



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS ARARAQUARA



**ESTRATÉGIAS TECNOLÓGICAS PARA AUMENTO DE  
SOLUBILIDADE E DIMINUIÇÃO DE TOXICIDADE DO  
FÁRMACO ANTIFÚNGICO ANFOTERICINA B**

**GUSTAVO JULIO BORGES ARRUDA**

ARARAQUARA - SP

2011

**GUSTAVO JULIO BORGES ARRUDA**

**ESTRATÉGIAS TECNOLÓGICAS PARA AUMENTO DE  
SOLUBILIDADE E DIMINUIÇÃO DE TOXICIDADE DO  
FÁRMACO ANTIFÚNGICO ANFOTERICINA B**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como  
requisito para obtenção do grau de  
Farmacêutico-Bioquímico.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira**

**ARARAQUARA - SP**

**2011**

## EPÍGRAFE

*“A ciência é uma aventura de toda a raça humana para aprender a viver e talvez a amar o Universo onde se encontra. Ser uma parte dele é compreender, é conhecer-se a si próprio, é começar a sentir que existe dentro do Homem uma capacidade superior a que ele pensava ter e uma quantidade infinita de possibilidades humanas”.*

*Isidor Isaac Rabi*

## DEDICATÓRIA

“Se um dia, já homem feito e realizado sentires que a terra cede a teus pés, que suas obras se desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai”

Rui Barbosa 1849 – 1923

Dedico ao meu irmão pelos conselhos. Também dedico aos amigos, colegas, professores e funcionários da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Acredito que Todos me influenciaram positivamente durante o período de minha graduação.

Obrigado.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a minha família.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira que me deu a oportunidade de fazer este trabalho sob a sua orientação e experiência profissional.

Aos colegas do Departamento de Farmacotécnica que me ajudaram na execução deste trabalho: Gustavo, Gisela, Cristina, Fernanda, Mariana.

Aos funcionários da biblioteca, pela dedicação e simpatia.

Aos docentes e funcionários em geral, desde aos atuais até aqueles que já passaram por aqui, que junto com os discentes fazem esse curso de farmácia-bioquímica acontecer desde 1923.

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	III
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IV
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO	VI
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Solubilidade	6
1.2. Nefrotoxicidade	8
<b>2. Revisão Bibliográfica das Formulações Disponíveis Comercialmente para o Antifúngico AmB</b>	<b>11</b>
2.1. AmB-Doc e Intralipid	11
2.2. Anfotericina B Lipossomal (Ambisome®)	12
2.3. Anfotericina B em Dispersão Coloidal (Amphocil®)	14
2.4. Complexo Lipídico de Anfotericina B (Abelcet®)	15
<b>3. Revisão Bibliográfica das Formulações em Estudo para o Antifúngico AmB</b>	<b>18</b>
3.1. Microemulsão	18
3.2. Nanoesferas e Microesferas	20
3.3. Nanopartículas	23
3.4. AmB-PLGA-DMSO	23
3.5. AmB-DoC-PLGA-DMSA	23

3.6.	<i>AmB-magnetolipossomas</i>	24
3.7.	<i>iCo-009 e iCo-010</i>	24
3.8.	<i>AmB-nanotubos de carbono</i>	24
3.9.	<i>AmB-polietilenoamina-dextran sulfato</i>	25
3.10.	<i>AmB-brometo de dioctadecildimetilamonio</i>	25
3.11.	<i>AmB-hidroxiapatita</i>	26
3.12.	<i>AmB-albumina</i>	26
3.13.	<i>AmB-PEG-b-PHSA</i>	27
3.14.	<i>AmB-GNPs</i>	28
3.15.	<i>AmB-PBPA</i>	30
3.16.	<i>AmB-óleo de soja purificado-lecitina de ovo</i>	31
<b>4.</b>	<b>Discussões</b>	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>35</b>
<b>6.</b>	<b>Referência Bibliográficas</b>	<b>37</b>

**ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABCD = Amphotec

ABLC = Abelcet

AG = Arabinogalactana

AmB = Anfotericina B

AmBAG = Anfotericina B conjugada à arabinolactana

AmB-DoC = Anfotericina B desoxicolato

AUC = Área sobre a curva

CNTs = Nanotubos de Carbono

DMSA = Dimercaptosuccínico

DOC = Desoxicolato de sódio

FDA = U.S. Food and Drug Administration

GNPs = Nanopartículas de gelatina

L-AmB = Anfotericina liposomal

PBPA = Ácido poli-L-aspártico benzilado

PLGA = poli ácido láctico-co-ácido glicólico



**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1: fórmula química da Anfotericina B_____	3
Figura 2: fórmula química da Anfotericina B_____	3
Figura 3: representação esquemática da interação entre a AmB e um esteróide em uma membrana lipídica._____	5
Figura 4: representação esquemática de um lipossomo_____	13
Figura 5: representação esquemática de sistemas de liberação usados para a AmB_____	17
Figura 6: estrutura das microemulsões_____	19
Figura 7: representação de um cochleate_____	22
Figura 8: produção de urina total e de creatinina saída na urina. Acima de 24 horas após a injeção em ratos controle, ratos tratados com AmB-D, e para AmB/PEG-b-PHSA ratos tratados com micelas._____	28
Figura 9: comparação entre AmB livre, Ambisome e AmB carregada por GNPs____	30
Figura 10: fotografia através de um microscópio eletrônico mostrando micelas de AmB após sonicação com ácido poli-Laspártico de benzilato._____	31

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: espectro de ação da Anfotericina B _____	1
Tabela 2: solubilidade da AmB em diferentes solventes _____	8
Tabela 3: comparação da eficácia, segurança e efeito tóxico relacionado à infusão de AmB em pacientes com malignidades hematológicas. _____	14
Tabela 4 : toxicidade de microemulsões contendo AmB em ratos_____	20

## RESUMO

A Anfotericina B é o fármaco antifúngico referência desde a sua descoberta na década de 50 até os dias atuais para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. O objetivo do trabalho é realizar uma revisão bibliográfica que forneça os sistemas de liberação comercializados e os que estão em estudo, focando estratégias tecnológicas que possam servir para resolver os problemas da baixa solubilidade em água e da alta nefrotoxicidade da Anfotericina B.

A AmB é um fármaco que apresenta inexpressiva solubilidade em meio-aquoso, principalmente na região de pH dos fluídos biológicos (7,4–8,0), sendo administrado atualmente por via endovenosa. Justificando a importância desse estudo para a área farmacêutica, novos sistemas de liberação que usem a via oral, aumentarão a adesão por crianças e idosos, além de aumentar o arsenal terapêutico e diminuir os gastos com hospitalizações.

Por ter a sua utilidade clínica limitada em razão de sua alta toxicidade, tem-se buscado direcionar a AmB especificamente para o fungo ou pelo menos para o local da infecção, mantendo-se longe o fármaco das células hospedeiras. Para isso, se busca diferentes veículos que não o desoxicolato (Fungizone).

Por fim, as formulações lipídicas mostram-se com maior eficácia e com menor toxicidade comparadas a Anfotericina B-desoxicolato, mas não fazem parte da rotina hospitalar em razão do seu alto custo.

Palavras-chave: Anfotericina B; sistemas de liberação; nefrotoxicidade; solubilidade.

## 1. Introdução

A Anfotericina B (AmB) foi isolada pela primeira vez em 1955 de um isolado de *Streptomyces nodosus*, coletado na Venezuela na bacia do rio Orenoco (TORRADO et al, 2007). Seu espectro antifúngico (Tabela 1) e eficácia a colocaram na posição, ainda mantida, de fármaco de referência no controle de infecções fúngicas sistêmicas Segundo DUTCHER e colaboradores, no ano de 1959 foi realizada a patente da AmB. Sendo considerado um dos antifúngicos mais efetivos para o tratamento de micoses sistêmicas (ESPOSITO et al., 2003; HEREC et al., 2005; RAÚL e EFRAÍN, 2002; AMATO et al., 2008). No final dos anos 50 a AmB já era utilizada em alguns casos clínicos, sendo o primeiro antifúngico a ser aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) em 1965 (WU, 1994; DISMUKES, 2000).

---

Tabela 1: espectro de ação da Anfotericina B

---

*Histoplasma capsulatum*

*Cryptococcus neoformans*

*Coccidioides immitis*

*Candida albicans*

*Candida glabrata\**

*Rhodotorula*

*Blastomyces dermatitidis*

*Paraccoccidioides brasiliensis*

*Aspergillus\**

*Sporothrix\**

\*Algumas cepas possuem resistência

---

(modificado de: Goodman and Gilman's  
Pharmacological Basis of Therapeutics)

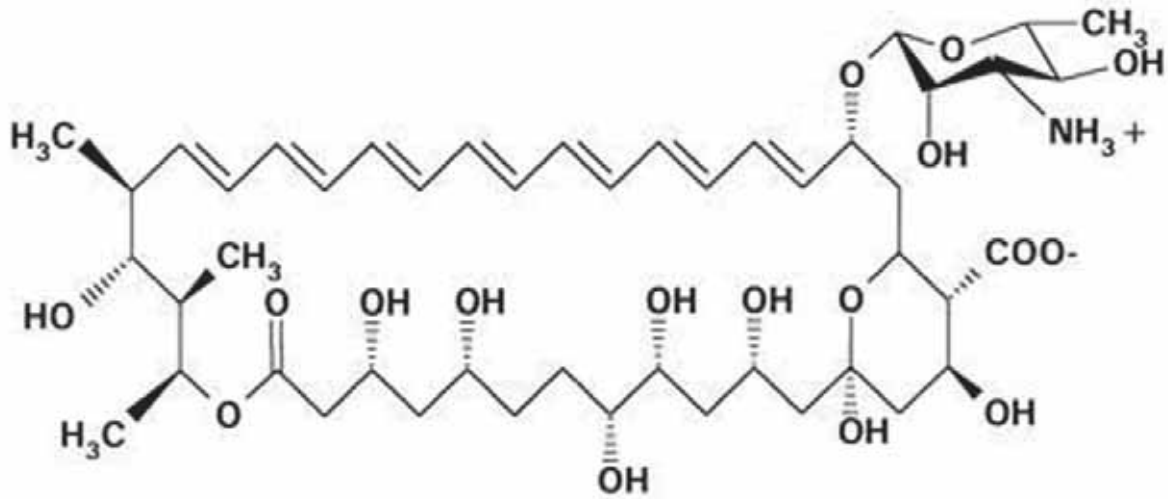
O mecanismo de ação da AmB consiste no fato dela possuir uma interação específica com o ergosterol, esteróide que é constituinte exclusivo da parede celular fúngica, ocorrendo a formação de poros através de membranas lipídicas que forma canais transmembrânicos (ZYGMUNT, 1966; TEERLINK, DE KRUIJFF & DEMEL, 1980, BRAJTBUTG et al., BOLARD et al, 1993). A célula despolariza-se tendo a sua permeabilidade alterada através do escape de pequenos íons e metabólitos (cátions monovalentes, prótons) principalmente íons potássio. Ligações de hidrogênio intermoleculares com grupos carboxila, amina e hidroxila estabilizam o canal na forma aberta, e assim, o conteúdo plasmático será liberado, levando à perda da atividade celular e eventualmente à morte celular (BOLARD et al, 1993; LABORÍN & VARGAS, 2009).

Embora a AmB possua maior afinidade pelo ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são em decorrência da ligação ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (WHITE, PETERSON, HARTSEL, 1989; BOLARD et al, 1993; MORIBE et al, 1999; HUANG et al.,2002).

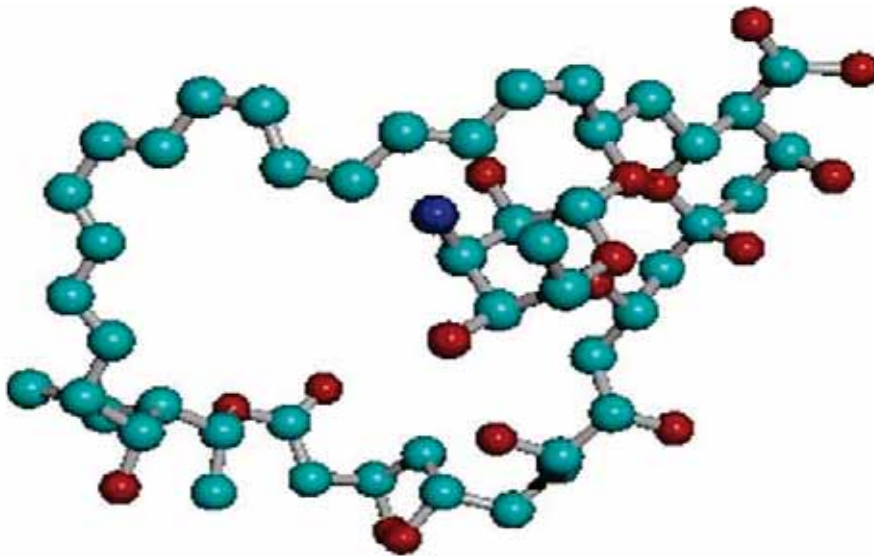
O nome anfotericina B deriva da característica anfifílica de sua estrutura molecular, formando sais solúveis tanto em meio ácido como em meio básico (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

A molécula da AmB é formada por 37 átomos de carbono chegando-se a um anel macrocíclico fechado por lactonização. Possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas não-substituídas e, na porção oposta, uma cadeia polihidroxilada com sete grupos hidroxila livres, o que lhe confere característica anfipática ou anfotérica. 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). As Figuras 1 e 2 mostram a estrutura da AmB.



**Figura 1:** Fórmula química da Anfotericina B (retirada de: LEMKE et al., 2005)



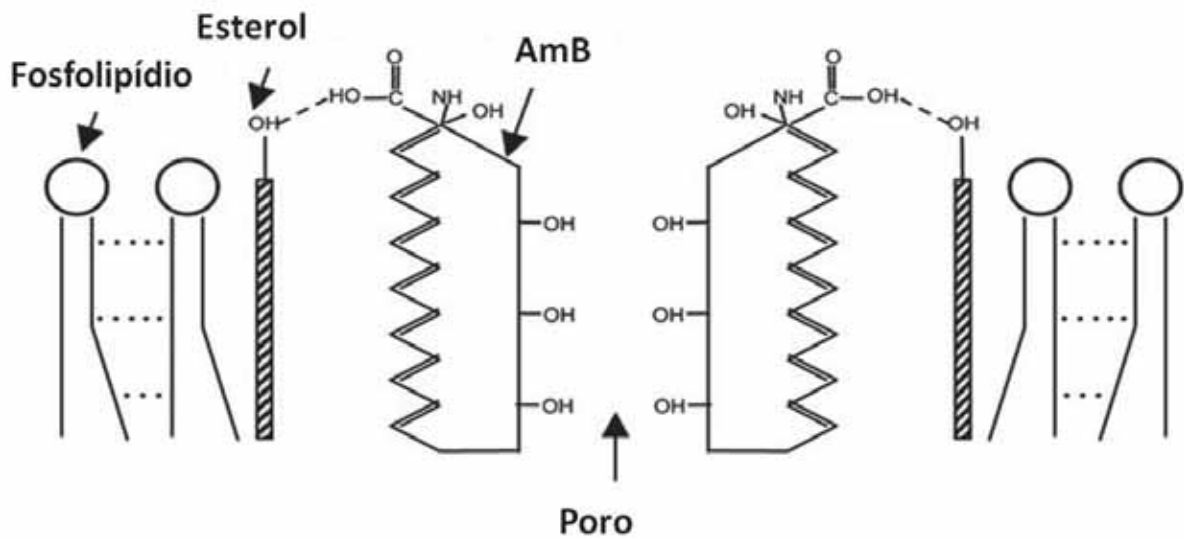
**Figura 2:** Fórmula química da Anfotericina B (retirada de: LEMKE et al., 2005)

A AmB é pouco solúvel na maioria dos solventes, inclusive em água, com exceção do dimetilsulfóxido e da dimetilformamida em que consegue-se solubilizá-la. A AmB além de sua baixa solubilidade em água, também tem baixa absorção por via oral, tendo-se a necessidade de administrá-la por via endovenosa (ESPOSITO et al,

2003). Sua solubilidade pode ser aumentada pela adição de laurilsulfato de sódio ou desoxicolato de sódio. A AmB também se dissolve em vesículas de lecitina e colesterol e em esteróides constituintes de membranas naturais (ASHER, SCHURARTZMAN, 1977).

Sua massa molecular é 924,1 g/mol (ARAÚJO,2005). Seu espectro de ação tem atividade máxima na faixa de pH 6,0 a 7,5, podendo ter ação fungistática ou fungicida, dependendo da concentração sérica e tecidual do antifúngico e da susceptibilidade do patógeno (VARTIVARIAN, ANAISSIE, BODEY, 1993).

Quando as moléculas de AmB estão em altas concentrações, elas se auto-associam formando dímeros ou agregados maiores (LARABI *et al*, 2004). Tanto a forma monomérica quanto a agregada podem formar canais em membranas contendo ergosterol (Figura 3). No entanto, somente a forma agregada tem a capacidade de formar tais canais em membranas contendo colesterol, que seria responsável pela toxicidade, em razão do colesterol estar presente em células de mamíferos (FILIPPIN & SOUZA, 2006). Logo, uma das estratégias para a diminuição da toxicidade da AMB é desenvolver novos derivados ou formulações que produzam agregados menos tóxicos, ou somente formas monoméricas que serão seletivas para as membranas contendo ergosterol, tendo-se assim somente as células fúngicas como alvos a serem destruídos (ARAUJO, 2005). Para isso, sais de ácidos biliares, como o desoxicolato de sódio, e derivados de ciclodextrinas, colesterol e outros agregados estão sendo usados em diversos estudos para se obter diferentes formas de administração da AmB (TORRADO *et al*, 2007).



**Figura 3:** Representação esquemática da interação entre a AmB e um esteróide em uma membrana lipídica. (retirado de: GOLENSER & DOMB, 2006)

O uso clínico da AmB é limitado pelos efeitos adversos e necessidade de aplicação endovenosa. A complexação com o desoxicolato, por exemplo, tem como resultado a formação de um sistema micelar estável quando na circulação sanguínea, que libera o fármaco na sua forma agregada tóxica, afetando as células de mamíferos. A AmB também pode ser transferida das micelas para lipoproteínas, sendo o reconhecimento dessas partículas, principalmente pelas células do fígado, um fator contribuinte para a toxicidade (LARABI, 2004).

A primeira formulação comercial da AmB surgiu em 1958, chamada de Fungizone<sup>®</sup> ou Fungizon<sup>®</sup>, contendo o detergente desoxicolato e um tampão. Trata-se de uma formulação contendo o tensoativo em solução aquosa de glicose, forma uma dispersão coloidal. Porém, também apresenta toxicidade, sendo a dose máxima recomendada de 1,5 mg/Kg/dia, e algumas vezes, não é suficiente para o tratamento (GOLENSER & DOMB, 2006).

Atualmente tem-se focado a redução da dose administrada para diminuir os efeitos adversos, buscando também aumentar a eficácia terapêutica. Sendo assim, as microemulsões contemplam este foco. Os fármacos ficam compartimentalizados



nas gotículas da fase interna, que por apresentar propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, promovem modificações nas propriedades biofarmacêuticas (FORMARIZ, 2004). Formam-se sistemas reservatórios que modificam a velocidade de liberação de fármacos. Estes sistemas podem alterar os parâmetros farmacocinéticos, aumentar o índice terapêutico, e em consequência, diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia clínica da AmB (FORMARIZ *et al.*, 2005; DALMORA *et al.*, 2001). Estudando-se novos sistemas de liberação para a AmB, temos atualmente o Ambisome®, formulação lipossomal que permite administrar uma dose de até 7,5 mg/Kg/dia com um ótimo perfil de segurança, maior que a fórmula convencional de Fungizone® (GOLENSER & DOMB, 2006).

Em suma, a alta toxicidade causada pelo uso de formulações convencionais, e a baixa solubilidade em água da AmB, além do baixo perfil de absorção por via oral, tem estimulado a pesquisa de sistemas capazes de veicular a AmB e diminuir os efeitos tóxicos, como por exemplo, as formulações lipídicas (ESPOSITO *et al.*, 2003; BRIME *et al.*, 2004). Entre as opções de formulações lipídicas para veiculação da AmB existem: emulsões lipídicas, complexos lipídicos, soluções micelares, microemulsões e nanopartículas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

### 1.1. Solubilidade

A baixa solubilidade em água e em muitos solventes orgânicos é um problema que não é fácil de ser resolvido. A AmB é solúvel em dimetilsulfóxido e levemente solúvel em dimetilformamida e metanol (SAMUSI *et al.*, 2009).

Utilizando-se o detergente éster lauril de sacarose se conseguiu um grande efeito além de ótima solubilidade, mas também sobre a seletividade de ação, pois se formaram complexos com ergosterol, mas não com colesterol. O responsável pelo

aumento de seletividade mostrou-se cerca de 1000 vezes mais seletivo do que quando solubilizado com desoxicolato. O desoxicolato é um detergente usado para solubilizar a AmB que tem um pequeno efeito sobre o espectro de ação da AmB sobre células de animais e de fungos. Experimentos com camundongos não-infectados demonstraram que quando a AmB é administrada junto com o éster lauril de sacarose, consegue-se menor toxicidade do que quando administrada com desoxicolato, em razão de sua maior seletividade para as células de fungos, preservando sadias as células de mamíferos (BRAJTBURG et al , 1990).

Outra estratégia para solubilizar a AmB é conjugá-la ao polissacarídeo arabinogalactana (AmB-AG). A alta solubilidade em água, biocompatibilidade, biodegradabilidade e fácil conjugação ao fármaco torna-o um ótimo carreador. Diferente das formulações lipídicas, o complexo AmB-AG pode ser facilmente esterilizado por filtração, barateando a produção e possivelmente podendo ser empregado em países pobres. Essa nova formulação mostrou-se eficaz para solubilizar a AmB (GOLENSER et al, 1999). A Tabela 2 mostra a solubilidade da AmB em diferentes solventes.

Tabela 2: solubilidade da AmB em diferentes solventes

Solvente	Solubilidade (mg/mL)
Água	< 1 entre pH 6 e 7
Metanol	2000
Etanol	500
Clorofórmio	100
Propilenoglicol	1
Ciclohexano	20

(retirado de TORRADO et al , 2007)

Incubar a formulação lipídica complexa Abelcet (ABLC) com a apolipoproteína A-I recombinante humana induz a solubilização do ABLC, transformando-o em partículas chamadas de nanodiscos. Estes nanodiscos preservam a atividade biológica da AmB, além de reduzir a toxicidade da formulação ABLC (LABORÍN e VARGAS, 2009 ).

### 1.2. Nefrotoxicidade

Desde 1956 quando começou o estudo clínico da AmB, já haviam descrições na literatura médica sobre os efeitos tóxicos que acometem os rins com o uso desse fármaco. O primeiro estudo específico que abordou o comportamento da função renal em indivíduos utilizando AmB foi em 1964 por Butler e colaboradores (1964) cujas principais manifestações da toxicidade renal indicavam redução da filtração glomerular, hipocalcemia e hipomagnesemia.

O mecanismo de nefrotoxicidade ainda não está completamente elucidado. Na literatura cogita-se que a toxicidade pode estar ligada ao estado físico da AmB,

indicando que o fármaco quando altamente disperso, ou seja, na sua forma monomérica, tem aumento de sua seletividade diminuindo a toxicidade, ao contrário do que ocorre no estado agregado (SAMUSI et al., 2009).

A nefrotoxicidade também é apontada como consequência de uma série de mecanismos incluindo lesões causadas diretamente aos rins através da vasoconstrição das arteríolas renais que reduz o aporte de sangue aos túbulos renais e aos glomérulos, e também a uma ação lítica das lisozimas que atacam membranas ricas em colesterol das células dos tubos renais (BONG et al., 2006). Também são descritos vários fatores que podem induzir a nefrotoxicidade, incluindo dose administrada, duração da terapia, nível de creatinina no plasma e o uso concomitante com outros fármacos potencialmente nefrotóxicos. Pacientes transplantados e imunocomprometidos em geral estão entre os mais vulneráveis a nefrotoxicidade causada pela AmB (ALEXANDER & WINGARD, 2005 ).

Estudos com modificações da AmB vem sendo realizados com o intuito de diminuir a toxicidade e aumentar a sua solubilidade. Na década de 70 foram realizados ensaios com a AmB metil-éster que era solúvel em água, além de acarretar menor nefrotoxicidade. Porém, com o surgimento de leucoencefalopatia limitou-se o seu uso (BERDICHEVSKI, 2003). Para diminuir os efeitos nefrotóxicos causados pela formulação referência AmB-DoC, a AmB é solubilizada em uma emulsão lipídica 10%, chamada comercialmente de Intralipid®, uma emulsão base que serve como sistema de liberação que usa uma solução parenteral nutritiva lipídica, reduzindo alguns efeitos adversos agudos ao mesmo tempo que preserva as propriedades terapêuticas do fármaco, com o enorme diferencial de ser uma alternativa barata para a administração da AmB (DÓREA et al, 1997).

Moribe e Maruyama (2002) descrevem como a peguilação pode reduzir a toxicidade e prolongar o tempo de meia-vida do fármaco em formulações que usam a estratégia tecnológica dos lipossomas. Isto é explicado pelo fato de a peguilação produzir uma camada hidrodinâmica sobre a superfície da partícula que protege a membrana lipídica. Em consequência disso, as partículas circulam mais tempo no sangue e são menos incorporadas pelos fagócitos.

Por fim, três formulações muito empregadas atualmente foram desenvolvidas para minimizar a nefrotoxicidade causada pela AmB. Lipossomos (AmBisome®), complexo lipídico (Abelcet®) e uma dispersão coloidal (Amphocil®) (MARTINDALE, 2005).

## 2. Revisão Bibliográfica das Formulações Disponíveis Comercialmente para o Antifúngico AmB

### 2.1. Anfotericina B desoxicolato e Intralipid

A absorção da AmB por via oral é mínima (inferior a 5%), por isso as infecções fúngicas sistêmicas tem sido tratadas através de infusão contínua por via endovenosa, sendo necessários cuidados especiais com o paciente, como por exemplo, administrar a AmB somente em ambiente hospitalar, por haver necessidade de usar a via endovenosa para administração do fármaco (BENNETT, 2003).

Desde 1956 a AmB é comercializada na forma de pó liofilizado associado ao desoxicolato (Fungizon®). É reconstituído em soro glicosado formando uma dispersão micelar. A administração endovenosa tem que ser feita lentamente (infusão contínua) para prevenir reações adversas, caso seja uma administração IV Bolus, pode até matar em razão da alta toxicidade do fármaco. Até a metade da década de 90, não havia opções de outras formulações além da AmB-DoC para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (KLEINBERG, 2006).

Na década de 90, em virtude da falta de disponibilidade de formulações lipídicas, a administração da AmB era veiculada em um excipiente de características lipofílicas, chamado Intralipid® (emulsão lipídica). Por falta de estudos de estabilidade, não era conhecido o comportamento dessa formulação. Dessa forma, ela era preparada no momento da infusão. A administração desse produto apresentou menos efeitos adversos do que a formulação convencional (GALERA, 2000). Para reforçar a superioridade da emulsão lipídica frente à formulação convencional, novos estudos mostraram que com a utilização da AmB-emulsão, conseguiu-se a redução dos efeitos tóxicos *in vitro* (incubação com eritrócitos) e *in*

*vivo* (administração em ratos) (SOUZA et al., 1993). A redução de toxicidade de AmB-emulsão nos rins foi avaliada por Souza, Saldiva e Campa (2000), que observaram menor dano renal para AmB-emulsão, se comparada com AmB convencional.

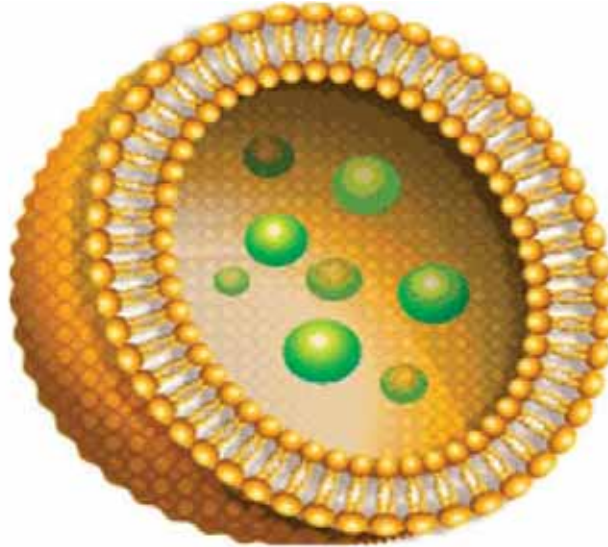
A partir da segunda metade da década de 90 surgiram as formulações lipídicas, que embora tenham demonstrado uma menor atividade em base de mg/Kg, a diminuída toxicidade permitiu a administração de doses elevadas, obtendo-se melhores resultados no tratamento, e hoje, estimula-se a utilização destas preparações em pacientes, porém com o empecilho de seu alto custo (FILIPPIN, 2006).

## 2.2. Anfotericina B Lipossomal (Ambisome®)

A primeira formulação lipossomal de AmB foi proposta por Lopez-Berestein e colaboradores (1984). O AmBisome® é uma preparação lipossômica de vesículas unilaminares, esféricas, pequenas, fechadas, contendo fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol, diesterolifosfatidiglicerol (DMPG) e AmB em razão molar de 2:1:0,8:4. Foi aprovado em 1997 pelo FDA, sendo comercializado na forma de pó liofilizado que deve ser diluído em água estéril. Por possuir um elevado tamanho de partícula, o AmBisome® é rapidamente eliminado da circulação pelo sistema retículo endotelial (ROBSON & NAHATA, 1999; KLEINBERG, 2006).

Os lipossomos são utilizados para transportar e aumentar o índice terapêutico de fármacos. Também protegem o fármaco contra degradação e contra uma possível fagocitose que pode ser feita pelo sistema mononuclear (GOURANG et al, 2011). Possui uma estrutura flexível que permite manipular o comportamento de

suas propriedades físico-químicas *in vitro* e *in vivo*, além do fato de ser o sistema de liberação coloidal mais estudado (Figura 4) (STORM & ETTEN, 1997).



### Lipossomo

**Figura 4:** representação esquemática de um lipossomo (retirado de Gourang et al, 2011)

Em 1999, Barquist e colaboradores publicaram um ensaio clínico constatando que a AmB lipossomal está associada a menor nefrotoxicidade do que a AmB livre. Em 2000, Wingard e colaboradores publicaram um estudo duplo cego randomizado com 244 pacientes divididos em três braços: AmB livre, AmB lipossomal e AmB em complexo lipídico. Os grupos tiveram sucesso terapêutico similar, mas o grupo relacionado à AmB livre teve maiores efeitos adversos e maior nefrotoxicidade (42,3%), além de um maior número de pacientes ter necessitado interromper o tratamento em razão dos efeitos adversos. Um estudo clínico realizado com pacientes com câncer e infecções fúngicas mostrou que a Anfotericina B Lipossomal (L-AmB) foi melhor tolerada do que a AmB livre (BRAJTBURG et al, 1990). Por fim, em 2002, Johnson e colaboradores publicaram que pacientes tratados com AmB



lipossomal tem maior sobrevida comparados àqueles pacientes que receberam AmB livre.

Para reforçar a superioridade da L-AmB sobre a AmB livre, lipossomas tem sido usados como veículos para a AmB em tratamentos de criptococose e candidíase, em que mostrou-se tão potente quanto a AmB livre, além de ser menos tóxica, podendo-se administrar doses maiores, que além de realizar um tratamento mais eficaz, também aumenta a qualidade de vida do paciente por aumentar o intervalo de administração das doses (BRAJTBURG et al, 1990).

Na Tabela 3 observamos a superioridade da formulação L-AmB frente à AmB-DoC e a infusão contínua da AmB-Doc, evidenciada por menor porcentagem dos níveis de creatinina, que nos indicam o potencial nefrotóxico da formulação.

Tabela 3: comparação da eficácia, segurança e efeito tóxico relacionado à infusão de AmB em pacientes com malignidades hematológicas.

	Infusão contínua de AmB-desoxicolato (UEHARA et al)	Infusão contínua de AmB-desoxicolato (ERIKSSON et al)	AmB (WALSH et al)	AmB lipossomal (WALSH et al)
Creatinina > 1,5 x linha basal	30,76%	33%	49,40%	29,40%
Outras drogas nefrotóxicas concomitantes	92,40%	28%	15,20%	6,30%
Hipocalcemia (<2.5)	16,67%	10%	11,60%	6,70%
Hepatotoxicidade	30%	-	20,30%	17,80%
Efeitos relacionados à infusão	23,07%	13%	73,50%	37,6%

(adaptado de: UEHARA et al, 2005)

### 2.3. Anfotericina B em Dispersão Coloidal (Amphocil®)

No ano de 1996 o FDA aprovou o Amphocil®, que serve para o tratamento de pacientes refratários ou intolerantes à AmB convencional. Trata-se de uma dispersão coloidal de AmB em sulfato de coleslerila sódica, formulada em partículas

discóides ou microdiscos com diâmetro médio de 122 nm (ROBSON & NAHATA, 1999).

Recentemente Bowden e colaboradores publicaram ensaio clínico duplo cego randomizado comparando AmB livre e AMB em dispersão coloidal (colesteril-sulfato) com 174 pacientes vítimas de aspergilose invasiva. Quanto às taxas de resposta terapêutica não houve diferença entre os grupos, mas houve redução significativa da nefrotoxicidade nos pacientes tratados com AmB em dispersão coloidal, cerca de 25% de nefrotoxicidade para pacientes tratados com AmB em dispersão coloidal, contra 49% de nefrotoxicidade para os pacientes que foram tratados com a AmB convencional.

#### *2.4. Complexo Lipídico de Anfotericina B (Abelcet®)*

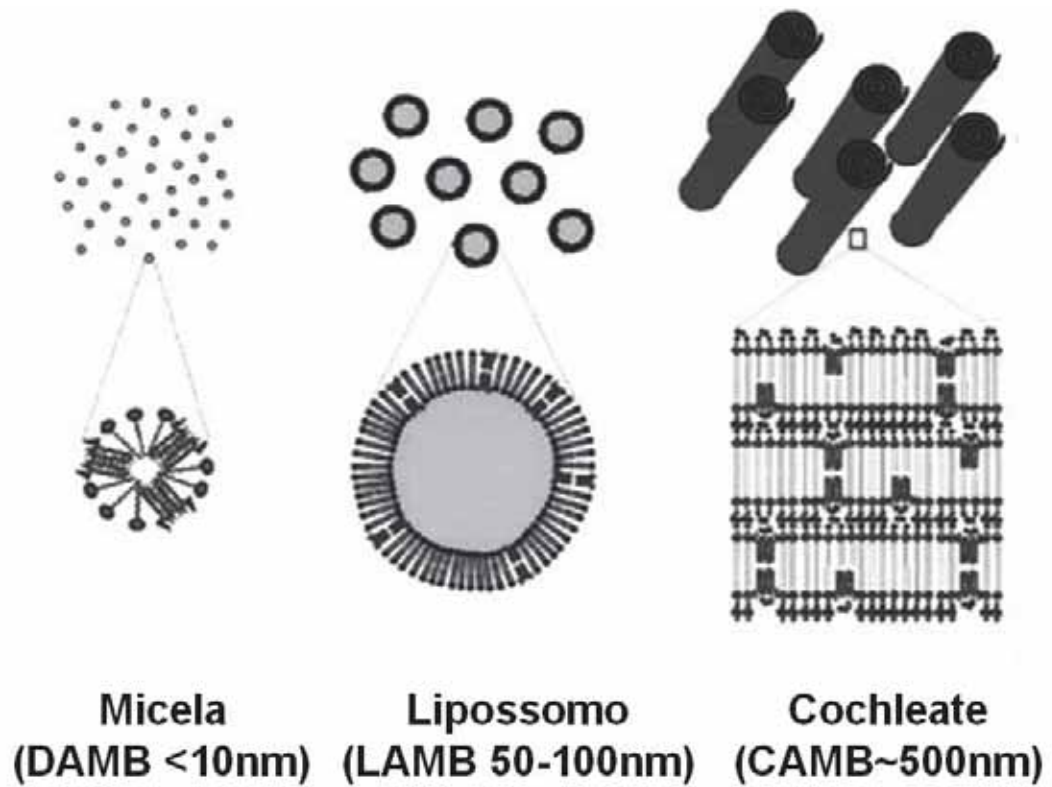
No ano de 1995 surgiu o Abelcet®, um complexo lipídico constituído de diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG), formado por partículas em formato de roseta de fitas. Essa foi a primeira formulação lipídica aprovada pelo FDA contendo AmB (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

As formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas nos últimos quinze anos. Elas apresentam menor toxicidade em relação à medicação convencional. Quando transportada por lipídeos, a anfotericina B atinge maiores concentrações no fígado e no baço do que a formulação desoxicolato, mas no rim seus níveis são menores. Isto explica a menor nefrotoxicidade das preparações lipídicas, que são, por outro lado, discretamente mais hepatotóxicas do que a medicação convencional. Mesmo pacientes com lesão renal ou com anemia induzida por anfotericina B desoxicolato, podem completar o tratamento com as formulações lipídicas, em geral sem agravamento destes efeitos adversos. Assim, o

principal benefício destas preparações é a maior segurança quanto à toxicidade celular no uso prolongado da anfotericina B (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

Comprovando isso, foi realizado um estudo retrospectivo analisando mais de 500 pacientes idosos imunocomprometidos devido ao tratamento quimioterápico. Demonstrou-se a efetividade e segurança de ABLC no tratamento de infecção fúngica invasiva. Pequena incidência de toxicidade renal foi observada no grupo tratado com ABLC, quando comparado com pacientes tratados com formulação convencional AmB-DOC, cuja concentração de creatinina sérica chegou a duplicar antes do final do tratamento. Os autores puderam demonstrar que ABLC e AmB-DoC foram igualmente efetivos, mas que a formulação lipídica pareceu preservar a função renal (HOOSHMAND-RAD et al., 2005).

O alto custo das formulações lipídicas contendo AmB é uma das principais desvantagens quando comparadas às formulações tradicionais, dificultando sua adesão pelos pacientes (GOLENSER et al, 1999). Para quantificar essa informação, dependendo da formulação e da instituição, diariamente o custo de um tratamento usando formulações lipídicas contendo AmB sai entre 300 a 1300 dólares, enquanto que usando Fungizone®, o tratamento sai de 5 a 17 dólares por dia (TORRADO, 2007). A Figura 5 mostra a representação esquemática de diferentes sistemas de liberação para AmB.



**Figura 5:** Representação esquemática de sistemas de liberação usados para a AmB (retirado de: GOLENSER & DOMB, 2006).

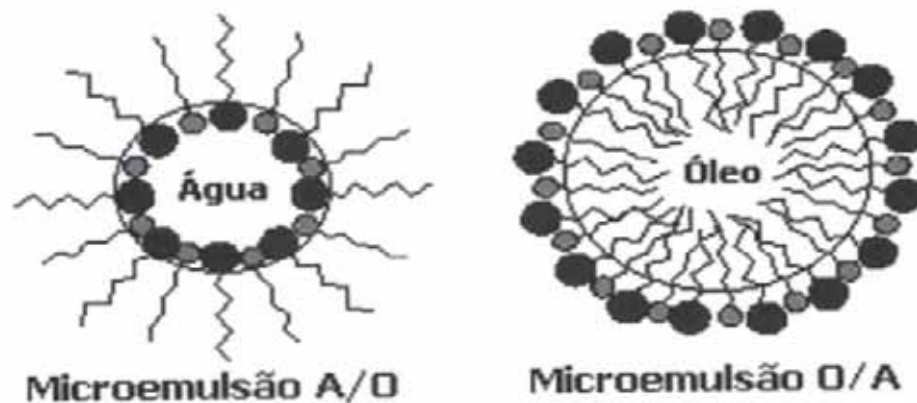
### **3. Revisão Bibliográfica das Formulações em Estudo para o Antifúngico AmB**

As formulações lipídicas da anfotericina B surgiram com o objetivo de torná-la menos tóxica e com a administração de doses diárias maiores e com maior eficácia. O uso clínico dessas anfotericinas lipídicas em substituição à tradicional formulação desoxicolato, passa pela análise da eficácia e da segurança. O uso terapêutico das formulações lipídicas de AMB têm como maior motivação o fato de apresentar menor nefrotoxicidade quando comparada à formulação desoxicolato (GOLENSER et al, 1999).

Algumas das estratégias utilizadas por diferentes pesquisadores foram a inclusão da AmB em lecitina baseado em microemulsões lipídicas, nanoesferas lipídicas, nanoesferas de  $\epsilon$ -caprolactona, conjugação com arabinogalactana e tratamento com calor (SANCHES et al, 2004).

#### *3.1. Microemulsão*

Novas formulações que se baseiam em microemulsão (Figura 6) contendo AmB para a administração endovenosa foram desenvolvidas utilizando-se lecitina de soja como tensoativo (MORENO, 2001), além de outra microemulsão que combina lecitina e polissorbato 80, em que ambos mostram-se viáveis por apresentar estabilidade e menor toxicidade que a formulação convencional, tendo sido observado em estudos de dose única e dose múltipla (MORENO, 2003).



**Figura 6:** estrutura das microemulsões (retirado de Oliveira et al, 2004)

No ano de 2008, Kelly e colaboradores conseguiram o aumento da biodisponibilidade oral da AmB veiculada em microemulsão, sendo aproximadamente 3 vezes maior do que a formulação convencional. A microemulsão foi capaz de aumentar a absorção oral da AmB sem induzir aos efeitos nefrotóxicos encontrados na formulação. 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. Por fim, concluíram que a microemulsão desenvolvida é um potencial sistema para administração oral da anfotericina B.

No ano de 2004, Brime e colaboradores demonstraram que além da microemulsão O/A estabilizada por fosfatidilcolina possuir menor toxicidade para aplicação endovenosa comparada a formulação convencional, apresentou também boa eficácia, mostrando ser um sistema de liberação viável para o fármaco. Concluindo, o perfil farmacocinético e nefrotoxicidade da AmB mostrou diferenças significativas entre a formulação convencional e a microemulsão, que proporcionou aumento significativo da biodisponibilidade oral do fármaco sem observação de efeito nefrotóxico, ou seja, a microemulsão foi capaz de aumentar a absorção oral da

AmB sem induzir aos efeitos nefrotóxicos sabidamente causados pela formulação convencional (BRIME et al, 2004).

A Tabela 4 mostra o experimento realizado por Moreno e colaboradores em 2001, que comprova a menor toxicidade da microemulsão comparada à formulação convencional, evidenciada pelo baixíssimo índice de mortalidade, o que acontece somente a partir de 4,0 mg/Kg.

**Tabela 4** : toxicidade de microemulsões contendo AmB em ratos

Grupo	% de sobrevivência após 45 dias	Mortalidade
<b>Salina (controle)</b>	100	-
<b>Microemulsão (controle)</b>	100	-
<b>Fungizone</b>		
0,5 mg/Kg	100	-
1,0 mg/Kg	50	Imediata
1,5 mg/Kg	0	Imediata
2,0 mg/Kg	0	Imediata
<b>Microemulsão</b>		
1,0 mg/Kg	100	-
2,0 mg/Kg	100	-
3,0 mg/Kg	100	-
4,0 mg/Kg	50	Imediata

(adaptado de: MORENO, 2001)

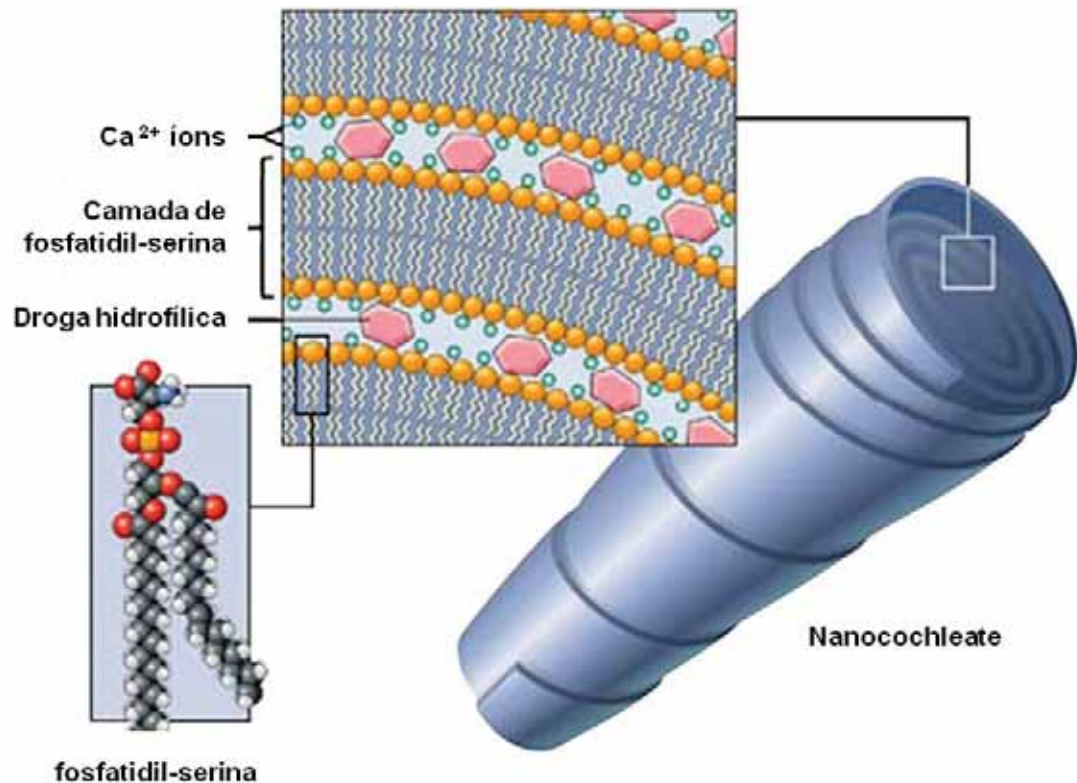
### 3.2. *Nanoesferas e Microesferas*

Por mais de vinte anos, pesquisas vem sendo direcionadas para a incorporação da AmB em sistemas lipídicos com o objetivo de reduzir a toxicidade

(LARABI, 2004). A insistência em desenvolver novas formulações lipídicas, tem a ver com a maior habilidade dos sistemas lipídicos em reter a molécula da AmB do que micelas de tensoativos, liberando o fármaco lentamente na forma de monômeros reduzindo a toxicidade para as células humanas, já que dímeros ou agregados maiores de AmB podem agregar-se a membranas que possuem colesterol, e assim, tornar-se tóxico (LARABI, 2004). Estudos buscam também novos sistemas de liberação de fármacos como nanoesferas e microesferas que podem resultar em maiores concentrações de AmB no fígado e no baço e diminuir as concentrações de AmB nos rins e nos pulmões, diminuindo o principal efeito tóxico da AmB que é nefrotoxicidade (LABORÍN & VARGAS, 2009).

Cochleates são micelas de formato cilíndrico multilamelar, compostos principalmente por fosfatidilserina (PAPAHADJOPOULOS et al., 1975). A microscopia eletrônica revela a estrutura de uma espiral, consistindo em duas membranas envolvidas por um espaço aquoso com interior hidrofóbico (Figura 7) (SANTANGELO et al., 2000).





**Figura 7:** representação de um cochleate (retirado de: LEMKE et al, 2005)

CAmB é um sistema de liberação que possui elevada estabilidade e enorme resistência à degradação no trato gastrointestinal. Assim, cochleate tem um grande potencial para ser administrado por via oral, podendo ser uma nova alternativa, já que as formulações contendo AmB são administradas atualmente por via endovenosa (GOLENSER & DOMB, 2006).

Cochleates tem sido usados para transportar proteínas, peptídeos, DNA para vacinas e aplicação de terapia gênica, além de claro, ser usado como sistema de liberação. Por causa de seu interior de natureza hidrofóbica, sugere-se que a AmB possa ficar localizada neste rígido espaço lipídico. Esta associação deveria proteger a AmB da degradação quando exposta às condições adversas do trato gastrointestinal ou enzimas. CAmB pode ser um sistema ideal de liberação para a via oral, aumentando-se o arsenal terapêutico para tratar infecções fúngicas

sistêmicas. A CAmb é comercializada como Bioral™ Amphotericin B (GOLENSER & DOMB, 2006 ).

### 3.3. *Nanopartículas*

Pensando em desenvolver formulações que usem a via oral como via de administração, tem-se as nanosuspensões que tem aderido com sucesso a mucosa gastrointestinal aumentando o tempo de contato com a AmB, e assim, aumentando a captação deste fármaco (KISHOR et al, 2009).

Nanopartículas poliméricas usadas como sistemas de liberação vem sendo extensivamente estudadas (ESPUELAS et al., 2003; SEN et al., 1988; VENIER-JULIENNE & BENOIT, 1996).

### 3.4. *AmB-PLGA-DMSO*

A AmB foi ligada ao polímero PLGA usando como co-solvente DMSO para melhorar a biodisponibilidade oral (ITALIA et al, 2009). Apesar de não se ter observado cura efetiva, é muito importante buscar produzir formulações que possam ser administradas pela via oral para diminuir os custos com as hospitalizações e aumentar a adesão de crianças e idosos ao tratamento (GOLENSER & DOMB, 2006).

### 3.5. *AmB-DoC-PLGA-DMSA*

Foi realizado também um sistema de liberação contendo AmB-D ligada ao PLGA que é aprovado pelo FDA e usando-se o ácido DMSA como co-solvente, buscando-se reduzir o número de administrações do fármaco. A incorporação de ácido dimercaptosuccínico (DMSA) guia as nanopartículas preferencialmente aos pulmões, agindo como um sinalizador para tratar doenças fúngicas entre outros tipos de doenças que possam afetar os pulmões. Não existe ainda nenhum mecanismo que explique este tropismo do ácido DMSA pelos pulmões. O objetivo é garantir 3

doses a partir de uma única administração por via endovenosa . Em suma, o novo sistema de liberação D-AmB-PLGA-DMSA representa uma enorme vantagem por reduzir a frequência de administração, além de possuir tropismo por células-alvo dos pulmões (AMARAL et al, 2009).

### 3.6. *AmB-magnetolipossomas*

Fluídos magnéticos ou magnetolipossomas constituídos a partir de nanopartículas magnéticas, tem sido propostos como carreadores de fármacos, para o tratamento de patologias como a Pbmicose (plumbomicose), doença que acomete os pulmões. Nanopartículas magnéticas são cobertas com ácido DMSA que tendem a se acumular nos pulmões, e que foram associados a moléculas de AmB, minimizando as graves reações adversas da AmB livre. Esta associação mostrou-se biocompatível e órgão-específica, para ser usada como carreador para a AmB, evidenciando os benefícios dos fármacos nanoestruturados (PEIXOTO, 2008).

### 3.7. *iCo-009 e iCo-010*

Leon e colaboradores (2011) estão tentando desenvolver uma formulação oral de AmB efetiva, segura e de baixo custo. São duas formulações desenvolvidas pelo grupo chamadas de iCo-009 e iCo-010. Estudaram-se quatro formulações (iCo-009, iCo-010, Fungizone e Ambisome) para verificar a ausência ou presença de citotoxicidade para células de monócitos humanos, células dos rins e em *Candida albicans*. A formulação iCo-010 foi a que apresentou os melhores resultados entre as 4 estudadas e, possivelmente, serão realizados novos ensaios *in vivo*, para determinar seu índice terapêutico.

### 3.8. *AmB-nanotubos de carbono*

Um novo sistema de liberação de fármacos utiliza nanotubos de carbono (CNTs) para transportar moléculas terapêuticas como a AmB. Observou-se diminuição da citotoxicidade em estudos *in vitro*. Tal formulação é obtida com baixo custo de produção, além de possuir armazenamento estável. Vários estudos estão sendo realizados para comparar a eficácia desse novo sistema de liberação com a AmB lipossomal, e também para poder explorar alguma possibilidade de administração dessa formulação por via oral (VIJAY et al, 2011). Várias vantagens podem ser obtidas conjugando-se a AmB aos CNTs, como: aumento de solubilidade da molécula evitando agregação (dímeros ou agregados maiores), diminuição da toxicidade, uma maior seletividade para as células alvo preservando as células do hospedeiro e aumentar a eficácia e o índice terapêutico (BENINCASA et al, 2011).

### 3.9. *AmB-polietilenoamina-dextran sulfato*

A AmB também pode ser carregada por um sistema de nanopartículas formado por polietilenoamina e dextran sulfato, com sulfato de zinco como agente de estabilização. Não apresentou sinais de toxicidade em tecidos de cultura em contraste com o fármaco livre. Mostrou-se um ótimo sistema em razão de facilidade de preparação, uso de polímeros biocompatíveis, processamento completamente aquoso evitando o uso de solventes orgânicos e alta quantidade de fármaco aprisionado (TIYABOONCHAI, WOISZWILLO & MIDDAUGH, 2001).

### 3.10. *AmB-brometo de dioctadecildimetilamonio*

Recentemente, tem sido desenvolvida uma formulação de baixo custo contendo o lipídeo catiônico brometo de dioctadecildimetilamonio. Essa formulação possui baixo potencial nefrotóxico, mas com uma capacidade limitada para servir como carreador de fármaco como a AmB (LINCOPAN et al., 2005; VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001).

### 3.11. AmB-hidroxiapatita

Hidroxiapatita foi impregnada com alguns antimicrobianos, inclusive com AmB. Para neutralizar o efeito citotóxico da hidroxiapatita quando empregada sozinha, usou-se quitosana. Estudos *in vitro* mostraram este sistema de liberação para o fármaco AmB entre outros antimicrobianos (gentamicina, imipenem) como biocompatível. Porém, falta fazer testes *in vivo*, já que *in vitro* não se garante uma simulação perfeita das condições do organismo humano (KRISANAPIBOON et al, 2006).

### 3.12. AmB-albumina

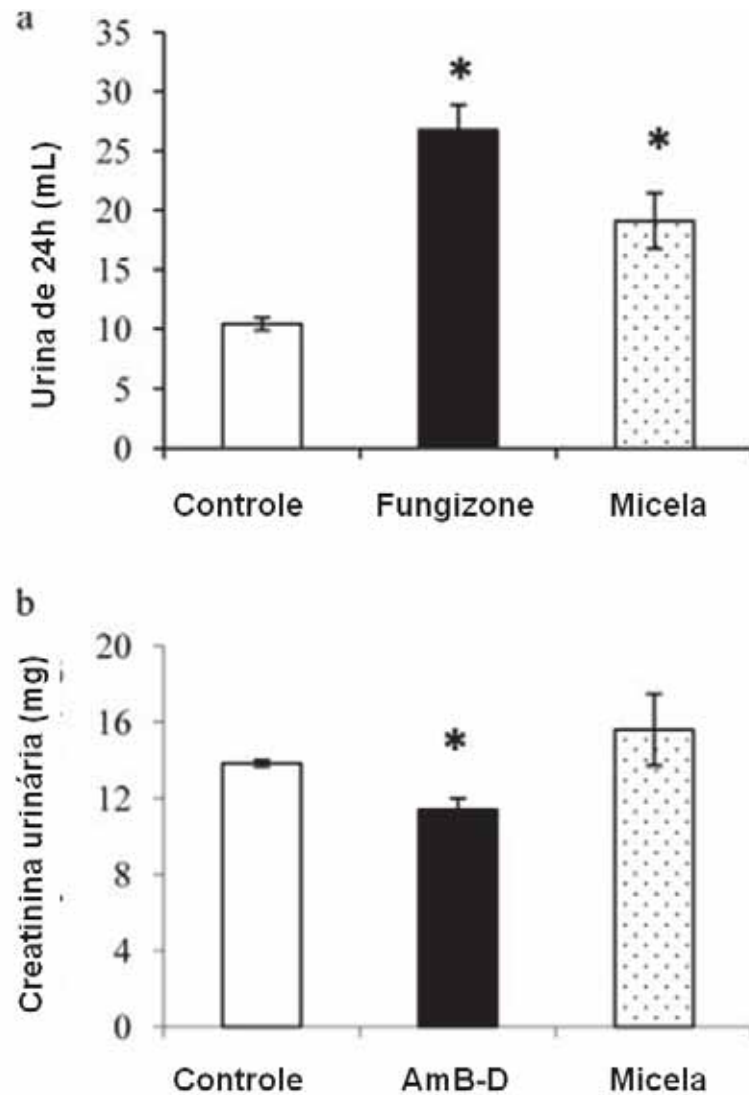
Microesferas hidrofílicas de albumina estão sendo propostas como um novo sistema de liberação para a AmB. A toxicidade deste novo sistema de liberação é menor do que da AmB desoxicolato, sendo promissora a possibilidade de substituir futuramente esta AmB-DoC que é a formulação referência. A *Leishamniose visceral* é endêmica principalmente em regiões pobres, dificultando o uso das novas formulações desenvolvidas nos últimos anos (Ambisome, Abelcet e Amphotec), em razão do alto custo dessas formulações. Logo, o desenvolvimento de novos veículos para a AmB com baixo custo tornou-se uma necessidade. A partir de um ponto de vista industrial, os componentes e processos de produção dessas microesferas de albumina tem um custo mais razoável comparado às caras formulações lipídicas (SÁNCHEZ-BRUNETE et al, 2004).

Esta formulação já foi patenteada. Pretende-se com ela atingir maior eficácia do que o Fungizone® e menor custo do que o Ambisome®. Esta tarefa parece ser possível, já que as microesferas sólidas de albumina são biocompatíveis e tendem a

ser mais estáveis do que os lipossomos, que são semi-sólidos (TORRADO et al, 2004 ).

### 3.13. *AmB-PEG-b-PHSA*

A AmB foi incorporada em micelas de PEG-b-PHSA (polyethylene glycol-block-polyNhexilstearate1-aspartamide) como mostrado na Figura 8. Foi produzido enzimúria em ratos com o uso de AmB-D, enquanto que com o uso de PEG-b-PHSA não houveram mudanças significativas nos túbulos renais dos ratos, tendo-se a possibilidade de aumentar a eficiência terapêutica da AmB. Segundo os estudos realizados, esse sistema de liberação polimérico reduziu a nefrotoxicidade da AmB. (THOMAS et al, 2011).



**Figura 8:** produção de urina total (a) e de creatinina saída na urina (b). Acima de 24 horas após a injeção em ratos controle (branco), ratos tratados com AmB-D (preto), e para AmB/PEG-b-PHSA ratos tratados com micelas (branco com pontos). (adaptado de: Thomas et al, 2011)

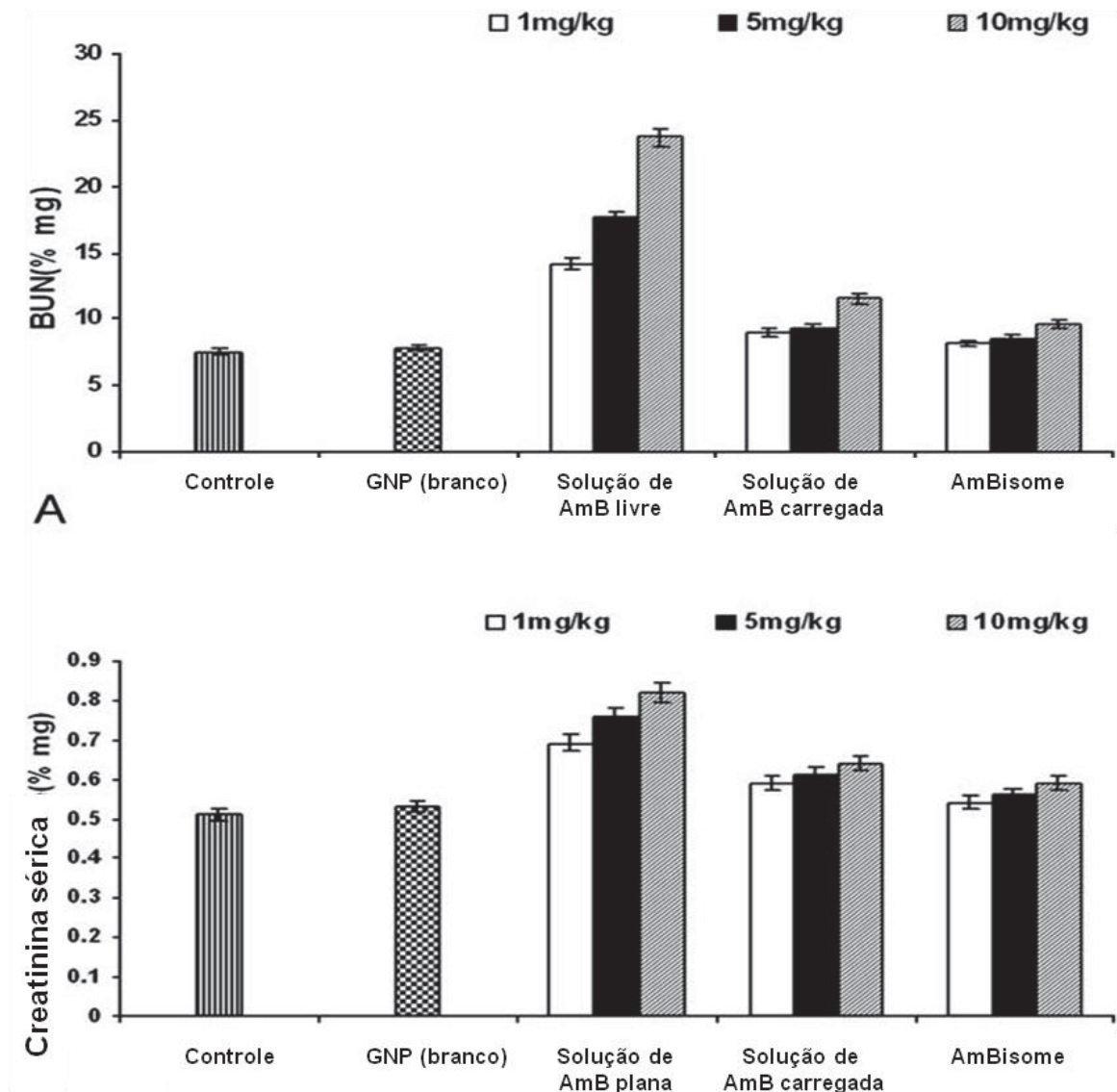
### 3.14. AmB-GNPs

Nanopartículas de vários polímeros como poly (lactide-coglycolide), poly ( $\epsilon$ -caprolactone) e mais recentemente quitosana-dextran com AmB, vem sendo investigados. Nanopartículas de gelatina (GNPs) também vem sendo muito estudados, em razão de seu baixo custo, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade e aplicação em diversas formulações parenterais. Estes

desafios buscam um sistema de liberação nanoparticulado usando um polímero de baixo custo como a gelatina, em que se possa controlar parâmetros que possam desenvolver um pequeno tamanho de partícula e máxima eficiência, certamente a liberação controlada de AmB por um maior tempo irá aumentar a adesão pelos pacientes, e claro, que possa transportar a AmB com poucos ou nenhum efeito adverso . Principalmente buscar evitar a auto-agregação das moléculas de AmB, que provavelmente seja a maior razão dos efeitos hemolíticos e tóxicos. O maior avanço para reduzir a auto-agregação das moléculas de AmB, foi realizar testes em valores de pH muito longe do pKa do fármaco, evidenciando-se quando se formam monômeros e quando se formam agregados. Pode-se concluir que GNPs são uma opção viável, eficaz e barata para o controle e segurança de entrega da AmB. Foi apresentado então uma formulação fácil de preparar e com grande potencial de desenvolvimento (NAHAR et al, 2008)

A Figura 9 mostra um desempenho levemente inferior da AmB ligada as nanopartículas de gelatina comparada ao Ambisome. Porém, com um desempenho bem melhor quando comparada a formulação convencional.



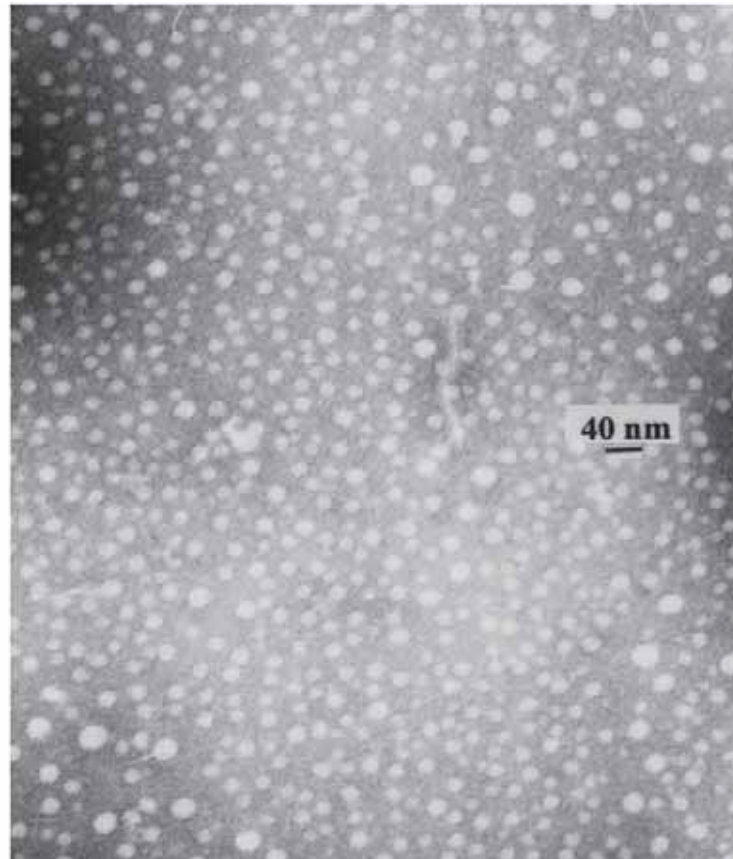


**Figura 9:** comparação entre AmB livre, Ambisome e AmB carregada por GNPs (adaptado de: NAHAR et al , 2008)

### 3.15. AmB-PBPA

O ácido PBPA foi sintetizado e investigado como sendo um agente protetor da função renal quando a AmB é administrada como uma micela. A micela apresentou diâmetro de 20 nm e demonstrou não causar nenhum dano significativo às células tubulares dos rins dos ratos observado através de microscopia eletrônica. A reduzida toxicidade renal provavelmente acontece em função da alteração da auto-agregação das moléculas de AmB, fazendo-se prevalecer as moléculas no estado físico

monomérico. Mecanismos para a redução da toxicidade renal, também podem incluir a formação de um complexo eletrostático entre grupos aniônicos do PBPA e grupos hidroxilas da AmB. Enfim, ocorre a alteração do comportamento de auto-agregação das moléculas de AmB na presença das nanopartículas micelares formadas por PBPA (Figura 10) (BONG et al, 2006 ).



**Figura 10:** Fotografia através de um microscópio eletrônico mostrando micelas de AmB após sonicação com ácido poli-Laspártico de benzilato. (retirado de: BONG et al, 2006)

### 3.16. AmB-óleo de soja purificado-lectina de ovo

Otsubo e colaboradores (1998) descreveram o desenvolvimento de um novo sistema de liberação para AmB. A formulação era constituída de óleo de soja purificado e lecitina de ovo, denominada nanoesfera lipídica carreadora de AmB. Os autores propuseram vários ensaios de caracterização das partículas, atividades *in*

*vitro* e *in vivo* contra *Aspergillus fumigatus* e farmacocinética em ratos normais e imunocomprometidos. Quando comparada com AmBisome e AmB-DoC, a nanoesfera apresentou-se mais efetiva e menos tóxica contra aspergilose experimental, sugerindo ser esta nova formulação um sistema de liberação de AmB promissor (FUKUI et al., 2003) Um outro grupo de pesquisadores orientais desenvolveu uma formulação de AmB semelhante. Também era constituída de óleo de soja e lecitina de ovo, mas com menor concentração de AmB. Apesar disso, os estudos farmacocinéticos em ratos e cães demonstraram que a AUC foi maior para a nova formulação se comparada com AmB-DoC, AmBisome, ABLC e ABCD. Os autores puderam concluir a manutenção da eficiência de AmB incorporada a nanoesfera, bem como a redução da toxicidade, se comparada às demais formulações (FUKUI et al., 2003).

#### 4. Discussões

O problema da baixa solubilidade da AmB em água e em muitos solventes orgânicos é difícil de se resolver. Uma alternativa melhor do que o sal biliar desoxicolato foi o uso de éster lauril de sacarose, que além de aumentar a solubilidade também aumentou a seletividade da AmB diminuindo as reações adversas.

A causa exata da nefrotoxicidade da AmB ainda não foi descoberta. Tem-se vários fatores que podem induzir a nefrotoxicidade, como dose administrada, duração da terapia, nível de creatinina no plasma e o uso simultâneo com outros fármacos potencialmente nefrotóxicos.

Ao meu entender, os sistemas de liberação que estão sendo estudados e em uso, buscam sempre a forma monomérica da AmB, conseguindo-se maior seletividade para as células fúngicas, preservando as células hospedeiras e, conseqüentemente reações adversas.

A grande maioria das novas formulações contendo AmB buscam utilizar a via oral como via de administração do medicamento. Dessa forma, conseguirão aumentar o arsenal terapêutico, aumentar a adesão de crianças e idosos, além de diminuir os custos com hospitalizações, já que até hoje a maior parte das formulações contendo o fármaco AmB precisa ser administrado por via endovenosa.

Durante a execução deste trabalho, analisando as formulações lipídicas de uma maneira geral, percebi que apresentam praticamente a mesma eficácia terapêutica quando comparada a AmB convencional. Porém, por estas serem menos nefrotóxicas, podem ser administradas doses maiores, e assim, conseguindo-se melhores resultados nos tratamentos das infecções fúngicas sistêmicas. A qualidade

de vida do paciente também aumenta por poder aumentar o intervalo de administração das doses.

O fato das formulações lipídicas serem de alto custo, a meu ver dificulta, e muito, a implantação dessas formulações nas rotinas dos hospitais nas regiões endêmicas, geralmente regiões pobres. Pensando-se no barateamento dessas formulações lipídicas, baseio-me no contexto do comércio, em que quando um produto é produzido em larga escala, o seu preço tende a decair. É o que associo a estas formulações, por serem relativamente recentes (surgiram a partir da metade da década de 90), precisam ser aceitas pelas indústrias farmacêuticas e passarem a ser produzidas em grande escala. Infelizmente, as infecções fúngicas sistêmicas são endêmicas geralmente em regiões pobres, e conseqüentemente, sendo uma doença negligenciada, pertencente a países subdesenvolvidos, e assim, encontrando problemas políticos e econômicos para a sua produção em massa e atingir assim, a possibilidade de seu barateamento.

Por fim, de todas as formulações que pesquisei, acredito que a AmB lipossomal seja a melhor. Os lipossomos além de transportarem a AmB também aumentam o índice terapêutico, já que aumentam a concentração do fármaco no sítio alvo e protegem a AmB contra a degradação e uma possível fagocitose realizada pelo sistema mononuclear. Os lipossomos são uma excelente forma de sistema de liberação controlada de fármacos, em virtude de sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica. Para finalizar, é o sistema de liberação coloidal mais estudado que temos.

## 5. Conclusões

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).

Embora as formulações lipídicas tenham demonstrado menor atividade em base de mg/kg, a diminuída toxicidade permitiu a administração de doses elevadas obtendo-se melhores resultados no tratamento e estimulando a utilização destas preparações em pacientes (FILIPPIN & SOUZA, 2006). No entanto, embora a AmB em complexo lipídico e lipossomal sejam menos nefrotóxicos, eles elevam muito o custo do tratamento. De fato, um miligrama de L-AmB é aproximadamente 35 vezes mais cara do que um miligrama de AmB-D (BERDICHEVSKI, 2003).

Apesar do tratamento com formulações lipídicas requererem um curto período de terapia (3-5 dias), ser mais efetivo e exibir menor toxicidade do que quando comparado ao Fungizone®, essas formulações são significativamente mais caras, o que se torna uma barreira para a disseminação do tratamento em muitas regiões, geralmente pobres, e assim, a mortalidade continua a crescer (ITALIA et al, 2009).

Estudos comparando as formulações ABLC e L-AmB concluíram eficácia e segurança similares quando administrados para pacientes imunocomprometidos, seja para tratamento ou profilaxia (SAFDAR et al, 2010).

Por fim, apesar da comprovada superioridade das formulações lipídicas, o alto custo restringe o seu uso, já que geralmente as regiões endêmicas são locais pobres. Como alternativa, tem-se aderido a infusão contínua de AmB-DoC, que ao

invés de ser administrado em 4 horas, passou a ser administrado por 24 horas, conseguindo-se uma eficácia quase tão boa quanto uma formulação lipídica e, principalmente, diminuiu-se a toxicidade permitindo o tratamento e profilaxia nessas regiões endêmicas.

## 6. Referência Bibliográficas

ALEXANDER, B.D.; WINGARD, J.R. Study of Renal Safety in Amphotericin B Lipid Complex–Treated Patients. **Clinical Infectious Diseases**. v.40, p.414-421, 2005.

AMARAL et al. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.63, p.526-533, 2009.

ARAÚJO, I.B. Novos Sistemas Carreadores para Anfotericina B: Estudo dos Parâmetros Tecnológicos e Fármaco-tóxicológicos. Tese de Doutorado, Natal, 2005.

ASHER, I.M.; SCHURARTZMAN, G. Amphotericin B. **Anal. Profiles Drug Subst.**, v. 6, p.1-42, 1977.

BARQUIST et al. A randomized prospective trial of amphotericin B lipid emulsion versus dextrose colloidal solution in critically ill patients. **J Trauma**. v.47, p.336-340, 1999.

BENINCASA et al. Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Carbon Nanotubes. v.5, n.1, p.199-208, 2011.

BENNETT, J.E. Fármacos antimicrobianos. GOODMAN & GILMAN As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª Ed. **McGraw Interamericana do Brasil Ltda**. p.971-974, 2003.

BERDICHEVSKI, R.H. Nefrotoxicidade da AmB associada a pacientes de baixo risco. Dissertação de Mestrado. UFRS, 2003.

BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. **J. Liposome Res.**, v.3, p.409-427, 1993.



BONG et al. Reduced Renal Toxicity of Nanoparticulate Amphotericin B Micelles. Prepared with Partially Benzylated Poly-L-aspartic Acid **Biol. Pharm. Bull.** v.29, n.8, p.1700-1705, 2006.

BOWDEN et al. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersions versus amphotericin B for the treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Clinic infect disease.** v.35, p.359-366, 2002.

BRAJTBURG et al. Amphotericin B : Delivery Systems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.34, n.3., p.381-384, 1990.

BUTLER et al. Nephrotoxicity of amphotericin B, early and late events in 81 patients. **Ann intern Med;** v.61, p.175-187, 1964.

DÓREA et al. Nephrotoxicity of amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. **Journal of the American Society of Nephrology,** 1997.

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

ESPUELAS, M., LEGRAND, P., CAMPANERO, M., APPEL, M., CHERON, M., GAMAZO, C., BARRATT, G., IRACHE, J. Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. **J. Antimicrob. Chemother.** v.52, p.419–427, 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.

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. Dissertação de Mestrado, Araraquara, 2004.

G. LOPEZ-BERESTEIN, R. L. HOPPER, R. MEHTA, K. MEHTA, E. M. HERSH, AND R. L. JULIANO. Liposome-encapsulated amphotericin B for the treatment of disseminated candidiasis in neutropenic mice. **J. Infect. Dis.** v.150, p.278-283, 1984.

GALERA, R.M.L. Anfotericina B: determinación em diversos fluidos biológicos por cromatografía líquida. Aplicación a estudios farmacocinéticos y de estabilidad química. Tese de Doutorado, Barcelona, 2000.

GOLENSER et al. Efficacious Treatment of Experimental Leishmaniasis with Amphotericin B-Arabinogalactan Water-Soluble Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v.43, n.9, p.2209-2214, 1999.

GOLENSER, J, DOMB, A. New Formulations and Derivatives of Amphotericin B for Treatment of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** p.153-162, 2006.

GOURANG et al. An Evaluation of Hepatotoxicity and Nephrotoxicity of Liposomal Amphotericin B (L-AMB). **J. Med. Toxicol.** v.66, p.874-879, 2011.

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.

HAN et al. Mixed Micellar Nanoparticle of Amphotericin B and Poly Styrene-block-poly Ethylene Oxide Reduces Nephrotoxicity but Retains Antifungal Activity. **Arc Pharm**, v.30, n.10, p.1344-1349, 2007.

HOOSHMAND-RAD et al. Use of amphotericin B lipid complex in elderly patients. **J. Infection.**, v. 50, p.277-287, 2005.

ITALIA, J.L., M. M. YAHYA, D. SINGH, AND M. N. V. RAVI KUMAR. Biodegradable Nanoparticles Improve Oral Bioavailability of Amphotericin B and Show Reduced Nephrotoxicity Compared to Intravenous Fungizone®. **Pharmaceutical Research**, v.26, n.6, 2009.

J. A. SÁNCHEZ-BRUNETE, M. A. DEA, S. RAMA, F. BOLA'S, J. M. ALUNDA, R. RAPOSO. Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis with Amphotericin B in Stable Albumin Microspheres. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.48, n.9, p.3246-3252, 2004.

JOHNSON et al. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B compared with conventional amphotericin for induction therapy of histoplasmosis in patients with AIDS. **Ann Intern Med**; v.137, p.105-109, 2002.

K.C. PESTANAA, T.P. FORMARIZA, C.M. FRANZINIA, V.H.V. SARMENTOB, L.A. CHIAVACCI A, M.V. SCARPAA, E.S.T. EGITOC, A.G. OLIVEIRAA, Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.66,2 p.53–259, 2008.

KISHOR et al. Highly Effective Oral Amphotericin B Formulation against Murine Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**. p.357-360, 2009.

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

KRISANAPIBOON, B BURANAPANITKIT K OUNGBHO. Biocompatibility of hydroxyapatite composite as a local drug delivery system. **Journal of Orthopaedic Surgery**; v.14, n.3, p.315-318, 2006.

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.

LEON. In vitro cytotoxicity of two novel oral formulations of Amphotericin B (iCo-009 and iCo-010) against *Candida albicans*, human monocytic and kidney cell lines. **Lipids in Health and Disease**, v.10, p.144, 2011.

LINCOPAN, N., Mamizuka, E., Carmona-Ribeiro, A. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. **J. Antimicrob. Chemother.** v.55, p.727-734, 2005.

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.

MARTINDALE; The complete Drug Reference; Thirty fourth edition. p.391-395

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J. bras. pneumol.**, v.32, n.5, p.449-460., 2006.

MORENO, M.A.; FRUTOS,P.; BALLESTEROS, M.P. Lyophilized lecithin-based oilwater microemulsion as a new low toxic delivery system for Amphotericin B. **Pharm.Res.** v.18, p.344-351, 2001

MORIBE K, MARUYAMA K . Pharmaceutical design of the liposomal antimicrobial agents for infectious disease. **Curr Pharm Des** v.8, p.441-454, 2002.

NAHAR et al .Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles **.Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** v.4, p.252-261, 2008.

OLIVEIRA, A.G. et al. Microemulsões:estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos.**Quím. Nova**, v.27, n.1, p.131-138, 2004

OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Ciên. Farm.** v.41, p.301-313, 2005.

OTSUBO, T.; MARUYAMA, K.; MAESAKI, S.; MIYAZAKI, Y.; TANAKA, E.; TAKIZAWA, T.; MORIBE, K.;TOMONO, K.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Long-circulating immunoliposomal amphotericin B against invasive pulmonary aspergillosis in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 40-44, 1998.

PEIXOTO, D. Lima Guedes Avaliação da Biocompatibilidade da Anfotericina B em duas formulações : livre e associadas com nanopartículas magnéticas.Pós graduação em Patologia Molecular. Brasília, 2008.

PRAKASH, J.J., KUMAR, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v.40, p.456-465, 2010.

RAFAEL L.L., CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity .**RevIberoam Micol.** v.26, n.4, p.223-227, 2009.

SAFDAR et al. Drug-Induced Nephrotoxicity Caused by Amphotericin BLipid Complex and Liposomal Amphotericin B. v.89, n.4, 2010.

SAMUSI et al. Synthesis of a Highly Water-Soluble Derivative ofAmphotericin B with Attenuated Proinflammatory Activity. Department of Medicinal Chemistry, UniVersity of Kansas, Lawrence, **Molecular Pharmaceutics** v.6, n.5, 2009.

SEN, N., SAMANTA, A., BAIDYA, S., GUPTA, B., GHOSH, L. Development of amphotericin B loaded nanoparticles. **Boll. Chim. Farm.** v.137,p.295–297, 1988.

SOUZA, L.C.; CAMPA, A. Pharmacological parameters of intravenously administered amphotericin B in rats: comparison of the conventional formulation with amphotericin B associated with a triglyceride-rich emulsion. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.44, p.77-84, 1999.

SOUZA, L.C.; SALDIVA, P.H.N.; CAMPA, A. Lipid emulsion reduces subacute toxicity of amphotericin B: a histopathological study. **Exp. Toxic. Pathol.**, v.52, p.169-175, 2000.

STORM, G., ETTEN, E.V.. Biopharmaceutical Aspects Of Lipid Formulations Of Amphotericin B. **J.Clinic Microbiol.Infect.Dis**, v.16, p.64-73, 1997.

THOMAS A. DIEZI, JODY K. TAKEMOTO, NEAL M. DAVIES, GLEN S. KWON, Pharmacokinetics and Nephrotoxicity of Amphotericin B-Incorporated Poly(Ethylene Glycol)-Block-Poly(N-Hexyl Stearate I-aspartamide) Micelles. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.6, 2011

TORRADO et al. Microesferas de anfotericina B. Solicitud de Patente, Espanha, 2004.

UEHARA, R.P. et al. Continuous infusion of amphotericin B: preliminary experience at Faculdade de Medicina da Fundação ABC. **Sao Paulo Med. J.**, v.123, n.5, p.219-222. 2005.

VENIER-JULIENNE, M., BENOIT, J., 1996. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. **Pharm. Acta Helv.** v.71, p.121–128.

VIEIRA, D.B., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **J. Colloid Interf. Sci.** v.244, p.427–431, 2001.

VIJAY et al. Targeted killing of *Leishmania donovani* in vivo and in vitro with amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes. **J Antimicrob Chemother**; v.66, p.874-879, 2011.

WAREE TIYABOONCHAI, JAMES WOISZWILLO, C. RUSSELL MIDDAUGH .Formulation and Characterization of Amphotericin B Polyethylenimine Dextran Sulfate Nanoparticles. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v.90, n.7, 2001

WHYTE, B.S.; PETERSON, R.P.; HARTSEL, S.C. Amphotericin B and nystatin show different activities on sterol free vesicles. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.164, p.609-614, 1989.

WINGARD et al. A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. **Clinic infect disease** v.31, p.1155-63, 2001.

WU, T.C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. **Clin. Infect. Dis.** v.19, p. 54-58, 1994.