: Curva de concentração plasmática *versus* tempo de AmB após administração dose única da formulação comercial (D-AmB): i.v. *bolus* 1mg/kg e oral 50mg/kg (Δ D-AmB oral 50mg/kg; \square D-AmB i.v. *bolus* 1mg/kg).....91

Figura 34: Curva de concentração plasmática *versus* tempo de AmB após administração dose única de 50mg/kg da AmB por via oral. (Δ D-AmB e \circ ME-AmB).....92

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sistema cromatográfico em modo gradiente.....	23
Tabela 2: Composição das MEs selecionadas.....	37
Tabela 3: Raio hidrodinâmico da gotículas	39
Tabela 4. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações preparadas com proporções fixas de tensoativo e crescentes de fase oleosa na presença e ausência da AmB.....	47
Tabela 5. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações preparadas com concentrações fixas de fase oleosa crescentes de tensoativo na presença e ausência da AmB.....	48
Tabela 6: Volume de fase interna das MEs.....	50
Tabela 7 – Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de tensoativo e aumento da concentração de fase oleosa.....	64
Tabela 8 – Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase oleosa e aumento da concentração de tensoativo.....	65
Tabela 9: Precisão e exatidão do método bioanalítico da AmB em plasma.....	72
Tabela 10: Limites de detecção e quantificação do método de análise de AmB em plasma.....	73
Tabela 11: Estudo da seletividade do método de análise da AmB em plasma.....	74

Tabela 12: Estudo de estabilidade da AmB em amostra biológica (plasma).....	74
Tabela 13: Valores referentes ao volume de fase interna das MEs, suas respectivas medidas de diâmetro e a solubilidade da AmB em cada formulação.....	75
Tabela 14: Concentração plasmática de AmB em função de tempo nos animais que receberam D-AmB i.v. <i>bolus</i> na dose de 1mg/kg, os valores estão representados pela média e desvio padrão.....	88
Tabela 15: Concentração plasmática de AmB em função de tempo nos animais que receberam D-AmB por via oral na dose de 50mg/kg, os valores estão representados pela média e desvio padrão.....	89
Tabela 16: Concentração plasmática de AmB em função de tempo nos animais que receberam ME-AmB por via oral na dose de 50mg/kg, os valores estão representados pela média e desvio padrão.....	90
Tabela 17: Parâmetros farmacocinéticos da AmB após administração oral da formulação comercial (D-AmB) e da microemulsão (ME-AmB).....	93
Tabela 18: Níveis de creatinina plasmática antes e após a administração de dose única de D-AmB e ME-AmB 50mg/kg.....	94

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Materiais	16
3.1.1. Matérias primas, reagentes, e solventes	16
3.1.2 Equipamentos	17
3.2. Métodos	18
3.2.1. Preparação dos sistemas estabilizados por fosfatidilcolina de soja e Tween 20	18
3.2.2. Diagrama de fase para o sistema estabilizado por FS/Tw	19
3.2.3. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados	20
Determinação do Raio Hidrodinâmico das Gotículas por Espalhamento de luz.....	20
Análise Reológica.....	20
Microscopia de Luz Polarizada.....	21
Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	21
3.2.4. Determinação da AmB em formulações e plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	22
Sistema Cromatográfico	23
Curva analítica da AmB em metanol.....	23
Curva analítica da AmB em tampão.....	24
Procedimento Analítico	24

Curva analítica da AmB em plasma.....	24
3.2.5. Validação do Método Bioanalítico.....	24
Linearidade.....	24
Limite Inferior de Quantificação (LIQ).....	25
Limite de Detecção (LD).....	25
Precisão intra (repetibilidade) e interensaios (reprodutibilidade).....	25
Exatidão.....	25
Seletividade.....	26
Estabilidade.....	26
3.2.6. Determinação da incorporação da AmB nas MEs.....	27
Determinação das densidades da MEs.....	27
Determinação do volume de fase oleosa.....	27
3.2.7. Estudo do perfil de dissolução <i>in vitro</i>.....	28
3.2.8. Avaliação <i>in vivo</i>.....	30
3.2.9. Protocolo experimental.....	30
3.2.10. Análise farmacocinética	31
3.2.11. Determinação de creatinina.....	32
3.2.12. Análise estatística.....	32
4. Resultados e Discussão.....	33
4.1. Diagrama de fase	33
4.2. Caracterização Físico-química das MEs.....	37
4.2.1. Determinação do raio hidrodinâmico das gotículas por espalhamento dinâmico de luz.....	38
4.2.2. Comportamento Reológico.....	41

4.2.3. Microscopia de Luz Polarizada.....	51
4.2.4. Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	55
4.3. Determinação da AmB em formulações e plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	66
4.3.1. Curva Analítica da AmB em metanol	68
4.3.2. Curva Analítica da AmB em solução tampão	69
4.3.3. Curva Analítica da AmB em plasma	70
4.4. Validação do método analítico desenvolvido.....	71
Linearidade.....	72
Precisão e Exatidão Intra (repetibilidade) e Interensaios (reprodutibilidade).....	72
Limite de Detecção e Quantificação.....	72
Seletividade.....	73
Estabilidade do fármaco no fluido biológico.....	74
4.5. Determinação da incorporação da AmB em relação ao volume de fase interna.....	75
4.6. Estudo do perfil de dissolução <i>in vitro</i>	80
4.7. Análise Farmacocinética	88
4.8. Avaliação dos níveis creatinina.....	94
5. Conclusões.....	96
6. Referências Bibliográficas.....	98
7. Anexos.....	109

1. Introdução:

Durante as últimas décadas a incidência de infecções fúngicas invasivas (IFIs) apresentou um aumento significativo (PETRIKKOS & SKIADA, 2007) sendo causa de morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes imunodeprimidos (SHAO *et al.*, 2007). A maioria dos fungos geralmente não causa problemas em indivíduos saudáveis, porém em pacientes com deficiência de imunidade podem se tornar devastadores (REX, 2006).

Muitos fatores têm contribuído para este quadro, principalmente situações clínicas que alteram os mecanismos de defesa do organismo, tais como neoplasias, imunossupressão induzida em pacientes transplantados e associada a regimes intensivos de quimioterapia, alta incidência da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (KONTIYIANNIS *et al.*, 2003; OSTERMANN & BRYAN, 2007), nutrição parenteral, longo tempo de permanência em unidades de terapia intensiva e o uso irracional de antibióticos, que reduz o número de bactérias, permitindo o crescimento de fungos (REX, 2006).

O aumento do número de transplantes de células de tecido hematopoiético e o consequente aumento do número de pacientes com “Doença Enxerto Contra Hospedeiro Transfusional” (DECHT) também pode ser associado ao aumento na frequência de IFIs, principalmente as causadas por *Aspergillus* e *Candida* spp (CORDONNIER *et al.*, 2008).

A introdução de agentes imunossupressores de nova geração resultou no surgimento de um novo grupo de pacientes que apresentam alto risco de desenvolver infecções fúngicas, por exemplo, os acometidos por artrite reumatóide e colites (OSTERMANN & BRYAN, 2007).

Os casos mais comuns de IFIs oportunistas são causados por *Candida albicans*, (SHAO *et al.*, 2007), considerada a infecção fúngica mais comum em pacientes hospitalizados e se manifesta por um quadro grave, resultante da presença de um grande número de patógenos na corrente sanguínea, que pode ser adquirido em unidades hospitalares, e tem índice de mortalidade em torno de 40% (PETRIKKOS, 2007). Sua incidência tem aumentado, sendo considerada uma importante causa de mortalidade em pacientes com quadros críticos e imunodeprimidos (PEMÁN *et al.*, 2007).

A aspergilose invasiva (AI) ocorre predominantemente em pacientes imunodeprimidos e está associada a altos índices de mortalidade, que chegam a mais de 50% na maioria dos estudos (SHAO *et al.*, 2007).

Outros fungos emergentes como *Zygomycetes*, *Fusarium ssp* e *Scedosporium spp* tem apresentado relevância nos casos de IFIs (PETRIKKOS, 2007). A exposição a agentes azólicos, transplantes de células do tecido hematopoiético, transplante hepático, candidíase no trato urinário e envelhecimento da população estão associados ao aumento dos casos de infecções por estes patógenos. (PEMÁN *et al.*, 2007).

Alguns dos fatores que contribuem para o aumento da mortalidade causado pelas IFIs são: falta de um diagnóstico precoce e confiável, devido à baixa sensibilidade e especificidade das técnicas microbiológicas; dificuldade de se reconhecer os sintomas da doença, principalmente pela falta de resposta dos pacientes que fazem uso de agentes imunossupressores e o fato das terapias antifúngicas disponíveis não apresentarem respostas satisfatórias (KONTYIANNIS *et al.*, 2003).

A anfotericina B (AmB) é um dos antibióticos mais efetivos para o tratamento de micoses sistêmicas (ESPOSITO *et al.*, 2003; HEREC *et al.*, 2005; RAÚL e EFRAÍN, 2002; AMATO *et al.*, 2008).

É um agente antifúngico heptaênico obtido a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* (grupo dos Actinomicetos) (ESPOSITO *et al.*, 2003), isolada em meados de 1955 e, desde então, apenas alguns agentes com ação antifúngica tornaram-se viáveis para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. O nome anfotericina deriva da característica anfotérica de sua estrutura molecular, formando sais solúveis tanto em meio ácido como em meio básico (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

A molécula da AmB é composta por 37 átomos de carbono formando um anel macrocíclico fechado por lactonização; possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas não-substituídas (heptaeno) e, na porção oposta, uma cadeia polihidroxilada com sete grupos hidroxila livres, o que lhe confere característica anfipática. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um grupamento amina livre, formando uma cadeia lateral. A molécula tem aproximadamente 24 Å de comprimento, ou seja, o equivalente a meia camada de fosfolípido (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

No balanço geral a molécula possui baixa solubilidade em água, exigindo para sua administração *in vivo* uma dispersão coloidal do fármaco com o tensoativo desoxicolato de sódio (ESPOSITO *et al.*, 2003). Sua massa molecular é 924,1 g/mol (ARAÚJO, 2005) e sua estrutura química está apresentada na Figura 1.

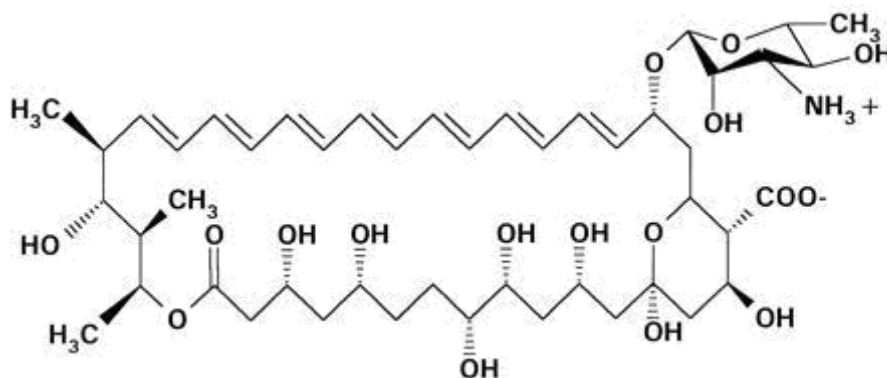


Figura 1: Fórmula química da Anfotericina B

É um pó amarelo alaranjado, insolúvel em água, em etanol e em éter, solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) e em propano-1,2-diol e levemente solúvel em dimetilformamida e em metanol. Tem pKas de 5,5 e 10 para os grupos carboxilato e amino, respectivamente (MERK INDEX, 1996). O fármaco é instável em faixas de pH abaixo de 6 e acima de 9 e em presença de luz, calor e oxigênio (ARAÚJO, 2005). Observa-se escurecimento gradual e decomposição em temperatura acima de 170°C (MERK INDEX, 1996).

A molécula da AmB é anfifílica e anfotérica. Possui uma extremidade polar e outra apolar, responsáveis pela sua alta afinidade pelos esteróis (colesterol e ergosterol) das membranas celulares (BRISTH PHARMACOPEIA, 2003) o que resulta na sua excelente ação antifúngica (INSELMANN *et al.*, 2002; LUMBERAS *et al.*, 2003.).

O mecanismo de ação da AmB nas células fúngicas se dá pela inibição da síntese de ergosterol, ocasionando a formação de poros através de membranas lipídicas (Figura 2). A alteração da permeabilidade celular permite, portanto, o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, que provoca um desequilíbrio eletrolítico e homeostático e tem como resultado a inibição do crescimento e, eventualmente, a morte celular (FILIPPIN & SOUZA, 2006). É necessário um número razoável de monômeros associados, entre oito e doze, para que ocorra a formação de poros na membrana (ROSOFF, 1996).

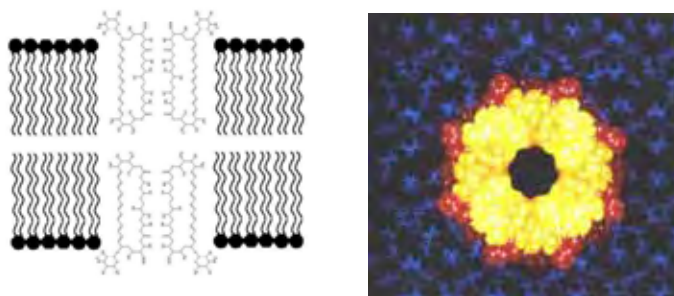


Figura 2: Formação de poros pela AmB na bicamada lipídica das membranas celulares (FRANZINI, 2006).

As ligações entre os esteróis das membranas celulares e a AmB ocorrem através de pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila dos esteróis e carboxila da molécula de AmB ou por forças de Van der Waals entre a cadeia lateral do ergosterol (dupla ligação do carbono 22) e o fármaco. No colesterol essa dupla ligação não está presente o que deixa a molécula mais flexível e dificulta seu contato intermolecular com os macrolídeos (ARAÚJO, 2005), o que explica a maior afinidade da AmB pelas células fúngicas do que pelas células animais, que contém ergosterol e colesterol, respectivamente. No entanto sua ação não é exclusiva nas células fúngicas, sendo que os rins constituem o maior alvo para seus efeitos deletérios, que pode gerar, muitas vezes, a necessidade de interrupção do tratamento (GIANNINI *et al.*, 2004).

Outro mecanismo de ação proposto para a AmB é a estimulação dos macrófagos mediante processos de oxidação e imunomodulação. A presença de metabólitos oxidativos no meio, como peróxido de hidrogênio, favorece a oxidação e a formação de radicais livres contribuindo para o aumento da permeabilidade da membrana celular e, assim, potencializando a ação do fármaco.

Moléculas de AmB em altas concentrações se auto-associam formando dímeros ou agregados maiores (LARABI *et al.*, 2004). Ambas as formas, monomérica e agregada, podem formar canais em membranas contendo ergosterol. Entretanto, somente a forma agregada é capaz de formar tais canais em membranas contendo colesterol (FILIPPIN & SOUZA, 2006), que seria responsável pela toxicidade. Então, uma das estratégias para diminuir a toxicidade do fármaco é desenvolver novos derivados ou formulações que produzam agregados menos tóxicos. (ARAÚJO, 2005).

A absorção da AmB por via oral é mínima (inferior a 5%), por isso as infecções sistêmicas tem sido tratadas através de infusão por via endovenosa, sendo necessários

cuidados especiais com o paciente, como por exemplo, hospitalização (BENNETT, 2003).

Devido à sua baixa solubilidade, convencionalmente, utiliza-se a AmB em associação com desoxicolato (D-AmB), tensoativo com capacidade de aumentar a solubilidade do fármaco (LINCOPAN *et al.*, 2006). No entanto esta complexação tem como resultado a formação de um sistema micelar instável quando na circulação sanguínea e que libera o fármaco na sua forma auto-associada tóxica. A AmB também pode ser transferida das micelas para lipoproteínas, e o reconhecimento dessas partículas pelas células, principalmente do fígado, é um fator contribuinte para a toxicidade (LARABI, 2004).

A AmB é comercializada desde 1956 na forma de pó liofilizado associado ao desoxicolato (Fungizon[®]). É reconstituído em 10mL de soro glicosado 5% formando uma dispersão micelar. A administração endovenosa 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 uma semana a 4°C.

A AmB apresenta dois tipos de reações tóxicas principais: toxicidade aguda, relacionada à infusão e toxicidade crônica, efeito nefrotóxico pronunciado que se observa em tratamentos prolongados (INSELMANN *et al.*, 2002; BRIME *et al.*, 2003; ANTONIADOU & DUPONT, 2005).

As reações adversas relacionadas à infusão incluem febre, calafrios, náusea, vômitos, hipocalcemia e arritmia cardíaca (INSELMANN *et al.*, 2002; BRIME *et al.*, 2003). Essas reações estão provavelmente ligadas à indução de citocinas pró-inflamatórias pelo fármaco (ANTONIADOU & DUPONT, 2005).

A nefrotoxicidade é definida como aumento nos níveis séricos de creatinina e está associada com vasoconstrição que leva à lesão isquêmica e a interação direta com as membranas das células epiteliais resultando em disfunção tubular (ANTONIADOU & DUPONT, 2005). Esse efeito é dose dependente e se caracteriza por perda de potássio e magnésio, lesão tubular e insuficiência renal (BENNETT, 2003).

Apesar da elevada toxicidade e da introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos na década de 1980 a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica têm assegurado que a AmB permaneça como fármaco de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas que acometem principalmente pacientes imunocomprometidos (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

No âmbito hospitalar, na década de 90, devido à falta de disponibilidade de formulações lipídicas tornou-se freqüente a administração da AmB veiculada em um excipiente de características lipofílicas, Intralipid[®], preparada no momento da infusão, já que não se dispunham de estudos de estabilidade que demonstrassem quanto tempo se podia armazenar antes do uso. A administração desse produto apresentou menor índice de efeitos adversos e toxicidade comparada à formulação convencional (em soro glicosado 5%) (GALERA, 2000).

O uso de doses de D-AmB, mais efetivas que as convencionais (acima de 1,0mg/kg/dia), bem como seu uso profilático, é limitado pelos efeitos tóxicos. Para contornar esses problemas, vem sendo desenvolvidas formulações menos tóxicas e novos métodos para veiculação da AmB (FILIPPIN & SOUZA, 2006). Entre as opções para redução da toxicidade da AmB pode-se utilizar formulações lipídicas como emulsões lipídicas, microemulsões, lipossomas e nanopartículas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

Sistemas lipídicos têm maior habilidade em reter a molécula da AmB do que micelas de tensoativos e liberam o fármaco lentamente na forma de monômeros, assim reduzindo a toxicidade para as células humanas (LARABI, 2004).

Por mais de duas décadas, pesquisas vêm sendo direcionadas para a incorporação da AmB em sistemas lipídicos com a finalidade de reduzir a toxicidade e três estão comercialmente disponíveis (LARABI, 2004).

-ABLCL: complexo lipídico com AmB de estrutura multilamelar constituído de diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) em razão molar de 7:3 com 36 mol% de AmB (Abelcet[®]) (FILIPPIN & SOUZA, 2006). Foi a primeira formulação lipídica aprovada pelo FDA, em 1995. Devido ao elevado tamanho de partícula é rapidamente eliminado da circulação pelo sistema retículo endotelial (ROBSON & NAHATA, 1999).

É comercializado na forma de suspensão de 100mg/20mL. A administração é feita por infusão, após diluição em soro glicosado 5%, com concentração final de 1mg/mL; e indicada a dose de 2,5mg/kg/dia por duas horas em adulto. Em pacientes pediátricos pode-se administrar uma concentração final máxima de 2mg/mL, devido ao potencial risco de anafilaxia.

As diluições em soro glicosado 5% são estáveis por 6 horas à temperatura ambiente e 15 horas sob refrigeração e abrigo da luz (ROBSON & NAHATA, 1999).

-ABCD: dispersão coloidal de AmB em sulfato de colesterila sódica em razão molar de 1:1, formulada em partículas discóides (Amphocil[®]);

Aprovado pelo FDA em 1996 para o tratamento de pacientes refratários ou intolerantes à AmB convencional.

É comercializado na forma de pó liofilizado e deve ser reconstituído em água para concentração de 5 mg/mL. Sua administração é feita por infusão após diluição em soro

glicosado 5% em doses de 5 mg/kg/hora por duas horas. A instabilidade física da dispersão é um fator limitante, sendo esta formulação estável por 14 dias nas concentrações de 0,1 a 2 mg/mL à temperatura entre 4 e 25°C e protegido da luz (ROBSON & NAHATA, 1999).

-AmBisome: preparação lipossômica de vesículas unilamelares pequenas, constituídas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e AmB em razão molar de 2:1: 0,8: 4 (AmBisome[®]).

Aprovada pelo FDA em 1997. É comercializada na forma de pó liofilizado, deve ser diluída em água estéril alcançando concentração final de 4mg/mL, sendo diluída em soro glicosado 5% para administração, alcançando concentração final de 1 a 2 mg/mL. É estável por 24 horas após reconstituição e 6 horas após diluição em soro glicosado (ROBSON & NAHATA, 1999).

A farmacocinética da AmB é relativamente complexa, seguindo um modelo bi ou tricompartmental. Sua distribuição e eliminação dependem da formulação administrada; isso se deve às características físico-químicas, à configuração estrutural, tamanho e composição da cadeia dos lipídios.

A farmacocinética da AmB na formulação convencional administrada por via endovenosa é bastante conhecida. O fármaco se distribui amplamente por vários tecidos, sendo que apenas 10% da dose permanecem no plasma. Seu volume de distribuição é de aproximadamente 4L/kg, o que reflete a ampla distribuição tissular do fármaco (GALLIS *et al.*, 1990; CIPOLLE, 1986). Acumula-se fundamentalmente no fígado, rins, pulmão, coração, músculos e glândulas adrenais. Liga-se fortemente às proteínas plasmáticas (90 a 95%)

Em adultos, uma dose de 0,6 mg/kg administrada em perfusão de 6 horas alcança concentrações máximas ($C_{max.}$) e mínimas ($C_{min.}$) de 1 a 3 e 0,2 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Sua eliminação obedece a um comportamento bifásico, a meia vida em fase inicial ($t_{1/2 \alpha}$) é de 24 a 48 horas, seguida de uma fase terminal ($t_{1/2 \beta}$) de 15 dias (GALLIS *et al.*, 1990; CIPOLLE, 1986).

Apenas 3 a 5% do fármaco são eliminados na forma inalterada na urina (detectada 24 horas após a administração).

O uso da AmB está sendo limitado pelas dificuldades da administração que exige a permanência do paciente em hospital e pelo seu potencial efeito nefrotóxico (AMATO *et al.*, 2008).

A baixa solubilidade da AmB em meio aquoso, sua alta toxicidade nas dispersões convencionais e a baixa taxa de absorção por via oral tem estimulado o desenvolvimento de novos sistemas de administração deste fármaco (ESPOSITO *et al.*, 2003; BRIME *et al.*, 2004).

Diante disto, muita atenção tem sido dada às microemulsões (MEs), por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais potenciais dos fármacos. 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). As MEs formam sistemas reservatórios, com capacidade de modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e absorção e controle da biodisponibilidade de fármacos. Como sistemas reservatórios podem alterar os

parâmetros farmacocinéticos, aumentar o índice terapêutico e conseqüentemente diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia clínica de fármacos (FORMARIZ *et al.*, 2005, DALMORA *et al.*, 2001).

O termo microemulsão foi introduzido por Hoar e Schulman, em 1943, que descreveram esses sistemas como transparentes ou translúcidos, obtidos por titulação a partir de uma emulsão comum, que apresenta aspecto leitoso e quando adicionado um álcool de cadeia média (co-tensoativo) se clarifica (GARTI & ASERIN, 1996).

As MEs são definidas como sistemas transparentes, caracterizados pela mistura de óleo, água, tensoativo e co-tensoativo, formando um sistema termodinamicamente estável. São geralmente caracterizados como agregados esféricos com diâmetro muito pequeno, na faixa de 5 a 140 nm, enquanto que o diâmetro das gotículas de uma emulsão é da ordem de 0,1 µm a 100 µm. As MEs são classificadas como sistemas coloidais com diâmetro de partícula menor que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente e, portanto, não espalham luz. Este fato explica porque as MEs são sistemas opticamente transparentes. (AULTON, 2005; LAWRENCE & REES, 2000). São capazes de solubilizar fármacos hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos (ESPOSITO *et al.*, 2003). Estes sistemas se formam espontaneamente com mistura em proporções adequadas de seus componentes.

Dois tipos de MEs podem ser formados, O/A e A/O além de estruturas bicontínuas em que água e óleo estão separados por uma monocamada de tensoativo (Figura 3). (CORREA *et al.*, 2005).

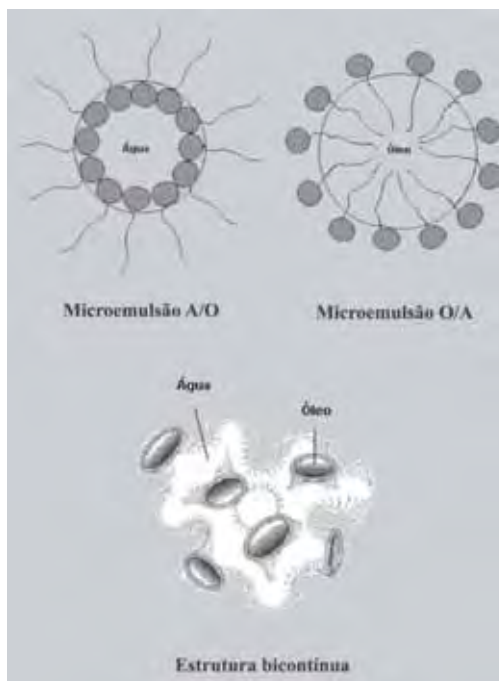


Figura 3: Representação esquemática da organização das microemulsões (CASTILLO, 2002).

Na prática as diferenças importantes entre as emulsões (EM) e as MEs são que as primeiras devem apresentar excelente estabilidade física do ponto de vista farmacêutico, mas são fundamentalmente instáveis termodinamicamente e, eventualmente, separam fases. Além disso, existe uma importante diferença em relação à aparência: EMs são opacas enquanto que MEs são transparentes ou semitransparentes (LAWRENCE *et al.*, 2000).

A possibilidade de formar microemulsão depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença de co-tensoativo. A mistura de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo adequado proporciona a condição máxima de solubilização do óleo e da água. Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e, quando necessário, o co-tensoativo sendo que a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-

químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções tensoativo/co-tensoativo e entre as proporções água/óleo (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Novas formulações baseadas em microemulsão contendo AmB para administração endovenosa foram desenvolvidas, uma utilizando lecitina de soja como tensoativo (MORENO, 2001) e outra combinando lecitina e polissorbato 80, sendo que ambos os sistemas se mostraram viáveis por apresentar características de estabilidade e menor toxicidade que a formulação convencional, observadas em estudos de dose única e dose múltipla (MORENO, 2003).

BRIME e colaboradores (2004) demonstraram que além da menor toxicidade a administração de 1 mg/kg de AmB em microemulsão O/A, estabilizada por fosfatidilcolina para aplicação por via endovenosa, apresentou boa eficácia e estabilidade, sendo um sistema de liberação viável para o fármaco.

As propriedades anfífilas dos tensoativos usados na preparação dos sistemas influenciam na solubilização de substâncias lipofílicas, favorecendo a permeabilidade do fármaco na membrana biológica, geralmente resultando no aumento de sua concentração intracelular. Esses fatores podem contribuir para o aumento da absorção gastrintestinal de componentes possibilitando sua administração oral. (CORTESI *et al.*, 1997).

A potencialidade desses sistemas em aumentar a absorção de substâncias no trato gastrintestinal, conferir proteção de substâncias contra o meio, possibilitar a vetorização, contribuir para maior adesão do paciente ao tratamento pela facilidade de administração e garantir a facilidade de produção fazem desse sistema uma importante alternativa a ser explorada na veiculação de fármacos também para administração por via oral (FRANZINI, 2006).

Dessa maneira é relevante o estudo de sistemas carreadores para AmB, na tentativa de melhorar a relação risco/benefício através do aumento da absorção gastrointestinal e diminuição dos efeitos colaterais, proposta do presente trabalho.

2. Objetivos :

2.1. Objetivo Geral:

O presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento de microemulsões para a veiculação da AmB por via oral, com a finalidade de favorecer a absorção gastrintetinal e minimizar problemas relacionados à toxicidade renal.

2.2. Objetivos Específicos:

- Desenvolvimento e caracterização físico-química das microemulsões;
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação da AmB nas formulações, no meio de dissolução e em matriz biológica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Incorporação da AmB nas MEs;
- Determinação, *in vitro*, do perfil de dissolução do fármaco;
- Avaliação da disposição cinética e parâmetros bioquímicos relacionados à nefrotoxicidade da formulação convencional de D-AmB em animais tratados com dose única oral da formulação convencional de AmB (D-AmB) e na microemulsão (ME-AmB) na dose de 50mg/kg.

3. Material e Métodos:

3.1. Materiais

3.1.1. Matérias primas, reagentes e solventes:

- ✓ Acetonitrila, J.T. Baker, HPLC;
- ✓ Ácido fosfórico, Synth, Brasil;
- ✓ Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade $18,2\mu\text{S. cm}^{-1}$;
- ✓ Álcool metílico, Synth, Brasil;
- ✓ Anfotericina B 900mcg/MG lote 05976/2007 (Cristália)
- ✓ Anforicin B, Cristália;
- ✓ Diéster de ácido cáprico e caprílico com propilenoglicol (Captex-200[®]) Abitec Corporation, Janesville, USA;
- ✓ Dimetilsulfóxido, Sigma Chemical Co;
- ✓ EDTA, Vetec, Brasil;
- ✓ Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200), Lucas Meyer, Alemanha;
- ✓ Hidróxido de sódio, PA-ACS, Grupo Química Brasil;
- ✓ Lauril sulfato de sódio, Synth, Brasil;
- ✓ Monolaurato de sorbitano etoxilado (Tween 20[®]), Aldrich Chemicals;

3.1.2. Equipamentos

- ✓ Agitador magnético Corning;
- ✓ Agitador Vórtex;
- ✓ Analisador de partículas *Light Scattering* – Brookhaven Instruments Corporation, modelo EMI 9863 – fonte de laser He-Ne 10mW, 514 e 532nm – HUGHES; Auto correlator 64 canais (Instituto de Química – UNESP – Araraquara);
- ✓ Balança digital Ohaus;
- ✓ Bomba a vácuo, Tecnal – TE – 058;
- ✓ Coluna Symmetry® C₁₈, 5 µm, 100 Å, 3,9 mm x 250 mm, 4,6 mm φ;
- ✓ Cubetas de quartzo para espectrofotometria, capacidade 5 mL, caminho óptico de 1 cm – Spectrocell;
- ✓ Espectrofotômetro de UV-VIS, Hewlett Packard 8453, com HP UV-Visible ChemStation Software;
- ✓ Estação de dissolução Dissolution SRO plus, Hanson Research, Chatsworth, USA;
- ✓ Filtros descartáveis para seringas, porosidade 0,22 µm, Corning® Incorporated;
- ✓ Membranas descartáveis para seringas, porosidade 0,22µm, Corning® Incorporated;
- ✓ Microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena
- ✓ Peagâmetro Quimis;
- ✓ Reômetro Carri-med CSL 100 (TA Instruments);
- ✓ Sistema de cromatografia líquida (CLAE) Waters Alliance equipado com detector UV-Vis 2487, operando a 409 nm, com injetor automático;
- ✓ Sistema de purificação de água MILLIPORE®, Milli - Q Plus;
- ✓ Ultracentrífuga HITACHI, modelo Himac CP 80 β;
- ✓ Ultrasom, Branson, modelo 1210;
- ✓ Ultrassom de haste - Sonicador® Ultrasonic Liquid Processor modelo XL2020™ ;

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação dos sistemas estabilizados por fosfatidilcolina de soja e Tween[®]20:

Os sistemas foram obtidos dissolvendo-se a fosfatidilcolina de soja (FS) em volumes previamente estabelecidos de fase oleosa (Captex[®] 200) e de co-tensoativo (Tween[®] 20; Tw). A fase aquosa (tampão fosfato 50 mM pH 7,2) foi adicionada, fracionada em volumes de 0,5 mL, sob agitação em vortex. Essa seqüência de adição facilita a homogeneização da mistura, que foi submetida à ultrassom de haste, com potência 220 Watts, operando em modo descontínuo, por 20 minutos, com intervalos de 30 segundos a cada um minuto, à temperatura ambiente.

As amostras foram centrifugadas a 3800rpm por 15 minutos, para eliminar resíduos de titânio liberados pela haste de ultrassom.

A escolha das proporções entre os componentes das fórmulas foi baseada em trabalho previamente desenvolvido em nosso grupo de pesquisa (WARGAFTIG, 2001) visando o favorecimento da absorção gastrointestinal de fármacos, e no trabalho de CONSTANTINIDES e colaboradores (1995). A proporção de FS/ Tw foi mantida fixa em 1:1 para todos os experimentos.

Os ensaios utilizados para a caracterização dos sistemas foram determinação do raio hidrodinâmico das gotículas por espalhamento dinâmico de luz, determinação da viscosidade, comportamento reológico, microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

A incorporação da AmB nos sistemas foi determinada pela adição do antifúngico em excesso diretamente à formulação previamente preparada e quantificação por CLAE.

3.2.2. Diagrama de fase para o sistema estabilizado por FS/Tw.

A partir de misturas de tensoativo/ co-tensoativo (FS/Tw) prepararam-se, em triplicata, formulações de 3g com composição variando de 10 a 90% da mistura de tensoativos. A este sistema foi adicionado Captex[®], como fase oleosa, em concentrações decrescentes correspondentes de 90 a 10%. Cada formulação foi titulada com fase aquosa, sob agitação em vórtex e submetida a ultrassom por 20 minutos à temperatura ambiente.

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

As alterações ocorridas nos sistemas a cada alíquota de água adicionada foram analisadas visualmente.

Considerando as proporções dos componentes (sistema tensoativo, fase oleosa e fase aquosa) após titulação aquosa foi possível determinar os pontos em que se deu a transição de sistema opticamente transparente para sistema opaco ou ainda separação de fases no diagrama de fase.

A partir destes dados foram selecionados sistemas, em função do volume de fase interna (fase oleosa) e da porcentagem de tensoativos que foram utilizados para estudo das características físico-químicas.

3.2.3. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados

Determinação do raio hidrodinâmico das gotículas por espalhamento de luz.

Prepararam-se 3g de cada formulação, que foram diluídas em tampão fosfato 50 mM pH 7,2, cuidadosamente filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,22 μ m e colocadas em frascos de cintilação isentos de poeira. Os frascos foram colocados na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A luz espalhada é captada por um fotomultiplicador posicionando a 90°C do feixe de laser que aumenta o sinal captado e o envia para um sistema correlator no qual os cálculos são processados e enviados ao computador. A temperatura do sistema foi mantida a 20°C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro e índice de polidispersidade das gotículas, com duração de 5 minutos.

Análise Reológica

As propriedades reológicas das formulações na presença e ausência do fármaco foram determinadas utilizando reômetro com geometria cone-placa. A amostra é colocada sobre a placa e submetida a sucessivas velocidades de cisalhamento pela ação do movimento de rotação do cone. Dessa forma é possível construir o reograma de tensão de cisalhamento (τ) por taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), que possibilita o cálculo da viscosidade dinâmica dos materiais. A vantagem desta geometria é que não ocorre variação na tensão de cisalhamento através da amostra, porque a distância entre o cone e a placa é muito pequena (da ordem de dezenas ou centenas de microns), fazendo com que a tensão de cisalhamento seja praticamente uniforme por toda a amostra (TOKUMOTO, 1996).

Utilizou-se placa de 4 cm de diâmetro e espaço de 55 μ m entre cone e placa. A velocidade de cisalhamento (γ) empregada variou de 0 a 400 s⁻¹ e cada medida teve duração de 2 minutos. O comportamento reológico dos sistemas foi determinado utilizando gráficos representativos das curvas ascendentes e descendentes. Todas as determinações foram realizadas em triplicata a 25°C.

Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada (MLP) permite estudar estruturas anisotrópicas e birrefringentes. O microscópio de luz polarizada é um microscópio no qual, junto ao condensador, existe um polarizador, que orienta as ondas luminosas provenientes da fonte de luz em uma só direção, em um só plano. As alterações que uma substância birrefringente provoca na direção da propagação da luz, em um equipamento desse tipo, são feitas graças ao analisador, um segundo sistema de polarização, junto à ocular. O máximo de luz é obtido quando o polarizador e analisador estão com eixos em paralelo e, ao contrário, a luz extingue quando são perpendiculares (ABRAMOWITZ *et al.*, 2005).

As amostras selecionadas para análise foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas no microscópio sob luz polarizada.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A utilização da técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização de sistemas é explicada pela possibilidade de se determinar o tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada (CARVALHO, 2009).

As amostras selecionadas foram submetidas a esse estudo para se obter informações sobre a estrutura e distribuição de tamanho dos objetos espalhadores do sistema.

As medidas foram realizadas na estação de medidas D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, que é equipado com um monocromador ($\lambda = 1,608 \text{ \AA}$), uma câmara de ionização, um detector vertical e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento.

O espalhamento das partículas existentes no sistema foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

3.2.4. Determinação da AmB em formulações e plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação de AmB em fluido biológico por CLAE. A validação envolve testes de linearidade, seletividade, precisão intra e inter ensaio, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e estabilidade, de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (RE 899, de 29 de maio de 2003).

Sistema cromatográfico

Foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Waters Alliance[®] equipado com detector UV-Vis 2487, operando a 410 nm, coluna de fase reversa Symmetry[®] C₁₈, 5 μm, 100 Å, 3,9 mm x 250 mm, 4,6 mm φ, com injetor automático. A fase móvel foi constituída dos solventes acetonitrila e solução de EDTA em água 25mM, em gradiente (Tabela1) com início e término nas proporções 35:65 com vazão de 0,4mL/min e o volume de cada injeção de 100μL utilizando detector UV-Vis operando em comprimento de onda de 410nm.

Tabela 1: Sistema cromatográfico em modo gradiente.

t (min)	Acetonitrila (%)	EDTA 0,0025M (%)
0	35	65
5	35	65
6	70	30
14	35	65
20	35	65

Curva analítica da AmB em metanol

A curva analítica foi obtida em intervalo de concentração de 0,1 a 50μg/mL de AmB utilizando metanol como solvente. As determinações foram feitas em triplicata por CLAE utilizando detector UV-Vis operando em comprimento de onda de 410 nm.

Foi construída uma curva analítica de AmB *versus* área do pico com o objetivo de determinar a incorporação do fármaco nas formulações.

Curva analítica da AmB em solução tampão

A curva analítica foi obtida em intervalo de concentração de 0,1 a 5 mg/mL de AmB tampão fosfato acrescido de laurilsulfato de sódio 0,15% como solvente. As determinações foram feitas em triplicata por CLAE utilizando detector UV-Vis operando em comprimento de onda de 410 nm.

Foi construída uma curva de concentração de AmB *versus* área do pico com o objetivo de quantificar o fármaco no meio receptor durante o ensaio de dissolução.

Procedimento analítico

O procedimento ao qual se submeteu a amostra de plasma envolveu a precipitação de proteínas através da adição de metanol às amostras na proporção 2:1, agitação em vórtex por 30 segundos, centrifugação a 3800rpm por 20 minutos e injeção do sobrenadante, conforme descrito por BRIME et al (2003).

Curva analítica da AmB em plasma

Foi construída uma curva de concentração de AmB *versus* área do pico, através de regressão linear, em intervalo de concentração de 0,025 a 5µg/mL de AmB. As determinações foram feitas em triplicata em concentrações de AmB de 0,05 a 5 µg/mL por CLAE com detecção UV-Vis operando em comprimento de onda de 410 nm.

3.2.5. Validação do método bioanalítico

Os limites de confiança do método bioanalítico foram determinados de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (RE 899, 29 maio 2003) a partir dos parâmetros:

Linearidade: A avaliação da linearidade foi realizada através da análise de amostras de plasma adicionadas de concentrações maiores de AmB do que aquelas

utilizadas para construção da curva de calibração. O método é considerado linear até a maior concentração analisada com coeficiente de variação menor que 15%. As amostras foram analisadas em triplicata.

Limite Inferior de Quantificação (LIQ): Foi considerado como a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco. A resposta do analito no LIQ deve ser identificável e reproduzível com precisão de 20% (vinte por cento) e exatidão de 80 - 120 % (oitenta a cento e vinte por cento). Este parâmetro foi estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis utilizando-se 5 (cinco) amostras de padrões.

Limite de Detecção (LD): É definido como a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo e estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base ou ruído de fundo quando se analisa o branco de amostra.

Precisão intraensaios (repetibilidade) e interensaios (reprodutibilidade): A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de amostras de plasma acrescidos de AmB em 3 concentrações (baixa; 0,125 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; média 1 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e alta 5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) durante 5 dias consecutivos (inter ensaios) e em 5 replicatas num mesmo ensaio (intraensaio).

Exatidão: A exatidão (% de erro sistemático) foi obtida pela concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores teóricos do fármaco na amostra.

Seletividade: A interferência de outros fármacos em um regime terapêutico foi avaliada através da injeção de soluções padrão em concentrações similares às observadas no plasma quando são administrados na dose terapêutica, e os tempos de retenção foram comparados com o da AmB nas condições cromatográficas estabelecidas. Os fármacos utilizados neste ensaio foram: AAS, cafeína, cetoconazol, diclofenaco sódico, dipirona, fluconazol, itraconazol, paracetamol, prednisona, prednisolona, tetraciclina, zidovudina.

Estabilidade: O ensaio de estabilidade verifica se a concentração da substância sofre alterações após um período específico de armazenamento pré-processamento laboratorial.

As alíquotas foram preparadas em duas concentrações diferentes, baixa e alta, em triplicatas, como estabelecido pela RE 899 da ANVISA.

- Estabilidade de curta duração: As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 24 horas, foram analisadas e os resultados comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: As amostras foram congeladas à temperatura de -20°C por 24 horas sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas foram novamente congeladas à temperatura indicada por 12 a 24 horas, e assim sucessivamente até completar 3 ciclos. O fármaco foi quantificado após o terceiro ciclo e os valores comparados com os obtidos na análise das amostras recém-preparadas

- Estabilidade de longa duração: O tempo de armazenamento deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e análise da última, de acordo com o cronograma. A temperatura deve reproduzir a recomendada para armazenamento da amostra, geralmente 20°C .

3.2.6. Determinação da incorporação da AmB nas MEs.

Fármaco em excesso foi adicionado diretamente às formulações previamente preparadas até que se observasse a formação de precipitado. As amostras foram submetidas à ultrassom em modo descontínuo por 20 minutos com pulso de 30 segundos a cada 1 minuto, à temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 3800 rpm por 15 minutos, para eliminar o excesso de fármaco não incorporado.

O sobrenadante foi diluído em metanol e submetido ao procedimento descrito no item 3.2.4 para a quantificação da AmB na formulação.

Determinação das densidades das MEs

A densidade foi determinada pela pesagem de quantidades exatas de cada formulação utilizando-se pipetas volumétricas de 2 mL limpas e secas, utilizando-se a Equação 1:

$$d = \frac{m}{V} \quad (1)$$

Esse parâmetro foi utilizado para calcular o volume de fase oleosa dos sistemas.

Determinação do volume de fase oleosa.

O volume de fase oleosa foi calculado, através da Equação 2 com a finalidade de se relacionar a incorporação da AmB em função do volume de fase oleosa do sistema.

$$\Phi = 1 - (w \cdot \delta) \quad (2)$$

Sendo:

Φ = volume de fase oleosa;

δ = densidade da ME;

w = massa de fase externa.

3.2.7. Estudo do perfil de dissolução *in vitro*

Para o estudo de dissolução *in vitro* utilizou-se o modelo da célula de difusão em sistema estático do tipo Franz adaptada ao equipamento de dissolução (Figura 4).

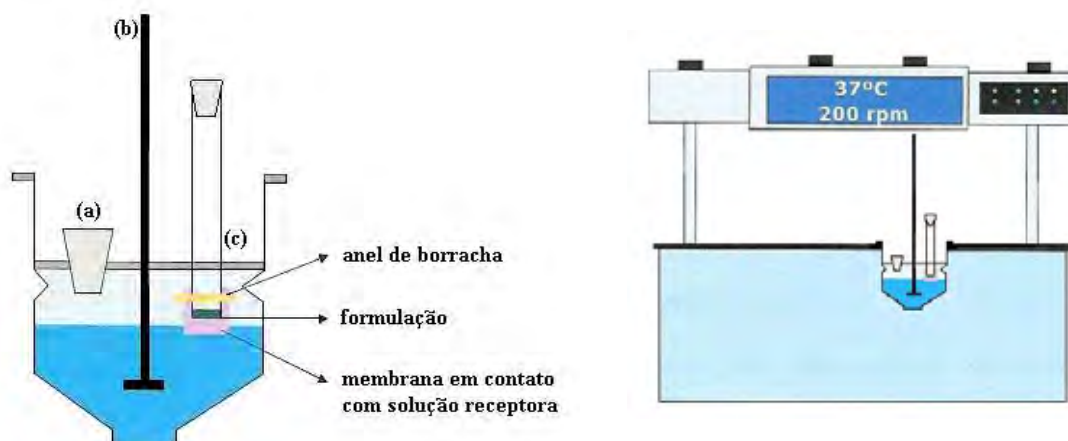


Figura 4: Esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução. (a) abertura para coleta de amostra e reposição, (b) entrada do dispositivo para agitação do meio, (c) abertura para colocação do tubo com a membrana (à esquerda) e esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução (à direita) (URBAN, 2004).

O dispositivo apresenta uma tampa com três aberturas, sendo uma para coleta e reposição do meio de dissolução, uma, no centro, para a entrada do dispositivo de agitação e a terceira para a introdução de um cilindro de vidro que fica em contato com o meio receptor no qual é colocada uma membrana de acetato de celulose, fixada por meio de um anel de borracha, sobre a qual é adicionada a amostra.

A concentração de soluto no meio não deve alcançar mais de 10 a 15% de sua solubilidade máxima. Para isso é utilizado grande volume de meio de dissolução, que é repostado a cada alíquota retirada. Pode-se dizer então que a concentração de fármaco dissolvido em um tempo t é muito menor que sua solubilidade no meio receptor. Se tal parâmetro é mantido, diz-se que o teste está sendo conduzido sob a *sink condition*, o que

permite a difusão do fármaco através de um gradiente de concentração (GENNARO, 2000).

Foram utilizados como solução receptora 25 mL de tampão fosfato pH 2,5 acrescido de laurilsulfato de sódio 0,15%. O experimento foi conduzido a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e a solução receptora foi mantida em constante agitação a $100 \pm 0,2$ rpm.

As amostras da solução receptora foram coletadas em intervalos de 15 minutos nas primeiras horas e depois a cada 30 minutos. Posteriormente à coleta das alíquotas, o volume retirado foi repostado com meio receptor e foram feitos cálculos para a correção da diluição. Esse procedimento é imprescindível para manter a *sink condition*.

A quantidade de fármaco liberado foi determinada por CLAE utilizando detector UV-Vis operando com comprimento de onda de 410nm

3.2.8. Avaliação *in vivo*.

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso médio de 250g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista, UNESP, em Botucatu. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, e mantidos em condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($55\% \pm 5$) e luz (ciclo 12/12h), receberam alimento e água à vontade.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta faculdade (Protocolo CEP/FCF/CAr n°03/2006).

3.2.9. Protocolo experimental

Os animais foram submetidos a jejum por 8 horas antes da administração das formulações e receberam água à vontade. Os experimentos foram realizados na fase de claro. Utilizou-se um total de 50 animais distribuídos nos seguintes grupos:

- **Grupo I:** animais tratados com 1 mg/kg de D-AmB, i.v. *bolus*, em dose única (n = 10). Neste grupo foram obtidas informações relacionadas ao perfil de disposição cinética da AmB na formulação administrada por via endovenosa.

- **Grupo II:** animais tratados com 50mg/kg de D-AmB, por gavagem, em dose única (n = 20). Neste grupo foram obtidas informações relacionadas aos parâmetros farmacocinéticos da AmB administrada por via oral na formulação convencional e desenvolvimento de dano renal por exposição a esta formulação.

- **Grupo III:** animais tratados com 50mg/kg de AmB na microemulsão, por gavagem, em dose única (n=20). Neste grupo obtiveram-se informações relacionadas aos parâmetros farmacocinéticos da AmB administrada por via oral na formulação microemulsionada e desenvolvimento de dano renal por exposição a esta formulação.

A farmacocinética da AmB foi investigada com base na relação concentração plasmática *versus* tempo, construída a partir de amostras de sangue coletadas nos tempos 30 minutos; 1, 2; 4; 8; 12, 24, 48 e 72 horas. Para cada tempo de coleta foram empregadas 5 replicatas. Os animais tiveram duas coletas de sangue feitas pela cauda e uma através decapitação. Este procedimento está de acordo com o Guia de Boas Práticas de administração de substâncias e coleta de sangue de animais (DIEHL *et al*, 2001).

3.2.10. Avaliação farmacocinética

A disposição cinética da AmB foi avaliada após administração de dose única das formulações em diferentes grupos de animais e pela via *iv* (1 mg/kg) e por gavagem (50 mg/kg). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas concentração plasmática *versus* tempo, construídas a partir de amostras de sangue coletadas nos tempos 30 minutos; 1, 2; 4; 8; 12, 24, 48 e 72 horas.

As meias-vidas e as constantes de velocidade de eliminação foram determinadas pelo modelo bicompartimental, que melhor se adaptou aos dados experimentais. As constantes de velocidade foram calculadas através da equação $0,693/t_{1/2}$ e as meias vidas foram obtidas a partir do método gráfico. As áreas sob as curvas de 0 ao tempo de coleta (ASC^{0-72}) foram calculadas através do método dos trapezóides, e as áreas sob as curvas do tempo 0 ao infinito ($ASC^{0-\infty}$) foram calculadas através da equação 3:

$$ASC^{0-\infty} = ASC^{0-72} + (C_{p_n}/K_{el}) \quad (3)$$

Foi calculada a biodisponibilidade oral da AmB através da comparação das ASC obtidas na administração *iv* e pela via oral das duas formulações, utilizando a equação 4:

$$F_{oral}(\%) = \left(\frac{ASC_{oral}}{ASC_{iv}} \times \frac{Dose_{iv}}{Dose_{oral}} \right) \times 100 \quad (4)$$

As $ASC^{0-\infty}$ foram utilizadas nos cálculos de *clearance* total ($Cl = \text{dose}/ASC$) e do volume de distribuição ($Vd = Cl/\beta$).

3.2.11. Avaliação dos níveis creatinina

Este parâmetro foi utilizado como marcador indireto de danos renais induzidos pelo fármaco aos animais submetidos ao tratamento com AmB por via oral.

A determinação dos níveis de creatinina nas amostras de plasma foi realizada através do método colorimétrico. A creatinina e outros componentes presentes no plasma reagem com picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. Então se adiciona um acidificante que diminui o pH para 5 promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor dos cromógenos, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor verdadeiro de creatinina.

3.2.12. Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados como médias e desvios padrão. A comparação dos parâmetros farmacocinéticos entre os grupos foi realizada através da aplicação do teste *t* de Student para os dados paramétricos e teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Os parâmetros bioquímicos foram comparados pelo teste ANOVA.

Foram empregados os programas SigmaStat e GraphPad Instat[®]. Os cálculos das curvas analíticas e coeficiente de variação (CV%) foram realizados através dos programas Origin[®] e Sigma Plot[®].

4. Resultados e Discussão

4.1. Diagrama de fase

Os diagramas de fase pseudoternários, os quais descrevem em que condições experimentais os componentes devem ser combinados para formar preparações opticamente transparentes é de extrema relevância para a caracterização dos sistemas microemulsionados (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Para as microemulsões estabilizadas com fosfatidilcolina de soja/tween o diagrama de fases pseudoternário descreve uma ampla faixa de possibilidades para a obtenção de regiões em que dominam sistemas transparentes no diagrama de fases onde microemulsões O/A prevalecem (FORMARIZ, 2004).

Os tensoativos usados neste trabalho foram selecionados baseados em estudos prévios de formulações contendo varias proporções FS/Tw que resultaram em diferentes valores de EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) (WARGAFTIG, 2001). O EHL descreve a atração simultânea da mistura de tensoativos pela fase oleosa e aquosa. Esta condição favorece a diminuição da energia livre do sistema. Quando FS e Tw são incorporados a uma combinação de óleo e tampão as moléculas de tensoativo podem estar localizadas na interface óleo-água, o que é termodinamicamente favorável à estabilização do sistema. A proporção FS/Tw 1:1 (p/p) foi estabelecida a fim de se obter valor de EHL que resultasse em um sistema transparente utilizando Captex[®] como fase oleosa (WARGAFTIG, 2001).

Para os sistemas contendo ou não AmB as regiões de domínio obtidas para as microemulsões O/A foram muito similares (Figura 5). Nesta região, particularmente de interesse para as formulações de microemulsões, as formulações foram selecionadas visando obter sistemas óleo em água. Embora os diagramas de fase descritos na Figura 5

estejam ilustrados apenas com a intenção de descrever a região utilizada neste estudo, os resultados obtidos são muito interessantes e demonstram que as MEs existem em condições de diluição infinita com fase aquosa. Os pontos A até D destacados na Figura 5 representam as composições específicas das formulações variando-se a proporção de fase oleosa e os pontos E até G representam as variações da proporção de tensoativo.

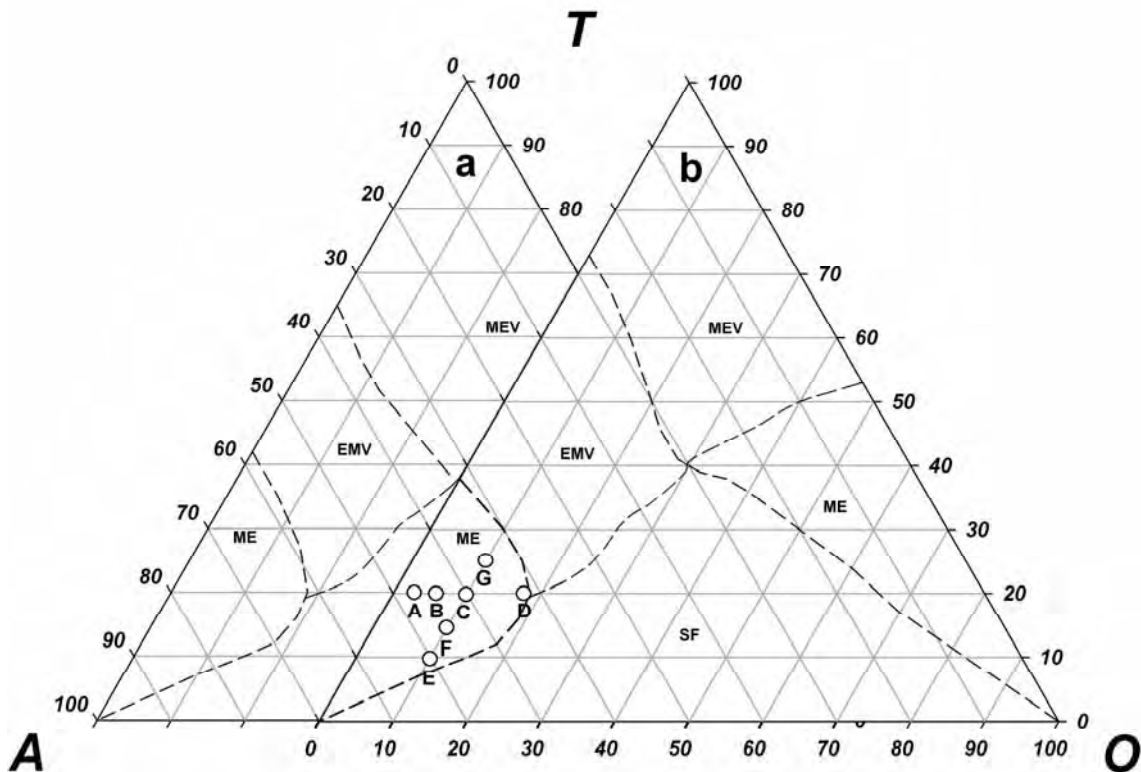


Figura 5: Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo FS/Tw (**T**), CaptexTM (**O**) e sistema tampão (**A**). Legenda: (**a**) Microemulsão vazia (**b**) Microemulsão carregada com AmB; (**ME**) microemulsão; (**MEV**) Microemulsão viscosa (**EM**) emulsão; (**EMV**) Emulsão viscosa (**O**) composições específicas das ME's estudadas, 25 °C.

Os dados da Figura 5 mostram que é possível adicionar grande volume de fase aquosa e limitado volume de fase oleosa mantendo a estabilidade termodinâmica dos sistemas O/A. Para as microemulsões contendo ou não AmB regiões de microemulsão

O/A foram verificadas no diagrama de fases dentro dos limites de 20% de fase oleosa, sendo que após esse limite os sistemas ficavam opacos, apresentando regiões de transição para as emulsões convencionais. Transições distintas de emulsão (EM) para microemulsão (ME) puderam ser observadas. Na presença de AmB a área de ME começou a aparecer com aproximadamente 60% de fase aquosa (Figura 5). Na ausência de AmB a área de EM foi menor que na presença do fármaco (Figura 5a-b). Dependendo do conteúdo de fase oleosa um mínimo de 25% de fase aquosa foi necessário para formar as emulsões convencionais. Na presença de AmB, microemulsões com alto conteúdo de fase oleosa foram identificadas na região com proporção de 0–25% de fase aquosa e na ausência de AmB na faixa de 0–35%. Para ambos os diagramas de fases (com e sem AmB) as ME A/O permitiram a diluição infinita com fase oleosa mantendo a estabilidade termodinâmica do sistema (Figura 5).

Sistemas microemulsionados convergem para os dois vértices dos diagramas pseudoternários onde predominam as fases aquosa e oleosa, respectivamente, (Figura 5) separadas por uma região de transição opaca com microestrutura interna diferente, mas que pode ser transformada em microemulsão A/O ou O/A, dependendo da proporção entre as fases aquosa e oleosa. Assim, quando a proporção de fase oleosa foi aumentada o sistema tornou-se opaco, indicando a mudança na microestrutura interna. De fato, as medidas reológicas mostraram que quando a fase oleosa aumentou e a proporção de tensoativo diminuiu a viscosidade aparente dos sistemas aumentou, permitindo a formação de sistemas líquidos mais organizados. A região restante do diagrama de fases representado por sistemas opacos envolve emulsões convencionais (EM). Além disso, foi verificado que na região de interesse dos diagramas de fases, a qual representa ME A/O, com alto conteúdo de fase aquosa, a incorporação da AmB não alterou

significativamente a região de ME A/O no diagrama de fases (Figura 5). Os sistemas permaneceram isotrópicos, opticamente transparentes e, após centrifugação a 8.500 (xg) por 15 minutos nenhuma sedimentação ou separação de fases ocorreu. Assim, a estabilização dos sistemas contendo FC/Tw proporcionou condições próprias para a redução da tensão interfacial permitindo a formação de fase interna com o menor diâmetro possível, para a obtenção de sistemas opticamente transparentes (KEGEL *et al.*, 1999; LINDMAN & FRIBERG, 1999)

Embora não tenha sido representada nos diagramas de fase, a presença de sistemas do emulsionados com alta viscosidade, em altas proporções de tensoativo e pequenas proporções de fases aquosa e oleosa, muito provavelmente é devido às propriedades da fosfatidilcolina, a qual possui valor de EHL próximo de 4, sendo capaz de gelificar quando absorve pequenas proporções de água (CORNELL *et al.*, 1986; TROTTA, 1999; TROTTA *et al.*, 2002). Dessa forma com aumento na proporção de fase oleosa pode-se observar aumento significativo da viscosidade. O diagrama de fases descrito na Figura 5 fundamentou a seleção dos alguns sistemas de interesse para caracterização físico-química (Tabela 2).

Tabela2: Composição das MEs selecionadas para a sequência do trabalho.

Fórmula	Fase aquosa (% m/m)	Fase oleosa (% m/m)	Tensoativo (%m/m)
A	77	3	20
B	74	6	20
C	70	10	20
D	63	17	20
E	80	10	10
F	75	10	15
C	70	10	20
G	65	10	25

As formulações selecionadas foram divididas em dois grupos: no primeiro, a proporção de tensoativo foi mantida constante em 20%, variando-se a fase oleosa de 3 a 17% (A-D) e, no segundo grupo, a fase oleosa foi mantida em 10%, variando-se o tensoativo de 10 a 25% (E-G).

Com a caracterização desses sistemas é possível avaliar o efeito da fase oleosa e do tensoativo nas características físico-químicas do sistema e sua influência no perfil de liberação do fármaco.

4.2. Caracterização físico-química das MEs

Devido à grande variedade de estruturas, a caracterização de sistemas destes tipos é uma tarefa difícil e, por essa razão, muitas técnicas vêm sendo desenvolvidas com esta finalidade. Em geral, utiliza-se uma combinação destas técnicas para obter-se uma caracterização mais precisa. Entre estas, as técnicas de espalhamento de luz são de ampla utilização e compreendem, principalmente, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

4.2.1. Determinação do raio hidrodinâmico das gotículas por espalhamento dinâmico de luz.

O raio hidrodinâmico (r_h) das gotículas foi medido utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz. Esta técnica fornece o raio hidrodinâmico de partículas coloidais, através da variação do espalhamento de luz causado pelo movimento Browniano das gotículas

Como o coeficiente de difusão diminui quando r_h aumenta, é necessário realizar diluições das amostras a fim de que a concentração das gotículas não interfira na difusão. Deve-se dar atenção especial para a temperatura e viscosidade, uma vez que pequena variação desses parâmetros pode levar a erros nas determinações de tamanho (ABOFAZELI *et al.*, 2000).

A técnica consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, geralmente He-Ne 532 nm, de modo que as gotículas presentes no meio espalhem a luz. A luz espalhada é captada por um sinal que é enviado ao correlator, no qual se dá o processamento dos dados. Estes são enviados para um software que realiza os cálculos fornecendo os valores de tamanho médio e índice de polidispersidade, entre outros.

A intensidade da luz espalhada é medida em diferentes ângulos sendo que, devido ao movimento Browniano das partículas, o espalhamento ocorre em várias direções (GRASSI, 2006).

A determinação de tamanho das gotículas foi realizada para as amostras descritas na Tabela 3 e o ensaio foi realizado em triplicata.

Tabela 3: Raio hidrodinâmico das gotículas

Formulação	Raio Hidrodinâmico das Gotículas (ηm)			
	Ausência da AmB		Presença da AmB	
	Média	DP	Média	DP
A (77% A; 3% O; 20% T)	37,7	0,2	141,6	7,4
B (74% A; 6% O; 20% T)	41,8	0,2	157,5	4,4
C (70% A; 10% O; 20% T)	42,5	0,1	161,7	10,0
D (63% A; 17% O; 20% T)	62,0	0,7	165,0	2,9
E (80% A; 10% O; 10% T)	68,3	0,4	205,7	5,4
F (75% A; 10% O; 15% T)	46,4	0,2	186,7	8,8
C (70% A; 10% O; 20% T)	42,5	0,1	161,7	10,0
G (65% A; 10% O; 25% T)	34,1	0,2	81,9	1,6

A Figura 6 mostra a relação entre o raio das gotículas e a porcentagem de fase oleosa na presença e na ausência da AmB.

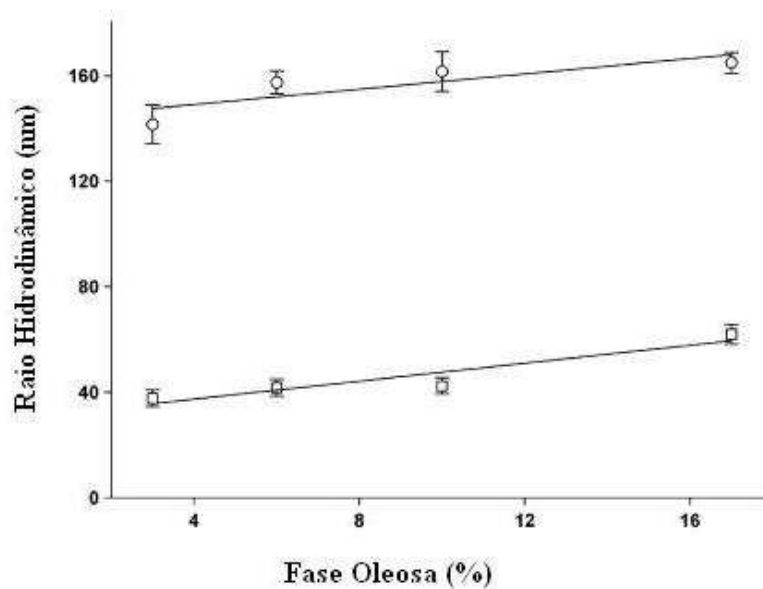


Figura 6. Variação do raio hidrodinâmico das gotículas em função da porcentagem de fase oleosa na presença e ausência de AmB.

Na ausência de AmB, o raio hidrodinâmico não apresentou aumento significativo com a concentração de fase oleosa, sugerindo um aumento no número de gotículas dispersas por unidade de volume. Este fato demonstra que a proporção de tensoativo presente é suficiente para estabilizar a energia remanescente da interface, criada com o aumento da área interfacial durante a divisão das gotículas da fase interna oleosa. Por outro lado, quando o fármaco foi adicionado ao sistema, houve um aumento de cerca de quatro vezes do raio hidrodinâmico, devido ao comprimento da cadeia carbônica da molécula de AmB, a qual particiona na interface óleo-água aumentando o volume local das gotículas. No entanto, entre as amostras incorporadas com AmB, o raio hidrodinâmico não apresentou diferença significativa com o aumento da concentração de fase oleosa, o que sugere igual eficiência do tensoativo na estabilização das gotículas na presença do fármaco.

A Figura 7 mostra a variação do raio hidrodinâmico das gotículas de fase interna em função da porcentagem de tensoativo, na presença e ausência da AmB.

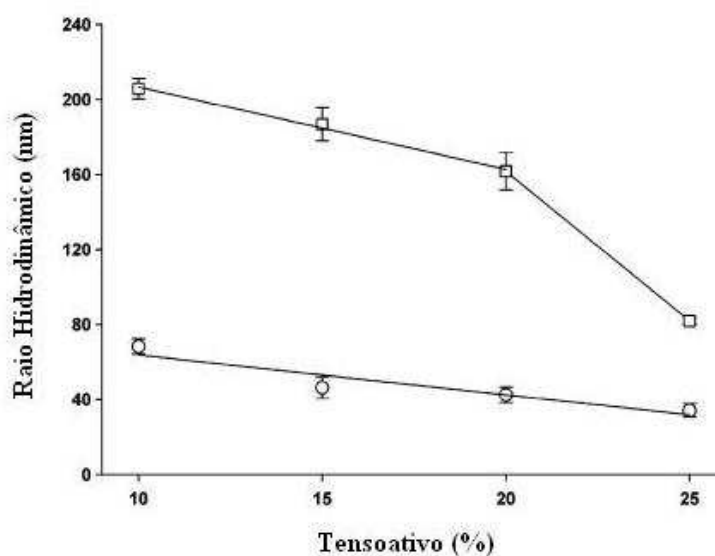


Figura 7. Variação do raio hidrodinâmico das gotículas em função da porcentagem de tensoativo na presença e ausência de AmB.

Pode-se observar que tanto na ausência como na presença de AmB o raio hidrodinâmico das gotículas diminui com o aumento da porcentagem de tensoativo. Um dos fatores importantes na definição das dimensões finais das gotículas de fase interna oleosa da microemulsão é a proporção de tensoativo na formulação. O aumento da concentração de tensoativo deve reduzir o diâmetro das gotículas para valores mínimos, os quais dependem da capacidade das moléculas do tensoativo em particionar favoravelmente na interface óleo-água reduzindo a tensão interfacial na mesma proporção. Desta forma, pode-se afirmar que quanto maior o grau de redução da tensão interfacial, menor é o diâmetro das gotículas (NIRAULA *et al.*, 2004).

4.2.2. Comportamento reológico

Reologia é o termo formalmente introduzido por Bingham em 1929 para designar o estudo do fluxo e deformação de materiais. Refere-se ao comportamento macroscópico de um material sob fluxo ou deformação e determina suas propriedades não-lineares. O estudo reológico visa estabelecer relação entre o processo microestrutural e o comportamento macroscópico (GRASSI *et al.*, 2006). Consiste no estudo do escoamento ou deformação do material quando submetido a uma tensão. O método é aplicável na caracterização de sistemas microemulsionados, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema (interações entre seus componentes). Também permite avaliar o efeito de aditivos na formulação (SCOTT, 2000; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Na área farmacêutica as medições reológicas são usadas para caracterizar a facilidade com que o material esco de um frasco, o bombeamento de um produto do equipamento em um processo industrial, o espalhamento de um creme ou loção sobre a

pele e a passagem do produto pelo orifício de uma agulha (GENNARO, 2000; WOOD, 2001; ALMEIDA e BAHIA, 2003).

A correlação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento que define o comportamento de fluxo de um líquido é mostrada graficamente em diagramas chamados de curvas de fluxo. Os diferentes tipos de curva de fluxo têm seus correspondentes tipos de curva de viscosidade. As curvas de fluxo representam duas partes do experimento, a curva ascendente que indica o aumento da taxa de cisalhamento, e a curva descendente, quando a taxa de cisalhamento é reduzida continuamente (SCHRAMM, 2006).

A curva ascendente representa o comportamento do fluxo, que pode ser newtoniano, pseudoplástico, plástico e dilatante.

O fluxo newtoniano é representado por uma reta, e a razão de todos os pares de valores de tensão e taxa de cisalhamento pertencentes a essa reta é constante. Isso significa que a viscosidade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento, já que ela é determinada pela tangente do ângulo α .

O fluxo é pseudoplástico quando o sistema sofre diminuição de viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. Esse aumento favorece a reorientação das partículas rígidas na direção do fluxo, e as interações intermoleculares que causam resistência ao fluxo tornam-se menores, provocando o afinamento do fluxo, conhecido por *shear thinning*.

O fluxo plástico é descrito como os pseudoplásticos, mas com limite de escoamento, e na curva intercepta a ordenada não na origem, mas no ponto crítico (*yield point*).

O comportamento de fluxo dilatante é caracterizado pelo aumento da viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta (SCHRAMM, 2006).

A partir da curva descendente obtemos informações quanto à tixotropia do sistema. Um líquido tixotrópico é definido pelo seu potencial de ter uma estrutura reversível, sempre que a amostra for mantida em repouso, e essa mudança deve ser reprodutível diversas vezes. A reconstrução pode ser tempo independente quando as curvas de ida e de volta se sobrepõem, indicando que o sistema reverte rapidamente para sua estrutura original. Será tempo dependente quando a viscosidade aumenta mais lentamente do que diminuiu inicialmente com o *shear thinning*, e entre as duas curvas forma uma área de histerese, que define a magnitude da tixotropia. Essa área indica a energia necessária para quebrar a estrutura tixotrópica. Graficamente, a histerese da curva de fluxo gira no sentido horário (SCHRAMM, 2006).

O comportamento reológico dos sistemas em estudo foi avaliado utilizando ensaios de escoamento.

A Figura 8 mostra a influência da proporção da fase oleosa sobre o comportamento reológico das MEs estabilizadas com 20% de tensoativo, FS/Tw 1:1, na ausência do fármaco. Em todas as proporções de fase oleosa estudadas, as curvas ascendentes (símbolos cheios) mostraram comportamento Newtoniano, pois a tensão de cisalhamento foi diretamente proporcional ao gradiente de cisalhamento. Estes resultados sugerem que as gotículas presentes no sistema não apresentam interações com as vizinhanças, ou seja, se encontram isoladas uma das outras. Estes aspectos estruturais são independentes da porcentagem de fase oleosa estudada.

MEs apresentam comportamento Newtoniano, isto significa que a viscosidade é constante em função da tensão de cisalhamento.

Para os sistemas preparados com proporções de fase oleosa acima de 10%, entretanto, o reograma revela a presença de um laço de histerese entre as curvas ascendente (símbolos cheios) e descendente (símbolos vazios) típica de sistemas com comportamento anti-tixotrópico, que é mais pronunciado na ME com 17% de fase oleosa.

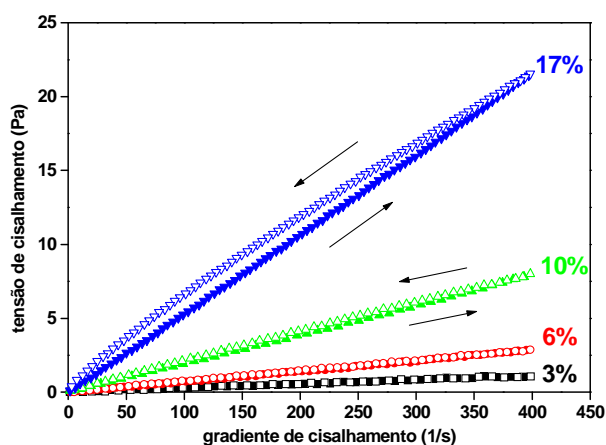


Figura 8: Perfil reológico das MEs em função da proporção de fase oleosa, na ausência de AmB. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos cheios e vazios.

O comportamento reológico das MEs na presença do fármaco em função da porcentagem de fase oleosa também foi avaliado. A Figura 9 mostra a relação da tensão de cisalhamento e gradiente de cisalhamento na presença da AmB em função da porcentagem de fase oleosa. Observam-se aspectos estruturais idênticos às formulações na ausência do fármaco: comportamento Newtoniano apresentando anti-tixotropia a partir de 10% de fase oleosa. Estes resultados revelam que a incorporação do fármaco ao sistema não induz nenhuma interação entre as gotículas e o cisalhamento promove a

formação de novas estruturas o que favorece o aumento da viscosidade quando o gradiente de cisalhamento diminui.

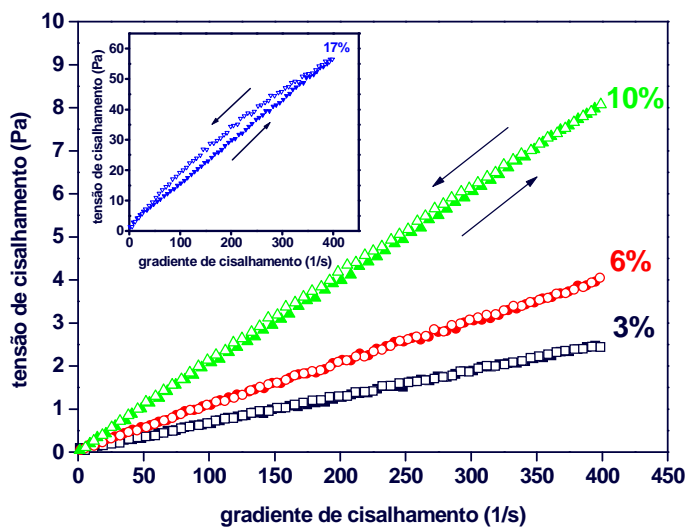


Figura 9: Perfil reológico das MEs na presença da AmB, variando a porcentagem de fase oleosa. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos cheios e vazios. Para uma melhor visualização, a formulação com 17% de fase oleosa foi mostrada separadamente.

As Figuras 10 e 11 mostram o efeito da porcentagem de tensoativo sobre o comportamento reológico dos sistemas na ausência e presença da AmB, respectivamente. Observou-se comportamento semelhante aos resultados do estudo do efeito da fase oleosa, ou seja, comportamento Newtoniano com caráter anti-tixotrópico, sugerindo que as gotículas presentes no sistema não apresentam interações com as vizinhanças. Aumentando a porcentagem de tensoativo observou-se o aparecimento de um laço de histerese entre as curvas ascendente e descendente, nas proporções de tensoativo acima de 20%, revelando a influência do tensoativo sobre as propriedades reológicas dos sistemas.

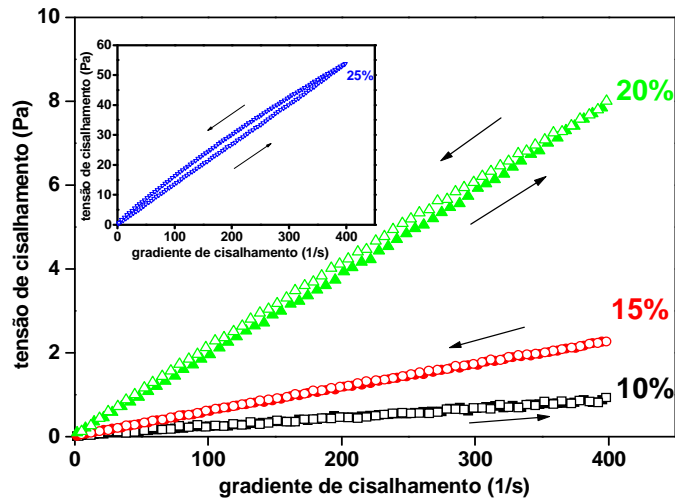


Figura 10: Perfil reológico das MEs variando a porcentagem de tensoativo na ausência da AmB. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos cheios e vazios. Para uma melhor visualização, a formulação com 25% de fase oleosa foi apresentada separadamente.

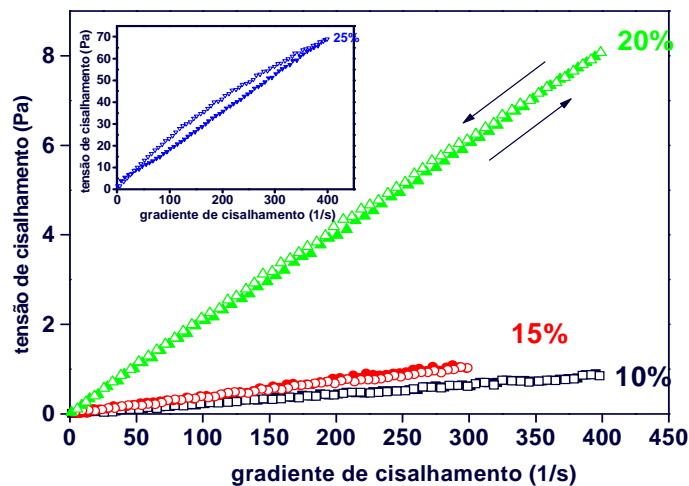


Figura 11: Perfil reológico das MEs na presença da AmB, variando a porcentagem de fase oleosa. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos cheios e vazios. Para uma melhor visualização, a formulação com 25% de fase oleosa foi apresentada separadamente.

Com base nos dados obtidos no estudo reológico e utilizando um modelo de lei de potência (equação 5), calculou-se o valor de n para caracterizar o comportamento de fluxo (Newtoniano, pseudoplástico, plástico ou dilatante) e k (índice de consistência) para caracterizar a viscosidade do material.

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (5)$$

em que τ é a tensão de cisalhamento em Pa, k é o índice de consistência, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento em s^{-1} e n é o índice de comportamento.

Para todas as formulações, na presença e ausência do fármaco, os valores de n são bem próximos de 1 e estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, confirmando o comportamento Newtoniano das amostras.

TABELA 4. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações preparadas com proporções fixas de tensoativo e crescentes de fase oleosa na presença e ausência da AmB.

ME	Fase Oleosa (%)	Sem AmB		Com AmB	
		K	n	K	n
A	3	0,0027	1	0,00871	0,94
B	6	0,0059	1,03	0,015	0,93
C	10	0,02	1,02	0,02	1
D	17	0,05	1,02	0,223	0,92

TABELA 5. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações preparadas com concentrações fixas de fase oleosa crescentes de tensoativo na presença e ausência da AmB.

ME	Tensoativo %	Sem AmB		Com AmB	
		K	n	K	n
E	10	0,0037	0,91	0,00291	0,95
F	15	0,007	0,96	0,00525	0,94
C	20	0,02	1,02	0,02	1
G	25	0,14	1	0,234	0,95

A Figura 12 apresenta o índice de consistência (K) para as MEs na presença e ausência do fármaco em função da porcentagem de fase oleosa.

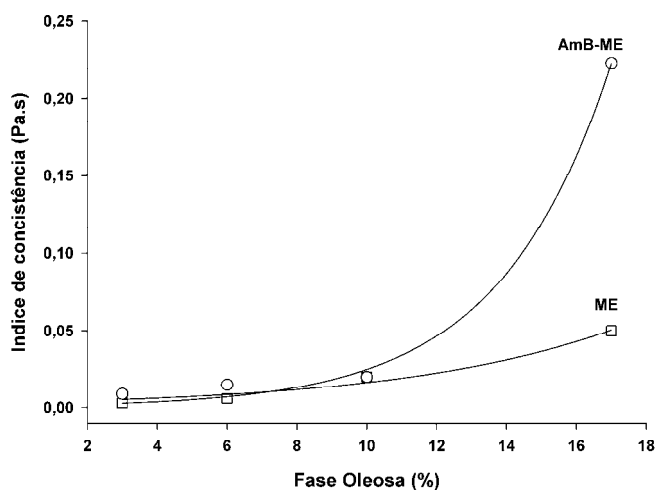


Figura 12. Índice de consistência (K) para MEs na presença e ausência do fármaco em função da porcentagem de fase oleosa.

A figura12 mostra que os valores de K aumentam com a porcentagem de fase oleosa, cerca de 18 vezes (de 0,0027 para 0,05 Pa.s) na ausência da AmB e cerca de 25 vezes (de 0,009 para 0,23 Pa.s) em sua presença. A incorporação do fármaco não alterou significativamente a viscosidade do sistema, exceto para a proporção maior de fase oleosa (17%) em que a viscosidade da formulação acrescida de AmB foi maior.

Tipicamente, a viscosidade de sistemas óleo-água aumenta com a fração de volume de fase interna. Esse comportamento pode ser descrito por modelos teóricos baseados na hipótese de esferas rígidas dispersas em que o diâmetro considera também a presença da camada de tensoativo ao redor do núcleo oleoso. De fato, a fase dispersa ocupa um volume maior que o volume real da fase oleosa (GRASSI, 2006).

A Figura 13 relaciona o índice de consistência (K) com a proporção de tensoativos para as MEs na presença e ausência da AmB

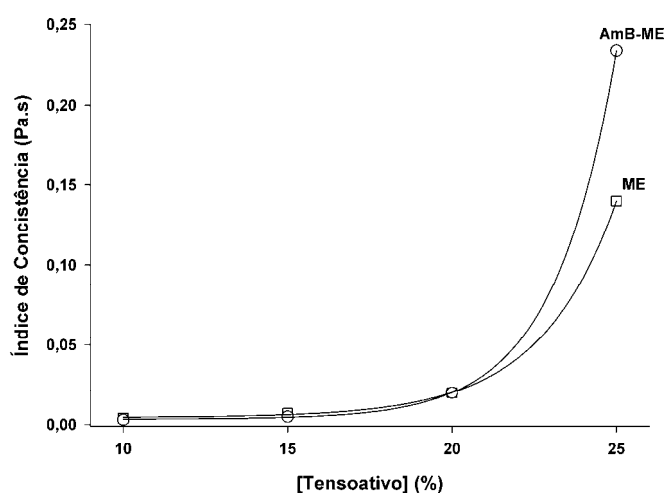


Figura 13. Índice de consistência (K) para MEs na presença e ausência do fármaco em função da porcentagem de tensoativo.

A Figura 13 mostra que os valores de K aumentam com a porcentagem de tensoativo, além disso, um comportamento interessante é observado: os sistemas apresentam viscosidade semelhante na presença e ausência da AmB. Este fenômeno ocorre com até 20% de tensoativo; acima desta proporção, a viscosidade com AmB é muito maior, o que sugere que o fármaco promove aumento da distância entre as monocamadas, reduzindo o volume da fase interna, o que altera a viscosidade do sistema.

É sabido que a fração volumétrica da fase dispersa (Φ) e o diâmetro das gotículas podem exercer forte influência sobre a viscosidade das emulsões (PAL, 2000). PAL (2000) sugere que, para valores reduzidos de volume de fase ($\Phi < 0,6$), estes sistemas exibem comportamento Newtoniano e com isto o tamanho das gotículas não exerce influência sobre sua viscosidade. Entretanto, para $\Phi > 0,6$ as emulsões apresentam “shear thinning”, ou seja, “afinamento” com o cisalhamento. Com isto, a viscosidade nestas condições é fortemente influenciada pelo tamanho das gotículas.

A Tabela 6 mostra os valores calculados de volume de fase interna das MEs.

Tabela 6: Volume de fase interna das MEs

Fórmula	Fase aquosa (% m/m)	Fase oleosa (% m/m)	Tensoativo (%m/m)	Volume de fase interna
A	77	3	20	0,233
B	74	6	20	0,270
C	70	10	20	0,323
D	63	17	20	0,413
E	80	10	10	0,212
F	75	10	15	0,261
C	70	10	20	0,323
G	65	10	25	0,420

No caso das formulações estudadas neste trabalho, Φ varia entre 0,2 a 0,4 (Tabela 5). A fase aquosa (externa, dispersante) é predominante em relação à fase oleosa (interna, dispersa), determinando que as gotículas formadas sejam “diluídas” no meio dispersante, sem haver interações significativas com a vizinhança, justificando assim o comportamento Newtoniano observado.

4.2.3. Microscopia de luz polarizada

As características estruturais de cada sistema foram analisadas através de medidas ópticas. Uma maneira de classificar os sistemas é através da determinação da isotropia óptica através da técnica de microscopia de luz polarizada. Sob um plano de luz polarizada a amostra é considerada anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. (NORLING *et al.*, 1992; BRINON *et al.*, 1999; HYDE, 2001).

Materiais isotrópicos (não desviam a luz polarizada) e anisotrópicos (desviam a luz polarizada) podem ser distinguidos através da técnica de microscopia de luz polarizada. As propriedades ópticas dos materiais anisotrópicos podem ser usadas para revelar informações sobre a estrutura e composição dos materiais. Assim, os materiais isotrópicos devem ter apenas um índice de refração e não restringir a direção da vibração de luz que passa através deles e exibem a mesma propriedade óptica em todas as direções. Por outro lado, materiais anisotrópicos devem ter propriedades ópticas que se alteram com a orientação da luz incidente, apresentando índices de refração dependendo da direção de propagação da luz através da substância e a da orientação do plano de vibração (FORMARIZ *et al.*, 2007).

A Figura 14 mostra as fotomicrografias das fórmulas contendo proporções crescentes de fase oleosa e proporção fixa de tensoativo. Os resultados mostram a presença de “Cruzes de Malta”, sugerindo a existência de estruturas lamelares.

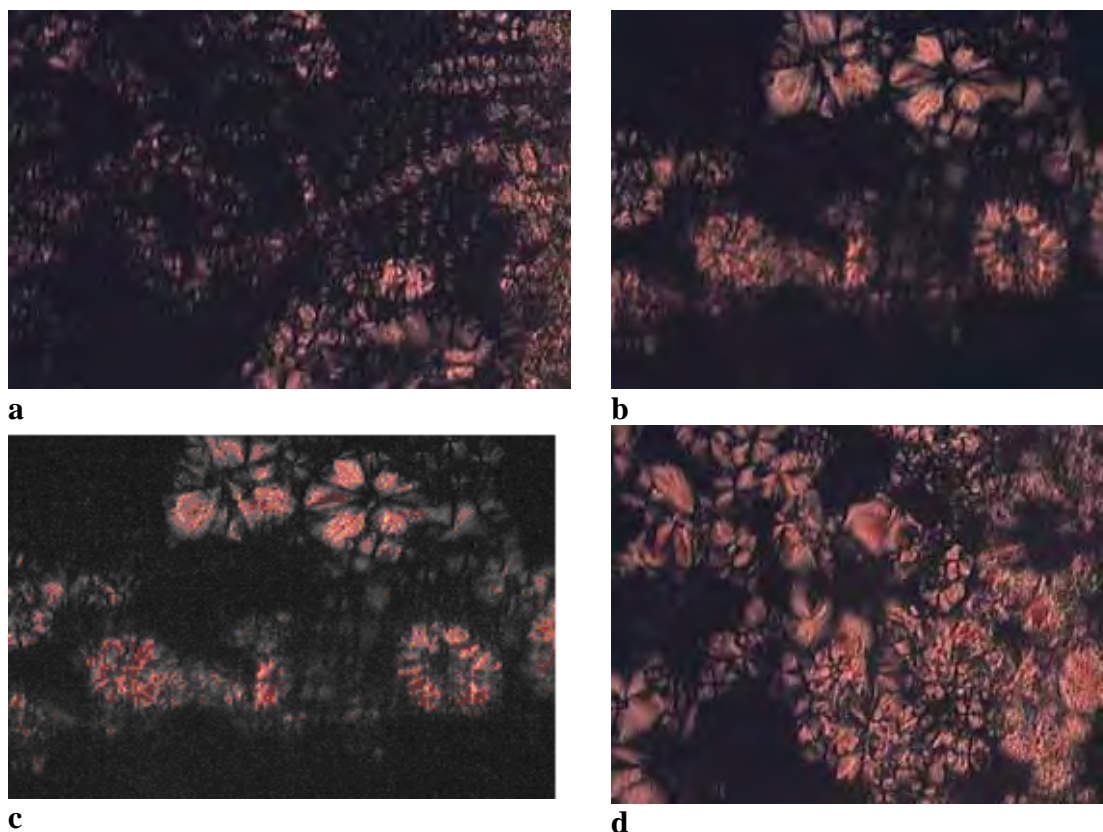


Figura 14. Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (**a**:3%; **b**:6%; **c**:10%; **d**:17%), mantendo-se o tensoativo em 20% m/m.

Os resultados da microscopia de luz polarizada apresentados na Figura 14 indicaram que o aumento na proporção de fase oleosa promove aumento na organização estrutural do sistema. Estes dados estão de acordo com o estudo reológico que mostra um aumento do índice de consistência das formulações com o aumento da proporção de fase oleosa, como resultado da estruturação interna.

A Figura 15 apresenta fotomicrografias dos sistemas contendo proporções crescentes de tensoativo e fase oleosa em proporção fixa (10%). Observa-se que as formulações com maiores porcentagens de tensoativo apresentam maior organização estrutural, que está de acordo com o aumento do índice de consistência apresentado no estudo reológico.

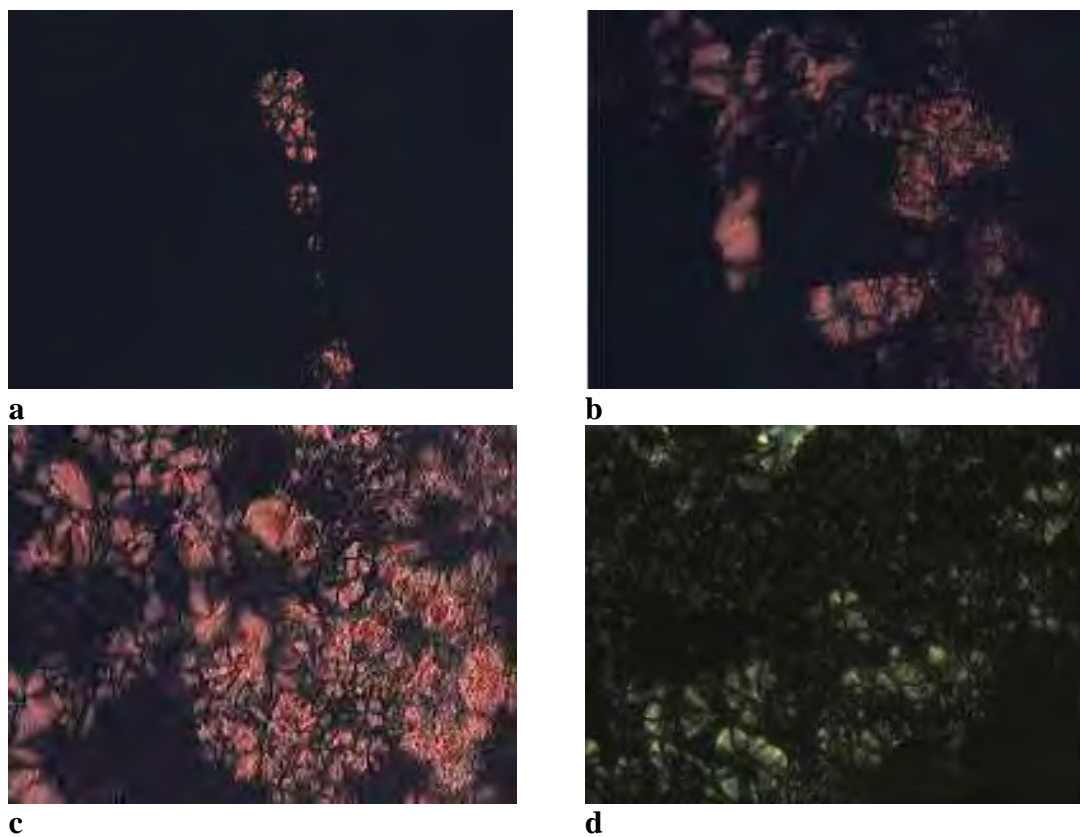


Figura 15. Fotomicrografia dos sistemas preparados com porcentagem crescente de tensoativo (**a**:10%; **b**:15%;**c**:20%; **d**:25%) e de fase oleosa fixa (10% m/m).

A Figura 16 (a e b) apresenta fotomicrografias dos sistemas contendo 20% de tensoativo e 10% de fase oleosa na ausência e presença da AmB, respectivamente.

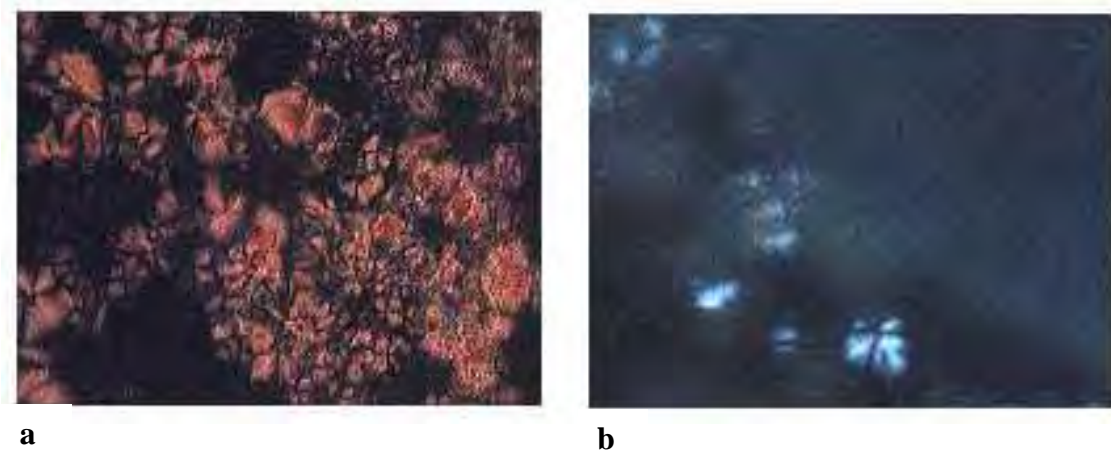


Figura 16. Fotomicrografia dos sistemas estabilizados por 20% FS:TW (1:1) 10% de fase oleosa (a) ausência do fármaco e (b) presença do fármaco.

A fotomicrografia do sistema após incorporação do fármaco mostra que ocorreu diminuição significativa no grau de organização do sistema. Isto pode ser resultado da incorporação da molécula de AmB entre as lamelas, devido ao seu caráter anfifílico, promovendo um aumento da distância entre elas.

As amostras foram analisadas em microscópio de luz polarizada antes e após o estudo reológico.

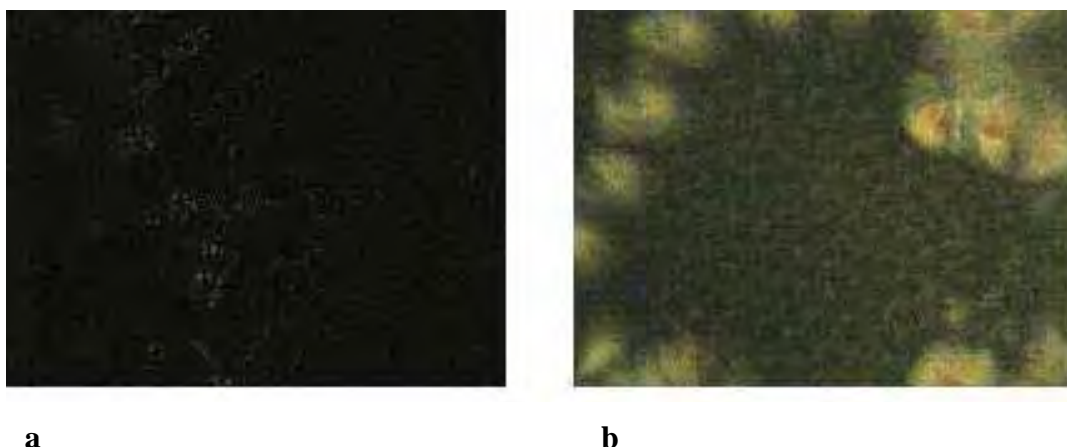


Figura 17. Fotomicrografia das MEs estabilizadas por 25% FS:TW (1:1) 10% de fase oleosa (a) antes da aplicação da tensão de cisalhamento e (b) após aplicação da tensão de cisalhamento.

A fotomicrografia apresentada na Figura 17 indica mudanças estruturais provocadas pela aplicação de tensão, evidenciadas pelo aumento significativo das “cruzes de malta”, como anteriormente sugerido pelos resultados de reologia que mostravam um laço de histerese na curvas descendentes característico de comportamento anti-tixotrópico.

4.2.4. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Modificações na composição dos sistemas podem promover mudanças estruturais e, conseqüentemente, podem restringir a mobilidade das moléculas dissolvidas no sistema. Sabe-se que as MEs são sistemas menos ordenados com baixa viscosidade, enquanto que sistemas mais ordenados, como fase lamelar, hexagonal e cúbica apresentam propriedades elásticas de sólidos. A mobilidade das moléculas é maior em líquidos do que em sólidos, e as modificações estruturais podem alterar o perfil de liberação de fármacos (FORMARIZ et al, 2007).

A mistura de óleo, água e tensoativo é capaz de formar uma grande variedade de estruturas, incluindo as estruturas não cristalinas, como microemulsões e emulsões e estruturas cristalinas, como fases lamelares, cúbicas e hexagonais (HYDE, 2001; KREILGAARD, 2002). A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) tem sido utilizada para a obtenção de informação sobre a estrutura tridimensional de sistemas. As medidas de SAXS associadas à microscopia de luz polarizada permitem estudar as fases formadas resultantes das diferentes proporções de tensoativo e fase oleosa.

Ao irradiar uma amostra bifásica numa plaqueta relativamente fina, com um feixe de luz monocromático (luz visível, raios X, nêutrons, elétrons), observa-se o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. O espalhamento de raios X deve-se às heterogeneidades na densidade eletrônica das estruturas do sistema. Considerando uma partícula de tamanho e forma qualquer, a intensidade espalhada $I(q)$ é proporcional ao fator de forma $P(q)$ desta partícula, em que q é o vetor de espalhamento (GLATTER, 1982).

Num sistema diluído, em que as partículas são isoladas uma das outras e não interagem entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$ (GUINIER, 1964). Sistemas formados pela associação de água, óleo, estabilizados com quantidades de tensoativo abaixo da concentração micelar crítica (CMC) requerida, a intensidade obtida pelo SAXS pode ser similar à observada em partículas diluídas ou monodispersas. A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que, para n partículas distribuídas ao acaso têm-se:

$$I(q) \propto \sum_n P_n(q) \quad (6)$$

Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si, e o espalhamento medido refletirá sua geometria e arranjo. Em sistemas cuja concentração de tensoativo é superior à CMC, as interações entre as moléculas de tensoativo começam a ocorrer em diferentes graus de organização. O padrão de espalhamento poderá então ser similar ao observado em partículas dispersas numa matriz homogênea (GLATTER, 1982). Para N partículas idênticas, distribuídas ao acaso, a intensidade espalhada é descrita pela Equação 7, em que $S(q)$ é o fator de estrutura do conjunto:

$$I(q) = N \cdot P(q) \cdot S(q) \quad (7)$$

Entretanto $S(q)$ pode assumir formas muito variadas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras, e será difícil separar as contribuições de $P(q)$ e $S(q)$. Ainda, pode-se deduzir uma distância média d , entre duas gotículas ou planos vizinhos, a partir do valor da posição do vetor de espalhamento quando a intensidade é máxima ($q_{\text{máx}}$), empregando a relação:

$$d = \frac{2\pi}{q_{\text{máx}}} \quad (8)$$

Em sistemas do tipo micelas e MEs, as curvas de SAXS apresentam uma banda ou pico amplo, associado com a baixa correlação espacial 3D (BEAUCAGE *et al.*, 1995).

Já sistemas cristalinos com orientação aleatória também podem agregar formando domínios exibindo estruturas uni, bi e tridimensionais. A intensidade $I(q)$ produzida exibe forma máxima (ou picos de Bragg) para valores específicos do vetor de espalhamento q . Se a curva de espalhamento contiver vários picos, suas posições no eixo q revelam o tipo de estrutura cristalina, e permite calcular parâmetros estruturais (BEAUCAGE *et al.*, 1995).

A estrutura hexagonal, lamelar e cúbica de cristais líquidos liotrópicos pode ser verificada de acordo com a posição dos picos de difração no eixo do vetor de espalhamento q . Para estruturas lamelares, a posição relativa dos picos (em relação ao primeiro pico mais intenso) geralmente obedece à relação $1 \div 2 \div 3 \dots$, enquanto que, para estruturas hexagonais a relação esperada é $1 \div 3 \div 2 \div 7 \dots$ (HOLMQVIST; ALEXANDRIDIS; LINDMAN, 1997). O parâmetro espacial d da Equação 7 para estruturas lamelares mede a distância entre duas lamelas adjacentes, e para estruturas hexagonais mede a distância entre o centro de dois cilindros (Figura 18).

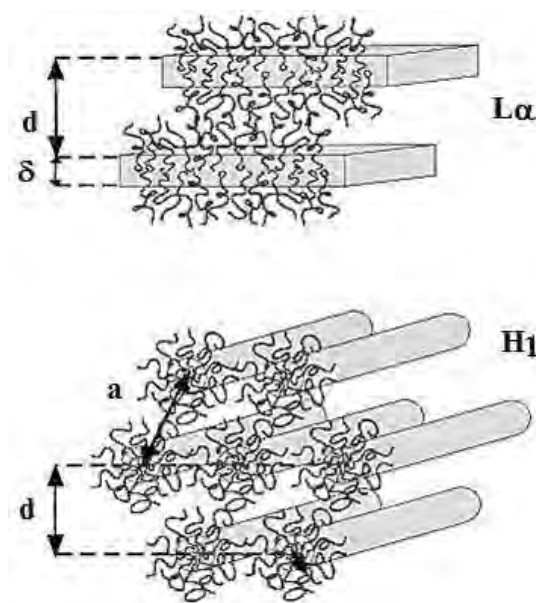


Figura 18: Representação esquemática da auto-organização de tensoativos em estruturas lamelares e hexagonais (HOLMQVIST *et al.*, 1997).

Para uma análise mais criteriosa dos sistemas selecionados foi realizado um estudo de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). As Figuras 19 e 20 mostram as curvas das intensidades de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) das formulações selecionadas e apresentadas, anteriormente, na Tabela 1.

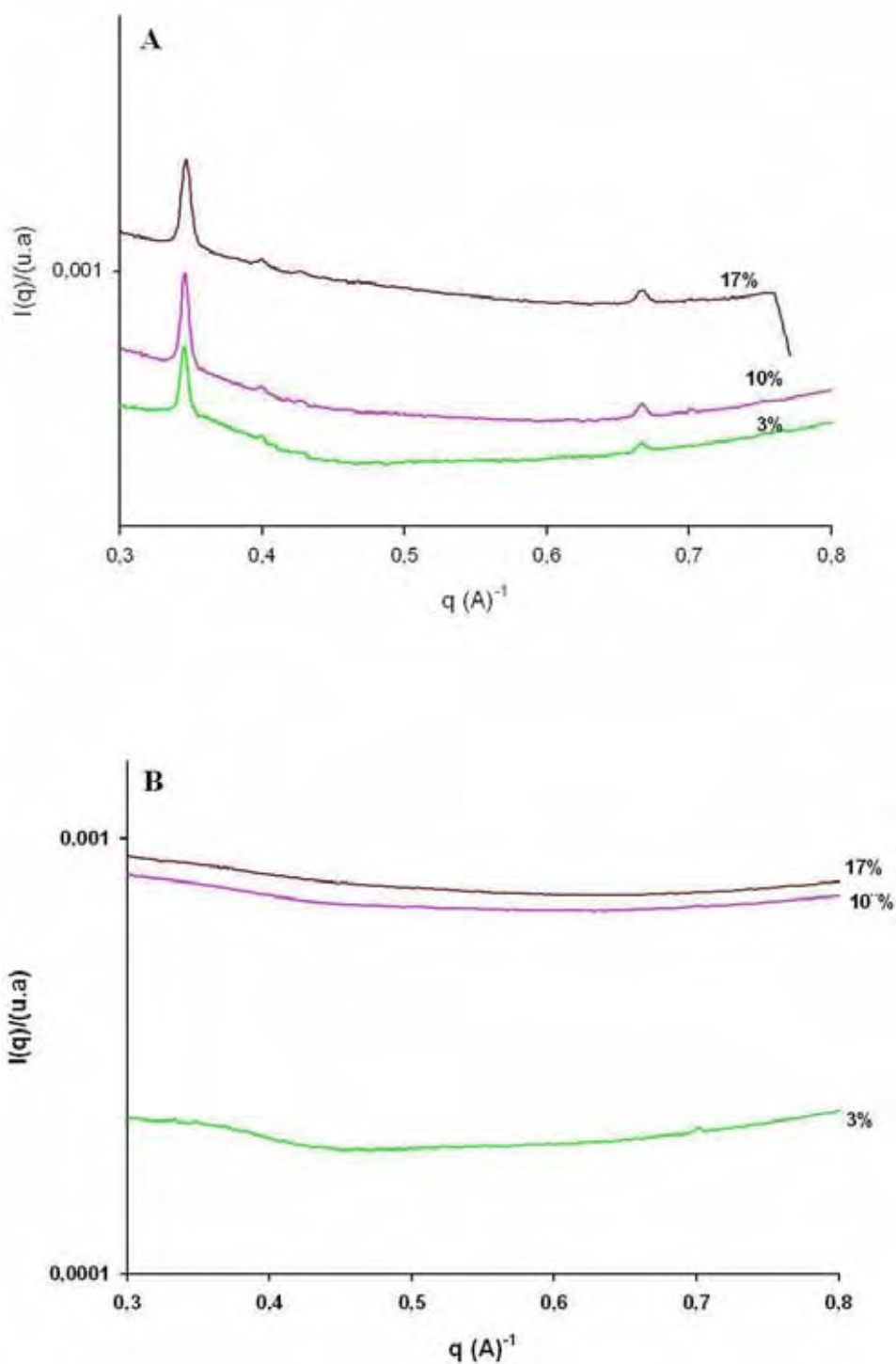


Figura 19: Curvas de SAXS para os sistemas preparados com porcentagem crescente de fase oleosa (3%, 10% e 17%) e porcentagem fixa de tensoativo (20% m/m). **A:** ausência de AmB; **B:** presença de AmB.

Observa-se os dados da Figura 19A, na ausência de AmB, a presença de dois picos com distância de aproximadamente 2, sugerindo a presença de partículas ou agregados com organização espacial. Para todas as amostras as curvas são similares, diferindo apenas nas intensidades dos picos e indicando que as características estruturais dos sistemas são as semelhantes. A técnica de SAXS é muito sensível do ponto de vista estrutural local, permitindo obter informações da ordem de nanômetros, impossível de serem obtidas por reologia. As fotomicrografias destes sistemas, apresentadas na Figura 14, indicaram a existência de Cruzes de Malta, características de estruturas birrefringentes como de fase lamelar.

Quando a AmB é adicionada aos sistemas (Figura 19B) os picos se tornam pouco evidentes, indicando que o fármaco altera significativamente as nanoestruturas existentes, independentemente da proporção de fase oleosa, como mostrado nos dados da Figura 18. As moléculas de AmB, possuem caráter anfifílico, e podem se inserir nos espaços entre as lamelas provocando o desaparecimento das propriedades estruturais do sistema.

A Figura 20 mostra as curvas de espalhamento, $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q , para as amostras com proporções fixas de fase oleosa (10%) e crescentes de tensoativo (10, 20 e 25%) na presença e na ausência do fármaco.

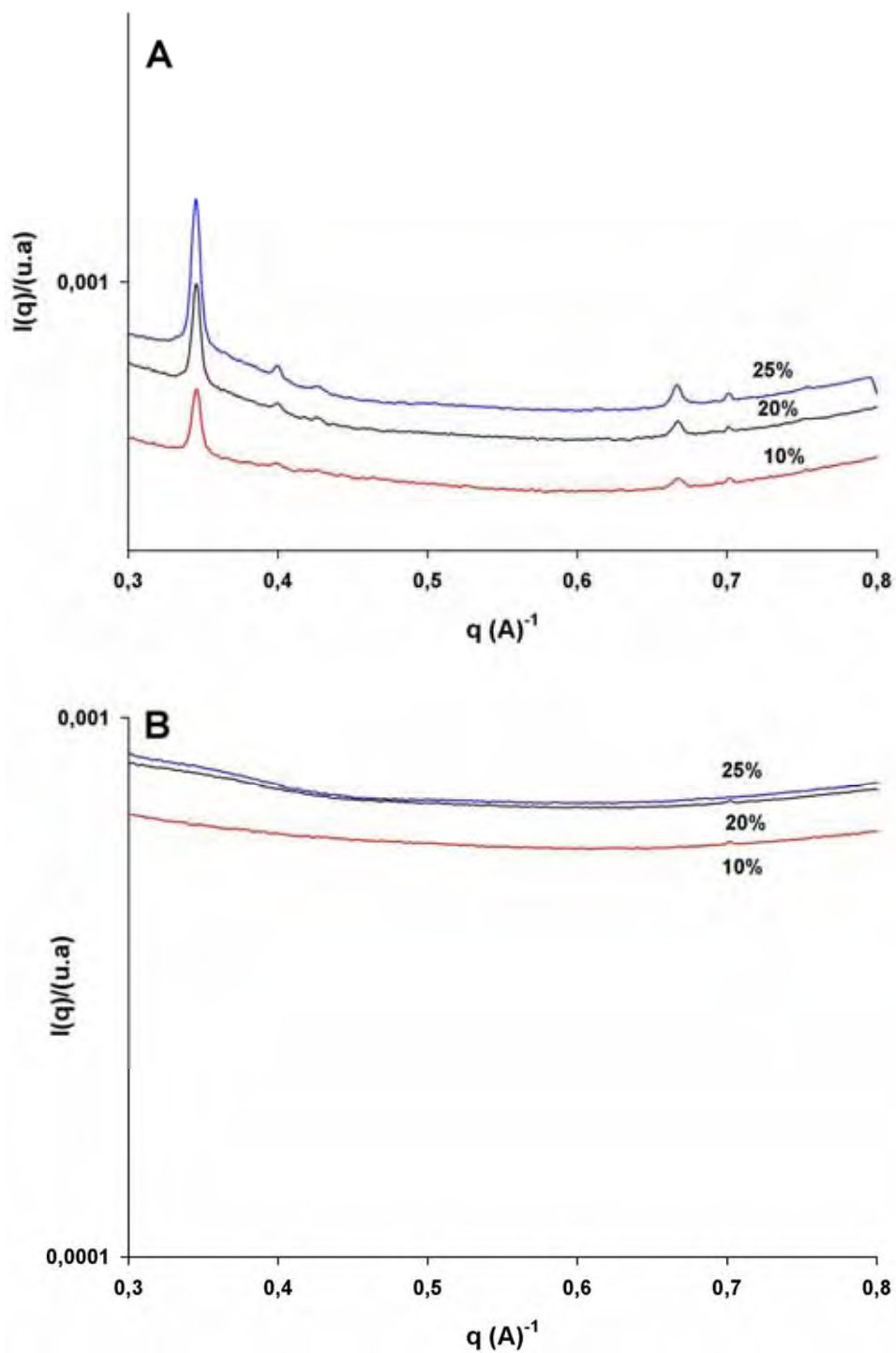


Figura 20. Curvas de SAXS para sistemas preparados com concentrações crescentes de tensoativo (10%, 20% e 25%) e fase oleosa constante (10% m/m). **A:** ausência de AmB; **B** presença de AmB.

Todas as formulações apresentaram características semelhantes, como as discutidas anteriormente, presença de dois picos distância relativa de aproximadamente 2, indicando a formação de estruturas com organização espacial, as quais são independentes da concentração de tensoativo (Figura 20A).

De forma semelhante, após a adição de AmB no sistema, houve desaparecimento dos picos observados anteriormente, evidenciando que a molécula do fármaco promoveu uma desestruturação do sistema (Figura 20B).

Os resultados experimentais das medidas de SAXS foram coerentes com os resultados observados na microscopia de luz polarizada, apresentadas anteriormente, e permitem concluir que a estruturação do sistema independe da relação tensoativo/fase oleosa, sendo desfavorecida à medida que a AmB é incorporada ao sistema.

Assim, para determinar os parâmetros estruturais como raio de giro (**Rg**) e distância média entre as gotículas (**d**), para as amostras acrescidas do fármaco, as curvas de SAXS foram ajustadas utilizando-se a equação proposta por Beaucage (BEAUCAGE *et al.*, 1995).

$$I(q) = G \exp\left(\frac{-q^2 Rg^2}{3}\right) + B \left\{ \frac{\left[\operatorname{erf}\left(\frac{qRg}{\sqrt{6}}\right) \right]^3}{q} \right\}^p \times S(q) \quad (9)$$

sendo **G** a intensidade para q tendendo a zero relacionada à Lei de Guinier, **B** é a constante de Porod, uma constante específica ao tipo de lei de potência descrita por Porod e o expoente **p**, conhecido como expoente de Porod, é associado à morfologia da superfície das partículas (por exemplo, no caso de partículas de superfície lisa $P = 4$) e **S(q)** é o fator de estrutura.

Na Figura 21 estão apresentados os ajustes dos dados experimentais das amostras ao modelo de Beaucage, nos quais a linha contínua refere-se aos dados experimentais e a

descontínua representa o modelo teórico. Observa-se uma ótima concordância entre os dados experimentais das fórmulas contendo AmB e o modelo proposto por Beaucage e colaboradores (1995).

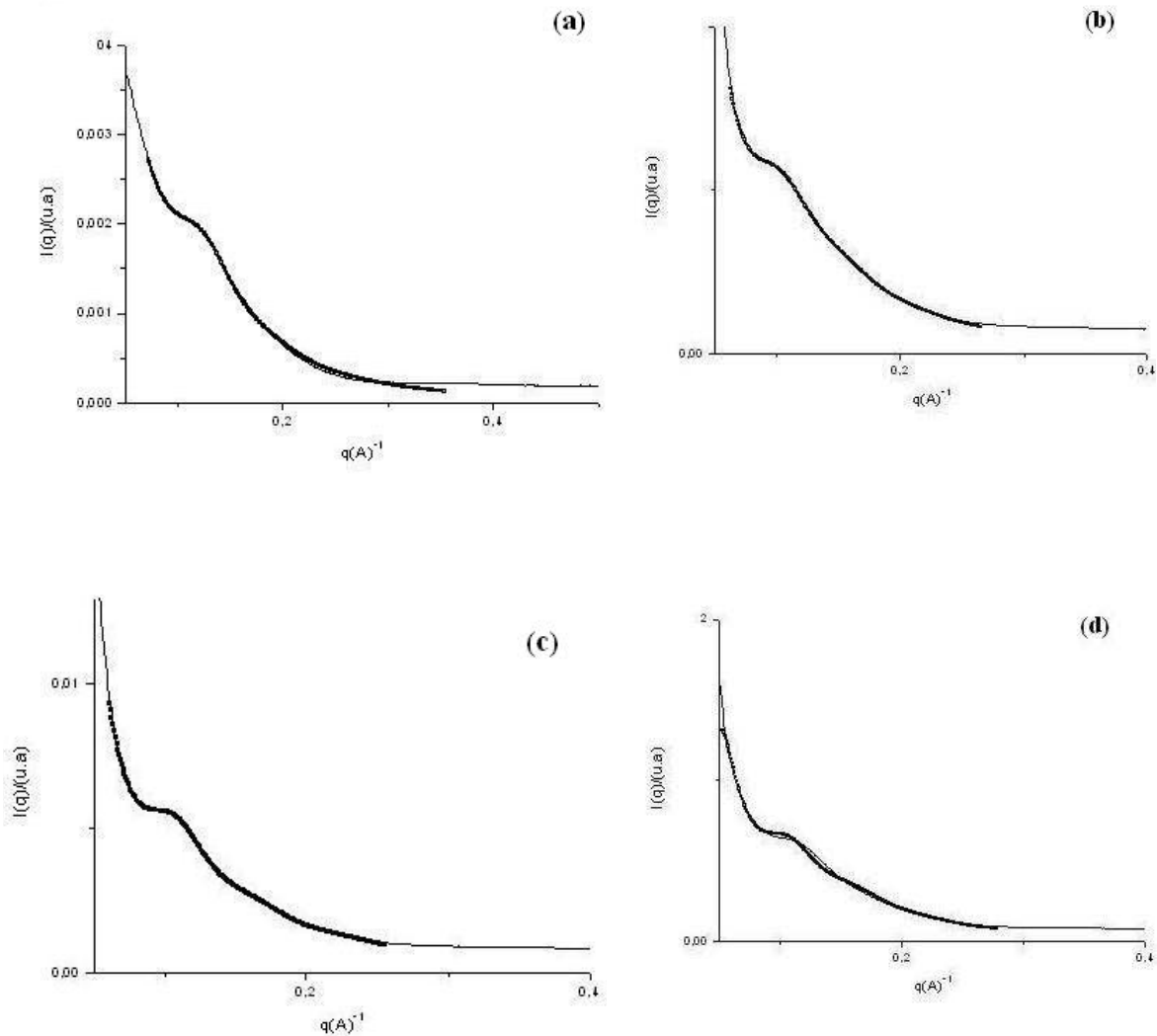


Figura 21 – Curva da intensidade de espalhamento $I(\mathbf{q})$ em função do vetor de espalhamento (\mathbf{q}) para amostras das formulações contendo: (a) ME-A; (b) ME-C; (c) ME-D; (d) ME-G.

Não foi possível ajustar os dados de SAXS da ME-E ao modelo de Beaucage e, portanto, os parâmetros estruturais referentes a essa formulação não foram calculados.

Os parâmetros estruturais determinados para as amostras contendo AmB, com estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 – Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de tensoativo e aumento da concentração de fase oleosa.

Formulação	Fase oleosa (%)	R_g (Å)	k	d (Å)
ME-A	3	27.69	1.71	91.81
ME-C	10	29.22	1.49	113.34
ME-D	17	32.30	2.94	108.98

R_g = raio de giro das gotículas; k = fator de compacidade; d = distância entre as gotículas

Os resultados referentes aos parâmetros estruturais das formulações na presença do fármaco indicaram que o raio de giro (R_g), relacionado com as dimensões dos objetos espalhadores (gotículas ou agregados) teve um pequeno aumento com a adição de fase oleosa. A distância entre as gotículas (d) aumenta até 10% e depois se mantém praticamente constante. O parâmetro k , relacionado com o grau de empacotamento dos agregados, apresentou aumento, o que sugere a agregação das gotículas da fase interna oleosa do sistema.

Tabela 8 – Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase oleosa e aumento da concentração de tensoativo.

Formulação	tensoativo (%)	R_g (Å)	k	d (Å)
ME-E	10	-	-	-
ME-C	20	29.22	1.49	113.34
ME-G	25	30.15	1.93	98.31

R_g = raio de giro das gotículas; k = fator de compactidade; d = distância entre as gotículas

A variação na proporção de tensoativo não teve efeito significativo sobre o raio de giro. Esse fato mostra claramente que o tensoativo, nessas proporções, foi capaz de manter o diâmetro das gotículas em valores mínimos e praticamente constantes. A distância entre as gotículas diminuiu proporcionalmente, conforme mostram os resultados de d , descritos na tabela 7, indicando que, o aumento na proporção de tensoativo promove formação de estruturas mais compactadas.

Sistemas estruturados do tipo reservatório podem, além de modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, alterar parâmetros farmacocinéticos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e biodisponibilidade, diminuição da toxicidade e aumento da eficácia clínica de fármacos, (FORMARIZ *et al.*, 2005).

4.3. Determinação da AmB em formulações e plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A disponibilidade de métodos analíticos com sensibilidade e especificidade adequadas é fundamental para a avaliação das características de dissolução e incorporação do fármaco em uma formulação assim como para a avaliação do perfil farmacocinético em modelos animais.

Metodologias envolvendo difusão em placa que utilizam microrganismos como indicador tem sido aplicadas para a determinação das concentrações plasmáticas de AmB, porém os dados produzidos por diferentes autores são conflitantes (SHADONY *et al.*, 1969; BANNATYNE *et al.*, 1997). Por outro lado há numerosos métodos cromatográficos para quantificação da AmB em matrizes biológicas (plasma, urina, tecidos, etc.). No entanto a maioria deles apresenta sensibilidade insuficiente, reprodutibilidade inadequada, baixa recuperação ou interferência de componentes endógenos, o que torna sua aplicação insatisfatória para avaliação farmacocinética (ECHEVARRÍA *et al.*, 1998). Outros métodos, que apresentaram sensibilidade e precisão mais adequadas, envolvem extração em fase sólida que, notavelmente, aumenta o tempo e o custo da análise (ECHEVARRÍA *et al.*, 1998). Daí a necessidade de se desenvolver uma metodologia rápida, fácil e reprodutível para análise quantitativa da AmB em plasma dentro dos limites de confiança de precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e especificidade.

Nesse trabalho foi desenvolvido e validado um método rápido, simples, sensível e reprodutível para quantificar AmB em formulações, meios de dissolução e fluido biológico por CLAE. O método envolveu diluição/desproteíntização das amostras com metanol e separação em coluna de fase reversa C₁₈.

O método desenvolvido apresentou vantagens como simplicidade na preparação da amostra e limites de detecção e quantificação inferiores aos obtidos em outros métodos publicados possibilitando sua aplicação na determinação do fármaco tanto nas formulações e meios de dissolução como em plasma para o estudo de farmacocinética.

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de AmB (50 μ g/ml) em mistura de solventes, metanol e DMSO, tendo em vista sua insolubilidade na maioria dos solventes, inclusive em metanol puro. Pesou-se 5mg de AmB, adicionou-se 1mL de DMSO, então completou-se o volume para 100mL com metanol. Essa solução foi mantida sob refrigeração e utilizada como solução estoque para posteriores diluições.

Nas Figuras 23, 23 e 24 estão apresentados os cromatogramas obtidos a partir dos brancos e de amostras contendo AmB, nas condições descritas, em plasma, em formulações e em tampão, respectivamente

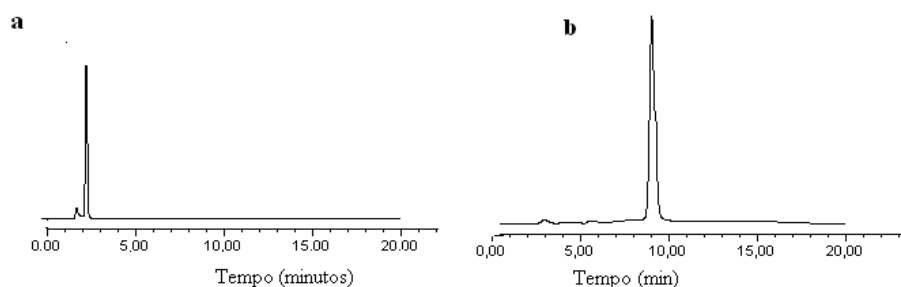


Figura 22: Cromatogramas: (a) matriz biológica; (b) matriz biológica adicionada de AmB 5 μ g/mL na condição selecionada.

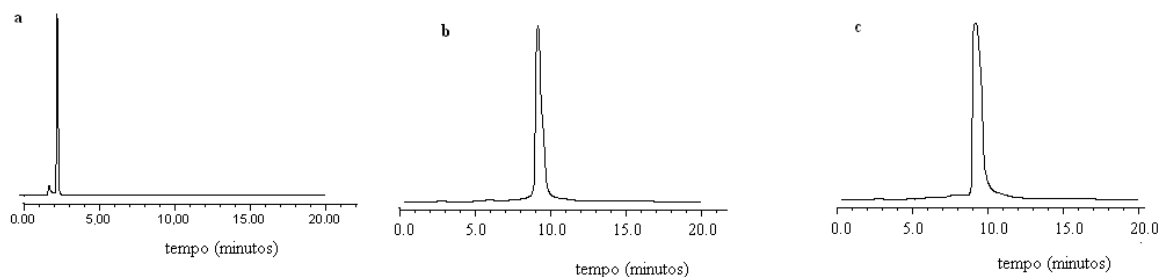


Figura 23: Cromatogramas: (a) metanol, (b) ME contendo AmB diluída em metanol (c) formulação comercial de AmB diluída em metanol.

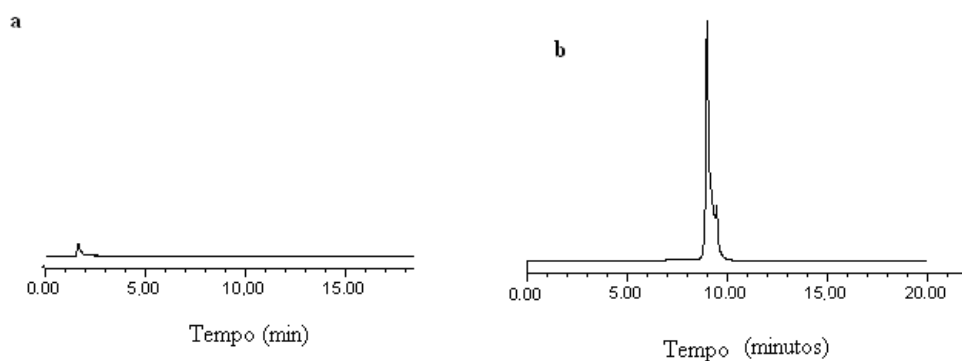


Figura 24: Cromatograma: (a) Tampão fosfato, pH 2,5, contendo laurilssulfato de sódio 0,15%, (b) AmB 5 ug/mL em tampão fosfato, pH 2,5 contendo laurilssulfato de sódio 0,15%.

A AmB apresentou tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos em todas as amostras analisadas. Não houve diferença entre os tempos de retenção identificados na análise do fármaco na matriz biológica, em metanol ou no meio de dissolução indicando a robustez do método quanto a este aspecto. Não foi detectada qualquer impureza ou componente das matrizes neste tempo de retenção, indicando especificidade e seletividade para o método.

4.3.1. Curva Analítica da AmB em metanol

Foi construída uma curva de AmB em solução de metanol por CLAE, representada na Figura 25, que posteriormente foi utilizada para quantificação do fármaco nas formulações.

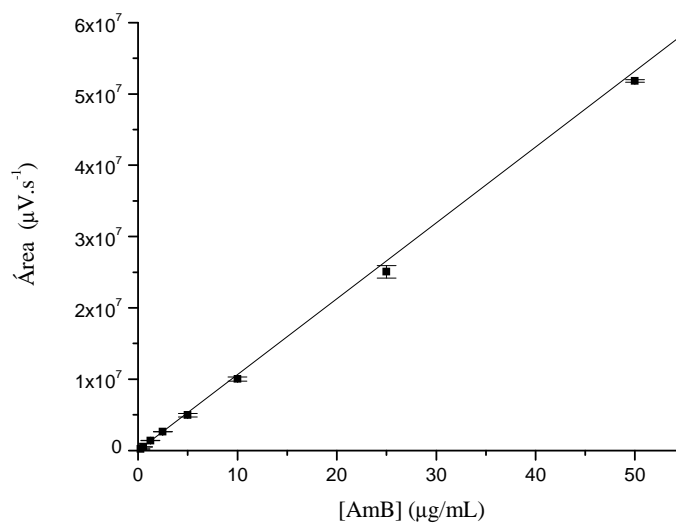


Figura 25: Curva analítica da anfotericina B em metanol obtida por CLAE em 410nm.

A equação linear representativa obtida para curva analítica para determinação da AmB em metanol foi $y = -14088.02 + 1.0644 \times 10^6 x$. O coeficiente de correlação foi de 0,9990 demonstrando linearidade satisfatória.

4.3.2. Curva analítica da AmB em solução tampão

Foi construída uma curva analítica da AmB em tampão fosfato pH 2,5 acrescido de laurilsulfato de sódio 0,15% por CLAE em 410nm, representada na Figura 26 para a quantificação do fármaco no meio receptor durante o ensaio de dissolução.

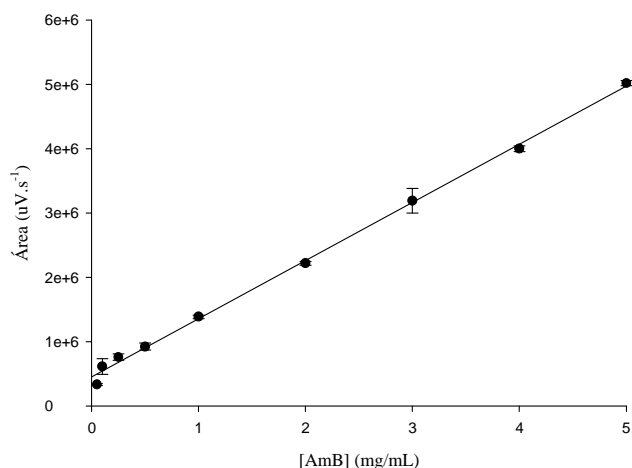


Figura 26: Curva analítica da AmB em tampão fosfato pH 2,5 acrescido de 0,15% de laurilsulfato de sódio obtida por CLAE em 410nm.

A equação obtida para curva analítica foi $y = 90848x + 451137$. O coeficiente de correlação foi de 0,9978, demonstrando a linearidade do método para a determinação do fármaco no meio de dissolução.

4.3.3. Curva analítica da AmB em plasma

Foi construída uma curva analítica da AmB em plasma por CLAE em 410nm, representada na Figura 27 para a quantificação do fármaco nas amostras de ratos que receberam as formulações por diferentes vias de administração.

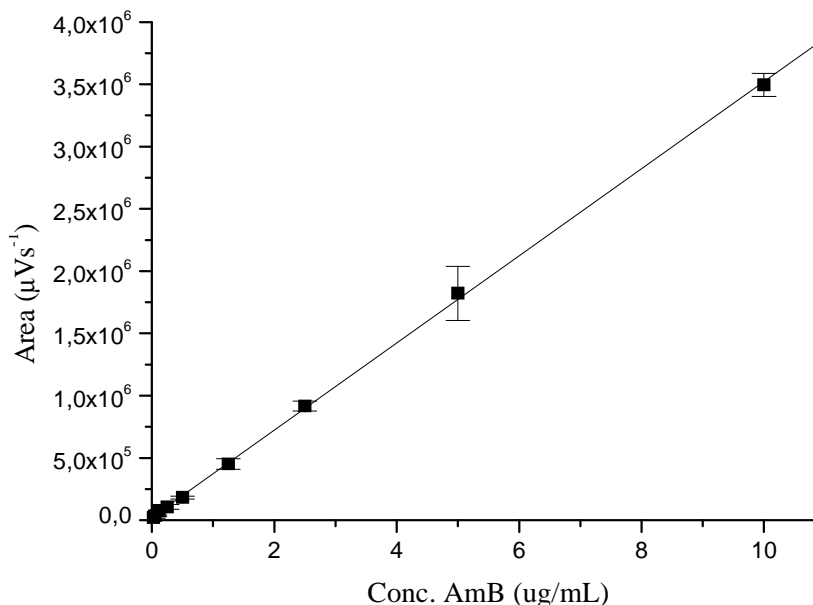


Figura 27: Curva analítica de AmB em plasma obtida por CLAE em 410nm

A equação obtida para curva analítica foi $y = 24092,80 + 349737,28 x$. O coeficiente de correlação foi de 0,9998 demonstrando a linearidade do método para a determinação do fármaco na matriz biológica.

4.4. Validação do método analítico desenvolvido

O processo de validação incluiu os procedimentos necessários para a determinação dos limites de confiança do método, de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (RESOLUÇÃO-RE nº899, de 29 de maio de 2003). O objetivo desses procedimentos foi avaliar se o método analítico desenvolvido apresenta características de confiabilidade essenciais para a sua aplicação no estudo de farmacocinética da AmB. Os parâmetros analisados na validação, de acordo com a regulamentação da ANVISA foram:

Linearidade

As curvas de calibração, construídas nas diferentes matrizes, apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,9, confirmando a linearidade do método.

Precisão e Exatidão Intra (repetibilidade) e Interensaios (reprodutibilidade)

Os resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão intra e interensaios estão apresentados na Tabela 9 e apresentaram valores adequados de CV demonstrando repetibilidade e reprodutibilidade satisfatórias para a aplicação do método no estudo em farmacocinética, pois em todos os níveis de concentração investigados os valores de CV% foram inferiores a 15%.

Tabela 9: Precisão e exatidão do método bioanalítico da AmB em plasma.

Concentração	Intra-ensaio n=5		Interensaio (5 dias) n=5	
	Precisão (CV%)	Exatidão (%ES)	Precisão (CV%)	Exatidão (%ES)
0,125 µ/mL	2,99	6,87	2,86	4,17
1,25 µg/mL	4,82	8,03	5,07	3,38
5,00 µ/mL	6,15	11,28	4,45	5,60

CV= coeficiente de variação; ES = erro sistemático

Limites de Detecção e Quantificação.

Na Tabela 10 estão demonstrados os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação da AmB na matriz biológica.

Tabela 10: Limites de detecção e quantificação do método de análise de AmB em plasma.

Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	0,025
CV (%)	17,81
Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	0,05
CV (%)	8,84

CV = coeficiente de variação

Seletividade

Para o estudo da seletividade do método foram analisados os fármacos que poderiam ser utilizados concomitantemente na terapêutica de micoses sistêmicas ou no alívio dos efeitos adversos, em suas concentrações plasmáticas na faixa terapêutica, comprovando a ausência de picos na região de interesse (Tabela 11). Os fármacos analisados não foram detectados na região de interesse (tempo de retenção da AmB) ou não foram detectados pelo sistema utilizado.

Esses resultados indicam que o método pode ser usado em estudos clínicos, e não somente em amostras controladas como a de animais de experimentação.

Tabela 11: Estudo da seletividade do método de análise da AmB em plasma.

Fármaco	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	t_R (minutos)
Tetraciclina	16,4	ND
Itraconazol	0,65	3,055
Cetoconazol	3,2	3,051
Fluconazol	10,6	ND
AAS	24	ND
Diclofenaco sódico	3	ND
Paracetamol	20	ND
Zidovudina	2,6	ND
Prednisona	0,08	3,048
Prednisolona	0,46	ND
Dipirona	2	3,022
Cafeína	10	ND

* ND - Não detectado (0-30 min)

Estabilidade do fármaco no fluido biológico:

Na Tabela 12 estão demonstrados os resultados do estudo de estabilidade da AmB no fluido biológico sob diferentes condições, conforme descrito no item 3.2.5 de Materiais e Métodos.

Tabela 12: Estudo de estabilidade da AmB em amostra biológica (plasma).

Estabilidade						
Curta duração (24 h)			3 Ciclos de congelamento		Longa duração (10 dias)	
Temp. ambiente					T= -20°C	
	0,125 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	0,125 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	0,125 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$
% perda	3,8%	0,56%	4,65%	3,88%	3,63%	1,93%

Os resultados obtidos indicam que o fármaco apresenta estabilidade na amostra biológica, possibilitando que seja armazenada para posterior análise se acondicionada nas condições específicas do estudo.

Os resultados gerais da validação demonstraram que o método desenvolvido apresentou limites de confiança adequados para sua aplicação no estudo da farmacocinética da AmB.

4.5. Determinação da incorporação da AmB em relação ao volume de fase interna

A Tabela 13 relaciona a incorporação do fármaco nos sistemas e o volume de fase interna.

Tabela 13: Valores referentes ao volume de fase interna das MEs, suas respectivas medidas de diâmetro e a solubilidade da AmB em cada formulação.

Formulação	Volume de fase interna	Incorporação (mg/mL)
A (77%A; 3%O; 20%T)	0,233	3,69
B (74%A;6%O; 20%T)	0,270	4,62
C (70%A;10%O;20%T)	0,323	5,22
D (63%A;17%O;20%T)	0,413	5,81
E (80%A;10%O;10%T)	0,212	2,96
F (75%A;10%O;15%T)	0,261	4,35
C (70%A;10%O;20%T)	0,323	5,22
G (65%A;10%O;25%T)	0,420	5,71

Através dos valores de incorporação determinados neste experimento, observa-se que a solubilização da AmB é diretamente dependente das proporções de fase oleosa e de tensoativo.

Quando se obtém um maior volume de fase interna, a solubilidade da AmB no meio é facilitada devido a extensa cadeia carbônica que lhe confere afinidade pela fase oleosa. Da mesma forma, a incorporação do fármaco no sistema é favorecida quando há maior quantidade de tensoativo, já que este facilita a solubilização do fármaco no sistema.

Considerando que os valores do pK_{a1} (5,5) da função carboxilato ligado ao C₃₆ e do pK_{a2} (10) da função amina do grupo substituinte de C33, nas condições experimentais desse trabalho a AmB encontra-se predominantemente na forma zwitteriônica, podendo interagir facilmente com a microemulsão em meio aquoso.

A Figura 28 apresenta os resultados da variação da concentração de AmB em relação aos volumes de fase interna da ME. O volume de fases (ϕ) foi definido como (Mackay, 1982):

$$\phi = 1 - \omega \cdot g \quad (10)$$

na qual ω é a fração percentual de fase aquosa no sistema e g é a gravidade específica da ME.

A concentração de AmB solubilizada nas fases aquosa e oleosa (AmB_s) foi marcadamente aumentada pela incorporação na microemulsão. A concentração de AmB_s aumentou com o aumento do volume de fases, atingindo valores máximos em altas proporções do mesmo (Figura 28). Este perfil de incorporação ($AmB_s-\phi$) é um fenômeno típico de associação de substâncias em agregados supramoleculares cuja componente hidrofóbica da molécula exerce um efeito marcante no processo, como é o caso da incorporação da AmB em microemulsões neutras. Esse fenômeno pode ser

analisado quantitativamente pelos procedimentos do modelo de pseudo-fase (SEPULVEDA et al, 1986; OLIVEIRA et al., 1991; 1997).

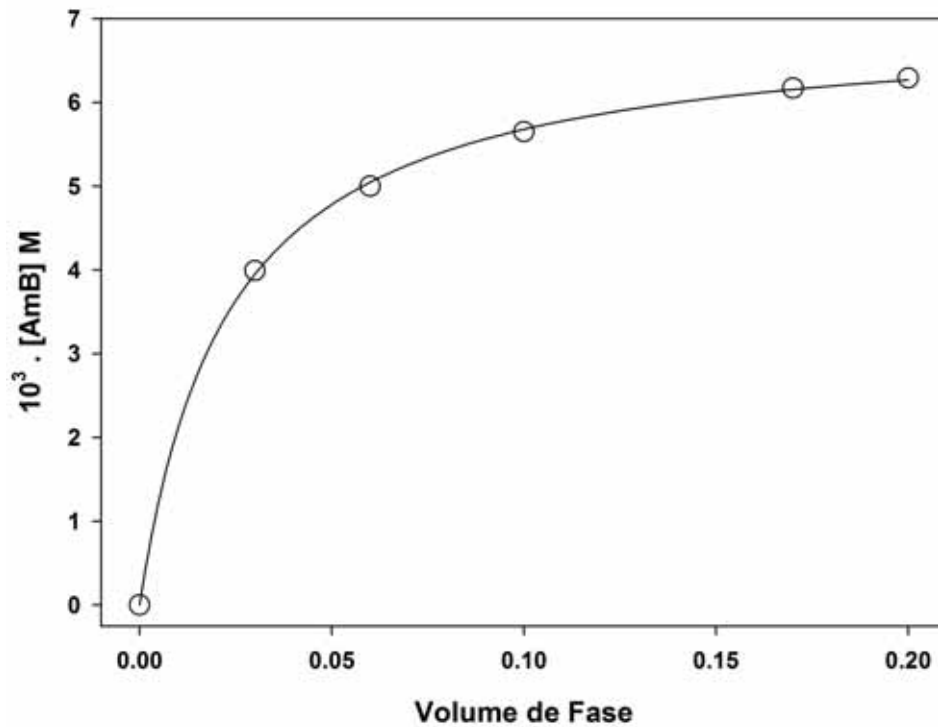
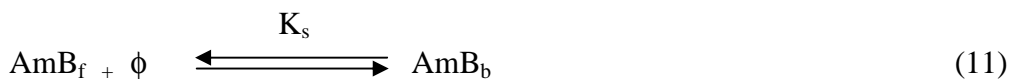


Figura 28: Efeito do volume de fase da ME, com tensoativo constante, na incorporação da AmB em pH fisiológico a 25°C. A curva cheia representa o ajuste dos dados experimentais através da equação 14.

A incorporação da AmB na fase oleosa dispersa da ME pode ser representada através do equilíbrio:



A distribuição da AmB entre as nanogotículas de fase oleosa e a fase externa aquosa é descrita pela constante de associação (K_s):

$$K_s = \text{AmB}_b / \text{AmB}_f \cdot \phi \quad (12)$$

Considerando-se que a concentração de anfotericina B total (AmB_T) é representada pela soma das concentrações parciais da anfotericina B presentes na fase aquosa (AmB_f) e na fase oleosa dispersa (AmB_b) (equação 13) pode-se definir a equação que descreve a variação da concentração de anfotericina B dissolvida no sistema microemulsionado pelo efeito da variação do volume de fases (Equação 14):

$$\text{AmB}_T = \text{AmB}_f + \text{AmB}_b \quad (13)$$

$$\text{AmB}_s = \frac{\text{AmB}_f + \text{AmB}_b \cdot K_s \cdot \phi}{1 + K_s \cdot \phi} \quad (14)$$

Na qual os subscritos f e b referem-se às concentrações de AmB na fase aquosa e ligada nas gotículas da fase interna, respectivamente.

Baseando-se nas equações 11-14 foi possível realizar o ajuste dos dados experimentais para o cálculo do valor da constante de associação K_s da AmB para a microemulsão neutra, em pH 7,2, cujo valor foi de $23,1 \text{ mM}^{-1}$ e da máxima concentração de AmB incorporada (AmB_{max}) de 7,0 mM em volumes de fase correspondentes região do patamar no diagrama de solubilidade. Esses resultados mostram que nestas condições experimentais a AmB_f interage favoravelmente com a fase interna oleosa da microemulsão gerando a AmB_b (Figura 28) e que essa associação é essencial no processo de liberação *in vitro*.

Por outro lado, a solubilidade da AmB em meio aquoso também significativamente aumentada variando-se a proporção de tensoativo na composição da ME. Os resultados

apresentados na Figura 29 mostram que a concentração molar de AmB aumenta com a proporção de tensoativo tendendo à saturação do sistema em altas concentrações.

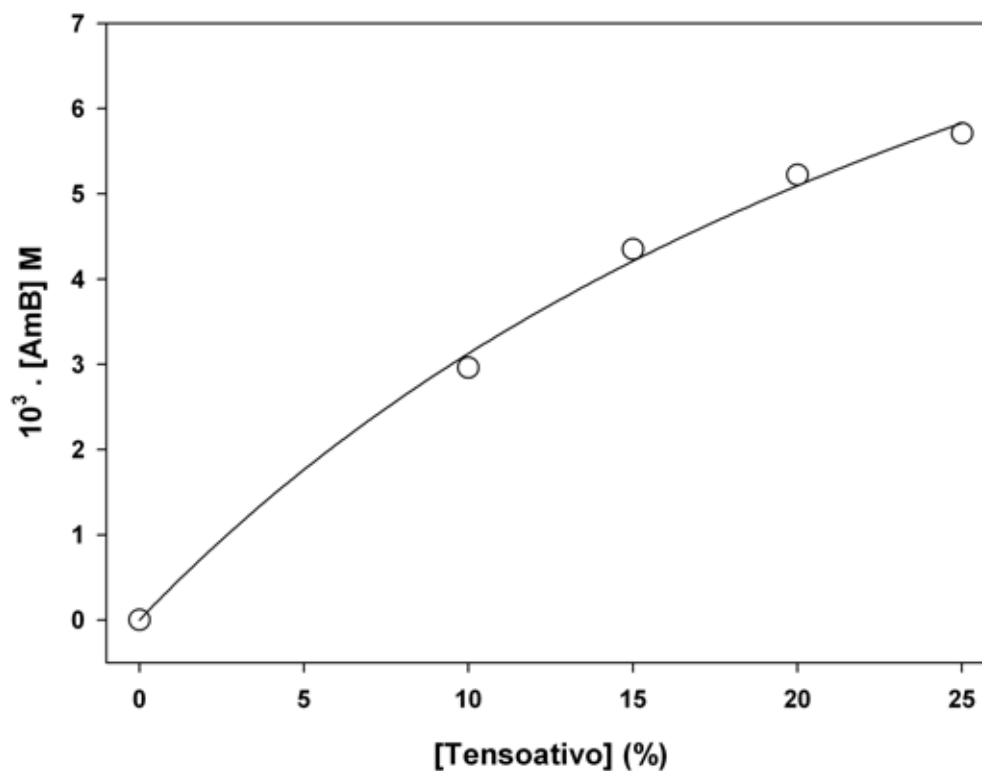


Figura 29: Efeito da proporção concentração de tensoativo, com volume de fase constante, na incorporação da AmB, em pH fisiológico, a 25°C. A curva cheia representa o ajuste dos dados experimentais através da equação 15.

Considerando que a mistura dos tensoativos estabilizantes, fosfatidilcolina/tween 20 (1:1), pode ser considerada formalmente neutra, a incorporação da AmB no sistema microemulsionado reflete diretamente a contribuição hidrofóbica da molécula na interação com a interface óleo água.

Neste caso, o ajuste dos dados experimentais para o cálculo do valor da constante de associação K_s da concentração máxima de AmB dissolvida no meio (AmB_{max}) para a microemulsão neutra foi realizado através da equação 15:

$$\text{AmB}_s = \frac{\text{AmB}_f + \text{AmB}_b \cdot K_s \cdot [\text{T}]}{1 + K_s \cdot [\text{T}]} \quad (15)$$

Na qual [T] representa a concentração de tensoativo presente no sistema.

Os valores obtidos, em pH 7,2, foram de 34 mM⁻¹ para o K_s e de 13,8 mM para concentração máxima de AmB incorporada (AmB_{max}) em volumes de fase correspondentes à região do patamar na curva de incorporação. Esses resultados mostram claramente que nestas condições experimentais a AmB_f interage favoravelmente com o tensoativo organizado na interface óleo-água gerando a AmB_b (Figura 29) e que essa associação interfere significativamente no processo de liberação *in vitro*.

A comparação dos efeitos do volume de fase e da proporção de tensoativo mostra um valor de K_s melhor pelo efeito do tensoativo, demonstrando que esse parâmetro proporciona melhor perfil de incorporação do que o efeito direto da proporção de fase oleosa, fornecendo uma alternativa viável para o uso como veículo não só para a AmB, mas também para outros fármacos lipofílicos.

4.6. Estudo do perfil de dissolução *in vitro*

Os testes de liberação *in vitro* são importantes ferramentas de controle de qualidade de diferentes ciclos de vida de um medicamento. Nos primeiros estágios de desenvolvimento farmacotécnico são úteis para identificar variáveis críticas, selecionar diferentes formulações, aperfeiçoá-las e fazer avaliações de risco como no caso de formulações de liberação prolongada. Estes testes têm sido empregados com sucesso

para formas farmacêuticas convencionais e os testes gerais descritos na farmacopéia são geralmente suficientes para avaliar uma nova formulação. Para casos de formas de liberação controlada vários fatores devem ser levados em consideração, como por exemplo, o mecanismo de liberação, propriedades físico-químicas do fármaco, escolha do meio receptor, agitação e condição *sink*.

O estudo da liberação de fármacos a partir de sistema coloidais não é uma tarefa trivial. Para isso existem poucos métodos para avaliar a liberação de fármacos, entre os quais a técnica que utiliza membranas de difusão e o método *in situ*. Este último apresenta desvantagens, já que a formulação é colocada em um compartimento (geralmente meio aquoso) com conseqüente diluição, o que dificulta a manutenção de sua estrutura original. Ao contrário, o método que utiliza membrana de difusão, evita essas variações na estrutura. Inicialmente, o compartimento receptor está livre de fármaco. No ensaio de dissolução *in vitro* o fármaco deve ser liberado das gotículas (fase oleosa interna) para a fase aquosa externa do sistema difundindo, em seguida, através da membrana de celulose até o meio receptor, onde deve ser quantificado (GRASSI, 2006).

Na escolha do meio receptor para formas de liberação prolongada de fármacos pouco solúveis, pode-se utilizar um agente solubilizante, como por exemplo uma substância tensoativa para acelerar o processo de liberação (MARCOLONGO, 2003). Para garantir que o processo de liberação da AmB a partir das MEs não fosse influenciado pela baixa solubilidade do fármaco no meio externo utilizou-se o laurilsulfato de sódio a 0,15% (m/v) no meio receptor.

Fármacos hidrofóbicos apresentam solubilidade consideravelmente maior na fase oleosa das microemulsões devido ao efeito de partição favorável para solventes com baixa constante dielétrica. Assim, as MEs apresentam elevada capacidade de

solubilização de fármacos com esta característica. Se a fase oleosa constitui o ambiente preferencial para a solubilização, depois de incorporado no sistema microemulsionado para difundir-se novamente para o meio externo o fármaco deve atravessar o meio aquoso, o qual funciona essencialmente como uma barreira para o transporte de fármacos pouco solúveis em água. Assim as MEs podem agir retardando a liberação do fármaco e a fase oleosa funciona como um sistema reservatório (GRASSI, 2006).

Os perfis de liberação *in vitro* da AmB a partir das diferentes formulações de MEs estão representados nas Figuras 30 e 31. Os dados das Figuras 30 e 31 mostram o efeito da variação da proporção de fase oleosa e da proporção de tensoativo na dissolução *in vitro* da AmB_b, respectivamente. Verifica-se que a liberação *in vitro* anfotericina livre AmB_f (não microemulsionada) seguiu um perfil descrito por uma cinética de primeira ordem, com liberação inicial rápida e reagindo em patamar no espaço de tempo de 12 horas do experimento. Entretanto, na presença de microemulsão esse perfil foi modificado drasticamente devido à inclusão da AmB_f nas gotículas de fase oleosa. Independentemente do volume de fase interna no sistema, o perfil de liberação da AmB_b, apresentou curvas sigmoidais, com forte inibição da liberação nas primeiras 6 horas do monitoramento, mas com aumento característico da liberação subsequente a essa fase.

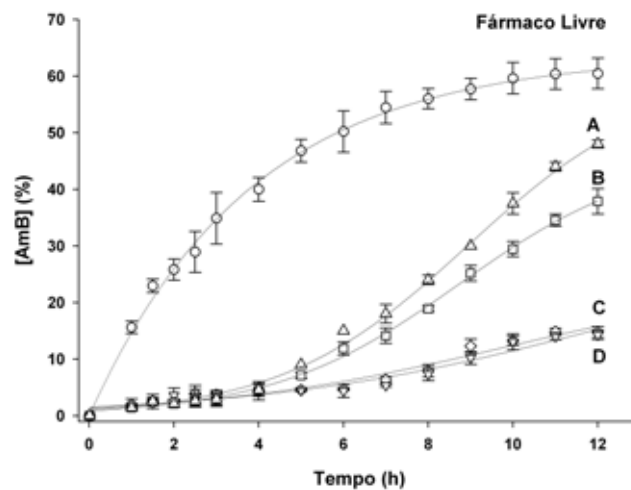


Figura 30: Perfil de liberação *in vitro* da AmB nos sistemas com proporções crescentes de fase oleosa (A:3%; B:6%; C:10%; D:17%) e fixa de tensoativo em 20%, em comparação ao fármaco livre em tampão fosfato pH 2,5.

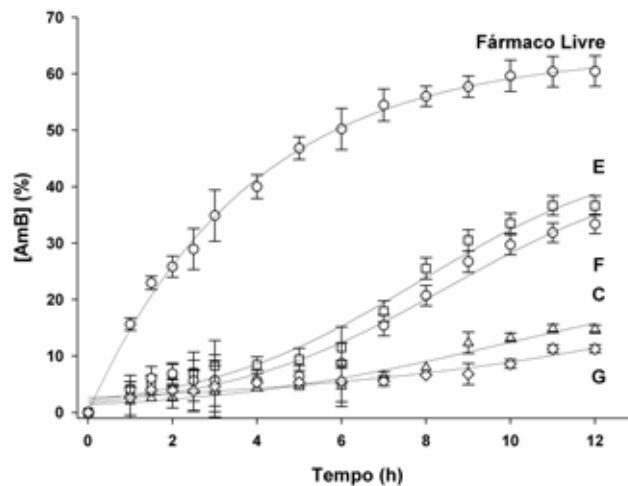


Figura 31: Perfil de liberação *in vitro* da AmB nos sistemas com proporções crescentes de tensoativo (E: 10%; F:15%, C:20% e G:25%) e fase oleosa fixa em 10%, em comparação ao fármaco livre em tampão fosfato pH 2,5

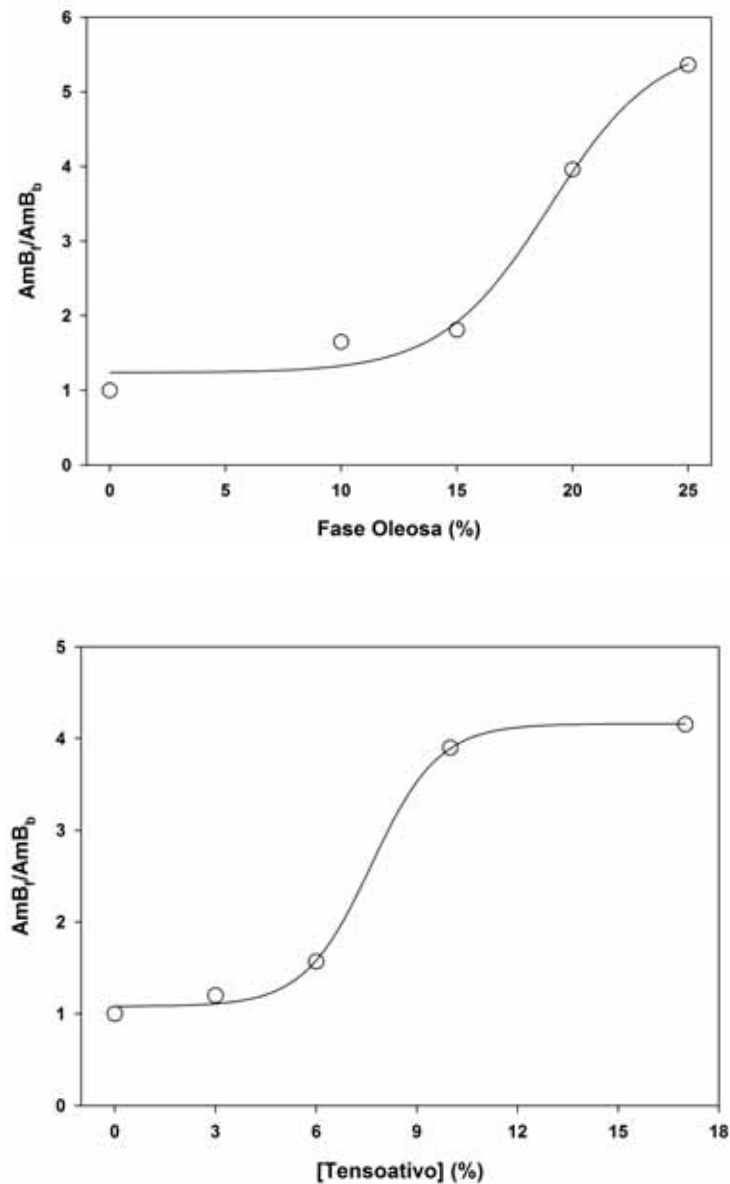


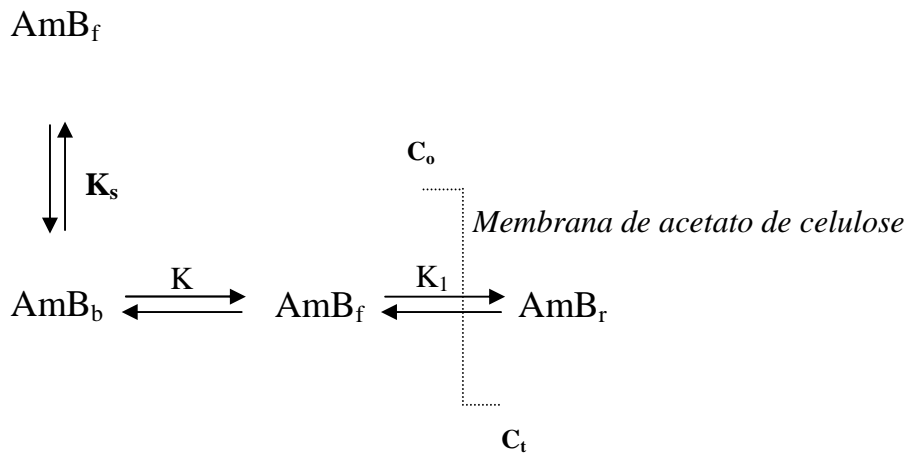
Figura 32: Efeito das proporções de fase oleosa (A) e de tensoativo (B) na relação entre as liberações da anfotericina B livre e incorporada nos sistema microemulsionados.

Verificou-se que tanto a variação da proporção de fase oleosa como a de tensoativo exercem um efeito marcante no processo de liberação da AmB_b , diminuindo claramente a liberação do fármaco com o aumento da proporção dos mesmos nas formulações. Para avaliar o efeito da variação do volume de fase interna dispersa da ME

na liberação *in vitro*, foram analisadas as relações entre a AmB_f/AmB_b no tempo máximo (12 horas) transcorrido da liberação *in vitro* da AmB_f , a qual encontra-se representada na Figura 32. Observou-se em ambos os casos um perfil sigmoidal, com pouco efeito inicial e aumento subsequente. Verificou-se que tanto a proporção de fase oleosa como da proporção de tensoativo são diretamente proporcionais quanto à relação AmB_f/AmB_b , implicando em que na medida em que anfotericina B ligada aumenta, há uma inibição mais acentuada no processo de liberação *in vitro*. Esse fenômeno reflete diretamente o efeito da componente hidrofóbica da AmB na incorporação na fase oleosa da microemulsão. Pode-se racionalizar que quanto mais intensa for a interação da AmB com as gotículas de fase oleosa, mais limitada será a liberação. De fato os resultados das Figuras 30-32 demonstram claramente esse aspecto.

Finalmente, a distinção entre os perfis de primeira ordem para a AmB_f e sigmoidal para a AmB_b sugere que a liberação *in vitro* da Anfotericina B a partir dos sistemas microemulsionados provavelmente ocorre por processo de dois estágios, o primeiro envolvendo a saída da AmB_b das gotículas de fase oleosa produzindo a AmB_f e o segundo, relacionado com a difusão da AmB_f através da membrana de acetato de celulose produzindo a Anfotericina B liberada (AmB_r).

O processo global de liberação da AmB_b a partir do sistema microemulsionado pode ser sumarizado através do Esquema I.



No qual C₀ refere-se à concentração inicial de fármaco na membrana (tempo zero) e C_t a concentração de fármaco liberado num tempo t.

Esquema I

No Esquema I, mostra que o processo global de liberação depende da contribuição relativa das magnitudes das constantes de associação (K_s), constante de liberação (K) e constante de permeação (K₁). Se a contribuição hidrofóbica da molécula do fármaco for desprezível revelando K_s extremamente baixo, então a molécula de AmB_b é rapidamente liberada, acumula-se no lado interno da membrana criando um alto gradiente de concentração de fármaco em relação ao lado externo da mesma e proporcionando a permeação mais rápida da AmB_f. De fato, as Figuras 29 e 30 demonstram claramente esse fenômeno, no processo de liberação da AmB não microemulsionada, pois o fármaco encontra-se totalmente disponível no lado interno da membrana podendo ser permeado mais rapidamente para meio receptor (Figuras 30 e 31).

Ao contrário, o sistema microemulsionado exerce um efeito marcante no processo de liberação (Figuras 30-32) já que o fato da AmB_b estar compartimentalizada nas gotículas de fase oleosa cria uma restrição acentuada de sua liberação de forma que a concentração da AmB_f no lado interno da membrana é menos intensa, criando um

gradiente de concentração menor nos dois lados da membrana e proporcionando a liberação menos intensa.

O esquema I mostra que se o valor da constante de associação K_s for suficientemente intenso para fazer predominar o efeito hidrofóbico da molécula do fármaco, então $K < K_1$, e o primeiro estágio da liberação da AmB será o passo limitante de todo processo de liberação, sendo que neste caso os parâmetros com a formulação é que poderão controlar o processo global de liberação. De fato os resultados da figura 31 mostram claramente os limites desse processo de controle.

Por outro lado, também é conveniente considerar que como o raio hidrodinâmico das gotículas de óleo da fase interna não sofreu modificações significantes com o aumento da fase oleosa do sistema (Figura 6), pode-se racionalizar que, em presença de volume de fase interna reduzido, existe menor número de gotículas por unidade de volume. Assim, nos sistemas com baixo volume de fase interna o número de gotículas pode não ser suficiente para associar todas as moléculas de AmB, gerando um sistema com equilíbrio deslocado para o meio externo (Equação 11, Esquema I), dificultando a incorporação da AmB_f e, pelas mesmas razões mencionadas anteriormente, favorecendo a liberação da AmB_b . Por outro lado, quando o volume de fase interna aumenta, também cresce o número de gotículas por unidade de volume, deslocando o equilíbrio para a fase interna da ME, favorecendo a incorporação da AmB_f , mas dificultando a liberação da AmB_b (Equação 11, Esquema I).

Nestas condições esses parâmetros podem ser usados como meios eficazes para o controle da velocidade de liberação de fármacos hidrofóbicos a partir de microemulsões O/A, evidenciando a característica de sistemas reservatórios das MEs.

4.7. Análise Farmacocinética

A seleção da formulação ME-D, contendo cerca de 63% de fase aquosa, 17% de fase oleosa e 20% de tensoativo, foi baseada principalmente na maior incorporação do fármaco por este sistema (5,81mg/mL) e considerando-se que as propriedades físico-químicas desta formulação não variaram significativamente em relação às outras.

O objetivo desta etapa do estudo foi comparar o perfil farmacocinético da formulação desenvolvida (MEs) administrada por via oral, através de gavagem, com a apresentação de AmB disponível no mercado administrada pela via oral e via endovenosa. Assim, foi possível verificar se o sistema desenvolvido possibilitaria um incremento na absorção oral do fármaco, que para a formulação convencional é da ordem de 3%.

Na Tabela 14 estão apresentados os valores de concentrações plasmáticas da AmB após administração i.v. *bolus* de 1mg/kg do fármaco veiculado na formulação convencional com desoxicolato (D-AmB).

Tabela 14: Concentração plasmática de AmB em função de tempo nos animais que receberam D-AmB i.v. *bolus* na dose de 1mg/kg, os valores estão representados pela média e desvio padrão.

Tempo (h)	Conc. Plasmática ($\mu\text{g/ml}$)	DP
0,25	1,300	0,0902
0,75	0,980	0,0503
3,50	0,420	0,0203
6,00	0,320	0,0645
12,00	0,210	0,0220
24,00	0,063	0,0120

Na Tabela 15 estão demonstrados os valores de concentrações plasmáticas da AmB após administração oral (gavagem) de 50mg/kg do fármaco veiculado na formulação convencional com desoxicolato (D-AmB).

Tabela 15: Concentração plasmática de AmB em função de tempo nos animais que receberam D-AmB por via oral na dose de 50mg/kg, os valores estão representados pela média e desvio padrão.

Tempo (h)	Conc. Plasmática ($\mu\text{g/mL}$)	DP
0,5	0,070	0,0336
1,0	0,115	0,0175
2,0	0,156	0,0106
4,0	0,125	0,0106
8,0	0,103	0,0019
12,0	0,083	0,0039
24,0	0,082	0,0078
48,0	0,070	0,0009

Na Tabela 16 estão apresentados os valores de concentrações plasmáticas da AmB após administração oral (gavagem) de 50mg/kg do fármaco veiculado na microemulsão (ME-AmB).

Através da comparação dos dados das Tabelas 15 e 16 pode-se observar que as concentrações plasmáticas obtidas na administração da ME foram significativamente superiores às obtidas na administração da formulação convencional, sugerindo que o sistema desenvolvido foi eficiente para incrementar o processo de absorção oral da anfotericina B.

Tabela 16: Concentrações plasmáticas de AmB em função de tempo nos animais que receberam ME-AmB por via oral na dose de 50mg/kg, os valores estão representados pela média e desvio padrão.

Tempo (h)	Conc. Plasmática ($\mu\text{g/mL}$)	DP
0,5	0,39	0,042
1,0	0,69	0,046
2,0	0,87	0,076
4,0	0,60	0,068
8,0	0,34	0,022
12,0	0,23	0,018
24,0	0,15	0,016
48,0	0,18	0,005

Também pode ser observado que as concentrações plasmáticas atingidas após a administração da anfotericina B microemulsionada apresenta valores inferiores àquelas obtidas após a administração endovenosa da formulação convencional, o que sugere a necessidade de um ajuste na dose administrada para que a concentração plasmática atinja valores comparáveis quando administrada por via oral.

Na Figura 33 estão relacionados comparativamente os resultados da concentração plasmática da AmB em função do tempo em ratos Wistar machos, os quais receberam a formulação convencional de AmB-desoxicolato i.v. *bolus* a 1mg/kg e por via oral a 50mg/kg .

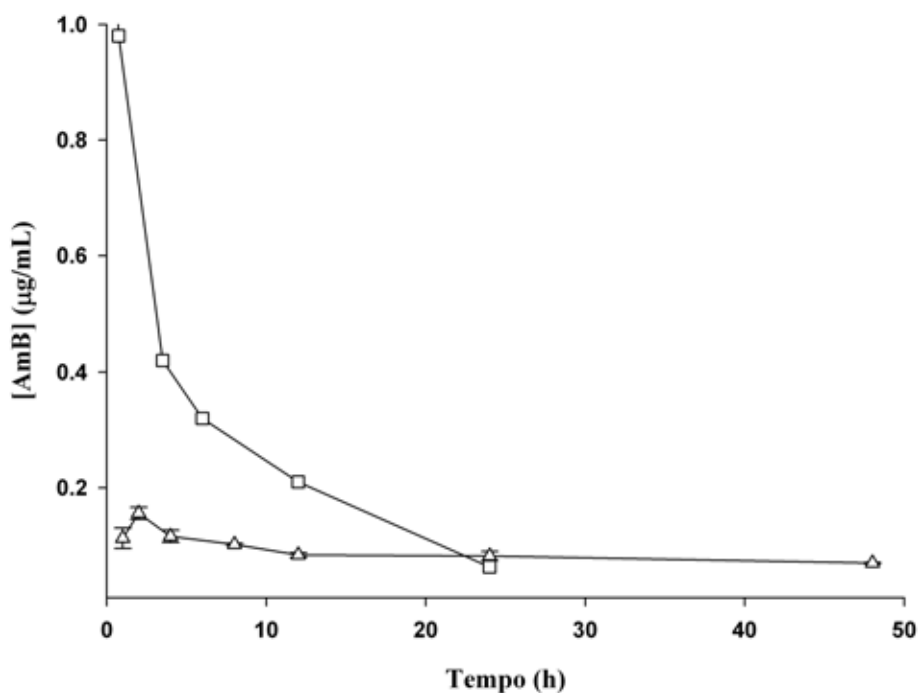


Figura 33: Curva de concentração plasmática de AmB após administração dose única da formulação comercial (D-AmB). (Δ) D-AmB oral 50mg/kg; (□) D-AmB i.v. bolus 1mg/kg.

A biodisponibilidade (F) da AmB administrada por via oral na formulação comercial (D-AmB) calculada a partir dos dados experimentais deste trabalho foi da ordem de 3,5%. Este valor está de acordo com outros resultados da literatura que consideram a biodisponibilidade oral do fármaco inferior a 5% (BENNETT, 2003).

Na Figura 34 estão apresentados os resultados da variação da concentração plasmática da AmB em função do tempo em ratos Wistar machos que receberam 50mg de AmB por via oral veiculada na formulação convencional (D-AmB) e na microemulsão (ME-AmB), ambas em dose única. Sem qualquer tipo de análise mais profunda, verifica-se facilmente que a AmB-microemulsionada apresentou perfil de absorção muito superior ao da formulação convencional de AmB-desoxicolato, em toda

a extensão da curva de absorção, sendo cerca de 5,5 vezes maior no T_{max} . Também está evidente que em tempo prolongado, cerca de 48 horas após a administração oral, os níveis plasmáticos mais baixos da AmB-microemulsionada ainda são cerca de 1.9 vezes superiores aos níveis mais altos alcançados pela formulação convencional da AmB-desoxicolato.

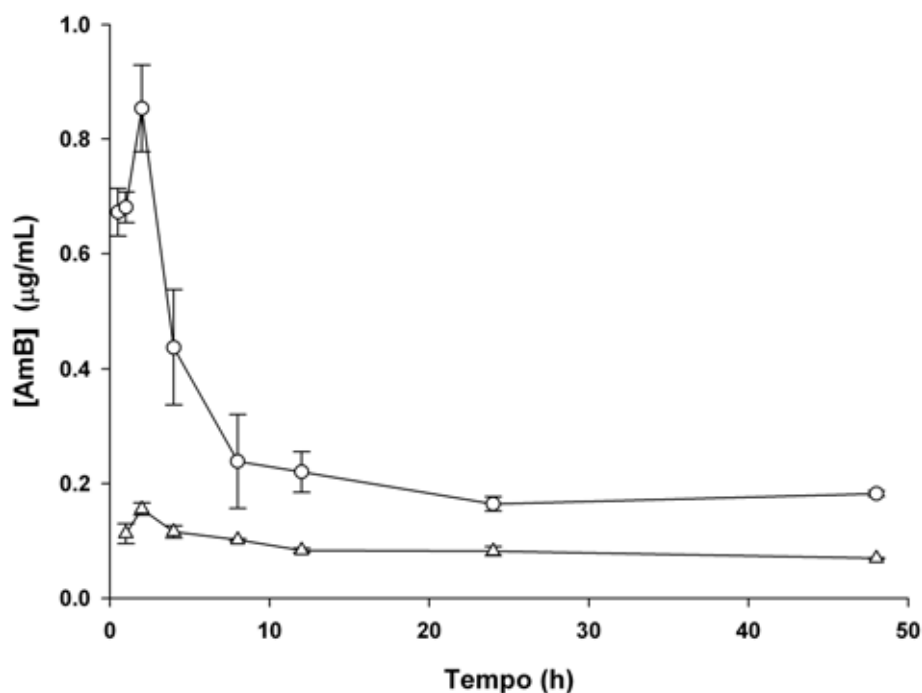


Figura 34: Curva de concentração plasmática *versus* tempo de AmB após administração dose única de 50mg/kg da AmB por via oral. (△) D-AmB; (○) ME-AmB).

Os valores de concentração plasmática após 72h encontraram-se abaixo do limite de quantificação do método analítico, por isso não são apresentados no gráfico.

Na tabela 17 estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos da anfotericina administrada na formulação convencional com desoxicolato (D-AmB) e na microemulsão (ME-AmB) por via oral em dose única de 50mg/kg.

Tabela 17: Parâmetros farmacocinéticos AmB após administração oral da formulação comercial (D-AmB) e da microemulsão (ME-AmB).

Parâmetro	D-AmB	ME-AmB
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*	0,16	0,87
$t_{m\acute{a}x}$ (h)	2	2
ASC_{0-48} ($\mu\text{g.h.mL}^{-1}$)*	4,18	9,34
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g.h.mL}^{-1}$)*	13,63	37,52
$t_{1/2\beta}$ (h)	93,75	109,02
β (h^{-1})	0,0075	0,0066
Vd (L.kg^{-1})	17,6	20,3
Cl ($\text{L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$)	0,132	0,133
F (%)*	3,6	10

* $p < 0,05$; teste Mann-Whitney

$C_{m\acute{a}x}$: concentração plasmática máxima; $t_{m\acute{a}x}$: tempo em que a concentração plasmática é máxima, ASC: área sob a curva; Vd: volume de distribuição; Cl: clearance, $t_{1/2}$: meia vida; β : constante de eliminação; F: biodisponibilidade.

As formulações de D-AmB e ME-AmB apresentaram diferenças significativas nos parâmetros farmacocinéticos quando administradas por via oral. Os parâmetros farmacocinéticos da AmB calculados para a formulação convencional e para a microemulsão apresentaram diferença estatisticamente significantes para $p < 0,05$, teste Mann Whitney (Tabela 17).

A biodisponibilidade oral da AmB veiculada cerca de 2,8 vezes maior que a formulação comercial de desoxicolato. Este aumento significativo da ASC, assim como de $C_{m\acute{a}x}$, na administração da ME pela via oral demonstra que o sistema microemulsionado óleo/água favoreceu a absorção AmB no trato gastrointestinal, provavelmente através do aumento da permeabilidade de membrana.

Finalmente, também foi possível verificar que, no final da determinação farmacocinética o nível plasmático da AmB microemulsionada ainda manteve-se cerca de 1.9 vezes superior em relação à AmB convencional. Embora não tenha havido diferenças significantes no t_{max} , Cl, Vd ou meia vida essa manutenção do nível plasmático superior em tempo prolongado evidencia um efeito reservatório da microemulsão.

4.8. Avaliação dos níveis creatinina

Na Tabela 18 estão apresentados os valores de creatinina plasmática para os animais antes (basal) e após a administração de dose única de D-AmB e ME-AmB 50mg/kg por gavagem em ratos.

Tabela 18: Níveis de creatinina plasmática antes e após a administração de dose única de D-AmB e ME-AmB 50mg/kg.

Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dL)					
Grupo	Basal	Após 24hs	Grupo	Basal	Após 48hs
ME-AmB	3,34 ± 0,41	3,43 ± 0,9	ME-AmB	2,18 ± 0,73	2,29 ± 0,34
D-AmB	1,58 ± 0,3	6,16 ± 1,4*	D-AmB	1,93 ± 0,2	8,1 ± 1,5*

* apresentaram diferenças estatísticas (ANOVA)

Os resultados da relação pré e pós-tratamento do grupo ME-AmB demonstraram que não houve alteração significativa nas concentrações de creatinina após 24 e 48 horas da administração. No entanto para o grupo que recebeu D-AmB os níveis de creatinina foram significativamente maiores 24 e 48 horas após a administração. Estes dados

sugerem que a formulação microemulsionada apresentou habilidade em reduzir os parâmetros bioquímicos relacionados à nefrotoxicidade do fármaco.

Assim, conclui-se que o sistema ME desenvolvido no presente trabalho foi capaz de favorecer a absorção da AmB pela via oral, sem alterar suas características de distribuição e eliminação, e simultaneamente diminuir o risco de nefrotoxicidade.

Como já descrito anteriormente, a nefrotoxicidade da AmB pode estar relacionada com as formas auto-associadas e os resultados obtidos com a ME sugerem a possibilidade de imobilização das moléculas de AmB na interface óleo/água, impedindo a formação de agregados potencialmente tóxicos de AmB e prevalecendo maior proporção de monômeros, em decorrência das dimensões nanométricas das gotículas e da característica oleosa da fase interna do sistema.

5. Conclusão

- Foi possível obter MEs O/A e A/O utilizando FS/Tw 1:1 como sistema tensoativo.
- O raio hidrodinâmico das gotículas é diretamente proporcional ao volume de fase oleosa e inversamente proporcional a porcentagem de tensoativos e aumenta com a incorporação do fármaco ao sistema.
- Os sistemas estudados se comportam como fluidos Newtonianos, apresentando valores de n próximos de 1.
- Observa-se um comportamento anti-tixotrópico em altas proporções de tensoativo ou de fase oleosa.
- A viscosidade dos sistemas aumentou com a fração de volume de fase interna e de tensoativo.
- A incorporação do fármaco não alterou significativamente a viscosidade do sistema.
- A organização estrutural do sistema independe da proporção de fase oleosa e de tensoativo; no entanto, é desfavorecida pela incorporação do fármaco.
- A incorporação da AmB é dependente do volume de fase interna.
- As formulações estudadas comportam-se como sistemas reservatórios *in vitro*, retardando a liberação do fármaco, sendo a velocidade de liberação dependente do volume de fase interna e da proporção de tensoativo.
- O método analítico desenvolvido mostrou-se satisfatório para avaliação da farmacocinética da AmB.
- A microemulsão foi capaz de aumentar a absorção oral da AmB sem induzir aos efeitos nefrotóxicos encontrados na formulação.

Conclusão Geral

A microemulsão desenvolvida é um potencial sistema para administração oral da anfotericina B.

6. Referências Bibliográficas

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M.J., Particle size analysis of concentrated Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **APPS PharmSci.**, v.2, n.3, e.19, 2000.

ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M. J.; DAVIDSON, M. Polarized light microscopy. The Florida State University and Olympus American Inc. Disponível em: <http://www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>. Acesso em 20 mar. 2009.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.G.F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmetico-farmacêutica. **Cosmetics e Toiletries**. v.15, p.96-100, 2003.

ANVISA. Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 12 fev. de 2009.

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

AMATO, V.S.; TUON, F.F.; BACHA, H.A.; AMATO NETO, V.; NICODEMO, A.C. Mucosal leishmaniasis Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**. v.105, p.1-9, 2008.

ARAÚJO, I.B. **Novos Sistemas Carreadores para Anfotericina B: Estudo dos Parâmetros Tecnológicos e Fármaco-tóxicológicos**. 2005. 112f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ªed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

BANNATYNE R.M.; CHEUNG R.; DEVLIN, H.R. Microassay for amphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.11, p.44-46, 1997

BEAUCAGE, G.; ULIBARRI, T.A.; BLACK, E.P.; SCHAEFER, D.W. Hybrid organic inorganic composites, Washington DC, American Chemical Society, 1995. Cap. 9.

BENNETT, J. E. Fármacos antimicrobianos. In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw Interamericana do Brasil Ltda, 2003. cap. 49, p.971-974.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J.T.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Rel.** v.60, p.67-76, 1999.

BRIME, B.; FRUTOS, P.; BRINGAS, P.; NIETO, A. ; BALLESTEROS, M.P.; FRUTOS, G. Comparative pharmacokinetics and safety of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and amphotericin B deoxycholate in animal models. **J. Antimicrobial. Chemother.** v. 52, p. 103-109, 2003.

BRIME, B.; MOLERO, G.; FRUTOS, P.; FRUTOS, G. Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and deoxycholate-amphotericin B in immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans*. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 22, p. 451-458, 2004.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office, 2003, v.4.

CARVALHO, F.C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina.** 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

CIPOLLE R.J.; SOLOMKIN, J.S. Amphotericin B. A textbook for the clinical application of therapeutic drug monitoring. In: TAYLOR, W.J.; CAVINESS, N.H. **Irving: Abbot laboratories, Diagnostics Division**. 1986. p.321-328.

CONSTANTINIDES, P.P. Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects. **Pharm. Res.** v.12, p.1561-1572, 1995.

CORDONNIER, C.; MOHTY, M. ; FAUCHER, C. ; PAUTAS, C. ; ROBIN, M. ; VEY, N. ; MONCHECOURT, F. ; MAHI, L. ; RIBAUD, P. Safety of a weekly high dose of liposomal amphotericin B for prophylaxis of invasive fungal infection in immunocompromised patients: Prophosome Study. **Int. J. Ant. Ag.** v.31, p. 135-141, 2008.

CORNELL, B.A.; MIDDLEHURST, J.; SEPAROVOIC, F. Small unilamellar phospholipids vesicles and the theory of membrane formation. **Faraday Disc. Chem. Soc.** v.81, p.163-167,1986.

CORREA, M.A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M.C.; OLIVEIRA, A.G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Colloids and Surfaces B.** v.43, p.108-114. 2005.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; MAIETTI, A.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and microemulsion. **Int. J. Pharm.** v.159. p. 95-103, 1997.

DALMORA, M. E. A.; DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, A.G.; Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. *In vitro* drug delivery and *In vivo* topic anti-inflammatory effect. **Int. J. Pharm.** v.22, p. 45-55, 2001.

ECHEVARRIA I.; BARTUREN C.; RENEDO M. J.; DIOS-VIEITEZ M. C. High-performance liquid chromatographic determination of amphotericin B in plasma and tissue. Application to pharmacokinetic and tissue distribution studies in rats. **J. Chromatogr. A.** v.919, p.171-176, 1998;

ESPOSITO, E.; BORTOLOTTI, F.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Amphiphilic association systems for Amphotericin B delivery. **Int. J. Pharm.** v.260, p. 249-260, 2003

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

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.** 2004. 199f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

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

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

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.V.; FRANZINI, C.M.; SILVA- JR, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA A.G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.63, p. 287–295, 2008.

FRANZINI, C.M. **Microemulsões e subemulsões contendo Anfotericina B para administração oral.** 2006. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

GALERA, R.M.L. **Anfotericina B: determinación en diversos fluidos biológicos por cromatografía líquida. Aplicación a estudios farmacocinéticos y de estabilidad química.** 2000. 109f. Tese (Doutorado) - Unidad de Monitorización de Fármacos del Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona. Barcelona, 2000.

GALLIS, H.A.; DREW, R.H.; PICKARD, W.W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev. Infekt. Dis.** v.12, p. 1165-1169, 1990.

GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsion and microemulsion. In: **Drug and the pharmaceutical science.** New York: Marcel Dekker, 1996. v.73, cap.15, p. 412-519.

GENNARO, A.R (ed). **Remington: the science and the practice of pharmacy.** 20^aed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. p.335-343.

GIANNINI, F. A.; AIMAR, M. L.; SORTINO, M.; GOMES, R.; STURNOLOLLO, A.; JUAREZ, A.; ZACCHINO, S.; ROSSI, R. D. *In vitro* antifungal evaluation and structure activity relationship of 3-H-1,2-dithiole-3-thione derivatives. **Fármaco.** v.59, p.245-254, 2004.

GLATTER, O. *Small-angle-X-rays scattering.* London: Academic Press, 1982.

GRASSI, M.; GRASSI, G.; LAPASIN, R.; COLOMBO, I. Rheology. In: **Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms: A Physical and Mathematical Approach.** New York: Taylor & Francis Group, LLC., 2006. cap.3.

GRASSI M.; GRASSI G.; LAPASIN R.; COLOMBO I. Drug Release from Microemulsions. In: **Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms: A Physical and Mathematical Approach**. New York: Taylor & Francis Group, LLC., 2006. cap.8.

GUINIER, A. Théorie et technique de la radiocristallographie, Paris: Dunod, 1964. Cap.1.

GUTIÉRREZ, L.O.; FERNÁNDEZ, R.E.; DEA-AYUELA, M.A.; TORRADO, J.J.; FERNANDEZ, F.B.; ALUNDA, J.M. *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Int. J. Ant. Ag.** v.30, p.325-329, 2007.

HEREĆ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K.; MORZYCKI, J. W.; GRUSZECKI, W.I. An effect of antibiotic amphotericin B on ion transport across model lipid membranes and tonoplast membranes. **Biochem. Pharm.** v.70, p.668-675, 2005.

HOLMQVIST, P.; ALEXANDRIDIS, P.; LINDMAN, B. Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-Oil Systems by Varying the Oil Type. **Macromolecules.** v. 30, p. 6788-6797, 1997.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap.16, p.299-332.

INSELMANN, G.; INSELMANN, U.; HEIDEMANN, H. T. Amphotericin B and liver function. **Eur. J. Int. Med.** v.13, p.288-292, 2002.

KEGEL, W.K.; OVERBEEK, J.T.G.; LEKKERKERKER, H.N.W. Thermodynamics of microemulsions I, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), **Handbook of Microemulsion Science and Technology**, New York: Dekker, 1999.

KONTIYIANNIS, D. P.; MANTADAKIS, E.; SAMONIS, G. Systemic mycosis in the immunocompromised host: an update in antifungal therapy. **J. Hosp. Infection.** v.53, p. 243-258, 2003.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.** v.54, p.77-98, 2002.

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

LAVRADOR, C.; ALMEIDA, A.J.; CARDOSO, L.A. Avaliação *in vitro* de um injetável subcutâneo para liberação prolongada de um fármaco β agonista. **Port. Ciênc. Vet.** v.97, p.29-34, 2002.

LAWRENCE, M. J.; RESS, D. G. Microemulsion-based as a novel drug delivery systems. **Adv. Drug Delivery Rev.** v.45, p.89-121, 2000.

LINCOPAN, N.; BORELLI, P.; FOCK, R.; MAMIZUKA, E.M.; RIBEIRO, A.M.C. Toxicity of an effective amphotericin B formulation at high cationic lipid to drug molar ratio. **Exp. and Tox. Pat.** v. 58, p.175–183, 2006.

LINDMAN, B.; FRIBERG, S.E. Microemulsions-a historical overview, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999].

LISSI, E.; ABUIN, E.; CUCCOVIA, I.M. & CHAIMOVICH, H. Ion exchange between alkyl dicarboxylates and hydrophilic anions at the surface of cetyltrimethylammonium micelles. **J. Colloid Interf. Sci.** v.112, p. 513-519, 1986.

LISSI, E.; ABUIN, E.; RIBOT, G.; VALENZUELA, E.; CHAIMOVICH, H.; ARAUJO, P.S.; ALEIXO, R.M.V.; CUCCOVIA, I.M. Ion exchange between *n*-alkyl

carboxylates and bromide at surface of cetyltrimethylammonium bromide micelles.

J.Colloid Interf. Sci. 103:139-144, 1985.

LUMBERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J.M. Antifungicos de uso sistêmico.

Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. v.21, p.366-80, 2003.

LYMAN, C.A.; WALSH, T.J. Systematically administered antifungal agents. **Drugs.**

v.44, p.9-35, 1992.

MACKAY,R.A. (1982) Reactions in microemulsions. The ion-exchange model.

J.Phys.Chem. v.86, p.4756-4758, 1982.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de Medicamentos: fundamentos, aplicações aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica.** 2003. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2003.

MERK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological. 12^aed. Withehouse Station, 1996.

MORENO, M.A.; FRUTOS,P.; BALLESTEROS, M.P. Lyophilized lecithn-based oil-water microemulsion as anew low toxic delivery sistem for Amphotericin B. **Pharm. Res.** v.18, p. 344-351, 2001.

MORENO, M.A.; BALLESTEROS, M.P.; FRUTOS,P.; Lecithn-based oil-water microemulsion for parenteral use: pseudothernary phase diagrams, characterization and toxicity studies. **J. Pharm. Sci.** v.22, p. 1428-1437, 2003.

NIRAULA, B.; KING, T.C.; CHUN, T.K.; MISRAN, M. Rheology properties of glucopyranoside stabilized oil–water emulsions: effect of alkyl chain length and bulk concentration of the surfactant. **Colloids and Surfaces A.** v.251, p.117-132, 2004.

NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRON, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.** v.19, p.687-692, 1992.

OLIVEIRA, A.G.; NOTHENBERG, M.S.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. Micellar catalysis of the intramolecular aminolysis of the beta-lactam antibiotic cephaclor. **J. Phys. Org. Chem.** v.4, p.19-24, 1991.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CHAIMOVICH, H. Effect of hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsions on the rate of decomposition of the β -lactam antibiotic cephaclor. **J. Pharm. Sci.** v.86, n.5, p. 616-620, 1997.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Microemulsões I: Fundamentos Teóricos da formação de Sistemas Microemulsionados. **Infarma** v.13, p.73-79, 2001.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. CERA, L.F.R. Microemulsões II: Aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Infarma** v. 14, n. 7/8, p. 76-80, 2002.

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

OSTERMANN, H.; BRYAN, J. New therapeutic approaches to managing invasive fungal Infections. **Int. J. of Antim. Agents** v.30, p.377-380, 2007.

PAL, R. Shear Viscosity Behavior of Emulsions of Two Immiscible Liquids. **J. Colloid Interface Sci.** v. 225, p.359-366, 2000.

PEMÁN, J.; BOSCH, M.; CANTÓN, E.; VIUDES, A.; JARQUE, I.; GÓMEZ-GARCÍA, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.M.; GOBERNADO, M. Fungemia due to

Candida guilliermondii in a pediatric and adult population during a 12-year period. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.60, p. 109-112, 2007.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **Int. J. Ant. Agents**. v.30, p.108-117, 2007.

RAÚL, A. Z.; EFRAÍN, B. S. **Reacciones adversas a la anfotericina B en pacientes VIH (+) con diagnóstico de micosis sistémica**. 2002. 73f. Tese (Químico farmacêutico) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento Académico de Farmacología, Bromatología y Toxicología, 2002. Disponível: >http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/Tesis/Salud/Arias_Z_R/indice_Arias.htm>. Acesso em 12 fev. 2009.

REX, J.H. O desafio das infecções fúngicas no século XXI. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/fungos21.html>. Acesso em 09/01/08

ROBINSON, R.F.; NAHATA, M.C. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. **J. Clin. Pharm. Ther.** v.24, p.249-457, 1999.

ROSOFF, M. **Surfactant Science Series: Vesicles**. New York : Marcell Deckker, 1996. v.62, p. 491-526.

SCOTT, H. Reology. In: **Remington. The science and practice of pharmacy**. 20^aed. Philadelphia: Editora Lippincott, 2000, cap.23, p.335-355.

SHADONY S., MCCAY J.A., SCHWARTZ S.I. Bioassay for hamycin and amphotericin B in serum and other biological fluids. **Appl Microbiol**. v.17, p.497-503, 1969.

SHAO, P.L. HUANGA, L. M. HSUEH, P.R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int. J. Ant. Ag**. v.30, p.487-495, 2007.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.

TOKUMOTO, M.S. **Evolução estrutural durante a transição sol-gel em suspensões coloidais aquosas de SnO₂: abordagem reológica.** 1996, 95f.. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.

TROTTA, M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsion. **J. Control. Release.** v.60, p.399-405, 1999.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONO, T. Stability of Drug carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.53, p. 206-208, 2002.

URBAN, M.C.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea de acetato de dexametasona.** 2004. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

WARGAFTIG, T. N.; **Desenvolvimento de microemulsões lipídicas estabilizadas com fosfatidilcolina de soja para veiculação de vacina de DNA contra tuberculose.** 2000. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

WOOD, J.H. Reologia Farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.; KANIG, L.J.(Ed). **Teoria e prática na indústria farmacêutica.** 3ªed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, v.1, cap.6, p.210-253.

7. Anexos

7.1. Artigo completo publicado em periódico

PESTANA, K. C., FORMARIZ, T.P., SARMANETO, V.H.V., CHIAVACCI, L.A., SCARPA, M. V., OLIVEIRA, A. G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. v.66, p.253 - 259, 2008.

7.2. Parecer comitê de ética



Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B

K.C. Pestana^a, T.P. Formariz^a, C.M. Franzini^a, V.H.V. Sarmiento^b, L.A. Chivacci^a,
M.V. Scarpa^a, E.S.T. Egito^c, A.G. Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú km 01, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

^b Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP, Rua Francisco Degni, s/n, Quitandinha, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

^c Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde-UFRN, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias s/n, 59010-180 Natal, RN, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2008

Received in revised form 25 June 2008

Accepted 27 June 2008

Available online 4 July 2008

Keywords:

Microemulsion
Amphotericin B
Drug delivery
Rheology
Phase diagram

ABSTRACT

In this work the structural features of microemulsions (MEs) containing the pharmaceutical biocompatible Soya phosphatidylcholine/Tween 20 (1:1) as surfactant (S), Captex™ 200 as oil phase (O), and phosphate buffer 10 mM, pH 7.2 as aqueous phase (W) were studied. Systems obtained with different proportions of the components were described by pseudo-ternary phase diagrams in order to characterize the microemulsions studied here. MEs were prepared with and without the polyene antifungal drug amphotericin B (AmB). The maximum AmB incorporation into the ME system was dependent on both the oil phase and surfactant proportions with 6.80 and 5.7 mg/mL in high contents, respectively. The incorporation of AmB into the ME systems significantly increased the profile of the droplet size of the ME for all ranges of surfactant proportions used in the formulations. The microstructures of the system were characterized by dynamic light scattering (DLS) and rheological behavior. The DLS results showed that the size of the oil droplets increases 4.6-fold when AmB is incorporated into the ME system. In all cases the increase in the proportion of the oil phase of the ME leads to a slight increase in the diameter of the oil droplets of the system. Furthermore, for both the AmB-loaded and AmB-unloaded MEs, the size of the oil droplets decrease significantly with the increase of the S proportion in the formulations, demonstrating the efficiency of the surfactant in stabilizing the ME. Depending on the ME composition, an anti-thixotropic behavior was found. The maximum increases of the consistency index caused by the increase of the oil phase of the ME were of 17- and 25-times for the drug-loaded and drug-unloaded MEs, respectively. However, the observed effect for the drug-loaded ME was about 4.6 times higher than that for the drug-unloaded one, demonstrating the strong effect of the drug on the rheological characteristics of the ME system. Therefore, it is possible to conclude that the investigated ME can be used as a very promising vehicle for AmB.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Invasive fungal infections are an important cause of morbidity and mortality among immunodeficient patients (transplants, chemotherapy, AIDS) [1–3]. Amphotericin B (AmB), 3-(4-amino-3,5-dihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxy-19,25,27,30, 31,33, 35,37octahydroxy-18,20,21-trimethyl-23-OxO-22,39-dioxabicyclo [33.3.1] nonatriaconta-4,6,8,10,12,14,16-heptan-38-carboxylic acid (Fig. 1), a broad spectrum antifungal agent mainly used for the treatment of invasive fungal infections [4–6], acts on the ergosterol, a steroid present in the membrane of the fungal cells by increasing

its permeability, which promotes an ion influx into the parasite, thus leading to its death [7,8]. This molecule has the broadest spectrum of activity of all available antifungal agents [9].

The high toxicity of AmB in its conventional formulation, a micellar desoxycholate (D-AmB), has been successfully prevented in other types of AmB formulations [10,11]. The novel lipid-containing formulations of AmB (i.e. liposomes, microemulsions) have been developed in an attempt to decrease its nephrotoxicity and increase its potential therapeutic effect [5].

Colloidal systems, such as microemulsions (MEs), have been investigated as drug delivery and targeting, since these systems can incorporate drug compounds modifying their bioavailability and stability and reducing their side effects [12,13]. These structures have considerably been investigated as drug delivery systems and have also been used to dissolve water-insoluble drugs in

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 6974; fax: +55 16 33016960.
E-mail address: oliveia@fcfar.unesp.br (A.G. Oliveira).

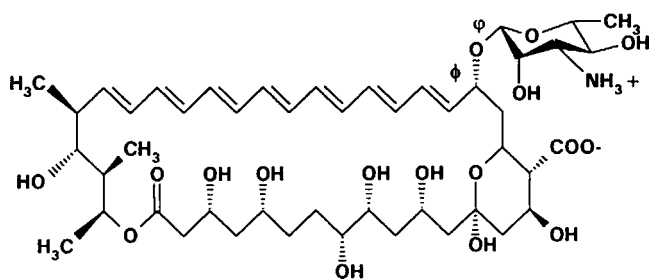


Fig. 1. Chemical structure of AmB.

aqueous medium or water-soluble drugs in lipophilic medium [14]. An ME is a system which contains water and oil coexisting in thermodynamic equilibrium due to the presence of a surfactant film at the oil–water interface [15–17]. It is formed spontaneously and exhibits typical physicochemical properties, such as optical transparency and isotropy, a wide range of viscosity and thermodynamic stability [15,18]. Usually, the system contains surfactants and cosurfactants to achieve the low interfacial tension and required packing parameters [19]. MEs differ from conventional emulsions not only by their much smaller structural size but also by their thermodynamic stability [20].

Modifications in the composition of the ME can promote changes in its structural features and consequently in its mechanical behavior and may constrain the extent of mobility and direction of the movement of the molecules dissolved in such systems [15,21]. It is known that less ordered microemulsion systems usually have reduced viscosity, while the more ordered hexagonal and cubic phases show the elastic properties of solids. As the mobility of molecules is higher in liquid than in solid systems, such structural modifications can raise the rate and the profile of drug delivery [14,21].

In this work, an ME stabilized by the mixture of phosphatidylcholine and neutral polysorbate hydrophilic surfactant was studied. The systems were characterized in a pseudo-ternary phase diagram. The diameter distribution of the oil phase was analyzed in relation to the used surfactant and oil phase contents. Rheological studies were performed by controlled-stress rheological analysis. The variation of the droplet diameter and rheological properties were studied in the presence and absence of AmB incorporated into the ME system.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soya phosphatidylcholine (SPC), (Epikuron 200™) was purchased from Degussa Texturants Systems Deutschland GmbH & Co. (Hamburg, Germany); amphotericin B powder, lot 596/07, was kindly provided by Cristalia, Brazil. Captex 200™ (propylene glycol dicaprylate/dicaprate) (O) was kindly provided by Abitec Corporation, (Janesville, USA). Phosphoric acid P.A. and polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20) (Tw) were from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, USA). Water was purified in a Milli Q Plus system (Millipore) and its resistivity was 18.2 MΩ cm. All other solvents and chemicals were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Pseudo-ternary phase diagram

The appropriated proportions of SPC/Tw for the surfactant mixture (S) were previously established in this study as 1:1 (w/w), and thus the surfactant mixture provided a sufficiently clear system

conceptually consistent with the ME structure. Captex 200™ (O) was added to the semisolid mixture of SPC/Tw (S) in suitable ratios from 1:9 to 9:1 (w/w) to obtain the phase diagram. To the constantly stirred semisolid mixture (1.0 g), containing S and O, the aqueous phase (W) was slowly added with a precision burette. The transitions from semisolid mixture to optically clear ME and then from clear ME to translucent colloidal ME were sharp and reproducible to within 0.05 mL of W. The titrations were carried out in a controlled-temperature room at 25 ± 0.1 °C. MEs were prepared 4 h before the experiments and maintained at 25 ± 0.1 °C to allow the system to reach complete equilibrium.

2.2.2. Microemulsion preparation

Selected weights of SPC and Tw were mixed to obtain S. To the semisolid mixture of SPC/Tw, an appropriate amount of O was added. To the constantly stirred mixture containing S and O, the aqueous phase was slowly added. This additional sequence enabled the homogenization of the surfactant. Subsequently, the system was maintained under agitation using a 220-W Ultrasonic Liquid Processor, model XL 2020 (USA), operating in a discontinuous mode, for 20 min at room temperature. The mixture was left for 10 min in a thermostatic chamber at 25 ± 0.1 °C. The samples were centrifuged at 8500 × g in an Ultracentrifuge Hitachi Himac CP-80 (Japan) for 15 min, to eliminate the titanium residues that could be released from the sonicator tip. The appropriated amounts of AmB were dissolved directly in the microemulsion (ME) previously prepared. The formulations used in this work are described in Table 1 and characterized in Fig. 2.

2.2.3. Maximum incorporation of AmB into microemulsion

Microemulsions containing SPC/Tw (S), CP (O), and buffer phosphate 10 mM pH 7.2 (W) were prepared in triplicate (Table 1). Three milliliters of the ME were transferred to the sonication tube. An excess of AmB was added, and the system was submitted to a tip ultra-sound vibration for 20 min. After sonication, the mixture was left for 10 min in the thermostatic chamber at 25 ± 0.1 °C. The MEs were centrifuged at 8500 × g in a Hitachi Himac CP-80 Ultracentrifuge (USA) for 15 min to remove the drug excess. The supernatant was recovered and carefully filtered using a 0.45 μm membrane. The filtrate was diluted and dissolved in methanol for the quantitative analysis of the AmB by HPLC.

2.2.4. Quantitative analysis of AmB

The AmB was analyzed by HPLC using a Chromatograph Waters® Alliance (USA) with automatic sample injector and Symmetry® C18 column 150 mm × 4.0 mm with a 5 μm particle size. The mobile phase was acetonitrile:EDTA 25 mM in a gradient mode (from 35:65 to 70:30 (v/v)), with a flow rate of 0.4 mL min⁻¹, a column temperature of 25 °C, rheodyne injector with 100 μl loop, and UV-vis detector at 410 nm.

2.2.5. Dynamic light scattering (DLS)

The particle size analysis was carried out using a dynamic light scattering (DLS) apparatus (Brookhaven Instruments Corporation, EMI 9863 model (USA) with laser source He–Ne 10 mW, 532 nm-HUGHES, self-correlator, 64 channels). Before analysis the samples

Table 1
Composition of the ME formulations

ME composition (w/w) (%)	ME A	ME B	ME C	ME D	ME E	ME F	ME G
SPC/Tw (1:1) (S)	20	20	20	20	10	15	25
CP (O)	3	6	10	17	10	10	10
Aqueous phase (W)	77	74	70	63	80	75	65

See Fig. 2 for phase diagram location.

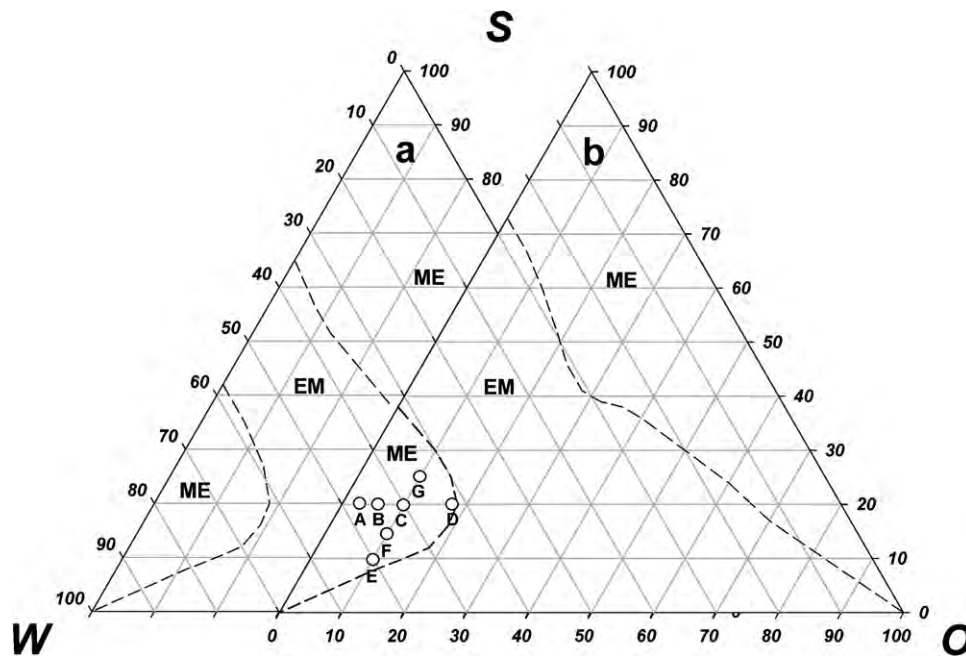


Fig. 2. Pseudo-ternary phase diagram for the system containing SPC/Tw (S), Captex™ (O), and aqueous buffer (W). Key: (a) AmB-unloaded ME, (b) AmB-loaded ME, (ME) microemulsion, (EM) emulsion and (○) specific compositions of the studied MEs, 25 °C. See Table 1 for ME formulation details.

were diluted with buffer phosphate 10 mM pH 7.2 and filtered (0.22 μm). The size measurements were carried out at fixed angle of 90°. The correlator was operated in parallel mode and the cumulant method of analysis was used to calculate the mean sample size according to the intensity of scattered light (Z -average diameter). The results are the mean and standard deviation (S.D.) of at least 10 measurements of the samples. The measurements were performed at 25 ± 0.2 °C.

2.2.6. Rheological measurements

The rheological properties of drug-loaded and drug-unloaded MEs were determined using a controlled-stress Carrimed CSL 100 rheometer (TA instruments) with cone-plate geometry. The cone-plate geometry is a 2° stainless steel cone with a 4 cm diameter and a gap of 55 μm between the cone and plate. The experiments were performed with a shear rate ($\dot{\gamma}$) in the range of 0–400 s⁻¹. The used shear rate regions were selected due to the resisting abilities against the applied stresses. The rheological measurements were performed for both up and down curves. The data of the shear cycle were fitted to the power-law model using the Rheology Solutions Software (version Data V1.1.7, TA Instruments). All rheological determinations were carried out in triplicate for all samples and at 25.0 ± 0.2 °C.

3. Results and discussions

The pseudo-ternary phase diagram that describes the experimental conditions in which the components must be combined to form clear preparations is of relevance to characterization of ME systems. For the MEs stabilized with SPC/Tw, the pseudo-ternary phase diagram (Fig. 2) describes the wide range of possibilities to obtain domain regions of clear systems in the phase diagram where O/W microemulsions prevail. The surfactant used in this work was selected from previous studies with initial ME formulations containing various SPC/Tw mixtures providing a different hydrophilic–lipophilic balance (HLB). The HLB describes the simultaneous attraction of the surfactant mixture for the oil and aqueous

phases. When it is similar to the required HLB of the ME oil phase, the system provides the minimum energy condition for ME formation. The composition of the surfactant system SPC/Tw 1:1 (w/w) was established in order to obtain the HLB value to provide the clearest system used in the pseudo-ternary phase diagram. This condition serves to optimize the solvation requirements of the surfactant and minimizes the free energy of the overall system. When SPC/Tw surfactant was incorporated into the immiscible mixture of O and aqueous buffer (W), the surfactant molecules could be located in the oil–water interface, which is thermodynamically very favorable to stabilizing the ME system.

For the system containing AmB, a very similar domain region for oil-in-water ME was obtained in the phase diagram (Fig. 2). In this particular region of interest, the ME formulations were selected in order to obtain oil-in-water systems. Although the phase diagram described in Fig. 2 is shown here with only the intention to illustrate the ME region used in this study, the results were very interesting because they reveal that the ME exists at infinite dilution in water. The points A–D shown in Fig. 2 represent the specific composition of the formulations ranging up to the oil phase proportion. On the other hand, the points E–G represent the variations in the surfactant proportion.

The data of the pseudo-ternary phase diagram (Fig. 2) shows that it is possible to add a great volume of the aqueous phase and a limited volume of the oil phase maintaining the thermodynamic stability of the O/W systems. For both with and without AmB, the O/W microemulsion region in the pseudo-ternary phase diagram was verified within the limit of 20% of the oil phase. After the system becomes opaque with transition to conventional emulsion, the distinct transition from emulsion (EM) to ME could be observed. In the presence of AmB, the area of the ME begins to appear with approximately 60% of the aqueous phase (Fig. 2).

In the presence of AmB, the area of EM (Fig. 2a) is greater than that observed in the absence of the drug (Fig. 2a–b). Depending on the oil phase contents, a minimum of about 25% of the aqueous phase was necessary to form the conventional EM phases. MEs with high oil content were identified in the region of 0–25% of the aqueous

ous phase proportions. Additionally, this was observed not only in the presence of AmB but also in the range of 0–35% in its absence. In the pseudo-ternary phase diagrams with and without AmB, the W/O ME allows the infinite dilution with the oily phase maintaining its thermodynamic stability (Fig. 2).

MEs systems are presented on both sides of the pseudo-ternary phase diagram (Fig. 2) showing oil-in-water and water-in-oil ME systems mutually separated by an opaque transition region with greater internal microstructure, but that can be changed into either of the systems depending on the component proportions. Thus, when the oil phase proportion was increased, the system became cloudy, indicating a change in the internal microstructure. In fact, rheological measurements show that when the oil phase proportion increases together with the decrease of the surfactant amount, the apparent viscosity of these systems increases, indicating the microstructure modifications.

The remainder region of the phase diagram represented by opaque systems (EM) involves the conventional emulsions. Furthermore, we have found that in the interest region of the phase diagram, which represents W/O ME with high content of the aqueous phase, the incorporation of AmB did not induce significant changes in the phase diagram region of ME–AmB (Fig. 2). The systems remained isotropic and optically transparent and, after $8500 \times g$ centrifugation for 15 min, no phase separation or solid sediment was observed. Thus, the stabilization of the system with SPC/Tw provides the best condition to reduce the interfacial tension and to allow the formation of the smallest possible size of the internal phase to obtain optically clear systems [22–25].

Light scattering is a routine technique to determine the diameter of the internal phase of MEs. The light scattering measures were made for liquid MEs, which were diluted with aqueous buffer in order to detect experimental errors [26]. The diameters of the oil droplets are shown in Figs. 3 and 4.

The data showed to be dependent on the ratio of surfactant (Fig. 3) and oil phase (Fig. 4) in the ME formulations. We can verify that for both drug-loaded and drug-unloaded ME the diameters of the structures decrease with the concentration of surfactant (Figs. 3 and 4).

For AmB-loaded ME we found that when the S proportion increased, its mean droplet size diameter decreased from 205 to 82 nm (Fig. 3). This occurred slowly in smaller proportions of S, and sharply between 20% and 25% of S. The abrupt reduction

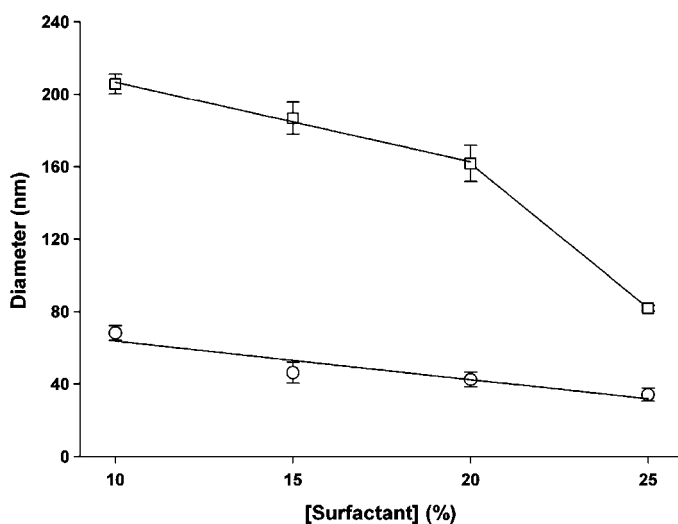


Fig. 3. Effect of the surfactant proportion on the diameter. Key: (□) AmB-loaded ME and (○) AmB-unloaded ME, 25 °C. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

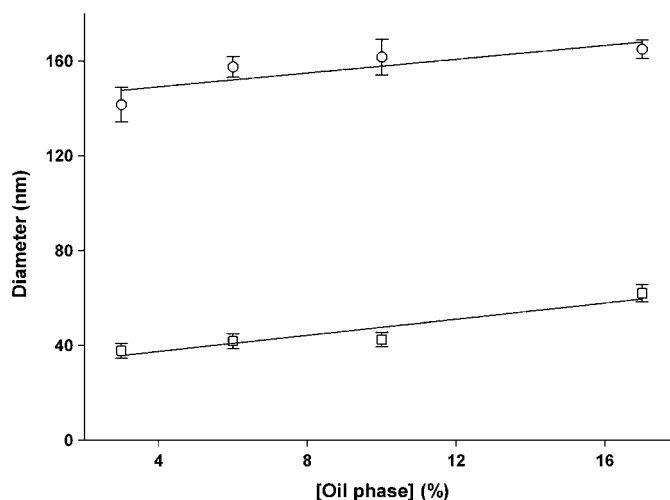


Fig. 4. Effect of the oil phase on the diameter of the ME. Key: (○) AmB-loaded ME and (□) AmB-unloaded ME. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

verified in the final range of S contents can be related to an additional dissolution of AmB fraction from the oil–water interface caused by the excess of the surfactant in the bulk of the dispersion medium.

For drug-unloaded ME, the mean droplet size diameter was about 3.0-fold lower than that for AmB-loaded ME with low S content. The results show a linear dependence with little slope by the effect of the S proportion (Fig. 3). The decrease of the mean diameter of the droplets was from 68.3 to 34.1 nm, in the range of 10–25% of S, respectively. The decrease in droplet size diameter allowing the formation of clear to semi-transparent systems, demonstrating the good effect of the 1:1 (w/w) SPC/Tw ratio in the reduction of the interfacial tension for the ME stabilization [22–23]. This profile can be explained since the surfactant organizes as a monolayer at the oil–water interface reaching saturation in high proportions and leading to minimum droplet size diameters [13,27].

The change of the hydrodynamic diameter of the oil droplets as a function of the oil ratio is shown in Fig. 4.

Since the experimental data were obtained with a fixed proportion of S (20%), the droplet size diameter values achieved in the low oil phase content were about 141.6 and 37.7 nm, for the drug-loaded and unloaded ME, respectively. It was shown that the oil phase has little effect on the mean droplet size diameter. This profile shows that the S proportion was sufficient to cover the entire oil–water interface and provide a thermodynamically stable system.

Therefore, we have found that the AmB incorporation into the ME modified the droplet size diameter profile of the internal oil phase of the ME. For both the surfactant and oil phase, the effect on the mean droplet size diameter profile of the AmB-loaded ME was more pronounced in all ranges of component proportions (Figs. 3 and 4). One hypothesis to explain the biggest diameters of the oil droplets when AmB was incorporated into the ME system is related to the hydrophobic property of the AmB molecule in the studied pH region. Besides, since the pK_a value of the amino group of AmB was taken as 5.7 for $-\text{COOH}$ and 10.0 for $-\text{NH}_2$, under the experimental conditions (pH 7.2), the AmB is amphoteric and very slightly water soluble, and then can be favorably partitioned into the oil phase. In this condition the AmB can be considered as an additional fraction of the oil phase added to the ME system, increasing the droplet volume. Moreover, as the AmB molecule also exhibits amphiphilic properties, a fraction of the drug molecules can incorporate as a spacer into the surfactant monolayer at the oil–water interface, leading to an increase in droplet

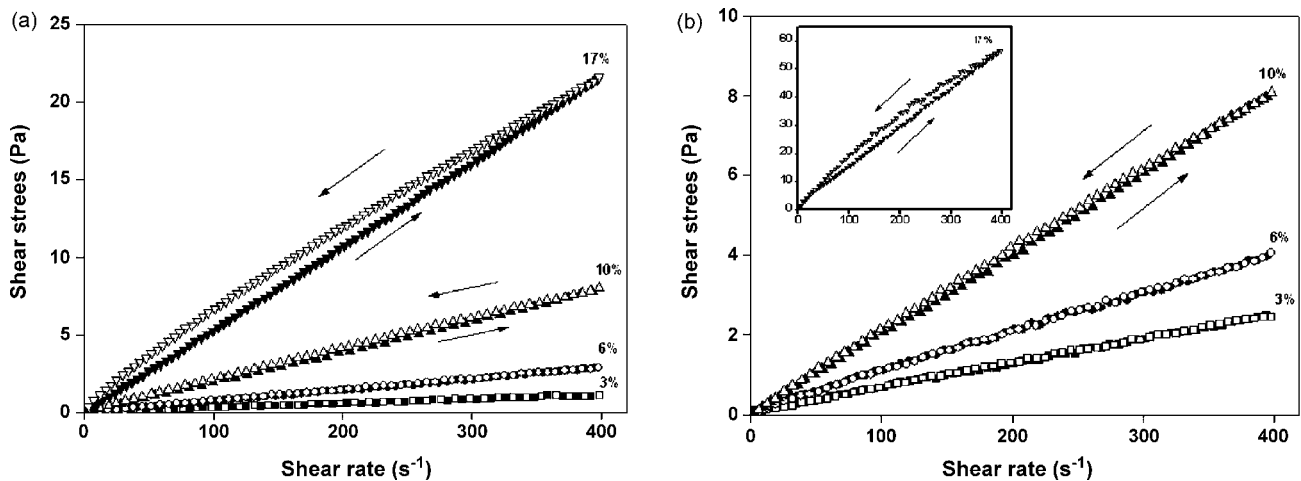


Fig. 5. Rheological behavior of the ME stabilized with SPC/Tw in function of the oil phase. (See Table 1 for formulation details). Key: (a) AmB-unloaded ME and (b) AmB-loaded ME.

size. Thus, these phenomena can explain the parallel shift between AmB-unloaded and AmB-loaded ME data observed in Fig. 4.

The data in Figs. 5 and 6 show the rheological profile of the samples and correlate the shear stress (τ) and the shear rate ($\dot{\gamma}$) relationships. The response of the anti-thixotropic properties of the ME to stepwise changes of shear rate is shown in Fig. 5a–b.

It was found that for both drug-loaded and drug-unloaded MEs this property decreased with the increase of the oil phase proportion in the system. The addition of AmB to the ME system has a little effect on this property. The results in Fig. 5 demonstrate that the thixotropic ME becomes more mobile with the stirring.

The results of the surfactant effect on rheological behavior of drug-loaded and drug-unloaded MEs are shown in Fig. 6a–b.

The flow curves revealed that the majority of the ME systems showed a non-linear relationship between the shear stress (τ) and shear rate ($\dot{\gamma}$), which is characteristic of a non-Newtonian flux material. It was verified that the anti-thixotropic response was very similar to that observed for the oil phase (Fig. 6a–b). In fact, the flow curves revealed that, especially in high S and O contents, the ME systems showed a non-linear relationship between the shear stress and the shear rate, exhibiting a non-Newtonian profile. In this case the viscosity is dependent on the shear rate, pressure, temperature, and time [28]. Because of these properties, the systems behave as

pseudoplastic ones, and a power-law model can be used to describe the flow characteristics of the MEs. Thus, the flow behavior can be described by the Eq. (1) [29]:

$$\tau = k(\dot{\gamma})^n \quad (1)$$

where k is a constant parameter related to the viscosity (consistency index) and n is the flow behavior index. In this model $n > 1$ represents a dilatant fluid, $n < 1$ represents a pseudoplastic fluid, and Newtonian fluids have an n value of unity.

In general, the changes in the material caused by the shearing process increase the apparent viscosity under the shear stress. However, the structure is gradually recovered when the stress is removed [30,31]. On the other hand, the results of our system showed that despite the rheological curves showing a decrease of the viscosity, a more ordered arrangement was observed after the shearing process, typical behavior of anti-thixotropic systems.

This is a desired property in pharmaceutical dispersions as ME, especially for pseudoplastic systems, because the decrease of the viscosity facilitates not only the drug administration but also the ME preparation. Moreover, the more ordered system formed after the shearing process may be responsible to prolong or modify the drug release profile. For the AmB-unloaded ME, the thixotropic behavior was negligible, highlighting the AmB role in the ME weak

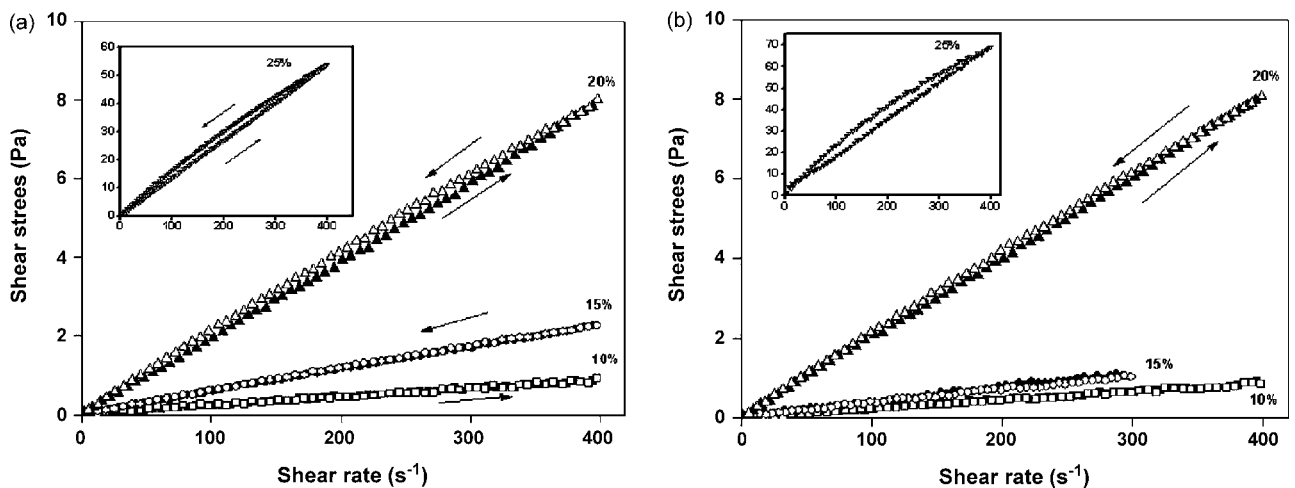


Fig. 6. Rheological behavior of the ME stabilized with SPC/Tw in function of surfactant ratio. Key: (a) AmB-unloaded ME and (b) AmB-loaded ME. See Table 1 for formulation details.

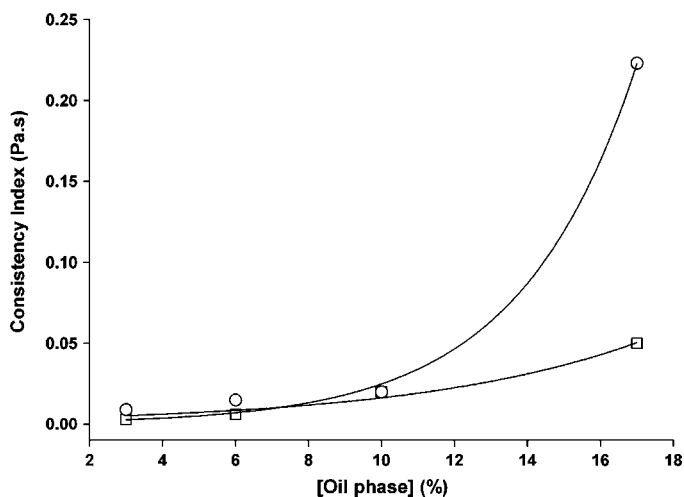


Fig. 7. Consistency index of the ME stabilized with SPC/Tw in function of the oil phase content. Key: (○) AmB-loaded ME and (□) AmB-unloaded ME. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

thixotropy. It is known that the thixotropic property progressively breaks down on shearing and slowly rebuilds more organized arrangements at rest for a time period [32,33]. Furthermore, these results show that the addition of AmB to the ME system does not cause interactions between the dispersed droplets. In this case the decrease in the shear rate during the rheology analysis induces the formation of new structures which temporarily decrease the viscosity, providing conditions for the existence of thixotropy.

The apparent viscosity of the ME is directly related to the consistency index that is measured directly from the slope of the rheological curves. Figs. 7 and 8 show that for both the AmB-loaded and AmB-unloaded MEs, the values of the consistency index varied slightly in low proportions of O and S. The AmB incorporation into the ME led to a sharp rise in its consistency index in high proportions of O compared with the empty ME. This phenomenon is in agreement with the results of Figs. 3–4, showing a significant contribution of AmB in increasing the diameter of the droplets of the internal phase ME.

In addition, the effect of the S content on the modification of the consistency index discloses that the profile also leads to an increase in this parameter when compared with the empty

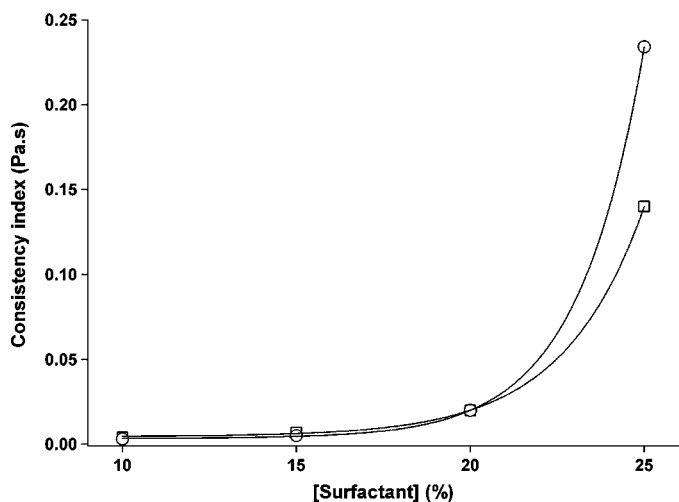


Fig. 8. Consistency index of the ME stabilized with SPC/Tw in function of surfactant ratio. Key: (○) AmB-loaded ME and (□) AmB-unloaded ME. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

ME (Figs. 7 and 8). This effect can be explained since the interaction of AmB with the oil droplets provokes the formation of more voluminous microstructures, which are reflected directly in the consistency index. In fact, the light scattering analysis showed larger diameters for the internal oil droplets when AmB was incorporated into the ME (Figs. 3 and 4). Also, it is well known that the increase of the oil phase and surfactant contents leads to an enhancement of the consistency index [33,34].

In this work all the n determined values were less than unities, indicating that these systems behave as pseudoplastic shear-thinning fluids. This behavior is due to the orientation of droplets towards the flow caused by shearing of the system. In these conditions, the consistency index is strongly influenced by the size of the droplets [35]. For both the AmB-loaded and AmB-unloaded MEs, the values of the consistency index increase about 18- and 25-fold with the oil phase proportion, respectively.

The variation of the consistency index (Figs. 7 and 8) verified in our results could be due to the properties of the oil phase and also to the modifications achieved on the diameter of the oil droplets. For diluted ME systems, the oil droplets were scarce and have no or little effect on the viscosity. But when the diameter increases, or the number of droplets increases per unity of volume, the droplet–droplet interactions become predominant and then the frictional effects can lead to the consistency index increase.

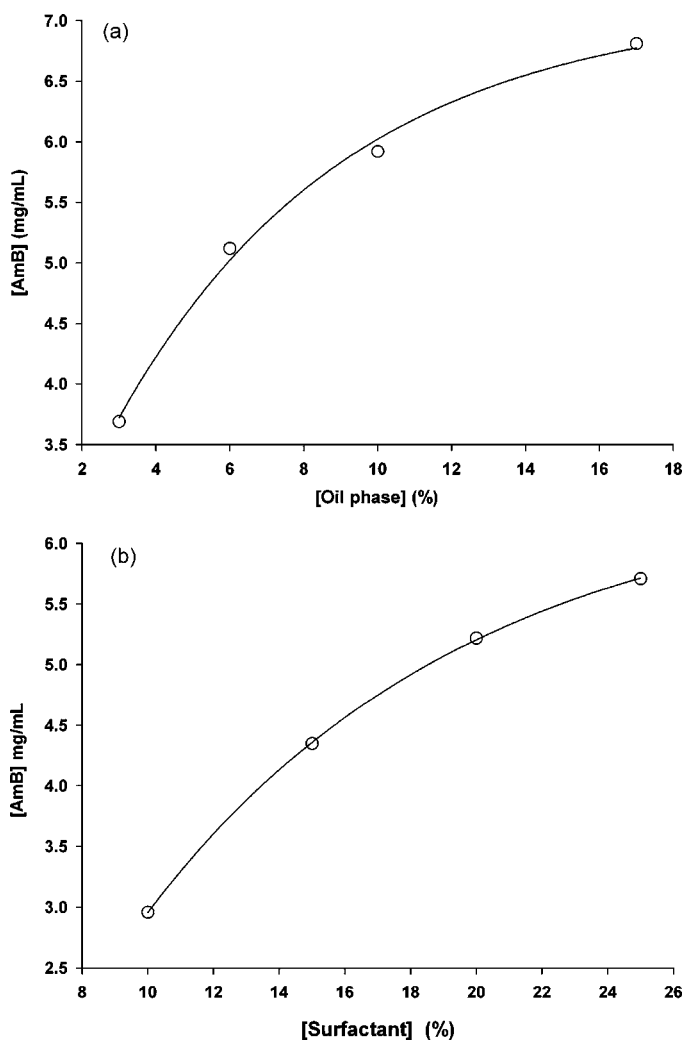


Fig. 9. Incorporation of the AmB in the microemulsion system. (a) Effect of the oil phase and (b) effect of the surfactant contents. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

Since in the experimental conditions the water solubility of AmB can be considered negligible, we have verified the effect of the proportions of the oil phase and the surfactant proportions on the solubility of the drug. The results of the association of AmB to ME, the effect of the oil phase proportions and the surfactant contents are shown in the solubility diagram of Fig. 9a–b.

The concentration of the dissolved AmB was remarkably increased by the addition of the oil phase (Fig. 9a) and surfactant (Fig. 9b), increasing probably up to a plateau in high proportions of these components. These features clearly demonstrate that AmB interacts strongly with the internal phase of the ME system through a hydrophobic effect. This rate of AmB association to ME is typical of the neutral drugs incorporation into supramolecular aggregates as micelles and microemulsions [36–38]. In fact, since the pK_a values of AmB were 5.2 and 10.0 for the carboxylate and amino groups, respectively, at the experimental pH region AmB is an amphoteric compound, and then it is formally neutral and may interact with microemulsion aggregates through hydrophobic effect, associating predominantly into the oil phase.

Furthermore, since this ME system also exhibited great physical stability, we could rationalize the most appropriate ME formulation for incorporation of AmB. We found that in the range of the experimental conditions, the maximum incorporation of AmB into the ME system was about 6.80 mg/mL of the ME. This is a quite sufficient concentration, higher than the required dose for use in antifungal therapy, which is 5 mg/mL. Thus, the aqueous solubility of AmB was significantly increased by association with neutral MEs which offer many promising features for their possible widespread use as a vehicle for AmB administration.

4. Conclusions

The results of this work show that it is possible to obtain oil-in-water and water-in-oil microemulsions stabilized by mixed surfactant SPC/Tw. The pseudo-ternary phase diagram demonstrates that clear systems such as oil-in-water microemulsions exist in a defined region of high water contents and that the increase in the oil phase leads to the formation from a transition region to a conventional emulsion region followed by a water-in-oil microemulsion. The O/W ME system of interest was thermodynamically stable, appropriate from the rheological point of view and from its droplet size distribution. Since it also allowed the incorporation of appropriate AmB concentrations for therapeutic administration, we can conclude that the investigated ME system can be a promising vehicle as a new drug-carrier for AmB.

Acknowledgements

The authors wish to thank FAPESP, CNPq, and CAPES for their financial support and Glenn Hawes, from the American Language Program of the University of Georgia, for editing this manuscript.

References

- [1] G. Petrikkos, A. Skiada, *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 (2007) 108.
- [2] J. Pemán, M. Boscha, E. Cantón, A. Viudes, I. Jarque, M. Gómez-García, J.M. García-Martínez, M. Gobernado, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60 (2008) 109.
- [3] P.L. Shao, L.M. Huang, P.R. Hsueh, *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 (2007) 487.
- [4] E. Esposito, F. Bortolotti, E. Menegatti, R. Cortesi, *Int. J. Pharm.* 260 (2003) 249.
- [5] B.K. Yoo, M.A.J. Miah, E.S. Lee, K. Han, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 1700.
- [6] B. Brime, P. Frutos, P. Bringas, A. Nieto, M.P. Ballesteros, G. Frutos, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 103.
- [7] N. Lincopana, P. Borell, R. Fockb, E.M. Mamizukab, A.M. Carmona-Ribeiro, *Exp. Toxicol. Pathol.* 58 (176) (2006) 175.
- [8] V.S. Amato, F.F. Tuon, H.A. Bacha, V. Amato Neto, A.C. Nicodemo, *Acta Trop.* 105 (2008) 1.
- [9] C. Cordonnier, M. Mohty, C. Faucher, C. Pautas, M. Robin, N. Vey, F. Monchecourt, L. Mahi, P. Ribaud, *Int. J. Antimicrob. Agents* 31 (2008) 135.
- [10] J.W. Lee, M.E. Petersen, P. Lin, D. Dressler, I. Bekersky, *Ther. Drug Monit.* 23 (2001) 268.
- [11] B. Brime, G. Molero, P. Frutos, G. Frutos, *Eur. J. Pharm. Sci.* 22 (2004) 451.
- [12] T.P. Formariz, M.C.C. Urban, A.A. Silva-Júnior, M.D. Gremião, A.G. Oliveira, *Braz. J. Pharm. Sci.* 41 (2005) 301.
- [13] T.P. Formariz, V.H.V. Sarmento, A.A. Silva-Junior, M.V. Scarpa, C.V. Santilli, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 51 (2006) 61.
- [14] M.A. Correa, M.V. Scarpa, C.M. Franzini, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 43 (2005) 106.
- [15] A.G. Oliveira, M.V. Scarpa, M.A. Correa, L.F.R. Cera, T.P. Formariz, *Química Nova* 27 (2004) 138.
- [16] E.J. Acosta, T. Nguyen, A. Witthayapanyanon, J.H. Harwell, D.A. Sabatini, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 1275.
- [17] J.S. Yuan, M. Ansari, M. Samaan, E.J. Acosta, *Int. J. Pharm.* 349 (2008) 130.
- [18] M.A. Polizelli, A.L. Santos, E. Feitosa, *Colloids Surf. A* 315 (2008) 130.
- [19] D. Libster, A. Aserin, N. Garti, *J. Colloid Interface Sci.* 302 (2006) 322.
- [20] M. Gradzielski, *Curr Opin, Colloid Interface Sci.* 13 (2008) 263.
- [21] T.P. Formariz, L.A. Chiavacci, V.H.V. Sarmento, C.V. Santilli, E.S.T. Egito, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 60 (2007) 28.
- [22] S. Avramiotis, V. Beckiari, P. Lianos, A. Xenaskis, *J. Colloid Interface Sci.* 195 (1997) 331.
- [23] H.N. Bhargava, A. Narurkar, L.M. Lieb, *Pharm. Tech.* 3 (1987) 54.
- [24] W.K. Kegel, J.T.G. Overbeek, H.N.W. Lekkerkerker, *Thermodynamics of microemulsions. I*, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999.
- [25] B. Lindman, S.E. Friberg, *Microemulsions—a historical overview*, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999.
- [26] D. Orthaber, O. Glatter, *Chem. Phys. Lipids* 107 (2000) 189.
- [27] T.P. Formariz, L.A. Chiavacci, V.H.V. Sarmento, C.M. Franzini, A.A. Silva- Jr., M.V. Scarpa, C.V. Santilli, E.S.T. Egito, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 63 (2008) 287.
- [28] H.V. Atkinson, *Prog. Mater. Sci.* 50 (2005) 341.
- [29] Z.Q. Chen, Z.G. Dai, *Colloid Chemistry*, Higher Education Press, Beijing, China, 1984.
- [30] A. Martin, *Physical Pharmacy*, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
- [31] H.A. Barnes, *J. Non-Newton Fluid Mech.* 70 (1997) 1.
- [32] H.A. Barnes, *Colloids Surf. A* 91 (1994) 89.
- [33] M.T. Ghannam, M.N. Esmail, *J. Appl. Polym. Sci.* 64 (1997) 289.
- [34] J.L. Salager, in: F. Nielloud, G. Marti-Mestres (Eds.), *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, Marcel Dekker, New York, 2000, Chapter 3.
- [35] R. Pal, *J. Colloid Interface Sci.* 225 (2000) 359.
- [36] A.G. Oliveira, M. Nothenberg, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, *J. Phys. Org. Chem.* 4 (1991) 19.
- [37] A.G. Oliveira, M.V. Scarpa, H. Chaimovich, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 616.
- [38] M.E.D. Dalmora, A.G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 157.



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 03/2006 – Animais em Pesquisa

Interessado: KELLY CHRYSTINA PESTANA

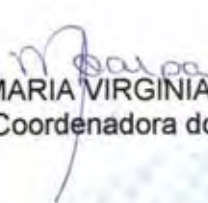
Orientador: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

Título do Projeto: Microemulsões contendo anfotericina para uso oral:
Estudo da farmacocinética em modelos animais.

Parecer nº 27/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa "Microemulsões contendo anfotericina para uso oral: Estudo da farmacocinética em modelos animais", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 7 de agosto de 2006.


Prof^ª. Dr^ª. MARIA VIRGINIA COSTA SCARPA
Coordenadora do CEP