

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

ESTUDO DE MICROEMULSÕES E SUBEMULSÕES
CONTENDO ANFOTERICINA B PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL

CRISTINA MARIA FRANZINI

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

ARARAQUARA – SP

2006

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

ESTUDO DE MICROEMULSÕES E SUBEMULSÕES
CONTENDO ANFOTERICINA B PARA ADMINISTRAÇÃO
ORAL

CRISTINA MARIA FRANZINI

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em ciências farmacêuticas, Área de Pesquisa de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

ARARAQUARA – SP

2006

Ficha Catalográfica

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

F837e Franzini, Cristina Maria
Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral / Cristina Maria Franzini. – Araraquara, 2006.
146 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

1. Microemulsões. 2. Anfotericina B. 3. Ciclodextrinas. I. Oliveira, Anselmo Gomes de , orient. .II. Título.

CDD: 615.4

CAPES:40300005

*“Que Deus não permita que eu perca o ROMANTISMO,
mesmo sabendo que as rosas não falam...
Que eu não perca o OTIMISMO, mesmo sabendo que o futuro
que nos espera pode não ser tão alegre...
Que eu não perca a VONTADE DE VIVER, mesmo sabendo que a vida é,
em muitos momentos, dolorosa...
Que eu não perca a vontade de TER GRANDES AMIGOS,
mesmo sabendo que, com as voltas do mundo,
eles acabam indo embora de nossas vidas...
Que eu não perca a vontade de AJUDAR AS PESSOAS,
Mesmo sabendo que muitas delas são incapazes
de ver, reconhecer e retribuir, esta ajuda...
Que eu não perca o EQUILÍBRIO, mesmo sabendo
que inúmeras forças querem que eu caia...
Que eu não perca A VONTADE DE AMAR, mesmo sabendo que a pessoa que
eu mais amo pode não sentir o mesmo sentimento por mim...
Que eu não perca a LUZ E O BRILHO NO OLHAR, mesmo sabendo que muitas coisas
que verei no mundo escurecerão os meus olhos...
Que eu não perca a GARRA, mesmo sabendo que a derrota e a perda
São dois adversários extremamente perigosos...
Que eu não perca a RAZÃO, mesmo sabendo
que as tentações da vida são inúmeras e deliciosas...
Que eu não perca o sentimento de JUSTIÇA, mesmo
sabendo que o prejudicado possa ser eu...
Que eu não perca o meu FORTE ABRAÇO, mesmo sabendo
que um dia os meus braços estarão fracos...
Que eu não perca a BELEZA E A ALEGRIA DE VIVER, mesmo sabendo
que muitas lágrimas brotarão dos meus olhos e escorrerão por minha alma...
Que eu não perca o AMOR POR MINHA FAMÍLIA, mesmo sabendo que ela
muitas vezes me exigiria esforços incríveis para manter a sua harmonia...
Que eu não perca a vontade de DOAR ESTE ENORME AMOR que existe em meu coração, mesmo
sabendo que muitas vezes ele será submetido e até rejeitado...
Que eu não perca a vontade de SER GRANDE, mesmo sabendo que o mundo é pequeno...
E acima de tudo... Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente!
Que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um”
é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois,*

A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E CONCRETIZADA NO AMOR!

Francisco Cândido Xavier

*Mais tarde é certo que o aprimoramento te
conduzirá para novas lutas e novos
ensinamentos; entretanto, permanece
convicto de que toda a lição nobre aprendida
hoje, por mais obscura e mais simples, será
sempre facilidade a sorrir-te amanhã.*

Emmanuel

Aos meus pais Alcebides e Zulmira

Há cerca de 30 anos recebi o maior presente que alguém pode receber nessa breve passagem por este mundo. Recebi a dádiva de poder compartilhar essa oportunidade que

Deus me ofereceu com vocês, meu pai e minha mãe.

Não há para mim maior felicidade do que dividir momentos bons, tristes, de glória e de dificuldades com vocês, criaturas que não medem esforços pela felicidade de seus filhos.

Agradeço por aceitarem em seu lar um espírito cheio de defeitos, o qual puderam direcionar os passos e ensinar a viver com dignidade; que sempre incentivaram quando a dúvida e o medo se fizeram presentes; que vibraram com cada nova conquista.

Não bastam palavras para expressar meus mais sinceros agradecimentos e hoje lhes

ofereço o que me é mais caro:

Ofereço-lhes a alegria desse momento

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar a oportunidade da vida, por me dar uma família especial, por me conceder obstáculos para que eu pudesse crescer, por me mostrar o caminho, pelo amor incondicional.

À minha família por ter acreditado que meu sonho era possível, por estarem ao meu lado nos momentos mais importantes, por dividirem comigo este momento tão especial.

Ao meu irmão Ricardo, pelo carinho e amizade. Pelo seu auxílio nas diversas etapas desse trabalho.

Ao Prof. Anselmo Gomes de Oliveira pela oportunidade a mim concedida, pela amizade, pelos ensinamentos e dedicação colaborando dessa forma para que eu pudesse ser uma profissional melhor.

Aos professores Marcos Antonio Corrêa e Raul César Evangelista pela contribuição concedida no exame geral de qualificação.

À todos os professores que me deram a oportunidade da convivência nesses anos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela colaboração e disponibilização de material para a elaboração desse trabalho .

Às secretárias do programa de Pós graduação Cláudia, Laura e Sônia pelo auxílio, disposição e atenção constantes. À todos os funcionários do Serviço Técnico de Biblioteca e documentação pelo auxílio na atualização das referências e correção bibliográfica assim como colaboração na formatação da dissertação.

Ao Serviço de apoio da Faculdade de Ciências farmacêuticas da UNESP-Araraquara pelo auxílio na realização do trabalho, em particular à Francisco Rocatelli pela realização das fotografias que fazem parte desse trabalho.

Agradecimentos

Aos técnicos do departamento de Fármacos e medicamentos da Faculdade de Ciências farmacêuticas da UNESP - Araraquara, em particular à Margareth e Fátima, e à Queila S. Baraldo Leme secretária do departamento de pós graduação.

Ao Professor Celso Santili do departamento de físico-química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pela disponibilização de equipamentos para análises.

À Professora Leila Aparecida Chiavacci do departamento de físico-química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pelos ensinamentos, colaboração e discussão em análises.

À Professora Rosângela Peccinin pela paciência e dedicação que dispensou a mim e ao nosso trabalho.

Aos estagiários Vanessa, Priscila e Rafael pela amizade e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos que proporcionaram momentos especiais e tornaram minha vida mais feliz em especial Nelson, Daniela Longo, Rubiana, Beatriz, Tina, Marlus, Gustavo, Thalita, Kelly, Arnóbio, Thiago, Fernando, Priscila, Mara, Gisele, Maria Carolina, Kelle, Karen e Traudi.

À minha amiga Ketylin que sempre me incentivou, desde o ingresso nessa Universidade até a conclusão do mestrado. Obrigada pela amizade.

À Luana, Helen, Daniele Michelin e Mara, pelos momentos bons e ruins, pela companhia nas alegrias e tristezas. Obrigada à vocês que fizeram de nossa casa um lar.

“Amigos são anjos que nos deixam em pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar como voar...”

Sylene Rayub

À um amigo muito especial. Um anjo que me acompanha do plano espiritual nessa caminhada pela vida. Que ri e chora comigo nas alegrias e derrotas. À você meu carinho e eterno agradecimento.

RESUMO

A Anfotericina B (AmB) é um dos mais importantes antifúngicos de amplo espectro utilizados na terapia de infecções invasivas, no entanto apresenta baixa solubilidade, o que tem levado ao desenvolvimento de formulações lipídicas que modifiquem o perfil de biodisponibilidade, e conseqüentemente a atividade terapêutica. Microemulsões (MEs) são sistemas líquidos transparentes isotrópicos e termodinamicamente estáveis de dois líquidos imiscíveis, estabilizados por um agente tensoativo, e quando necessário um co-tensoativo. As subemulsões possuem características semelhantes, porém apresentam gotículas de tamanho intermediários entre emulsões e MEs e são semi-transparentes. O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de sistemas microemulsionados ou subemulsionados estabilizados por fosfatidilcolina de soja (FS) associada à tensoativos hidrofílicos para veiculação de AmB. Foi avaliada a utilização de pluronic (PLU) como co-tensoativo e observou-se o predomínio de sistemas mais viscosos. A utilização de Tween-20 (TW-20) associado à FS proporcionou a obtenção de sistemas transparentes líquidos o que levou a um estudo mais criterioso desses sistemas. O estudo do balanço hidrófilo-lipófilo (EHL) foi realizado assim como medidas utilizando técnicas de espalhamento dinâmico de luz para análise do tamanho das gotículas da fase interna. Foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a determinação quantitativa da FS presente nas MEs por 60 dias e foi verificado que não há significância nos valores de hidrólise obtidos. O estudo do comportamento reológico das MEs, mostrou que todas as amostras apresentaram comportamento Newtoniano, mantendo a viscosidade constante independente da velocidade de deformação. Os estados de agregação da AmB foram avaliados através de seus espectros de absorção relativos às diferentes concentrações, inclusão em ciclodextrinas e incorporação no sistema microemulsionado

Resumo

selecionado. Foi verificada uma modificação relativa na proporção de monômeros do fármaco. A técnica de nefelometria foi realizada e indicou aumento no tamanho das gotículas da ME com o aumento da concentração da AmB. Verificou-se que a incorporação de AmB nos sistemas desenvolvidos é dependente da proporção relativa da fase interna oleosa. A liberação de AmB, *in vitro*, é mais prolongada à medida que aumenta a proporção de fase interna oleosa. Os sistemas microemulsionados e subemulsionados mostraram-se eficazes na veiculação de AmB apresentando-se como sistema reservatório facilitando a liberação prolongada.

PALAVRAS-CHAVE: microemulsões, anfotericina B, ciclodextrinas.

ABSTRACT

Amphotericin B (AmB) is one of the most important wide spectrum antifungal used in the invasive infections therapy. It presents low solubility, which has taken to the development of lipid formulations that change the bioavailability profile, and consequently the pharmacological effect. Microemulsions (MEs) are isotropic liquid transparent and thermodynamically stable systems of two immiscible liquids stabilized by a surfactant agent, and when necessary, by a co-surfactant. Subemulsions show similar characteristics, however they present droplets of intermediate size between emulsions and MEs and they are semi-transparent. The objective of this work was the development of subemulsified and microemulsified systems stabilized by soya phosphatidylcholine (FS) and/or FS associated to hydrophilic surfactants to AmB veiculation. It was evaluated the use of pluronic (PLU) as co-surfactant and it was observed the predominancy of the more viscose systems. The use of tween-20 (TW-20) associated with the FS provided the formation of transparent liquid systems that has taken to a detailed study of those systems. The hydrophilic–lipophylic balance (HLB) study was performed as well as measures using techniques of dynamic light scattering to verify the droplets size to internal droplet phase analysis. It was performed the quantitative determination of the FS in the ME for 60 days through of high performance liquid chromatography (HPLC) and it was verified that there is no significance in the hydrolysis values obtained. The study of the rheological behavior of MEs verified that all the samples have presented Newtonian behavior, maintaining the viscosity constant independent of the deformation speed. The states of aggregation of the AmB have been evaluated through its relative absorption specters to the different concentrations, inclusion in cyclodextrins and incorporation in the selected microemulsion system. A relative modification in the proportion of monomers of the drug

Abstract

was verified. The Nefelometry technique was performed and showed increase in the droplets size of the ME with increase to the AmB concentration. It was verified that the AmB incorporation in the developed systems is dependent on the oil phase. The *in vitro* release of AmB is more prolonged as long as the internal oil phase increases. The microemulsified and subemulsified systems appear as more effective in the AmB veiculation presenting themselves as reservatory system, facilitating the prolonged release.

KEYWORDS: microemulsions, amphotericin B, cyclodextrins.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	<i>i</i>
LISTA DE TABELAS	<i>vii</i>
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	<i>viii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Infecções fúngicas	5
2.2.O fármaco: Anfotericina B.....	6
2.3.Microemulsões.....	13
3.OBJETIVOS	29
4.MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1.MATERIAL	30
4.1.1.Matérias primas, reagentes e solventes.....	30
4.1.2.Equipamentos, vidrarias e outros.....	30
4.2.MÉTODOS	33
4.2.1.Diagrama de fases pseudo-ternários para sistema estabilizado por FS/PLU.....	33
4.2.2.Preparação e caracterização de sistema estabilizado por FS/TW-20.....	34
4.2.2.1. Caracterização macroscópica.....	34
4.2.2.2.Equilíbrio hidrífilo-lipófilo- EHL	35
4.2.2.3.Cinética de crescimento das gotículas através de análise espectrofotométrica	36
4.3 .Diagrama de fases pseudo-ternário para o sistema estabilizado por FS/TW-20	36
4.4 .Determinação do raio hidrodinâmico das gotículas por espalhamento de luz da amostra com valor de EHL 11,0.....	37
4.4.1 . Determinação do índice de refração.....	38

4.5.Determinação quantitativa de FS.....	38
4.5.1.Curva padrão da FS.....	39
4.5.2.Quantificação FS na ME.....	39
4.6.Análise Reológica.....	40
4.7.Espalhamento de raios-x a baixo ângulo(SAXS).....	41
4.8.Complexação de AmB em β-ciclodextrinas (βCD) e hidroxipropil-β-ciclodextrinas, (HP-BCD).....	45
4.9.Incorporação da AmB na ME EHL 11,0.....	46
4.10.Incorporação da AmB na ME/β-CD.....	46
4.11.Análise da turbidez das MEs contendo AmB por nefelometria	47
4.12.Determinação da densidade das EMs e MEs.....	47
4.13.Determinação da solubilidade de AmB nas MEs e SEs.....	48
4.13.1.Preparo das MEs e SEs para incorporação de AmB.....	48
4.13.2.Curva padrão da AmB em metanol.....	48
4.13.3.Determinação da solubilidade da AmB nas microemulsões em função do volume de fase oleosa.....	48
4.14.Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i>.....	49
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
6.CONCLUSÕES.....	105
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Química da Anfotericina B	7
Figura 2: Formação de pontes de hidrogênio entre AmB, esteróis e H ₂ O.....	8
Figura 3: Estrutura química do ergosterol.....	8
Figura 4: Formação de poros pela AmB na bicamada lipídica das membranas celulares.....	9
Figura 5: Estrutura de uma microemulsão.....	14
Figura 6: Estrutura química da fosfatidilcolina de soja.....	21
Figura 7: Estrutura química do Pluronic F-127.....	23
Figura 8: Estrutura de uma molécula de ciclodextrina.....	27
Figura 9: Representação esquemática da estrutura funcional das CDs.....	27
Figura 10: Diagrama esquemático das principais regiões das curvas de SAXS.....	43
Figura 11: Esquema da célula de difusão adaptada ao dissolution. (a) abertura para coleta de amostra e reposição, (b) entrada do dispositivo para agitação do meio, (c) abertura para colocação do tubo com a membrana (à esquerda) e esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução (à direita).....	50
Figura 12: Fotos da célula de difusão utilizada no ensaio de liberação <i>in vitro</i>	51
Figura 13(A): Foto do equipamento de dissolução	51
Figura 13(B): Fotos da célula de difusão adaptada ao equipamento.....	51
Figura 14: Diagrama de fases para o sistema estabilizado FS e PLU na proporção 7:3(EHL 8,8); CP-200 e CO como fase oleosa na proporção 9:1(p/p) e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como fase aquosa. As áreas delimitadas representam, EV - emulsão viscosa; EL - emulsão líquida; ME - microemulsão; SEV -subemulsão viscosa; SEL - subemulsão líquida; SF – separação de fases.....	54
Figura 15: Amostras constituídas de TW-20/FS (7:3) EHL 12,8 nas proporções 1:9 até9:1 óleo/tensoativos respectivamente imediatamente após a preparação dos sistemas emulsionados.....	58
Figura 16: Amostras constituídas de TW-20/FS nas proporções 1:9 até 9:1 óleo/tensoativos respectivamente, após 15 dias da preparação dos sistemas emulsionados.....	58

Figura 17: Amostras com valores de EHL entre 15,43 e 9,08 respectivamente imediatamente após a preparação dos sistemas microemulsionados.....	59
Figura 18: Amostras com valores de EHL entre 15,43 e 9,08 respectivamente após 15 dias da preparação dos sistemas microemulsionados.....	59
Figura 19: Variação da turbidez da amostra de microemulsão preparada a partir de fosfatidilcolina de soja, captex, colesterol, tween-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 9,8.....	61
Figura 20: Variação da turbidez da amostra de microemulsão preparada a partir de fosfatidilcolina de soja, captex, colesterol, tween-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 10,0.....	61
Figura 21: Variação da turbidez da amostra de microemulsão preparada a partir de fosfatidilcolina de soja, captex, colesterol, tween-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 10,35.....	61
Figura 22: Variação da turbidez da amostra de microemulsão preparada a partir de fosfatidilcolina de soja, captex, colesterol, tween-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 10,99.....	61
Figura 23: Variação da turbidez da amostra de microemulsão preparada a partir de fosfatidilcolina de soja, captex, colesterol, tween-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 11,3.....	62
Figura 24: Variação da turbidez da amostra de microemulsão preparada a partir de fosfatidilcolina de soja, captex, colesterol, tween-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 11,62.....	62
Figura 25: Perfil de estabilidade das MEs preparadas a partir de FS:TW-20 (15%), CP-200:CO (10%), e tampão Tris-HCl 0,01 pH 7,2 (75%) por espectrofotômetro em 410nm avaliando aumento do tamanho das gotículas através da relação Abs/tempo.....	63
Figura 26: Diagrama de fases para o sistema estabilizado com FS:TW-20 5,52/4,48 (EHL 10,99), CO:CP-200 como fase oleosa na proporção 9:1 e tampão fosfato 50mMM pH 7,4 como fase aquosa. As áreas delimitadas representam, EV - emulsão viscosa; EL - emulsão líquida; ME - microemulsão; SEV - subemulsão viscosa; SEL - subemulsão líquida; SF - separação de fases, ● - amostra selecionada com 15% MT, 10% FO e 75% FA.....	64
Figura 27: Cromatograma típico da FS em 206 nm.....	68
Figura 28: Curva padrão da FS em n-hexano / n-propanol (1:4), obtida por CLAE, detecção em 206 nm (n=3)	69

Figura 29: Hidrólise da FS em MEs durante 60 dias. Análise realizada por CLAE a 206 nm.....	71
Figura 30: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 (5,43:4,57), 5% de CO:CP-200(0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 25°C com valor de EHL 9,8.....	72
Figura 31: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 (5,43:4,57), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 37°C com valor de EHL 9,8.....	72
Figura 32: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW- 20 (5,27:4,73), 5% de CO;CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 25°C com valor de EHL 10,0.....	73
Figura 33: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 (5,27:4,73), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 37°C com EHL 10,0.....	73
Figura 34: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 (5:5), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 25°C com EHL 10,35.....	73
Figura 35: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 20 (5:5), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 37°C com EHL 10,35.....	73
Figura 36: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 (4,48:5,52), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 25°C com EHL 10,99.....	74
Figura 37: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 (4,48:5,52), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 37°C com EHL 10,99	74
Figura 38: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 (4,25:5,75), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 25°C com EHL11,35.....	74
Figura 39: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW- 20 (4,25:5,75), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 37°C com EHL 11,35.....	74
Figura 40: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS :TW-20 (4,0:6,0), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 25°C com EHL 11,62.....	75

Figura 41: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% e FS:TW-20 (4,0:6,0), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa a 37°C com EHL 11,62.....	75
Figura 42: Viscosidade da ME EHL 9,8 estabilizada com 10% de FS:TW-20 (5,43:4,57), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa.....	76
Figura 43: Viscosidade da ME EHL 10,0 estabilizada com 10% de FS:TW-20 (5,27:4,73), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa.....	76
Figura 44: Viscosidade da ME EHL 10,35 estabilizada por 10% de FS:TW-20 (5:5), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa.....	76
Figura 45: Viscosidades da ME EHL 10,99 estabilizada por 10% de FS:TW-20 (4,48:5,52), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa.....	76
Figura 46: Viscosidade de ME EHL 11,35 estabilizada por 10% de FS:TW-20 (4,25:5,75), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa...	77
Figura 47: Viscosidade de ME EHL 11,62 estabilizada por 10% de FS:TW-20 (4,0:6,0), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 85% fase aquosa.....	77
Figura 48: Curvas de SAXS para amostras com valores de EHL entre 9,08 e 11,62....	78
Figura 49: Ajuste da curva para a amostra com EHL= 9,08 à equação 1.....	80
Figura 50: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-6} M em tampão fosfato 50 mM pH 7,4 na faixa de comprimento de onda entre 300 e 500 nm.....	82
Figura 51: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-6} M em tampão fosfato 50 mM pH 7,4 (_____) e em β -CD (_____) na mesma concentração, na faixa de comprimento de onda entre 300 e 500 nm.....	83
Figura 52: Comparação dos espectros de absorção da AmB em tampão e incorporada a ME na concentração 5×10^{-6} M na faixa de comprimento de onda entre 300 e 500 nm.....	84
Figura 53: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-6} M em ME- β -CD a 406nm.....	85
Figura 54: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-5} M em tampão fosfato 50mM pH 7,4 e em β -CD na mesma concentração, a 406nm.....	86
Figura 55: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-5} M em tampão fosfato 50mM pH 7,4 e em β -CD tempo zero e após 48 horas, a 406nm.....	86
Figura 56: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-5} M em tampão fosfato 50mM pH 7,4 a 406nm (t_0).....	87

- Figura 57:** Espectro de absorção da AmB na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ em HP- β CD, a 406nm após 48 h (t_{48})..... 88
- Figura 58:** Espectro de absorção da AmB na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ em HP- β CD no momento da incorporação e após filtração em filtro 0,2 μm realizadas a cada 1 minuto, a 406nm..... 88
- Figura 59** Medidas de turbidez em NTU (unidades nefelométricas de turbidez) das amostras de ME vazia, e com fármaco nas concentrações $5 \times 10^{-6} \text{M}$ e $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 89
- Figura 60** :(A)Verificação da turbidez das amostras de ME vazia (1), com fármaco, na concentração de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ (2) e ME na concentração de $5 \times 10^{-5} \text{M}$ (3).(B) amostras nas concentrações $5 \times 10^{-6} \text{M}$ (4) e $5 \times 10^{-5} \text{M}$ (5) após 24 horas em repouso..... 90
- Figura 61:** AmB incorporada na ME na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ no momento da incorporação (A) e após 24 horas (B) 90
- Figura 62(A):** Distribuição de tamanho de gotículas de fase interna de ME sem a incorporação de AmB..... 91
- Figura 62(B):**Distribuição de tamanho de gotículas de fase interna de ME com fármaco na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 91
- Figura 63:** Curva padrão da Anfotericina B(AmB) em metanol, obtida por espectrofotometria, detecção por VIS em $\lambda = 406 \text{ nm}$ ($n=3$). $r^2 = 0,996869$ 93
- Figura 64:**Incorporação de AmB nas MEs em função do volume de fase oleosa (%)...... 94
- Figura 65:**Curva padrão da Anfotericina B(AmB) em tampão fosfato pH 7,4 50mM (solução receptora) obtida por espectrofotometria, detecção por VIS em $\lambda = 412 \text{ nm}$ ($n=3$). $r^2 = 0,9992$ 97
- Figura 66:** Perfil de liberação de ME composta de 15% de tensoativo (FS:TW-20 4,49:5,51), 2,5% de fase oleosa (CO/CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH7,4 como fase aquosa comparado com a liberação da AmB em solução..... 98
- Figura 67:** Perfil de liberação de ME composta de 15% de tensoativo (FS:TW-20 4,49:5,51), 5% de fase oleosa (CO/CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH7,4 como fase aquosa comparado com a liberação da AmB em solução..... 98
- Figura 68:** Perfil de liberação de ME composta de 15% de tensoativo (FS:TW-20 4,49:5,51), 7,5% de fase oleosa (CO/CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH7,4 como fase aquosa comparado com a liberação da AmB em solução..... 99

- Figura 69:** Perfil de liberação de ME composta de 15% de tensoativo (FS:TW-20 4,49:5,51), 10% de fase oleosa (CO/CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH7,4 como fase aquosa comparado com a liberação da AmB em solução..... 99
- Figura 70:** Perfil de liberação de ME composta de 15% de tensoativo (FS:TW-20 4,49:5,51), 12,5% de fase oleosa (CO/CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH7,4 como fase aquosa comparado com a liberação da AmB em solução..... 100
- Figura 71:** Perfil de liberação de ME composta de 15% de tensoativo (FS:TW-20 4,49:5,51), 15% de fase oleosa (CO/CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH7,4 como fase aquosa comparado com a liberação da AmB em solução..... 100
- Figura 72:** Perfil de liberação de ME composta de 15% de tensoativo (FS:TW-20 4,49:5,51), 20% de fase oleosa (CO/CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH7,4 como fase aquosa comparado com a liberação da AmB em solução..... 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Combinação entre mistura de tensoativos e fase oleosa para determinação do diagrama de fases.....	33
Tabela 2: Representação de diferentes proporções de tensoativos e dos valores de EHL obtidos	35
Tabela 3: Composição das amostras selecionada para o teste de liberação <i>in vitro</i>	52
Tabela 4: Medidas de raio hidrodinâmico das amostras com EHL 10,99.....	67
Tabela 5: Valores das áreas dos picos de fosfatidilcolina de soja em diferentes concentrações	69
Tabela 6: Valores das áreas obtidas por CLAE e valores de concentração de fosfatidilcolina.....	70
Tabela 7: Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as amostra com EHL entre 9,08 e 11,3.....	80
Tabela 8: Determinação da densidade e volume de fase de MEs EHL 11, variando a proporção de fase aquosa e oleosa.....	92
Tabela 9: Valores das absorbâncias da AmB em diferentes concentrações.....	92
Tabela 10: Valores das absorbâncias da Anfotericina B(AmB) em diferentes concentrações.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O	Água em óleo
AmB	Anfotericina B
β-CD	β-ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO	Colesterol
CP-200	Captex-200
CPP	Parâmetro de empacotamento crítico
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
FA	Fase aquosa
FO	Fase oleosa
FS	Fosfatidilcolina de soja
HP-β-CD	Hidroxipropil β-ciclodextrina
IR	Índice de refração
ME(s)	Microemulsão(s)
MT	Mistura tensoativa
NTU	Unidades nefelométricas de turbidez
O/A	Óleo em água
PCS	Espectroscopia de fotocorrelação
pH	Potencial hidrogeniônico
PLU	Pluronic [®]
SAXS	Espalhamento de raios x a baixo ângulo
SE(s)	Subemulsão(s)
SEL	Subemulsão líquida
SEV	Subemulsão viscosa
SF	Separação de fases
T	Tensoativo
TW-20	Tween-20

1. INTRODUÇÃO:

Diversos fatores têm contribuído para o aumento no número de pacientes imunocomprometidos. Dentre esses fatores destacam-se a síndrome da imunodeficiência adquirida, o câncer, os transplantes, o uso de sistemas de suporte de nutrição parenteral e o uso indiscriminado de antimicrobianos. Em decorrência do comprometimento imunológico, tais pacientes tornam-se alvos fáceis para infecções fúngicas sistêmicas (ARAÚJO, 2005).

Anfotericina B (AmB), embora apresente toxicidade aguda e crônica, tem sido um dos fármacos mais efetivos como agente antifúngico sistêmico. A AmB tem amplo espectro de atividade contra vários tipos de fungos, porém em razão de sua baixa solubilidade não é adequadamente absorvida pelo trato gastrointestinal (COHEN, 1998).

A AmB é anfotérica devido à presença da carboxila e do grupo amino e anfifílica por apresentar uma extremidade polar e outra apolar, assemelhando-se, por isso com fosfolipídios (colesterol e ergosterol) das membranas celulares. O fármaco possui maior afinidade pelo ergosterol da membrana fúngica do que pelo colesterol da membrana de animais pelo maior contato intermolecular com o ergosterol que possui uma estrutura mais rígida que o colesterol. Seu efeito fungicida baseia-se na capacidade da AmB em formar canais que se estendem à membrana celular. Dessa forma os constituintes da célula do microrganismo são perdidos, levando a uma perturbação do metabolismo, desestabilização osmótica e morte celular (HILLERY, 1997). Entretanto, a atividade da AmB não é exclusiva para as células fúngicas sendo que os rins constituem o maior alvo desse efeito tóxico.

Substâncias farmacologicamente ativas, assim como AmB, quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais, geralmente não conseguem atingir concentração

apreciável no tecido alvo no organismo, porque entre o local da aplicação e as células se interpõe uma série de barreiras biológicas que expõe os tecidos normais do organismo aos efeitos potencialmente tóxicos do fármaco (OLIVEIRA et al., 1992; CONSTANTINIDES, 1995; DALMORA et al., 2001, OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2004).

A forma comercialmente disponível é um sistema micelar no qual o fármaco está solubilizado com desoxicolato de sódio. Essa formulação tem sido utilizada por mais de 40 anos para tratar micoses sistêmicas. Na tentativa de reduzir sua toxicidade, três complexos lipídicos foram desenvolvidos e estão disponíveis no mercado. Ambisome[®], ABCL[®] e Amphocil[®]. Essas formulações são administradas por via parenteral e o paciente deve permanecer hospitalizado durante a infusão. Esses fatores contribuem para uma menor adesão do paciente ao tratamento.

É necessário um estudo muito criterioso no desenvolvimento de novas formulações para veicular a AmB, pois se trata de uma molécula praticamente insolúvel na maioria dos solventes, e possui mecanismo de ação que preconiza a não existência de agregados. As formas monoméricas são mais eficientes na indução da permeabilidade de potássio nas membranas que contém esteróis e levam a uma menor toxicidade.

Formulações lipídicas como microemulsões (MEs) e lipossomas possuem capacidade de reduzir a toxicidade, o que pode ser devido à diminuição da exposição renal pela redução da ligação do fármaco às lipoproteínas (BEKERSKY, *et al.*, 1999).

A composição dos carreadores lipídicos deve permitir que as moléculas de AmB fiquem indisponíveis para interagirem com as células humanas e exercerem seus efeitos tóxicos.

Misturas de eletrólitos, hidrocarbonetos e compostos anfifílicos têm sido assuntos de extensivas pesquisas, especialmente aqueles sistemas formando soluções isotrópicas, também conhecidas como microemulsões (BOURREL e SCHECHTER, 1988).

MEs são definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo associado ou não, a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (OLIVEIRA et al, 2004). Para a estabilização desses sistemas, é necessária a diminuição da tensão interfacial para a neutralização dessa energia livre (LAWRENCE et al., 2000; OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2004). Apresentam grande área interfacial devido ao tamanho diminuto de gotículas que possuem, levando a um aumento da energia livre (OLIVEIRA, 1997; LAWRENCE et al., 2000; OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2004).

MEs podem formar estruturas tais como gotículas de óleo em água (O/A), gotículas de água em óleo (A/O) ou estruturas bicontínuas. Está descrito na literatura que substâncias farmacologicamente ativas dissolvidas na fase interna da ME O/A possuem liberação mais lenta em relação ao fármaco livre, mostrando a habilidade desse tipo de agregado como sistema reservatório podendo proporcionar efeito Estudos realizados em nosso laboratório com o antiinflamatório não esteroideal piroxicam ilustram claramente esse fenômeno (DALMORA e OLIVEIRA ,1999; DALMORA et al, 2001).

MEs frequentemente apresentam grande capacidade solvente para fármacos, tornando-as formulações mais atrativas na área farmacêutica, além de oferecerem vários benefícios para administração oral, incluindo aumento na absorção, maior potência terapêutica e redução da toxicidade (TROTTA et al., 1999).

Desta forma, as potencialidades das MEs e SEs em aumentar a absorção de fármacos no trato gastrintestinal, proporcionar proteção de substâncias contra o meio biológico, possibilitar o direcionamento do fármaco, contribuindo assim para a adesão de pacientes ao tratamento pela facilidade de administração, garantir facilidade de produção, fazem deste sistema uma importante alternativa a ser explorada também na liberação por

via oral. São consideradas como sistemas transportadores podendo comportar-se como potente reservatório de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos (CERA, 2001).

Um desenvolvimento científico e tecnológico é necessário para a próxima geração de formulações para veicular a AmB, que se somará às opções atualmente disponíveis para a terapêutica antifúngica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INFECÇÕES FÚNGICAS

As infecções fúngicas invasivas são cada vez mais prevalentes devido ao aumento de pacientes com imunossupressão. Doenças de base ou condições crônicas como câncer, transplante de medula óssea ou de órgãos sólidos, infecções por HIV ou administração prolongada de corticosteróides tornam os pacientes vulneráveis para infecções fúngicas oportunistas (EDMOND et al, 1999). Outros fatores predisponentes relacionam-se ao uso simultâneo de antibióticos, porque a redução das bactérias protetoras pode permitir o crescimento de fungos. O uso de dispositivos que quebram barreiras de defesa, particularmente catéteres venosos centrais em pacientes recebendo nutrição parenteral, facilita o acesso de agentes patogênicos. Internação prolongada em uma unidade de cuidados intensivos também aumenta o risco (REX, 2006).

Pacientes com pneumonia de etiologia fúngica, infecções do trato urinário, infecções oriundas de processos cirúrgicos, têm aumentado de 50 a 400% desde 1990 (ELLIS, 2001).

Tem sido também indicada para o tratamento de leishmaniose visceral como terapia primária em pacientes imunocomprometidos e para leishmaniose cutânea e mucocutânea americana, não sendo nesses últimos dois casos, medicamento de primeira escolha (RATH et al., 2003; KAYSER et al., 2003).

A maioria dos fungos não causa problemas em indivíduos saudáveis, porém em pacientes com déficit da imunidade podem se tornar devastadores. (REX, 2006).

Entre os microrganismos causadores de infecções fúngicas-sistêmicas destacam-se a *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Criptococcus neoformans*, *Histoplasma* e microrganismos patogênicos múltiplos, os quais invadem sítios tais como trato genito-

urinário, pulmões, pleura, coração, mediastino, sangue e outros fluidos corporais (KULLBERG et al., 1999).

Alguns fatores contribuem para o risco de mortalidade por infecções fúngicas. Primeiramente, um diagnóstico recente e confiável é freqüentemente dificultado e as abordagens microbiológicas são pouco sensíveis e não específicas, consumindo tempo. Segundo, os sinais clínicos e sintomas de uma infecção fúngica invasiva podem ser ausentes até que a infecção atinja um estágio avançado, devido à redução ou ausência de uma resposta antiinflamatória sistêmica em pacientes com profunda neutropenia ou recebendo esteróides. Terceiro, as terapias antifúngicas disponíveis não são suficientes e uma resposta satisfatória ao tratamento depende principalmente da correção da deficiência imune, o que não ocorre freqüentemente (KONTOYIANNIS et al., 2003).

2.2. O FÁRMACO: ANFOTERICINA B

Nos últimos 40 anos, a Anfotericina B (AmB) tem sido um dos fármacos mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas. É um antibiótico poliênico, pertencente ao complexo grupo dos macrolídeos sendo bem conhecidos pelos efeitos letais contra fungos em baixas concentrações. Foi descoberto nos Estados Unidos, na década de 50 por Gold e colaboradores. Apresenta uma cadeia complexa com massa molar igual a 924,09 (ARAUJO, 2005).

A AmB tem amplo espectro de atividade contra vários tipos de fungos, porém em razão de sua baixa solubilidade não é adequadamente absorvida pelo trato gastrointestinal (COHEN, 1998). É comumente utilizada nas infecções sistêmicas por fungos como *Candida sp*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides ssp* (WALSH et al., 2001; HOESLEY & DISMUKES, 1999). Apresenta-se como um pó amarelo alaranjado,

insolúvel em etanol e em éter. Solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) e em propano-1,2-diol. Levemente solúvel em dimetilformamida e em metanol. A solubilidade em água depende do pH. O fármaco é sensível à luz, ao calor e ao pH abaixo de 6 e acima de 9 (BUDAVARI et al., 1996).

A AmB é anfotérica devido à presença da carboxila e do grupamento amino, tendo pKas de 5,5 e 10 e anfifílica por apresentar uma extremidade polar e outra apolar, assemelhando-se, por isso com fosfolipídios, colesterol (CO) e ergosterol (ER) das membranas celulares, as quais, por sua vez agem como receptores para as suas moléculas (figura 1).

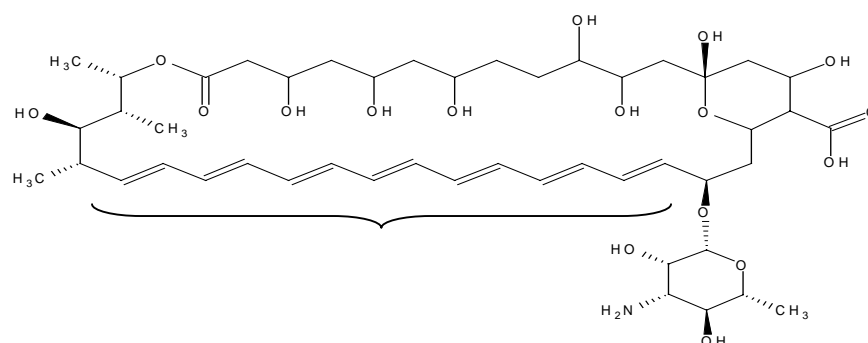


Figura 1: Estrutura Química da Anfotericina B

As ligações entre os esteróis das membranas celulares e a AmB ocorrem através de pontes de hidrogênio (entre a hidroxila dos esteróis e a carboxila da molécula de AmB (figura 2) ou através de forças de Van der Waals. Essa última atua entre cadeia lateral do ER, (dupla ligação localizada no carbono 22) e o fármaco. Já no CO, essa dupla ligação não está presente, o que a torna uma molécula mais flexível e dificulta o seu contato intermolecular com os macrolídios (ARAÚJO, 2005).

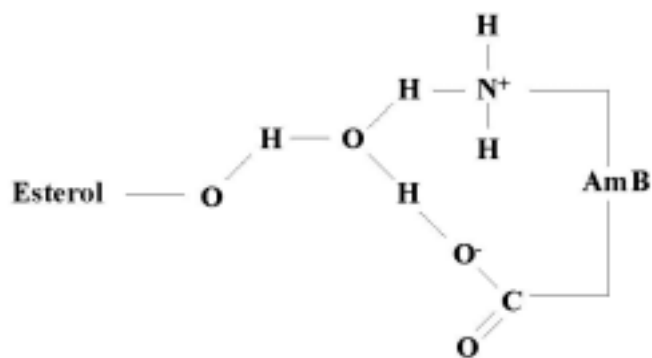


Figura 2. Formação de pontes de hidrogênio entre AmB, esteróis e H₂O.

A chave na figura 1 indica a cadeia carbônica do antibiótico que interage com a dupla ligação do carbono 22 do ER, indicada na figura 3 pela seta.

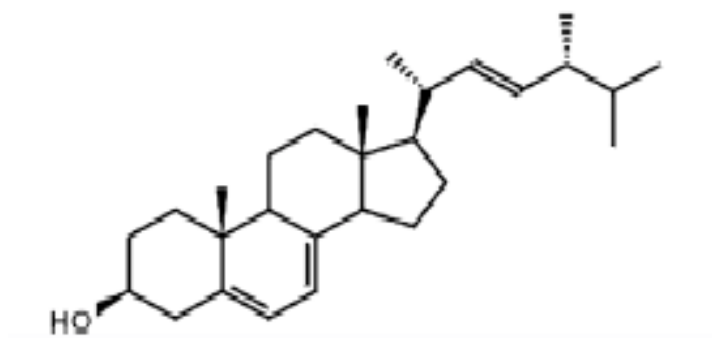


Figura 3. Estrutura química do ergosterol

Dado à natureza anfipática da AmB e suas dimensões moleculares, um modelo para propor seu efeito fungicida baseia-se na capacidade da AmB em formar canais que estendem-se à membrana celular. A AmB intercala-se com o esterol presente na membrana celular para formar o poro no qual a face hidrofílica localiza-se no interior e a face hidrofóbica na membrana lipídica. O canal então criado por essa associação de moléculas do fármaco, capaz de induzir modificações na permeabilidade da membrana, é a

rota através da qual os constituintes da célula do microrganismo são perdidos, levando a uma perturbação do metabolismo, desequilíbrio osmótico e morte celular (HILLERY, 1997). O número razoável de monômeros associados para formar um poro na membrana celular foi estimado ser de 8 a 12 (ROSOFF, 1996).

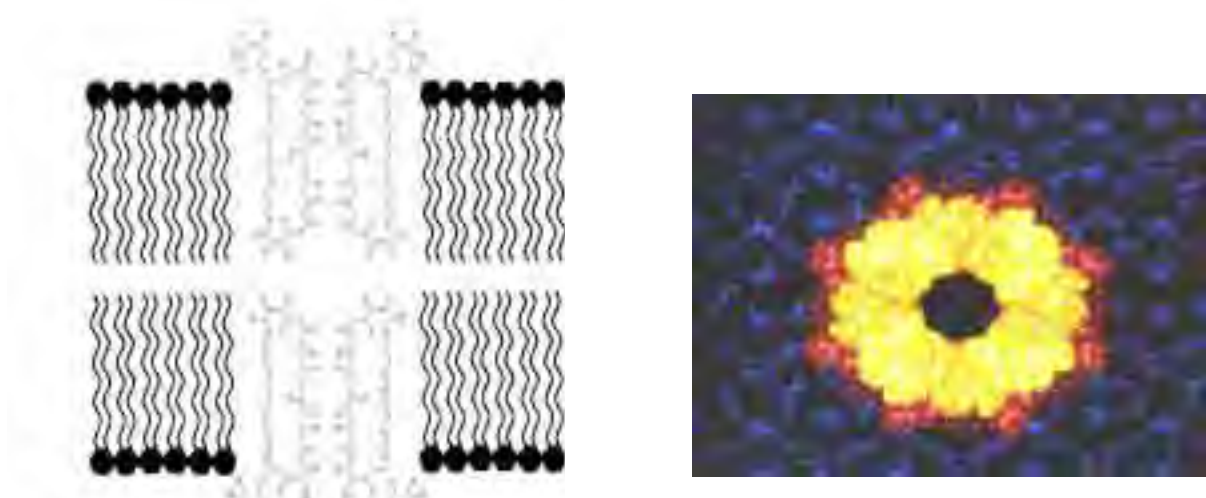


Figura 4: Formação de poros pela AmB na bicamada lipídica das membranas celulares

Estudos revelam que somente quando uma concentração crítica da AmB alcança e atravessa as membranas é que as moléculas se unem para formar canais aquosos juntamente com os esteróis (VENEGAS et al., 2003, COREN, 1997, MINONES et al, 2005).

A especificidade da ligação da AmB à membrana celular é devida à maior seletividade do fármaco pelo ergosterol, esterol constituinte da membrana celular dos fungos do que pelo (CO) presente nas membranas plasmáticas de células animais (GIANNINI et al., 2004).

Infelizmente, a atividade da AmB não é exclusiva para células fúngicas sendo que os rins constituem o maior alvo desse efeito tóxico, fato esse responsável, muitas vezes, pela interrupção do tratamento. Esses efeitos adversos tóxicos podem prevalecer sobre o efeito terapêutico, assim a severidade e a frequência de danos renais são tais que a

toxicidade, sendo maior que o benefício de seu efeito, determina a dose do fármaco que deve ser administrada. Outros efeitos adversos inerentes ao fármaco são náuseas, anemia, calafrios, febre, cardiotoxicidade, tromboflebitis, hipotensão, dor no local da aplicação, entre outros (BEKERSKY et al., 1999; COHEN, 1998; TIPHINE et al., 1999).

Quando em solução aquosa, a AmB apresenta-se como uma mistura de monômeros, agregados solúveis (dímeros e oligômeros) e agregados insolúveis. A sua seletividade com as membranas celulares do fungo é também dependente desse estado de agregação (ARAÚJO, 2005; MINÖNES et al, 2005)

A proporção relativa destas formas depende da concentração, sendo possível sua detecção através dos espectros de absorção (EGITO et al., 1996; MILLIE et al., 1999).

É conhecido que a AmB possui uma cadeia hidrofóbica que consiste em uma série de sete duplas ligações que indicam a sua presença no espectro de absorção em torno de 400nm.

Em baixas concentrações (menores que $5 \times 10^{-6} \text{M}$), o espectro de absorção de luz de uma suspensão aquosa apresenta quatro bandas entre 420 e 320nm (409, 385, 365 e 347nm). A forma monomérica é responsável pela banda em 405-409nm e sua absorção máxima.

Em contraste, em altas concentrações (acima de $5 \times 10^{-6} \text{M}$) as moléculas se auto-associam para formar oligômeros e agregados de oligômeros, sendo então observado um novo espectro, onde as bandas próximas de 400nm são substituídas e uma nova banda é observada em torno de 340nm. Essas bandas são características das mudanças no estado molecular da AmB devido à agregação. Assim a forma do espectro depende do estado de agregação das moléculas do fármaco (MORENO, 2000).

Há uma concentração crítica de AmB, na qual se inicia a transição do estado de agregados para o de monômeros. Portanto, abaixo do valor de concentração crítica, a AmB

existe no estado monomérico. Com a quantidade aumentada acima da concentração crítica, elas se agregam umas nas outras em solução (HUANG, et al., 2002). Numa solução de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de AmB observa-se uma dissociação de 50% de formas agregadas e 50% de formas monoméricas (ARAÚJO, 2005).

Foi confirmado que a forma solúvel de AmB auto-associada, assim como os monômeros são mais eficazes na indução da permeabilidade de potássio nas membranas que contém CO, que os agregados insolúveis, que são os maiores responsáveis pela toxicidade. Então, uma das estratégias para diminuir a toxicidade do fármaco é desenvolver novos derivados ou formulações que diminuam a agregação ou produzam agregados menos tóxicos. Assim, o estudo estrutural e a quantificação dos agregados constituem um passo essencial para o entendimento dos mecanismos moleculares da AmB a respeito da seletividade e da citotoxicidade (ARAÚJO, 2005).

A forma convencional de AmB no mercado é o Fungizon[®], que consiste numa dispersão coloidal (sistema micelar) onde o fármaco encontra-se solubilizado em desoxicolato de sódio, um sal biliar com características de tensoativo. Este medicamento apresenta-se na forma de um pó liofilizado para reconstituição administrado via intravenosa. A eficácia clínica do Fungizon[®] é limitada pela toxicidade e efeitos adversos já conhecidos da AmB que se desenvolvem após várias semanas de tratamento (ROSOFF, 1996; HARTSEL et al., 2001; MORENO et al., 2001; FUKUI et al., 2003). A via de administração mais utilizada atualmente é a parenteral, visando efeito sistêmico. No fungizon[®], a AmB se dissocia rapidamente após administração tornando-se extensivamente ligada às lipoproteínas plasmáticas. Essa ligação pode ser responsável pelo acúmulo do fármaco nos rins. A capacidade das formulações lipídicas em reduzir a toxicidade pode ser devida à capacidade em minimizar a exposição renal do fármaco, pela diminuição de sua liberação às lipoproteínas (BEKERSKY et al., 1999).

Além de concentração flutuante na corrente sanguínea, problemas como baixa aceitação de pacientes e altos custos têm sido observados, conduzindo à necessidade do estudo de novas formulações para administração oral do fármaco. O maior desafio é o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas que não alterem a atividade antifúngica do antibiótico, mas que reduzam os efeitos adversos e apresentem viabilidade econômica.

O uso das tecnologias de liberação de fármacos tem recentemente alcançado sucesso no aumento do índice terapêutico (razão entre dose terapêutica e toxicidade) desse valioso fármaco, oferecendo novas opções clínicas para segurança e maior efetividade no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (BEKERSKY et al., 1999).

Algumas formas farmacêuticas baseadas em lipídios com diferenças em sua estrutura e conteúdo de fármaco existem no mercado (HILLERY, 1997; KULBERG et al, 1999).

A composição dos carreadores lipídicos deve permitir que as moléculas de AmB permaneçam ligadas ao carreador e fiquem então indisponíveis para interagirem com as células humanas e exercerem seus efeitos tóxicos. Para isso os carreadores lipídicos devem permanecer na circulação. Um balanço de afinidades é necessário, entre as moléculas de AmB e o colesterol nas membranas das células humanas; os lipídios do carreador e o ergosterol na membrana (HILLERY, 1997).

Associação com esses carreadores facilita a captura desses sistemas pelo sistema reticuloendotelial. Direcionamento passivo ocorre para órgãos como fígado, pulmão e medula óssea e altas concentrações então são encontradas nesses locais, maiores sítios de infecção fúngica (HILLERY, 1997). Essa alta captação tem sido atribuída a danos nos capilares de vários órgãos e a liberação de fármacos para o sítio infectado através de monócitos circulantes e macrófagos, os quais têm a capacidade de fagocitar as vesículas

lipídicas contendo AmB na circulação, bem como a tendência para migrar até o sítio infectado (ARAÚJO, 2005).

Alteração nos perfis farmacocinéticos pode também servir para desviar o fármaco de outros tecidos tais como o rim, e finalmente após alcançar a seletiva transferência do carreador lipídico para o local da infecção envolvendo mínima interação com as membranas das células humanas, a AmB pode, preferencialmente, acumular nos fungos devido a forte interação com ergosterol (HILLERY, 1997).

Várias estratégias estão sendo desenvolvidas para vencer essas desvantagens do Fungizon[®]. Como resultado, novos sistemas de liberação desenvolvidos já estão no mercado, com redução dos efeitos adversos. Podemos destacar a forma lipossomal de AmB (Ambisome[®]), um complexo com sulfato de colesterol (Amphocil[®] e Amphotec[®]) e outro complexo lipídico (Abelcet[®]) (FUKUI et al., 2003).

Risovic et al., 2003 relatou a hipótese de que a incorporação de AmB em formulações lipídicas teria maior impacto na segurança desse fármaco pela alteração da distribuição do fármaco nos tecidos.

2.3. MICROEMULSÕES

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos tem sido muito relevante no sentido de estabelecer alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes e com efeitos colaterais minimizados, a partir dos fármacos já existentes (CERA, 2001).

Estudos mostram que a forma farmacêutica em que são veiculados os fármacos é de grande importância e tem responsabilidade direta pelos efeitos terapêuticos dos medicamentos, em razão de poderem modificar favoravelmente ou não, a biodisponibilidade dos mesmos (GIBALDI et al., 1970; ATTWOOD et al., 1983).

A interação de fármacos com novos sistemas de liberação como micelas, microemulsões, β -ciclodextrinas (β -CD), lipossomas, micro e nanopartículas, entre outros é importante alvo de estudo na área farmacêutica, pois esses sistemas podem veicular fármacos com o objetivo de modificar solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade, diminuição de toxicidade, possibilidade de incorporação de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, além da capacidade de agir como sistemas reservatórios desses compostos (DALMORA et al., 2001; GABBOUN et al., 2001).

Atualmente, há um direcionamento para formas farmacêuticas de liberação de fármacos como MEs e subemulsões (SEs), pois esses sistemas podem aumentar a adesão de pacientes em relação à via parenteral, além de proporcionar uma farmacocinética mais adequada (KAYSER et al., 2003).

MEs (figura 5) podem ser definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (OLIVEIRA et al, 2004).

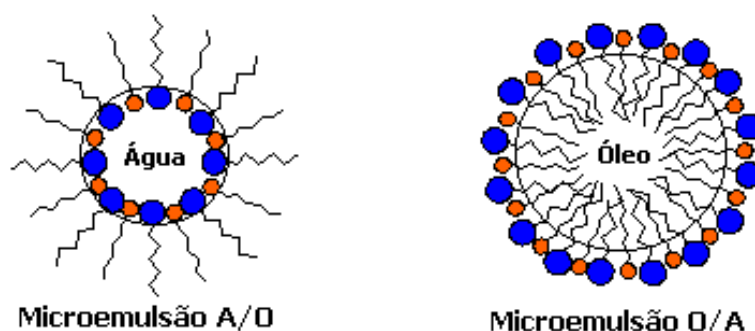


Figura 5: Estrutura de uma microemulsão

(MOLLET et al., 2001)

As MEs permitem administração por vias diversas como parenteral, ocular, percutânea, pulmonar, intravaginal e oral (SOLANS e KUNIEDA, 1997) e

freqüentemente apresentam grande capacidade solvente para fármacos, tornando-as formulações mais atrativas na área farmacêutica além de oferecerem vários benefícios para administração oral, incluindo aumento na absorção, maior potência terapêutica e redução da toxicidade (TROTTA et al., 1999). Os sistemas O/A tem sido descritos na literatura como sistemas reservatórios, os quais podem prolongar a liberação de fármacos, aumentando o tempo de ação farmacológica, conferindo dessa forma efeito prolongado, por via tópica ou oral (MARTINI et al., 1984; GASCO et al., 1989; PATTARINO et al., 1993; DALMORA & OLIVEIRA, 2001). MEs foram propostas para a liberação oral de fármacos, tais como esteróides, hormônios, diuréticos e antibióticos (KOVARIK, 1994; HO et al., 1996).

Segundo alguns autores, para alguns fármacos peptídeos administrados por via oral, MEs promoveram um aumento de até 30% na absorção (CONSTANTINIDES et al., 1996).

O mecanismo pode estar relacionado com o aumento na permeabilidade da membrana causada pela inclusão de tensoativos na ME. A composição da ME também é fator predominante no perfil de absorção de fármacos (CONSTANTINIDES et al., 1995).

Dessa forma as potencialidades das MEs em aumentar a absorção de substâncias no trato gastrointestinal, conferir proteção de substâncias contra o meio, possibilitar vetorização, contribuir para maior adesão de pacientes, pela facilidade de administração, garantir facilidade de produção, fazem desse sistema uma importante alternativa a ser explorada também na liberação por via oral.

Na prática, as diferenças importantes entre emulsões (EM) e microemulsões (MEs) são que as primeiras podem exibir excelente estabilidade física, são fundamentalmente instáveis termodinamicamente e eventualmente separam as fases. Outra importante

diferença diz respeito à aparência; EMs são opacas enquanto MEs transparentes ou semi-transparentes (LAWRENCE et al., 2000).

A literatura denomina sistemas semi-transparentes de miniemulsões ou subemulsões como sendo emulsões com tamanho de gotículas em escala nanométrica (20 a 200nm) finamente dispersas com longo tempo de estabilidade contra sedimentação ou cremeação quando comparado à emulsões. Podem ser chamadas de emulsões ultrafinas ou emulsões submicrônicas. (LAMAALLAN, et al, 2005, SOLANS et al., 2005).

As duas questões fundamentais quando se trata de microemulsões são as relacionadas aos seus prováveis mecanismos de formação e sua estabilidade termodinâmica em comparação a emulsões convencionais (ou macroemulsão). Uma macroemulsão coalesce e chega a se separar em fases aquosa e oleosa devido à sua falta de estabilidade termodinâmica. Apesar disso, as emulsões podem exibir estabilidade a longo prazo, para algumas finalidades, sendo este comportamento referido como estabilidade cinética. Isso ocorre porque o sistema apresenta uma alta barreira de energia para a coalescência entre as gotículas. A estabilização de microemulsões requer baixa solubilidade de tensoativo nas fases aquosa e oleosa, resultando na adsorção do tensoativo na interface óleo-água para provocar abaixamento da tensão interfacial (WASAN,1998).

Elas apresentam grande área interfacial devido ao tamanho diminuto de gotículas que possuem, levando a um aumento da energia livre (OLIVEIRA, 1997; LAWRENCE et al., 2000; OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2004). Para a estabilização desses sistemas, é necessária a diminuição da tensão interfacial para a neutralização dessa energia livre (LAWRENCE et al., 2000; OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2004).

Durante a emulsificação ocorrem vários processos, dentre eles, “quebra em gotículas”, adsorção de tensoativos e colisão de gotículas. Cada um desses processos

ocorre numerosas vezes durante a emulsificação e o tempo necessário para cada processo é muito curto, tipicamente microsegundos. Isso mostra que o processo de emulsificação é um processo dinâmico e os eventos que ocorrem em microsegundos podem ser muito importantes. Para entender e descrever o processo de emulsificação ao menos dois fatores devem ser considerados: hidrodinâmica e ciência interfacial (TADROS et al., 2004).

As MEs são sistemas reservatórios, nos quais a fase interna constitui um microambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades (CERA, 2002; WARGAFTIG, 2001). A principal característica do sistema é formar espontaneamente a fase interna por homogeneização suave dos componentes da fórmula. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, podendo ser utilizada por tempo muito mais amplo (OLIVEIRA et al., 2004; CONSTANTINIDES, 1995; DALMORA et al., 1999).

Alguns fatores, tais como aumento de absorção de substâncias no trato gastrointestinal, capacidade de conferir proteção de substâncias contra o meio biológico, possibilitar vetorização, contribuir para a maior adesão de pacientes ao tratamento, facilidade de administração e produção, e a geração de produtos de alta estabilidade, tornam esse sistema um importante alvo de estudo oferecendo contribuição em potencial na liberação oral de fármacos (SOLANS e KUNIEDA, 1997).

Medicamentos desenvolvidos no campo das MEs têm permitido a ampliação das possibilidades terapêuticas de fármacos potencialmente tóxicos como quimioterápicos antineoplásicos, com a conseqüente redução dos efeitos tóxicos severos desses fármacos (OLIVEIRA et al., 2004).

Nos sistemas microemulsionados, o objetivo principal é obter uma combinação crítica entre os componentes, de modo a conseguir uma “solubilização” máxima da fase

interna. Existem certas vantagens no uso das MEs como sistemas de liberação de fármacos, incluindo o fato de que os fármacos são imediatamente absorvidos e, na maioria dos casos, de forma mais rápida e eficiente do que a mesma quantidade de fármaco administrado em comprimidos ou em cápsulas (CONSTANTINIDES, 1995).

Para a preparação de MEs é necessário conhecer as características dos tensoativos utilizados, assim como suas propriedades e avaliar quais tensoativos são mais adequados para determinadas aplicações (CONSTANTINIDES, 1995).

O tensoativo pode ser puro, uma mistura ou uma combinação com outros componentes, cuja função é a estabilização da ME pela redução da tensão interfacial (CRUZ et al., 2001).

A estabilidade de sistemas emulsionados depende intrinsecamente da interação interfásica estabelecida pelo agente emulsivo, entre as fases imiscíveis que as constituem.

A escolha, proporção e a característica do tensoativo a ser utilizado na preparação almejada são previstos por meio da verificação do EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) das substâncias o que permite predizer o tipo de comportamento esperado do composto frente a substâncias polares e apolares (ZANIN et al., 2002). O sistema EHL para seleção de tensoativos adequados para estabilizar emulsões tem sido utilizado por décadas. Analisa a mistura de tensoativos não iônicos hidrofílicos e lipofílicos, concluindo que o valor de EHL é uma função da porcentagem em peso da porção hidrofílica de moléculas de tensoativos não iônicos para determinação do tensoativo ou mistura de tensoativos a serem utilizados (AL SABAGH, 2002).

Pesquisadores concluíram ainda que esse conceito depende do balanço de tensoativos na interface óleo/água, e depende ainda da natureza da fase oleosa e de outros constituintes nas fases aquosa e oleosa (AL SABAGH, 2002).

Tensoativos podem associar-se na presença de excesso de água produzindo vários tipos de agregados supramoleculares tais como microemulsões O/A, A/O, estruturas bicontínuas onde a quantidade de água e óleo, são praticamente iguais, e estruturas lamelares, onde existe grande quantidade de tensoativos. Há também as estruturas conhecidas por apresentarem uma fase hexagonal, lamelar e uma fase cristalina que pode ser constituída de gotículas O/A ou A/O, sendo que existe um equilíbrio entre elas em função dos tensoativos e da natureza do óleo (ISRAELACHVILI, 1985; FENDLER, 1982; SIROTTI, 2002). As MEs O/A ou A/O podem ser invertidas variando as condições de emulsificação. As estruturas bicontínuas se formam provavelmente nesse processo de inversão de fases (LAWRENCE et al., 2000).

A relação entre o comportamento de fase de uma mistura e sua composição pode ser observada com a construção de um diagrama de fases, que compreende óleo; água e tensoativo e no caso de MEs, um co-tensoativo, no qual cada ápice representa 100% de cada componente em particular. Aquecimento e sonicação são freqüentemente utilizados, particularmente em sistemas contendo tensoativos não-iônicos, para acelerar o processo.

Para descrever o equilíbrio entre emulsões, Winsor em 1948 caracterizou alguns sistemas a seguir:

- ✓ Winsor I: Há equilíbrio entre a fase ME e excesso de óleo
- ✓ Winsor II: Há equilíbrio entre a fase ME e excesso de fase aquosa
- ✓ Winsor III: três fases em equilíbrio (O, A e ME)
- ✓ Winsor IV: Há apenas a fase ME que pode ser chamado de sistema pseudomonofásico.

Para aumentar o domínio da existência da região de microemulsão, um quarto componente que atua como co-solvente para ambos, água e óleo é freqüentemente

adicionado. Geralmente co-solventes hidrofílicos são mais indicados para produzir uma grande região isotrópica e opticamente clara (TROTTA et al., 1999).

Atualmente, a incorporação de co-tensoativos se justifica pelo expressivo aumento da extensão da região isotrópica da solução, especialmente naquelas em que se tem tensoativos iônicos. Uma possível explicação para isso é que o co-tensoativo interage com a cauda apolar do tensoativo, possibilitando a formação de uma curvatura adequada da interface que separa a fase oleosa da fase aquosa. Essa curvatura se dá pela fluidez interfacial por penetrar no filme do tensoativo e ocupar lacunas existentes entre suas moléculas (THEVENIN et al., 1996). Além de aumentar a extensão da região de microemulsão, a quantidade e tamanho do co-tensoativo tem influência significativa na estrutura da microemulsão (OLLA et al., 1999). A adição de um co-tensoativo apropriado pode causar um maior abaixamento da tensão interfacial podendo conduzir a valores transientes negativos, no qual a interface se expande para formar gotículas dispersas, e subsequente mente adsorver mais tensoativo e co-tensoativo até um ponto em que a tensão interfacial se torna positiva outra vez. Este processo, denominado emulsificação espontânea, forma as microemulsões.

Outro parâmetro utilizado para racionalizar o comportamento de tensoativos é o empacotamento crítico. O parâmetro de empacotamento crítico (CPP) relata a habilidade em formar agregados particulares, referindo-se à geometria da molécula e a tendência à formação de micelas ou micelas reversas. Considera-se que $CPP > 1$ determinam o favorecimento do tensoativo à formação de micelas reversas enquanto $CPP < 1$ levariam à tendência de formação de micelas ou bicamadas (ISRAELACHVILI et al., 1976; ISRAELACHVILI, 1985; HYDE et al., 1997).

Recentemente, o desenvolvimento de formas farmacêuticas, tem focado o uso de lecitina e alguns estudos recentes têm mostrado que MEs contendo triglicerídeos como

veículos, podem ser formuladas utilizando lecitina e um co-solvente (TROTTA et al., 1999).

Os fosfolipídeos como a fosfatidilcolina (FS) de soja são muito utilizados. A FS (figura 5) é um tensoativo que possui grande biocompatibilidade, independente da via de administração, e não apresenta problemas com toxicidade, sendo bastante utilizada para medicamentos via oral (ALBOOFAZELI et al., 1994). É um tensoativo natural, e devido a esta característica é rapidamente difundida na interface óleo-água. ME compostas de fosfolipídio tem mostrado melhorar as lesões gástricas induzidas por fármacos antiinflamatórios não esteroidais (LEYK et al., 1985; CRUZ et al., 2001).

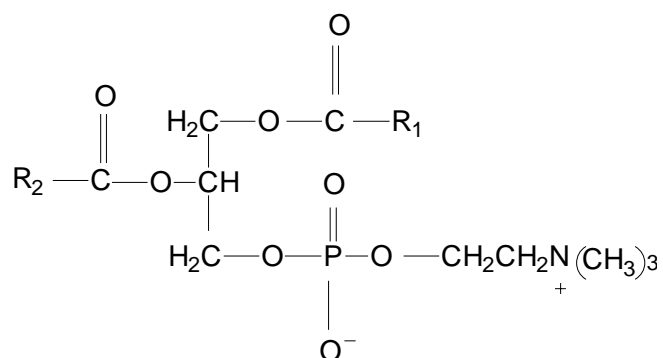


Figura 6: estrutura química da fosfatidilcolina de soja

R¹ e R² são ácidos graxos idênticos ou diferentes

Sua categoria funcional é emoliente, agente emulsificante e agente solubilizante. A fosfatidilcolina (FS) apresenta cadeia fortemente hidrofóbica em sua composição, devido às duas longas cadeias de hidrocarbonetos e apresenta também características hidrofílicas devido à cabeça de grupos zwitteriônicos polares, os quais têm momentos dipolo. A FS é muito lipofílica para formar espontaneamente a camada lipídica de tensão interfacial zero necessária para a formação de microemulsões. Um co-tensoativo, tal como álcoois de cadeia curta são necessários para formar sistemas microemulsionados (PARK et al., 1999).

As lecitinas podem apresentar várias colorações desde marrom a amarelo claro dependendo do grau de pureza. Quando expostas ao ar sofrem oxidação, resultando em uma coloração amarela escura ou marrom. São praticamente inodoras. O EHL situa-se na faixa de 3-4 e o índice de saponificação é igual a 196. Decompõem-se em valores extremos de pH, são higroscópicas e estão sujeitas à degradação microbiana, são biocompatíveis, não apresentam toxicidade, portanto podem ser utilizadas como adjuvantes farmacotécnicos em comprimidos, preparações oftálmicas, vaginal e retal, suspensões, cápsulas, injeções intravenosa e intramuscular e preparações de uso inalatório (KIBBE, 2000).

Por outro lado, MEs contendo em sua formulação apenas FS (EHL próximo de 4) como tensoativo, não mostram capacidade para produzir sistemas isotrópicos de água e óleo em uma vasta faixa de concentrações, tornando-as muito viscosas, pois apresentam dificuldade em absorver fase aquosa (TROTTA et al., 1999). Nesse sentido, tensoativos não iônicos com alto valor de EHL com propriedades solubilizantes têm sido estudados com o objetivo de aumentar a incorporação de água e proporcionar região mais ampla no diagrama de fases.

Nos últimos anos, os polímeros anfifílicos têm sido muito utilizados como tensoativos. São moléculas grandes que podem ser combinadas covalentemente ou não com fármacos para vencer problemas como a baixa solubilidade e estabilidade.

Podem combinar-se com vários vetores para direcionar fármacos para sítios específicos no corpo, e ainda são ideais para desenvolver sistemas que permitam liberação sustentada e controlada do fármaco para o sítio de ação.

Possuem ainda capacidade de interagir ou modificar a atividade de vários sistemas endógenos transportadores de fármacos afetando então a liberação (ALEXANDRIDIS E HATTON, 1995; HAFETI et al., 2000; KABANOV et al., 2002).

Entre eles destacam-se os poloxamers. São constituídos de polioxietileno/polioxipropileno/polioxietileno (POE/POP/POE) que diferem entre si pelo número de óxidos de etileno e propileno que possuem em sua cadeia e que podem ser alterados modificando sua estrutura físico-química. O Poloxamer 407, também conhecido como pluronic F-127[®] (PLU) (figura 6), é um co-polímero não iônico com propriedades tensoativas que apresenta um valor de EHL que varia de 18 a 23, é solúvel em água e não tóxico, que apresenta aproximadamente 70% de óxido de etileno e 30% de óxido de propileno e com massa molar aproximada de 12500.

Quando em baixas temperaturas, a solução polimérica contendo o fármaco a ser liberado, se apresenta na forma líquida podendo até ser administrada parenteralmente, ao passo que a temperaturas mais elevadas e em certas concentrações, o polímero em solução forma micelas com a porção relativamente hidrofóbica (óxido de propileno) formando um núcleo que é circundado em ambos os lados por uma porção hidrofílica (óxido de etileno).

A formação de uma fase aquosa e outra microfase micelar permite que fármacos hidrofóbicos sejam solubilizados em concentrações maiores do que ocorreriam em soluções aquosas puras (ANDERSON et al., 2001).

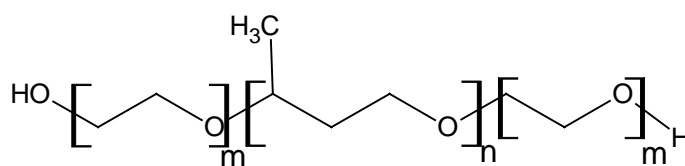


Figura 7: Estrutura química do Pluronic F-127[®]

Como MEs são sistemas com propriedade de direcionamento de fármacos, em se tratando de infecções fúngicas tendo como alvo esteróis da membrana fúngica, o colesterol

pode ser utilizado. Imagina-se que o mesmo pode ser útil na formulação pela afinidade pela membrana do fungo e colaborar para a ligação AmB-fungo.

O colesterol é um material estável de origem vegetal, não irritante, não confere toxicidade quando empregado como excipiente. É utilizado como emoliente e emulsificante e pode ser utilizado para preparações injetáveis, oftálmicas, tópicas e vaginais. É solúvel em acetona, óleos vegetais, benzeno, clorofórmio, éter. Pouco solúvel em etanol e metanol e praticamente insolúvel em água (KIBBE, 2000).

Há estudos que relatam uma forte interação do CO com os fosfolipídeos das membranas, apresentando grande importância do ponto de vista biológico. O CO é um importante fator no controle das propriedades das membranas das células e suas funções, formando complexos com diferentes estequiometrias. Vesículas tais como lipossomas compostos por lecitina na presença de CO mostraram diminuição na permeabilidade de algumas substâncias assim como na difusão lateral (BRZOZOWSKA et al, 2002, DYNAROWICZ et al, 2004).

A estrutura, dinâmica e comportamento de transporte de sistemas microemulsionados são fisicoquimicamente únicos e necessitam de exploração para entendimento de sua formação, estados de agregação, interação interna e estabilidade com referências em seus prováveis usos. A elucidação da estrutura interna de MEs, embora importante pode ser bastante complexa (MOULIK e PAUL, 1998). Existem técnicas, já descritas na literatura, para a caracterização de sistemas microemulsionados. Para o estudo de sistemas coloidais, é de suma importância o estudo das características reológicas de um sistema. São propriedades a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação da forma farmacêutica.

A reologia estuda as propriedades de escoamento e deformação da matéria sob a ação de forças, e relata as relações entre tensão e deformação, força tangencial aplicada ao

material e alteração relativa no comprimento do material sob ação dessa força, respectivamente. O estudo reológico encontra aplicação nos mais diversos setores. Cada categoria de produtos deve apresentar um comportamento reológico adequado à aplicação, sendo conveniente conhecer as velocidades de deformação das operações a que estarão sujeitos.

Para descrever o tipo de comportamento, os fluidos são classificados em dois grupos: Fluidos Newtonianos e Fluidos não Newtonianos. Os parâmetros que levam à caracterização de fluidos tempo-dependentes ou independentes são analisados pelas curvas ascendentes e descendentes dos reogramas.

Quando as curvas se sobrepõem, o sistema é caracterizado como tempo-independente e indica que apresenta uma reconstrução rápida da sua estrutura. Quando a curva ascendente indica valores maiores que os da curva descendente, o sistema é chamado não Newtoniano apresentando características de tixotropia, e quando ocorre o contrário, o sistema tem comportamento reopético. A diferença entre as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas ilustra o fenômeno de histerese e sua área indica a energia requerida para a quebra da estrutura do sistema (URBAN, 2004).

Assim como a reologia, a determinação da medida do raio hidrodinâmico das gotículas da fase interna do sistema é indispensável. Com esse dado, pode ser calculado o coeficiente de difusão das gotículas pela equação de Einstein-Stokes. A variação do espalhamento de luz que é causado pelo movimento Browniano das gotículas o que permite realizar esse cálculo. A equação de Einstein-Stokes é dada por:

$$D = kt/6\pi\eta R_h$$

sendo k , a constante de Boltzmann, t é a temperatura absoluta, η é a viscosidade do meio e R_h é o raio hidrodinâmico.

A técnica de espectroscopia de fotocorrelação (**PCS**) é realizada pela passagem de um feixe de raios laser, normalmente He-Ne 532 nm através de determinada amostra, de modo que as gotículas presentes no meio espalhem a luz. A luz espalhada é captada em sinal, que é enviada ao correlator, no qual é realizado o processamento dos dados. Esses dados são enviados a um computador, onde um software realiza os cálculos, fornecendo os valores de tamanho médio e o índice de polidispersidade (FROKJAER et al., NEW, 1990; HASKELL, 1998).

Para colaborar com o estudo estrutural das microemulsões pode-se ser utilizada a técnica de espalhamento de raios-x à baixo ângulo (SAXS) que fornece informações sobre tamanho, forma, quantidade e arranjo dos objetos espalhadores da amostra. Em um sistema diluído, em que as partículas são isoladas umas das outras e não interagem entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$ das diferentes partículas. Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si e o espalhamento medido refletirá sua geometria e o arranjo entre elas. Portanto se as partículas estão correlacionadas, $S(q)$ caracteriza o arranjo e contém todas as informações sobre as interações entre as partículas.

O interesse na utilização da técnica de SAXS na caracterização de sistemas é explicado pelo fato de existir a possibilidade de exploração dos dados na determinação do tamanho médio e da distância entre os objetos espalhadores, como gotículas e micelas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados. Oferece a vantagem de caracterizar materiais que tem distância entre objetos espalhadores além do limite de trabalho da difração de raios-x (GLATTER, 1982; LECOMTE, 1988).

Existem ainda diversas estruturas utilizadas na tecnologia de liberação de fármacos pouco solúveis em água, como lipossomas, dispersões sólidas e ciclodextrinas (CDs). As CDs tem apresentado grande potencial na área farmacêutica apresentando em sua oligossacarídeos cíclicos solúveis em água, contendo de seis a doze unidades de glicose. As unidades de glicose que constituem as CDs encontram-se unidas por ligações do tipo α -1,4 (Figura 7). As CDs possuem uma forma tronco-cônica com uma cavidade hidrófoba (Figura 8) (FERNANDES e VEIGA, 1999).

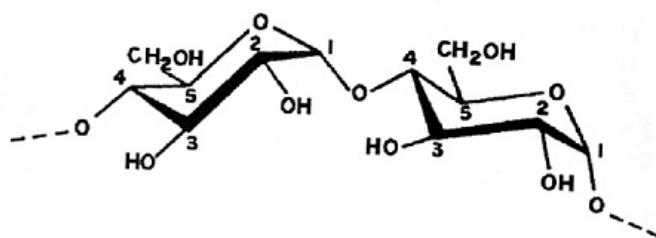


Figura 8: estrutura de uma molécula de ciclodextrina.

(FERNANDES e VEIGA, 1999)

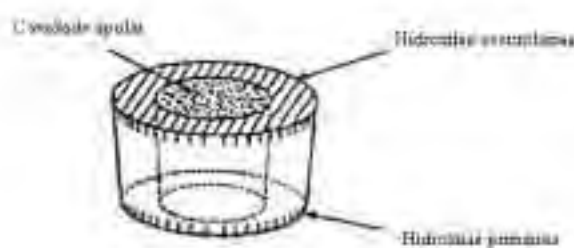


Figura 9: Representação esquemática da estrutura funcional das CDs.

(SZEJTLI, 1990)

Três tipos de CDs são conhecidos: α -CD, que contém 6 unidades de glicopirranose, β -CD com 7 unidades de glicopirranose e γ -CD com 8 unidades de glicopirranose (SZEJTLI, 1982). Devido à estrutura das CDs, estas apresentam a habilidade de formar complexos com compostos sólidos, líquidos e gasosos. Uma das condições para

que ocorra a complexação é que o tamanho da molécula a ser encapsulada deve ser compatível com a cavidade da CD em questão (SZETJTI, 1994).

Fármacos pouco solúveis em água formam complexos de inclusão com as CDs por penetrarem na cavidade hidrofóbica aumentando, deste modo, sua solubilidade (FERNANDES e VEIGA, 1999). Embora as CDs sejam reconhecidas pelo seu potencial em solubilizar e estabilizar fármacos, os níveis de toxicidade renal, quando α e β CDs são administradas via parenteral, limitam seu uso por essa via (RAJEWSKI e STELLA, 1996). Por outro lado, a via oral é a mais importante das vias de administração de fármacos destinados à ação sistêmica (BANKER e ANDERSON, 1986).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- ✓ Desenvolver um sistema terapêutico microemulsionado ou subemulsionado O/A para incorporação de AmB, com o intuito de proporcionar efeito reservatório e redução da toxicidade.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Desenvolver sistemas de subemulsão (SE) e microemulsão (ME), para administração oral AmB, através da associação de Fosfatidilcolina de soja (FS) com tensoativos não iônicos, utilizando o colesterol (CO) e Captex-200(CP-200) como fase oleosa e tampão aquoso Tris-HCl como fase aquosa;
- ✓ Proceder à caracterização físico-química dos sistemas obtidos;
- ✓ Avaliação dos parâmetros de incorporação da AmB na fase interna oleosa contendo CO e CP-200;
- ✓ Avaliação dos parâmetros de inclusão da AmB em ciclodextrinas (CDs)
- ✓ Avaliação dos estados de agregação da AmB quando incorporada em MEs ou CDs.
- ✓ Avaliação da liberação “in vitro” da AmB-ME ou AmB-SE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. MATÉRIAS PRIMAS, REAGENTES, E SOLVENTES

- ✓ Ácido Clorídrico, Synth, Brasil;
- ✓ Água deionizada Milli Q;
- ✓ Álcool etílico comercial, Santa Cruz, Brasil;
- ✓ Anfotericina B, Sigma[®], Paris, França;
- ✓ Clorofórmio, Merck, Darmstadt; Alemanha;
- ✓ Diéster de ácido cáprico e caprílico com propilenoglicol (Captex-200[®]),
Abitec Corporation, Janesville, USA;
- ✓ Colesterol, Sigma-Aldrich, USA;
- ✓ Dimetilsulfóxido, Sigma Chemical Co;
- ✓ Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200), Lucas Meyer, Alemanha;
- ✓ Fosfato de potássio monobásico, Dinâmica, Brasil;
- ✓ Hidróxido de sódio, PA-ACS, Grupo Química Brasil;
- ✓ Álcool metílico J.T. Baker, HPLC;
- ✓ Álcool metílico, Synth, Brasil;
- ✓ Monolaurato de sorbitano etoxilado (Tween 20[®]), Aldrich Chemicals;
- ✓ Polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (Poloxamer[®]), Sigma Chemical Co;
- ✓ Tris (hidroximetil) aminometano, Merck, Darmstadt, Alemanha.

4.1.2. EQUIPAMENTOS, VIDRARIAS E OUTROS

- ✓ Agitador magnético Corning;
- ✓ Agitador Vórtex;
- ✓ Analisador de imagem Leica DMR – Qwin;

- ✓ Analisador de partículas *Light Scattering* – Brookhaven Instruments Corporation, modelo EMI 9863 – fonte de laser He-Ne 10mW, 514 e 532nm – HUGHES; Auto correlator 64 canais, instalado no Depto de Físico-Química, Instituto de Química - UNESP- Araraquara;
- ✓ Balança digital Ohaus;
- ✓ Centrífuga SORVAL, modelo TC;
- ✓ Coluna HPLC Lichospher® Si-60 5µm, Darmstadt, Alemanha;
- ✓ Copos de Becker 5-1000 mL;
- ✓ Cubetas de Quartzo para espectrofotometria, capacidade 5 mL, caminho óptico de 1 cm – Spectrocell;
- ✓ Espectrofotômetro de UV-VIS, Hewlett Packard;
- ✓ Filtros descartáveis para seringas, porosidade 0,22µm, Corning® Incorporated;
- ✓ HPLC, Shimadzu; Bomba – Shimadzu, modelo LC-9^A; Detector espectrofotométrico-UV- VIS-Shimadzu, modelo SPD-6AV; Forno controlador de temperatura da coluna – Shimadzu, modelo CTO-6AV; Integrador – Shimadzu, modelo C-R6A; Sistema controlador – Shimadzu, modelo SCL-6B; Sistema com alça de Injeção de 10µl;
- ✓ Micro seringa de 25µL;
- ✓ Microscópio Leitz DMRXE;
- ✓ Parafilme, Sigma;
- ✓ Peagômetro Quimis;
- ✓ Pipeta de Pasteur;
- ✓ Pipetador automático Gilson capacidade 10-1000 µL;
- ✓ Pipetas graduadas 1,0 a 10 mL;
- ✓ Provetas 500 e 1000 mL;

- ✓ Refratômetro de Abbé, Atago;
- ✓ Sistema de purificação de água MILLIPORE, Milli - Q Plus;
- ✓ Sonicador^R Ultrasonic Liquid Processor modelo XL2020TM ;
- ✓ Sonicador Sonics & materials, Inc, modelo VC 505;
- ✓ Tubos para sonicação;
- ✓ Banho de ultrassom, Branson, modelo 1210;
- ✓ Nefelômetro Del lab-DLA 1000.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNÁRIO PARA O SISTEMA ESTABILIZADO POR FS/PLU.

Partindo-se de misturas de tensoativos FS/PLU 7:3, preparou-se amostras de 2,0 gramas compostas por 10 a 90% da mistura tensoativa (MT). A essa mistura adicionou-se o CO:CP-200 (0,1:9,9) como fase oleosa (FO) em concentrações decrescentes e correspondentes de 90 a 10%. Cada amostra obtida foi titulada com solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como fase aquosa (FA). Após cada titulação a amostra foi sonicada utilizando-se potência 220 Watts, operando em modo descontínuo por 20 min à temperatura ambiente. Após cada sonicação, cada amostra foi centrifugada a 11.180 (x g) por 15 min. para retirada de resíduos de titânio.

De acordo com as proporções dos componentes (fase aquosa, fase oleosa e mistura tensoativa), plotou-se os pontos em que se deu a transição de fases de sistema semi-sólido para sistema líquido transparente, sistema transparente viscoso, sistema opaco líquido ou viscoso ou ainda separação de fases. As regiões foram detectadas visualmente, contra fundo escuro. O diagrama de fase de uma ME corresponde a uma área delimitada contida em um triângulo equilátero, delimitando em que proporção os componentes da ME formam sistemas opticamente transparentes ou translúcidos. Fora desta região obtém-se a formação de emulsões comuns ou separação de fases.

Tabela 1: Combinação entre mistura de tensoativos (MT) e fase oleosa (FO) para determinação do diagrama de fases.

<i>Proporção de FS/PLU</i>	<i>Proporção de mistura de tensoativos / CO e CP-200 (fase oleosa)</i>								
7:3	1:9	2:8	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1

4.2.2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA ESTABILIZADO POR FS/TW-20.

Partindo-se de misturas de FS:TW-20 (3:7) preparou-se amostras de 2,0 gramas, compostas por 10 a 90% de MT e CO:CP-200 (0,1:9,9) como FO em concentrações decrescentes e correspondentes de 90 a 10%. As amostras foram tituladas com tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como fase aquosa (FA) e sonicadas utilizando-se potência 220 Watts, de modo descontínuo por 20 min à temperatura ambiente. Cada amostra foi centrifugada a 11.180 (x g) por 15 min. para retirada de resíduos de titânio.

Os ensaios mais comumente utilizados para a caracterização de MEs e SEs são determinação da viscosidade, e do comportamento reológico, determinação do EHL, determinação do raio hidrodinâmico de partículas por espalhamento de luz (light scattering) e SAXS (espalhamento de raios-X a baixo ângulo) entre outros (LAWRENCE e REES, 2000; CERA, 2001).

4.2.2.1. Caracterização macroscópica

As características macroscópicas foram avaliadas através da observação visual. Fotografias foram realizadas imediatamente e após 15 dias da preparação, à temperatura controlada de 30°C a fim de verificar modificações nas características dos sistemas emulsionados e microemulsionados tais como, coalescência, transição de sistema transparente para semi-transparente ou opaco, estando esses fatores diretamente relacionados à estabilidade.

4.2.2.2. Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo – EHL

O estudo do EHL do sistema pode fornecer informações sobre as proporções adequadas dos tensoativos para formar sistemas opticamente transparentes ou semi-transparentes, os quais apresentam maior estabilidade.

CO e CP-200 foram utilizados como FO nas proporções 0,1:9,9 e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como FA. As amostras foram preparadas utilizando-se 10% de FO, 15% de MT e 75% de FA. O experimento foi realizado titulando-se FA em proporções conhecidas às amostras contendo MT e FO (tabela 2). As amostras foram homogeneizadas, submetidas à sonicação e centrifugação a 11.180 (x g) por 15 min. para a retirada dos resíduos de titânio liberados pela haste do sonificador (ultrassom).

Tabela 2. Variação nas proporções de FS (EHL=4) e TW-20 (EHL= 16,7) e obtenção de valores de EHL obtidos para amostras constituídas de 10% FO, 15% MT e 75% FA.

Amostras	FS (%)	TW 20 (%)	EHL Obtido
1	10	90	15,4
2	20	80	14,2
3	30	70	12,9
4	33,07	66,93	12,5
5	37	63	12,0
6	38,59	61,41	11,8
7	40	60	11,6
8	42,52	57,48	11,3
9	44,89	55,11	11,0
10	50	50	10,4
11	52,75	47,24	10,0
12	54,33	45,67	9,8
13	56,70	43,30	9,5
14	58,26	41,74	9,3
15	60	40	9,1

O EHL das amostras foi calculado segundo a equação:

$$\text{EHL} = \frac{\text{EHL}_{\text{FS}} \times \% \text{FS} + \text{EHL}_{\text{TW-20}} \times \% \text{TW-20}}{100}$$

4.2.2.3. Cinética de crescimento das gotículas através de análise espectrofotométrica

As amostras com valores de EHL; 11,6; 11,3; 11,0; 10,4; 10,0 e 9,8 os quais apresentaram características inerentes a sistemas microemulsionados, tais como transparência ou semi-transparência foram selecionados. As amostras foram preparadas, transferidas para cubetas de quartzo com capacidade de 5mL e 1 cm de caminho óptico, e analisadas por um período de 14 dias por espectrofotometria visível a 410 nm. Os resultados foram registrados através de gráficos relacionando absorvância em função do tempo.

4.3. DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNÁRIO PARA O SISTEMA ESTABILIZADO POR FS/TW-20 EHL 11,0.

Partindo-se de misturas compostas 10 a 90% de (MT) FS:TW-20 4,48:5,52, preparou-se amostras de 2,0 gramas. A essa mistura adicionou-se o CO:CP-200 0,1:9,9 como (FO) em concentrações decrescentes e correspondentes de 90 a 10%. Cada amostra obtida foi titulada com volumes conhecidos de solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como (FA). Após cada titulação a amostra foi sonicada utilizando-se potência 220 Watts, operando em modo descontínuo por 20 min à temperatura ambiente. Após cada sonicação, cada amostra foi centrifugada a 11.180 (x g) por 15 min. para retirada de resíduos de titânio.

De acordo com as proporções dos componentes (FA, FO e MT), plotou-se os pontos em que se deu a transição de fases de sistema semi-sólido para sistema líquido transparente, sistema transparente viscoso, sistema opaco líquido ou viscoso ou ainda separação de fases. As regiões foram detectadas visualmente, contra fundo escuro.

4.4. DETERMINAÇÃO DO RAIOS HIDRODINÂMICO DAS GOTÍCULAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DA AMOSTRA COM VALOR DE EHL 11,0

A análise do tamanho das gotículas da amostra constituída de 10% FO, 15% MT (EHL 11,0) e 75% FA (EHL 10,99), foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (*Light Scattering*), também denominada espectroscopia de fotocorrelação (PCS). É fato conhecido que o coeficiente de difusão das gotículas tende a diminuir quando o raio hidrodinâmico aumenta. Portanto, é necessário realizar diluições das amostras para que a concentração das gotículas não interfira na difusão, uma vez que as mesmas tendem à diluição infinita.

Outros parâmetros importantes a serem considerados são a viscosidade e a temperatura, pois uma variação nesses parâmetros pode causar erro nas medidas de tamanho (FROKJAER et al., 1989; NEW, 1990; ABOOFAZELI et al., 2000).

Foram preparadas 5,0g das amostras selecionadas, seguidas de centrifugação e filtração em membranas de 0,22 μ m CORNING[®]. Volumes de 250 e 500 μ L foram diluídos em 6mL de tampão Tris HCl 0,01M pH 7,2 e submetidos ao analisador de partículas BROOKHAVEN. Os frascos receptores da amostra foram colocados na câmara de análise, de modo que o feixe de laser pudesse atravessar a dispersão em toda sua extensão. A luz espalhada foi captada por um fotomultiplicador posicionado a 90° do feixe de laser que aumentou o sinal captado e o enviou para um sistema correlator, onde os cálculos foram processados e enviados ao computador.

Os parâmetros para a análise foram:

- Temperatura 20°C,
- Comprimento de onda do laser 514nm,
- Índice de refração de acordo com o índice da amostra analisada.

Foram realizadas 10 determinações do diâmetro e índice de polidispersidade das gotículas, com duração de 5 minutos.

4.4.1. Determinação do índice de refração

O índice de refração é uma constante física freqüentemente usada na determinação da identidade e pureza de fármacos (KOROLKOVAS, 1988).

De acordo com os resultados da análise espectrofotométrica, o sistema que apresenta valor de EHL igual a 11,0 foi selecionado. O índice de refração foi determinado em amostras recém preparadas, utilizando-se refratômetro de Abbé, ATAGO, calibrado com água deionizada Milli-Q (índice de refração 1,330), à temperatura de $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$. As determinações foram feitas em triplicata.

4.5. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA FS

Foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando sistema cromatográfico Shimadzu SPD-AV UV-Vis, coluna de sílica (fase normal) com poros de 100 Å, e partículas com 5µm de diâmetro. (ANDREO FILHO et al, 1999). Os parâmetros utilizados estão descritos a seguir:

- ✓ Fase móvel: sistema solvente composto por n-hexano:n-propanol:água na proporção 1:4:1, filtrada em membrana de teflon 0,22µm e degaseificada,
- ✓ Temperatura da coluna: 35°C,
- ✓ Detecção: espectrofotometria no visível em comprimento de onda 206 nm,

- ✓ Vazão da fase móvel: 1 mL/min.
- ✓ Volume da injeção: 20µL,
- ✓ Pressão: 270 bar
- ✓ Velocidade do papel: 5mm/ min.

4.5.1. Curva padrão da FS

A curva padrão foi obtida em concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50µM em solvente n-hexano/n-propanol na proporção 1:4. As determinações foram obtidas em triplicata. As diluições foram obtidas a partir de solução 1mM de FS solubilizada em clorofórmio.

Alíquotas de solução foram transferidas para balão de 10 mL e o volume foi completado com o solvente. A cada diluição agitou-se a mistura e realizou-se a leitura da área do pico.

Foi elaborado um gráfico relacionando a área do pico em função das concentrações de FS. Com os valores experimentais, construiu-se a curva padrão através da seguinte equação:

$$\text{Área do pico} = a \cdot x + b$$

Sendo que:

a = coeficiente angular da reta

b = representa o intercepto da curva em relação ao eixo da Área do pico em λ_{206} ,

x = concentração de fosfatidilcolina de soja.

4.5.2. Quantificação da FS na ME

Foi preparada amostra da microemulsão selecionada com valor de EHL igual a 11,0 composta de FS/TW-20 na proporção 4,48:5,52, CO:CP-200 como fase oleosa na

proporção 0,1:9,9. A amostra foi diluída com o solvente (n-hexano:n-propanol na proporção 1:4) de modo a obter uma concentração de 30 μM de FS.

As amostras foram filtradas e analisadas diariamente em triplicata por CLAE.

Através dos cálculos realizados em função da área sob a curva, foram obtidos valores de concentração em μM e realizada análise para verificar uma possível hidrólise de FS da amostra.

Foi realizado teste estatístico ANOVA para verificar se as variações nos resultados são significativas.

4.6. ANÁLISE REOLÓGICA

O estudo do comportamento reológico foi realizado para as amostras com valores de EHL 9,1; 9,5; 9,8; 10,0; 10,4; 11,0; 11,3; 11,6; 11,8. As medidas foram realizadas em triplicata a 25 e 37°C, em reômetro Carri-med. O reômetro funciona pelo princípio de rotação, nos quais a amostra é cisalhada entre paredes interna e externa do porta-amostra cuja a geometria usual compreende cone e placa. Nessa geometria, a amostra colocada sobre a placa é submetida a sucessivas velocidades de cisalhamento pela ação do movimento de rotação do cone. Dessa forma é possível construir o reograma tensão de cisalhamento (τ) versus velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), a partir dos quais se torna possível o cálculo da viscosidade dinâmica dos materiais. O valor do torque empregado foi estabelecido de modo a obter valor de tensão de cisalhamento superior a zero e fixou-se o limite máximo de velocidade de cisalhamento em 600 1/s.

Utilizou-se para o experimento cone placa de 6cm com duração de 3 min. cada medida. Os resultados foram plotados em gráficos onde foram representadas curvas ascendentes e descendentes e posteriormente analisadas para determinação do tipo de comportamento.

4.7. ESPALHAMENTO DE RAIOS -X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

As amostras com valor de EHL entre 9,1 e 11,6 foram submetidas a essa técnica para o fornecimento de informações sobre tipo de estrutura e distribuição de tamanho dos objetos espalhadores dos sistemas. As características estruturais das amostras que apresentam variação do valor EHL foram analisadas por SAXS.

Os estudos de SAXS foram realizados na linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (Campinas). A linha é equipada com um monocromador ($\lambda = 1.608 \text{ \AA}$), uma câmara de ionização, um detector vertical localizado a cerca de 800 mm da amostra (a distância foi um pouco diferente de acordo com o dia em que a medida foi feita) e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento.

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

Ao irradiar uma amostra bifásica com a forma de uma plaqueta relativamente fina, com um feixe monocromático (luz visível, raios-X, nêutrons, elétrons), pode-se observar o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. No caso dos raios X, o espalhamento deve-se às heterogeneidades na densidade eletrônica do sistema. A dependência angular da intensidade espalhada por uma heterogeneidade está diretamente relacionada à densidade eletrônica através da transformada de Fourier.

Considerando uma partícula de tamanho e forma qualquer, a intensidade espalhada é proporcional ao fator de forma $P(q)$ desta partícula: $I(q) \propto P(q)$.

Em um sistema diluído, onde as partículas são isoladas uma das outras e não interagem entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$

das diferentes partículas. A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que para n partículas distribuídas ao acaso têm-se:

$$I(q) \propto \sum_n P_n(q) \quad (1)$$

Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si; assim o espalhamento dependerá das características geométricas de cada partícula e do arranjo espacial formado pelo conjunto. Nesse caso, a intensidade espalhada por um conjunto com N partículas é escrita da seguinte forma.

$$I(q) = N \cdot P(q) \cdot S(q) \quad (2)$$

sendo, $S(q)$ o fator da estrutura do conjunto. Portanto, se as partículas estão correlacionadas, $S(q)$ caracteriza o arranjo e contém todas as informações sobre as interações entre as partículas. $S(q)$ pode assumir diferentes formas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras. Em muitos casos, a presença de um máximo de espalhamento a baixos ângulos pode ser relacionada com a presença de correlações entre as posições dos centros espalhadores. A uma distância média de correlação, d , entre as partículas vizinhas (ou dois planos paralelos) pode se determinada pelo valor da posição do máximo ($q_{\text{máx}}$), empregando a relação:

$$d = \frac{2\pi}{q_{\text{máx}}} \quad (3)$$

O comportamento assintótico das curvas de SAXS, $I(q)$, para $q \rightarrow \infty$, produzido por um sistema de duas densidades eletrônicas, é dado pela lei de Porod:

$$I(q) = \frac{A}{q^4} + B \quad (4)$$

Sendo que:

A é proporcional à área da interface entre as partículas e a matriz líquida,

B é a contribuição das flutuações da densidade eletrônica na matriz e nas partículas.

No caso particular de agregados com estrutura fractal, a intensidade $I(q)$ é proporcional a q^{-D} , onde D é a dimensão fractal. Esta lei de potência é válida para valores intermediários de q , cuja localização e extensão dependem do tamanho das partículas primárias e de seus agregados.

A Figura 9 apresenta um exemplo de curva de espalhamento obtida a partir de medidas de SAXS, onde é possível se observar diferentes regiões. A região de Porod (altos valores de q) fornece informações sobre a superfície das partículas. A região de Guinier fornece informação sobre o tamanho das partículas (R) maiores ou agregados e a região de q intermediária a respeito da existência e da natureza de estruturas fractais. Na região de Bragg ocorre o fenômeno de difração dos raios-X.

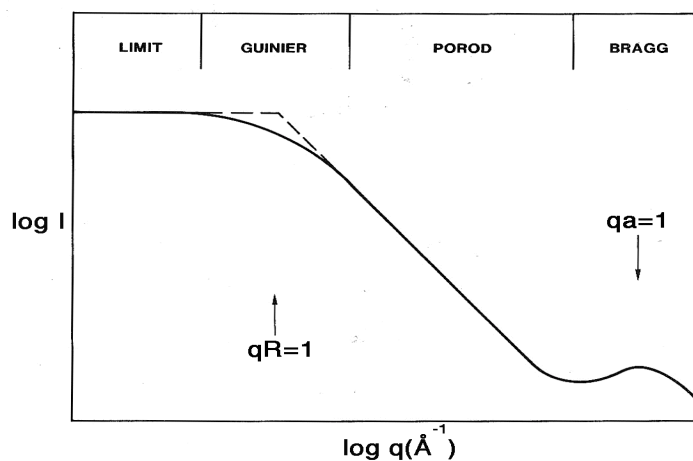


Figura 10: Diagrama esquemático das principais regiões das curvas de SAXS

A intensidade do espalhamento produzida por amostras contendo múltiplos (n) níveis estruturais pode ser descrito por uma equação semi-empírica proposta por Beaucage et al que descreve a tendência assintótica das regiões de Guinier e Porod e leva em consideração os efeitos da correlação:

$$I(q) = \sum_{i=1}^n G_i e^{-\frac{q^2 R_{gi}^2}{3}} + B_i e^{-\frac{q^2 R_{g(i-1)}^2}{3}} \cdot \left[\frac{\left[\text{erf} \left(q R_{gi} / \sqrt{6} \right) \right]^3}{q} \right]^{P_i} S_i(q) \quad (6)$$

onde R_g é o raio de giro do objeto espalhador e os parâmetros G , B e P dependem da densidade eletrônica, tamanho e forma dos objetos, respectivamente.

A função de estrutura $S(q)$ para nano-objetos esféricos, onde a correlação resulta da interação entre esferas duras é dada por:

$$S(q) = 1 / (1 + k \theta) \quad (7)$$

sendo $k = 8V/V_0$, o fator de empacotamento ou compactidade, onde V é o volume médio disponível para cada esfera e V_0 é o volume médio efetivamente ocupado por cada esfera.

O fator θ depende da distância média de correlação entre esferas (d), sendo: $\theta = 3[\text{sen}(qd) - qd \cos(qd)] / (qd)^3$.

A utilização da equação proposta por Beaucage et al para simular as curvas experimentais permite estimar parâmetros estruturais tais como raio das partículas de menor e de maior tamanhos, a distância de correlação entre elas (quando há correlação) e o grau de empacotamento dessas partículas para diferentes sistemas, dentre eles, microemulsões e suspensões de nanopartículas.

O interesse na utilização da técnica de SAXS na caracterização de sistemas é explicado pelo fato de existir a possibilidade de exploração dos dados na determinação do tamanho médio e da distância entre os objetos espalhadores, como gotículas e micelas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados. Oferece a vantagem de caracterizar materiais que tem distância entre objetos espalhadores além do limite de trabalho da difração de raios-x (GLATTER, 1982; LECOMTE, 1988).

É uma técnica permite caracterizar partículas entre 10 e 1000Å. Assim sendo, permite caracterizar uma grande variedade de amostras como vidros, colóides e proteínas (WILLIAMS, et al., 1993).

4.8. COMPLEXAÇÃO DA AmB COM β-CICLODEXTRINA (β-CD) E HIDROXIPROPIL- β-CICLODEXTRINA (HPβ-CD).

Foi preparada uma solução contendo 5×10^{-4} M de AmB em dimetilsulfóxido (DMSO) (TABOSA DO EGITO et al, 1996; VANDERMEULEN, et al, 2006). A solução foi convenientemente diluída em tampão fosfato 50mM pH 7,4 de modo a obter solução 5×10^{-6} M) e analisada por espectrofotometria visível; utilizando cubeta de quartzo com 1cm de caminho óptico a 25 °C em 406nm, utilizando como branco o tampão fosfato 50 mM pH 7,4 (TABOSA DO EGITO et al, 1996)

Em seguida, foram preparadas soluções de β-CD 13mM e HPβ-CD 100mM em tampão fosfato 50mM pH 7,4. A partir da solução mãe (5×10^{-4} M) foram preparadas amostras de AmB 5×10^{-6} M em β-CD e HPβ-CD. Foram realizadas análises espectrofotométricas em condições idênticas à análise anterior, utilizando como branco β-CD e HPβ-CD sem o fármaco respectivamente.

O espectro de absorção da AmB em tampão fosfato 50mM pH 7,4 obtido foi comparado com os obtidos com β-CD e HPβ-CD para a análise de possível complexação do fármaco com as ciclodextrinas, através de deslocamento dos picos obtidos.

O mesmo experimento foi realizado preparando-se amostras de AmB 5×10^{-5} M em tampão fosfato 50mM pH 7,4, β-CD e HPβ-CD a partir da solução mãe 5×10^{-4} M. Os espectros foram comparados para a análise de possível complexação do fármaco com as ciclodextrinas, através de deslocamento dos picos obtidos.

4.9. INCORPORAÇÃO DA AmB NA ME COM EHL 11,0

A ME selecionada contendo FS:TW-20 como MT (4,48:5,52), CO:CP-200 como FO (0,1:9,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA foi preparada. Alíquota da solução mãe contendo 5×10^{-4} M de AmB em DMSO foi incorporada na ME para alcançar uma concentração de 5×10^{-6} M. O mesmo procedimento foi realizado para alcançar uma concentração de 5×10^{-5} M de AmB. Análise por espectrofotometria foi realizada a 406nm utilizando cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico. ME sem o fármaco foi utilizada como branco. Comparação dos espectros foi realizada para a análise de possível ligação do fármaco com gotículas da fase interna da ME e possível formação de formas monoméricas do fármaco, através de deslocamento dos picos obtidos.

4.10. INCORPORAÇÃO DE AmB EM COMPLEXO ME/ β CD

Foi realizado ensaio com a incorporação do fármaco nos dois sistemas (ME e β -CD) simultaneamente. Foi preparada uma amostra de AmB em β -CD 13mM. Alíquota dessa solução foi incorporada na ME para alcançar uma concentração de 5×10^{-6} M.

AmB foi solubilizada em DMSO na concentração 5×10^{-4} M. Alíquota dessa solução foi transferida para uma solução aquosa de β -CD 13mM para se obter uma concentração 5×10^{-5} M.

Uma amostra de ME contendo FS:TW-20 como MT (4,48:5,52), CO:CP-200 como FO (0,1:9,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA foi preparada e à ela foi incorporado volume devidamente mensurado do complexo AmB/ β -CD. Dessa forma foi obtida uma amostra contendo ME/ β -CD/AmB 5×10^{-6} M.

Análise por espectrofotometria VIS foi realizada a 406nm utilizando cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico. ME/ β -CD sem o fármaco foi utilizada como branco.

4.11. ANÁLISE DA TURBIDEZ DAS MEs CONTENDO AmB POR NEFELOMETRIA.

A nefelometria é um método analítico baseado no fenômeno de espalhamento da radiação por partículas em suspensão, que mede a intensidade da radiação espalhada em ângulo reto ao feixe incidente (NIELSEN, 1993).

Essa técnica consiste na medida da turbidez frente a padrões compreendidos entre valores nas faixas de 0 - 10, 10 - 100 e 100 a 1000 NTU que se caracterizam pelo aumento da turbidez respectivamente. AmB foi incorporada na ME nas concentrações 5×10^{-6} e 5×10^{-5} M e as amostras foram submetidas à radiação. Os valores obtidos foram comparados aos valores dos padrões e um gráfico foi plotado relacionando as concentrações das amostras e a turbidez. Foi utilizado nefelômetro Del lab-DLA 1000, com radiação policromática emitida por filamento de tungstênio automatizado.

4.12. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DAS SEs E MEs.

A determinação foi realizada utilizando pipetas volumétricas de 2mL limpas e secas. As pipetas vazias foram pesadas em balança analítica obtendo assim valores m_1 . Posteriormente as pipetas foram cuidadosamente preenchidas com as amostras e pesadas novamente obtendo assim valores m_2 . As densidades forma calculadas através da equação:

$$d = \frac{m_2 - m_1}{V}$$

4.13. DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE AmB NAS MEs e SEs

4.13.1. Preparo das MEs e SEs para incorporação de AmB

O preparo das MEs foi realizado variando-se a FO nas proporções 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 20%, mantendo constante em 15% a proporção da MT e variando-se a FA. Foram utilizados FS:TW-20 4,48:5,52 como MT e CO:CP-200 na proporção 0,1:9,9 como FO. Em seguida titulou-se com tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA. A mistura foi sonicada utilizando-se a potência de 220Watts, operando em modo descontínuo por 20 min. à temperatura ambiente. As amostras foram preparadas em triplicata.

4.13.2. Curva padrão da AmB em metanol

A curva padrão da AmB em metanol foi obtida utilizando diluições preparadas a partir de solução de 100µg/mL em DMSO/Metanol. Alíquotas da solução foram transferidas para balão de 5,0 mL e o volume foi completado com metanol.

A cada diluição a mistura foi agitada e em seguida foram realizadas as leituras por espectrofotometria em 406nm. O experimento foi realizado em triplicata e em seguida foi elaborado um gráfico relacionando os valores de absorbância em função da concentração de AmB.

4.13.3. Determinação da solubilidade da AmB nas MEs e SEs em função do volume de fase oleosa.

Após o preparo das amostras, 3mL foram transferidas para um tubo de sonicação e acrescidas de AmB em excesso até ser observado a formação de precipitado. As amostras foram submetidas à sonicação utilizando a potência de 220Watts, operando em modo descontínuo por 20 min. à temperatura ambiente.

Finalizada a sonicação, as amostras foram centrifugadas (11.180 x g), por 15 min. com o objetivo de eliminar o excesso de fármaco não solubilizado. O sobrenadante foi coletado e cuidadosamente filtrado em membrana millipore de 0,45 µm,.

O filtrado foi solubilizado em metanol e em seguida efetuadas as leituras por espectrofotometria a 406nm.

A partir dos valores de absorbância, calculou-se a concentração da AmB obtida, através da equação da reta:

$$y = a \cdot x + b$$

sendo:

a = coeficiente angular da reta

x = concentração de AmB solubilizada

b = intercepto da curva em relação ao eixo

Foi calculado o volume de fase das amostras e foi elaborado um gráfico relacionando concentração da AmB em função do volume de fase de cada amostra. Para cálculo do volume de fase foi utilizada a equação:

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

sendo:

Φ = volume de fase,

δ = densidade da ME,

w = massa fase aquosa (%).

4.14. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Para avaliar o perfil de liberação da AmB quando incorporada às MEs e SEs, utilizou-se o modelo da célula de difusão *in vitro* em sistema estático do tipo Franz

adaptada ao equipamento de dissolução (Dissolution SRO plus), respectivamente. (URBAN, 2004).



Figura 11: Esquema da célula de difusão adaptada ao dissolution. (a) abertura para coleta de amostra e reposição, (b) entrada do dispositivo para agitação do meio, (c) abertura para colocação do tubo com a membrana (à esquerda) e esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução (à direita) (URBAN, 2004).

Como pode ser observada nas figuras 11 e 12, a célula apresenta uma tampa com três aberturas, sendo uma para coleta e uma para reposição de amostra, outra no centro, para entrada do dispositivo de agitação e a terceira para a colocação do tubo de ensaio com a membrana, o qual é preso por um anel de borracha.

A membrana é fixada no tubo de ensaio através de um anel adaptado que proporciona um diâmetro de 1,98 cm. A área de exposição calculada é de 3,08 cm².

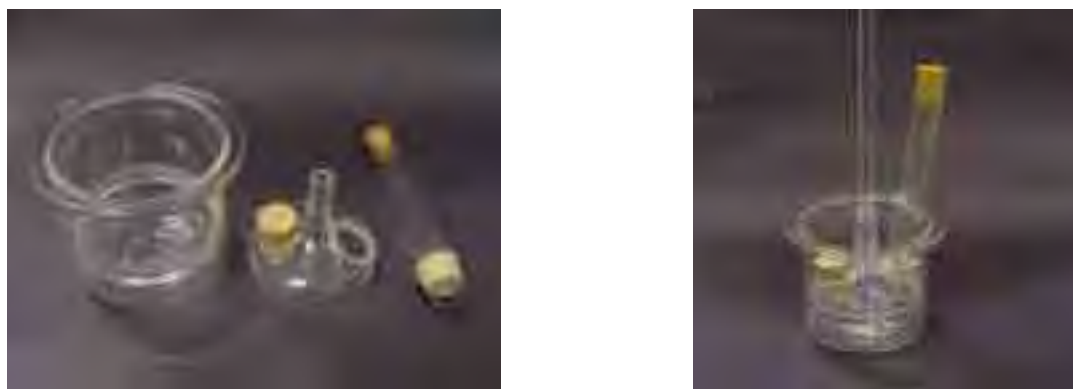


Figura 12: Fotos da célula de difusão utilizada no ensaio de liberação *in vitro*



Figura 13(A): Foto do equipamento de dissolução

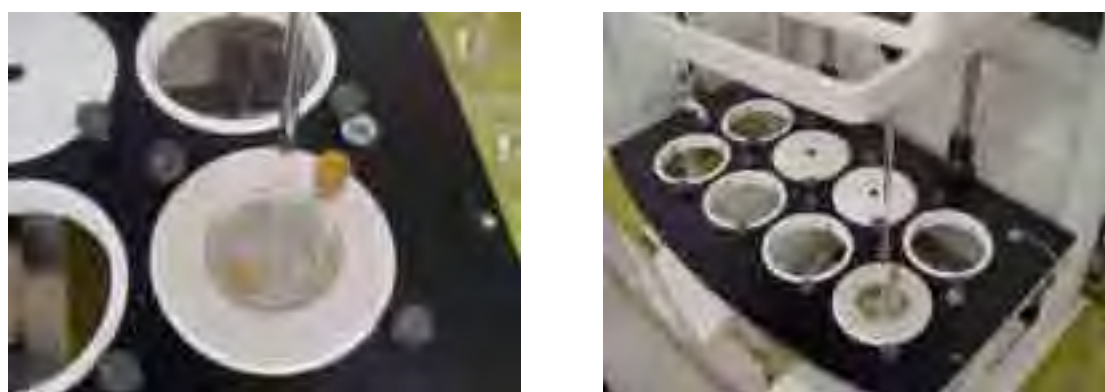


Figura 13(B): Fotos da célula de difusão adaptada ao equipamento.

Foi utilizada como solução receptora 25 mL de tampão fosfato isotônico 50mM pH 7,4 adicionada de laurilsulfato de sódio a 1% para garantir “sink condition”. O experimento foi conduzido a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a solução receptora empregada foi mantida sob constante agitação a $100 \pm 0,2$ rpm. As formulações empregadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Composição das amostras selecionadas para o teste de liberação *in vitro*.

<i>Amostras</i>	<i>FO (%)</i>	<i>MT (%)</i>	<i>FA (%)</i>	<i>[AmB] mg/mL</i>
1	2,5	15	82,5	4,20
2	5	15	80	4,38
3	7,5	15	77,5	4,64
4	10	15	75	4,94
5	12,5	15	72,5	5,2
6	15	15	70	5,45
7	20	15	65	6,62

Amostras da solução receptora foram coletadas em intervalos de 15 minutos nas primeiras horas e respectivamente a cada 30 minutos. Posteriormente à coleta das alíquotas, o volume de meio retirado foi repostado com meio receptor recentemente preparado e em seguida foram realizados os cálculos para correção da diluição. Esse procedimento é imprescindível para manter a “sink condition”.

A quantidade de fármaco liberado foi determinada por espectrofotometria visível a 412 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se modifica progressivamente a composição de uma mistura de solventes imiscíveis, as mudanças que produzirão na dispersão podem ser traduzidas por importantes variações nas propriedades termodinâmicas dos compostos que a compõe (OLIVEIRA et al, 2004). A construção de diagramas de fase pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais as MEs e SEs existem e em que proporções dos componentes outras estruturas podem estar presentes (FORMARIZ, 2004).

Foi elaborado um diagrama de fases (figura 14) para um sistema constituído por FS:PLU como mistura tensoativa (MT) na proporção 7:3, CO:CP-200 como fase oleosa (FO) na proporção 1:9 e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como fase aquosa (FA). A composição dos sistemas obedeceu à relação 1:9 a 9:1 para MT:O.

Pode ser observado o predomínio de sistemas do tipo emulsão viscosa (EV) devido provavelmente às características gelificantes da FS, que possui valor de EHL igual a 4, o que restringe a capacidade do sistema em absorver FA (CORNELL et. Al., 1986; TROTTA 1999; TROTTA et. Al., 2002), aumentando a viscosidade e causando turbidez.

Além desse fato o sistema contém o copolímero PLU que tem a capacidade de aprisionar a FA em sua rede polimérica conferindo também aumento da viscosidade.

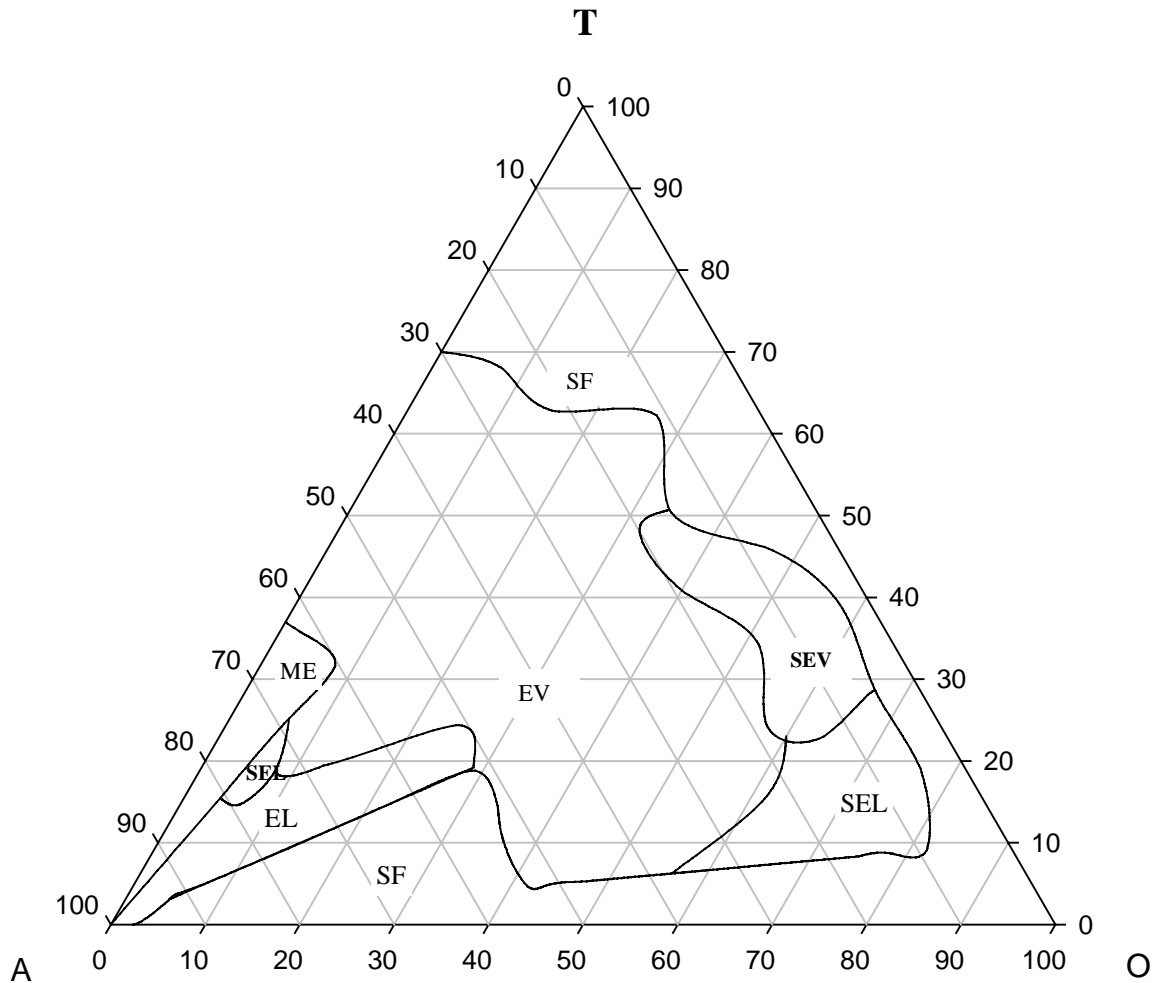


Figura 14. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com FS:PLU na proporção 7:3 EHL= 8,8 (p/p), como MT,; CP-200:CO como FO na proporção 9:1(p/p) e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como FA. As áreas delimitadas representam **EV**- emulsão viscosa; **EL** – emulsão líquida; **ME** - microemulsão; **SEV** - subemulsão viscosa; **SEL** – subemulsão líquida; **SF** - separação de fases.

Foi observada a formação de sistemas de transição de fase subemulsão viscosa (SEV) A/O e subemulsão líquida (SEL) A/O para emulsão viscosa (EV). Esses sistemas subemulsionados líquidos ou viscosos apresentaram aspecto semi-transparente, ou seja, menos transparente que as MEs e mais transparentes que emulsões. As SEVs foram formadas em uma região com proporção de tensoativos entre 20 e 50%, não mais de 20% de fase aquosa e alta proporção de fase oleosa na faixa de 30 a 70%. Embora esses sistemas sejam semi-transparentes e apresentem alta viscosidade, exibem pouca probabilidade de formar nessa região estruturas lamelares pela baixa proporção de tensoativos, ou bicontínuas por não conter quantidades equivalentes de água e óleo.

Uma menor proporção de MT entre 8 e 30% acompanhada por um aumento de FO para uma faixa de 60 a 95% e elevação de 20 para até 40% de FA levou à diminuição da viscosidade desses sistemas, originando SELs apresentando menos transparência que as MEs.

Não ocorreu a formação de sistema microemulsionado (A/O) nessa região devido à alta proporção de FO em relação à FA e MT, a qual não conseguiu consumir a energia livre remanescente na expansão da interface.

Ocorreu também a formação de fase ME líquida (O/A) em uma pequena região do diagrama com proporção de óleo no máximo de 8% e proporção de tensoativos em torno de 10 a 35%. Proporções mais elevadas de FO e diminuição na proporção da MT conferiram ao sistema maior viscosidade e aspecto mais turvo, caminhando para a formação de SEL e EL O/A.

As MEs O/A por sua vez só se formaram com proporções elevadas de FA acima de 60%. É possível perceber que a FO foi um fator determinante na formação de MEs e que um aumento em suas proporções, pode ocasionar turbidez, passando de um sistema transparente para semi-transparente e posteriormente formando emulsões líquidas (ELs).

Pode ser ainda verificado que uma pequena elevação na proporção da MT até próximo de 35% pode ocasionar um aumento na região de ME, não ultrapassando a proporção limite de FO incorporada. A transparência apresentada por estes sistemas pode ser explicada pela capacidade do tensoativo de diminuir a tensão interfacial entre a água e o óleo a ponto de formar estruturas de tamanhos muito reduzidos, menores que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz visível, que não desviam luz, caracterizando sistemas isotrópicos.

Subemulsões líquidas (SEL) O/A se formaram em pequena região partindo de um sistema transparente para semi-transparente com o aumento da FO em uma região com proporção de MT constante ou menor, o qual não foi capaz de manter a tensão interfacial a níveis suficientes para a estabilização do tamanho das gotículas. ELs se formaram em seqüência, mantendo MT em proporção relativamente constante em relação às MEs, porém com aumento de FO

É possível observar através do diagrama de fases (figura 13), que a combinação de tensoativos utilizada proporcionou em sua maioria a formação de sistemas viscosos. Sabe-se que esse fato deve-se principalmente à utilização do polímero na formulação que eleva a viscosidade à temperatura ambiente ou temperaturas mais altas. PLU em associação com a FS conferiu ao diagrama região ampla de alta viscosidade.

Em virtude desse fato, foi estudada outra combinação de tensoativos substituindo-se PLU por monolaurato de sorbitano 20 OE (TW-20) o qual possui características hidrofílicas, a fim de se obter sistemas menos viscosos.

O sistema composto de FS:TW-20 na proporção 3:7 como tensoativos, CP-200:CO na proporção 0,1: 9,9 como FO e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como FA, mostrou-se hábil em formar MEs, SEs e ELs, quando preparado nas proporções 1:9 até 9:1 FO:MT.

Esse fato deve estar relacionado com a inclusão de TW-20 como co-tensoativo, o qual apresenta um valor de EHL de 16,7 e alta hidrofília (KIBBE, 2000).

Utilizando tensoativos com valores mais elevados de EHL, estaremos proporcionando maior polaridade ao meio, favorecendo a incorporação de fase aquosa ao sistema. Dessa forma, a diminuição da tensão interfacial será mais intensa, favorecendo a estabilidade termodinâmica do sistema. Isso leva ao aumento na curvatura do filme interfacial possibilitando a formação de gotículas menores, como as das microemulsões.

Assim, a combinação adequada dos tensoativos vai permitir que a energia livre (equação 1) do sistema se aproxime de zero proporcionando a melhor estabilidade termodinâmica do sistema.

$$(\Delta G = \gamma_i \cdot \Delta S) \quad (1)$$

Onde γ_i representa a tensão interfacial e ΔS o aumento da área interfacial.

Foi observada uma pequena região de separação de fases, onde a proporção de tensoativos é baixa, não sendo suficiente para a estabilização do sistema.

De acordo com as fotografias registradas durante e 15 dias após a preparação do sistemas emulsionados, foi possível observar que as amostras A, B, C e D (figura 14) apresentaram-se transparentes ou translúcidas no primeiro dia, com tamanhos de gotículas provavelmente muito pequenas, ao passo que as amostras E, F, G e H apresentaram-se leitosas caracterizando emulsões líquidas.

De acordo com as figuras 15 e 16, após 15 dias da preparação dos sistemas emulsionados, verificou-se turvação nas amostras B, C e D as quais inicialmente apresentaram-se transparentes. Ao entrar em equilíbrio o sistema apresentou algumas modificações significativas em relação ao tamanho das gotículas, uma vez que a turbidez relaciona-se diretamente com o tamanho das gotículas.

Esse resultado indica que esse sistema, cujo valor de EHL é 12,9, é tempo dependente e sua estabilidade deve ser avaliada.

Os dados sugerem que com o aumento da proporção de fase oleosa, a mistura tensoativa vai se tornando cada vez mais ineficaz na diminuição da tensão interfacial, a curvatura do filme interfacial não se faz suficiente para conferir às gotículas da fase interna tamanho diminuto e as mesmas assumem um tamanho inerente a emulsões conferindo ao sistema aspecto leitoso.



Figura 15. Amostras constituídas de TW-20/FS 7:3 EHL 12,9 nas proporções 1:9 até 9:1 óleo/tensoativos, respectivamente imediatamente após a preparação dos sistemas emulsionados.



Figura 16. Amostras constituídas de TW-20/FS 7:3 EHL 12,9 nas proporções 1:9 até 9:1 óleo/tensoativos, respectivamente, 15 dias após a preparação dos sistemas emulsionados.

As fotografias apresentadas nas figuras 17 e 18 revelam que os sistemas com valores de EHL entre 9,5 e 11,6 foram capazes de formar MEs líquidas transparentes. Acima e abaixo dessa faixa de valores os sistemas tendem a opacidade, formando ELs convencionais. Foi verificado, também, que com o tempo de repouso houve um estreitamento dessa faixa de valores, a qual ficou compreendida entre 9,5 e 11,0.

15,4 14,16 12,9 12,5 12,0 11,8 11,6 11,3 11 10,4 10,0 9,8 9,5 9,1



Figura 17. Amostras com valores de EHL entre 15,4 e 9,1 respectivamente imediatamente após a preparação dos sistemas microemulsionados.

15,4 14,16 12,9 12,5 12,0 11,8 11,6 11,3 11,0 10,4 10,0 9,8 9,5 9,1



Figura 18. Amostras com valores de EHL entre 15,4 e 9,1 respectivamente após 15 dias da preparação dos sistemas microemulsionados.

Verificou-se que o tempo foi responsável por modificações importantes nas características dos sistemas como aumento na turbidez após o período necessário para atingirem o equilíbrio. Percebe-se aumento na turbidez das amostras de valores de EHL 11,6 e 11,3 com um provável aumento no tamanho das gotículas. Nas amostras com valores de EHL entre 11,0 e 9,5 não foi possível identificar nenhuma modificação macroscópica.

Em valores de EHL abaixo de 9,5 pode ser percebida a turvação da amostra. Esse fato pode ser explicado em razão de que com a diminuição dos valores de EHL provocada pelo aumento da proporção de FS na MT e menor contribuição do TW-20 há uma dificuldade de levar a tensão interfacial para valores baixos ou nulos, o que provavelmente provoca a formação de gotículas de tamanhos intermediários entre EMs e MEs, conferindo opacidade e restringindo a região de transparência óptica. Sistemas

semi-transparentes A/O também são formados e foram denominados anteriormente de subemulsões.

Entretanto, em regiões com valores mais elevados de EHL entre 9,5 e 11,8 onde a proporção de FS é mais baixa há a possibilidade de maior incorporação de FA em virtude da maior contribuição hidrofílica da molécula de TW-20 que possui EHL 16,7 e possivelmente ocorrerá a formação de sistemas O/A. Da mesma maneira ocorrerá a formação de SEs onde o tamanho das gotículas da fase interna é maior em relação às MEs que são transparentes.

É conhecido o papel fundamental dos tensoativos na estabilização de EMs e MEs. Quando o número dessas moléculas aumenta por unidade de área, elas comprimem-se desenvolvendo uma pressão bilateral. A tensão de superfície na interface diminui proporcionalmente com o desenvolvimento da pressão, podendo ser negativa (tensão negativa transiente da interface). O equilíbrio é conseguido quando a tensão negativa volta à zero (OLIVEIRA et al., 2001). Esses fatos podem justificar as modificações ocorridas nos sistemas apresentados nas figuras 16 e 17.

Para a análise desse fenômeno nas amostras desenvolvidas foi estudado o aumento do tamanho das gotículas após o preparo das amostras, assim como a velocidade com que ocorre.

De acordo com os resultados das análises espectrofotométricas realizadas em comprimento de onda de 410nm, através da medida da absorbância (derivada do espalhamento de luz) das amostras em função do tempo, para vários valores de EHL, foram determinados valores que expressam essa relação. Esses valores sugerem que as gotículas da fase interna do sistema aumentam lentamente de tamanho com o tempo de estocagem (figuras 19 a 24).

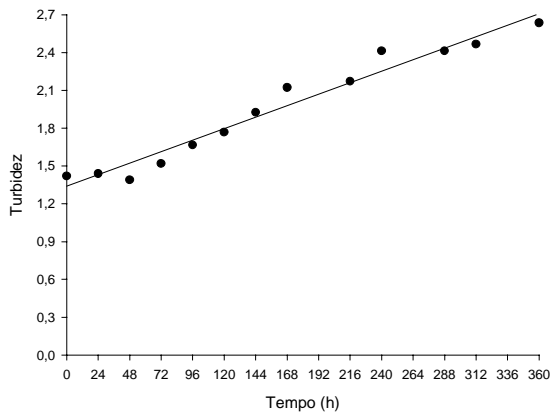


Figura 19. Variação da turbidez da amostra de ME preparada a partir de FS, CP-200, CO, TW-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 9,8.

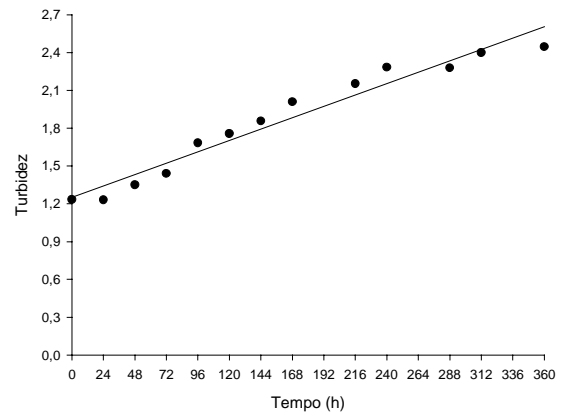


Figura 20. Variação da turbidez da amostra de ME preparada a partir de FS, CP-200, CO, TW-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 10,0.

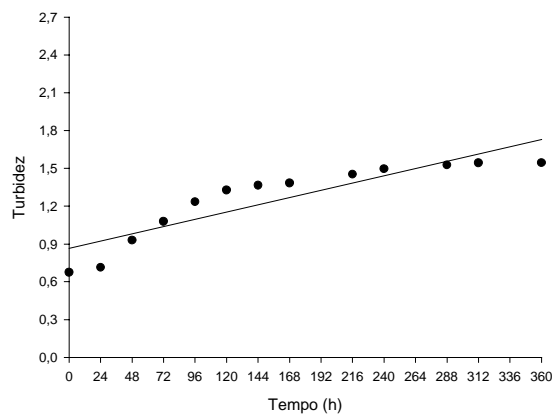


Figura 21: Variação da turbidez da amostra de ME preparada a partir de FS, CP-200, CO, TW-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 10,4

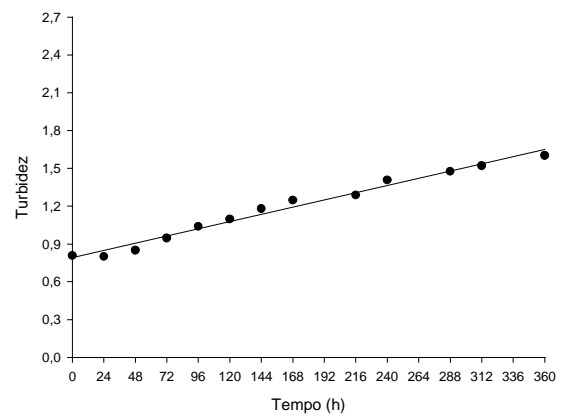


Figura 22: Variação da turbidez da amostra de ME preparada a partir de FS, CP-200, CO, TW-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 11,0.

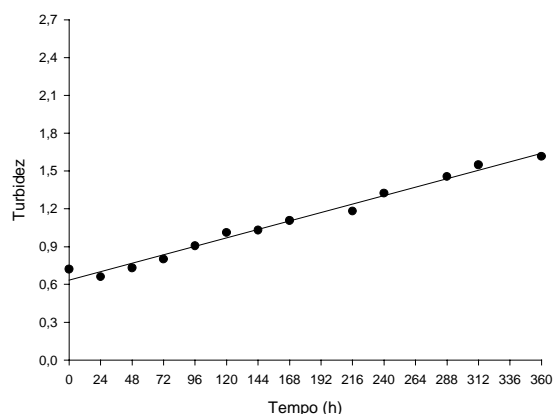


Figura 23: Variação da turbidez da amostra de ME preparada a partir de FS, CP-200, CO, TW-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 11,3.

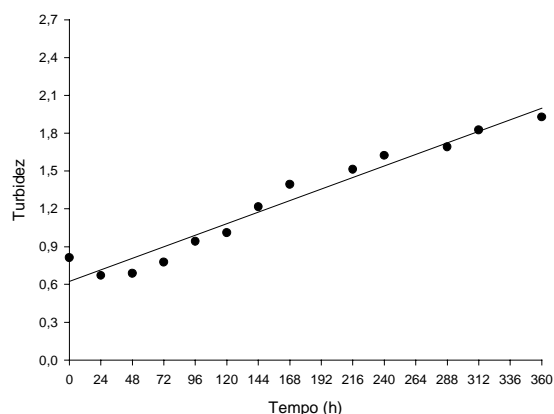


Figura 24: Variação da turbidez da amostra de ME preparada a partir de FS, CP-200, CO, TW-20 e tampão Tris-HCl 0,01M conforme tabela 5 com valor EHL 11,6.

Como pode ser observado nas figuras anteriores, em todos os valores de EHL analisados, houve nas 24 primeiras horas, um decréscimo nos valores de absorvância. Esse fato pode estar relacionado à termodinâmica do sistema, uma vez que foi fornecida energia às amostras através do uso de ultrassom para formação dos sistemas. Esse comportamento reflete um estágio em que as amostras estão, provavelmente, entrando em equilíbrio termodinâmico, pois há energia livre. Foi analisado o perfil do sistema relacionando esses valores de velocidade (figura 25).

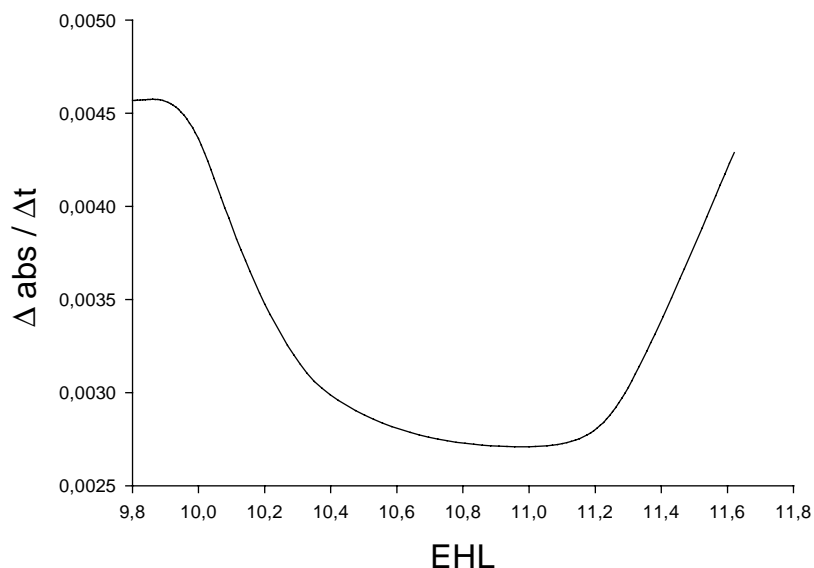


Figura 25: Perfil de estabilidade das MEs preparadas a partir de FS:TW-20 (15%), CP-200:CO (10%), e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 (75%), por espectrofotometria em 410 nm avaliando aumento do tamanho das gotículas através da relação Abs/h.

Pode ser observado que a amostra com valor de EHL 11,0 apresenta crescimento de tamanho de gotículas da fase interna mais lento ($2,72 \times 10^{-3}$ Abs/h), refletindo que a proporção de tensoativos utilizada é a mais adequada para conferir maior estabilidade em relação às demais amostras analisadas.

Observa-se que à medida que os valores de EHL se afastam do encontrado como ideal as velocidades de crescimento de gotículas aumentam. Esse fato pode ser visto nos EHLs 9,8; 10 e 10,4 com velocidades de $4,57 \times 10^{-3}$; $4,36 \times 10^{-3}$; $3,06 \times 10^{-3}$ Abs/h respectivamente. Os valores de EHL 11,3 e 11,6 apresentaram velocidades de $3,02 \times 10^{-3}$ e $4,29 \times 10^{-3}$ Abs/h. Portanto, o resultado sugere que a máxima estabilidade é alcançada em amostras com valores de crescimento de fase interna menores.

Foi construído um diagrama de fases (figura 26) para sistemas com valor de EHL 11,0 estabilizado com FS:TW-20 5,52:4,48 como MT, CO:CP-200 0,1:9,9 como FO e tampão fosfato 50mMM pH 7,4 como FA.

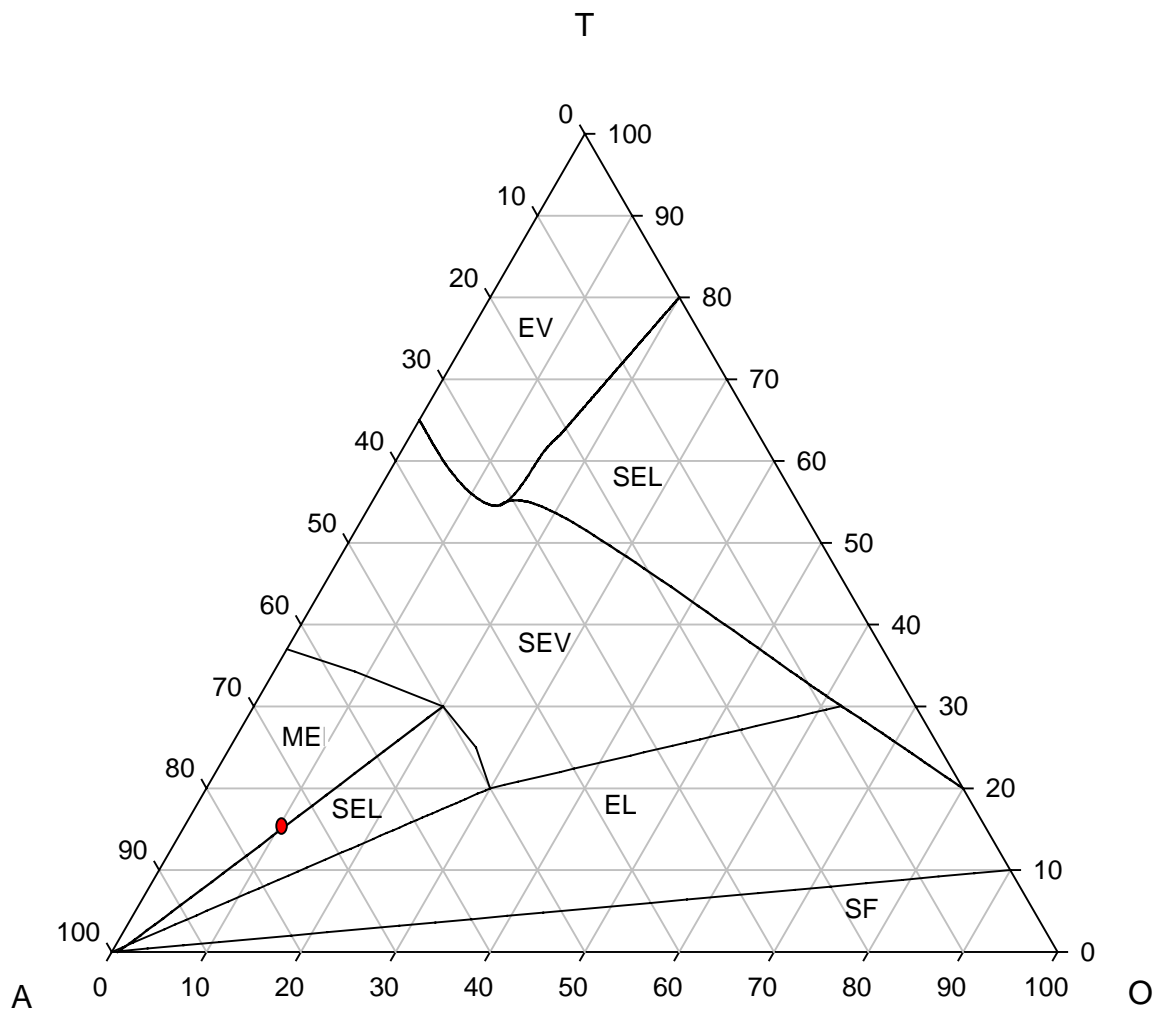


Figura 26. Diagrama de fases para o sistema estabilizado com FS:TW-20 na proporção 5,52:4,48, EHL 11,0, CO:CP-200 como fase oleosa na proporção 0,1:9,9 e tampão fosfato 50mMM pH 7,4 como fase aquosa. As áreas delimitadas representam: **EV**-emulsão viscosa; **EL**-emulsão líquida; **ME**-microemulsão; **SEV** – subemulsão viscosa; **SEL O/A ou A/O**-subemulsão líquida O/A ou A/O; **SF**-separação de fases; ● - amostra selecionada com 10% FO, 15% MT e 75% FA.

É possível observar através do diagrama de fases (figura 25), que a combinação de tensoativos utilizada proporcionou a obtenção de sistemas mais líquidos que no diagrama constituído de FS:PLU como MT. ME foi obtida em região onde a proporção de FA é superior a 63% e no máximo 37% de MT, porém a tensão interfacial conseguiu ser mantida em níveis baixos permitindo a inclusão de até 20% de FO. A proporção de FO difere consideravelmente do diagrama estabilizado por FS/PLU, onde o máximo incorporado se estabeleceu em torno de 8%. À medida que a proporção de FO aumenta para até 30%, diminuindo, portanto, FA e tensoativa, há uma modificação nas características dos sistemas obtidos tornando-os menos transparentes que as MEs. Provavelmente isso ocorreu em virtude da ocorrência de discreto aumento na tensão interfacial devido à diminuição da MT. Esses sistemas foram designados SEL O/A em virtude do tamanho das gotículas estarem possivelmente em tamanhos intermediários ente MEs e EMs.

Entretanto, um aumento na viscosidade desses sistemas SEL O/A ocorre, quando há diminuição do volume de FA formando SEV. A restrição na incorporação de água pode estar relacionada ao aumento na proporção de tensoativos que variou entre 20 e 60%. Nesse sentido a FS com baixo valor de EHL e contida na pode ter sido responsável por esse fato.

Ampla região caracterizando sistemas líquidos e opacos foi obtida, caminhando de SEL e SEV para EL, à medida que proporção de FO vai se ampliando e a proporção de FA vai diminuindo. Nessa região há MT variando de 10 a 30% o que se mostra em quantidade ineficaz para neutralizar a energia livre remanescente.

Separação de fases pode ser visualizada apenas em regiões contendo 10% ou menos de MT, aumentado essa região com a elevação da proporção de FO.

Proporções de MT acima de 55% geraram regiões opacas de alta viscosidade (EV), uma vez que a incorporação de FA se encontra dificultada sendo de até 35% apenas.

Em regiões com baixa proporção de FA (até 35%) e variação na proporção da MT entre 20 e 80%, não foi possível a formação de sistemas transparentes, mas sim semi-transparentes, os quais foram chamados SEL O/A. A proporção de FO contribuiu para a ampliação ou diminuição dessa região. A região SEL A/O, é composta de 20 a 50% de MT, havendo alta proporção FO e a tensão interfacial ainda se faz elevada demais para formar ME. Esses fatores demonstram que ainda há energia livre nessa região e o tamanho das gotículas ainda é superior ao estabelecido para formar sistemas microemulsionados.

O aumento de FA foi necessário para a formação de sistemas MEs, acompanhado de MT em menor concentração. Nessas regiões, a FO é fator importantíssimo na determinação de sistemas mais transparentes e semi-transparentes (ME e SE) ou opacos (EL), o que pode ser avaliado pelas características visuais e pela determinação do diâmetro médio das gotículas. Dentre as amostras obtidas foi selecionada a composta de 10% FO, 15% MT e 75% FA.

Para a realização da medida do raio hidrodinâmico das gotículas por Light Scattering é necessário diluir a amostra corretamente para impedir a interação entre as gotículas. Dessa forma, o equipamento fornecerá o tamanho correto das gotículas uma vez que o laser conseguirá detectá-las individualmente. A determinação do diâmetro das gotículas por espalhamento de luz foi realizada para amostra de EHL 10,99. O ensaio foi realizado em triplicata a cada 24 horas por um período de 240 horas. As medidas de raio hidrodinâmico em função do tempo estão relacionadas na tabela 4. Para tal experimento foi determinado o índice de refração das amostras em triplicata e foi calculada a média desses valores.

$$IR = \frac{\sum (ni)}{3} \quad i = n^{\circ} \text{ amostras}$$

$$IR = \frac{1,351 + 1,353 + 1,353}{3}$$

$$IR = 1,352$$

Tabela 4: Medidas de raio hidrodinâmico das amostras constituída de 10% FO, 15% MT (EHL 11,0) e 75% FA.

<i>Tempo(h)</i>	<i>Raio hidrodinâmico (nm)</i>
0	33,6
72	43,4
96	51,8
120	52,5
144	52,8
168	53,5
240	57,0

Os resultados da tabela 4 monitorados imediatamente após a preparação da microemulsão com EHL=11,0 mostram que os valores do raio hidrodinâmico aumentaram com o tempo, tendendo à estabilização em tempo infinito. Esse fenômeno pode ser explicado desde a preparação da ME envolvendo a utilização de técnica de alta energia (ultrassom) a qual proporciona valores transientes negativos para a tensão interfacial. Quando o fornecimento de energia é cessado o sistema tende ao equilíbrio energético levando ao aumento do raio hidrodinâmico (OLIVEIRA et al, 2004).

Para melhor entendimento desse fato, e análise da possível identificação de micelas originárias de reações de hidrólise da FS foi realizada a análise quantitativa da mesma presente na ME. É conhecido através da literatura que a FS pode hidrolisar e originar lisolecitina, que é seu principal produto de degradação. Muitos fosfolipídeos naturais

possuem suas cadeias hidrofóbicas insaturadas que podem ser identificadas através de técnicas específicas, como cromatografia líquida de alta eficiência.

Essa degradação ocorre em lipídios contendo duplas ligações, uma vez que a insaturação permite deslocamento de elétrons emparelhados ao longo da cadeia lipídica, diminuindo a energia nesse estado, promovendo o aparecimento de picos diferenciados (NEW, 1997). Essa hidrólise pode causar a perda de cadeias carbônicas da porção hidrofóbica de sua molécula, a qual pode juntamente com as cadeias de outras moléculas formarem micelas.

Foi realizado experimento através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com objetivo de se detectar uma possível hidrólise da FS. Após a estabilização das condições cromatográficas, foi identificado o tempo de retenção da FS em torno de 8,3 min., e obtido o seu cromatograma (figura 27).

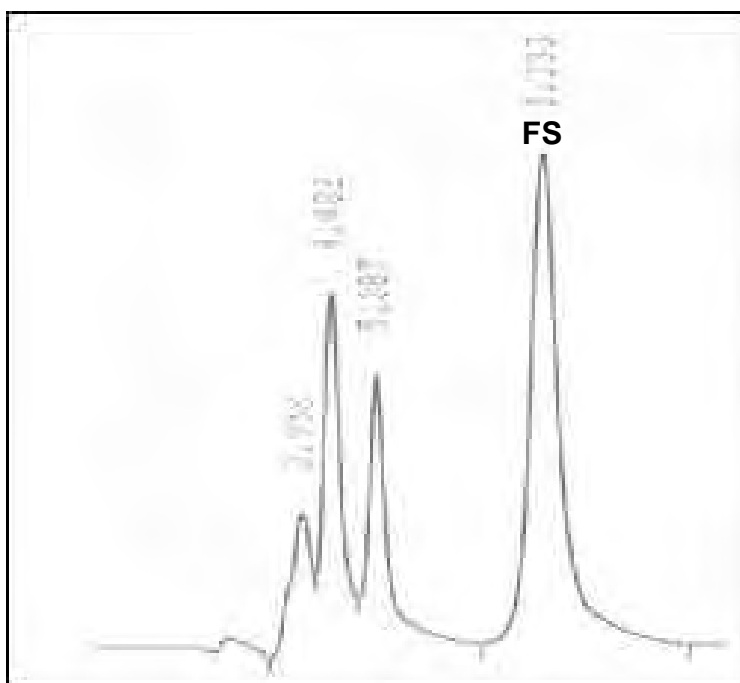


Figura 27: Cromatograma típico da FS em 206 nm. Tempo de retenção de 8,333 min.

Para tal, foi obtida uma curva padrão da FS em n-hexano:n-propanol (1:4).

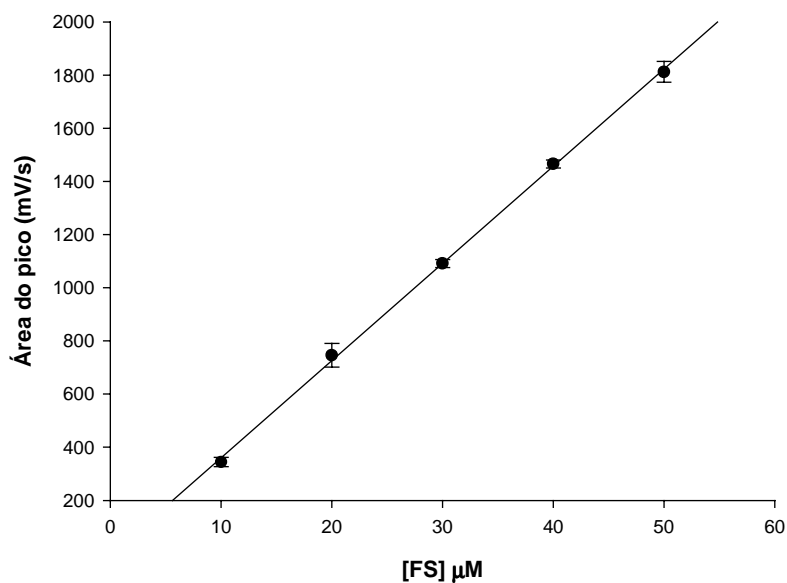


Figura 28: Curva padrão da FS em n-hexano:n-propanol (1:4), obtida por CLAE, detecção em 206 nm (n=3). $r^2 = 0,9993$.

$$\text{Área do pico} = a \cdot x + b$$

$$\text{Área do pico} = 36561 \cdot x + (-4914)$$

A curva padrão da FS foi realizada em triplicata por CLAE, $\lambda = 206$ nm conforme tabela 5.

Tabela 5: Valores das áreas dos picos de FS em diferentes concentrações.

Concentração de FS (μM)	Média da área dos picos (n=3)	Desvio padrão (n=3)
10	334,227	17,673
20	745,884	44,506
30	1091,231	14,908
40	1466,090	15,178
50	1812,191	39,111

A amostra da ME foi preparada e diluída a fim de se obter uma concentração 35µM/L. A análise foi realizada em triplicata e foi obtida a média desses valores, assim como mostra a tabela 6.

Tabela 6: Valores das áreas obtidas por CLAE e valores de concentração de FS

Dias	Média[FS] µM/L	Desvio padrão	Erro padrão
1	37,74	2,93	1,69
2	36,04	1,30	0,75
3	34,45	4,87	2,81
6	34,04	2,92	1,68
7	36,40	1,37	0,79
8	35,61	1,83	1,06
9	33,65	6,01	3,47
10	34,12	6,52	3,76
13	35,62	3,79	2,18
14	35,76	3,46	1,99
23	37,40	1,19	0,69
26	36,27	2,51	1,45
27	34,49	5,73	3,31
29	29,59	4,05	2,34
30	37,19	0,95	0,54
35	31,04	2,41	1,39
36	33,24	4,98	2,87
37	38,02	4,31	2,49
41	37,45	3,49	2,01
44	36,21	2,51	1,45
50	33,76	3,22	1,86
60	37,74	2,93	1,69

O valor de significância do teste estatístico empregado é de $p < 0,05$.

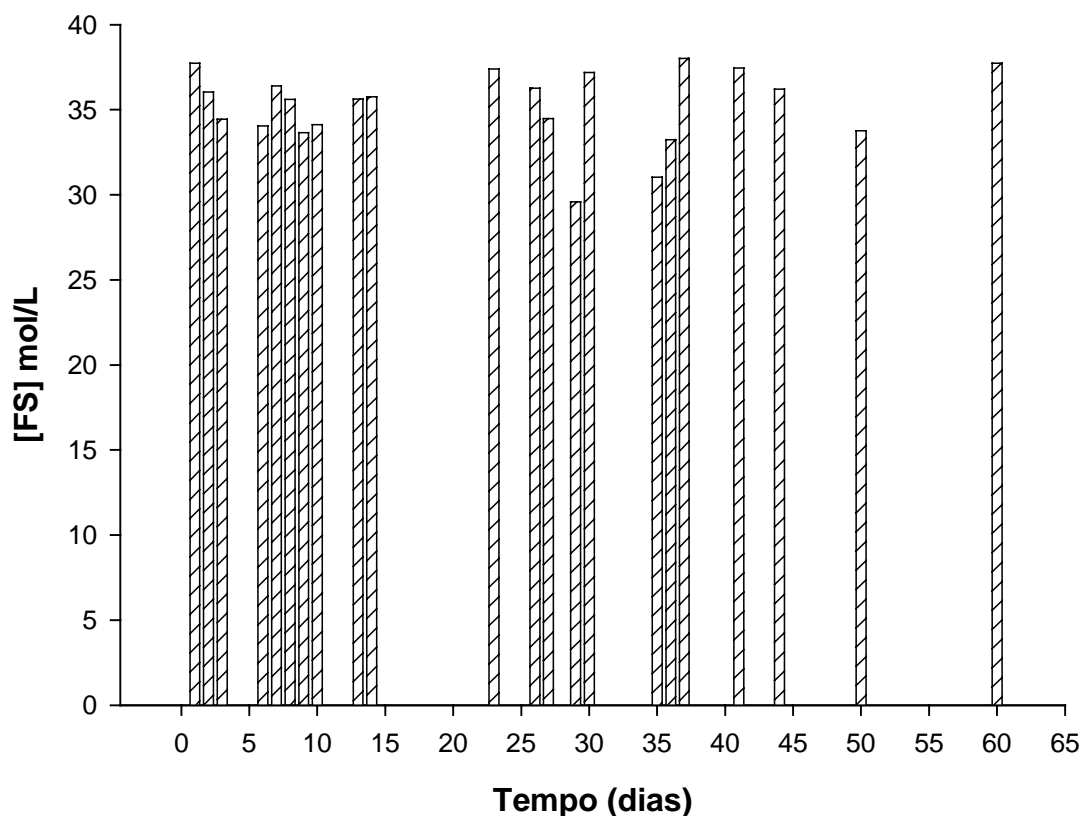


Figura 29: Hidrólise da FS em MEs durante 60 dias. Análise realizada por CLAE a 206 nm.

Foi realizada análise estatística ANOVA, e constatado que não há diferenças estatisticamente significativas das concentrações de FS entre os 60 dias; fato determinado através valor de significância $P=0,459$. Desse modo, o experimento demonstra que não ocorreu a formação de qualquer produto de degradação da FS, uma vez que os mesmos causariam diminuição nas áreas dos picos.

Devido às numerosas aplicações em indústria farmacêutica e cosmética é importante definir as características de cada um dos sistemas estudados. Por essas razões é necessário verificar se os sistemas são susceptíveis ao uso do ponto de vista de suas habilidades para a liberação dos fármacos encapsulados e sob o ponto de vista reológico (FA et al, 2004).

Na área farmacêutica as medições reológicas são utilizadas para caracterizar a facilidade com que o material pode ser despejado de um frasco, o bombeamento de um produto do equipamento em um processo industrial, o espalhamento de um creme ou loção sobre a pele, entre outras (GENNARO, 2000; WOOD, 2001; ALMEIDA e BAHIA, 2003).

É importante método aplicado à caracterização de sistemas emulsionados microemulsionados e pelo fato de estar relacionado com o tipo e grau de organização dos sistemas (SCHOTT, 2000). A reologia estuda a relação entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de cisalhamento nas amostras com EHL compreendidos entre 9,8 e 11,6 (figuras 30 a 41).

Pode ser observado que as amostras estudadas apresentaram comportamento Newtoniano, não sofrendo deformação em função da tensão aplicada. Segundo a lei de Newton, para os líquidos ideais a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à velocidade de cisalhamento (ALMEIDA et al., 2003). A viscosidade é independente da velocidade de deformação. Sabe-se que as curvas de líquidos newtonianos são linhas retas que passam através da origem (SCHOTT, 2000).

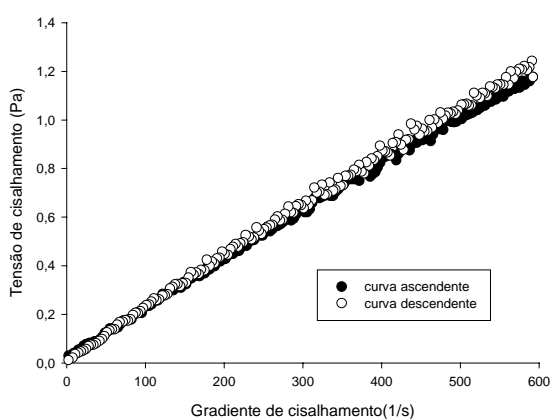


Figura 30: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% de FS:TW-20 (5,43:4,57), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 25°C com valor de EHL 9,8.

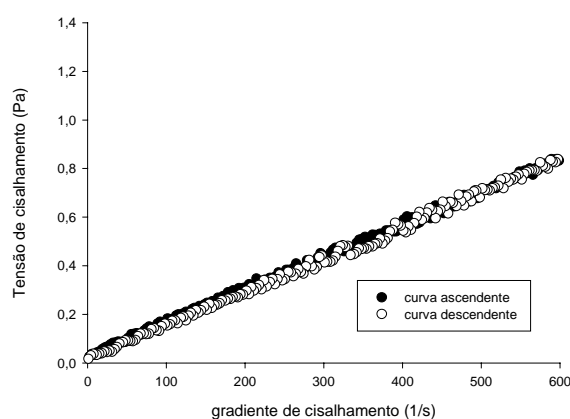


Figura 31: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% de FS:TW-20 (5,43:4,57), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 37°C com valor de EHL 9,8.

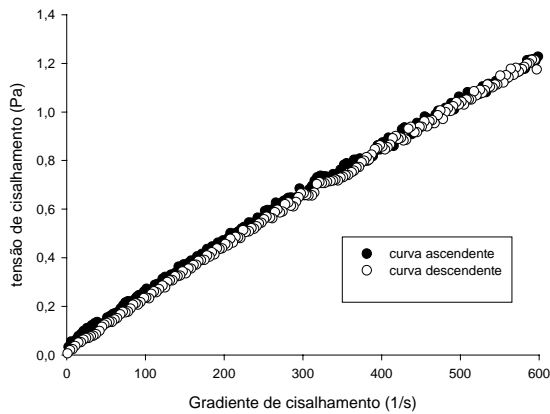


Figura 32: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% e FS:TW-20 (5,27:4,73), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 25°C, com EHL 10,0.

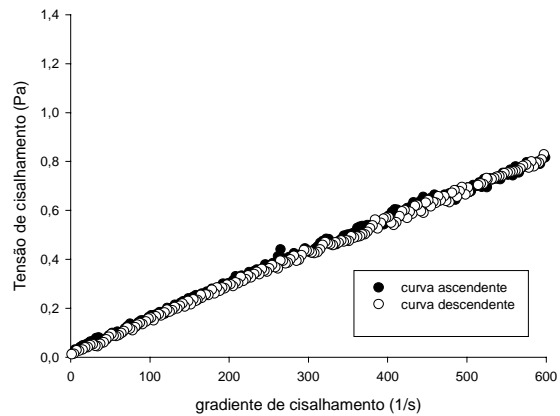


Figura 33: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% de FS:TW-20 (5,27:4,73) 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 37°C, com EHL 10,0.

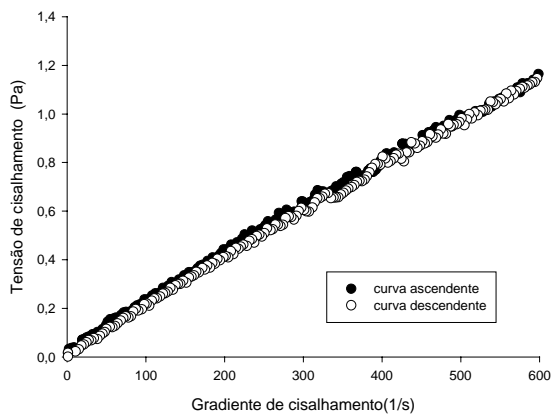


Figura 34: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% de FS:TW-20 (5:5), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 25°C, com EHL 10,4.

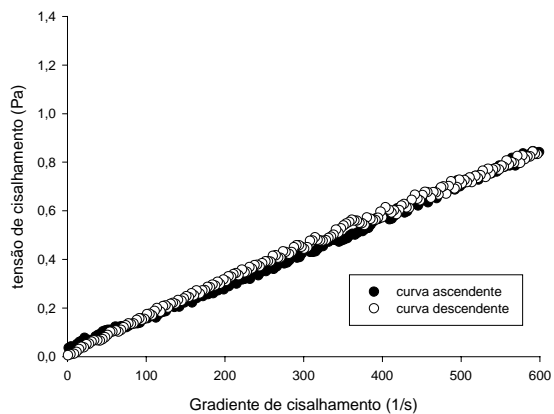


Figura 35: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% de FS:TW-20 (5:5), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 37°C, com EHL 10,4.

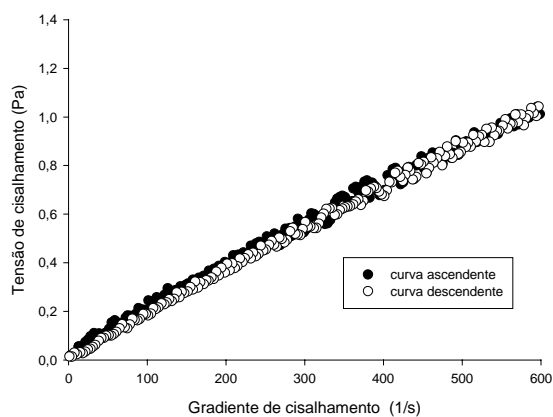


Figura 36: Comportamento reológico de ME estabilizada por 10% de FS:TW-20 (4,48:5,52), 5% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 25°C, com EHL 11,0

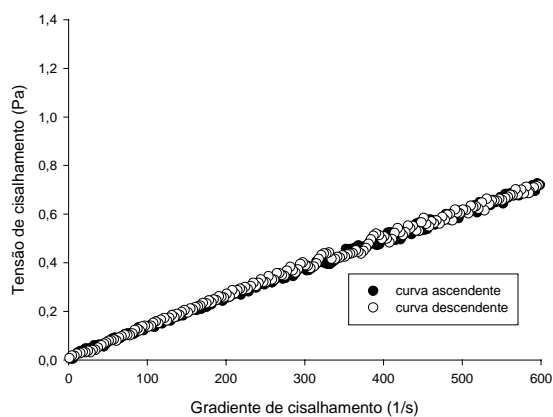


Figura 37: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% de FS:TW-20 (4,48:5,52) 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 37°C com EHL 11,0

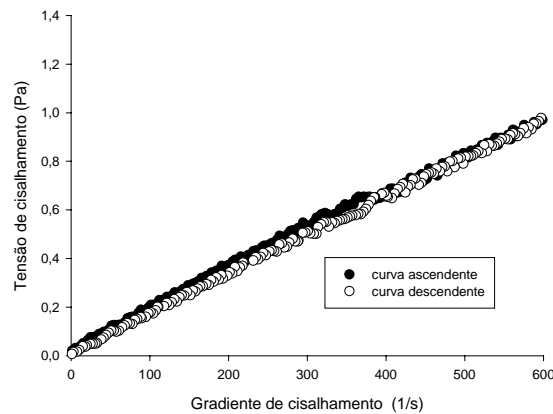


Figura 38: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% e FS:TW-20 (4,25:5,75), 10% de CO:CP-200(0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 25°C com EHL 11,3.

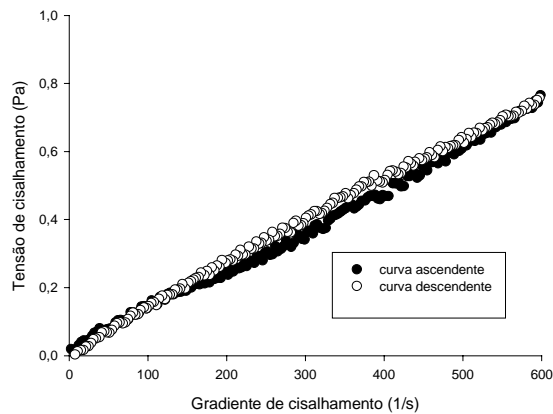


Figura 39: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% e FS:TW-20 (4,25:5,75), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 37°C com EHL 11,3.

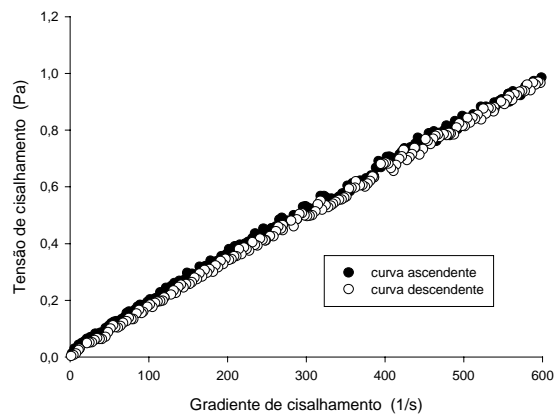


Figura 40: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% de FS:TW-20 (4,0:6,0), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 25°C, com EHL 11,6.

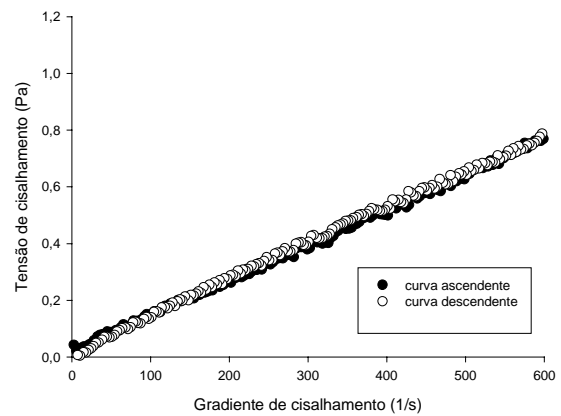


Figura 41: Comportamento reológico de ME estabilizada por 15% de FS:TW-20 (4,0:6,0), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa a 37°C com EHL 11,6.

As alterações que ocorrem sobre as propriedades reológicas ao longo do tempo podem ser verificadas determinando a viscosidade em função das velocidades de cisalhamento de modo ascendente e descendente continuamente. Se o fluido é tempo independente as curvas irão se sobrepor. Se esse fato não ocorrer e não houver a sobreposição das curvas, o fluido é tempo dependente.

Através da determinação da viscosidade das amostras com valores na faixa de EHL entre 9,8 e 11,6 pudemos confirmar que as mesmas apresentam fluido Newtoniano, mantendo viscosidade constante com a velocidade de cisalhamento aplicada.

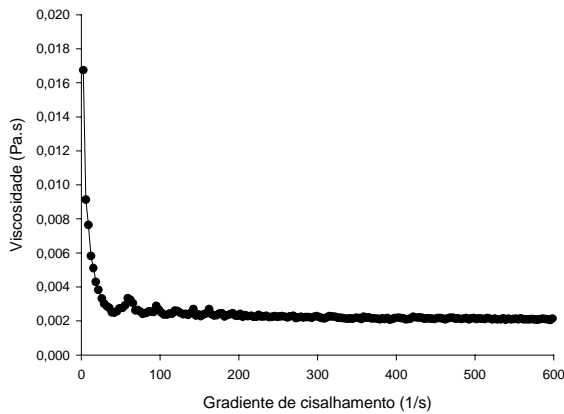


Figura 42: Viscosidade da ME EHL 9,8 estabilizada com 15% de FS:TW-20 (5,43:4,57), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa.

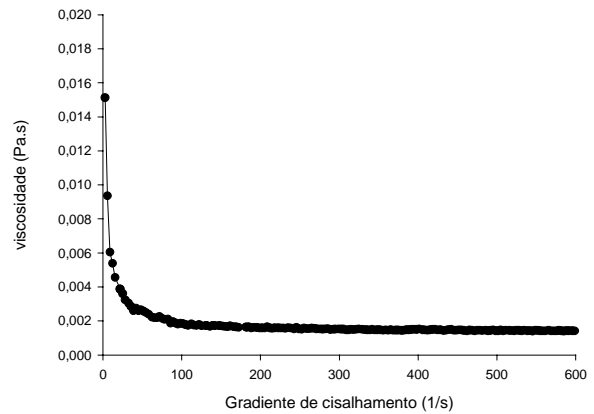


Figura 43: Viscosidade da ME EHL 10,0 estabilizada com 15% de FS:TW-20 (5,27:4,73), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% fase aquosa .

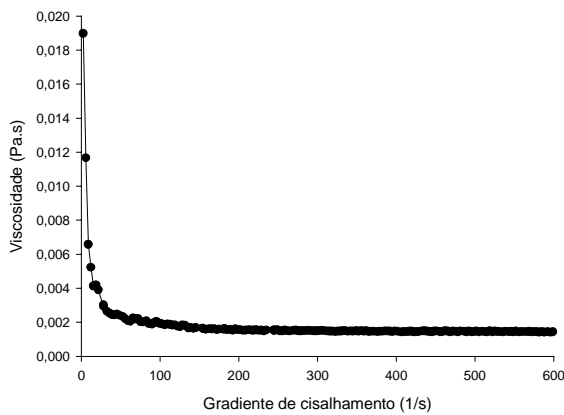


Figura 44: Viscosidade da ME EHL 10,4 estabilizada por 15% de FS:TW-20 (5:5), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa .

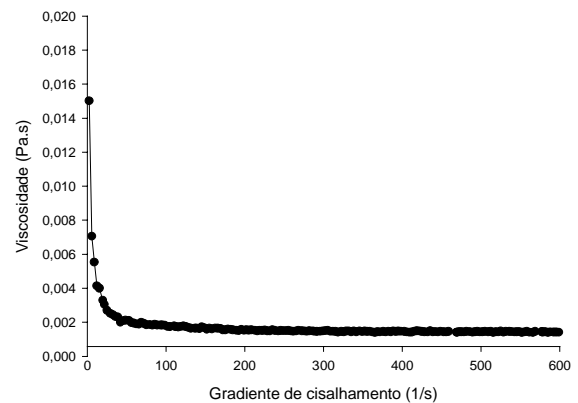


Figura 45: Viscosidade da ME EHL 11,0 estabilizada com 15% de FS:TW 20 (4,48:5,52), 10% de CO:CP-200(0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa .

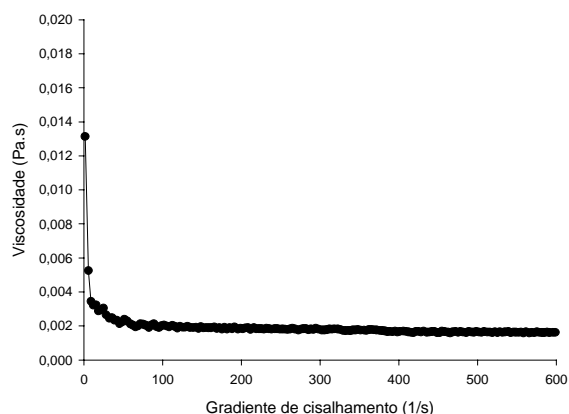


Figura 46: Viscosidade de ME EHL 11,3 estabilizada por 15% e FS:TW-20 (4,25:5,75), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa.

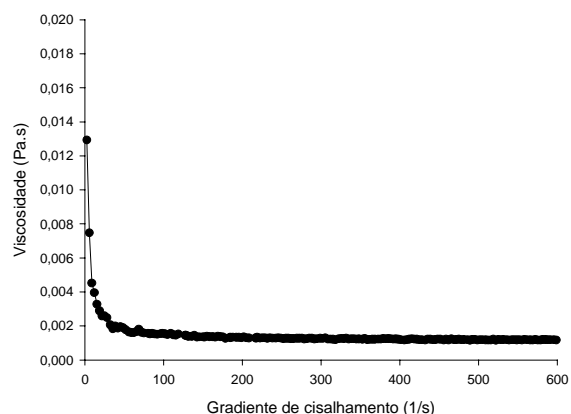


Figura 47: Viscosidade de ME EHL 11,6 estabilizada por 15% de FS:TW-20 (4,0:6,0), 10% de CO:CP-200 (0,1:99,9) como fase oleosa e 75% de fase aquosa.

Os resultados apresentados nas figuras 42 a 47 indicam que todas as amostras são tempo independentes. Foi verificado que a variação na proporção de tensoativo, caracterizada por diferentes valores de EHL, não interfere nas características reológicas e nem na viscosidade dos sistemas estudados.

Para uma análise criteriosa da estrutura dos sistemas estudados, foi realizado espalhamento de luz a baixo ângulo em todas as amostras (EHL entre 9,1 a 11,3). As curvas de SAXS estão apresentadas na figura 48.

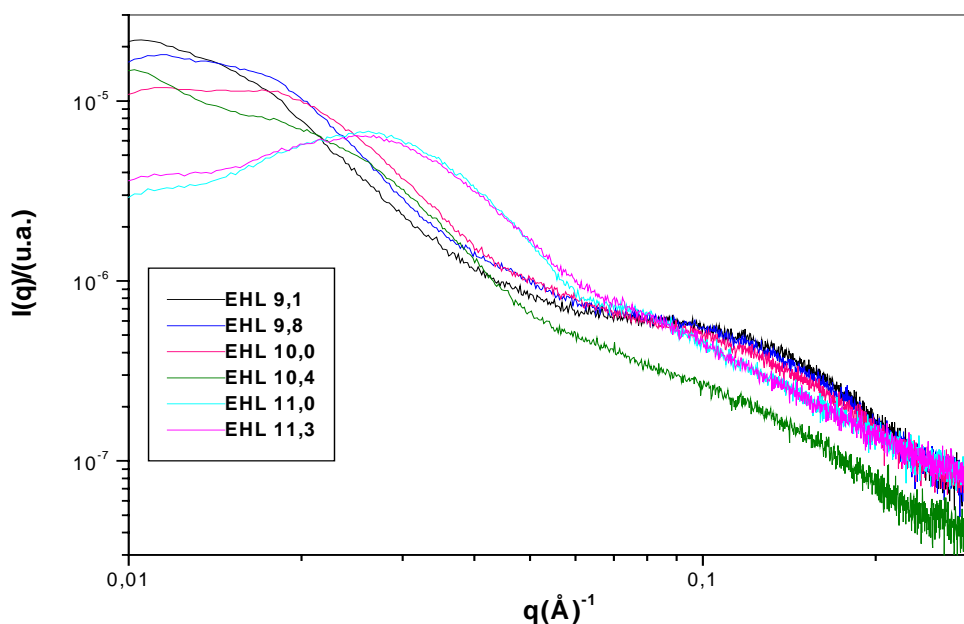


Figura 48: Curvas de SAXS para amostras com valores de EHL entre 9,1 e 11,3

As curvas da intensidade espalhada $I(\mathbf{q})$ em função do vetor de espalhamento (\mathbf{q}) para todas as amostras com exceção das com EHL 11 e 11,3 apresentam um regime linear a valores pequenos de \mathbf{q} , cuja extensão aumenta à medida que se eleva o valor do EHL, característico da formação de gotículas grandes ou de agregados. Além disso, observa-se para essas amostras um segundo regime caracterizado pela presença de um pico de correlação a valores de \mathbf{q} maiores, sugerindo que essas amostras são constituídas por um sistema hierárquico de 2 níveis, um de gotículas ou agregados pequenos (pico de correlação a \mathbf{q} alto) e outro de gotículas ou agregados maiores (regime linear a \mathbf{q} menores).

Este tipo de sistema foi extensivamente estudado por Beaucage e colaboradores (BEAUCAGE et al, 1995) que propuseram um modelo matemático descrito por uma equação geral que descreve funções de espalhamento múltiplas separadas por diferentes regimes de leis de potência.

Essa equação leva em consideração o fator estrutural como, por exemplo, neste caso, a formação de micelas homogêneas (GLATTER, 1982) e é descrita pela expressão abaixo:

$$I(q) = G \exp\left(\frac{-q^2 Rg^2}{3}\right) + B \left\{ \frac{\left[\operatorname{erf}\left(\frac{qRg}{\sqrt{6}}\right) \right]^3}{q} \right\}^p * S(q) \quad [1]$$

onde **G** é a intensidade para **q** tendendo a zero relacionada à lei de Guinier, **B** é uma constante específica ao tipo de lei de potência seguida pelo expoente **P** e **S(q)**. Quando no sistema analisado a estrutura interna apresenta correlação (ex: gotículas esféricas) pode ser utilizada a equação abaixo para o fator de estrutura:

$$S(q) = \frac{1}{1 + k \left[3 \frac{\operatorname{sen}(qd) - qd \cos(qd)}{(qd)^3} \right]}$$

onde **d** é a distância média de correlação entre os objetos espalhadores e **k** é o fator de compacidade das gotículas.

Desta forma, as curvas das amostras com EHL entre 9,1 e 11 foram ajustadas utilizando a equação geral de Beaucage de 2 níveis para se obter alguns parâmetros essenciais como raio de giro (**Rg**), e a distância média entre as gotículas (**d**) (BEAUCAGE, et al., 1995). Os valores dos parâmetros estruturais assim obtidos encontram-se listados na tabela 7.

O ajuste das curvas experimentais à equação 1 foi realizado e um exemplo desse ajuste é representado pela Figura 49, referente à amostra com EHL= 9,1.

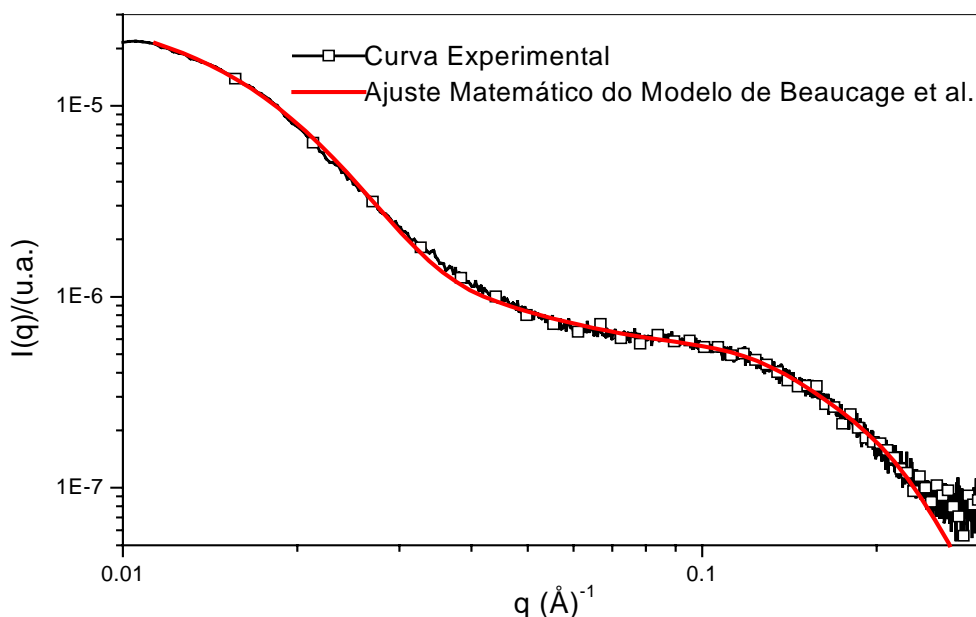


Figura 49 – Ajuste da curva para a amostra com EHL= 9,1 à equação 1.

Tabela 7: Valores dos parâmetros de ajuste das curvas de SAXS para as formulações com valores de EHL entre 9,1 e 11,3.

<i>Amostras</i>	<i>EHL</i>	<i>Tensoativos</i>	R_1 (Å)	R_2 (Å)	k	d (Å)
<i>I</i>	9,1	60% FS/40% TW-20	10,8	110,62	0,61	73,46
<i>II</i>	9,8	54,33% FS/45,67% TW-20	10,9	87,33	0,071	60,79
<i>III</i>	10,0	52,75% FS/47,24% TW-20	10,78	71,24	0,18	55,76
<i>IV</i>	10,4	50% FS/50% TW-20	11,23	72,98	0,92	91,00
<i>V</i>	11	44,89% FS/55,11% TW-20	–	132,228	0,70	169,33
<i>VI</i>	11,3	42,52% FS/57,48% TW-20	–	124,311	0,69	174,34

Os resultados obtidos sugerem que à medida que se eleva o valor do EHL de 9,1 para 11,0 com o aumento da proporção de TW-20 ao sistema, ocorre diminuição do raio das gotículas ou dos agregados e um aumento da distância entre eles em razão da diminuição da tensão interfacial entre as gotículas causada pela presença de uma maior proporção de tensoativo hidrofílico (tabela 8).

No caso das amostras com EHL superior ou igual a 11,0 observa-se pelas curvas de SAXS apenas a presença de um pico de correlação a valores baixos de q , sugerindo a formação de gotículas ou agregados um pouco maiores. Neste caso o modelo de Beaucage também foi utilizado para calcular os parâmetros estruturais do sistema, mas considerou-se a existência de apenas 1 nível de gotículas. Através do ajuste valores de k , R e d foram obtidos (tabela 7). No caso dessas amostras, a maior proporção de co-tensoativo aparentemente promove a formação de gotículas ou agregados um pouco maiores, mas muito mais distanciadas entre si, o que sugere um grau menor de agregação em razão do valor muito pequeno de tensão interfacial entre as gotículas.

Esses resultados estão de acordo com o observado através das características macroscópicas das amostras (figura 18) e microscópicas por espalhamento de luz (tabela 4). Eles revelam que embora o tamanho das gotículas ou agregados seja menor para as amostras com EHL menor que 11,0 o sistema é opaco, provavelmente em razão do alto grau de agregação. O tamanho de agregados obtido por espalhamento de luz para amostra 11,0 é da ordem de 33 nm, ou seja, um tamanho pequeno suficiente para formar um sistema micelar transparente.

Pode-se então concluir que o TW-20 exerce um papel fundamental no processo de agregação entre as partículas.

Em razão desses resultados selecionou-se a amostra com EHL 11,0 para os ensaios de incorporação e liberação de AmB.

Após a caracterização e escolha do sistema mais adequado para a incorporação da AmB, foi avaliado o comportamento a AmB incorporada em solução tampão fosfato, CDs e na amostra selecionada, a qual apresenta característica inerente à ME .

A AmB quando em solução forma uma mistura de agregados e monômeros. O espectro de absorção da AmB na concentração $5 \times 10^{-6} \text{M}$ em tampão fosfato 50mM pH 7,4

mostra a presença de formas auto-associadas em comprimento de onda de 327nm, assim como a presença de monômeros, os quais se apresentam em proporções inferiores, em comprimentos de onda 388 e 409nm e uma banda em 365nm (figura 50) como já relatado por Araújo, 2004.

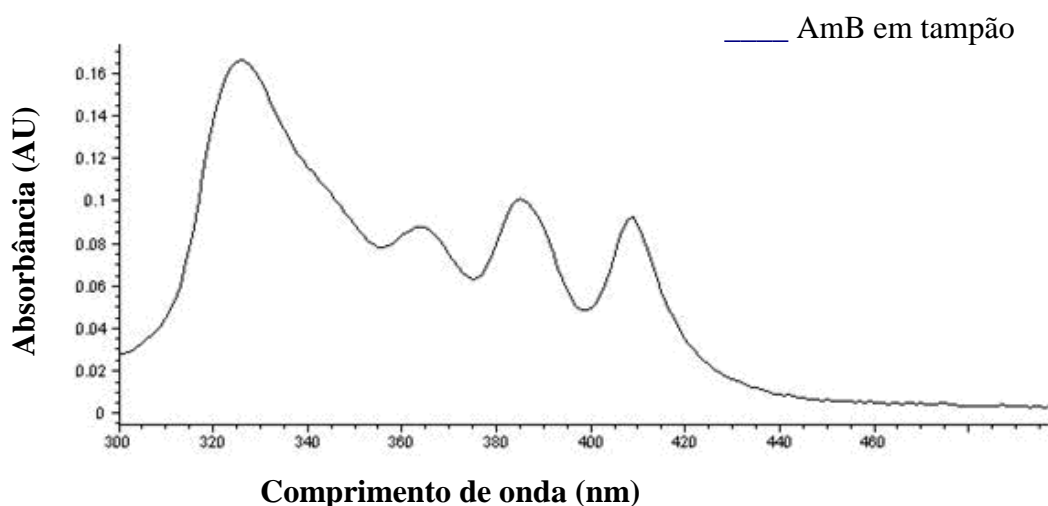


Figura 50: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-6} M em tampão fosfato 50 mM pH 7,4 na faixa de comprimento de onda entre 300 e 500 nm.

O espectro de absorção apresentado na figura 51, permite verificar que quando a AmB na mesma concentração (5×10^{-6} M) foi incorporada à solução de β -CD 13mM ocorreu uma mudança hipsocrômica na banda em 327nm. O espectro foi modificado aparecendo sinal intenso em 365, 388 e 409nm correspondentes às formas monoméricas. Esse fato sugere a complexação do fármaco com a CD e a predominância de monômeros na formulação, os quais são conhecidos por apresentarem menor toxicidade (BOLLARD, 1991). Concluímos dessa forma que a AmB complexada em β -CD seleciona formas monoméricas do fármaco, porém apenas parcialmente.

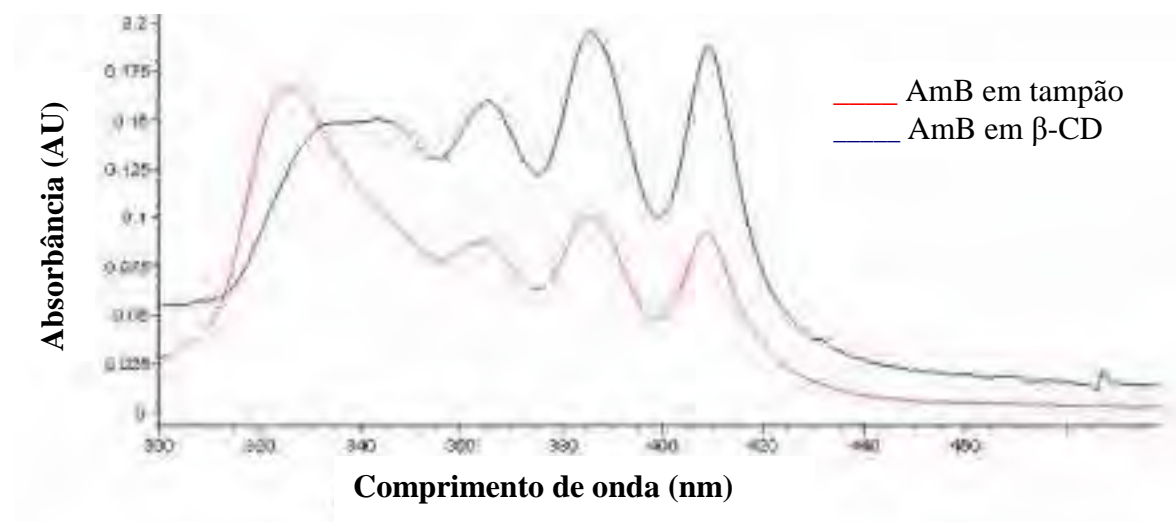


Figura 51: Espectro de absorção da AmB na concentração $5 \times 10^{-6} \text{M}$ em tampão fosfato 50mM pH 7,4 e em β -CD na mesma concentração, na faixa de comprimento de onda entre 300 e 500 nm.

Posteriormente foi realizada a incorporação do fármaco na ME selecionada constituída de FS:TW-20 (4,48:5,52) como MT, CO:CP-200 (0,1:9,9) como FO e tampão fosfato 50mM pH7,4 como FA. O espectro apresentado na figura 51 mostra que quando a AmB na concentração $5 \times 10^{-6} \text{M}$ foi incorporada à ME ocorreu uma diminuição de absorção das bandas correspondente às formas agregadas (327nm) e um sinal mais intenso em 365,388 e 409nm pode ser observado.

Esse fato sugere que a AmB modifica seu estado de agregação quando incorporada na ME indicando a formação de monômeros do fármaco e sua interação hidrofóbica da cadeia insaturada de carbonos da AmB com as gotículas da ME.

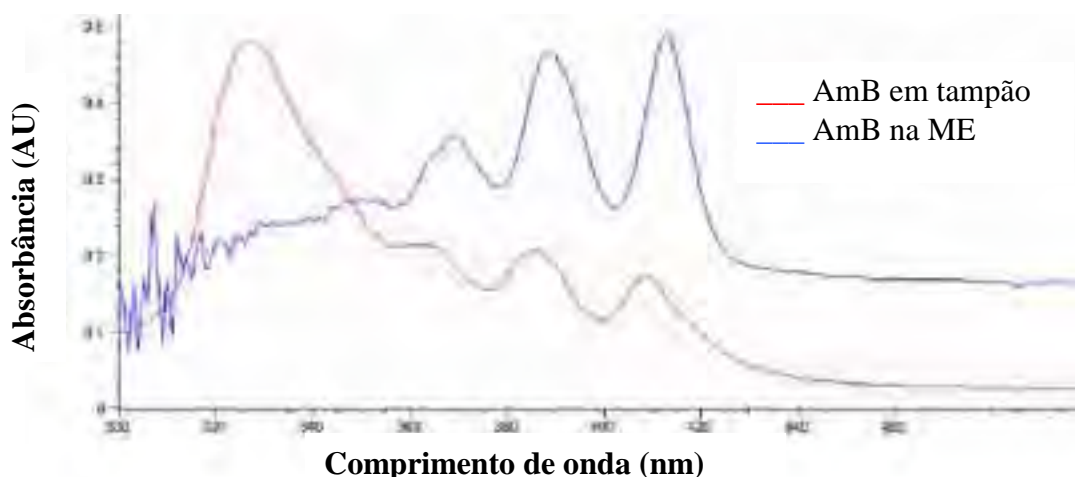


Figura 52: Comparação dos espectros de absorção da AmB em tampão e incorporada à ME na concentração $5 \times 10^{-6} \text{M}$ a 406nm.

Através da análise comparativa dos espectros relativos à AmB-tampão, AmB- β -CD e AmB-ME $5 \times 10^{-6} \text{M}$ é visível que tanto a β -CD como a ME são capazes de selecionar monômeros. Porém a ME foi mais eficaz na redução das formas mais tóxicas (agregados) confirmado pela diminuição da intensidade da banda em 327nm.

Embora dos resultados obtidos com a incorporação de AmB na β -CD e na ME tenham sido considerados satisfatórios, a modificação no estado de agregação da AmB não foi total. Nesse sentido, foi realizado ensaio com a incorporação do fármaco nos dois sistemas simultaneamente. Foi preparada uma amostra de AmB em β -CD 13mM. Alíquota dessa solução foi incorporada na ME para alcançar uma concentração de $5 \times 10^{-6} \text{M}$. Uma análise de seu espectro pode ser realizada observando a figura 53.

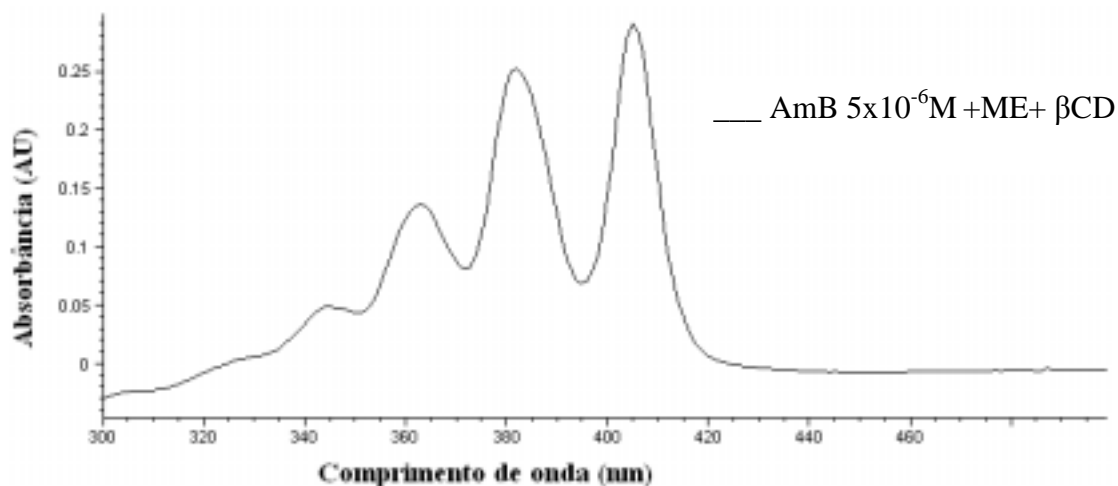


Figura 53: Espectro de absorção da AmB na concentração $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ em ME/β-CD a 406nm.

O espectro da AmB/β-CD/ME (figura 53) permite observar um efeito sinérgico da β-CD/ME, os quais já se mostraram hábeis na diminuição de agregados quando utilizados separadamente. Esse resultado propõe que algumas formas agregadas de AmB que não haviam obtido sucesso na inclusão com a β-CD (figura 51), permaneceram livres na solução (banda em 327nm). Após a incorporação do complexo AmB:βCD na ME ocorreu a ligação dessas moléculas agregadas nas gotículas da fase interna oleosa da ME ou na interface por interação hidrofóbica, e desaparecimento das formas agregadas remanescentes, justificando a utilização dos dois sistemas conjuntamente.

Dessa forma, é esperado que a diminuição da toxicidade ocorra possivelmente devido ao mecanismo de difusão das moléculas de AmB da β-CD e da ME, liberando mais monômeros que agregados diminuindo a ligação dessas formas com órgãos sadios, já que as formas auto-associadas da AmB são hábeis na ligação com o colesterol das células de mamíferos (TABOSA DO EGITO et al., 1996).

Quando a AmB em concentração $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ foi incorporada à solução de β-CD não houve modificação significativa no espectro, comparado ao fármaco na mesma

concentração incorporado ao tampão (figura 54). Houve inicialmente um aumento significativo nos valores de absorbância. As amostras foram mantidas em repouso por 48h e um novo espectro foi obtido (figura 55) no qual é visível a diminuição de absorção em 365, 388 e 409nm assim como o desaparecimento da banda em 327nm característica de formas agregadas.

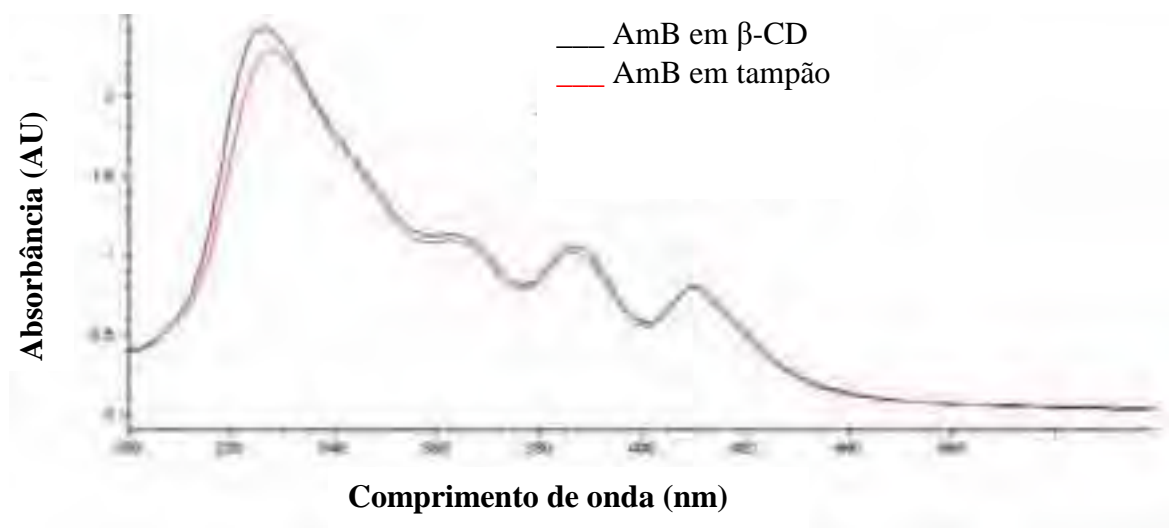


Figura 54: Espectro de absorção da AmB na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ em tampão fosfato 50mM pH 7,4 e em β -CD na mesma concentração, a 406nm.

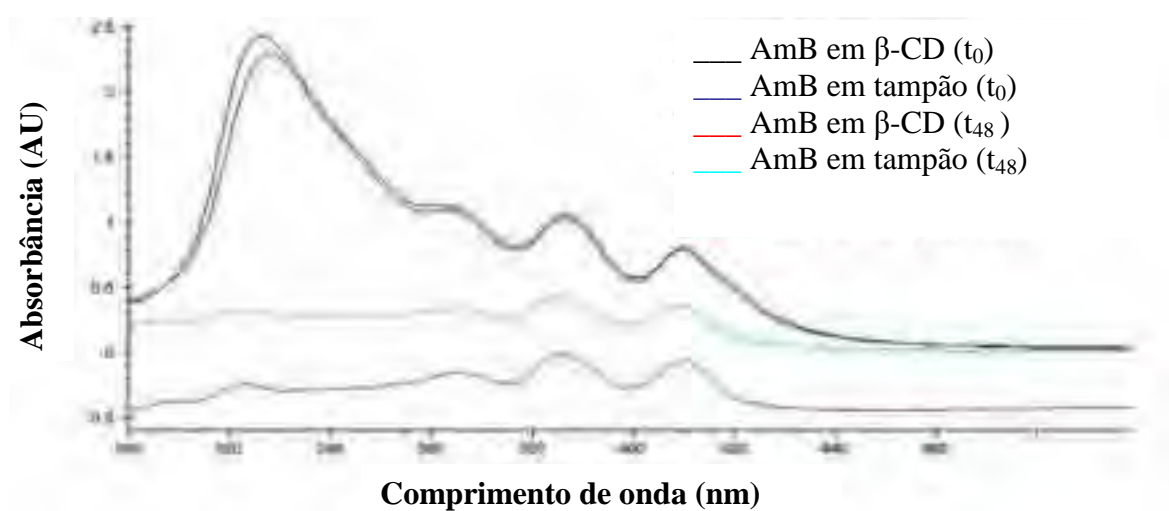


Figura 55: Espectro de absorção da AmB na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ em tampão fosfato 50mM pH 7,4 e em β -CD tempo zero e após 48 horas, a 406nm.

Acompanhando os fenômenos descritos anteriormente, ocorreu a formação de precipitado na formulação após 48h da preparação. A redução da absorção pode ser atribuída ao fato de não ter ocorrido total complexação do fármaco com a CD. Uma porção de AmB permaneceu insolúvel no sistema, precipitando.

Resultados semelhantes foram obtidos com a incorporação de AmB $5 \times 10^{-5} \text{M}$ em hidroxipropil beta-ciclodextrinas (HP β -CD). Uma banda em 327nm pode ser observada no espectro relativo ao fármaco em tampão (figura 56).

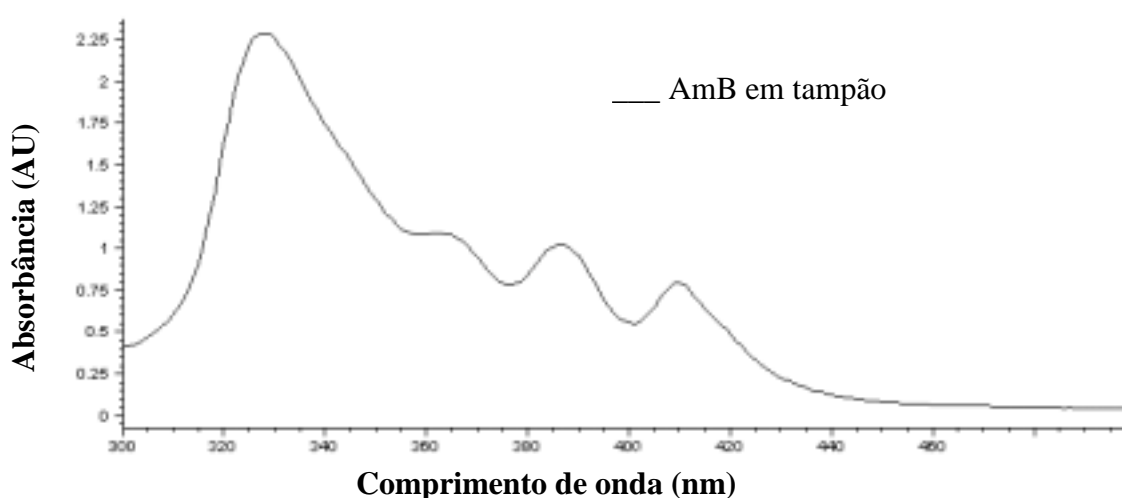


Figura 56: Espectro de absorção da AmB na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ em tampão fosfato 50mM pH 7,4 a 406nm (t_0).

Com a incorporação de AmB em HP β -CD houve inicialmente uma redução significativa na absorção da banda em 327 nm prevalecendo as bandas em 365, 388 e 411 nm. Embora tais resultados indiquem a seleção de formas monoméricas de AmB pela HP β -CD, também foi observada a formação de precipitado no fundo da cubeta após 48 horas.

Os espectros sugerem que algumas moléculas de AmB foram incorporadas na cavidade das HP β -CD e que as formas oligoméricas que não complexaram com a CD permaneceram insolúveis e precipitaram, assim como ocorreu com as β -CD. As leituras foram realizadas em tempo zero e após 48 h (figura 57).

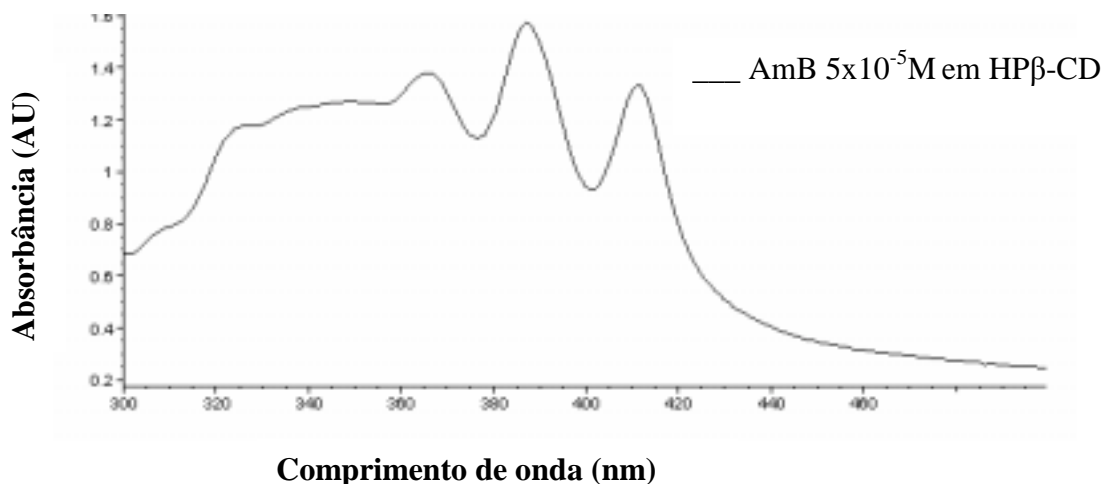


Figura 57: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-5} M em HPβ-CD, a 406nm após 48 h (t_{48}).

Uma amostra preparada nas mesmas condições foi submetida a consecutivas filtrações em membrana $0,2 \mu\text{m}$ em intervalos de 1 min., durante 30 minutos. Esse ensaio foi realizado a fim de verificar a formação de precipitado, o qual foi confirmado através dos espectros (figura 58) na qual foi possível observar a diminuição dos valores de absorbância da amostra e desaparecimento dos picos em 327nm. As bandas referentes a monômeros permaneceram em 388 e 412nm.

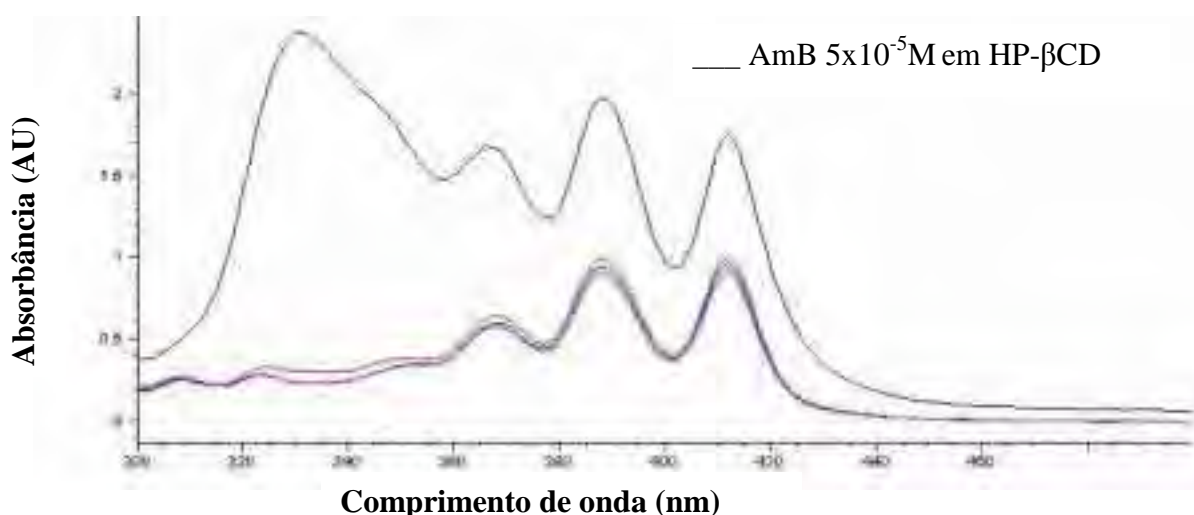


Figura 58: Espectro de absorção da AmB na concentração 5×10^{-5} M em HPβ-CD no momento da incorporação e após filtração em filtro $0,2 \mu\text{m}$ realizadas a cada 1 minuto, em 406nm.

Análise macroscópica da AmB incorporada à ME foi realizada e pode ser observada leve turvação da amostra quando comparada com a ME vazia. Foi avaliada a AmB-ME em concentração $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-5} \text{M}$.

Após 12 horas de sua preparação, a ME com concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ apresentou sobrenadante, sendo reversível após leve agitação.

Através da nefelometria foi possível observar o aumento da turbidez das amostras em função do aumento da concentração do fármaco (figura 59).

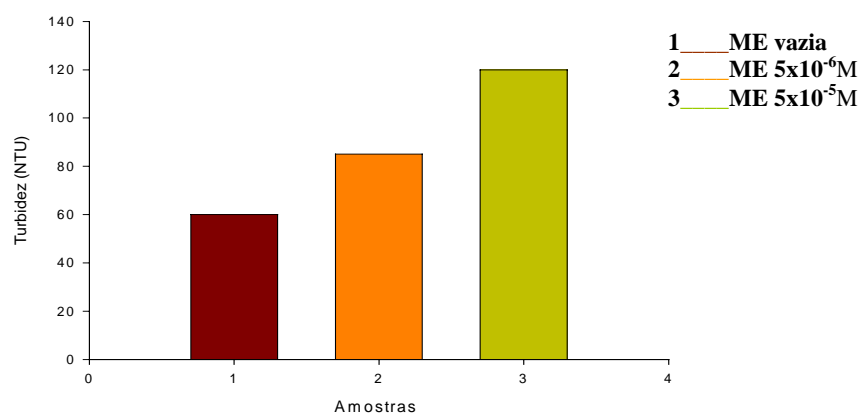


Figura 59: Medidas de turbidez em NTU (unidades nefelométricas de turbidez) das amostras de ME vazia, e com fármaco nas concentrações $5 \times 10^{-6} \text{M}$ e $5 \times 10^{-5} \text{M}$.

É possível notar através da figura 60(A) a transparência da ME vazia pela passagem da luz através do frasco. No segundo frasco, após a incorporação de AmB $5 \times 10^{-6} \text{M}$, é notável que a amostra torna-se mais translúcida que a ME vazia. A incorporação de AmB 5×10^{-5} na ME causa maior turbidez ainda quando comparada com as duas amostras anteriores, mostrando que a turbidez das amostras é dependente da concentração.



Figura 60:(A)Verificação da turbidez das amostras de ME vazia (1), com fármaco, na concentração de 5×10^{-6} M (2) e ME na concentração de 5×10^{-5} M (3).(B) amostras nas concentrações 5×10^{-6} M (4) e 5×10^{-5} M (5) após 24 horas da preparação.

As amostras com o fármaco incorporado nas concentrações 5×10^{-6} M e 5×10^{-5} M foram mantidas em observação por 24 horas e submetidas a uma nova análise. Na β -CD e HP- β CD em concentração 5×10^{-5} M houve a formação de um sobrenadante (figura 60 B).

Pode-se perceber através da figura 60 turbidez na amostra contida no frasco A, devido ao fármaco apresentar-se disperso na ME imediatamente após sua incorporação. Através da figura 60(B), nota-se desestabilização da ME 24 horas após a incorporação de AmB ocorrendo separação de fases, na qual o fármaco provavelmente encontra-se em maior proporção na fase oleosa localizada na porção superior da amostra, uma vez que o mesmo é mais solúvel nessa fase.

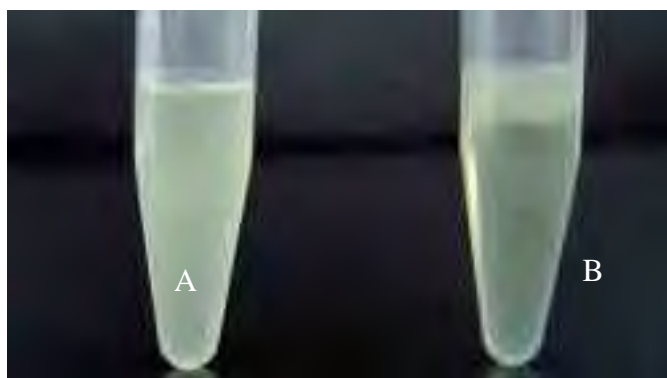


Figura 61: AmB incorporada na ME na concentração 5×10^{-5} M no momento da incorporação (A) e após 24 horas (B).

O aumento da turbidez na amostra com concentração $5 \times 10^{-6} \text{M}$ pode ser atribuída ao aumento do tamanho das gotículas com o aumento da concentração de AmB.

O tamanho das gotículas da fase interna foi determinado. Através da figura 62(A) observa-se que o gráfico é do tipo bimodal apresentando duas populações diferentes de gotículas em relação ao diâmetro médio, situadas em torno de 25nm e outra entre 130-190nm para as MEs sem o fármaco incorporado. Essa população de gotículas maiores também pode ser observada após a incorporação do fármaco (figura 62 B), porém em frequência maior que na amostra anterior. Pode ser constatada ainda, apenas uma população significativa, com diâmetro médio entre 100-150 nm, ocorrendo o desaparecimento de gotículas menores. Esse comportamento sugere desestabilização parcial da ME após incorporação de AmB nessa concentração.

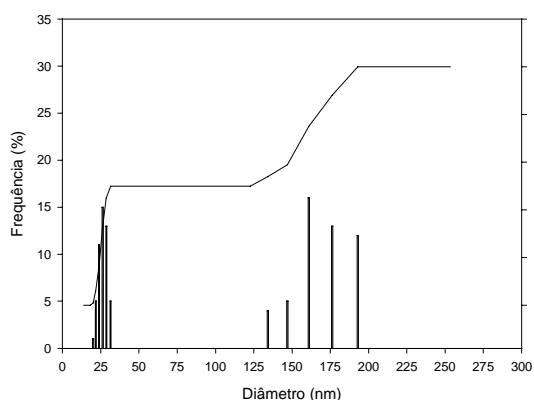


Figura 62(A): Distribuição de tamanho de gotículas de fase interna de ME sem a incorporação de AmB.

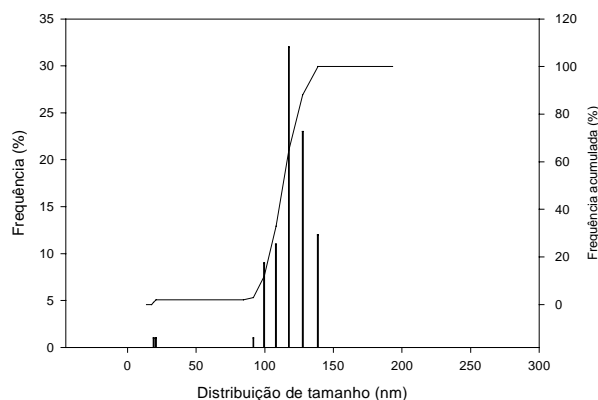


Figura 62(B): Distribuição de tamanho de gotículas de fase interna de ME com fármaco na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$.

Após a caracterização dos sistemas obtidos foi realizado o estudo de incorporação de AmB nas MEs e SEs com valor de EHL 10,99 e proporções de fase oleosa de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 20%. Foram determinados os valores das densidades de cada uma das amostras, assim como os valores de volume de fase (Φ) como mostra a tabela 8

Tabela 8: Determinação da densidade e volume de fase de MEs EHL 10,99, variando a proporção de FA e FO.

<i>FA (%)</i>	<i>Densidades</i>	<i>Volumes de fase (Φ)</i>
82,5	1,04825	0,14
80,0	1,0249	0,18
77,5	1,0232	0,21
75,0	1,0205	0,23
72,5	1,0085	0,27
70,0	1,005	0,30
65,0	0,999	0,35

Para o estudo de incorporação foi elaborada uma curva padrão da AmB em metanol. As determinações foram realizadas em triplicata a 406nm.

Tabela 9: Valores das absorvâncias da AmB em diferentes concentrações.

<i>Concentração AmB ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Medias das absorvâncias (n=3)</i>	<i>Desvio padrão (n=3)</i>
3	0,2397	0,0165
5	0,3313	$8,5540 \times 10^{-3}$
7	0,4705	0,0123
9	0,5822	$6,3589 \times 10^{-3}$
11	0,7410	$8,4054 \times 10^{-3}$
13	0,8622	$1,9252 \times 10^{-3}$
15	0,9656	0,0131

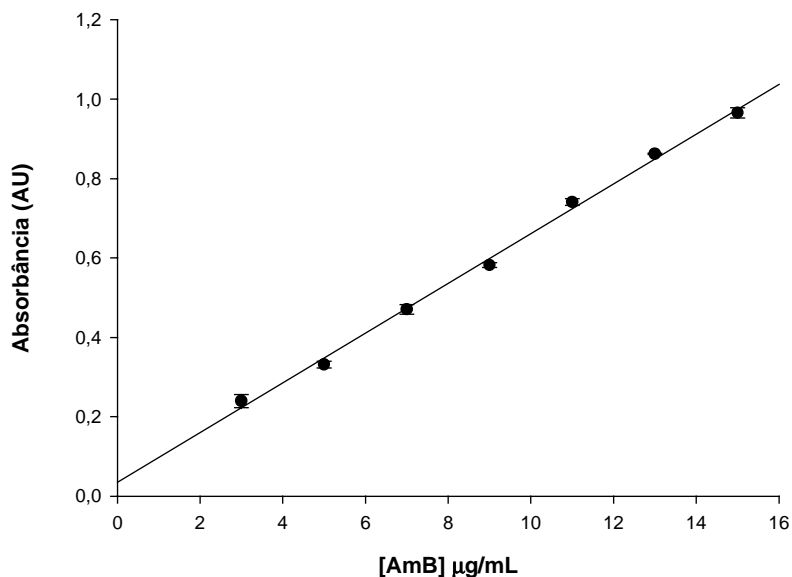


Figura 63: Curva padrão da (AmB) em metanol, obtida por espectrofotometria VIS, detecção em $\lambda = 406$ nm (n=3). $r^2 = 0,996869$

$$Abs = a \cdot x + b$$

$$Abs = 0,063 \cdot x + (0,0348)$$

O estudo foi realizado em amostras com proporção fixa de tensoativo (15%) alcançando valor de EHL igual a 11, variando-se o volume de fase interna em 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15,0 e 20,0 %. Após o fármaco ser adicionado em excesso às amostras, as mesmas foram sonicadas e centrifugadas a 11.180 (x g). O sobrenadante foi retirado, diluído e as leituras foram realizadas por espectrofotometria a 406nm.

Baseado nos resultados obtidos, foi construído um gráfico relacionando a concentração de AmB em função volume de fase (Φ) de cada amostra analisada (figura 64).

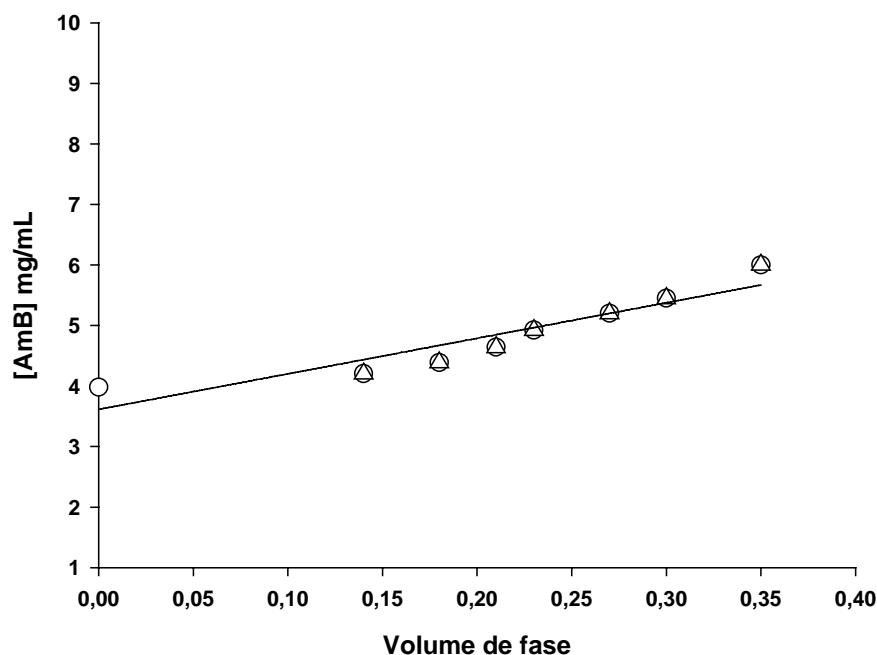


Figura 64: Incorporação de AmB nas MEs e SEs constituídas de 15% FS:TW-20 4,48:5,52 como MT, 10% CP-200:CO 9,9:0,1 como FO e 75% tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA. As determinações foram realizadas em função do volume de fase.

Os resultados da figura 64 mostram que a incorporação da AmB no sistema microemulsionado é dependente de proporção de fase oleosa no sistema, aumentando com o volume de fase. Pode-se observar que a incorporação da AmB aumentou linearmente com o volume de fase nas condições experimentais utilizadas no estudo. Considerando que a proporção de tensoativo foi mantida constante, o aumento da incorporação do fármaco reflete diretamente a capacidade da fase oleosa da microemulsão de solubilizar a AmB. O intercepto da curva no eixo y representa a solubilidade da AmB na ausência da fase oleosa da microemulsão, ou seja, o efeito da mistura de tensoativos usados na estabilização na solubilização da AmB. Assim, como a AmB apresenta solubilidade parcial na fase aquosa acrescida dos tensoativos, já que a proporção de fase oleosa é nula, o intercepto da curva com o eixo y representa incorporação de 3,615mg/mL, valor muito próximo ao obtido experimentalmente, de 3,98mg/mL.

Dessa forma amostras com volumes de fase a partir de 0,30 passam por uma transição de fase ME para SE. É fato conhecido que nessa fase SE o tamanho das gotículas é maior que de uma ME, sugerindo aumento de área superficial o que facilita a interação do fármaco, aumentando assim a incorporação. Todos esses fatores são de extrema importância para a realização dos estudos de liberação do fármaco dos sistemas selecionados. O perfil de liberação da AmB incorporada às ME e subemulsões com variação de proporção de fase oleosa situando-se entre 2,5 e 20% foi estudado.

Testes de dissolução *in vitro* são uma importante ferramenta de controle de qualidade em diferentes ciclos de vida de um medicamento. Nos primeiros estágios do desenvolvimento farmacotécnico são úteis para identificar variáveis críticas, escolher entre diferentes formulações, aperfeiçoá-las e fazer avaliações de risco como no caso de sistemas de liberação controlada. Os testes de dissolução têm sido empregados com sucesso para formas farmacêuticas de liberação imediata e os testes gerais descritos na farmacopéia são normalmente suficientes para avaliar uma nova formulação. Para casos de formas de liberação controlada vários fatores devem ser levados em consideração como por exemplo o mecanismo de liberação, propriedades físico-químicas, escolha do meio receptor, agitação e condições *sink*.

Na escolha do meio receptor para formas de liberação prolongada de fármacos pouco solúveis, pode-se lançar mão do uso de um solubilizante como um tensoativo (MARCOLONGO, 2003).

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

condition”, o que significa não estar sob influência do gradiente de concentração do fármaco na solução (GENNARO, 2000).

Para que o experimento estivesse sob “sink condition”, foi utilizada como fase receptora solução tampão fosfato 50mM pH 7,4 isotônico adicionado de tensoativo. A quantidade de fármaco a ser solubilizado na fase receptora foi calculada em função da massa incorporada nas formulações e do volume do meio (KHAN, 1996).

Para a quantificação por espectrofotometria VIS, foi elaborada uma curva padrão na solução receptora, nas concentrações descritas na tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros utilizados para elaboração da curva padrão da AmB

<i>Concentração AmB($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Medias das absorvâncias (n=3)</i>	<i>Desvio padrão (n=3)</i>
2	0,1057	$3,9145 \times 10^{-4}$
4	0,2125	$1,7838 \times 10^{-3}$
6	0,2884	$3,3369 \times 10^{-3}$
8	0,3805	$1,5078 \times 10^{-3}$
10	0,4648	$3,1891 \times 10^{-3}$
12	0,5467	$1,8411 \times 10^{-3}$
14	0,6445	$3,2906 \times 10^{-3}$
16	0,7235	$2,9123 \times 10^{-3}$
18	0,8128	$8,3600 \times 10^{-3}$
20	0,9031	$4,0362 \times 10^{-3}$
22	0,9824	$3,3630 \times 10^{-3}$
24	1,0613	0,0110
26	1,1444	0,0218
28	1,2093	$5,5245 \times 10^{-3}$

A partir desses valores foi uma curva padrão em tampão fosfato 50mM acrescida de 1% de laurilsulfato de sódio.

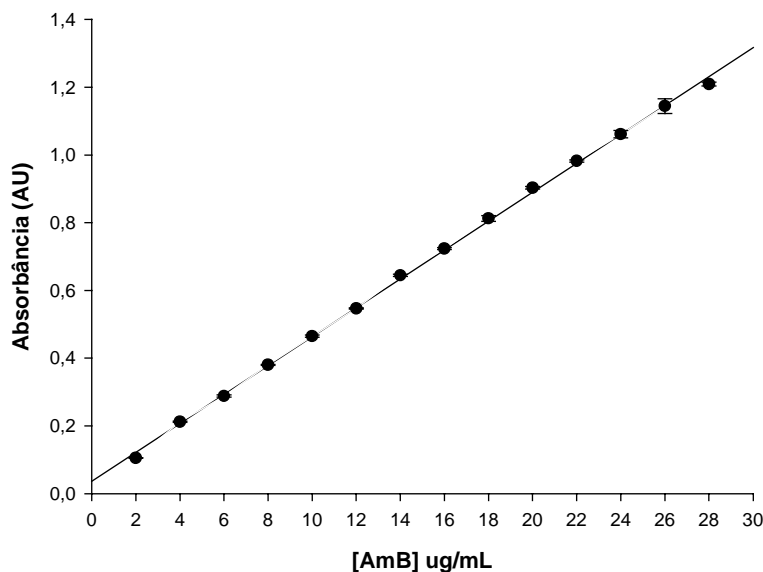


Figura 65: Curva padrão da AmB em tampão fosfato pH 7,4 50mM e laurilsulfato de sódio (solução receptora) obtida por espectrofotometria, detecção por VIS em 412 nm (n=3). $r^2 = 0,9992$

$$Abs = a \cdot x + b$$

$$Abs = 0,0426758 \cdot x + 0,0370002198$$

Os valores das absorbâncias obtidos por espectrofotometria foram aplicados na curva padrão da AmB em tampão fosfato 50mM pH 7,4 a fim de se obter a quantidade de AmB liberada.

O experimento foi realizado avaliando a quantidade de AmB que atravessa a membrana de acetato de celulose e passa para o meio receptor.

Os perfis de liberação das amostras foram obtidos em relação às concentrações de AmB das preparações aplicadas na célula de difusão com as concentrações de AmB liberadas no meio de dissolução. As determinações foram feitas em triplicata. Os perfis de liberação estão ilustrados nas figuras a seguir.

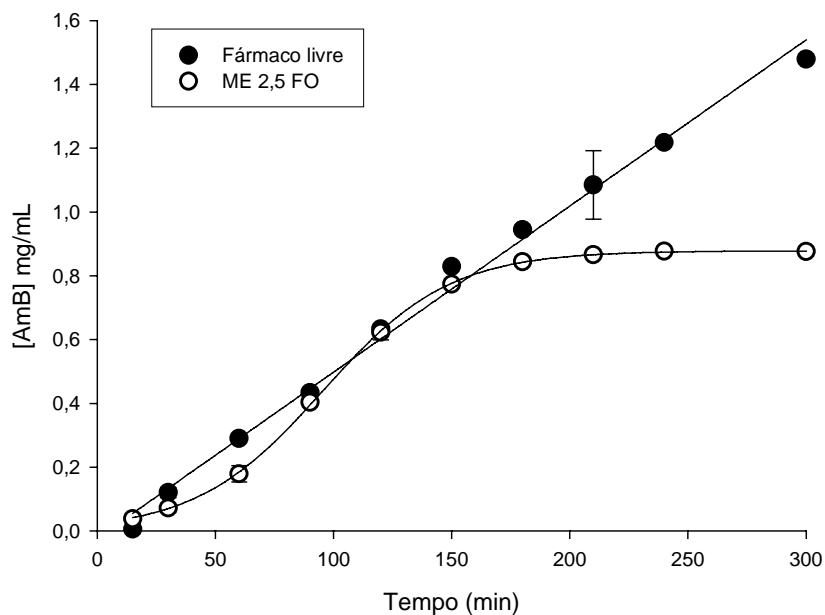


Figura 66: Perfil de liberação da AmB de ME composta de 15% de MT (FS:TW-20 4,49:5,51), EHL 10,99, 2,5% de FO (CO:CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA comparado com a liberação da AmB em solução.

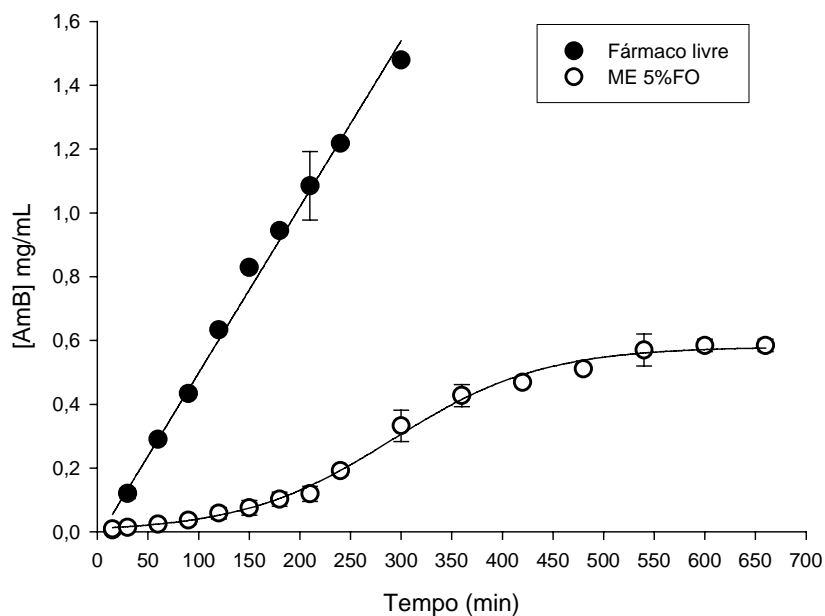


Figura 67. Perfil de liberação da AmB de ME composta de 15% de MT (FS:TW-20 4,49:5,51), EHL 10,99, 5% de FO (CO:CP-200 0,1:9,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA comparado com a liberação da AmB em solução.

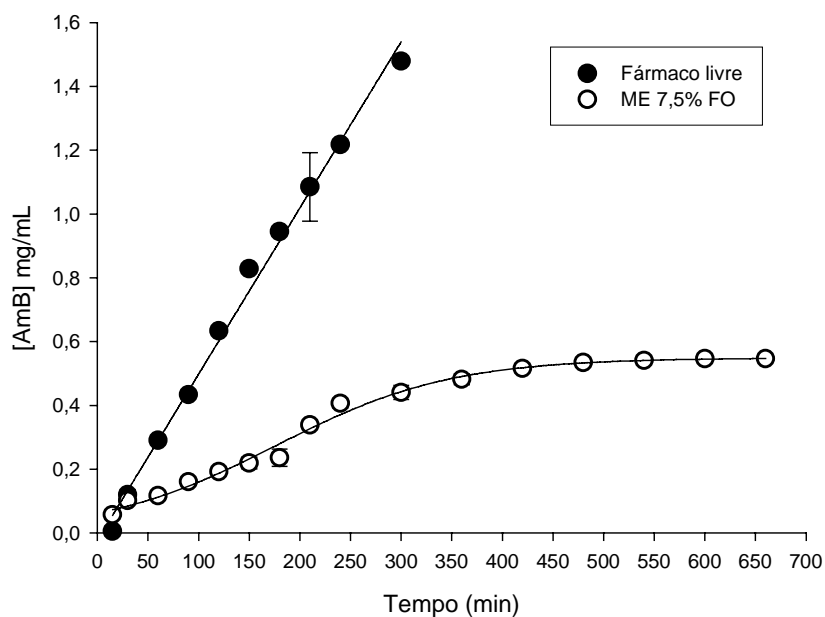


Figura 68. Perfil de liberação da AmB de ME composta de 15% de MT (FS:TW-20 4,49:5,51), EHL 10,99, 7,5% de FO (CO:CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA comparado com a liberação da AmB em solução.

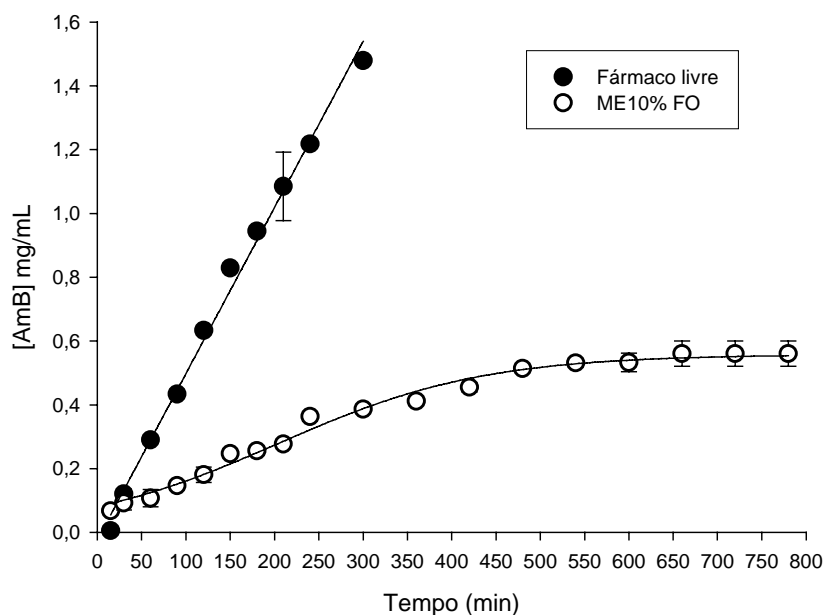


Figura 69. Perfil de liberação da AmB de ME composta de 15% de MT (FS:TW-20 4,49:5,51), EHL 10,99, 10% de FO (CO:CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA comparado com a liberação da AmB em solução.

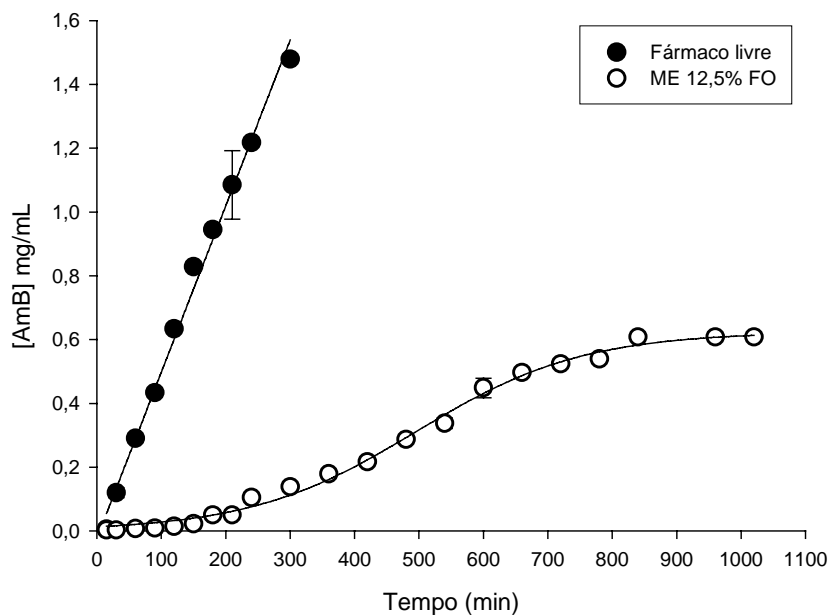


Figura 70. Perfil de liberação da AmB de ME composta de 15% de MT (FS/TW-20 4,49:5,51), EHL 10,99, 12,5% de FO (CO:CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA comparado com a liberação da AmB em solução.

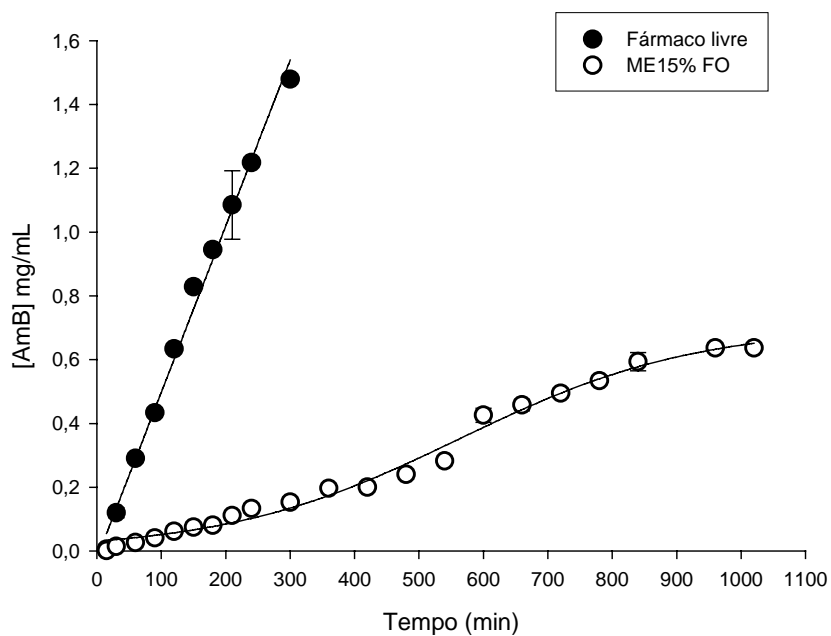


Figura 71. Perfil de liberação da AmB de SE composta de 15% de MT (FS/TW-20 4,49:5,51), EHL 10,99 15% de FO (CO:CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA comparado com a liberação da AmB em solução.

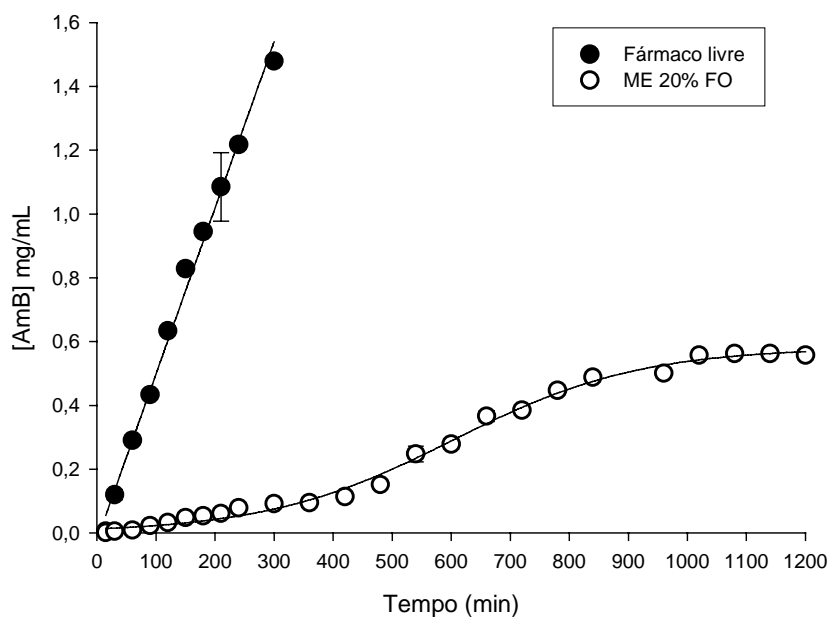


Figura 72. Perfil de liberação da AmB de SE composta de 15% de MT (FS:TW-20 4,49:5,51), EHL 10,99 20% de FO (CO:CP-200 0,1:99,9) e tampão fosfato 50mM pH 7,4 como FA comparado com a liberação da AmB em solução.

Através das figuras 66 a 72 podem ser comparadas as curvas resultantes do ensaio de liberação de uma solução de AmB com as curvas das preparação das MEs (2,5 a 12,5% FO) e SEs (15,0 e 20,0% FO) acrescidas do fármaco. As curvas evidenciam o comportamento das MEs e SEs em retardar a liberação do fármaco. Como pode ser visto nos estudos de incorporação, existe uma forte interação entre a AmB e a fase interna oleosa visto que aumento no volume dessa fase implica no aumento da concentração de AmB solubilizada.

ados de microscopia eletrônica e cromatografia de exclusão descrevem que há formação de complexo estável AmB-CO. Em alguns sistemas de liberação formados de estruturas em forma de vesículas fechadas, esse complexo AmB-CO confere maior rigidez à bicamada lipídica (HILERRY, 1997). No caso das gotículas das MEs e SEs, esse fato

sugere que o CO presente aumenta o tempo de difusão da AmB da gotícula prolongando dessa forma a liberação a liberação.

As curvas relativas à AmB em solução, apresentam de forma nítida um perfil de liberação mais rápido comparado com AmB incorporada aos sistemas micro e subemulsionados. Além disso, na combinação de tensoativos empregada nas formulações, há tensoativo hidrofílico (TW-20) em maior proporção, o que torna a interface mais polar retardando a saída do fármaco das gotículas. A literatura mostra que a composição do tensoativo está diretamente relacionada com o grau de hidrofilia/lipofilia do tensoativo final (CALDERO et al., 1997; ROCCA et al.,1999). A característica mais importante evidenciada nos resultados foi o parâmetro de retenção da substância ativa pela fase interna oleosa das amostras, a qual proporciona a liberação em uma faixa mais ampla de tempo quando comparada à AmB em solução.

Nas MEs com proporção de fase interna reduzida, há um menor número de gotículas por unidade de volume quando comparadas com amostras com volume de fase interna mais elevado. Independente do volume de fase interna de cada amostra, os quais variam de 2,5 a 20,0%, foi disponibilizada na célula de difusão a mesma concentração de AmB. Nos sistemas compostos por menor volume de fase interna, as moléculas do fármaco estão provavelmente ligadas a um grande número de gotículas, enquanto que um maior volume de fase interna pode originar um número de gotículas além do necessário para a concentração de fármaco incorporada. Dessa forma, pode ser sugerido que um menor volume de fase leva o fármaco a sair da gotícula com maior velocidade, assim como o volume de fase interna elevado deve proporcionar maior retenção do fármaco nas gotículas. De uma forma geral, de acordo com Einstein Stokes, quanto menor o tamanho da gotícula, maior o coeficiente de difusão, maior a superfície total da fase dispersa e, portanto, maior a velocidade de liberação (LAVRADOR et al., 2002). Esse fato pode ser

visualizado na a ME com 2,5% de fase oleosa (figura 65), a qual nos primeiros 180 min. não apresentou perfil significativamente diferente daquele que contém o fármaco em solução. Desse modo, a proporção de fase oleosa é muito baixa para proporcionar efeito reservatório a esse sistema, promovendo a liberação do fármaco em 5h.

As amostras compostas de 5,0 e 7,5% de fase oleosa (figuras 67 e 68) apresentaram perfil de liberação semelhante, liberando a substância ativa em 11h e 30 min., tempo relativamente menor que as amostras com volume de fase interna maior, sendo a composta de 10,0% de FO em 13h 3 30 min., as compostas de 12,5 e 15% de FO em 18h e a com 20% de FO, apresentando o perfil de liberação mais lento, em 20h.

De acordos figuras 67 a 72 podemos observar as curvas com perfil sigmoidal. Esse fato pode indicar que a liberação esteja ocorrendo em duas etapas. A primeira etapa envolvendo a saída da AmB de estrutura interna das ME ou SEL e a segunda envolvendo a passagem do fármaco livre para o meio receptor após atravessar a membrana. O passo limitante para o processo de liberação refere-se à saída da AmB de dentro das gotículas para o meio externo. A partir desse passo, a passagem do fármaco através da membrana por difusão, ocorre envolvendo um gradiente de concentração entre a fase aquosa e o meio externo.

Fica, portanto, com esse experimento, evidenciado o efeito das MEs e SEs em retardar a liberação da AmB. Esse comportamento pode ser explicado pela associação do fármaco com a fase interna da ME provocando retenção da AmB nas gotículas, em razão da sua maior afinidade e estabilidade nessa fase. Esse fato, pode ser evidenciado em virtude de os sistemas em estudo apresentarem capacidade de liberar cerca de 45% do fármaco total dispensados na célula de difusão, apresentando um elevado valor de retenção.

Dessa forma, podemos avaliar a importância do sistema microemulsionado na modulação da velocidade de liberação. No caso da AmB, a liberação apresentou-se mais lenta, sendo portanto prolongada.

Concluindo, MEs podem modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e absorção e controle da biodisponibilidade. Como sistemas reservatórios, podem alterar os parâmetros farmacocinéticos diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos.

6. CONCLUSÕES

- ◆ A utilização de PLU/FS proporcionou a formação de pequena região do tipo ME O/A, e vasta região de EM com alta viscosidade.
- ◆ Foi possível a obtenção de microemulsão O/A e A/O utilizando FS como tensoativo e TW-20 como co-tensoativo em várias proporções.
- ◆ O estudo do EHL para os tensoativos FS e TW revelou que a proporção ideal para proporcionar maior estabilidade ao sistema é 44,89%/55,11% respectivamente, concluindo um valor de EHL igual a 11.
- ◆ A fosfatidilcolina de soja presente na ME não apresenta hidrólise significativa após 60 dias de sua preparação.
- ◆ As MEs estudadas comportam-se como fluidos Newtonianos e as viscosidades das mesmas permanecem constantes após tensão aplicada.
- ◆ Através da complexação da AmB com β -CD e HP β -CD é possível um aumento parcial na proporção relativa de monômeros com conseqüente diminuição na proporção de formas agregadas na concentração 5×10^{-6} M.
- ◆ A incorporação de AmB em ME aumenta a proporção relativa de monômeros com conseqüente diminuição na proporção de formas agregadas na concentração 5×10^{-6} M, porém não completamente.
- ◆ Ocorre efeito sinérgico entre β -CD e ME na redução de formas agregadas de AmB quando incorporada nesses sistemas simultaneamente de forma efetiva.
- ◆ Ocorre precipitação da AmB na concentração 5×10^{-5} M quando incorporada em ciclodextrinas ou na ME após a preparação.

- ◆ Há a desestabilização da ME quando acrescida de AmB na concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$, ocorrendo separação de fases.

- ◆ O incorporação de AmB nas MEs e SEs é maior quanto maior é a proporção de fase oleosa no sistema.

- ◆ As MEs e SEs estudadas comportam-se como sistemas reservatórios ocasionando retenção do fármaco na fase oleosa, a qual aumenta com o aumento da proporção de fase proporcionando liberação prolongada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M.J. Particle analysis of concentrated phospholipidic microemulsions II. Photo correlation spectroscopy. **AAPS Pharm. Sci.**, v.2, n.3, p.1-10, 2000. Disponível em: <<http://www.pharmasci.org>>. Acesso em:20 mar.2005.

ABOOFAZELLI, R.; LAWRENCE, C.B.; WICKS, S.R., LAWRENCE, M.J. Investigation into the formation and characterization of phospholipids microemulsions: III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecitin-isopropyl miristate and either an alcanoic acid, amine, alkanediol, polyoxyethylene glycol alkyl ether or alcohol as surfactant. **Int. J. Pharm.** v.111, p.63-72, 1997.

AHMED, M.; AL SABAGH. The relevance HBL of surfactants on the stability of asphalt emulsion. **Colloids Surf.** v.204, p. 73-83, 2002.

ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T.; Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics and modeling.Review. **J. Colloid Interf. Sci.**, v. 96, p.1-46, 1995.

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

AL SABAGH, A.M. The relevance of surfactants on the stability of asphalt emulsions. **Coll. Surf A: Physicochem Eng. Aspects**, v.204, n.1-3, p.73-83, 2002.

ANDERSON, B.C.; PANDIT, N.K.; MALLAPRAGADA, S.K. Understanding drug release from poly (ethylene oxide)-b-poly (propylene oxide)-b-(ethylene oxide gels. **J. Control. Release.**, v.70, p.125-167, 2001.

ANDREO FILHO, N.; ODA, C.Y.; SCARPA, M.V.;OLIVEIRA, A.G. Quantitative determination of phosphatidylcholine by high performance liquid chromatography using silica column. **Rev.Ciênc.Farm.** São Paulo,v.20, p. 107-115, 1999.

ARAÚJO, I.B. **Novos Sistemas Carreadores para Anfotericina B**: Estudo dos parâmetros tecnológicos e fármaco-toxicológicos. Natal, 2005.112f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A.T. **Surfactants systems**: their chemistry, pharmacy and biology. London: Chapman & Hall, 1983. p.48-739.

BANKER, G.S.; ANDERSON, N.R. Tablets. In : LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H., KANIG, J.L. **The theory and practice of industrial pharmacy**. 3rded. Philadelphia: Lea & Febiger, 1996. p. 293-5.

BARBER, T.A. **Pharmaceutical particulate matter**: analysis and control. Buffalo Grove, IL: Interpharm Press, 1993, p. 115.

BEKERSKY, I.; FIELDING, D.B.; LAWRENCE, I. Lipid-based amphotericin B formulations: from animals to man. **Res. Focus/Rev.** v. 2, p. 230-236, 1999.

BEUCAGE, G. **J.Apl.Crystallorgr.**, v.28, p.717-728, 1995.

BERNI, M.G.; LAWRENCE,C.J.; MACHIN,D. A review of the rheology of the lamellar phase in surfactant systems. **Adv Colloid Interf. Sci.**, v.98, p.217-243, 2002.

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

BOSWELL G. W., BUELL D., BEKERSKY I. AmBisome (Liposomal Amphotericin B): a comparative review. **J. Clin. Pharm.**, v. 38, p.583-592, 1998

BOURREL, M.; SCHECHTER, R.S. Microemulsion and related system. Formulation, solvency, and physical properties. New York: Marcel Dekker, 1988. v.30.

BRINKER, C.J.; SCHERER, G.W. **Sol-gel science**: the physics and chemistry of gel processing. Los Angeles: Academic Press, 1990.

BRZOZOWSKA, I.; FIGASZEWSKI, Z.A. The equilibrium of phosphatidylcholine – cholesterol in monolayers at the air/water interface. **Colloids Surf. B.**, v.23, p.51-58, 2002.

CALDERO, G.; GARCIA-CELMA, M.J.; SOLANS, C.; PLAZA, M.; PONS, R. Influence of composition variables on the molecules diffusion from highly concentrated water-in-oil emulsions (gel-emulsions). **Langmuir**, v.13, p.385-390, 1997.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/a emulsions. **Adv.Colloid Int. Sci.**, v.107, p.125-155, 2004.

CERA, R.F.L. Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsões lipídicas: Formulação e liberação “in vitro”. Araraquara, 2001.145f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2001.

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

CONSTANTINIDES, P.P. Lipid microemulsion for improving dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. **Pharm. Res.**, v.12, p.1561-1572, 1995.

CONSTANTINIDES, P.P.; WELZEL, G.; ELLENS, H.; SMITH, P.L.; STURGIS, S.; YIV, S.H.; OWEM, A.B. Water in oil microemulsions containing medium-chain fatty acid/salts: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation. **Pharm. Res.**, v.13, p.210-215, 1996.

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

CRUZ, D.J.O.; UCKUN, M.F. Gel microemulsion as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v.64, p.113-123, 2001.

DALMORA, M.E.A.; OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. **Int. J. Pharm.**, v.184, p.157-164, 1999.

DALMORA, M.E.A.; DALMORA, S.L.; OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. *In vitro* drug release and *in vivo* topical anti-inflammatory effect. **Int. J. Pharm.**, v.222, p.45-55, 2001.

DISMUKES, W.E. Guidelines from the infections diseases society of américa. **Clinical infections disease.**, v.30, p.653-657, 2000.

DYNAROWICZ - LATKA, P.; KATARZYNA HAC - WYDRO. Interaction between phosphatidylcholine and cholesterol in monolayers at the air/water interface. **Colloids surf. B.**, v.37, 9.21-25, 2004.

EDMOND, M.B.; WALLACE, S.E.; Mc CLISH, D.K.; PFALLER, M.A.; JONES, R.P.; WENZEL, R.P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v.29, p.239-244, 1999.

EGITO, E.S.T; FESSI, H., APPEL, M., BARRATT, G., LEGRAND, P., BOLARD, J. DEVISSARGUET, J. A morphological study of an Amphotericin B. emulsion-based delivery system. **Int. J. Pharm.** v.145, p. 17-27, 1996.

EGITO, E.S.T.; APPEL, M.; FESSI, H., BARRATT, G.; PUISIEUX, F.; J. DEVISSARGUET, J.P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a new amphotericin B emulsion based delivery system. **J. Antimicrobial Chemother.**, v38 n.3, p.485-497, 1996.

ELLIS, M. Invasive fungal infections:envolving challengers for diagnosis and therapeutics. **Mol. Immunol.**, v 38, p.947-957, 2001.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR,P.; MITTAL, K.L.; Ed. **Handbook of microemulsion science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.7, p.185-246.

FA, N.; BABAH, V.G.; STÉBÉ, M. The release of caffeine from hydrogenated and fluorinated gel emulsions and cubic phases. **Colloids Surf. A: Physicochem Eng. Aspects**, 243, p.117-125, 2004.

FAHR, A.; KISSEL, T. Mikropartikel und implantate: arzneiformem zur parenteralen application. In: MULLER, R.H., HILDEBRAND, G.E. **Pharmazcutische technologie: moderne arzneiformem**. Stuttgart: Wissenschaftliche lagsgesellschaft, 1998, p. 243-258. In: FORMARIZ, T.P. **Incorporação da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa *in vitro* através de cultura de células**. Araraquara, 2004.199f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, 2004.

FENDLER, J.H. Membrane mimetic chemistry. New York: Wiley-Interscience, 1982, p.545.

FERNANDES, C. M.; VEIGA, F. J. B. As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica.III. Preparação e caracterização de complexos de inclusão no estado sólido. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.20, n.2, p. 375-387, 1999.

FORMARIZ, T.F. Incorporação de doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa in vitro através de cultura de células. Araraquara, 2004.199f. Universidade Estadual Paulista,. 199f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2004.

FROKJAER, S., HJORTH, E.L., WORTS, O. Stability testing of liposomes during storage. In: GREGORIADIS, G. **Liposome technology**. Boca Raton: CRC-PRESS, 1989. v.1, Cap.17, p.241-243.

FUKUI H.; KOIKE T.; SAHEKI A.; SONOKE S.; SEKI J. A novel delivery system for amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS®). **Int .J. Pharm.**, v. 265, p. 37–45, 2003.

GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **Int. J. Pharm.**, 212, p. 73-80, 2001.

GASCO, M.R.; GALLARATE, M.; PATTARINO, F. On the release of prednisone from oil water microemulsion. **II Fármaco.**, Ed. Prat. v.43, p.325-330, 1989.

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

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

GIBALDI, M., FELDMAN, S. Mechanism of surfactants effects on drug absorption. **J. Pharm. Sci.**, v.59, p.89-579, 1970.

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

HASKELL, R.J. Characterization of submicron system via optical methods. **J. Pharm. Sci.**, v.87, p.125-129, 1998.

HATEFI, A., AMSDEN, B. Biodegradable injectable in-situ forming drug delivery systems. Review. **J. Control. Rel.**, v.80, p. 9-28, 2002.

HILLERY, A. M. Supramolecular lipidic drug delivery systems: from laboratory to clinic. A review of the recently introduced commercial liposomal and lipid-based formulations of Amphotericin B. **Adv. Drug. Del. Rev.**, v. 24, p. 345-363, 1997.

HYDE, S.; ANDERSSON, S.; LARSSON, K.; BLUM, Z.; LANDH, T.; LIDIN, S.HINHAM, B.W. **The language of shape: the role of curvature in condensed matter: physics, chemistry and biology.** Amsterdam: Elsevier Science B.1997.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN X.; TANG, J.; WANG, J, DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of Amphotericin B in sterol-free and cholesterol-or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. **Biophys. J.**, v. 83, n.6, p.3245-3255, 2002.

ISRAELACHVILI J.N. **Intermolecular and surface forces**. London : Academic Press, 1985. p.112-114.

ISRAELACHVILI J.N.; MITCHEL, D.J.; NINHAM, B.W.J. **Chem. Soc. Faraday Trans.** v.72, p. 1525, 1976.

KABANOV, A V.; BATRAKOVA, E., ALAKHOV, V.Y. Pluronic[®] block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. Review. **J. Control. Rel.**, v.82, p. 189-212, 2002.

KHAN, M.Z.I.; Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with *in vivo* data: challenges and opportunities. **Int. J. Pharm.**, v.140, p.131-143, 1996.

KAYSER, O.; OLBRICH, C.; YARLEY, V; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. **Int. J. Pharm.**, v.254, p.73-75, 2003.

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

KIBBE, A.H.(Ed.). **Handbook of pharmaceutical excipients**, 3rded., London: Pharmaceuticas Press, 2000, p.138-139, 292-293, 412-415.

KONLOYIANNIS, D.P., MONTADAKIS, E., SAMONIS, G. Systemic mycoses in the immuno compromised host: on update in antifungal therapy. **J. Hosp. Infec.**, S3, p. 243-258, 2003.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p.35.

KOVARIK, J.M.; MUELLER, E.A.; VAN BREE, J.B. TETZLOFF, W.; KUTZ, K. Reduced inter-and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. **J. Pharm. Sci.** v.83, p.444-446, 1994.

KULLBERG, B.J., PAUW. B.C. therapy of invasive fungal infections. **Netherlands J. Med.**, p.55, 118-127, 1999.

LAMAALLAN, S.; BATALLER, C.; DICHARRY, C.; LACHAESE, J. Formation and stability of miniemulsions produced by dispersion of water/oil surfactants concentrates in a large amount of water. **Colloids Surf.A: physicochemical and engineering aspects.** v.270-271, p.44-51, 2005.

LASIC, D.D., PAPAHAJOPOULOS, D. **Medical applications of liposomes**. Ed. Elsevier. Amsterdam, p.182, 1998.

LAVRADOR, C.; ALMEIDA, A.J.; CARDOSO, L.A. Avaliação *in vitro* de um injetável subcutâneo para liberação prolongada de um fármaco β -agonista. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v.97, n.541, p.29-34, 2002.

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

LECOMTE, A. Application de la diffusion des rayons-x à l'étude de séparation de phases amorphes et aux procédés sol-gel. 1988. Tese (doutorado). L'Université de Limoges, 1988.

LEYK, S.; DEREU, N.; ETSCHENBERG, E.A. Improvement of the gastric tolerance of non-steroidal anti-inflammatory drugs by polyene phosphatidylcholine (Phospholipon 100). **Eur. J. Pharm.**, v.117, p.35-42, 1985.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica, São Paulo, 2003.127f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo., 2003.

MARTINI, M.C.; BOBIN, M.F.; FLANDIN, H. Role des microemulsions dans absorption percutanée de tocoferol. **J. Pharm Belg.**, v.39, p.348-354, 1984.

MILLIE, P., LANGLET, J., BERGES, J., CAILLET, J., DEMARET, J.P. Self-association of Amphotericin B in water. Theoretical energy and spectroscopy studies. **J. Phys. Chem. B.** v.103, n.49, p.10883-10891, 1999.

MINÕES, J.JR; CONDE, O.; DYNAROWICZ,-LATKA,P.; CASAS, M. Penetration of amphotericin B into DOPC monolayers containing sterols of cellular membranes. **Colloids. Surf A.**, v.270-271, p.129-137, 2005.

MOLLET, H.; GRUBENMANN, A. **Formulation technology**: emulsion, suspension, solid forms. Weinheim: WILEY-VCH, 2001. p.62.

MORENO, M. A. Lyophilized Lecithin Based Oil-Water microemulsions as a new and low toxic delivery system for Amphotericin B. **Pharm. Res.** v.18, p. 344-363, 2001.

MOULIK, S.P.; PAUL, B.K. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. **Adv.Colloid Int. Sci.**, v.78, p. 99-195, 1998.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 58, p. 343–356, 2004.

NIELSEN, J.A. In: BARUCHEL, J.; HODEAN, J.L.;LECHMAN, M.S.; REGNARD, J.R.; SCHLENKER, C. **Diffraction, refraction and absorption of X-rays and neutrons**: a comparative exposition. Paris: Spring Verlag, 1993, p.3-21.

NEW, R.R.C. **Liposomes**: a practical approach. Oxford: University Press, 1997. p.105-113-154-160.

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

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Microemulsões I: Fundamentos Teóricos da formação do Sistema Microemulsionado. **Pharm. Bras.**, v.1, n.8, p.73-79, 2001.

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

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; BUENO, J.H.F.; EVANGELISTA, R.C. Micro e nanocapsulas um eficiente sistema com dimensões reduzidas para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados. **Rev.Ciênc.Farm.**, São Paulo v.14, p.37-49, 1992.

OLLA, M.; MONDUSSI, M.; AMBROSONE, L. Microemulsions and emulsions in DDAB/w/oil systems. **Colloids Surf. A.**,v.160, p.23-26, 1999.

O'NEIL, M.J. 13ed. Rahway:the Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 2001.p.98.

O'NEIL, M.J. 12ed. Rahway:the Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drug and biologicals, 1996, p.627.

PARK, M.K.; HWANG, J.K.; KIM, K.C. Phospholipids-based microemulsion of flubiprofen by the spontaneous emulsification process. **Int. J. Pharm.**, v.18.,p.145-154, 1999.

PARK, M.K.; KIM, K.C. Preparation and evaluation of flubiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. **Int. J. Pharm.**, v.181, p.173-179,1999.

PATTARINO, F.; MARENGO, E.; GASCO, M.R. Experimental design and partial least squares in the study of complex mixtures: Microemulsions as drug carries. **Int. J. Pharm.**

v.91, p.157-165, 1993.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins, 2. In vivo drug delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, p. 1142-1169, 1996.

RATH, S., TRIVELIN, L.A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELA, D.M., JESÚS, M.N., MARZAL, P.C. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. **Quim. Nova**, v.26, n.4, p.550-555, 2003.

REX, J.H. O desafio das infecções fúngicas no século XXI. [on line] Disponível em <http://ccih.med.br/fungos21.html>. Acesso em 05/07/2006.

RISOVIC, V.; BOYD, M.; CHOO, E.; WASAN, K.M. Effects of lipid-based oral formulations on plasma and tissue Amphotericin B concentrations and renal toxicity in male rats. **Antimicrob. Agents chemother.**, v.47, n.10, p.3339-3342, 2003.

ROCCA, S.; MULLER, S.; STÉBÉ, M.J. Release of a model molecule from highly concentrated fluorinated reverse emulsion. Influence of composition variables and temperature. **J. Control. Release.**, v.61, p.251-265, 1999.

ROSOFF, M. **Surfactant Science Series: vesicles**. New York: Marcel Dekker,. 1996. v.62, p.491-526.

SIROTTI, C.; COCEANI, N.; COLOMBO, I.; LAPASIN, R.; GRAS, M. Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case. **J. Membrane Sci.**, v.204, p.401-412, 2002.

SOLANS, C.; KUNIEDA, H. **Industrial applications of microemulsions**. New york: Marcel Dekker, 1997. v.66.

SOLANS, C.; P. IZQUIERDO.; J. NOLLA, N.; AZEMAR AND M.J.; GARCIA-CELMA. Nano emulsions. **Coll. Interf. Sci.**,v.10, n.3-4, p.102-110, 2005.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.T.; ALLORET, F.L. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Adv. Colloid Interf Sci.**, v.108-109, p.145-149, 2004.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins in food, cosmetics and toiletries. **Starch/Stärke**, v.34, n.11, p. 379-385, 1982.

SZEJTLI, J. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. **Carbohydrate Polymers.**, v.12, n.4, p.375-392, 1990.

TADROS, T.; SOLANS, C.; ESQUENA, J. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv. Colloid Interf. Sci.**, v.108-109, p.303-308, 2004.

TADROS, T.F. **Surfactants**. London: Academic Press, 1984. p.342.

THEVENIN, M.A.; GROSSIORD, J.L.; POELMAN, M.C. Sucrose esters/co surfactant microemulsion systems for transdermal delivery: assessment of bicontinuous structures. **Int. J. Pharm.**, v.137, p.177-186, 1996.

TIPHINE, M.; HERBRECHT R.; LETSCHER-BRU V. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transplant Infect. Dis.**, v.1, p.273-283, 1999.

TROTTA, M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. **J. Control. Release.**, v.60, n.2-3, p.399-405, 1999.

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

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

VANDERMEULEN, G.; ROUXHET, L.; ARIEN, A.; BREWSTER, M.E. ; PR'EAT, V. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethyleneglycol)-block-poly(-caprolactone-co-trimethylenecarbonate)polymeric micelles. **Int. J. Pharm.**,v. 309, p.234–240, 2006.

VENEGAS, B.; DAMIÁN, J.G.; CELIS, H.; BLAKE, I.O.A Amphotericin B channels in the bacterial membrane: Role of sterol and temperature. **Biophysical Journal.**, v.85, p.2323-2332,2003.

WALSH, T.J., GOODMAN, J.L., PAPPAS, P., BEKERSKY, I., BUELL, D.N., RODEN, M., BARRETT, J., ANAISSIE, E.J. Safety, Tolerance, and Pharmacokinetics of High-Dose Liposomal Amphotericin B (AmBisome) in Patients Infected with *Aspergillus* Species and Other Filamentous Fungi: Maximum Tolerated Dose Study. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n.12, p. 3487-3496, 2001.

WARGAFTG, T. N. Desenvolvimento de Microemulsões Lipídicas Estabilizadas com Fosfatidilcolina de soja para veiculação de vacina de DNA contra Tuberculose. Araraquara, 2000, 90f. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

WASAN, D. T., et al. **Surfactants in chemical**. Process Engineering, v.28., New York: Marcel Dekker, 1998.

WILLIAMS, C. In: BARUCHEL, J.; HODEAN, J.L.; LECHMAN, M.S.; REGNARD, J.R.; SCHLENKER, C. **Diffraction, refraction and absorption of X-rays and neutrons: a comparative exposition**. Paris: Spring Verlag, 1993. p.3-21.

WOOD, J.H. Reologia Farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, M.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.1, p.211-253.

ZEJTLI, J. Medicinal applications of cyclodextrins. **Med. Res. Rev.**, v.14, p.353-386, 1994.

ZANIN, S.M.W., MIGUEL ,M.D., CHIMELLI, M.C. OLIVEIRA, A.B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**. v.3, n.11, p.13-18, 2002.