



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA



DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROEMULSÕES CONTENDO
FLUCONAZOL PARA O TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Marcela Brito Oliveira



ARARAQUARA - SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROEMULSÕES CONTENDO FLUCONAZOL PARA O
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Marcela Brito Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do
grau de Farmacêutica-Bioquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marlus Chorilli

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Márcia Aparecida Graminha

ARARAQUARA – SP

2012

Candidata: Marcela Brito Oliveira

Título do Trabalho: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES CONTENDO FLUCONAZOL PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Monografia, em sessão pública realizada em 22 de novembro de 2012, consideraram a candidata:

(X) APROVADO () REPROVADO

Comissão Examinadora

Examinadora *Dra. Priscileila Colerato Ferrari*

Examinadora *Profa. Dra. Mara Cristina Pinto*

Presidente *Prof. Dr. Marlus Chorilli*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que
fizeram o impossível para que eu me tor-
nasse Farmacêutica - Bioquímica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Reginaldo e Dilma, pelo imenso esforço em garantir que tivesse a melhor educação, nas piores situações vivenciadas. Te amo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela confiança, apoio na orientação do trabalho e muita paciência nesses dois anos de estágio no laboratório.

A Profa. Dra. Márcia Aparecida Graminha pela co-orientação e por ter cedido o laboratório para a realização dos ensaios de citotoxicidade para as leishmanias.

À técnica Isabel Martinez pelo auxílio na realização dos ensaios leishmanicidas in vitro.

Agradeço aos amigos do laboratório Fernanda Kolenyak, Giovana Calixto e Márcia Oyafuso, pelos ensinamentos e amizade durante as atividades do dia-dia no laboratório.

Aos companheiros do laboratório pelas inúmeras confraternizações realizadas no laboratório e fora da faculdade.

Agradeço aos professores do laboratório Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira e Prof. Dr. Raul César Evangelista pelo conhecimento compartilhado e risadas durante o período de atividades de laboratório.

Agradeço ao pessoal da secretaria da graduação, em especial ao Alexandre Donizeti Pazoti pelos milhares de ajuda e apoio prestados durante o período letivo e durante o intercambio em Portugal. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Celso Santilli do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP - Araraquara pela disponibilização do seu laboratório para realização das análises de difração de Raios X.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa por ter disponibilizado o uso do microscópio de luz polarizada.

Aos meus amigos de graduação Érica Funagoshi, Fernanda Oliveira e Natália Nakamura pelas caronas, cumplicidade, apoio para realizar o intercâmbio, e companhia para festas...

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

A FAPESP pelo apoio financeiro (Proc.FAPESP nº 2011/10595-6).

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é causada pela picada da fêmea dos insetos flebotomíneos. As lesões podem evoluir de pápulas para úlceras, que apresentam fundo granuloso e bordas infiltradas, as quais são indolores, podendo ser únicas ou múltiplas. Trata-se de uma doença negligenciada e o investimento em seu tratamento é desprezível. Até hoje, são empregados no tratamento medicamentos a base de antimônio pentavalente, além de outros fármacos como pentamidina, anfotericina B, paromomicina, imidazoquinolina, antifúngicos, como o fluconazol (FLU). As microemulsões (MEs) melhoraram a solubilidade e estabilidade dos fármacos, além de proporcionarem ação prolongada, vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos do organismo. Este trabalho teve como objetivos desenvolver e caracterizar MEs contendo FLU, caracterizar estruturalmente por meio de análises de microscopia de luz polarizada, análise do tamanho das gotículas, análise do perfil de textura e avaliação da bioadesão. Para o estudo de estabilidade foram empregados ensaios de avaliação visual e determinação do pH. Quanto aos ensaios biológicos *in vitro*, foram realizados ensaios colorimétricos das amostras visando verificar se o sistema desenvolvido permite a potencialização do poder leishmanicida do FLU contra as formas promastigotas da *Leishmania amazonensis*. Pelo diagrama de fases observou-se fases líquido-cristalinas confirmadas pela microscopia de luz polarizada, e foram selecionadas três formulações: uma SLT e duas SVT. Todos os ensaios de caracterização estrutural para a F2 sofreram variação quando acrescentou o fármaco, exceto para o potencial zeta, difração de raios X e bioadesão. Não houve alteração no ensaio de estabilidade físico-química no período analisado. Os ensaios biológicos *in vitro* evidenciaram, nas condições metodológicas, inefetividade do sistema contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Palavras-chave: Microemulsões; Fluconazol; Leishmaniose Tegumentar.

ABSTRACT

The cutaneous leishmaniasis is caused by the bite of female phlebotomine insects. The lesions may evolve papules and ulcers, that present infiltrated granular base and edges, which are painless, and may be single or multiple. This is a neglected disease and the investment in the treatment is negligible. Until today, are employed in the treatment medications based on pentavalent antimony, and other drugs such as pentamidine, amphotericin B, paromomycin, imidazoquinoline, antifungals such as fluconazole (FLU). Microemulsions (MEs) improve the solubility and drugs stability, in addition to providing prolonged action, vectoring differentiated to certain tissues or organs. This study aimed to develop and characterize MEs containing FLU, characterized structurally by polarized light microscopy, droplet size, texture profile analysis and evaluation of bioadhesion. For the stability study, it was performed assay of visual evaluation and determination of pH. As for *in vitro* biological assays, it were performed colorimetric assays of samples to verify whether the developed system allows the enhancement of the power leishmanicidal of the FLU against promastigotes forms of *Leishmania amazonensis*. By the phase diagram observed liquid-crystalline phases confirmed by polarized light microscopy, it was chosen three formulations: one liquid transparent system (LTS) and two viscous transparent systems (VTS). It was observed variation of the structural characteristics for F2 when it was added the drug, except for zeta potential, X-ray diffraction and bioadhesion assays. It was not observed changes in physic-chemical stability in the analyzed period. The *in vitro* biological assays showed ineffectiveness of the system against promastigotes forms of *L. amazonensis*.

Keywords: Microemulsions; Fluconazole; Cutaneous Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da leishmaniose cutânea e muco-cutânea (A) e a distribuição da leishmaniose visceral (B)	20
Figura 2. Fêmea do Flebotomíneo	21
Figura 3. Formas dos parasitas forma amastigota (Figura 3A) parasitas promastigota (Figura 3B)	21
Figura 4. Ciclo evolutivo da leishmaniose	22
Figura 5. Lesões da leishmaniose muco-cutânea a) cutânea, b) muco-cutânea, c) calazar ou visceral, d) cutânea difusa.....	23
Figura 6. Fármacos de primeira escolha n-metil glucamina e stibogluconato de sódio.	24
Figura 7. Alguns fármacos de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose	25
Figura 8. Estrutura do fluconazol	26
Figura 9. Formas de penetração de fármacos através da pele e seus anexos. (a) 1. por via de ductos sudoríparos; 2. Pelo estrato córneo contínuo; ou 3. Por folículos pilosos com suas glândulas sebáceas associadas. (b) Estrato córneo penetração via intercelular e transcelular.....	30
Figura 10. Seqüência teórica dos diferentes tipos de fases formadas	34
Figura 11. Estrutura química do óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado	35
Figura 12. Estrutura química da fosfatidilcolina de soja	36
Figura 13. Estrutura química do oleato de sódio	36
Figura 14. Estrutura química do colesterol	37
Figura 15. Ensaio proposto para ensaio biológico <i>in vitro</i>	46
Figura 16. Diagrama de Fases segundo regiões observadas no sistema	49

Lista de Figuras

Figura 17. Representação da Cruz-de malta e estrias 17A e Cruz-de-malta 17B (aumento de 20x).....	50
Figura 18. Fotomicrografias das amostras F1(18A), F2 (18B) e F3 (18C) obtidas por microscopia de luz polarizada (aumento de 20x).....	51
Figure 19. Dureza das Amostras.....	52
Figura 20. Adesividade das Amostras	52
Figura 21. Compressibilidade das Amostras.....	53
Figura 22. Coesão das Amostras	53
Figura 23. DRX dos componentes da microemulsão	56
Figura 24. DRX das misturas físicas das amostras F1e F1D, F2 e F2D e F3 e F3D.....	56
Figura 25. DRX das formulações para a F1e F1D, F2 e F2D e F3 e F3D	57
Figura 26. Força máxima versus tempo obtido a partir de formulações com e sem o fármaco, em comparação com gel de Carbopol [®] 974P 0,5%.....	58
Figura 27. Trabalho de aderência das formulações obtidas com e sem o fármaco, em comparação com Carbopol [®] 974P gel de 0,5%	59
Figura 28. IC ₅₀ da formulação F1 com e sem o fármaco.	62
Figura 29. IC ₅₀ da formulação F2 com e sem o fármaco.	62
Figura 30. IC ₅₀ da formulação F3 com e sem o fármaco	63
Figura 31. IC ₅₀ do fármaco	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações dos pontos F1, F2 e F3 das formulações escolhidas48

Tabela 2. Valores de média e desvio-padrão de compressibilidade, dureza, adesividade e coesão das formulações.53

Figura 3. Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos da partícula e índice de polidispersão para as formulações.54

Tabela 4. Tabela com a média e desvio-padrão do potencial zeta das formulações.....55

Tabela 5. Valores de média e desvio-padrão de força x tempo e trabalho de adesão.....59

Tabela 6. Determinação do pH das formulações.61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- %C**..... Porcentagem de citotoxicidade.
- D**..... Coeficiente de difusão das partículas.
- DO** Densidade ótica.
- F1** Formulação 1.
- F1D** Formulação 1 com o Fluconazol.
- F2** Formulação 2.
- F2D** Formulação 2 com o Fluconazol.
- F3** Formulação 3.
- F3D** Formulação 3 com o Fluconazol.
- FLU** Fluconazol.
- I(q)** Intensidade de espalhamento.
- IC₅₀** Concentração Máxima Inibitória de 50%.
- IPD** Diâmetro e índice de polidispersidade.
- K** Constante de Boltzmann.
- LIT** Liver Infusion Triptose.
- LT** Leishmaniose Tegumentar.
- MEs** Microemulsões.
- MTT** [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bro-
mide].
- PMS** Metassulfato de fenazina.
- Rh** Raio hidrodinâmico.
- SDS** Dodecil sulfato de sódio.
- SF** Separação de Fases.

Lista de Abreviaturas e Siglas

SLT Sistema Líquido Transparente.

SVO Sistema Viscoso Opaco.

SVT..... Sistema Viscoso Transparente.

T..... Tensoativo.

Tab..... Temperatura absoluta.

TFDA..... Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana.

ζ mV Potencial zeta.

η Viscosidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A Leishmaniose	20
2.2 Fármacos azólicos	26
2.2.1 O Fluconazol (FLU)	26
2.3 A Pele e os anexos	28
2.3 Vias de absorção de fármacos através da pele	29
2.4 Sistemas de liberação de fármacos	31
2.5 Microemulsões	32
2.6 Características dos componentes das MEs	35
2.6.1 Óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado	35
2.6.2 Fosfatidilcolina de soja	35
2.6.3 Oleato de sódio	36
2.6.4 Colesterol	36
2.6.5 Tampão-Fosfato	37
3. OBJETIVOS	38
3.1 Geral	38
3.2 Específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Materiais	39
4.2 Equipamentos	39
4.3 Métodos	40
4.3.1 Desenvolvimentos dos sistemas	40
4.3.2 Caracterização físico-química e estrutural dos sistemas	41
4.3.2.1 Microscopia de luz polarizada	41
4.3.2.2 Análise das Propriedades de Textura (TPA)	41
4.3.2.3 Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico)	42
4.3.2.4 Análise do Potencial Zeta	43

Sumário

4.3.2.5 Difração de raios-X	43
4.3.2.6 Avaliação da bioadesão	43
4.4 Ensaios de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos	44
4.4.1 Avaliação visual	44
4.4.2 Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo	44
4.5 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	44
4.5.1 Ação leishmanicida <i>in vitro</i>	44
4.6 Análises Estatísticas	47
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO	48
5.1 Desenvolvimentos dos sistemas	48
5.2 Caracterização físico-química e estrutural dos sistemas	49
5.2.1 Microscopia de luz polarizada	49
5.2.3 Análise das Propriedades de Textura (TPA)	51
5.2.4 Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico)	53
5.2.5 Análise do Potencial Zeta	54
5.2.6 Difração de Raio X (DRX)	55
5.2.7 Avaliação da Bioadesão	57
5.3 Ensaios de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos	60
5.3.1 Avaliação visual	60
5.3.2 Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo	60
5.4 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	61
5.4.1 Ação leishmanicida <i>in vitro</i>	61
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. APÊNDICE	74
Apêndice A - Difração de Raio X	74

1.INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, é considerada doença infecciosa, porém não contagiosa. Esta doença, predominantemente de regiões de climas tropicais e neotropicais, pode se manifestar de duas formas principais: visceral e tegumentar, sendo que a leishmaniose tegumentar (LT) abrange a cutânea, a cutânea difusa e a muco-cutânea (BEZERRA *et al.*, 2004).

A LT apresenta uma incidência crescente no Brasil, sendo considerada uma doença negligenciada em virtude do pouco interesse por parte dos doadores financeiros, autoridades de saúde pública e profissionais para a realização de atividades de investigação, prevenção ou controle da doença. Trata-se de uma afecção que merece maior atenção, devido à sua magnitude, tanto pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem, como também pelo envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional, uma vez que os trabalhadores adquirem a doença quando estão trabalhando na mata ou próximo a ela (REITHINGER *et al.*, 2007).

Pode-se dizer que, no Brasil, a doença apresenta dois padrões epidemiológicos característicos. Um deles é caracterizado por surtos epidêmicos associados à derrubada das matas para construção de estradas, instalação de povoados em regiões pioneiras e exploração desordenada de florestas com derrubada de matas para extração de madeira, agricultura e pecuária. O segundo, por sua vez, está relacionado à ocupação de encostas e aglomerados semi-urbanizados na periferia das grandes cidades (BRASIL, 2000).

O tratamento da LT é um desafio porque os fármacos disponíveis apresentam elevada toxicidade, além de serem usados tanto em adultos como em crianças, sendo a dose distinta

Introdução

entre os grupos. A duração do tratamento é de longo prazo e muitas espécies de *Leishmania* possuem resistência; desta forma, poucos fármacos são realmente eficazes. Os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metil glucamina, possuem restrições à pacientes gestantes, para as quais indicam-se o tratamento a partir do 6º mês, com doses mais baixas e controle laboratorial. Também existem restrições para o tratamento de pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas. O uso deve ser acompanhado de uma rigorosa avaliação clínica antes do tratamento e reavaliações clínicas periódicas, com acompanhamento eletrocardiográfico, duas vezes por semana, além de exame bioquímico de sangue (BRASIL, 2000).

Tendo em vista os problemas oriundos dos fármacos usuais, a busca por alternativas ao tratamento convencional tem se mostrada de grande valia. Há relatos de fármacos administrados topicamente, exercendo ação coadjuvante no tratamento da LT. Podem ser utilizados cremes com imidazoquinolina e pomadas com paromomicina, porém tais formulações não têm mostrado eficácia contra todas as espécies de *Leishmania*. Também, alopurinol, miltefosine, azitromicina e antifúngicos imidazólicos, como o fluconazol (FLU), têm sido empregados por via oral em terapias combinadas, exercendo ação coadjuvante contra algumas espécies de *Leishmania*, uma vez que contribuem para uma diminuição no tempo de cicatrização de lesões localizadas (LIMA, 2007; SALERNO *et al.*, 2010;).

Em virtude do grande número de citações na literatura científica, as indústrias farmacêuticas têm se interessado no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação controlada de fármacos, além de protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação (MOHANRAJ & CHEN, 2006; GUTERRES *et al.*, 2007).

As microemulsões (MEs) podem ser definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou

Introdução

não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável e apresentando gotículas da fase interna na ordem de nanômetros (nm). As substâncias ativas podem ser veiculadas nas microemulsões quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa (OLIVEIRA & SCARPA, 2001; FORMARIZ *et al.*, 2005).

A incorporação do FLU em MEs, que é o grande enfoque desta pesquisa, parece ser extremamente viável, objetivando o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica eficaz, com doses menores e com efeitos colaterais reduzidos. SALERNO *et al.* (2010) relataram a incorporação de FLU em formulações contendo 5% de óleo de rícino como fase oleosa e 15% de Eumulgin HRE® 40 como tensoativo. Os resultados obtidos pelos autores foram promissores, uma vez que observaram que a retenção do fármaco na pele aumentava quando incorporada neste sistema.

Outro ponto a ser destacado é a capacidade dos sistemas microemulsionados melhorarem a solubilidade e estabilidade dos fármacos, além de proporcionarem ação prolongada, aumentando sua biodisponibilidade e diminuir sua dose administrada, gerando a vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos do organismo e poderem veicular substâncias ativas com diferentes graus de hidrofília/lipofília na mesma formulação (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003; SINTOV & SHAPIRO, 2004).

O objeto do estudo foi a obtenção e caracterização de microemulsões contendo fluconazol para o tratamento da leishmaniose tegumentar. A caracterização estrutural das formulações foi realizada por meio de análises de microscopia de luz polarizada, análise do tamanho das gotículas, análise do perfil de textura, difração de raios X e avaliação da bioadesão. Para o estudo de estabilidade foram empregados ensaios de avaliação visual e determinação do pH. Quanto aos ensaios biológicos *in vitro*, foram realizados ensaios colorimétricos das amostras visando verificar se o sistema desenvolvido permite a

Introdução

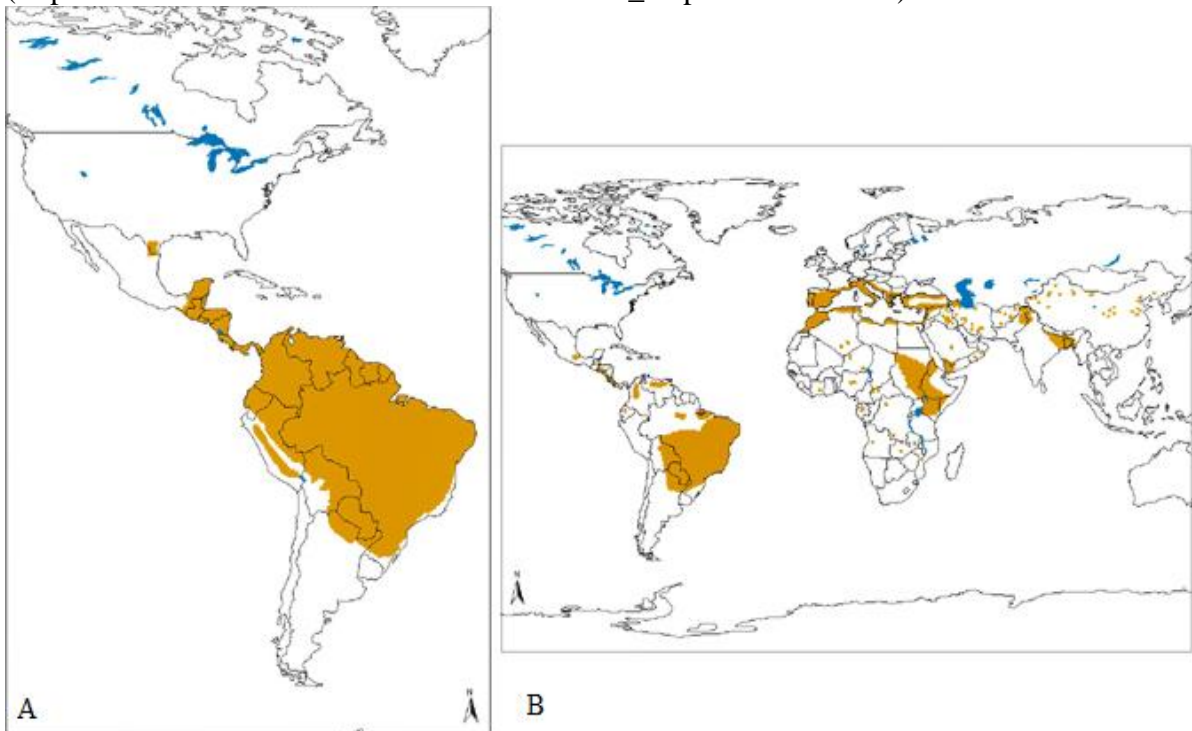
potencialização do poder leishmanicida do FLU contra as formas promastigotas da *Leishmania amazonensis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Leishmaniose

A epidemiologia das leishmanioses é bastante considerável, tendo em vista o registro em mais de 80 países, afetando cerca de quinze milhões de pessoas. A Figura 1A mostra a incidência da leishmaniose cutânea e muco-cutânea no Brasil e na Figura 1B a prevalência da leishmaniose visceral no Brasil e no mundo. Segundo informações de Alvar et al. (2006), a incidência por ano é de dois milhões de novos casos; destes, um quarto é causado pela forma visceral (90% deles no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão) e o restante deve-se à forma muco-cutânea (90% deles no Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Sudão).

Figura 1. Distribuição da leishmaniose cutânea e muco-cutânea (A) e a distribuição da leishmaniose visceral (B) (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html).



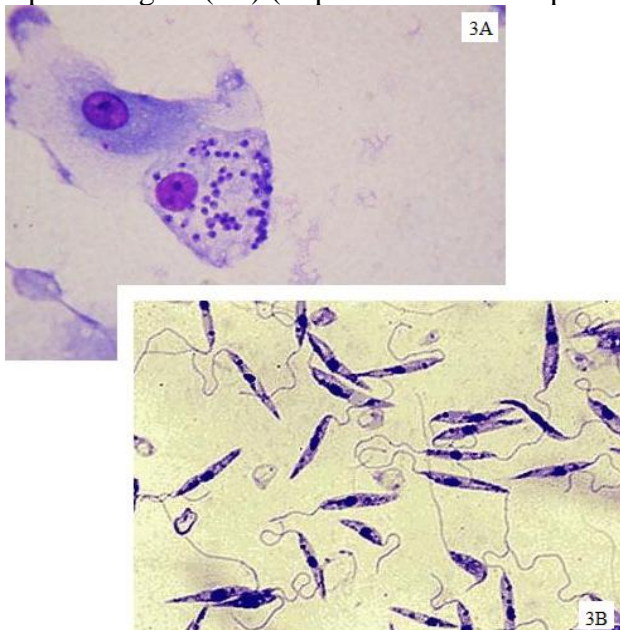
Revisão Bibliográfica

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e da família Tripanosomatidae, sendo transmitida por diferentes insetos vetores (flebotomíneos) da família Psychodidae e da subfamília Phlebotaminae (Figura 2). Os parasitas causadores da doença apresentam-se na forma amastigota (Figura 3A), forma infectante do homem e causadora das lesões, que se desenvolvem no interior de células de defesa, os macrófagos, e na forma flagelada dos parasitas promastigota (Figura 3B), forma infectante do inseto vetor, que se desenvolvem no interior do tubo digestório do inseto (BASTOS *et al.*, 2012).

Figura 2. Fêmea do Flebotomíneo (<http://www.ufrgs.br/parasite/Imagensatlas/Athropoda/Lutzomyia.htm>).



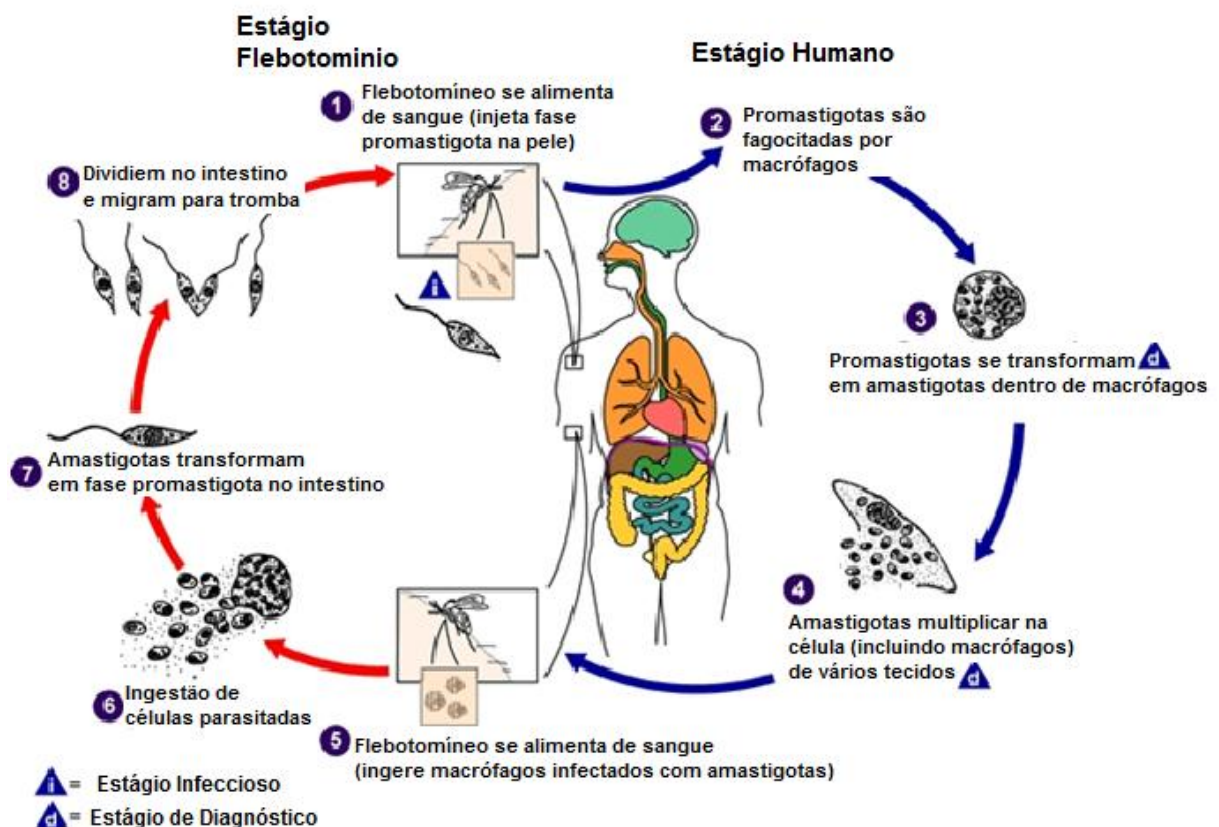
Figura 3. Formas dos parasitas amastigota (3A) e promastigota (3B) (<http://www.medicinapratica.com.br/tag/amastigota>).



Revisão Bibliográfica

A Figura 4 mostra o ciclo evolutivo e de transmissão da doença que ocorre quando o inseto flebotomíneo - fêmea suga o sangue do hospedeiro vertebrado e simultaneamente regurgita formas promastigotas metacíclicas; estas formas são fagocitadas por macrófagos (células do sistema fagocítico mononucleares) do homem e quando no interior do macrófago, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, e estas se multiplicam e levam ao rompimento da célula hospedeira. A lise libera grande quantidade de parasitas, que infectam outros macrófagos, final da fase evolutiva no homem. O estágio evolutivo no vetor ocorre quando o inseto suga o sangue do hospedeiro infectado e no interior do tubo digestório as formas amastigotas são transformadas em formas promastigotas, que ao picar o homem são transmitidas (LESHER *et al.*, 1999).

Figura 4. Ciclo evolutivo da Leishmaniose (<http://caminhosdabio.wordpress.com/category/inseto/flebotomo/promastigota-e-amastigota/>).



Revisão Bibliográfica

A Figura 5 mostra os tipos de leishmanioses que podem acometer o homem: tegumentar (cutânea, muco-cutânea e cutânea difusa), visceral ou calazar. A leishmaniose cutânea (Figura 5A) pode ser do tipo localizado ou difuso, sendo causada pelas espécies *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. major* e é caracterizada por lesões na pele. Já a leishmaniose tegumentar (LT), figura 5B, é causada pela *L. braziliensis*, compreendendo lesões que destroem parcial ou totalmente a mucosa nasal e oral, gerando deformidades. A leishmaniose visceral (Figura 5C) é causada pelas espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. É uma doença sistêmica, pois afeta vários órgãos, sendo que os mais acometidos são o fígado, baço e medula óssea. Sua evolução é longa, podendo, em alguns casos, até ultrapassar o período de um ano. A leishmaniose cutânea difusa (Figura 5D) é a mais rara causada por *L. amazonensis* que correspondem a metástase da forma cutânea. A espécie de *Leishmania* causadora da muco-cutânea mais comum no Brasil é *L. braziliensis*, embora existam outras que acometem pele, mucosas e vísceras (DARDARI, 2004; NETO *et al.*, 2008).

Figura 5. Lesões da Leishmaniose A. Cutânea, B. Muco-Cutânea, C. Calazar ou Visceral, D. Cutânea Difusa
(http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n11/fig_tab/nrmicro1748_F2.html).



Revisão Bibliográfica

Os fármacos de primeira escolha disponíveis para o tratamento da LT apresentam-se em grande parte na forma de solução injetáveis, sendo verificados dois tipos de antimoniais pentavalentes: o antimoníato n-metil glucamina e o stibogluconato de sódio (Figura 6). Não havendo resposta satisfatória ou na impossibilidade de utilizar os antimoniais pentavalentes, os fármacos de segunda escolha (Figura 7) são a anfotericina B e a pentamidina, sendo esta apresentada sob a forma de dois sais (isotionato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (LAFFITTE, GENTON & PANIZZON, 2005; CROFT, SEIFERT & YARDLEY, 2006).

Figura 6. Fármacos de primeira escolha n-metil glucamina e stibogluconato de sódio (BASTOS *et al.*, 2012).

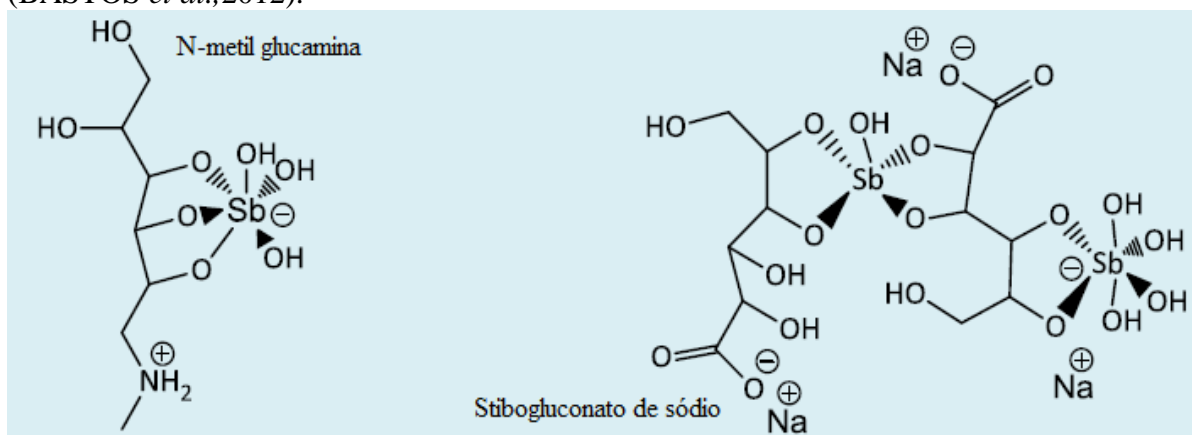
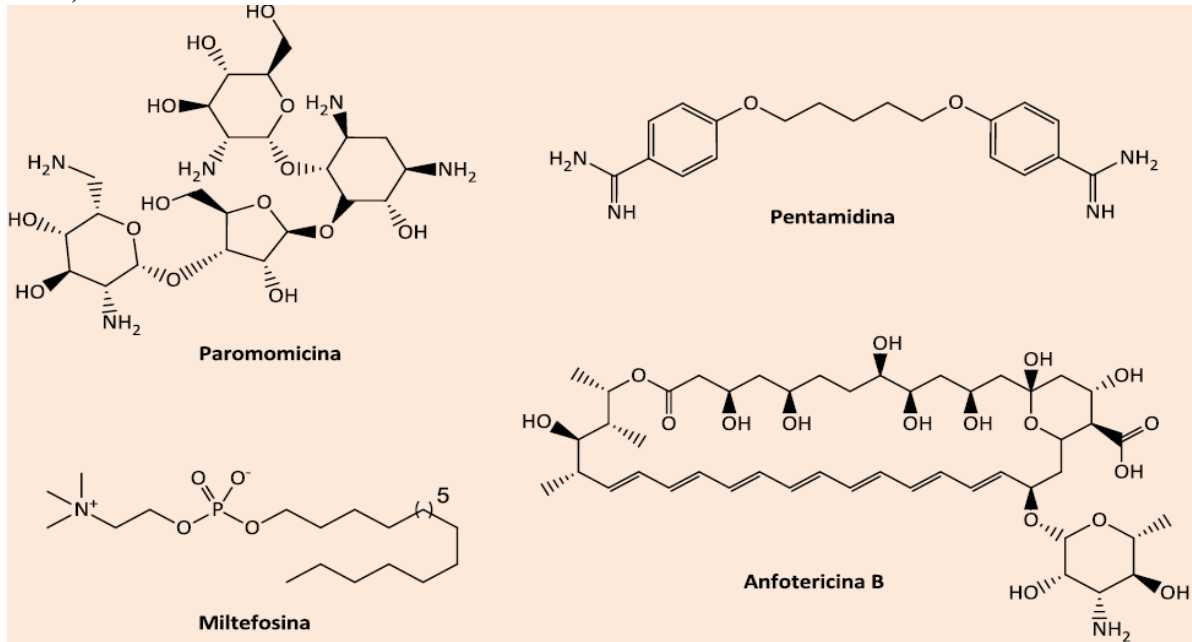


Figura 7. Alguns fármacos de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose (BASTOS, 2012).



Outras formas de administração de fármacos para o tratamento da leishmaniose podem ser os cremes a base de imidazoquinolina e as pomadas com paromomicina, porém tais formulações não têm mostrado eficácia contra todas as espécies de *Leishmania*, uma vez que o desenvolvimento dos parasitas ocorre no interior do macrófago do homem, e a penetração destas formulações na pele para atingir a corrente sanguínea e entrar em contato com as células fagocíticas com amastigotas é baixa. Também, alopurinol, miltefosina, azitromicina e antifúngicos imidazólicos, como o fluconazol (FLU), têm sido empregados por via oral em terapias combinadas, exercendo ação coadjuvante contra algumas espécies de *Leishmania*, uma vez que contribuem para uma diminuição no tempo de cicatrização de lesões localizadas (LIMA, 2007; SALERNO *et al.*, 2010).

Estudos recentes mostraram bons resultados na utilização de quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) com as porfirinas fazendo papel de fotossensibilizadores no combate de leishmaniasis cutânea, porém estudos ainda necessitam ser

explorados para elucidação de seu uso como forma de tratamento eficaz e seguro (BASTOS *et al.*, 2012).

A administração dos fármacos é geralmente realizada por via parenteral, intramuscular ou endovenosa, de acordo com o fármaco utilizado, sempre mantendo o paciente em repouso durante a aplicação. A melhor via de administração é a endovenosa, pois permite a aplicação de volumes de medicamento maiores que a intramuscular, além de controlar o volume injetado por unidade de tempo. Também, não tem o inconveniente da dor local, uma vez que o tratamento das lesões é de longa duração, ou seja, até a cicatrização das feridas (LIMA *et al.*, 2007).

2.2 Fármacos azólicos

Em meados da década de 1970, a descoberta do antifúngico da família dos azóis foi de grande impacto na vida da população, sendo possível curar doenças que antes não era possível devido ao seu grande espectro de ação. Existem dois subgrupos: os imidazólicos (miconazol, cetoconazol) e triazólicos de 1° geração (fluconazol, itraconazol) e os de 2° geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol), sendo estes últimos oriundos da modificações estrutural do fluconazol e itraconazol, respectivamente (MARTINEZ *et al.*, 2006).

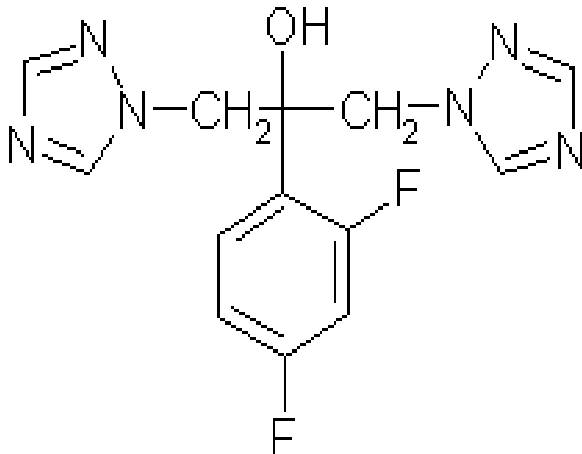
2.2.1 O Fluconazol (FLU)

O FLU é um antifúngico da família dos azólicos, fazendo parte da primeira geração dos antifúngicos, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 8. Trata-se de um antifúngico que apresenta na sua estrutura dois anéis bis-triazóis que contribuem para a sua moderada lipofilicidade ($\log P = 0,5$). Possui um amplo espectro de ação, ligando-se menos que 11% às proteínas plasmáticas. Este fármaco possui biodisponibilidade em jejum superior a 90% e distribuição rápida nos fluidos e tecidos. Após administração oral (50 mg

Revisão Bibliográfica

diariamente durante 12 dias ou 150 mg uma vez por semana durante duas semanas) para o tratamento de infecções fúngicas, este fármaco se acumula no suor e rapidamente se difunde para o estrato córneo, onde se acumula em maior quantidade quando comparado ao sêrum. Também, sua eliminação a partir do estrato córneo é consideravelmente mais lenta que a partir do sêrum ou plasma, em virtude de sua interação com a queratina (FAERGEMANN & LAUFEN, 1993; WILDFEUER, 1994; KLIMKE & SCHÄFER-KORTING, *et al.*, 1997).

Figura 8. Estrutura do Fluconazol (<http://kdbio.inesc-id.pt/~atf/bioinformatics.ath.cx/bioinformatics.ath.cx/indexa7a0.html?id=158>).



O FLU atua na inibição do processo de demetilação C-14-esterol em virtude de agir inibindo o citocromo P450 fúngico, evitando a síntese do ergosterol da membrana dos protozoários de algumas espécies de *Leishmania* pela inibição da síntese de esteróides específicos e indispensáveis para o crescimento e viabilidade celular (SALERNO *et al.*, 2010).

Apesar de o FLU ser eficaz no tratamento de lesões cutâneas causadas por *L. major*, alguns autores ressaltam que altas doses deste fármaco administradas por via oral podem levar ao aparecimento de efeitos colaterais relevantes, como problemas hepáticos (náuseas, vômitos, icterícia, toxicidade hepática, hepatite, necrose hepatocelular, elevação dos níveis de fosfatase alcalina, bilirrubina, TGO e TGP), problemas sangüíneo e linfático (leucopenia),

alterações imunológicas; metabólicas e nutricionais (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipocalemia), alterações no sistema cardíaco, nervoso (tontura, convulsões, distúrbio de paladar) e anafilaxia (ALRAJHI *et al.*, 2002; BARON *et al.*, 2004).

2.3 A Pele e os anexos

A pele é o maior órgão do corpo humano, recebe irrigação sanguínea de aproximadamente 1/3 de todo o fluxo sanguíneo corpóreo e apresenta a espessura de $2,97 \pm 0,28$ mm. A pele atua como barreira cutânea contra agentes que causam danos ao equilíbrio do corpo humano, é dividida em três partes: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo, sendo que o tecido subcutâneo não participa do sistema vascular da pele, devido estar situado abaixo da rede de irrigação sanguínea e ser um depósito de lipídios. Os anexos da pele são constituídos de glândulas sudoríparas que desempenham papel de termorregulador do corpo humano por secretar substâncias que mantêm a temperatura corporal estável; os pelos que participam como isolantes térmicos não deixando o corpo perder calor para o meio em situações de frio extremo e as glândulas sebáceas que mantêm as duas estruturas citadas lubrificadas e protegidas contra o ressecamento cutâneo (GRATIERI *et al.*, 2008).

A epiderme é dividida em dois anexos: a parte superficial ou camada córnea, constituída de células amadurecidas e impregnadas com a queratina (proteína de impermeabilidade do tecido tegumentar), e a parte abaixo da superfície, onde as células da camada basal são produzidas, crescem e se transformam, por impregnação de queratina, em células da camada córnea. As funções desempenhadas são: barreira física impedindo a passagem de substâncias e micro-organismos que não são benéficas ao organismo, controle hidrostático controlando a passagem de água entre a pele e o meio (controlando a hidratação da pele), proteção contra a radiação solar, controle da produção de novas células e a descamação das células antigas presentes no tecido cutâneo. A absorção de princípios ativos ocorre principalmente através da

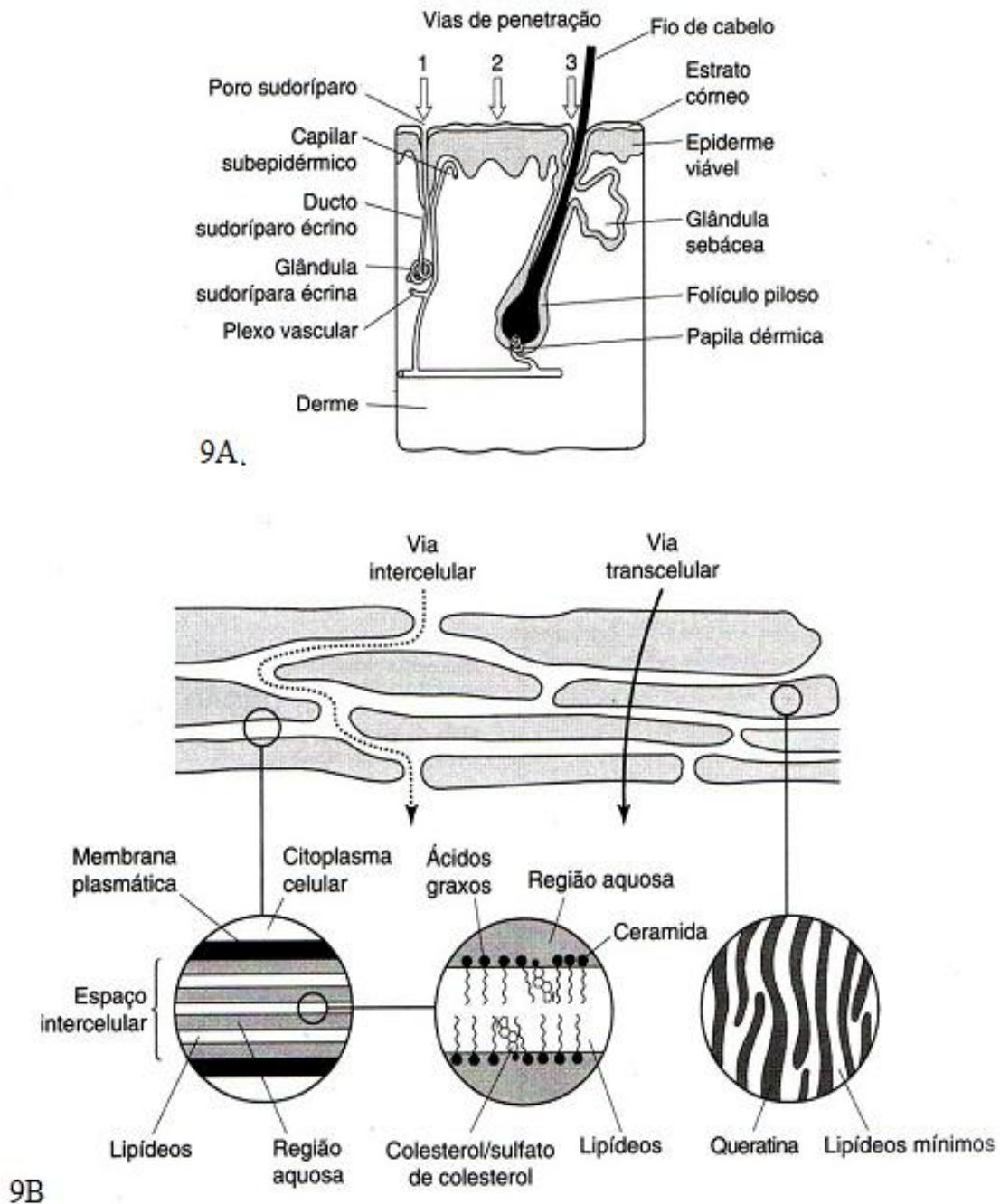
região superficial da pele e pode ser diminuída de acordo com a variação da espessura da pele, quantidade de pelos e glândulas sebáceas, o grau de hidratação da pele, a intensidade de irrigação sanguínea, além de alterar de acordo com a raça, idade, sexo e pH da pele (SILVA *et al.*, 2010).

2.3 Vias de absorção de fármacos através da pele

Os fármacos presentes nos sistemas de liberação podem penetrar pelo tecido cutâneo de três modos distintos, como descrito na Figura 9, pelos anexos da pele (glândulas sebáceas e sudoríparas) ou pelo estrato córneo contínuo (via intercelular ou transcelular). A penetração pelos anexos ocorre pela simples passagem das substâncias pelos pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas; enquanto que pelo estrato córneo contínuo pode ser via intracelular, quando o fármaco atravessa espaços intersticiais entre as células por difusão entre as membranas lipídicas presentes nas células e a via transcelular que ocorre quando o fármaco atravessa a célula por célula do tecido através da matriz lipídica até atingir o sistema vascular (GRATIERI *et al.*, 2008).

Revisão Bibliográfica

Figura 9. Formas de penetração de fármacos através da pele e seus anexos. 9A, 1. Por via de ductos sudoríparos; 2. Pelo estrato córneo contínuo; ou 3. Por folículos pilosos com suas glândulas sebáceas associadas. 9B. estrato córneo penetração via intercelular e transcelular (SOUZA, 2010).



A penetração de fármacos administrados de forma tópica, é devido, primeiramente ao caráter físico-químico do princípio ativo, para garantir que haja a penetração do fármaco ou a sua fixação no estrato córneo, como é o caso do fluconazol, fármaco lipofílico que possui

afinidade por queratina. No entanto, fármacos que apresentam limitada solubilidade em meio aquoso ficam mais facilmente retidos na camada córnea o que dificultam sua eficiência terapêutica tópica, uma vez que possui baixa penetração na pele (NOBRE, 2002; SILVA *et al.*, 2010).

A presença de tensoativos aumenta a permeabilidade da membrana celular, facilitando a absorção do fármaco e possibilitando maior biodisponibilidade (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003). Dessa forma, a administração do FLU de forma a aderir ao tecido cutâneo, pode ser conveniente pois estaria atuando diretamente no local das feridas onde há o crescimento dos protozoários, o que reduziria as reações adversas ocasionadas pelo fármaco, uma vez que não precisaria ser absorvido e metabolizado pelo fígado para agir no local. Por fim, por estar veiculado em um sistema de liberação de fármacos, poderia apresentar uma maior eficácia, em uma menor dose e um menor tempo de tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

2.4 Sistemas de liberação de fármacos

As estratégias tecnológicas que apresentam a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de princípios ativos e de modificar suas propriedades e comportamento em meio biológico, são promissoras para veiculação de tais substâncias. Sabe-se que a introdução de um novo princípio ativo no mercado, além de levar vários anos de pesquisa, envolve custos altíssimos. Assim, uma alternativa que pode ser empregada para contornar estes elevados custos é recorrer à estratégia de desenvolvimento de sistemas de liberação para estes princípios ativos, o que tem permitido o aumento de eficiência de diversos princípios ativos, a reintrodução de outros princípios ativos anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novas substâncias antes que sejam efetivamente lançadas no mercado ou utilizadas na terapêutica (MAINARDES *et al.*, 2006).

Assim, durante os últimos anos têm sido desenvolvidos novos veículos com o objetivo de permitir o controle de liberação, além de aumentar a seletividade e eficácia de princípios ativos, como, também, permitir a redução da dose total necessária, minimizando os efeitos colaterais tóxicos (GRILL, 2009; VENUGOPAL *et al.*, 2009).

As MEs são consideradas sistemas reservatórios, uma vez que o fármaco se encontra separado do meio de dissolução através de uma membrana ou interface, a qual deve ser transposta para que haja sua liberação para o meio. Estes sistemas proporcionam um ambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, capazes de ligar ou associar moléculas de diferentes grupos de fármacos, com o objetivo de solubilizar, modular a quantidade de fármaco liberado, aumentar a estabilidade da droga frente as condições ambientais ou melhorar o perfil de biodisponibilidade, aumentando a concentração da droga no local de ação protegendo o principio ativo (OLIVEIRA & SCARPA *et al.*, 2001).

Logo, sistemas cutâneos de liberação poderiam ser uma alternativa à administração oral para o tratamento da LT. Isso porque o FLU, quando administrado topicamente, apresenta um perfil de aderência em tecidos queratinizados, formando uma interação com o estrato córneo que poderia prolongar a sua liberação, além de apresentar baixa toxicidade em virtude de não haver necessidade de metabolização pelo fígado para ser alcançar o local de ação (AL-ABDELY, 1999; AYUB *et al.*, 2007).

2.5 Microemulsões

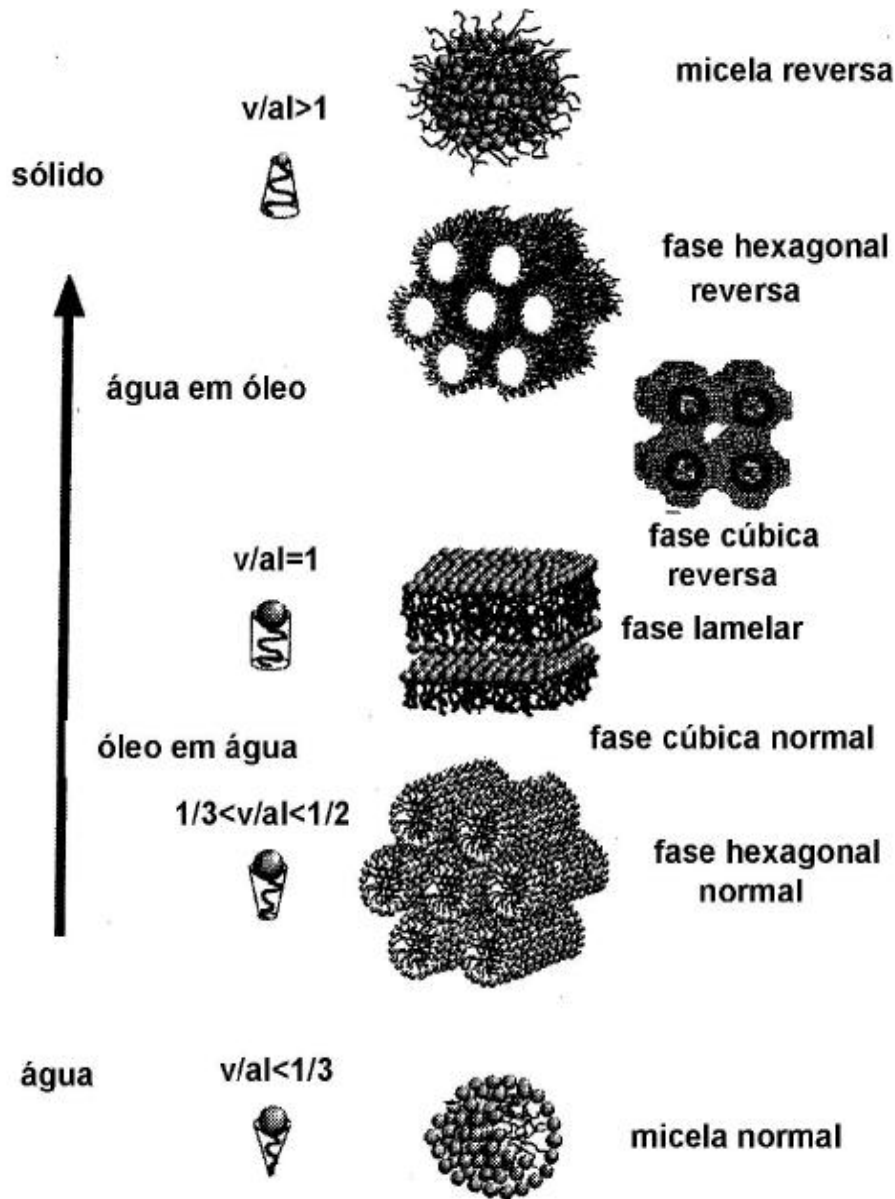
As microemulsões (MEs) ou nanoemulsões podem ser definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, apresentando gotículas da fase interna na ordem de aproximadamente 100 Angstroms (Å). Estes sistemas espontaneamente formados possuem propriedades físico-químicas específicas como transparência e estabilidade

Revisão Bibliográfica

termodinâmica, fatores que os tornam atrativos do ponto de vista da produção farmacêutica (SINTOV & SHAPIRO *et al.*, 2004).

A combinação de componentes imiscíveis como o óleo e a água, em presença do tensoativo com ou sem co-tensoativo, em concentrações variadas, podem formar gotículas de O/A (óleo disperso em água) ou A/O (água disperso em óleo) com distintas fases normais ou reversas (lamelar, hexagonal, cúbica ou micelar) dependendo da concentração dos componentes na formulação (Figura 10). Estas estruturas podem ser classificadas como anisotrópicas ou isotrópicas de acordo com a capacidade para desviar a luz polarizada. As MEs anisotrópicas são capazes de deslocar o plano de luz e mostram estruturas de fases lamelares (camadas sobrepostas de surfactante e solvente) ou hexagonal (cilindros longos que formam a junção de estruturas tridimensionais). Como o isotrópico são desprovidos de capacidade para desviar o plano de luz, são conhecidos por apresentar uma fase cúbica em que as estruturas são apenas determinadas por técnicas de dispersão de raios X em ângulo baixo (SAXs).

Figura 10. Sequência teórica dos diferentes tipos de fases formadas (CARVALHO *et al.*, 2009).



As substâncias ativas podem ser veiculadas nas microemulsões quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa de acordo com as propriedades físico-químicas do fármaco e do conjunto de componentes da formulação das microemulsões, ou seja, é possível ter a incorporação de um fármaco com características lipofílicas no interior das gotículas, na interfase entre a divisão entre a água e o óleo ou na fase aquosa em um sistema O/A de acordo

com as propriedades da constante dielétrica (OLIVEIRA & SCARPA, 2001; FORMARIZ *et al.*, 2005).

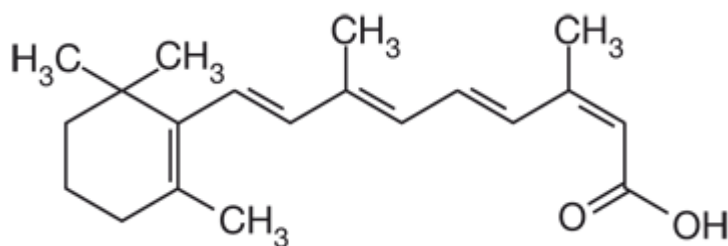
2.6 Características dos componentes das MEs

Dentre os adjuvantes empregados nas formulações de microemulsões destacam-se o óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado e a fosfatidilcolina de soja, normalmente empregados como tensoativos (VANDAMME, 2002; CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003), o oleato de sódio como co-tensoativo (LACHMAN *et al.*, 2001), colesterol como fase oleosa e tampão-fosfato como fase aquosa.

2.6.1 Óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado

O óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado (Figura 11) é um tensoativo não iônico de baixa viscosidade que não influencia significativamente nas propriedades reológicas do produto obtido (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

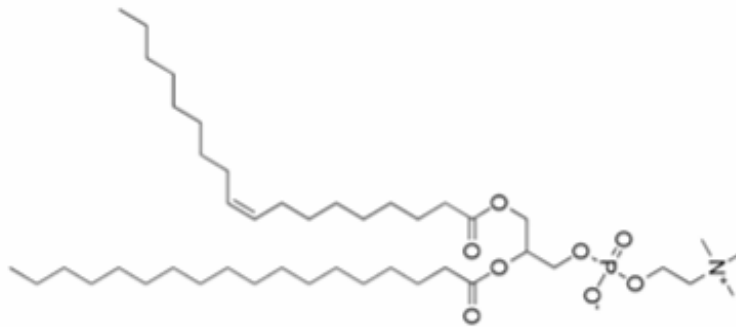
Figura 11. Estrutura química do óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado (<http://www.pharmaceuticals.basf.com/Products.aspx?PRD=30>).



2.6.2 Fosfatidilcolina de soja

Os tensoativos de natureza anfótera, como a fosfatidilcolina de soja (Figura 12), apresentam baixa toxicidade e são substâncias utilizadas usualmente na produção de MEs (VANDAMME *et al.*, 2002).

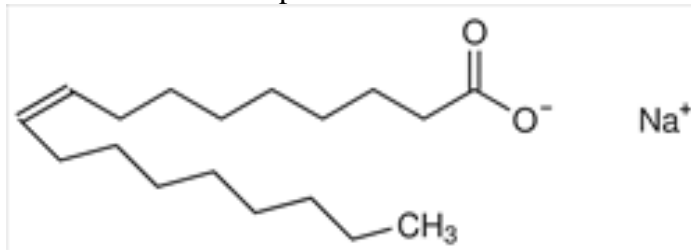
Figura 12. Estrutura química da Fosfatidilcolina de Soja (<http://engenhariadealimentosufc.blogspot.com.br/2009/11/o-que-e-lecitina.html>).



2.6.3 Oleato de sódio

O oleato de sódio (Figura 13) é um tensoativo do tipo aniônico que pode ser utilizado como agente solubilizante e co-tensoativo (LACHMAN *et al.*, 2001).

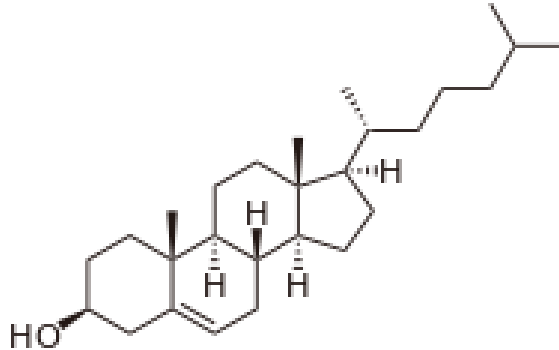
Figura 13. Estrutura química do Oleato de Sódio (<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/images/c143-19-1.png>)



2.6.4 Colesterol

No desenvolvimento das MEs será utilizado colesterol (Figura 14.) como fase oleosa. Por se tratar de um esterol, acredita-se que o colesterol possa ter afinidade com o ergosterol, um importante componente de membrana (DOGRA & SAXENA *et al.*, 1996). Isto, por sua vez, possibilitaria maior ação do FLU a partir do sistema microemulsionado, uma vez que este fármaco pode formar poros artificiais ao longo da membrana celular do parasita e hospedeiro, alterando a permeabilidade seletiva a cátions e levando-o à morte celular, ou seja, à lise coloidal osmótica devido ao fluxo iônico exacerbado (COHEN *et al.*, 1998).

Figura 14. Estrutura química do colesterol (<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9a/Cholesterol.svg/200px-Cholesterol.svg.png>).



2.6.5 Tampão-Fosfato

Já como fase aquosa, o tampão-fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4, em virtude de haver relatos na literatura de que a adição de tampões e/ou agentes isotonzantes na fase aquosa permitem a manutenção de um pH favorável, garantindo a estabilidade do fármaco (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e caracterizar microemulsões contendo fluconazol para o tratamento da leishmaniose tegumentar.

3.2 Específicos

- Desenvolver e caracterizar microemulsões;
- Realizar a caracterização estrutural e físico-química das formulações desenvolvidas;
- Avaliar a estabilidade físico-química dos sistemas escolhidos para o estudo;
- Realizar ensaios biológicos in vitro para verificar da ação das formulações contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Água ultra-pura Milli Q;
- Colesterol (Sigma-Aldrich, USA);
- Fluconazol (DEG, Brasil);
- Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200, Lucas Mayer, Alemanha);
- Fosfatos monossódico e dissódico (Merck, Darmstadt, F.R. Germany);
- Gel de Carbopol[®] 974P
- Meio LIT (*liver infusion triptose*);
- Oleato de sódio;
- Óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado (Eumulgin HRE[®] 40, Pharma Special, Brasil);
- PMS (metassulfato de fenazina);
- Solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio);
- Solução de SDS (dodecil sulfato de sódio).

4.2 Equipamentos

- Agitador Mecânico, Marconi;
- Balança METTLER, modelo H10;
- Balança semi-analítica, Micronal B160;
- Centrifugas (Sorvai TC 6 centrífuga, Du Pont, Newtown, EUA),
- Haste Sonics[®], Vibra-Cell;
- *Light Scattering* – Brookhaven;
- Microscópio de luz polarizada Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena;

- Peagômetro digital GEHAKA[®] PG 1000;
- Pipeta de Pasteur;
- Reômetro de tensão controlada Carri Med CSL 100, modelo CLS 100;
- Texturômetro Stable Micro Systems TA-XT2i;
- Ultracentrífuga HITACHI, Himac CP 80.
- Falcon, BD[®], Franklin Lakes, EUA.

4.3 Métodos

4.3.1 Desenvolvimentos dos sistemas

O diagrama de fases ternário foi construído através da incorporação adequadas de fosfatidilcolina de soja, óleo de rícino polioxil-40 hidrogenado e oleato de sódio, que funcionaram como sistema tensoativo (T), na proporção de 3:8:6. Para cada proporção de tensoativo foi adicionado o colesterol (fase oleosa) e em seguida foi realizada a titulação com tampão-fosfato 50 mmol.L-1 pH 7,4 (fase aquosa). A mistura dos componentes foi realizada em um frasco transparente onde foram transferidas quantidades específicas de óleo, água e tensoativo de acordo com as concentrações determinadas nos eixos do diagrama ternário. A amostra foi sonicada usando Sonicador de haste (Sonics[®], Vibra-Cell), com potência de 220 watts, operando de modo descontínuo, por 20 minutos com intervalos de 30 segundos a cada um minuto, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação. Posteriormente, foram selecionadas três formulações classificadas como F1, F2 e F3, sendo uma delas com características de sistema líquido transparente (F1) e duas de sistema viscoso transparente (F2 e F3) em que foi mantida a proporção de colesterol e foi adicionado 1% de FLU nas MEs de acordo com a relação m/m (massa/massa). Como as formulações tem o propósito de uso

tópico foram selecionadas formulações SVT que possuem viscosidade e que não escorrem durante a aplicação, e uma formulação SLT para comparação dos dados.

4.3.2 Caracterização físico-química e estrutural dos sistemas

A partir do diagrama de fases ternário foram escolhidos três pontos com concentrações diferentes dos componentes (F1, F2 e F3), onde foi fixada a porcentagem de colesterol e foram analisadas as características estruturais das formulações com a variação da concentração de água e do tensoativo.

4.3.2.1 Microscopia de luz polarizada

Uma pequena quantidade das formulações foi colocada sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e analisadas com auxílio de microscópio de luz polarizada Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena, onde foi avaliada a homogeneidade das dispersões e, com auxílio de polarização, observada a presença de área de anisotropia.

4.3.2.2 Análise das Propriedades de Textura (TPA)

Este teste foi realizado usando um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey Inglaterra). Foram colocadas 10 g das amostras em tubos Falcon de 50 mL para centrifugação com o objetivo de eliminar as bolhas de ar que possam estar aprisionadas na formulação. As amostras foram colocadas abaixo da sonda a cerca de 10 mm. Com o início da análise, a sonda desceu em direção a amostra a uma velocidade constante (1 mm/s), até atingir a formulação. Ao detectar uma força de desencadeamento de 2 mN na formulação, a sonda mergulhou 10 mm na amostra. Em seguida, a sonda voltou à superfície a uma velocidade de 0,5 mm/s e, depois de 5s, uma segunda compressão foi iniciada. Os resultados obtidos dos ensaios, gerou uma curva de força-tempo a partir da qual foi possível calcular

alguns parâmetros mecânicos como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. Os ensaios foram realizados em triplicata a uma temperatura de 32 ° C.

4.3.2.3 Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico)

A determinação do diâmetro médio das gotículas foi realizada pela técnica desenvolvida por (SILVA *et al.*, 2009) de correlação de fótons, usando equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser (*Light Scattering* – Brookhaven).

O aparelho para a medição do tamanho das gotículas é particularmente sensível para determinar pequenas mudanças no diâmetro médio. Quando um feixe de luz passa através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas espalham a luz em todas as direções. É possível, então, observar flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento através de um detector que processa os dados e envia a um computador. A partir dessa técnica, calcula-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Einstein-Stokes (equação 1):

$$D = \frac{K T_{ab}}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Equação 1}$$

sendo que: D = coeficiente de difusão das partículas; K = constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$); T_{ab} = temperatura absoluta (293, 15 K); $\pi = 3,141592$; η = viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2s}$); R_h = raio hidrodinâmico.

A ME foi analisada em um analisador de gotículas. As amostras foram diluídas e colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 20 °C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração foi de acordo com o índice observado para cada

Materiais e Métodos

amostra analisada. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro e índice de polidispersidade (IPD) das gotículas de cada amostra (n=3), com a duração total de 5 min.

4.3.2.4 Análise do Potencial Zeta

A medida do potencial zeta (ζ mV) foi determinada usando equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser (*Light Scattering* – Brookhaven), onde as gotículas da formulação foram submetidas a uma voltagem fixa e utilizando os valores fornecidos pelo aparelho para calcular o ζ mV. Para cada amostra (n=3) foram realizadas 10 medidas de mobilidade eletroforética (POULIOT *et al.*, 1999).

4.3.2.5 Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) foi utilizada para determinar o grau de cristalinidade ou o estado amorfo das misturas físicas (F1, F1D, F2, F2D, F3 e F3D), da mistura dos componentes sem a sonicação das formulações; amostras (F1, F1D, F2, F2D, F3 e F3D) sonicadas e dos componentes da microemulsão (oleato de sódio, fosfatidilcolina de soja, óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado e colesterol) e do fármaco através do difratômetro de raios X Siemens D5000, com radiação de cobre monocromatizada por cristal de grafite. A velocidade de varredura foi de 0,1 segundos a cada $0,05^\circ$ com $2\theta^\circ$ variando de 4° a 70° .

4.3.2.6 Avaliação da bioadesão

A bioadesão foi avaliada pela medida da força máxima necessária para o descolamento das formulações do contato com uma pele animal, utilizando analisador de textura TAXTplus. A pele animal usada foi a de orelha de porco, devidamente dermatomizada a 500 mm. Neste teste, a pele foi fixada na parte inferior da sonda utilizada no ensaio, a qual desceu a uma velocidade de 1 mm/s até encontrar a amostra, detectada por uma força de gatilho de 2 mN,

Materiais e Métodos

onde permaneceu em contato com a pele por 60 segundos. A sonda foi lentamente removida a uma velocidade constante de 0,5 mm/s e a força bioadesiva foi determinada através do gráfico de força máxima versus tempo. Os resultados obtidos foram comparados com aos valores de força bioadesiva obtidos em gel de Carbopol® 974P 0,5%, gel reconhecidamente bioadesivo. O gel de carbopol a 0,5% foi preparado por diluição de uma concentração de gel de carbopol a 5% . Esse gel foi preparado através de uma dispersão (5g do polímero em 95 mL de água). A mistura foi homogeneizada em agitador mecânico, a 3 rpm, de 10 a 15 minutos, até a dispersão total do polímero. Posteriormente o gel sofreu ajuste do pH para 7 com a trietanolamina com o auxílio do peagômetro. Os ensaios foram realizados em triplicata (KOFII *et al.*, 2006).

4.4 Ensaios de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos

4.4.1 Avaliação visual

As amostras foram observadas visualmente quanto às alterações do tipo: cor, separação de fases, homogeneidade, no período de um mês, em temperatura ambiente.

4.4.2 Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo

A medida de pH foi realizada em peagômetro, utilizando-se amostras de microemulsões e para o fármaco, fluconazol, diluídas em água destilada (5%).

4.5 Ensaios biológicos *in vitro*

*4.5.1 Ação leishmanicida *in vitro**

Neste estudo foram utilizados formas promastigotas de *L. amazonensis* (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79) mantidas no Laboratório de Parasitologia da FCFAr-

Materiais e Métodos

UNESP, que foram cultivadas em meio LIT até a fase exponencial de crescimento (aproximadamente 4 dias) para realização dos ensaios de atividade leishmanicida. O cultivo de *L. amazonensis* foi feito em meio LIT composto por 68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na₂HPO₄; 111 mM Dextrose; 0,3% Liver Infusion Broth; 0,5% Tryptose; 25 mg/L Haemin. Os meios foram incubados a uma temperatura de 68 °C por 1 hora e o pH foi corrigido para 7,2. Posteriormente, foram esterilizados os meios por filtração em membrana Millipore® de 0,22 µm e para finalizar o preparo, foi adicionado 10% de Soro Fetal Bovino estéril.

A avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida das formulações desenvolvidas (FLU, F1, F2, F3, F1D, F2D, F3D) contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* foi através do ensaio colorimétrico utilizando a solução de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] e PMS (phenazine methosulfate) nas proporções de 2,5 mg/mL de MTT para 0.22 mg/mL de PMS.

Foram realizados ensaios em placas de 96 orifícios Nunc®, contendo 97 µL de uma suspensão de parasitos (8x10⁶ parasitos/mL) e 3µL das formulações em diferentes concentrações (100 a 1,6 µg/mL, em diluições seriadas), por 72 horas a 26°C, em triplicata. Ao final da incubação, foi adicionado 10 µL de solução MTT/PMS em todos os orifícios, e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 75 minutos a 28 °C. Foi adicionado então 100 µL da solução SDS 10%, HCl 0,01 N, incubando-se à temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (leitor de Elisa - BioRad) a 492nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de parasitos mortos em porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada segundo a equação 2 (MUELAS-SERRANO et. al. 2000).

$$\%C = ((Gc-Gp)/(Gc)).100$$

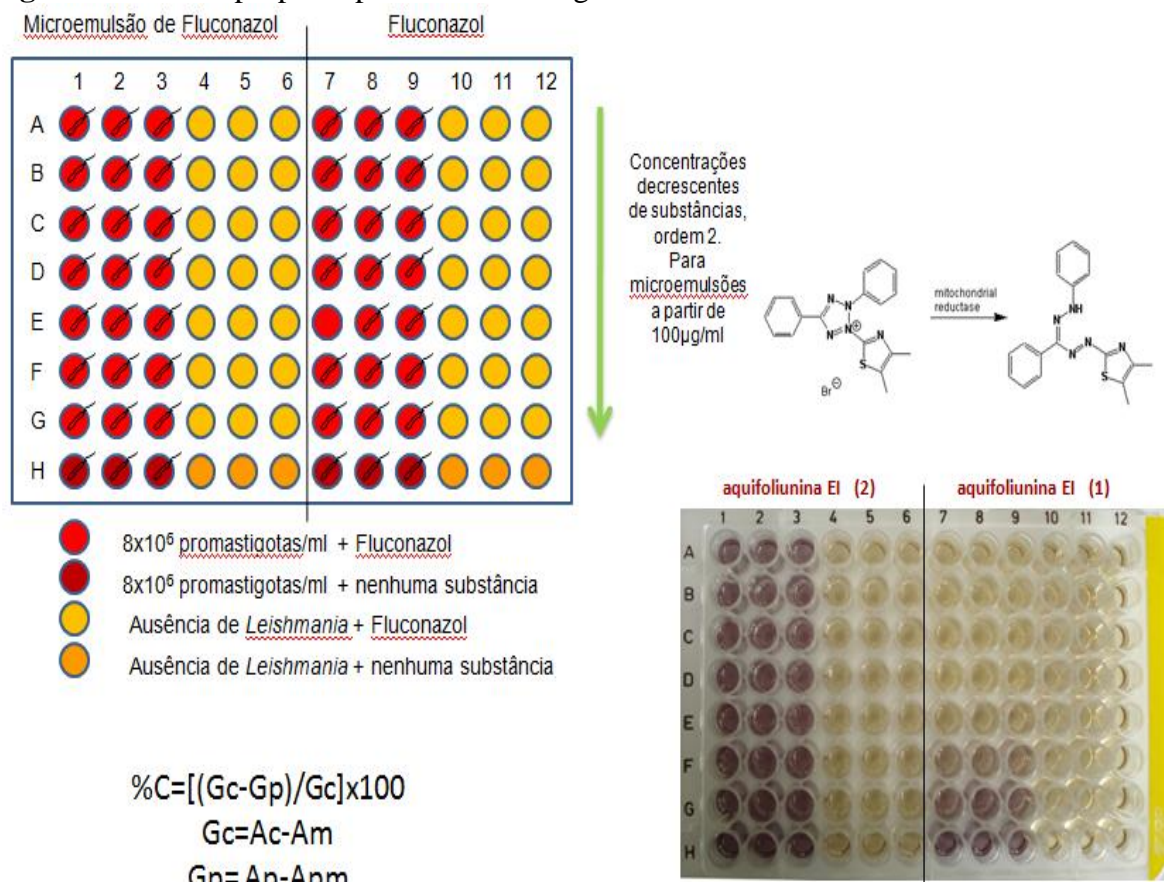
Equação 2

Materiais e Métodos

onde $G_c = (Ac-Am)$ e $G_p = (Ap-Apm)$; G_c representa o número de parasitos/mL nos poços controles; G_p representa o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações de substâncias; Ac corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitos; Am representa o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasito; Ap o valor da absorbância nos testes e Apm , o valor da absorbância das diferentes concentrações de substâncias na ausência do parasito. Os resultados foram plotados em gráficos e o IC_{50} de cada substância foi determinado por regressão linear.

A Figura 15 representa apresenta uma representação de como foi realizado o ensaio biológico *in vitro*:

Figura 15. Ensaio proposto para ensaio biológico *in vitro*.



4.6 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados com base na média e desvio padrão, sendo comparadas por análise de variância (ANOVA). Na versão de comparação unidirecional utilizou-se o teste Tukey, de forma a avaliar as diferenças significativas entre as amostras, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Utilizou-se o programa Origin[®] 7.0 SRO para o tratamento dos dados.

5. RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimentos dos sistemas

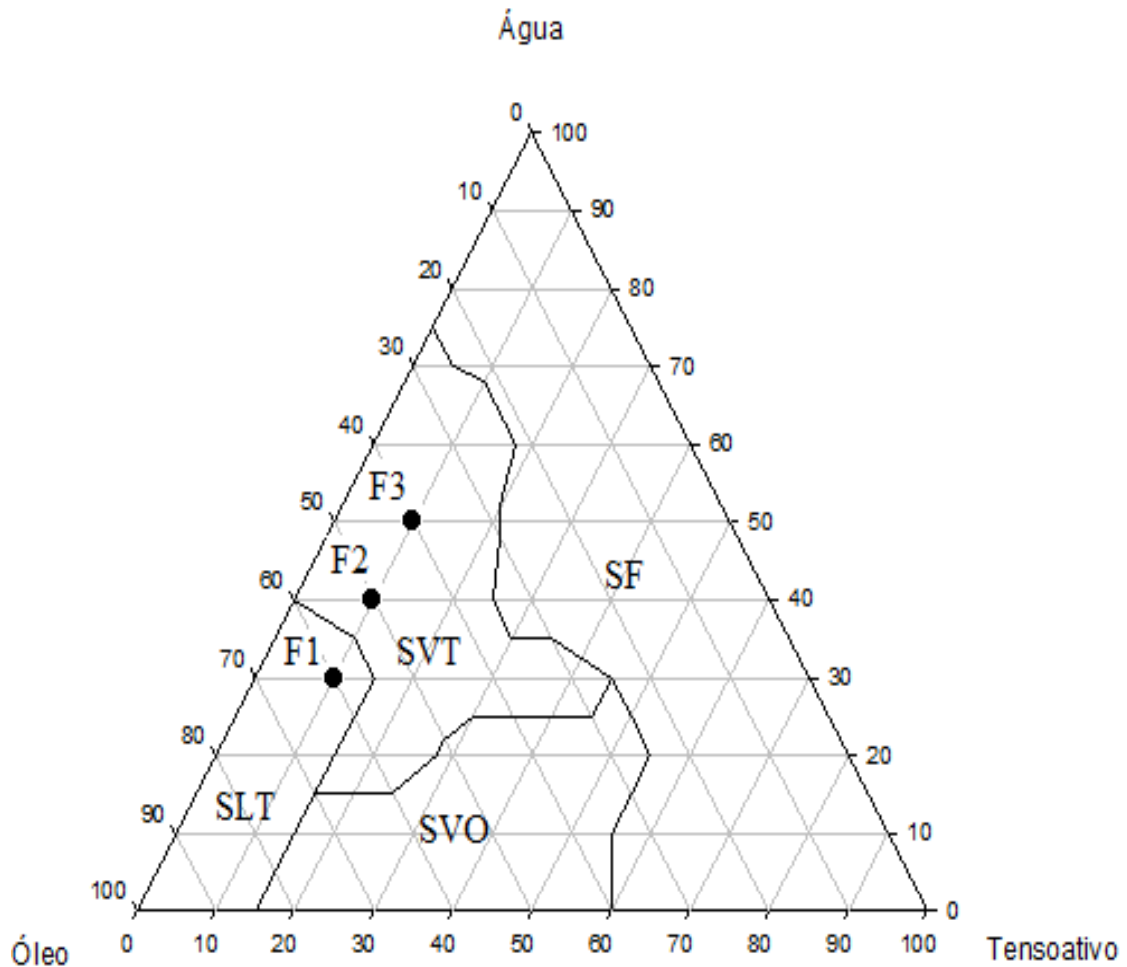
Os sistemas foram desenvolvidos utilizando os componentes: óleo, água e a mistura de tensoativo em diferentes concentrações. Foram obtidos pontos com diferentes características estruturais de acordo com a variação do óleo e água.

O diagrama de fases (Figura 16) mostra as características de pontos com SLT, SVT, SF e SVO. Observaram-se regiões chamadas SLT (Sistemas Líquido-Transparentes), onde há baixa concentração de óleo (10%) e surfactante (10-30%), SVT (Sistemas Viscosos Transparentes) com a concentração de surfactante entre 20 a 65% e a fase de óleo com 10-40%, SVO (Sistemas Viscosos e Opacos) encontrados na região inferior e central do diagrama com baixa concentração de óleo de (20-50%), tensoativo (10-20%), e SF (Separação de Fases) em concentrações baixas de água (10-30%) e independente da concentração do tensoativo nas formulações.

Os pontos escolhidos para o estudo foram as formulações F1, F2 e F3 descritas na Tabela 2, com suas concentrações de cada componente do sistema, e indicadas no diagrama de fase.

Tabela 1. Concentrações dos pontos F1, F2 e F3 das formulações escolhidas.

	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Colesterol	10	10	10
Tensoativo	30	40	50
Água	60	50	40

Figura 16. Diagrama de Fases segundo regiões observadas no sistema.

5.2 Caracterização físico-química e estrutural dos sistemas

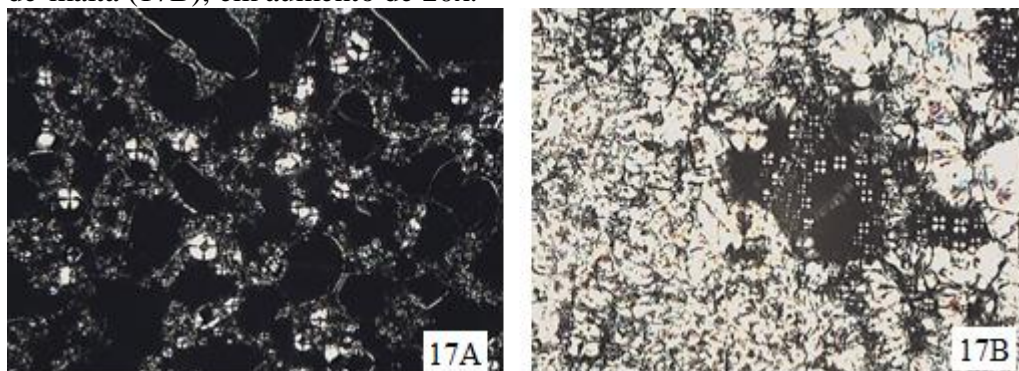
5.2.1 Microscopia de luz polarizada

Os pontos do diagrama de fases foram analisados por microscopia de luz polarizada, onde se observou que as regiões de SLT e SVT exibiram anisotropia, uma vez que foi capaz de desviar o plano de luz. As formulações representadas no diagrama de fases da Figura 16 por SLT e SVT tiveram estruturas de fases lamelares e hexagonal, respectivamente, que são representados pela presença de cruz-de-malta e estrias. Em algumas regiões, após a modificação das proporções dos componentes, foi possível observar a existência de duas fases em combinação (Figura 17A). O SVO obteve comportamento isotrópico, indicando uma

Resultados & Discussão

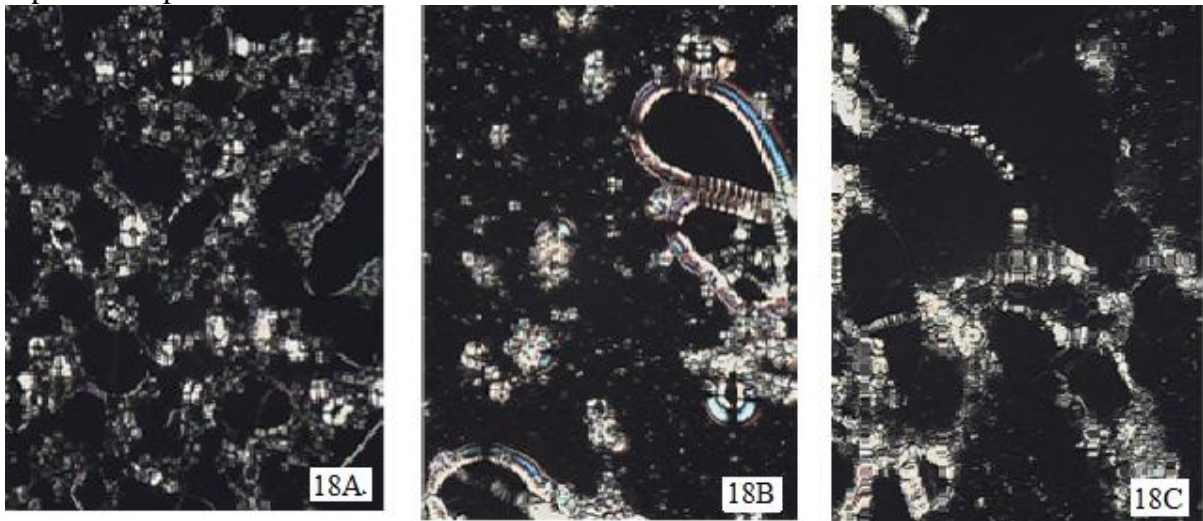
região de campo escuro, com a possibilidade de apresentar fase cúbica, por isso, para elucidação da presente estrutura necessária outras técnicas mais avançadas, como SAXs. Na formulação SF não houve agregação dos componentes do sistema para formar uma mistura uniforme e homogênea. A Figura 17B representa as estruturas de fase lamelar, conhecido como cruz-de-malta que pode ser observada em algumas das formulações desenvolvidas (SVT e SLT). A análise por microscopia de luz polarizada foi efetuada não só depois de 24 horas, o que indica que as formulações mostraram estabilidade termodinâmica de modo que estas formulações são as mais interessantes para uma aplicação na indústria farmacêutica.

Figura 17. Fotomicrografia evidenciando a presença de Cruz-de malta e estrias (17A) e Cruz-de-malta (17B), em aumento de 20x.



Os pontos F1, F2 e F3 foram analisados em microscopia de luz polarizada e através das fotomicrografias (Figura 18) foi possível classificá-las de acordo com as suas estruturas.

Figura 18. Fotomicrografias das amostras F1(18A), F2 (18B) e F3(18C) obtidas por microscopia de luz polarizada em aumento de 20x.



F1 “Estrias” e
“cruz-de-malta”
Sistema anisotrópico

F2 “Estrias” e
“cruz-de-malta”
Sistema anisotrópico

F3 “Estrias” e
“cruz-de-malta”
Sistema anisotrópico

5.2.3 Análise das Propriedades de Textura (TPA)

Os resultados foram analisados de acordo com os parâmetros de dureza, adesividade, coesão e compressibilidade para amostras F1, F1D (incorporada com fluconazol), F2, F2D, F3 e F3D e gel de Carbopol[®] 974P 0,5% (C974P). A dureza (Figura 19) e a adesão (Figura 20) foram diminuídos pela adição de fármaco somente para F2, segundo tratamento estatístico.

Figura 19. Dureza das Amostras.

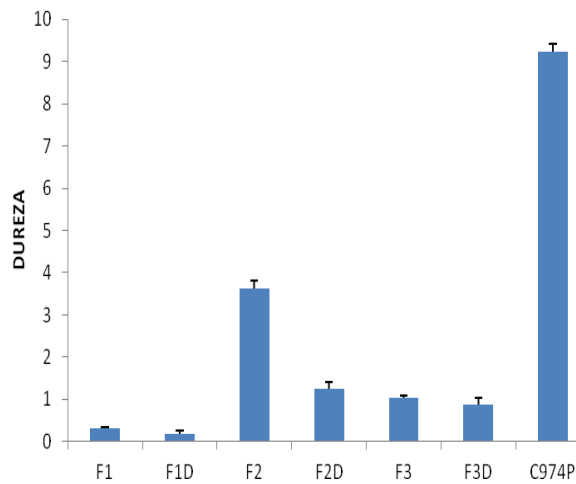
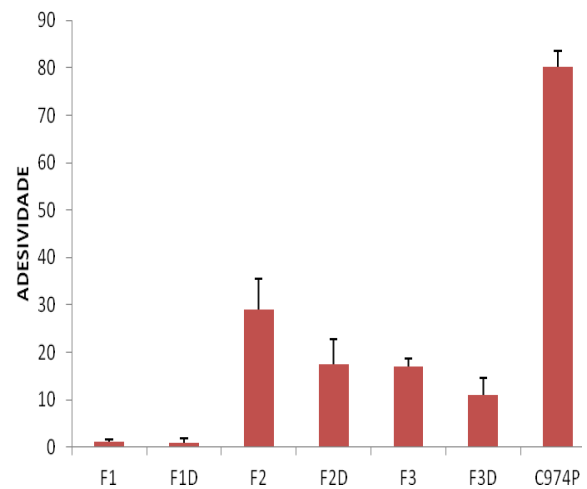
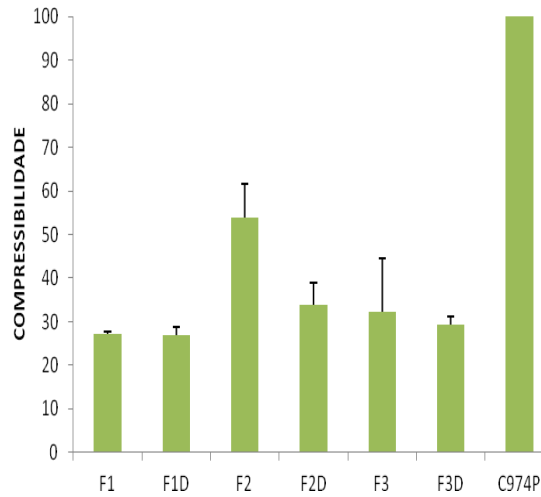
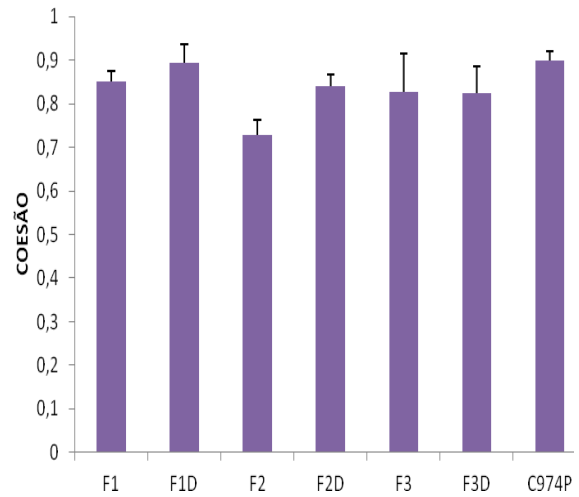


Figura 20. Adesividade das Amostras.



Quanto à compressibilidade (Figura 21), observou-se que a adição do FLU reduziu a compressibilidade de F2, enquanto que para os sistemas F1 e F3 os valores não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), sendo que para a amostra F2 o valor reduziu em 63% ao valor sem o fármaco. Os ensaios de dureza, adesividade e compressibilidade para as formulações analisadas comparadas com a amostra de carbopol (amostra controle) apresentaram valores estatisticamente menores que o do controle. Quanto à coesão (Figura 22), para todas as amostras os valores obtidos foram semelhantes estatisticamente quando comparados com a amostra que continha o fármaco. Os resultados das formulações quanto a coesão do sistema foram semelhantes estatisticamente ao gel de Carbopol[®] 974P, com a exceção dos obtidos para a amostra F2, que mostrou resultado diferente estatisticamente das demais amostras quando comparadas com a amostra controle ($p < 0,05$).

Figura 21. Compressibilidade das Amostras.**Figura 22.** Coesão das Amostras.

Os valores representados nos gráficos podem ser visualizados na Tabela 2, pela a média dos valores em triplicata e o desvio-padrão de cada amostra realizada nos ensaios.

Tabela 2. Com os valores de média e desvio-padrão de Compressibilidade, Dureza, Adesividade e Coesão das formulações.

Formulação	Compressibilidade		Dureza		Adesividade		Coesão	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
F1	27,139	0,502	0,327	0,019	1,085	0,596	0,851	0,023
F1D	26,935	1,942	0,189	0,065	0,854	1,088	0,893	0,041
F2	53,784	7,923	3,62	0,198	29,126	6,445	0,728	0,034
F2D	33,904	5,133	1,249	0,164	17,593	5,071	0,84	0,026
F3	32,139	12,285	1,038	0,062	17,064	1,637	0,8256	0,088
F3D	29,405	1,876	0,872	0,169	10,894	3,782	0,824	0,062
C974P	126,06	4,309	9,233	0,192	80,127	3,389	0,9	0,02

5.2.4 Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico)

De acordo com a Tabela 3, o tamanho das partículas variou entre $180,5 \pm 0,721$ a $928,833 \pm 34,186$ nm de acordo com a amostra. A incorporação do FLU não causou variação

Resultados & Discussão

no tamanho das partículas, com exceção da amostra F2. Tal fato pode ser justificado pela coalescência das gotículas em função do tempo, uma vez que a formulação preparada mais recentemente estava mais na superfície do frasco de armazenamento e foi retirada e acrescida de fármaco, ficando a formulação mais antiga no fundo do recipiente de armazenamento da amostra, o que pode ter gerado o aumento do tamanho das gotículas. Apenas para as formulações F1 e F1D os valores obtidos estão na faixa de 10 a 300 nm, faixa ideal para MEs. O índice de polidispersidade (IPD) é o índice que mostra a homogeneidade relativa entre os tamanhos das partículas distribuídos na amostra medida. Os valores de IPD variaram entre $0,174 \pm 0,013$ e $0,703 \pm 0,079$ apresentando uma ampla faixa de variação entre as formulações. As formulações F1 e F3 não sofreram variações no IPD quando incorporado o fármaco ($p > 0,05$), o que não ocorre com a amostra F2, uma vez que apresentou uma variação entre o tamanho das gotículas quando comparadas as amostras sem e com o fármaco.

Tabela 3. Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos da partícula e Índice de Polidispersão para as formulações.

Formulação	Tamanho das Partículas (nm)	Índice de Polidispersão
F1	180,500 ± 0,721	0,174 ± 0,013
F1D	181,200 ± 1,609	0,228 ± 0,012
F2	928,833 ± 34,186	0,615 ± 0,123
F2D	618,933 ± 28,612	0,703 ± 0,079
F3	357,633 ± 18,240	0,686 ± 0,132
F3D	317,800 ± 9,364	0,568 ± 0,083

5.2.5 Análise do Potencial Zeta

Os resultados das amostras para o potencial zeta (Tabela 4) variaram entre os valores de $-38,600 \pm 1,758$ mV a $-55,867 \pm 3,044$. Esta carga negativa advém dos componentes das formulações. A fosfatidilcolina de soja possui grupamentos ésteres livres $[-O-O=O-]^-$ que contribuem para a carga negativa do sistema, bem como o oleato de sódio que também possui o grupo éster associado ao átomo de sódio que se dissocia $[-O-O=O-]^-$ e o colesterol que em sua

Resultados & Discussão

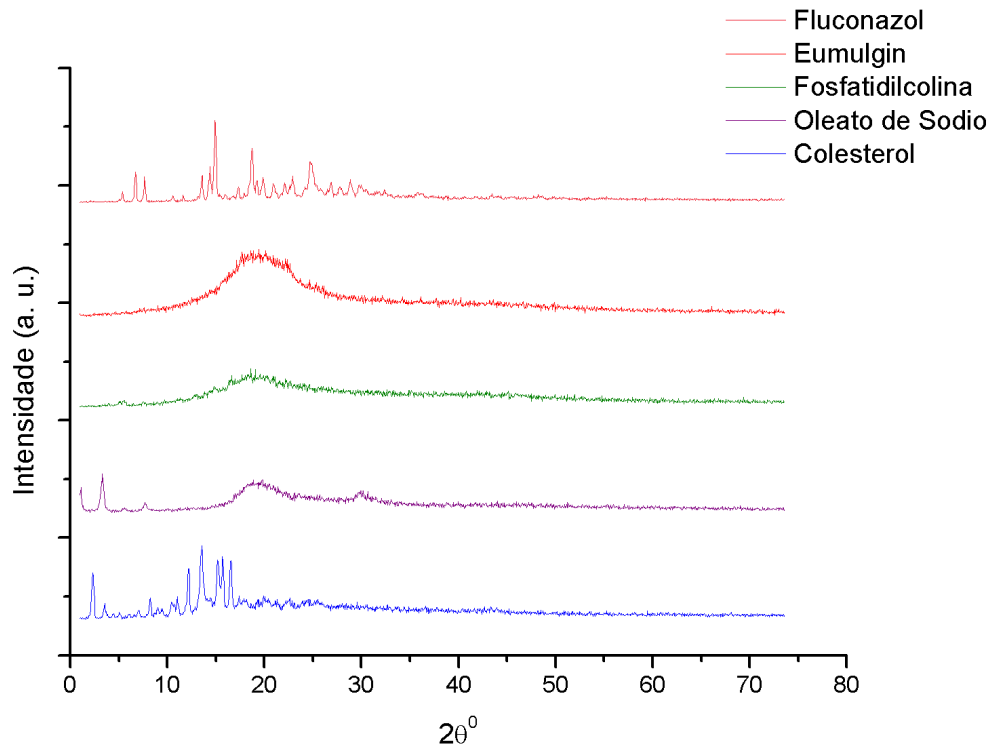
estrutura possui um grupamento hidroxila livre [OH⁻]. Para todas as amostras analisadas, a adição de fármaco não alterou os valores de potencial zeta.

Tabela 4. Tabela com a média e desvio-padrão do Potencial Zeta das formulações.

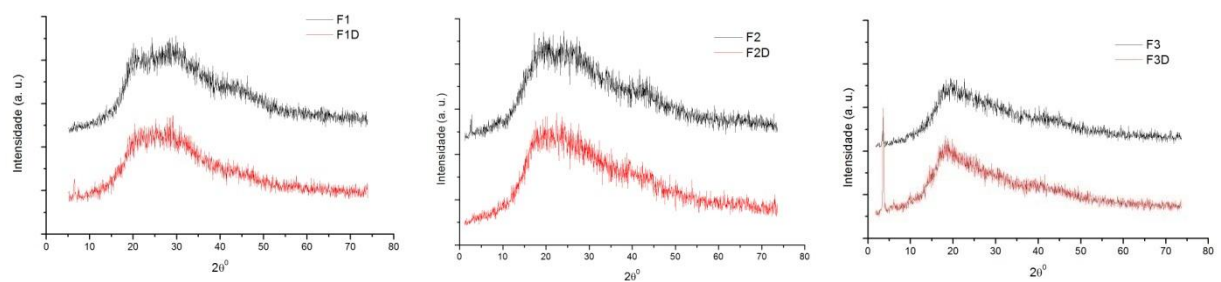
Formulação	Potencial Zeta (mV)
F1	-40,000 ± 1,758
F1D	-38,600 ± 1,967
F2	-43,000 ± 0,608
F2D	-45,167 ± 2,316
F3	-54,567 ± 2,608
F3D	-55,867 ± 3,044

5.2.6 Difração de Raio X (DRX)

Os resultados da análise de DRX para os componentes da ME, misturas físicas e MEs na ausência e presença do fármaco nas formulações foram plotados em gráficos. A presença de picos elevados demonstra que a substancia analisada possui caráter de cristalinidade, como na Figura 23, para o oleato de sódio, fluconazol e colesterol. Já para o Eumulgin e fosfatidilcolina de soja, assim como parte do oleato de sódio, apresentam picos elevados, porém com halos mais alargados de baixa intensidade caracterizados por um arranjo amorfo.

Figura 23. DRX dos componentes da microemulsão.

O apêndice A corresponde aos gráficos de cada um dos componentes da microemulsão

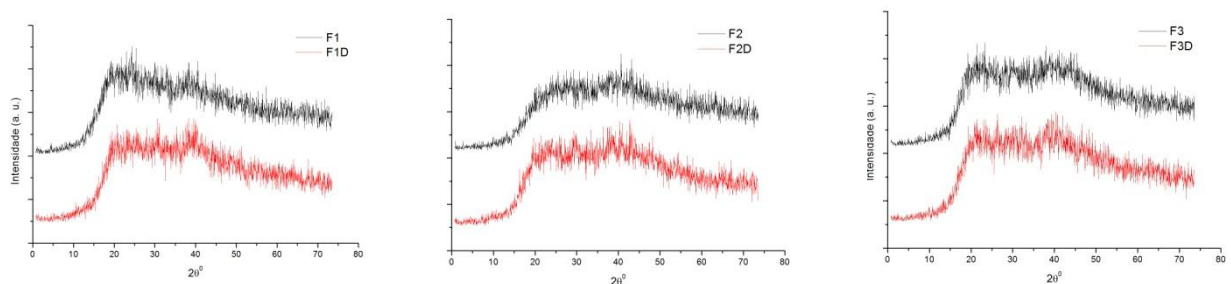
Figura 24. DRX das misturas físicas das amostras F1e F1D, F2 e F2D e F3 e F3D.

A ausência de picos elevados, Figura 24, demonstra que a mistura física da formulação analisada não apresenta o arranjo cristalino, mais sim a forma amorfa por apresentar halos alargados de baixa intensidade. Ambas as amostras, na ausência e na presença do fármaco, mostraram comportamento quase que semelhante disposto nas curvas das amostras. Porém para a formulação F3D é possível visualizar um pico de 200 de intensidade que corresponde a

Resultados & Discussão

estrutura cristalina do colesterol (pode ser visualizado no DRX do colesterol presente no Apêndice), isso por que talvez durante a preparação das placas para a análise, não houve a homogeneização da formulação e teve uma concentração de colesterol superior que foi possível detectar na análise. Para as amostras que sofreram o processo de sonicação (Figura 25), houve também um comportamento semelhante entre as formulações, indicando que o fármaco está incorporado ao sistema.

Figura 25. DRX das formulações para a F1e F1D, F2 e F2D e F3 e F3D.

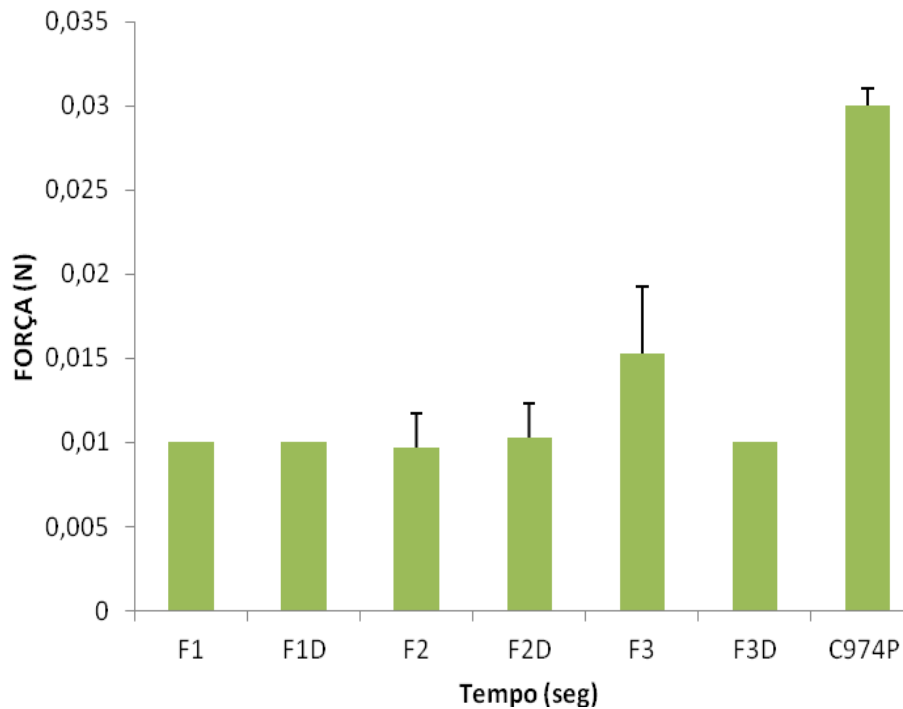


5.2.7 Avaliação da Bioadesão

A análise de força máxima versus tempo (Figura 26) mostra a força máxima que ocorre entre sonda e o tecido para que ocorra a separação da formulação, e se com a adição de um fármaco esta propriedade poderia ser mudada. Todas as amostras tinham menos força adesiva do que o gel de carbopol usado como uma amostra de controle, dados comprovados estatisticamente ($p < 0,05$). Para todas as amostras, a adição de fármaco não alterou a bioadesão.

Resultados & Discussão

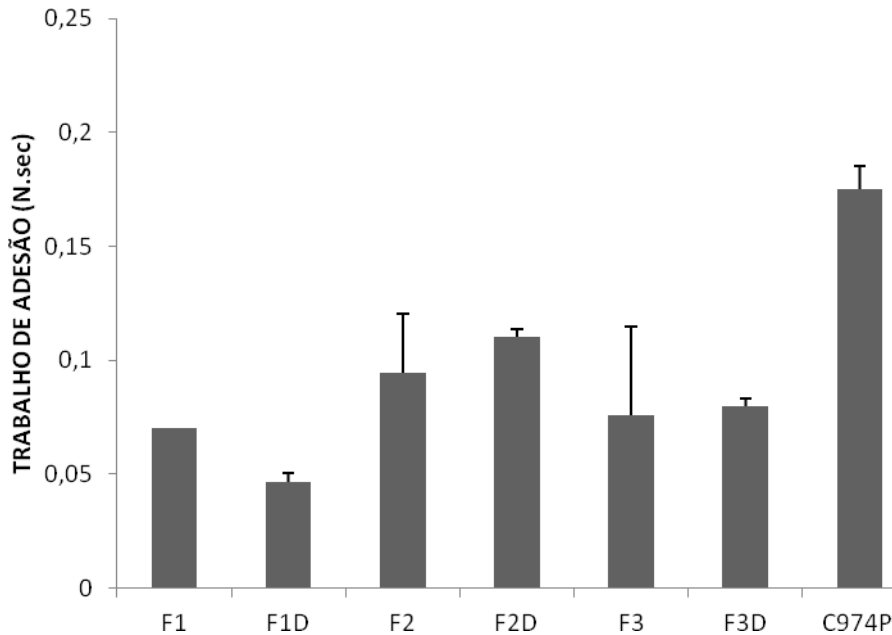
Figura 26. Força máxima *versus* tempo obtido a partir de formulações com e sem o fármaco, em comparação com o gel de Carbopol[®] 974P 0,5%.



A intensidade do trabalho de aderência foi obtida calculando a área sob o pico da força máxima, tal como uma função do tempo que é a soma das forças envolvidas na remoção da sonda do sistema, esta resistência é dada como a capacidade bioadesiva da formulação (Figura 27). As formulações F1, F2 e F3 permaneceram inalteradas, demonstrando o mesmo trabalho de aderência quando comparadas com a presença do fármaco na formulação. Os dados foram comprovados de acordo com as análises estatísticas, não apresentando resultado significativo de variação ($p > 0,05$).

Resultados & Discussão

Figura 27. Trabalho de aderência das formulações obtidas com e sem o fármaco, em comparação com gel de Carbopol[®] 0,5%.



Os valores podem ser melhores visualizados de acordo na Tabela 5 que apresenta os valores das médias e desvios-padrão dos gráficos da força máxima X tempo e do trabalho de adesão. Para todas as formulações os valores em comparação com o Carbopol[®] 974P (controle do ensaio) foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), com exceção da amostra F2D, que não apresentou um valor diferente estatisticamente quando comparado a amostra controle, indicando que é a formulação que mais se assemelha as característica do Carbopol[®] 974P para este parâmetro analisado.

Tabela 5. Valores de média e desvio-padrão de força x tempo e trabalho de adesão.

<i>Amostras</i>	<i>Força (N)</i>	<i>Trabalho de adesão (N.sec)</i>
F1	0,010±0,000	0,070±0,000
F1D	0,010±0,000	0,046±0,004
F2	0,009±0,002	0,095±0,026
F2D	0,010±0,002	0,110±0,004
F3	0,015±0,004	0,076±0,004
F3D	0,010±0,000	0,080±0,003
C974P	0,030±0,001	0,175±0,010

5.3 Ensaio de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos

5.3.1 Avaliação visual

A avaliação visual das MEs foram feitas periodicamente em um intervalo de 1 mês, visando a verificação de instabilidade nas formulações preparadas, incorporadas ou não de FLU, mostraram-se estáveis frente ao tempo, pois não foram constatados precipitações de fármacos, separações de fases e contaminações por fungos (nas amostras sem FLU) durante o período de observação.

5.3.2 Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo

O pH da pele varia entre 5 e 6 uma vez que o epitélio cutâneo é revestido por excreções ácidas de gordura e suor, liberados pelas glândulas sebáceas e sudoríparas, que contribuem para a proteção e barreira contra microrganismos. Quando a pele está desidratada ocorre um aumento deste pH para valores alcalinos. A determinação do pH das formulações foi realizada, em triplicata, diluindo-se as formulações a 5% em água MiliQ. As formulações analisadas todas apresentaram um elevado pH (Tabela 6) advindas das cadeias carbônicas presentes na fosfatidilcolina de soja e do grupamento amina $[-NH_4]^+$, da cadeia carbônica do oleato de sódio e da cadeia de carbonos da estrutura do colesterol que aumenta o pH de acordo com o tamanho de C presentes na estrutura. Porém quando acrescentou o fármaco na formulação houve um ligeiro abaixamento do pH advindo da característica do fluconazol, como foi demonstrado na medição do pH da solução a 5% do fármaco em água. Os dados das formulações F1 e F2 apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas com a amostra com o fármaco, mostrando valores de $p < 0,05$, indicando que o fármaco alterou o pH das formulações; enquanto que a formulação F3 não apresentou esta variação. Todas as formulações com e sem a incorporação do fármaco, apresentaram valores diferentes estatisticamente quando comparadas com a solução de fluconazol, indicando que os

Resultados & Discussão

componentes da formulação possuem características distintas do fármaco e que a adição deste nas formulações contribui para diminuir o pH das amostras.

Tabela 6. Determinação do pH das formulações.

Amostras	Média	Desvio-Padrão
Solução de Fluconazol	6,92	0,251
F1	10,01	0,075
F1D	9,52	0,036
F2	10,04	0,035
F2D	9,54	0,030
F3	10,10	0,049
F3D	9,89	0,030

5.4 Ensaios biológicos *in vitro*

5.4.1 Ação leishmanicida in vitro

Foram realizados os ensaios leishmanicidas com as formulações F1, F2 e F3 com e sem o fármaco para a leishmania do gênero *L. amazonensis* e foram realizados em triplicata. Para todas as amostras não foi possível obter o IC₅₀ da dose-resposta do fluconazol incorporado nas formulações contra os parasitas. Para todos nos ensaios realizados das amostras com e sem o fármaco não houve uma relação confiável entre elas, uma vez que não ocorreu uma regressão linear da morte dos parasitas de acordo com a diminuição da concentração da droga (Figura 28, 29 e 30), além de que em algumas concentrações a porcentagem de citotoxicidade entre a amostra com e sem o fármaco eram próximas ou até mesmo apresentavam-se com um valor negativo (Figura 29 e 30) indicando que houve um crescimento do número de parasitas durante a realização do ensaio.

Resultados & Discussão

Figura 28. IC₅₀ da formulação F1 com e sem o fármaco.

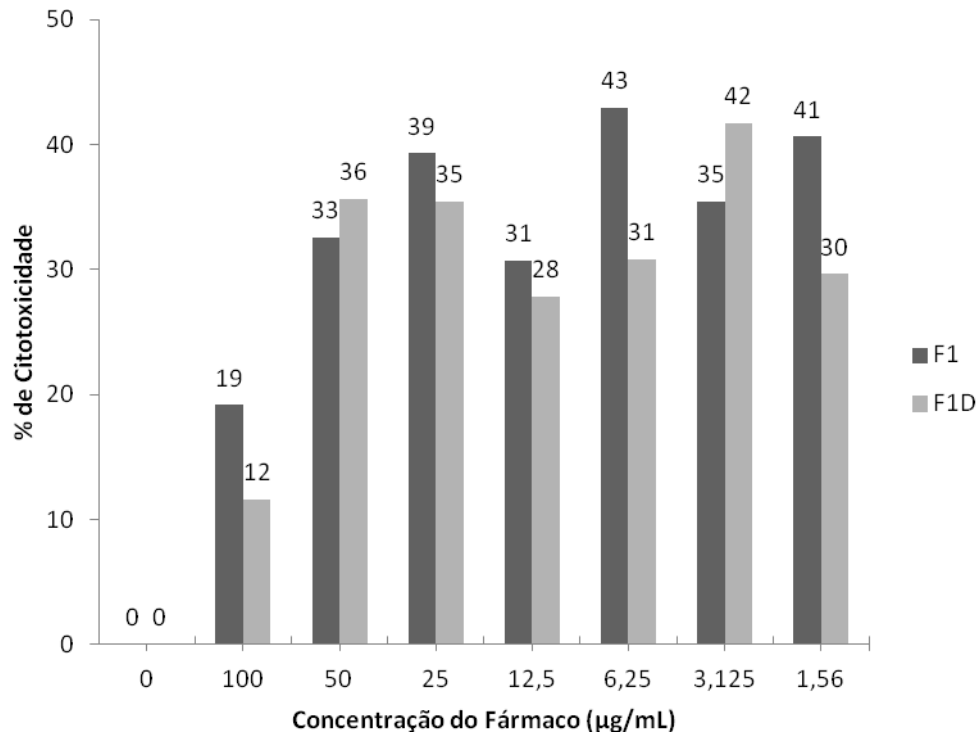
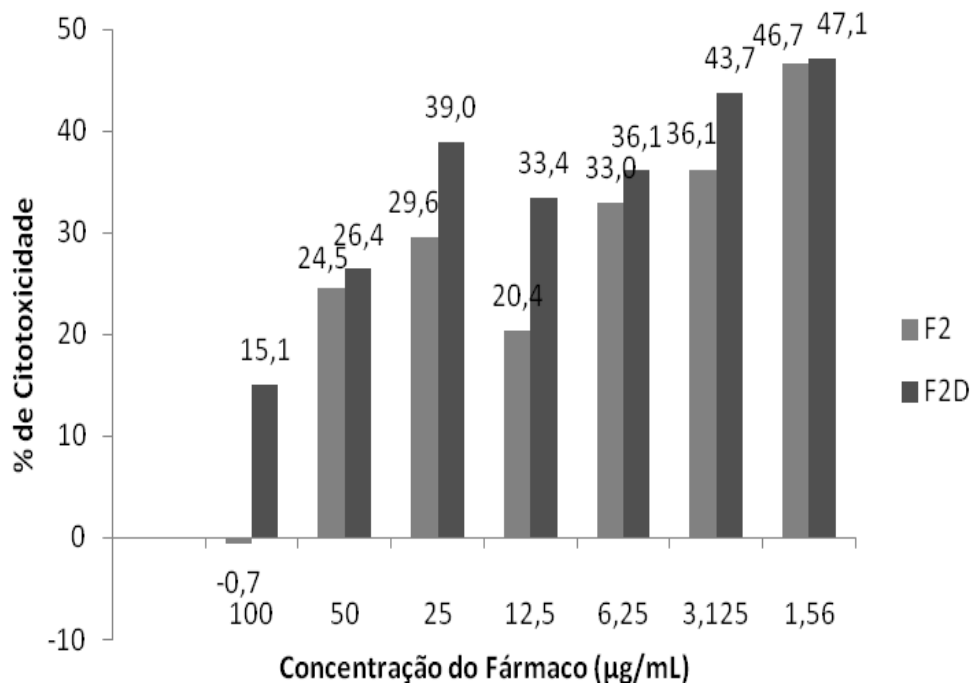
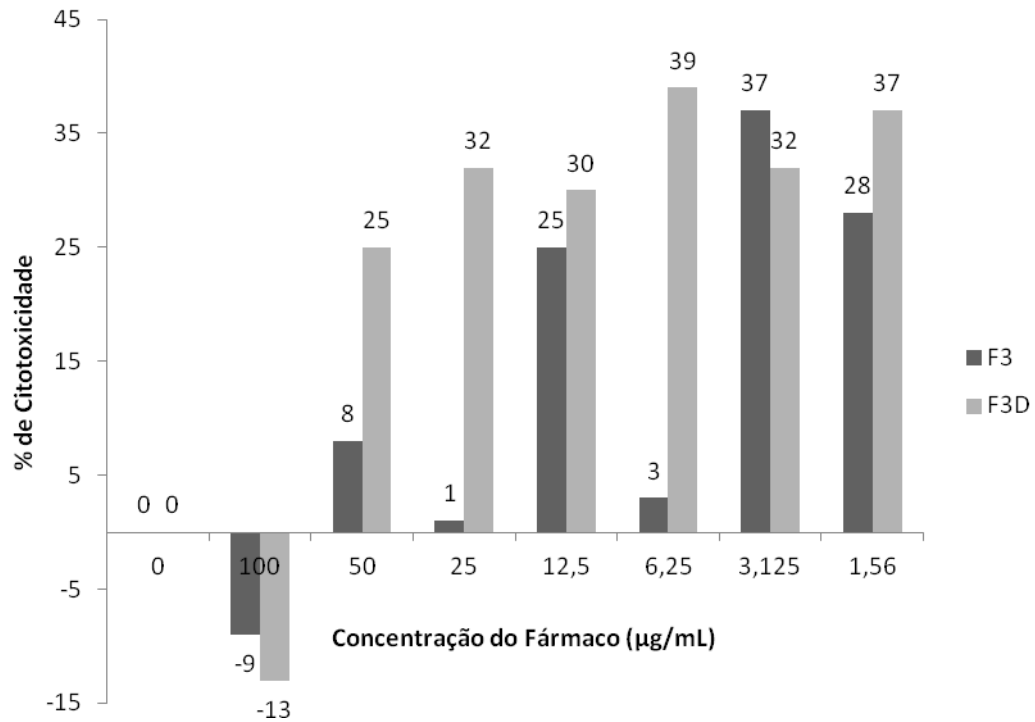
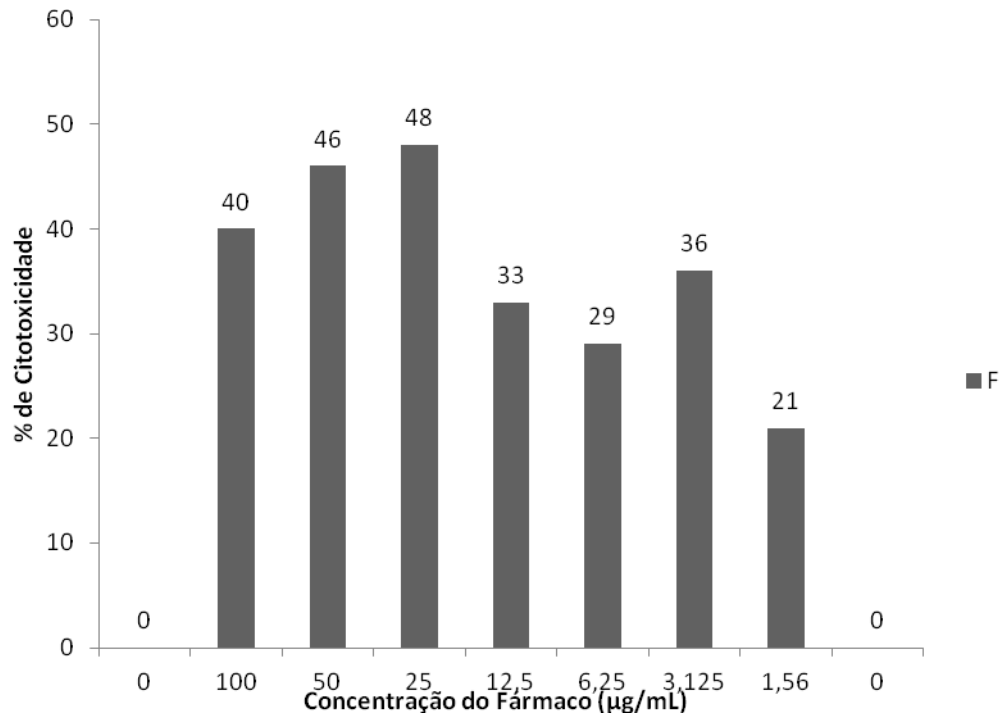


Figura 29. IC₅₀ da formulação F2 com e sem o fármaco.



Resultados & Discussão**Figura 30.** IC₅₀ da formulação F3 com e sem o fármaco.

Tendo em vista que as formulações não haviam apresentado um resultado positivo de ação leishmanicida foi realizada um segundo ensaio apenas com o fármaco para a determinação da dose-resposta do fluconazol. O resultado obtido também não foi conclusivo já que não houve a formação de uma regressão linear, como pode ser visualizado na Figura 31.

Figura 31. IC₅₀ do fármaco puro.

Tais questionamentos podem ser um indicativo de que a concentração do fármaco na amostra para a ação é superior aos 100 µg/mL utilizados como concentração máxima nos ensaios, ou o fármaco não possui nenhuma ação contra a espécie de *Leishmania* utilizada no experimento.

Salerno *et al.* (2010) mostra que a administração oral do fluconazol possui atividade leishmanicida contra *Leishmania spp.* no tratamento de leishmaniose cutânea, assim como no trabalho desenvolvido por Alrajhi e colaboradores (2002) o fluconazol também administrado por via oral, possui atividade leishmanicida contra promastigotas da espécie *Leishmania major* encurtando o tempo de cicatrização das feridas de 11,2 semanas para 8,5 semanas quando comparada com o grupo que receberam o placebo. Porém, quando realizados ensaios *in vitro* o fármaco apresenta baixa resposta de ação para varias espécies de *Leishmania*.

Estudos realizados por Buckner e colaboradores (2005) demonstraram que a concentração IC₅₀ para a *L. major* e *L. amazonensis* são maiores que 10 µg/mL de solução

Resultados & Discussão

testada durante o ensaio para amastigotas cultivadas em macrófagos. Os autores demonstraram que o fluconazol possui uma menor ação *in vitro*, porém é considerado um fármaco leishmanicida por possuir características de deposição na pele.

Rafaa e colaboradores (2007) desenvolveram uma pesquisa clínica quanto ao uso do fluconazol em suspensão oral a uma dose de 2,5 mg/Kg/dia num período de três a seis semanas de tratamento em crianças de seis anos infectadas com a *L. major*. Após seis semanas de tratamento, 36% dos pacientes tiveram remissão completa, 29% remissão parcial e para 35% o tratamento fracassou. Após três meses de tratamento, 71% dos pacientes tiveram a de remissão completa, 29% remissão parcial e 0% de fracasso, o que é um indicativo de que o fluconazol apresenta ação contra a espécie *L. major*.

Os resultados dos ensaios realizados no presente estudo são indicativos de que condições *in vitro* nem sempre corroboram os dados *in vivo*. Em muitos ensaios onde obtém a eficácia durante dos ensaios *in vitro*, quando são realizados em testes *in vivo*, não apresentam resultados animadores. O contrário também é verdadeiro. Um exemplo é o estudo de Tirel e colaboradores (1990), que realizaram os ensaios *in vitro* e *in vivo* para a suscetibilidade do bacilo C.I.P. 5832 aos agentes antimicrobianos. Os ensaios realizados com antimicrobianos *in vitro*, observava-se a capacidade de inibir o crescimento dos micro-organismos. Já nos ensaios realizados *in vivo*, realizados com aves que receberam o antimicrobiano, observou-se que nenhum dos antimicrobianos foi capaz de inibir o crescimento dos bacilos no ceco das aves dando resultados quase semelhantes ao controle negativo, ou seja, os dados das aves para as quais não houve a inibição do crescimento.

6. CONCLUSÃO

Os sistemas nanoestruturados são promissores no tratamento de doenças nas quais os fármacos tradicionais não possuem ação ou apresentam ação baixa, por possuírem características que permitem sua liberação no local de ação desejado, controle de liberação, compartimentalização da droga, diminuição das doses, menor efeito tóxico ao organismo, além de proteção contra a degradação do fármaco propiciada pelo meio ambiente.

Dentre as formulações analisadas as que se mostraram interessantes para o estudo são a F1 e a F3, uma vez que a F2 em grande parte dos ensaios apresentou alterações quando se incorporava o fármaco nas amostras. A formulação F1 apesar ser líquida e não apresentar adesividade e dureza mostrando-se um sistema pouco estruturado é a que apresenta menor tamanho das gotículas, o que pode ser administrado por outra via que não a tópica. Já a formulação F3, é um sistema estruturado e viscoso o que o torna viável para a aplicação tópica, porém apresenta tamanho de gotículas fora da faixa das microemulsões. Em todas as formulações o pH foi alcalino, muito superior ao pH levemente ácido da pele. Para uma melhor ação na pele as formulações devem ter o pH corrido.

O uso de microemulsões em doenças como a leishmaniose tegumentar é um sistema que deve ser melhor investigado, porém é preciso analisar a performance das formulações em ensaios *in vitro* e *in vivo*, uma vez que cada organismo possui uma resposta diferenciada a determinados fármacos, além do fato de que parâmetros de em ensaios *in vivo* podem influenciar uma resposta do organismo mais efetiva do que quando apenas realizados ensaios *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ABDELY, H.M.; GRAYBILL, J.R.; LOEBENBERG, D.; MELBY, P.C. Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.43, p.2910-2914, 1999.

ALRAJHI, A.A.; IBRAHIM, E.A.; DE VOL, E.B.; KHAIRAT, M.; FARIS, R.M.; MAGUIRE, J.H. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **N. Engl. J. Med.**, v.346, p.891-895, 2002.

ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of Leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v.61, p.223-274, 2006.

AYUB, A.C.; GOMES, A.D.M.; LIMA, M.V.C.; VIANNA-SOARES, C.D.; FERREIRA, L.A.M. Topical Delivery of Fluconazole: In Vitro Skin Penetration and Permeation Using Emulsions as Dosage Forms. **Drug Development and Industrial Pharmacy** v. 33, No. 3, p. 273-280, 2007.

BARON, S.; LAUBE, S.; RAAFAT, F.; MOSS, C. Cutaneous leishmaniasis in a Kosovan child treated with oral fluconazole. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.29, p.546-547, 2004.

BASTOS, M.M; BOECHAT, N; GOMES,A.T.P.C.; NEVES, M.G.P.M.S.; CAVALEIRO, J.A.S.; O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea **Rev. Virtual Quim.** v. 4, No. 3, p. 257-267, 2012.

Referências Bibliográficas

BEZERRA, R.J.S.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.2, p.139-149, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional de Saúde (FUNASA)**. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiologia, Brasília, 2000.

BUCKNER, F. S.; WILSON, A. J.; Colorimetric Assay For Screening Compounds Against Leishmania Amastigotes Grown In Macrophages **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 72(5), pp. 600–605, 2005.

CARVALHO, F. C. - Figura 10. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. / Flávia Chiva Carvalho, UNESP, Araraquara, 2009.

COHEN, B.E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **Int J Pharm**, v.162, p.95-106, 1998.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v.123, p.399-410, 2006.

CUNHA-JÚNIOR, A.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arq. Bras. Oftal.**, v.63, p.285-391, 2003.

DOGRA, J.; SAXENA, V.N. Itraconazole and leishmaniasis: a randomized double blind trial in cutaneous disease. **Int J Parasitol**, v.26, n.12, p.1413-1315, 1996.

Referências Bibliográficas

FAERGEMANN, J.; LAUFEN, H.; Levels of fluconazole in serum, stratum corneum, epidermis-dermis (without stratum corneum) and eccrine sweat. **J Clin Exp Dermatol Res** v.18, Issue 2, pages 102–106, March 1993.

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. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 41, n. 03, 2005.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ; R. F. V.; Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos **Quim. Nova**, v. 31, No. 6, 1490-1498, 2008.

GRILL, A.E.; JOHNSTON, N.W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Pat. Drug Deliv. Formul.**, v.3, n.2, p.137-142, 2009.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v.2, p.147-157, 2007.

KLIMKE, K.; SCHÄFER-KORTING, M.; Einfluß von Keratin auf die Wirksamkeit von Fluconazol. **Mycoses** Volume 40, Issue Supplement s1, pages 43–46, April 1997.

KOFFI, A.A.; AGNELY,F.; PONCHEL,G.; GROSSIORD, J. L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.27,p. 328-335, 2006.

LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.; KANIG, L.J. Teoria e prática na indústria farmacêutica. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.1143, 2001.

LAFFITTE, E.; GENTON, B.; PANIZZON, R.G. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: treatment with oral fluconazole. **Dermatology**, v.210, p.249-251, 2005.

Referências Bibliográficas

LESHER, J.L. Oral therapy of common superficial fungal infections of the skin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.40, p.S31-S34, 1999.

LIMA, E.B.; PORTO C.; MOTTA, J.C.O.; SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **An. Bras. Dermatol.**, v.82, n.2, p.111-124, 2007.

MAINARDES, R.M.; KHALIL, N.M.; GREMIÃO, M.P.D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **Int J Parasitol**, v.39, p.266-271, 2010.

MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO, P.O.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. **Curr Drug Deliv**, v.3, p.275-285, 2006.

MARTINEZ, R.; Atualização no uso de agentes antifúngicos **J. Bras. Pneumol.** v.32 no.5, 2006.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Trop. j. pharm. res.**, v.5, n.1, p.561-573, 2006.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J.; MARTINEZ-DIAS, J. A.; ESCARIO, A.; MARTINEZ FERNANDEZ, A.D.; GOMEZ-BARRIO, A. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **J Ethnopharmacol**, v.71, n.1-2, p.101-107, 2000.

NETO, V.A.; GRYSCHER, R.C.B.; AMATO, V.S.; TUON, F.F. Parasitologia; uma abordagem clínica. São Paulo: **Elsevier**, 2008.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES; M. C.; FERREIRO, L.; Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.175-184, 2002.

Referências Bibliográficas

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infar.**, v.1, p.73-79, 2001.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, No. 1, 131-138, 2004.

POULIOT, R.; GERMAIN, L.; AUGER, F.A.; TREMBLAY, N.; JUHASZ J. “Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro human skin equivalent produced by tissue engineering and its comparison with normal human skin by ATR-FTIR spectroscopy and thermal analysis (DSC)” **Biochim Biophys Acta** v. 1439,pp. 341- 352,1999.

RAFAA, M.; INGEN-HOUSZ-ORO, S.; MÉRY, L.; LE TURDU, F.; WENDLING J.; PAUWELS, C.; SIGAL-GRINBERG, M.; Traitement par fluconazole de la leishmaniose cutanée chez l’enfant **Ann Dermatol Veneréol** pp.134:682-7, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARRDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v.7, n.9, p.581-596, 2007.

SALERNO, C.; CARLUCCI, A.M.; BREGNI, C. Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms. **AAPS PharmSciTech**, v.11, n.2, p.986-993, 2010.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D.G.; BORBA, V. F. C; LIRA, A. A.; EGITO, E. S.T.; Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like **Quim. Nova**, v. 32, No. 6, 1389-1393, 2009.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R., DAMASCENO, B.P.G.L., MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o

Referências Bibliográficas

desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 31(3), p.125-131, 2010.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **J. Control. Rel.**, v.95, p.173-183, 2004.

SOUZA, L. K. - Figura 9. Utilização de sistemas poliméricos híbridos orgânicos-inorgânicos no desenvolvimento de sistemas formadores de filme. / Leiliane Kelline de Souza, UNESP, Araraquara, 2010.

TIREL, M. L.; LEVESQUE, A.; LEFRANCOIS, S.; RIDREMONT, B.; NGUYEN, I. H.; Discrepancy Between In Vitro And In Vivo Assays For The Susceptibility Of Bacillus C.I.P. 5832 To Antimicrobial Agents Comp. **Immun. Microbiol. infect. Dis.** v. 13, No. 3, pp. 155-162, 1990.

VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Prog. Retin. Eye Res.**, v.21, p.15-34, 2002

VENUGOPAL, J.; PRABHAKARAN, M.P.; LOW, S.; CHOON, A.T.; DEEPIKA, G.; DEV, V.R.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Curr. Pharm. Des.**, v.15, n.15, p.1799-1808, 2009.

VIDAL, M., S.; FERNANDES, A.P.; MIRANDA FERREIRA, L.A. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology Res.**, v.100, n.6, p.1221-1226, 2007.

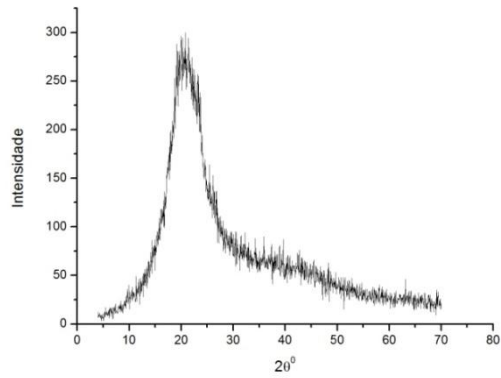
Referências Bibliográficas

WILDFEUER, A., FAERGEMANN, J., LAUFEN, H. Bioavailability of fluconazole in the skin after oral medication. **Mycoses**.v. 37, p.127–130, 1994.

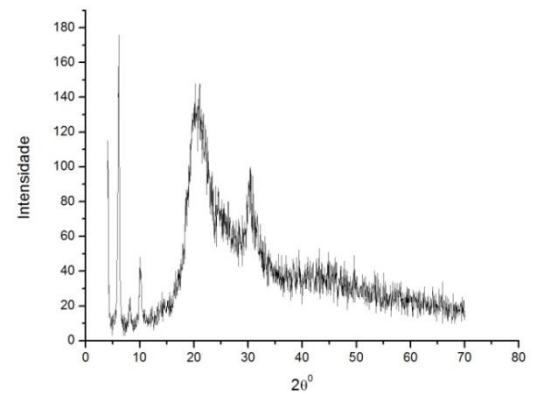
8. APÊNDICE

Apêndice A - Difração de Raio X

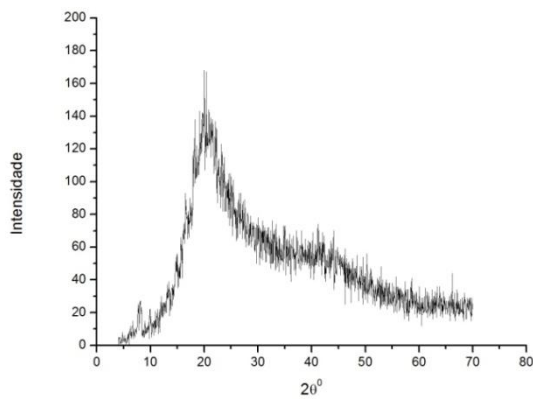
Eumulgin



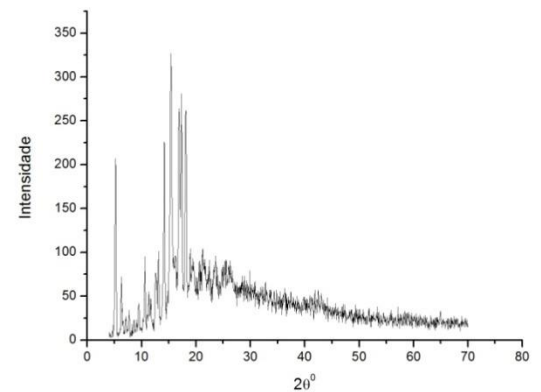
Oleato de Sódio



Fosfatidilcolina de Soja



Colesterol



Fluconazol

