

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ANFOTERICINA B COM
DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS E SUA INCORPORAÇÃO EM
MICROEMULÕES LIPÍDICAS BIOCAMPATÍVEIS.**

CRISTINA MARIA FRANZINI

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anselmo Gomes De Oliveira

ARARAQUARA – SP

2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ANFOTERICINA B COM
DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS E SUA INCORPORAÇÃO EM
MICROEMULÕES LIPÍDICAS BIOCOMPATÍVEIS.**

CRISTINA MARIA FRANZINI

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anselmo Gomes De Oliveira

ARARAQUARA – SP

2011

Ficha Catalográfica

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

F837c Franzini, Cristina Maria
Complexo de inclusão de anfotericina B com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis / Cristina Maria Franzini. – Araraquara, 2010.
154 f.

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

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

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

CAPES: 40300005

E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...

Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las. Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução. Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis. Decidi ver cada noite como um mistério a resolver. Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz. Naquele dia, descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las. Naquele dia, descobri que não era o melhor e que talvez eu nunca tivesse sido. Deixei de me importar com quem ganha ou perde. Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer. Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima e, sim, deixar de subir. Aprendi que o melhor triunfo é poder chamar alguém de "amigo". Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento. O amor é uma filosofia de vida. Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e passei a ser uma tênue luz no presente. Aprendi que nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais. Naquele dia, decidi trocar tantas coisas... Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade. E, desde aquele dia, já não durmo para descansar...

"Simplesmente durmo para sonhar."

Walt Disney.

...Devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma longa travessia cheia de pedregulhos que me fizeram mudar a rota algumas vezes e procurar um novo caminho. Esses percalços, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

O desafio foi enorme, porém as motivações foram grandiosas, somadas às generosidades que tornaram possível a transformação de momentos de angústia em uma estrada larga repleta de cheiros, cores, e sons, cujo nome é esperança e cuja base é a busca de saberes, representada por um "feixe de possíveis", na direção do desenvolvimento do novo.

Acredito que um trabalho se torna grandioso em função do empenho, participação e compromisso de uma equipe. Este estudo só se tornou possível pela colaboração de algumas pessoas a quem eu gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pais

... E às vezes, quando os procuro, noto que lhes falta a noção de como me são necessários, de como são indispensáveis ao meu equilíbrio vital, porque fazem parte do mundo que eu, tremulamente, construí e se tornaram o alicerce do meu encanto pela vida.

Vinicius de Moraes

Agradecimentos

À Deus pela sublime presença de em minha vida, importante força diretora de minha consciência, que ensina o amor, determinação e a linguagem silenciosa da vida.

Ao meu irmão Ricardo por estarmos juntos nos momentos mais importantes desta vida.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pela confiança depositada em mim, pela amizade, orientação e disposição em discutir os resultados, ouvir e procurar alternativas para solucionar os problemas.

"Meu muito obrigado àquele que, ao me ensinar e guiar semeou em mim a vontade de tocar minha própria música e escolher as notas que me cabem, com a coragem e a perícia para acreditar e mim mesma."

Aos professores Leila Aparecida Chiavacci, Nivaldo Boralle, Sandra Pulcinelli e Marcos Antonio Corrêa pela direta colaboração na elaboração desse trabalho.

Aos queridos amigos do programa de pós-graduação, que se tornaram imprescindíveis na minha vida: Ana Luiza (Velma), Hilris, Beatriz, Gustavo, Charlene, Cris Bruno, Kelly, Fernanda Carbinato, Fernanda Kolenyaki, Flávia, Flávio, Gisele, Joceana, Priscileila, Gisela, Grazielle, Liliane. Há também amigos que já se foram, mas são inesquecíveis: Luana, Arnóbio, Juliane Farinelli, Thalita, Thiago Francês e Tina.

"Muitas pessoas entrarão e sairão de nossas vidas, mas apenas os verdadeiros amigos deixarão pegadas em nosso coração".

Ao Francisco.

"Ainda que eu fale a língua dos homens e a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria. Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda a ciência se não tiver amor, nada serei"

(1-Coríntios, 13)

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

RESUMO

O tratamento das infecções fúngicas sistêmicas impõe grandes dificuldades devido ao fato da terapia endovenosa requerer administração do fármaco solubilizado ou disperso em partículas de diminutas dimensões, além da necessidade de hospitalização. A anfotericina B (AmB) continua sendo um dos antibióticos mais efetivos para tais tratamentos, apesar de sua baixa solubilidade e graves efeitos colaterais. Considerando que microemulsões permitem contornar esses problemas e proporcionar administração oral do fármaco, essas formulações lipídicas contendo AmB estão sendo cada vez mais estudadas. Adicionalmente, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (CDs) também tem sido promissora no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. Neste trabalho os parâmetros de formação de microemulsões (MEs) contendo fosfatidilcolina de soja (FS), Tween-20 (Tw) e oleato de sódio (OS) como tensoativos e colesterol (CHO) como fase oleosa e a formação de complexos de inclusão com diferentes derivados de CD e sua incorporação nas MEs foi estudado. Um diagrama de fases pseudoternário foi elaborado objetivando caracterizar MEs. O comportamento reológico e a estruturação interna foram empregadas para avaliação e ainda caracterização por espalhamento dinâmico de luz. Foi avaliado o efeito da proporção de tensoativo e óleo na determinação do diâmetro da fase interna nos sistemas com ou sem AmB, além da avaliação da contribuição da fase oleosa e do tensoativo na incorporação do fármaco nas MEs. Um diagrama de solubilidade de AmB em CDs foi desenvolvido e suas constantes de estabilidade determinadas. O preparo de ME contendo CDs em sua fase aquosa, parâmetros de incorporação de AmB e estudos de liberação foram realizados seguidos de análise termogravimétrica, difração de raios x (DRX) e ressonância magnética nuclear (RMN). Os resultados revelam a formação de MEs em regiões contendo até 30% de tensoativo e aproximadamente 11% de fase oleosa. Sob luz polarizada os sistemas de interesse apresentaram fundo escuro e estruturação do tipo lamelar e comportamento predominantemente pseudoplástico com tixotropia. A incorporação máxima de AmB nas MEs foi dependente da proporção de tensoativo e da fase oleosa com 2,37 e 2,34mg/mL respectivamente para amostras com 20 e 12% desses componentes. O diâmetro médios das gotículas foi aumentado pela incorporação de AmB em todas as amostras avaliadas. Entretanto o aumento da proporção de tensoativos nas MEs contendo AmB ou não, diminuiu esses diâmetros. Constatou-se ainda uma interação de AmB com beta ciclodextrina (β CD), metil beta-ciclodextrina (ME- β CD), hidroxipropil beta-ciclodextrina (HP- β CD) e sulfobutil éter beta-ciclodextrina (SB- β CD), tendo a SB- β CD um efeito predominante concordando com os valores das constantes de estabilidade encontrados de 11,82; 40,40; 919,8 e 5047 M⁻¹ respectivamente. A incorporação de AmB nos sistemas binários contendo ME e CDs foi mais eficaz sendo de 2,41; 2,81; 3,24 e 4,38 mg/mL para β CD, ME- β CD, HP- β CD e SB- β CD respectivamente. A análise termogravimétrica demonstrou uma forte interação entre o fármaco e as CDs estudadas, sugerido real formação de complexos de inclusão sugerindo ainda que a ME:AmB proporciona uma maior proteção do fármaco contra temperaturas elevadas diminuindo a possibilidade de degradação. A DRX e RMN evidenciaram também a presença de AmB nos complexos obtidos. Os estudos de liberação mostraram um prolongamento do tempo de liberação num estudo de 12h para os sistemas microemulsionados sem as CDs sendo exacerbado pela sua presença, seguindo a mesma relação supracitada sendo aumentado substancialmente em relação ao fármaco livre e a forma comercial Anfotericin[®]. Conclui-se dessa forma que os sistemas estudados apresentam-se promissores na veiculação e liberação prolongada de AmB.

Palavras-chave: anfotericina B, sistemas microemulsionados, ciclodextrinas, sistemas de liberação.

ABSTRACT

The fungal infections treatment imposes many difficulties mainly because the intravenous therapy requires administration of solubilized or dispersed drug in particles of smaller dimension beyond the need for hospitalization. Despite its low solubility and serious adverse effects the amphotericin B (AmB) remains one of the most effective antibiotics to the treatment. Microemulsions allow circumvent these problems and provide oral administration. Therefore these lipid formulations containing AmB have been increasingly studied. Additionally, the formation of inclusion complexes with cyclodextrins (CDs) has also been promising in developing new dosage forms. In this work the formation parameters of microemulsions (MEs) containing soybean phosphatidylcholine (FS), Tween-20 (Tw) and sodium oleate (SO) as surfactant and cholesterol (CHO) as oil phase and the formation of inclusion complexes with different CDs derivatives and their incorporation into MEs were studied. The pseudo ternary phase diagram was built in order to characterize MEs. The rheological behavior and internal structure were evaluated and characterized by dynamic light scattering. The effect of the proportion of surfactant and oil phase in the diameter of the internal phase in systems with or without AmB was evaluated. Therefore the contribution of the oil phase and surfactant in the drug loading efficiency was studied. The Solubility diagram of AmB in CDs was developed and its stability constants determined. The preparation of ME containing CDs in its aqueous phase, the incorporation AmB parameters and the release studies were performed followed by thermal analysis, x-ray (XRD) diffraction and nuclear magnetic resonance (NMR). The results reveal the MEs formation in regions containing up to 30% surfactant and about 11% of the oil phase. Under polarized light, the interest systems showed a dark background and lamellar structure and pseudoplastic with thixotropy predominantly behavior. The AmB maximum incorporation in MEs was dependent on the surfactant and oil phase ratio with 2.37 and 2.34 mg/mL respectively. The droplets average diameter was increased by the AmB incorporation in all samples. However, when the proportion of surfactant in MEs containing or not AmB increased, these diameters decreased. It was also observed an AmB interaction increased with β CD, ME- β CD, HP- β CD and SB- β CD, having the SB- β CD the predominant effect, which is in agreement with the stability constants values found of 11.82, 40.40, 919.8 and 5047 M⁻¹. The AmB incorporation in binary systems containing MEs:CDs was more efficient being 2,41; 2,81; 3,24 e 4,38 mg/mL to β CD, ME- β CD, HP- β CD e SB- β CD respectively. Thermogravimetric analysis showed a strong interaction between the drug and the studied CDs respectively suggesting that the existence of inclusion complexes formation. Additionally ME:AmB provides greater protection of the drug against high temperatures reducing the possibility of degradation. The NMR and XRD also showed the presence of AmB in the obtained complexes. The release studies showed a time release prolongation in 12 hours of study for the ME systems without the CD being exacerbated by its presence following the same relation mentioned above being increased substantially relative to free drug trade and the commercial form anfotericin®. It follows that so that the systems studied presents promising in the AmB transport and sustained release.

Keywords: amphotericin B, microemulsion systems, cyclodextrins, delivery systems

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	<i>i</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>v</i>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	<i>vi</i>
LISTA DE SÍMBOLOS.....	<i>viii</i>
LISTA DE ESQUEMAS.....	<i>ix</i>
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.OBJETIVOS.....	46
3.1. Objetivos gerais.....	46
3.2. Objetivos específicos.....	46
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1. MATERIAL.....	47
4.1.1. Matérias primas, reagentes e solventes.....	47
4.1.2. Equipamentos.....	48
4.2. MÉTODOS	49
4.2.1. Diagrama de fases pseudo-ternário para o sistema estabilizado por FS:OS:Tw.....	49
4.2.2. Análise da variação do diâmetro médio das gotículas da fase interna por espalhamento dinâmico de luz.....	50
4.2.3. Incorporação de AmB nas microemulsões em função das proporções de tensoativo e volume de fase. interna.....	51
4.2.3.1. Determinação das densidades relativas das MEs.....	51
4.2.3.2. Determinação dos volumes de fase interna	52
4.2.3.3. Curva padrão da AmB em metanol.....	52

4.2.4. Análise do comportamento reológico.....	53
4.2.5. Microscopia de luz polarizada.....	53
4.2.6. Diagrama de solubilidade da AmB em β CD, HP- β CD, SB- β CD E ME- β CD...	54
4.2.6.1. Metodologia estatística.....	54
4.2.7. Determinação das constantes de estabilidade (ks).....	55
4.2.8. Preparo das MEs contendo β CD, HP- β CD, SB- β CD E ME- β CD.....	55
4.2.9 Incorporação de AmB nas microemulsões desenvolvidas contendo β CD, HP- β CD, ME- β CD E SB- β CD.....	56
4.2.9.1. Sistema cromatográfico.....	56
4.2.9.2. Curva padrão de AmB em metanol.....	57
4.2.9.3. Procedimento analítico.....	57
4.2.10. Microscopia eletrônica de varredura.....	57
4.2.11. Análise térmica.....	58
4.2.11.1. Calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG).....	58
4.2.12. Difração de Raios X.....	59
4.2.13. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	59
4.2.14. Avaliação do perfil de liberação “in vitro” das MEs E MEs associadas à β CD, HP- β CD, SB- β CD E ME- β CD como fase aquosa dos sistemas.	59
4.2.14.1. Metodologia estatística.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1. Diagrama de fases pseudo-ternário para o sistema estabilizado por FS:OS:Tw...	62
5.2. Análise da variação do diâmetro médio das gotículas por espalhamento dinâmico de luz.....	65
5.3. Incorporação de AmB nas MEs em função das proporções de tensoativo e volume de fase interna	70

5.4. Análise do comportamento reológico.....	75
5.5. Microscopia de luz polarizada.....	86
5.6. Diagrama de solubilidade de AmB em β CD, HP- β CD, SB- β CD e β CD.....	90
5.7. Determinação das constantes de estabilidade (KS)	94
5.8. Incorporação de AmB nas MEs desenvolvidas contendo β CD, HP- β CD, ME- β CD e SB- β CD.....	98
5.9. Microscopia eletrônica de varredura	102
5.10. Análise Térmica	106
5.10.1. Calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimetria TG) e termogravimetria derivada (DTG).....	106
5.11. Difração de Raios X (DRX).....	119
5.12. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	123
5.13. Avaliação dos perfis de liberação de AmB das MEs desenvolvidas.....	133
6. CONCLUSÕES.....	142
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da anfotericina B.....	23
Figura 2: Estruturas químicas do Esgosterol (A) e Colesterol (B).....	24
Figura 3: Formação de poros pela AmB na bicamada lipídica das membranas celulares.....	25
Figura 4: Exemplos de estruturas auto-organizadas pela associação de moléculas anfífilas. Representação esquemática da organização de microemulsões (A) e de mesofases líquido cristalinas (B) compreendendo (1) fase lamelar, (2a) fase hexagonal e (2b) fase hexagonal reversa.....	32
Figura 5: Estrutura química da fosfatidilcolina de soja.....	34
Figura 6: Estrutura química do oleato de sódio.....	35
Figura 7: Esquema da formação de complexos de inclusão de p-xileno por uma CD.....	38
Figura 8: Estrutura geral da β CD, e radicais das CDs derivadas HP- β CD, ME- β CD e SB- β CD.....	40
Figura 9 - Principais tipos de complexos de inclusão.....	43
Figura 10: Esquema da célula de difusão adaptada ao dissolutor. (a) abertura para coleta de amostra e reposição, (b) entrada do dispositivo para agitação do meio, (c) abertura para colocação do tubo com a membrana (à esquerda) e esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução (à direita).....	60
Figura 11: Diagrama de fases (a) sem AmB e (b) contendo AmB para o sistema estabilizado com mistura de tensoativos FS:Tw:OS na proporção 1:1:1 (m:m), CHO como fase oleosa e tampão fosfato 0,05M pH 7,4 como fase aquosa. As regiões definidas no diagrama de fases foram (ST) sistema semi-transparente, (SF) separação de fases, (ME) microemulsão e (EV) emulsão viscosa. Símbolos vazios (\circ) representam aumento de proporção de fase tensoativo e os pontos cheios (\blacktriangle) representam aumento da fase oleosa.....	63
Figura 12: Representação das amostras selecionadas no diagrama de fases elaborado onde (\square) representam aumento de proporção de fase tensoativo e os pontos cheios (\blacktriangle) representam aumento da fase oleosa.....	67
Figura 13: Efeito da proporção do tensoativo no diâmetro das gotículas com proporção fixa de fase oleosa em 5%.....	68
Figura 14: Efeito da proporção de fase oleosa no diâmetro das gotículas com proporção fixa de tensoativo de 15%.....	69
Figura 15: Efeito do volume de fase da ME, na incorporação da AmB a 25°C. $r = 0,997$	71

Figura 16: Efeito das proporções de tensoativo na incorporação de AmB a 25°C. $r = 0,995$	74
Figura 17: Comportamento reológico das MEs em função da proporção de tensoativo, na ausência de AmB. Curvas ascendentes (símbolos vazios) e curvas descendentes (símbolos cheios).....	78
Figura 18: Comportamento reológico das MEs em função da proporção de tensoativo, na presença de AmB. Curvas ascendentes (símbolos vazios) e curvas descendentes (símbolos cheios).....	80
Figura 19: Comportamento reológico das MEs na ausência da AmB, variando a porcentagem defase oleosa. Curvas ascendentes (símbolos vazios) e curvas descendentes (símbolos cheios). No inset: Amostra com com 12% de fase oleosa.....	81
Figura 20: Comportamento reológico das MEs na presença da AmB, variando a porcentagem de fase oleosa. Curvas ascendentes (símbolos cheios) e curvas descendentes (símbolos vazios). No inset: Amostra com com 12% de fase oleosa.....	82
Figura 21: Figura 20: Índices de consistência (K) das ME em ausência e presença de AmB em função do aumento de tensoativo.....	84
Figura 22: Índice de consistência das ME em ausência e presença de AmB em função do aumento de fase oleosa.....	85
Figura 23: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (a :5%; b :10%; c :15%; d :20%), mantendo-se a fase oleosa em 5% m/m.....	86
Figura 24: Fotomicrografia de luz polarizada dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (e :3%; f :6%; g :9%; h :12%), mantendo-se o tensoativo em 15% m/m.....	88
Figura 25: Fotomicrografia de luz polarizada dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (a :5%; b :10%; c :15%; d :20%), mantendo-se o fase oleosa em 5% m/m, contendo AmB.....	89
Figura 26: Fotomicrografia de luz polarizada dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (e :3%; f :6%; g :9%; h :12%), mantendo-se fixo o tensoativo em 15% m/m, contendo AmB.....	89
Figura 27: Curva analítica da AmB em metanol.....	91
Figura 28: Cromatograma típico da AmB em metanol a 410nm. Tempo de retenção em torno de 9 minutos.....	91
Figura 29: Diagrama de solubilidade da AmB em SB- β CD, ME- β CD e HP- β CD e β CD.....	92

Figura 30: Efeito da solubilidade das CDs em relação ao Ks.....	97
Figura 31: Curva padrão da AmB em tampão, em 410nm por CLAE.....	99
Figura 32: Incorporação de AmB em ME contendo 15% de tensoativo e 10% fase oleosa com β CD, HP- β CD, SB- β CD e ME- β CD e solução tampão fosfato 50mmol.L ⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa.....	100
Figura 33: Microscopia de varredura da anfotericina B. Aumento de 150 e 350x.....	102
Figura 34: Fotomicrografias de varredura de SB- β CD. Aumento de 350 e 500x.....	103
Figura 35: Fotomicrografias de varredura do complexo SB- β CD:AmB. Aumento de 150 e 50x.....	104
Figura 36: Fotomicrografia de varredura da HP: β CD. Aumento de 200 e 350x.....	105
Figura 37: Fotomicrografia de varredura do complexo HP: β CD: AmB. Aumento de 350 e 100x.	105
Figura 38: Fotomicrografia de varredura da ME- β CD. Aumento de 350x.....	106
Figura 39: Fotomicrografia de varredura do complexo ME- β CD:AmB. Aumento de 350x.....	106
Figura 40: Curvas de DSC e TG/DTG da AmB em atmosfera de nitrogênio em taxa de aquecimento de 20°C.min ⁻¹	108
Figura 41: Curvas de DSC e TG/DTG da HP- β CD em atmosfera de nitrogênio em taxa de aquecimento de 20°C.min ⁻¹	108
Figura 42: Curvas de DSC e TG/DTG da SB- β CD em atmosfera de em taxa de aquecimento de 20°C.min ⁻¹	109
Figura 43: Curvas de DSC e TG/DTG da ME- β CD em atmosfera de em taxa de aquecimento de 20°C.min ⁻¹	109
Figura 44: Curvas típicas e TG de CDs em nitrogênio.....	110
Figura 45: Curvas de DSC da AmB, SB-BCD e seu complexo de inclusão.....	111
Figura 46: TG de amostras de AmB pura, da SB- β CD e do complexo de inclusão AmB: SB- β CD. Inset: DTG AmB, SB- β CD e complexo SB- β CD:AmB.....	112
Figura 47: Curvas de DSC da AmB, HP- β CD e seu complexo de inclusão	113
Figura 48: TG de amostras de AmB pura, da HP- β CD e do complexo de inclusão AmB: HP- β CD. Inset: DTG AmB, HP- β CD e complexo HP- β CD:AmB.....	114

Figura 49: Curvas de DSC de AmB, da ME-βCD e seu complexo de inclusão.....	115
Figura 50: TG de amostras de AmB pura, da ME-βCD e do complexo de inclusão AmB: ME-βCD. Inset: DTG AmB, ME-βCD e complexo ME-βCD:AmB.....	116
Figura 51: Curvas de DSC de AmB, e dos complexos de inclusão formados.....	118
Figura 52: Difratoograma de raios X de anfotericina B (AmB), Sulfobutil éter βCD (SB-βCD), Mistura física (MF) e complexo de inclusão SB-βCD:AmB.....	120
Figura 53: Difratoograma de raios X de anfotericina B (AmB), Hidroxipropil βCD (HP-βCD), Mistura física (MF) e complexo de inclusão HP-βCD:AmB.....	121
Figura 54: Difratoograma de raios x de anfotericina B (AmB), Metil βCD (ME-βCD), Mistura física (MF) e complexo de inclusão ME-βCD:AmB.....	122
Figura 55: Espectro de RMN ¹ H AmB em DMSO-d ₆ a 500MHz.....	124
Figura 56: Espectro de RMN ¹ H SB-βCD em DMSO-d ₆ a 500MHz.....	125
Figura 57: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ¹ H da SB-βCD(a) e do complexo SB-βCD:AmB (b) em DMSO -d ₆ em 500MHz.....	126
Figura 58: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ¹ H da AmB(a), da SB-βCD(b) e do complexo SB-βCD:AmB(c) em DMSO-d ₆ em 500MHz.....	127
Figura 59: Espectro de RMN ¹ H HP-βCD em DMSO-d ₆ a 500MHz.....	128
Figura 60: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ¹ H da AmB(a), da HP-BCD(b) e do complexo HP-βCD:AmB(c) em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	129
Figura 61: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ¹ H dos complexos HP-BCD:AmB em DMSO-d ₆ (a) em DMSO-d ₆ :D ₂ O (b) a 500MHz.....	131
Figura 62: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ¹ H da ME-βCD(a) e complexo ME-βCD (b) em DMSO-d ₆ a 500MHz.....	132
Figura 63: Perfil de liberação de AmB em MEs contendo CDs a partir das médias de três determinações (ponto) e desvio padrão (barra vertical), onde FL=fármaco livre, ME = microemulsão, MEME= microemulsão: metil-βCD, MEHP = microemulsão:hidroxipropil-βCD, MESB = microemulsão: sulfobutiléter-βCD.....	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: CDs disponíveis no mercado e seu tempo de permanência até os dias atuais.....	40
Tabela 2: Composição das amostras analisadas.....	50
Tabela 3: Sistema cromatográfico em modo gradiente.....	54
Tabela 4: Composição das amostras para avaliação do diâmetro das gotículas da fase interna do sistema em função da fase oleosa do tensoativo.....	66
Tabela 5: Índices de consistência (<i>k</i>) e de fluxo (<i>n</i>) das formulações em ausência e presença de AmB a 25°C.....	83
Tabela 6: Características físico-químicas das CDs.....	90
Tabela 7: Aumento de solubilidade de AmB em cada CD estudada.....	93
Tabela 8: Coeficientes de regressão linear, erros padrão, limites inferior (LI) e superior (LS) de intervalos de confiança de 95% para o coeficiente de regressão e coeficiente de correlação de Pearson, de acordo com a CD utilizada.....	94
Tabela 9: Temperaturas de degradação e perda de massa de cada CD estudada.....	110
Tabela 10: Temperaturas de degradação e perdas de massa de cada amostra avaliada.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

α-CD	Alfa ciclodextrina
A/O	Água em óleo
AmB	Anfotericina B
CDs	Ciclodextrinas
CHO	Colesterol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D₂O	Água deuterada
DMPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSPG	Distearoilfosfatidilglicerol
EL(s)	Emulsão líquida(s)
DMSO d₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DOC	Desoxicolato de sódio
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
ER	Ergosterol
EV(s)	Emulsão viscosa(s)
FA	Fase aquosa
FDA	Food and drug administration
FL	Fármaco livre
FO	Fase oleosa
FS	Fosfatidilcolina de soja
HP-βCD	Hidroxipropil β ciclodextrina
Hz	Hertz
IFI	Infecções fúngicas invasivas
IC	Índice de confiança
Ks	Constante de estabilidade
K_b	Constante de associação
K_f	Constante de liberação

K_p	Constante de permeação
LI	Limite inferior
LS	Limite superior
Mol.L⁻¹	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ME(s)	Microemulsão(s)
MEHP	Complexo microemulsão:hidroxipropil-βCD
MEME	Complexo microemulsão: metil-βCD
MESB	Complexo microemulsão: sulfobutiléter-βCD
ME-βCD	Metil β ciclodextrina
MHz	Mega Hertz
MLP	Microscopia de luz polarizada
N₂	Nitrogênio
O/A	Óleo em água
OS	Oleato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Coefficiente de correlação
S_∞	Solubilidade Infinita
SAXS	Espalhamento de raios x à baixo ângulo
SB-βCD	Sufobutyleter β ciclodextrina
SF	Separação de fases
ST	Sistema semi-transparente
T	Tensoativo
T/O	Tensoativo/óleo
TG	Termogravimetria
TGI	Trato gastrintestinal
TV	Sistema de transição viscoso
Tw	Tween-20
UV-Vis	Ultravioleta visível
β-CD	B-ciclodextrina
γ-CD	Gama ciclodextrina

LISTA DE SÍMBOLOS

\AA	Angstrom
d	densidade
J	Constante de acoplamento
k	Índice de consistência
n	Índice de fluxo
δ	Deslocamento químico
ϕ	Diâmetro

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Formulações lipídicas comercialmente disponíveis.....	28
Esquema 2	Esquema do processo de liberação de Fármacos a partir de MEs.....	135

1. INTRODUÇÃO

A frequência de infecções fúngicas invasivas (IFIs) tem se elevado marcadamente com o aumento de pacientes de alto risco, sendo essas, importante causa de mortalidade. Os patógenos estão se tornando cada vez mais resistentes e as opções terapêuticas atuais incluem limitações relacionadas a espectro inadequado de atividade, falta de eficácia, pequeno índice de tolerância, interações com outros fármacos, perfil farmacocinético inadequado, alta toxicidade e custo excessivo (REX, 2009; MUÑOZ et al., 2008). A elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos, a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica têm assegurado que a anfotericina B (AmB) seja atualmente o fármaco de escolha no tratamento da maioria das IFIs que acometem pacientes imunocomprometidos (FILLIPIN et al., 2006).

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 ao desequilíbrio osmótico e morte celular (GAGÓS et al., 2008). A AmB possui alta afinidade pelas membranas biológicas, resultando em ligação com os esteróis, o que é responsável pela sua ação antifúngica (INSELMANN et al., 2002; LUMBERAS et al., 2007). Entretanto, ela pode se auto-associar e agregar e, em solução aquosa, formar uma mistura de monômeros e agregados insolúveis e solúveis. Em relação às formas agregadas de AmB duas são bem definidas: oligômeros solúveis em água e agregados não solúveis. Claramente os oligômeros solúveis são as formas mais tóxicas da AmB (ESPADA et al., 2008). A sua seletividade com as membranas celulares do fungo é também dependente desse estado de agregação (ARAÚJO, 2005; MINÖNES et al., 2005).

A literatura tem fundamentado inúmeros trabalhos para a melhoria das formulações de AmB que sejam mais eficazes, mais toleráveis e menos tóxicas em particular menos nefrotóxicos que a forma comercialmente disponível no mercado, uma vez que os rins são considerados o maior alvo desse efeito tóxico (FILIPPIN, 2006; LANIADO-LABORIN et al., 2009).

As formulações convencionais comercialmente utilizadas, denominadas Fungizon[®] e Anforicin[®] constituem-se de AmB, e desoxicolato de sódio (DOC) em tampão fosfato. O DOC é empregado para solubilização da AmB, entretanto o sistema não é homogêneo, podendo apresentar em sua constituição três formas diferentes: monomérica, oligomérica e agregados de AmB-DOC misturados com micelas puras de DOC (FILLIPIN et al., 2006). Este medicamento é administrado via intravenosa e sua eficácia clínica é limitada pela toxicidade e efeitos adversos já conhecidos da AmB (HARTSEL et al., 2001; MORENO et al., 2001; FUKUI et al., 2003), além de problemas como baixa aceitação de pacientes devido à hospitalização e altos custos. Estudos revelam que a terapia medicamentosa dessas patologias oportunistas tratadas distantes do ambiente hospitalar oferece muitas vantagens psicológicas e econômicas ao paciente (SHAO et al., 2007).

Nesse sentido, uma nova abordagem em torno da terapia para IFIs tem sido avaliada e o arsenal terapêutico tem sido enriquecido após muitos anos de estudo (MUÑOZ et al., 2008). Além desse fato, o histórico da patologia associado aos tratamentos convencionais, têm conduzido à necessidade do estudo de novas formulações para administração oral do fármaco (FUKUI et al., 2003).

Segundo Larabi et al (2004) sistemas lipídicos têm maior habilidade na retenção da molécula da AmB do que micelas de tensoativos além de liberarem o fármaco lentamente na forma de monômeros, reduzindo a toxicidade para as células humanas. A solubilização de fármacos em agregados supramoleculares tais como microemulsões (MEs) é uma alternativa

importante e muito relevante na pesquisa farmacêutica, por associarem-se aos fármacos reduzindo sua toxicidade e biodisponibilidade modificada (CORREA et al., 2005).

MEs são descritas como dispersões coloidais transparentes de água e substâncias graxas, as quais se formam espontaneamente quando compostos anfifílicos são adicionados (BAYRAK et al., 2005). O desenvolvimento desses sistemas visa obter solubilização máxima da fase interna oleosa e nesse processo a formação de gotículas de diâmetros muito pequenos leva a um aumento da área superficial e um grande aumento de energia livre adsorvida na interface a qual é necessária para estabilizar os sistemas (OLIVEIRA et al., 2009).

Adicionalmente às vantagens oferecidas pelas MEs, a encapsulação monomolecular pela formação de complexos de inclusão também tem sido promissoras no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. Geralmente a inclusão monomolecular envolve a conformação espacial de uma única molécula na cavidade de uma molécula hóspede sem que qualquer ligação covalente seja formada. Ciclodextrinas (CDs) são conhecidas por formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas, tanto em solução como no estado sólido, no qual o meio hidrofóbico da cavidade da CD circunda a molécula hóspede. Isso leva a alterações físicas, químicas e biológicas da molécula e podem eventualmente apresentar grande potencial farmacêutico (RIBEIRO et al., 2003).

A estrutura molecular desses derivados de glicose gera uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interior hidrofóbica. CDs podem interagir com moléculas de tamanhos apropriados para formar complexos de inclusão (SPAMER et al., 2002). Esses complexos oferecem uma série de vantagens físico-químicas incluindo a possibilidade de aumentar a solubilidade em água, a estabilidade de soluções e biodisponibilidade.

Por uma série de razões, tais como preço, disponibilidade e dimensões da cavidade, β -CD é a mais utilizada. Entretanto, sua solubilidade em água (e baixa solubilidade na maioria de complexos) é uma séria barreira em sua utilização. Para vencer essas dificuldades,

modificações químicas têm sido feitas no sentido de melhorar e expandir as funcionalidades das CDs (RIBEIRO et al., 2003). Considerações especiais sobre o uso de CDs por via oral no controle da liberação estão relacionadas à sua conformação tipicamente adequada para liberação através de porções do trato gastrointestinal (TGI).

Alguns autores relatam aumento da solubilidade aquosa de fármacos com compostos derivados de β CDs, tais como 2-hidroxypropil- β -ciclodextrinas (HP- β CD), Metil- β -ciclodextrinas (ME- β CD), sulfobutiléter- β -ciclodextrinas (SB- β CD). Esses derivados de β -CD apresentam aumento na segurança e nas propriedades de solubilidade comparadas à β -CD (SPAMER et al., 2002).

Diante dos fatos citados incluindo o fato da alta toxicidade da AmB, do estado de agregação ser um fator limitante para sua toxicidade e absorção aliado às potencialidades de sistemas de liberação prolongada tais como MEs e CDs, estudos nesse sentido merecem atenção especial visando o desenvolvimento de novas formulações que se somarão às opções atualmente disponíveis para a terapêutica antifúngica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os fungos são extensivamente conhecidos como os patógenos mais encontrados em pacientes em condições críticas de saúde, sendo *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. os mais freqüentemente isolados. Filamentos de fungos isolados também muito encontrados são *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Penicillium* spp. e Zigomicetos. Muitas razões têm sido propostas para justificar o aumento das infecções invasivas causadas por fungos incluindo o uso de agentes antineoplásicos e imunossuppressores, antibióticos de amplo espectro, dispositivos implantáveis e catéteres, além de cirurgias mais agressivas. Dentre essas, aquelas que envolvem pacientes com queimaduras, neutropenia, HIV e pancreatite, os quais também estão predispostos a essas infecções (ENOCH et al., 2006).

A introdução de agentes imunossuppressores de nova geração resultou no surgimento de um novo grupo de pacientes que apresentam alto risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas, tais como aqueles acometidos por artrite reumatóide e colites (OSTERMANN & BRYAN, 2007).

Nesse sentido, as principais limitações das opções terapêuticas atuais incluem espectro inadequado de atividade, falta de eficácia devido à resistência crescente, pequeno índice de tolerância, interações com outros fármacos, perfil farmacocinético inadequado, alta toxicidade e custo excessivo. Sendo assim, o antifúngico ideal deve ter um amplo espectro de atividade, ação fungicida ao invés de fungistática, estar disponível em formulações oral e parenteral, causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ser custo-efetivo e estável à resistência microbiana. O desenvolvimento de um agente antifúngico ainda é um desafio uma vez que há poucos alvos potenciais de ação que não sejam compartilhados pelo fungo e a espécie humana (REX, 2009).

Cerca de uma década passada, pacientes com desordens hematológicas sofreram algumas conseqüências em relação ao aumento na incidência de infecções fúngicas as quais se

tornaram fatais em 70% dos casos e o agente mais efetivo, a AmB convencional foi inaceitavelmente tóxica (HANN et al., 2001). A elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos (DISMUKES, 2000), a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica têm assegurado que a AmB seja atualmente o fármaco de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos (FILLIPIN et al., 2006).

A AmB (Figura 1) (3-(4-amino-3,5-diidroxil-6-metil-oxan-2-il) oxo-9, 25, 27, 30, 31, 33, 35, 37 octahidroxi-18, 20, 21-trimetil - 23 - 0 x 0 - 22 39-dioxabícclico [33.3.1] nonatriacontano-4, 6, 8, 10, 12, 14, 16-heptano-38-carboxílico ácido) (CORDONNIER et al., 2008, ESPOSITO et al., 2003; HERÉĆ et al., 2005) tem seu nome derivado da característica anfotérica de sua estrutura molecular, formando tanto sais solúveis em meio ácido como em meio básico (FILIPPIN, et al., 2006). Sua estrutura molecular é caracterizada pelos orgânicos carboxila e amino, cujos valores de pKa são de 5,5 e 10 sendo também anfifílica por apresentar uma extremidade polar e outra apolar, assemelhando-se aos fosfolipídios, colesterol (CHO) e ergosterol (ER) das membranas celulares (BEKERSKY et al., 1999; COHEN, 1998; TIPHINE et al., 1999., FILIPPIN et al., 2006), o que resulta em excelente ação antifúngica (INSELMANN et al., 2002; LUMBRERAS et al., 2003). Apresenta-se como um sólido em pó de coloração amarelo alaranjado, sensível ao calor e a luz e se torna inativa em baixos valores de pH podendo, dessa forma, ser degradada. Possui cadeia carbônica complexa, cuja fórmula estrutural é $C_{47}H_{73}NO_{17}$ e massa molecular 924,09 g/mol. A AmB apresenta baixa solubilidade na maioria dos solventes exceto em relação ao dimetilsulfóxido (DMSO) e a dimetilformamida, é praticamente insolúvel em soluções aquosas de pH neutro. Relativamente à água, pode-se inferir que sua solubilidade pode ser aumentada pela adição de lauril sulfato de sódio ou desoxicolato de sódio (DOC). A AmB

também se dissolve em vesículas de lecitina e colesterol e em esteróides constituintes de membranas naturais (FILIPPIN et al., 2006).

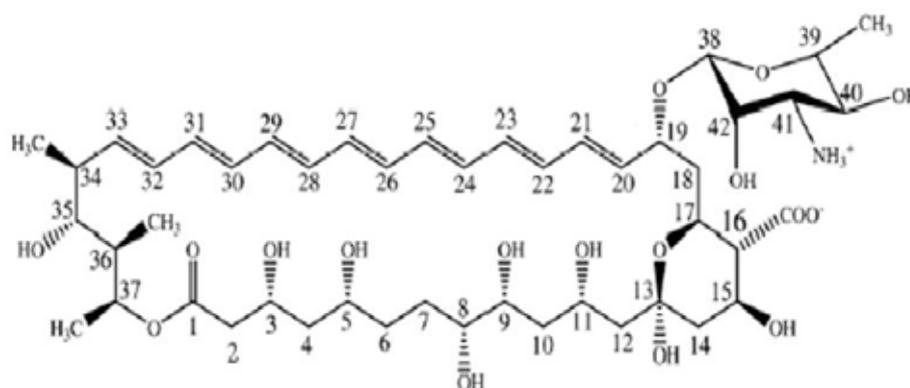


Figura 1: estrutura química da anfotericina B

A Figura 1 ilustra a estrutura química da AmB. A mesma contém 37 átomos de carbono formando um anel macrocíclico fechado por lactonização; possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas não substituídas (heptaeno) e, na porção oposta, uma cadeia polihidroxilada com sete grupos hidroxila livres o que lhe confere característica anfipática. Em uma das suas extremidades, encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um grupo amino livre, formando uma cadeia lateral. A molécula tem aproximadamente 24 Å de comprimento (FILIPPIN et al., 2006).

Os macrolídeos poliênicos, como a AmB, possuem alta afinidade pelas membranas biológicas, resultando em ligação com os esteróides, o que é responsável pela sua ação antifúngica (INSELMANN et al., 2002; LUMBRERAS et al., 2007). As ligações entre os esteróides das membranas celulares humanas tais como o CHO e dos fungos tais como o ER e a AmB (Figura 2) ocorrem através de ligações de hidrogênio (entre a hidroxila dos esteróides e a carboxila da molécula de AmB) ou através de forças de Van der Waals, sendo esta entre a cadeia lateral do ergosterol (dupla ligação do carbono 22) e o fármaco. Já no CHO, a dupla

ligação não está presente, o que a torna uma molécula mais flexível e dificulta o seu contato intermolecular com os macrolídios (ARAÚJO, 2005).

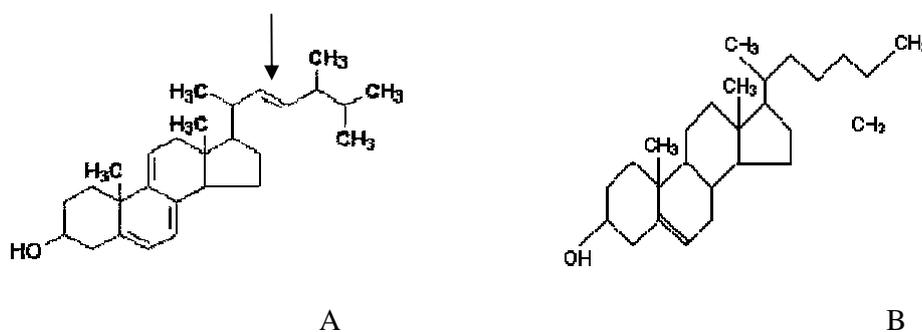


Figura 2: Estruturas químicas do Ergosterol (A) e CHO (B)

O efeito da AmB nas biomembranas está diretamente associado à formação de poros transmembrana que são hábeis em afetar severamente o transporte fisiológico de íons. Essa alteração da permeabilidade celular pode levar à despolarização e dessa forma causar efeitos na membrana aumentando sua permeabilidade (LANIADO-LABORIN et al., 2009).

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 (Figura 3). 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 (GAGÓS et al., 2008).

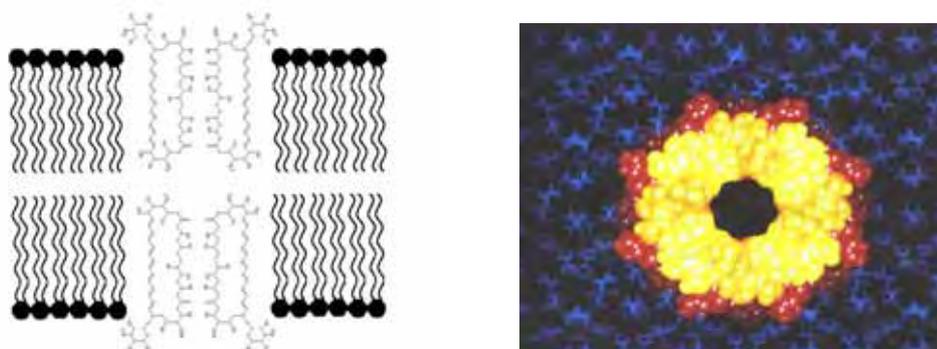


Figura 3: Formação de poros pela AmB na bicamada lipídica das membranas celulares

Estudos realizados em 1986 e 1994 por pesquisadores demonstraram que em baixas concentrações esse fármaco produzia perda de 98% do conteúdo intracelular (FILIPPIN, et al., 2006).

A literatura tem fundamentado inúmeros trabalhos para a melhoria das formulações de AmB. A principal motivação para o desenvolvimento dessas formulações é a necessidade da descoberta de sistemas que tornem a AmB mais eficaz, mais tolerável e menos tóxica, em particular menos nefrotóxica que AmB-desoxicolato, que é a forma comercial normalmente disponível no mercado, uma vez que os rins são considerados o maior alvo desse efeito tóxico. 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. Estes danos renais podem se manifestar através de vários mecanismos. O mais comum relaciona-se ao aumento dos níveis de creatinina sérica causada por vasoconstrição das arteríolas aferentes. A presença de desoxicolato em formulações contendo AmB pode ser responsável pelo aumento da nefrotoxicidade em comparação com formulações lipídicas do fármaco onde esse material não está presente. Esse dano renal provoca hipocalcemia e hipomagnesemia e de maneira menos significativa diminuição de bicarbonato e aminoácidos. Outros efeitos adversos

inerentes ao fármaco são náuseas, anemia, calafrios, febre, cardiotoxicidade, tromboflebitis, hipotensão, dor de cabeça e taquicardia. Além disso, observam-se alguns efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) quando são associados com administrações repetidas (LANIADO-LABORIN et al., 2009; FILIPPIN et al., 2006).

As formulações convencionais comercialmente utilizadas, denominadas Fungizon[®] e Anforicin[®] constituem-se de 50 mg de AmB, aproximadamente 41 mg de DOC e 20,2 mg de tampão fosfato. O DOC é empregado para solubilização da AmB, entretanto o sistema não é homogêneo, podendo apresentar em sua constituição três formas diferentes: monomérica, oligomérica e agregados de AmB-DOC misturados com micelas puras de DOC (FILLIPIN et al., 2006). Este medicamento apresenta-se na forma sólida em 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 (HARTSEL et al., 2001; MORENO et al., 2001; FUKUI et al., 2003).

Devido à sua natureza anfipática a AmB pode se auto associar e agregar e em solução aquosa formar uma mistura de monômeros e agregados solúveis e insolúveis. A forma monomérica solúvel é usualmente descrita como a forma menos tóxica. Em relação às formas agregadas de AmB duas são bem definidas: oligômeros solúveis em água e agregados não solúveis. Claramente os oligômeros solúveis são as formas mais tóxicas da AmB (ESPADA et al., 2008). A sua seletividade com as membranas celulares do fungo é também dependente desse estado de agregação (ARAÚJO, 2005; MINÑONES et al., 2005).

Estudos demonstraram que somente quando uma concentração crítica da AmB alcança e atravessa as membranas suas moléculas se unem para formar canais aquosos juntamente com os esteróis (VENEGAS et al., 2003, COREN, 1998, MIÑONES et al., 2005). A proporção relativa destas formas é concentração dependente. A solubilidade e o estado de agregação da AmB em meio aquoso são bem caracterizados. Em meio aquoso o espectro de

absorção de UV-Vis é dependente da concentração. A AmB se apresenta na forma de monômeros apenas em concentrações abaixo de 10^{-7} mol.L⁻¹. Quando em concentrações acima de 10^{-7} mol.L⁻¹, a AmB sofre um complicado processo de auto-agregação e formação de dímeros, oligômeros solúveis e em concentrações acima de 10^{-5} mol.L⁻¹, agregados insolúveis são observados. É dessa forma conhecido que o estado de agregação da AmB determina a seletividade por colesterol/ergosterol assim como nas membranas (VIJAN et al., 2009).

Em baixas concentrações (menores que 5×10^{-7} mol.L⁻¹), o espectro de absorção de UV de uma solução aquosa apresenta quatro bandas entre 420 e 320nm. A forma monomérica é responsável pela banda em 405-409nm e é sua absorção máxima. Em contraste acima de 5×10^{-5} mol.L⁻¹ (moléculas agregadas), uma nova banda é observada em torno de 340nm. Essas bandas são características das mudanças no estado molecular da AmB devido à agregação, responsável pela toxicidade do fármaco (MORENO 2001; VIJAN et al., 2009).

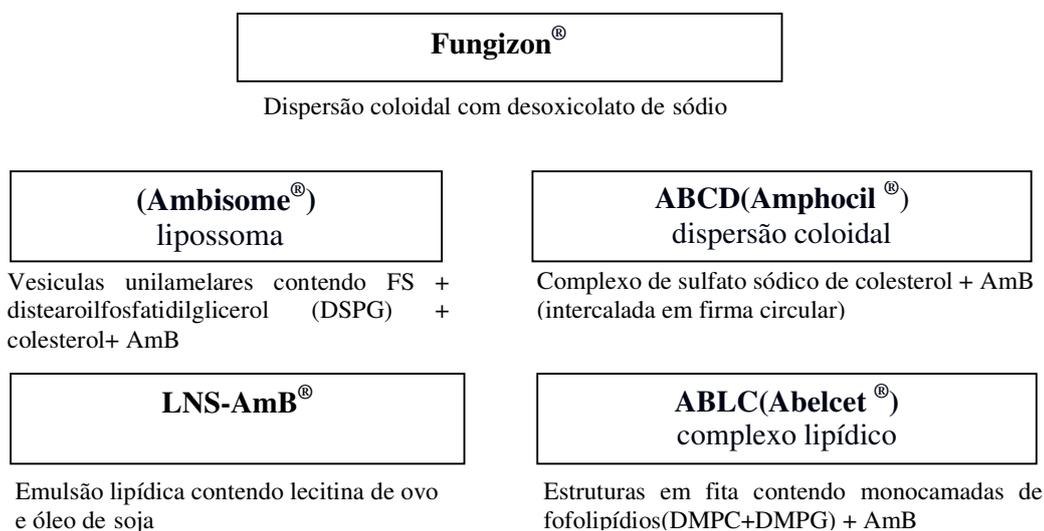
Em virtude da natureza anfipática da AmB ela exibe baixa solubilidade e baixa permeabilidade o que resulta em uma absorção oral ineficaz (inferior a 5%) (LANIADO-LABORIN et al., 2009), por isso as infecções sistêmicas tem sido tratadas através de infusão por via endovenosa, sendo necessários cuidados especiais ao paciente, como hospitalização (BENNETT, 2003).

Uma abordagem importante em estudos recentes com o objetivo de diminuir a toxicidade da AmB, é desenvolver formulações com a predominância de formas multi agregadas e não solúveis da mesma. Esses estudos se tornaram um desafio uma vez que a mesma formulação pode conter diferentes espécies presentes (ESPADA et al., 2008).

Muitos trabalhos foram desenvolvidos direcionados ao desenvolvimento de preparações lipídicas como veículo para fármacos. Lipossomas, emulsões e outros sistemas já

têm sido utilizados (FUKUI et al., 2003). As formulações comercialmente disponíveis contendo AmB e suas características estruturais podem ser descritas (esquema 1).

* Pós liofilizados para reconstituição e administração EV



Esquema 1: Formulações lipídicas comercialmente disponíveis

Fonte: FUKUI et al., 2003.

O Ambisone[®] é uma preparação lipossomal, constituída de vesículas unilamelares pequenas que está no mercado desde 1997 (LASIC & PAPAHAJOPOULOS, 1998; ROBINSON e NAHATA, 1999; VANDERMEULEN et al., 2006). É uma formulação liofilizada para reconstituição administrada através de infusão intravenosa. Sua formulação contém fosfatidilcolina de soja, distearoilfosfatidilglicerol (DSPG), colesterol e AmB na razão molar 2:1: 0,8: 0,4 (HILLERY, 1997; BOSWELL et.al., 1998, VANDERMEULEN et al., 2006).

A AmB liga-se a bicamada lipídica do lipossoma através da formação de um complexo de cargas entre o grupamento amino do fármaco e o grupamento fosfato do DSPG, formando canais, sendo que o número mínimo de moléculas do fármaco necessárias para a formação do canal é de 16 (HILLERY, 1997; LASIC & PAPAHAJOPOULOS, 1998).

Relativamente ao Abelcet[®], constituído de dipalmitoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), pode-se inferir que os mesmos são complexados com AmB na razão molar 7:3:10. A AmB nesse complexo lipídico contém estruturas na forma de fita (ribbon like) cujo diâmetro é aproximadamente 1-10µm formando monocamadas estáveis de fármaco:fosfolipídios. Nessa formulação, as moléculas de AmB também se intercalam com os fosfolipídios, originando poros similares aos formados com esteróis em membranas fúngicas e AmB em lipossomas (HOOSHMAND-RAD et al., 2005; BOSWELL et al., 1998; BEKERSKY et. al., 1999; ROBINSON e NAHATA, 1999; TIPHINE et al., 1999; LARABI et al., 2004).

Devido ao grande tamanho do complexo, o mesmo sai rapidamente da circulação via sistema retículo endotelial e no macrófago as fosfolipases quebram as estruturas lipídicas, liberando o fármaco para o sítio de infecção. Esse efeito pode diminuir a nefrotoxicidade (ROBINSON & NAHATA, 1999).

Amphocil[®] é um complexo lipídico estável de AmB e sulfato de colesterol na razão molar 1:1, onde as moléculas estão intercaladas em um arranjo multimérico. Os dois componentes formam uma dispersão coloidal contendo partículas na forma de discos com diâmetro de 122nm e espessura de 4nm. Essas estruturas não apresentam um compartimento aquoso central, como no caso de lipossomas, uma vez que a associação com sulfato de colesterol torna a bicamada lipídica mais rígida impedindo a sua curvatura e, portanto a formação de estruturas fechadas. (HILLERY, 1997; BOSWELL et al., 1998; BEKERSKY et. al., 1999; ROBINSON e NAHATA, 1999). Dessa forma, uma das estratégias para diminuir a toxicidade do fármaco é desenvolver novos derivados ou formulações que diminuam a agregação ou produzam agregados menos tóxicos.

Estudos revelaram que sistemas lipídicos têm maior habilidade na retenção da molécula da AmB do que micelas de tensoativos além de liberarem o fármaco lentamente na forma de monômeros, reduzindo a toxicidade para as células humanas (LARABI et al., 2004).

A utilização de substâncias ativas insolúveis em água, bem como em substâncias apolares é uma problema em formulações farmacêuticas ou cosméticas. Na verdade, as formas farmacêuticas mais utilizadas em aplicações farmacêuticas são à base de água, o que severamente limita a escolha das formulações disponíveis. Obviamente, a substância ativa é apresentada como uma solução aquosa quando é solúvel em água. Alternativamente, a substância ativa é encapsulada em uma forma farmacêutica, seja solubilizada no interior de uma formulação ou incorporada em gotículas de um sistema emulsionado. Substâncias anfifílicas, as quais são solúveis tanto em meio polar quanto apolar também apresentam limitações quanto aos solventes orgânicos que podem solubilizá-las, os quais não podem ser utilizados na maioria das aplicações (NOOMEN et al., 2008).

A solubilização em agregados supramoleculares tais como micelas, MEs e lipossomas é uma alternativa importante. Agregados supramoleculares são relevantes na pesquisa farmacêutica, por associarem-se aos fármacos reduzindo sua toxicidade e permitindo sua biodisponibilidade modificada (CORREA et al., 2005).

Sistemas de liberação de fármacos tais como MEs tem sido propostos para aumentar a absorção e o índice terapêutico de vários fármacos (OLIVEIRA et al., 2004). Nos últimos anos MEs têm gerado interesse considerável como sistemas potenciais para liberação de fármacos. Um grande número de trabalhos tem sido publicados, os quais têm avaliado a habilidade de MEs em contraste com sistemas de liberação como lipossomas, micelas, emulsões dentre outros (LAWRENCE, 2000).

MEs são misturas líquidas, isotrópicas de água, óleo e tensoativo, e freqüentemente estão combinadas com co-tensoativos e são transparentes além de termodinamicamente

estáveis. Sua fase dispersa é geralmente lipofílica e age como potencial reservatório de fármacos, os quais em contato com as membranas semipermeáveis podem facilitar o transporte através dessas barreiras (ROGÉRIO et al., 2010).

Outras definições para MEs as descrevem como dispersões coloidais transparentes de água e óleo, as quais se formam espontaneamente quando compostos anfifílicos são adicionados (BAYRAK et al., 2005). Raman et al, 2003) as descreveu como líquidos de baixa viscosidade, termodinamicamente estáveis constituídos de dois líquidos imiscíveis sendo um deles a água (A) e outro o óleo (O) que se tornam-se homogêneos quando adicionadas de proporções adequadas de tensoativos co-tensoativos. MEs contém gotículas de óleo geralmente com raios de até 100nm circundadas por moléculas de tensoativos e dispersas em água (RAMAN et al., 2003).

O termo ME foi revisado várias vezes, e a definição mais aceita descreve as MEs como dispersões coloidais de água e óleo, estabilizadas por um tensoativo e por um co-tensoativo quando necessário. São opticamente transparentes ou semitransparentes, termodinamicamente estáveis, apresentam partículas de tamanho menor que 1,0 μ m, sendo, portanto, passíveis de serem esterilizadas por filtração. Além disso, as microemulsões apresentam baixa viscosidade, possuem grande capacidade para o transporte de fármacos. A grande estabilidade contra sedimentação ou cremação, e geralmente contra floculação e coalescência é devida em partes às dimensões micrométricas de suas gotículas (LAMAALLANN et al., 2005).

MEs são sistemas versáteis para várias aplicações (TROTTA et al., 1999). As mesmas facilitam a solubilização de compostos apolares em meio aquoso e vice-versa demonstrando se potencial na área farmacêutica. MEs óleo em água (O/A) aumentam a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água. Essa característica pode estar associada à melhor

absorção de fármacos em nano transportadores, através do trato gastrointestinal em função da diminuição da degradação ou do metabolismo dos fármacos (ROGÉRIO et al., 2010).

Quanto às estruturas das MEs, as mesmas podem ser tais que os domínios de óleo sejam envolvidos por uma região contínua de água (ME óleo em água), os domínios aquosos são envolvidos por óleo (ME água em óleo) ou ainda estruturas, onde ambos os componentes formam domínios contínuos interpenetrantes, com nenhum dos dois rodeando o outro, chamados de estruturas bicontínuas. As dimensões características de uma gotícula de óleo ou água, bem como de um domínio bicontínuo, é da ordem de 10-100 nm, pequenas para padrões macroscópicos, mas grandes em escala molecular. Geralmente as MEs com gotículas de óleo dispersas em água (O/A) ou de gotículas de água dispersas em óleo (A/O) são obtidas com os mesmos tensoativos, porém em diferentes proporções e em outra faixa de temperatura (RAMAN et al., 2003). (Figura 4).

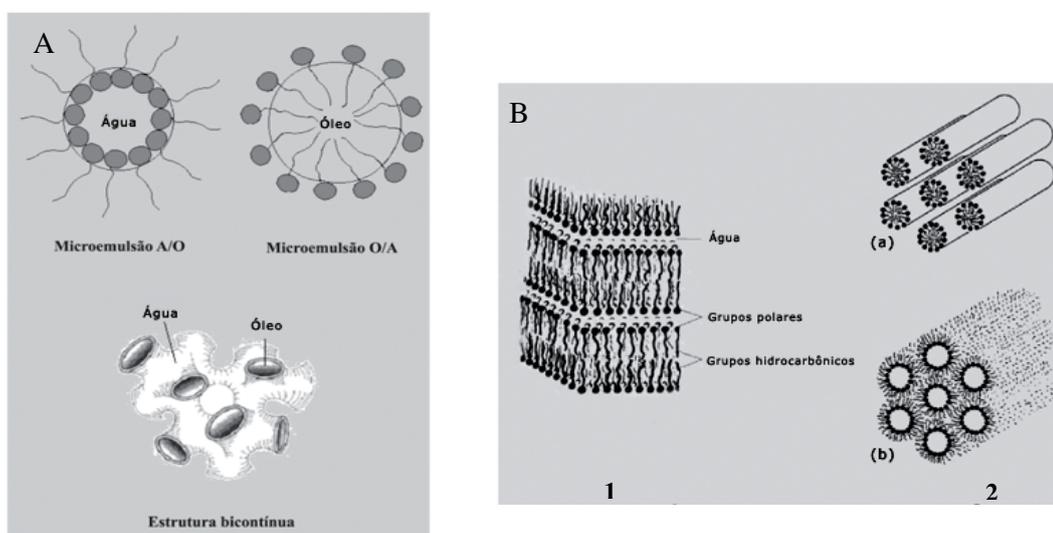


Figura 4: Exemplos de estruturas auto-organizadas pela associação de moléculas anfifílicas. Representação esquemática da organização de microemulsões (A) e de mesofases líquido cristalinas (B) compreendendo (1) fase lamelar, (2a) fase hexagonal e (2b) fase hexagonal reversa.

Fontes: (CASTILLO, 2002 e EZRAHI et al, 1999)

Enquanto as emulsões são estabilizadas por agentes emulsivos comuns as microemulsões podem ser adicionadas de um co-tensoativo, cuja função é diminuir a tensão interfacial para valores abaixo dos limites proporcionados pelo emulsivo comum. No entanto, nos casos em que os tensoativos são capazes de cumprir integralmente essa função, a presença dos co-tensoativos não é necessária e a composição da microemulsão restringe-se aos outros três componentes (OLIVEIRA et al., 2004).

As teorias envolvidas na formação e estabilização de MEs são o filme interfacial, a solubilização dos tensoativos e a teoria termodinâmica. A formação de MEs visa a combinação crítica entre os componentes da formulação visando obter a solubilização máxima da fase interna oleosa da fase dispersa. A ME possibilita a formação de gotículas muito pequenas, levando a um aumento da área superficial e uma superfície ativa para adsorção de energia livre. Esse processo leva a uma grande diminuição da tensão superficial estabilizando o sistema. Uma possível explicação para a teoria termodinâmica é que MEs resultam de grande energia livre adsorvida pelos tensoativos combinada com uma tensão de superfície muito baixa. (OLIVEIRA et al., 2009).

Alguns dos pontos de interesse pelas MEs que estimularam pesquisas sobre suas estruturas, dinâmica e interações referem-se ao fato de que suas gotículas podem ser consideradas microreatores nos quais podem se processar reações químicas confinadas em pequenas regiões. A restrição das dimensões das gotículas pode permitir o controle do crescimento de partículas ou polímeros formados como produtos destas reações. Em MEs de gotículas A/O, a fase aquosa pode servir como meio para solubilização de reagentes precursores de um produto de interesse que, posteriormente, são colocados em contato para formação do produto desejado, ao se promover a coalescência dos domínios aquosos (KAWACHI, 2002).

A possibilidade de formar microemulsão depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, que é determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença de co-tensoativo. A mistura de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) adequado proporciona a condição máxima de solubilização do óleo e da água. Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e, quando necessário, um co-tensoativo. Assim a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções tensoativo/co-tensoativo e entre as proporções água/óleo (FORMARIZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004).

Os fosfolipídios como a fosfatidilcolina de soja (FS) (Figura 5) são muito utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. A FS é um tensoativo com grande biocompatibilidade, independente da via de administração, apresentando biocompatibilidade, sendo bastante utilizada em medicamentos administrado via oral (ABOOFAZELI et al., 1994). Este é um dos principais tensoativos utilizados no preparo de microemulsões (VANDAMME, 2002). É considerada natural, sendo então rapidamente difundida na interface óleo-água (CRUZ et al., 2001).

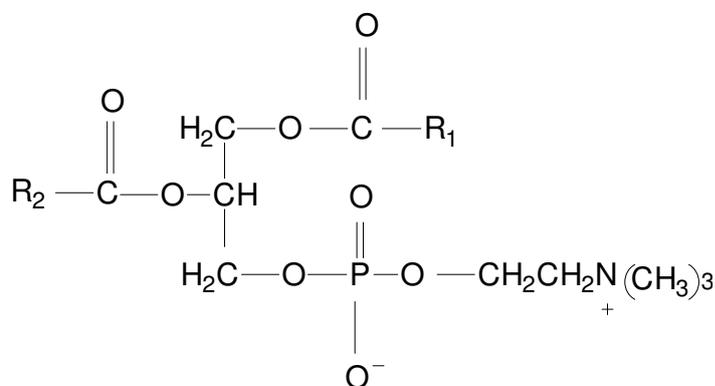


Figura 5: Estrutura química da fosfatidilcolina de soja

R¹ e R² são ácidos graxos idênticos ou diferentes

MERTINS et al., 2008

Como co-tensoativo utilizado destaca-se o oleato de sódio (Figura 6). É classificado como um tensoativo do tipo aniônico possuindo EHL igual a 18, sendo empregado como agente solubilizante (LACHMAN et al., 2001).

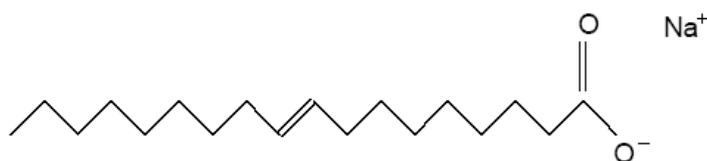


Figura 6: Estrutura química do oleato de sódio.

Fonte: FORMARIZ et al., 2008

A literatura também relata o efeito do CHO (ver Figura 2B) como fase oleosa nas propriedades estruturais e termodinâmicas de microemulsões lipídicas (FORMARIZ et al., 2008).

Estudos demonstraram que o aumento da concentração de CHO no sistema favorece a sua cristalização, ocorrendo na forma de bicamadas lamelares, levando a uma estrutura com menor mobilidade (STIDDER et al., 2005). O uso do CHO como fase oleosa pode modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos favorecendo o aumento da solubilidade e o direcionamento para sítios específicos, diminuindo com isso a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos (AZEVEDO et al., 2005; PRETE et al., 2006; DIAS et al., 2007).

Adicionalmente às vantagens oferecidas pelas MEs, a encapsulação monomolecular pela formação de complexos de inclusão também tem sido promissores no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. CDs podem ser produzidas pela transformação de cepas de certas bactérias tais como *Bacillus macerans* (ASTRAY et al., 2009).

Geralmente a inclusão monomolecular envolve a conformação espacial de uma única molécula na cavidade de outra molécula hóspede sem que qualquer ligação covalente seja formada. CDs são conhecidas por formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas, tanto em solução como em estado sólido, no qual o meio hidrofóbico da cavidade da CD circunda a molécula hóspede. Isso leva a alterações físicas, químicas e biológicas da molécula e podem eventualmente apresentar grande potencial farmacêutico (RIBEIRO et al., 2003).

CDs são oligossacarídeos cíclicos derivados de glicose contendo 6, 7, 8, 9, 10 ou mais unidades de glucopirranose (YUAN et al., 2008). Devido à conformação dessas unidades, as CDs apresentam-se em uma forma de cone truncado ou em forma de cilindro perfeito. Os radicais OH são orientados para o exterior do cone com os grupos hidroxila primários dos resíduos do açúcar na borda estreita do cone e os resíduos secundários nas extremidades mais largas. As moléculas de carbono estão alinhadas com a cavidade das CDs conferindo uma característica lipofílica nessa região. Em solução aquosa os grupamentos OH formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água que a circundam, resultando em uma camada de hidratação em torno da molécula de CD dissolvida (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

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. A α -CD é utilizada essencialmente para complexar moléculas pequenas ou cadeias laterais de moléculas grandes tais como prostaglandinas; a β CD é muito utilizada para complexar moléculas contendo massa molecular entre 200 a 800 g/mol e a γ CD é mais utilizada na complexação de moléculas de grande tamanho, como antibióticos macrolídeos e esteróides (LOFTSSON e BREWSTER, 1996). Outra condição é a polaridade da molécula encapsulada e sua competição com os demais compostos no meio. Os complexos inorgânicos não são, na sua maioria, adequados para a complexação com CDs, embora existam algumas exceções. Até 2007 foi

verificada a existência de aproximadamente 35 diferentes fármacos disponíveis no mercado em formulações constituídas de complexos de inclusão com CDs. Desses, podem ser citados o meloxicam, o clordiazepóxido comprimidos, e nimesulida comprimidos sublinguais. Nesses produtos farmacêuticos as CDs são agentes complexantes utilizados para aumentar a solubilidade de fármacos fracamente solúveis e aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade. Além disso, CDs podem ser empregadas para reduzir ou prevenir irritação gastrointestinal e ocular, reduzir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis e ainda prevenir interação entre fármacos ou de fármacos com excipientes (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Por uma série de razões, tais como custo, disponibilidade e dimensões da cavidade, a β CD é a mais utilizada, entretanto, sua solubilidade em água é ainda uma barreira quando se trata de sua inclusão em produtos farmacêuticos. β CD é a CD mais útil em função do tamanho médio das moléculas a serem solubilizadas ser adequado à dimensão da sua cavidade, entretanto sua capacidade de solubilização é limitada devido a sua baixa solubilidade em água (18,5g/L) (NOOMEN et al., 2008).

Para superar essas dificuldades, modificações químicas têm sido feitas no sentido de melhorar e expandir as funcionalidades das CDs (RIBEIRO et al., 2003). Esses derivados são β CDs sinteticamente modificadas, com alta segurança podendo ser utilizadas por diversas vias incluindo a parenteral (JULLIAN et al., 2007 e 2008).

Considerações especiais sobre o uso de CDs por via oral no controle da liberação estão relacionadas à sua conformação tipicamente adequada para liberação através de porções do trato gastrointestinal (TGI), porém as características do meio (TGI) podem alterar a influência que as CD possuem na solubilização de fármacos. Como a forma farmacêutica passa através do TGI as mudanças do meio fisiológico, tais como pH, conteúdo aquoso, sais biliares e concentração, podem influenciar na cinética de dissolução e solubilidade de fármacos, CDs,

assim como dos complexos. De maneira geral é conhecido que CDs formam complexos de inclusão (Figura 7) onde as moléculas de água localizadas dentro da cavidade central lipofílica são substituídas por moléculas lipofílicas. Entretanto os grupos OH localizados em sua superfície externa das CDs são hábeis na formação de ligações de hidrogênio com outras moléculas originando complexos solúveis em água com compostos lipofílicos insolúveis em água (ASTRAY, 2009).

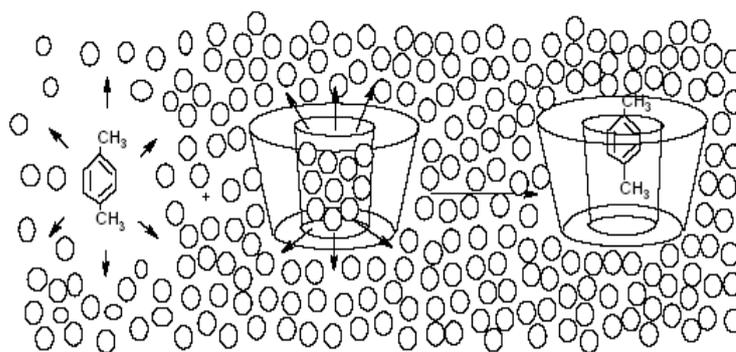


Figura 7: Esquema da formação de complexos de inclusão de p-xileno por uma CD

Fonte: ASTRAY et al., 2009.

Loftsson e Duchene (2007) citaram que substituições de qualquer grupamento OH por moléculas hidrofóbicas tais como grupos metoxi resultam em drástico aumento de sua solubilidade aquosa. Posteriormente tornaram-se disponíveis CDs com derivados hidroxipropil e sulfobutileter. Outros autores relatam aumento da solubilidade aquosa de furosemida com compostos derivados de β CDs, tais como 2-hidroxypropil- β -ciclodextrinas (HP- β CD) e sulfobutil éter-7- β -ciclodextrinas (SB- β CD). Esses derivados de β CD apresentam aumento na segurança e nas propriedades de solubilidade comparadas à β CD (SPAMER et al., 2002; ROGÉRIO et al., 2010).

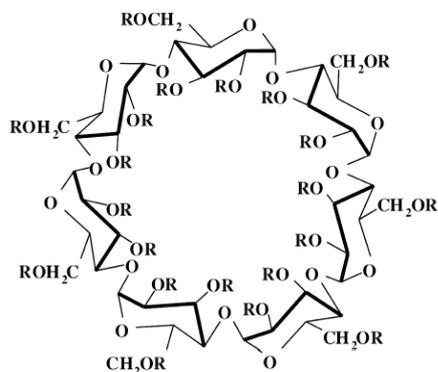
HP- β CD é uma CD alternativa para β , γ e α CDs que apresenta aumento de solubilidade em água. A mesma foi primeiramente CD aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA). Estruturalmente é preparada por reação com óxido de propileno em

solução aquosa alcalina. A alta concentração de álcalis favorece alquilação com O-6 e, quando o meio estiver fracamente alcalino ocorre o favorecimento de alquilação em O-2 (YUAN et al., 2008).

CDs hidrofílicas tais como HP- β CD e SB- β CD são consideradas não tóxicas em doses moderadas via oral e endovenosa. HP- β CD é muito mais solúvel em água e menos tóxica que a β CD natural. A mesma pode ser encontrada em várias formulações farmacêuticas como a de Itraconazol com dose via oral acima de 8g/dia e via endovenosa acima de 16h/dia. HP- β CD tem apresentado boa tolerância em humanos tendo como principal evento adverso diarreia em concentrações de 16 a 24g/dia por 14 dias. HP- β CD é quase que exclusivamente eliminada por via renal via filtração glomerular (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

A Metil β CD é uma mistura de várias moléculas de CDs parcialmente ou totalmente metiladas com 11 substituições de grupos OH. Elas diferem entre si não somente no número, mas também na posição dos grupamentos metil. Os grupamentos OH em C₆ estão totalmente substituídos e em C₂ e C₃ parcialmente (LEGRAND, 2009).

SB- β CD é um derivado polianiónico da β CD altamente solúvel em água, com um grau médio de substituição de sete. A habilidade de inclusão da SB- β CD é geralmente maior que a CD de origem devido à porção butil hidrofóbica que se estende à cavidade da CD (RIBEIRO et al., 2003). A Figura 8 ilustra a estrutura geral da β CD e suas derivadas.



β CD, R=H

HP- β CD, R=CH₂CHOHCH₃ ou H

ME- β CD, R=2, 6 = CH₃ 3=H

SB- β CD, R= -CH₂(CH₂)₃OSO⁻, Na⁺ ou -H (em razões variadas)

Figura 8: Estrutura geral de β CD, e radicais das CDs derivadas HP- β CD, ME- β CD e SB- β CD (JULLIAN et al., 2008).

Há muitos anos já existe a introdução de medicamentos contendo CDs (Tabela 1).

Tabela 1: CDs disponíveis no mercado e seu tempo de permanência até os dias atuais.

	Início	Produto comercializado	Tempo no Mercado (anos)
β CD	1970	Prostaglandina – Japão (Prostandin)	16
HP- β CD	1982	Itraconazol - USA (Sporaxox)	15
SB- β CD	1990	Voriconazol –USA (Vfend)	12

Fonte: THOMPSON, 2006.

O potencial de complexação conhecido para CDs é grande e inclui compostos tais como cadeias alifáticas, aldeídos, cetonas, alcoóis, ácidos orgânicos, gases, aminas e compostos polares tais como oxiácidos. Devido à disponibilidade de grupos hidroxílicos reativos múltiplos, a funcionabilidade das CDs é aumentada por modificações químicas. Através das modificações as aplicações das CDs são expandidas. CDs são modificadas através

de substituição de grupos funcionais na face primária ou secundária da molécula (SINGH et al., 2002).

Quanto à toxicidade pode-se inferir que este é também um fator bastante relevante, concluindo-se que quando administradas oralmente as ciclodextrinas mostram-se inofensivas, devido à insignificante quantidade absorvida (SILVA, 2005 apud MORES & ZANIN, 2000).

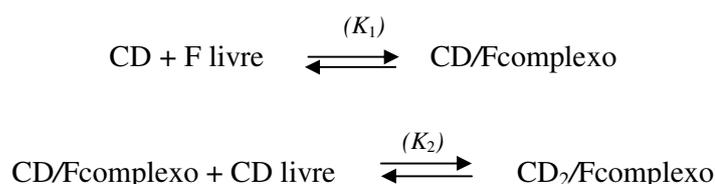
Diversos estudos relatam o seu uso para aumentar a biodisponibilidade oral de compostos ativos (CARRIER et al., 2007). Nesses são empregados CDs naturais e CDs derivadas e vários tipos de veículos, várias concentrações e várias razões fármaco:CD. Efeitos positivos têm sido observados na maioria dos casos. Tipicamente, o complexo ou mistura física de fármaco e ciclodextrina é dosado e o resultado dos parâmetros farmacocinéticos é comparado com aqueles resultados relacionados com o fármaco não complexado ou em formulações comerciais (SINGH et al., 2002; SPAMER et al., 2002; CARRIER et al., 2007).

Complexos de inclusão são formados parcialmente na interface por interação de ácidos graxos da cadeia de triglicérides. Essa molécula constitui um agente ativo de superfície. A ciclodextrina se liga a uma cadeia de ácido graxo e é orientada para a fase aquosa enquanto os ácidos graxos são orientados para a fase oleosa. Isso explica o papel estabilizador das CDs em emulsões. Dependendo do tipo de ácido graxo uma, duas ou mais CDs podem interagir (DUCHENE et al., 2003).

Há alguns requisitos para a formação de complexos de inclusão, dentre eles podem ser citados a constante de estabilidade e a toxicidade. A constante de estabilidade do complexo de inclusão (K_s) ou constante de equilíbrio indica se a molécula está mais associada (protegida no interior da cavidade da CD) ou dissociada (livre em solução). Seu valor numérico é diretamente proporcional a associação da molécula hóspede no interior da CD. Este é um parâmetro importante na avaliação da afinidade e para o grau de ligação das moléculas com a CD (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Segundo Higuchi & Connors (1965) um método frequentemente usado para a determinação da K_s é a construção de um diagrama de solubilidade de fases.

Dependendo do número de ciclodextrinas envolvidas na formação do complexo, poderá haver a formação de dois tipos de constantes:



A formação de complexos de inclusão ocorre através de dois tipos de interação:

- (1) Criação de ligações de hidrogênio entre os grupos carboxílicos das cadeias dos ácidos graxos e a hidroxila na posição 6 da CD;
- (2) Criação de interações hidrofóbicas entre a cadeia de ácidos graxos a cavidade da CD (DUCHENE et al., 2003).

CDs formam complexos de inclusão com substâncias com tamanho, polaridade e forma geométrica compatíveis com a dimensão de sua cavidade. Alternativas para a formação de complexos com moléculas significativamente maiores que sua cavidade, poderão ocorrer pela interação parcial do hóspede ou mediante a formação de complexos ciclodextrina-hóspede de estequiometria diferente de 1:1. Conforme Figura 9, os complexos de inclusão são classificados em:

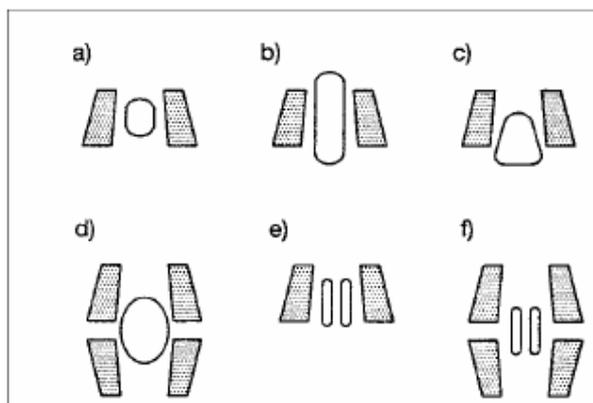


Figura 9 - Principais tipos de complexos de inclusão

Fonte: WENZ, 1994.

- Completa: quando a molécula hóspede é de tamanho pequeno e entra totalmente na cavidade da ciclodextrina (Figura 9 a).
- Parcial: quando a molécula somente entra parcialmente na cavidade da ciclodextrina (Figura 9 c).
- Axial: quando a molécula hóspede é de tamanho longo e estreito e se estende através do eixo mediano da ciclodextrina (Figura 9 b).
- Tipo “sandwich”: quando a molécula hóspede é muito grande e necessita de duas moléculas de ciclodextrina para formar o complexo (Figura 9 d).
- Complexos de estequiometria superior: são exemplificados pela inclusão 1: 2, onde duas moléculas hóspedes interagem com uma ciclodextrina (Figura 9 e) ou duas moléculas hóspedes para duas ciclodextrinas (Figura 9 f). (WENZ, 1994).

CDs não são meramente grupos de excipientes, mas são ferramentas tecnológicas que podem proporcionar modificações químicas. As mesmas têm demonstrado utilidades tecnológicas como modificadores de microambientes por solucionarem uma série de problemas atuais no que se referem a sua atuação como agentes quelantes moleculares de importante crescimento na área alimentícia, de medicamentos, agricultura e técnicas

cromatográficas. A versatilidade das CDs e CDs modificadas está demonstrada em sua faixa de aplicações para cosméticos, fármacos e alimentos (LEGRAND et al., 2009).

Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram a habilidade de β CD para a formação de complexos de inclusão com AmB. Foi realizada a complexação de β CD com AmB em concentrações $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ em solução tampão fosfato 50mM pH 7,4 e mostrou a presença de formas auto-associadas assim como a presença de monômeros. Quando a AmB na mesma concentração ($5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) foi incorporada à solução de β CD 13 mmol.L^{-1} ocorreu uma mudança hipsocrômica na banda correspondente à presença de formas agregadas para bandas correspondentes às formas monoméricas (FRANZINI, 2006). Esse fato sugere a complexação do fármaco com a CD e a presença de monômeros na formulação, os quais são conhecidos por apresentarem menor toxicidade. Concluímos dessa forma que a AmB complexada em β CD seleciona formas monoméricas do fármaco, porém apenas parcialmente.

Noomen (2008) e colaboradores citaram a dificuldade de desenvolver formulação de griseofulvina, um agente antifúngico. A solubilização com o uso de tensoativos é limitada além da concentração desse composto ser alta o que causa problemas de tolerância. Solubilização em sistemas biocompatíveis tais como nanopartículas de poliéster foi avaliada e resultou em encapsulação limitada de fármaco. A solubilização com CDs foi uma alternativa mais interessante, pois mostrou que é possível formar complexos de inclusão com esse fármaco. Outro antifúngico de cadeia que foi estudado foi a AmB que possui uma cadeia extensa e mostrou habilidade na formação de complexos de inclusão com γ -CD.

Chakraborty e Naik em 2003 estudaram a complexação de AmB com SB- β CD e HP- β CD e sua introdução em lipossomas. Foi constatado nesse estudo que as CDs citadas protegeram de forma mais efetiva o fármaco contra efeitos destrutivos da sua interação com

as lipoproteínas e células de membrana humana quando inserida na cavidade dessas CDs modificadas.

Considerando os fatos citados nesse trabalho incluindo o fato da alta toxicidade da AmB, do estado de agregação ser um fator limitante para sua toxicidade e absorção aliado às potencialidades de sistemas de liberação prolongada tais como MEs, lipossomas, ciclodextrinas entre outros, estudos nesse sentido merecem atenção especial visando o desenvolvimento de novas formulações que se somarão às opções atualmente disponíveis para a terapêutica antifúngica

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

O presente estudo tem por objetivo a obtenção de complexos de inclusão de AmB com derivados de β CD e proceder à sua incorporação de ME lipídicas biocompatíveis com o intuito de melhorar a solubilidade e diminuir a toxicidade do fármaco.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Esse trabalho tem por objetivos:

- Desenvolver sistemas de liberação microemulsionados para administração oral de AmB utilizando fosfatidilcolina de soja, oleato de sódio e Tween-20 como tensoativos, colesterol como fase oleosa e tampão aquoso;
- Desenvolver um complexo AmB:CDs
- Proceder a incorporação do complexo AmB:CDs nas microemulsões desenvolvidas
- Proceder à caracterização físico-química dos sistemas obtidos;
- Avaliar os parâmetros de incorporação da AmB no sistema ME:CD;
- Avaliar a liberação “*in vitro*” da AmB nos sistemas desenvolvidos.

4.0. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. MATÉRIAS PRIMAS, REAGENTES E SOLVENTES:

- ✓ Acetonitrila, J.T. Baker, HPLC;
- ✓ Ácido fosfórico, Synth, Brasil;
- ✓ Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade $18,2\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$;
- ✓ Álcool metílico, Synth, Brasil;
- ✓ Anfotericina B 900mcg/mg lote 05976/2007 (Cristália)
- ✓ Anforicin B, Cristália;
- ✓ Dimetilsulfóxido, Sigma Chemical Co;
- ✓ Colesterol, Vetec, Brasil
- ✓ EDTA, Vetec, Brasil;
- ✓ Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200), Lucas Meyer, Alemanha;
- ✓ Hidróxido de sódio, PA-ACS, Grupo Química Brasil;
- ✓ Lauril sulfato de sódio, Synth, Brasil;
- ✓ Ácido Oleico, Synth, Diadema, Brasil.
- ✓ Clorofórmio, Merck, Darmstadt, Germany.
- ✓ Monolaurato de sorbitano etoxilado (Tween 20[®]), Aldrich Chemicals;
- ✓ β -ciclodextrina Merck[®];
- ✓ Sulfobutiléter β -ciclodextrina, CyDex Inc., Lenexa, Kansas, U.S.A.;
- ✓ Metil β -ciclodextrina Sigma Chemical Co;
- ✓ Hidroxipropil β -ciclodextrina Merck[®];

4.1.2. EQUIPAMENTOS

- ✓ Agitador magnético Corning;
- ✓ Agitador Vórtex;
- ✓ Analisador de partículas *Light Scattering* – Brookhaven Instruments Corporation, modelo EMI 9863 – fonte de laser He-Ne 10mW, 514 e 532nm – HUGHES; Auto correlator 64 canais (Instituto de Química – UNESP – Araraquara);
- ✓ Balança digital Ohaus;
- ✓ Bomba a vácuo, Tecnal – TE – 058;
- ✓ Coluna Symmetry® C₁₈, 5 µm, 100 Å, 3,9 mm x 250 mm, 4,6 mm φ;
- ✓ Cubetas de quartzo para espectrofotometria, capacidade 5 mL, caminho óptico de 1 cm – Spectrocell;
- ✓ Espectrofotômetro de UV-VIS, Hewlett Packard 8453, com HP UV-Visible ChemStation Software;
- ✓ Liofilizador Solab, com bomba de vácuo Savant modelo VLP 285;
- ✓ Estação de dissolução Dissolution SRO plus, Hanson Research, Chatsworth, USA;
- ✓ Filtros descartáveis para seringas, porosidade 0,22 µm, Corning® Incorporated;
- ✓ Membranas descartáveis para seringas, porosidade 0,45µm, Corning® Incorporated;
- ✓ Microscópio-estereoscópio Leica MZAPO (Leica™)
- ✓ Peagômetro Quimis;
- ✓ Reômetro Carri-med CSL 100 (TA Instruments);
- ✓ Sistema de cromatografia líquida (CLAE) Waters Alliance equipado com detector UV-Vis 2487, operando a 409 nm, com injetor automático;
- ✓ Sistema de purificação de água MILLIPORE®, Milli - Q Plus;
- ✓ Ultracentrífuga HITACHI, modelo Himac CP 80 β;
- ✓ Ultrassom, Branson, modelo 1210;

- ✓ Ultrassom de haste - Sonicador[®] Ultrasonic Liquid Processor modelo XL2020[™] ;
- ✓ Microscópio de varredura - JEOL[®] modelo JSM T330A
- ✓ Difratorômetro de Raios X modelo D500 Siemens
- ✓ DSC-50 CEL Shimadzu
- ✓ TGA-50 Shimadzu
- ✓ Equipamento Ressonância Magnética Nuclear Varian Inova 500.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNÁRIO PARA O SISTEMA ESTABILIZADO POR FS:OS:Tw

Partindo-se de misturas de tensoativo/co-tensoativo FS:Tw:OS (1:1:1) foram preparadas, em triplicata, formulações de 3g com composição variando de 10 a 90% da mistura de tensoativos. A este sistema foi adicionado CHO, como fase oleosa, em concentrações decrescentes correspondentes de 90 a 10%. Cada amostra foi titulada com tampão Fosfato 50mmol.L⁻¹ pH 7,4 e submetida à ultrasson utilizando-se potência 220 Watts, operando em modo descontínuo por 20 minutos à temperatura ambiente. Após cada sonicação, cada amostra foi centrifugada a 3800rpm por 15 minutos 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.

4.2.2. ANÁLISE DA VARIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS GOTÍCULAS DA FASE INTERNA POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ.

A análise de diâmetro das gotículas foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS - Brookhaven Instruments Corporation, EMI 9863) utilizando equipamento contendo um laser fonte He-Ne 10mW, 532 nm-HUGHES, auto correlator, 64 canais. As amostras foram diluídas com tampão fosfato 50mM pH 7,4 e filtradas em membrana de acetato de celulose 0,22 μ m. O correlator foi operado de modo a estabelecer 10 determinações e calcular uma média de acordo com a intensidade de luz espalhada. Os resultados são a medida das 10 determinações e seu desvio padrão. As medidas foram conduzidas a 25°C

Foram selecionadas 8 amostras no diagrama de fases e posteriormente foram verificados os diâmetros das gotículas da fase interna através do preparo de dois grupos de amostras. O primeiro foi preparado variando-se a concentração de tensoativos, mantendo fixa a concentração de fase óleo. No segundo grupo manteve-se fixa a concentração de fase oleosa variando-se as concentrações de tensoativos (Tabela 2).

Tabela 2: Composição das amostras analisadas

GRUPOS	AMOSTRA	ÁGUA (%)	ÓLEO(%)	TENSOATIVO(%)
Grupo 1	A	90	5	5
	B	85	5	10
	C	80	5	15
	D	75	5	20
Grupo 2	E	82	3	15
	F	79	6	15
	G	76	9	15
	H	73	12	15

4.2.3. INCORPORAÇÃO DE AmB NAS MICROEMULSÕES EM FUNÇÃO DAS PROPORÇÕES DE TENSOATIVO E VOLUME DE FASE INTERNA

Foi avaliado o efeito do tensoativo e da fase oleosa na incorporação de AmB nas MEs. CHO foi adicionado à mistura de tensoativos FS:OS:Tw (1:1:1). Posteriormente a essa mistura foi adicionada a fase aquosa, em proporções que variam dependendo do conteúdo de óleo e tensoativo e submetidas à ultra som operando em modo descontínuo por 20 minutos com pulsos a cada 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 11.180 (x g) por 15 minutos. Dois grupos de amostras foram submetidos a esse experimento, sendo que o primeiro manteve fixas as proporções de tensoativo e variou a fase oleosa em uma faixa de 3 a 12% e o segundo manteve fixa as proporções de óleo e variou as proporções de tensoativo em uma faixa de 5 a 20%. AmB em excesso foi adicionada a cada amostra, sendo posteriormente submetidas a ultra som por 20 minutos de modo descontínuo com pulsos a cada 1 minuto e centrifugadas a 11.180 (x g) por 15 minutos. Detalhes das composições estudadas estão descritas na Tabela 3.

4.2.3.1 . Determinação da densidade relativa das MEs

As densidades relativas foram determinadas pelo método do picnômetro, de acordo com metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 4 ed., (1988) usando-se como referência água bidestilada e deionizada em aparelho Millipore modelo Milli-Q Plus. As determinações foram obtidas em triplicata a partir das MEs selecionadas, apresentadas na Tabela 3. A densidade foi obtida em ambiente com temperatura controlada de $20 \pm 0,5$ °C e calculada através da equação:

$$d = \frac{\text{Massa ME}}{\text{Massa AD}} = \frac{\text{MPic ME} - \text{MPic V}}{\text{MPic AD} - \text{MPic V}} \quad (\text{Eq.1})$$

onde,

MPic ME a massa do picnômetro contendo a microemulsão,

MPic MPic AD a massa do picnômetro contendo água destilada

MPic V a massa do picnômetro vazio.

4.3.2.2. Determinação do volume de fase interna

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

$$\Phi = 1 - (w \cdot \delta) \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo:

Φ = volume de fase oleosa;

δ = densidade da ME;

w = massa de fase externa.

4.2.3.3. Curva analítica da AmB em metanol

A curva analítica foi obtida em intervalo de concentração de 0,1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de AmB utilizando metanol como solvente. As determinações foram feitas em triplicata por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando detector UV-Vis operando em comprimento de onda de 410 nm.

A metodologia para CLAE utilizada nesse trabalho foi desenvolvida e validada pelo grupo de pesquisa de nosso laboratório.

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

4.2.4. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

A reologia foi determinada em um reômetro Carri-Med CSL 100 (TA Instruments). Trata-se de um viscosímetro rotacional que serve para determinar as propriedades reológicas de líquidos Newtonianos e não Newtonianos. As análises foram determinadas nas temperaturas de 25°C. As leituras foram realizadas à temperatura ambiente. Uma quantidade de amostra necessária para cobrir toda superfície do sistema Cone e Placa foi colocada sobre a placa, sendo o excesso da amostra removido cuidadosamente com espátula. Os parâmetros estabelecidos foram:

Tempo de análise: 120 segundos para curva ascendente e 120 segundos para curva descendente (as leituras para total de 60 leituras).

Gradiente de cisalhamento: de 0 a 125 rpm (0 a 600 [1/s]).

Os gráficos obtidos relacionam os valores de gradiente de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), no eixo das abcissas, com os valores de tensão de cisalhamento (τ) no eixo das ordenadas. Todas as determinações foram realizadas em triplicata a 25°C (CORREA et al., 2005).

4.2.5. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

A fim de se confirmar a evolução estrutural dos sistemas amostras contendo composições descritas na tabela 3 foram submetidas à microscopia de luz polarizada (MLP). A MLP permite estudar estruturas anisotrópicas e birrefringentes.

As amostras preparadas foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio sob luz polarizada (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena).

4.2.6. DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE AmB em β CD, HP- β CD, SB- β CD E ME- β CD.

Os estudos de solubilidade foram desenvolvidos utilizando solução aquosa de acordo com o método de Higuchi e Connors (1965).

Excesso de AmB foi adicionado em 5mL de soluções aquosas contendo concentrações crescentes de β CD, SB- β CD, HP- β CD e ME- β CD (10, 15, 20, 30 e 50 mmol.L⁻¹). Essas soluções foram submetidas a banho de ultra som por 1 hora, antes do acréscimo da AmB na solução. As amostras permaneceram em agitador rotativo por 48h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 11.180 (x g) e filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,45 μ m. As concentrações foram determinadas por CLAE a 410 nm (LONGXIAO & SUYAN, 2006).

Foi utilizado um sistema CLAE Waters Alliance equipado com detector UV-Vis 2487, operando a 410 nm, coluna Symmetry® C₁₈, 5 μ m, 100Å, 3,9 mm x 250 mm, 4,6mm de diâmetro, com injetor automático. A fase móvel foi utilizada no modo gradiente (Tabela 3).

Tabela 3: Sistema cromatográfico em modo gradiente.

t (min)	Fluxo (mL/min)	Acetonitrila	EDTA 0,0025 mol.L ⁻¹
0 a 5	0,4	35	65
6 a 11	0,4	70	30
12 a 20	0,4	35	65

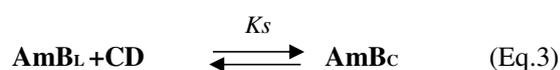
4.2.6.1. Metodologia estatística

Procedimentos da análise de regressão linear foram utilizados na avaliação da solubilidade de AmB nas CDs em estudo. A equação da reta que relaciona a quantidade de liberação de AmB com a concentração da ciclodextrina [CD], em mmol.L⁻¹, é da forma: [AmB] = b₀+b₁[CD]. Nesta equação, o coeficiente de regressão b₁ fornece a concentração de AmB solubilizada por unidade de CD, cuja significância estatística foi avaliada pelo teste t de

Student ao nível de significância de 5%. Foi construído um intervalo de confiança de 95% para esse coeficiente, o qual permitiu a comparação entre as CDs na solubilização de AmB.

4.2.7. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE (Ks)

A constante de estabilidade (Ks) foi calculada utilizando o modelo de Higuchi and Connors, 1965. O diagrama de solubilidade foi plotado relacionando a área em função da concentração de AmB dissolvida.



Onde:

Ks é a constante de estabilidade para AmB/CDs 1:1

L e C subscritos são o fármaco livre e complexado respectivamente

$$K_s = \text{inclinação}/S_0 (1 - \text{inclinação}) \quad (\text{Eq.4})$$

Tem-se que:

S₀= solubilidade intrínseca da AmB na ausência de HP-B-CD, SBE-βCD, ME-βCD e βCD (HIGUCHI & CONNORS, 1965).

A literatura relata que valores de Ks entre 200 e 5000 mol.L⁻¹ são considerados ideais para a formação do complexo (BLANCO et al., 1991).

4.2.8. PREPARO DAS MEs CONTENDO βCD, HP-βCD, SB-βCD e ME-βCD.

As ME foram preparadas através da mistura de FS:Tw:Os 1:1:1 como tensoativos e CHO como fase aquosa. A essa composição foram adicionadas as soluções de β-CD 13mmol.L⁻¹, HP-βCD, SB-βCD e ME-βCD 50mmol.L⁻¹ como fase aquosa. As amostras foram homogeneizadas e submetidas à ultra som de sonda por 20 minutos operando de modo descontínuo com pulsos de 1 minuto a cada 30 segundos.

4.2.9. INCORPORAÇÃO DE AmB NAS MICROEMULSÕES DESENVOLVIDAS CONTENDO β CD, HP- β CD, ME- β CD E SB- β CD.

Para a quantificação da AmB incorporada nas MEs foram preparadas cinco amostras distintas sendo:

- ✓ Microemulsão tendo como fase aquosa solução tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4;
- ✓ Microemulsão tendo como fase aquosa solução de HP- β CD 50 mmol.L⁻¹;
- ✓ Microemulsão tendo como fase aquosa solução de SB- β CD 50 mmol.L⁻¹.
- ✓ Microemulsão tendo como fase aquosa solução de ME- β CD 50 mmol.L⁻¹.
- ✓ Microemulsão tendo como fase aquosa solução de β CD 13 mmol.L⁻¹.

A esses sistemas foi incorporada AmB em excesso, permanecendo as amostras em agitador de tubos em temperatura controlada por 24h. Após esse período as amostras foram centrifugadas em 11.180 (x g) por 15 minutos, filtradas e diluídas para leitura por CLAE.

4.2.9.1. Sistema Cromatográfico

Sistema de cromatografia líquida (HPLC) Waters Alliance equipado com detector Uv-Vis 2487, operando a 410nm, coluna Symmetry® C₁₈, 5 μ m, 100Å, 3,9 x 250mm, 4,6mm ϕ , com injetor automático em modo gradiente, sendo o volume de cada injeção de 100 μ L.

Os parâmetros do equipamento são:

- ✓ Fase móvel: sistema solvente composto por acetonitrila:EDTA (0,0025mol.L⁻¹) filtrada em membrana de 0,22 μ m e degaseificada nas proporções iniciais 35:65 a 70:30.
- ✓ Temperatura da coluna: 25°C
- ✓ Detecção: Uv-visível em comprimento de onda 410 nm,
- ✓ Vazão da fase móvel: 0,4 mL/min.

- ✓ Volume da injeção: 100µL.

4.2.9.2. Curva analítica da AmB em Metanol

Soluções de AmB em metanol foram preparadas em concentrações que variaram entre 0,025 e 50µg/mL, fez-se análise em HPLC utilizando-se comprimento de onda de 410nm. Plotou-se uma curva analítica de concentração da AmB *versus* área do pico, com o objetivo de mensurar a incorporação da AmB nas microemulsões.

4.2.9.3. Procedimento analítico

Foram preparados 3mL de cada formulação selecionada dissolvendo-se a fosfatidilcolina de soja em volumes adequados de fase oleosa, Tween[®]20 e oleato de sódio. A fase aquosa contendo as CDs (βCD, HP-βCD, SB-βCD e ME-βCD) foi adicionada, através de titulação de volumes de 0,5 mL, sob agitação. Após esse procedimento foram levadas à sonicação de modo descontínuo, por 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se AmB em excesso em cada formulação as quais foram levadas novamente para sonicação pelo mesmo tempo mencionado anteriormente. Após sonicação as amostras foram centrifugadas a 11180g em Ultra centrífuga HITACHI, modelo Himac CP 80 β por 15 minutos, para eliminar resíduos de titânio liberados pela haste de sonicador e do excesso do fármaco. As análises foram realizadas em HPLC com detector UV-Vis operando em comprimento de onda de 410nm. As quantidades incorporadas foram calculadas utilizando-se a curva analítica da AmB em metanol.

4.2.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As fotomicrografias de AmB, das CDs e dos complexos de inclusão de AmB com CDs foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL[®] modelo JSM

T330A. As amostras liofilizadas foram depositadas em um porta amostras de metal e fixadas com fita adesiva. Posteriormente foram recobertas com uma fina camada de ouro (350Å) e colocadas diretamente no equipamento para obtenção das imagens (MURAKAMI, et al., 2009).

4.2.11. ANÁLISE TÉRMICA

AmB, CDs e complexos de inclusão com CDs foram liofilizados e analisados por análise térmica usando termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)

4.2.11.1. CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC), TERMOGRAVIMETRIA/ TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG).

A fim de verificar possíveis alterações na estabilidade térmica da AmB, das CDs e dos complexos de inclusão obtidos após com as CDs, foram obtidas as curvas TG do fármaco puro, da β CD, HP- β CD, ME- β CD, SB- β CD, dos complexos de inclusão contendo o fármaco nas mesmas razões molares fármaco:CDs, na faixa de 25-600°C, sob atmosfera de N₂ (100mL.min⁻¹), com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, utilizando cadinhos de alumínio fechados contendo aproximadamente 1mg de amostra.

Da mesma forma com o objetivo de verificar possíveis alterações na temperatura de fusão e identificar os eventos de degradação da AmB pura, das CDs e dos complexos de inclusão formados foi realizada a DSC das amostras. Apresentando a mesma razão molar fármaco-CDs foram obtidas as curvas de DSC, na faixa de 25-600°C, sob atmosfera de N₂ (100mL.min⁻¹), com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, utilizando cadinhos de alumínio fechados contendo aproximadamente 1mg de amostra. A célula de DSC foi calibrada antes dos experimentos utilizando padrão de Índio.

4.2.12. DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A análise por difração de raios X da AmB, das CDs e dos complexos de inclusão formados foi realizada utilizando o difratômetro Siemens modelo D500 com velocidade de goniômetro de 0,05/min. Sob radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5406$) e com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4 e 60°C .

4.2.13. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Medidas de RMN foram obtidas de em um equipamento Varian 500MHz. Foram analisadas as amostras de AmB, SB- β CD, HP- β CD e ME- β CD isoladamente e posteriormente de AmB:SB- β CD, AmB:HP- β CD, AmB:ME- β CD a temperatura de $301,1^\circ\text{K}$ sem utilização de padrão externo. Foi utilizado equipamanto Varian operando sonda de 5mm. Técnicas de Analise de Hidrogênio foram desenvolvidas utilizando DMSO deuterado como solvente. O espectro foi obido usando pulprog zgor, tempo de aquisição de 4,096s, 45° de pulso com frequência espectral de 7490,6 Hz, tempo de relaxação 0,904 s e 32 repetições. Tempo total de análise 2 min e 40s.

4.2.14. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS MEs E MEs ASSOCIADAS À β CD, HP- β CD, SB- β CD E ME- β CD COMO FASE AQUOSA DOS SISTEMAS.

Para avaliar o perfil de liberação da AmB quando incorporada às MEs e MEs associadas às CDs utilizou-se o modelo da célula de difusão *in vitro* em sistema estático do tipo Franz adaptada ao equipamento de dissolução (Dissolution SRO plus) (Figura 10). A célula onde foi depositada a amostra 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 foi preso por um anel de borracha. A membrana foi fixada no tubo de ensaio através de um anel adaptado

que proporcionou um diâmetro de 1,98cm. A área de exposição calculada foi de 3,08 cm². Foi utilizada como solução receptora 25mL de tampão fosfato isotônico 50mmol.L⁻¹ pH 7,4 adicionada de lauril sulfato de sódio a 1% para garantir “sink condition”, que se refere a capacidade excessiva de solubilização do meio receptor em relação ao fármaco.

O experimento foi conduzido a 37° ± 0,5°C e a solução receptora empregada foi mantida sob constante agitação a 100 ± 0,2 rpm. 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 foi imprescindível para manter a “sink condition”. A quantidade de fármaco liberado foi determinada por HPLC a 410nm. O experimento foi conduzido durante 12h.

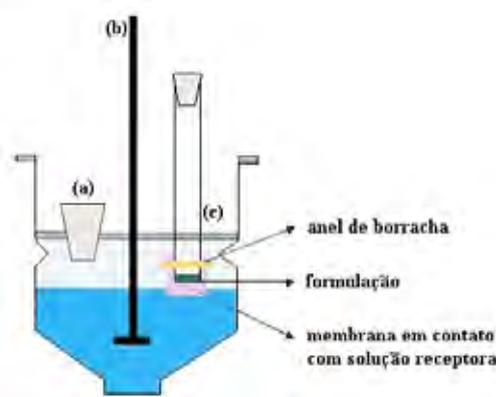


Figura 10: Esquema da célula de difusão adaptada ao dissolutor. (a) abertura para coleta de amostra e reposição, (b) entrada do dispositivo para agitação do meio, (c) abertura para colocação do tubo com a membrana (à esquerda) e esquema da célula de difusão adaptada ao equipamento de dissolução (à direita)

4.2.14.1. Metodologia estatística

No estudo dos perfis de liberação de AmB nas MES desenvolvidas foram empregadas análises de variância, complementadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Por esses procedimentos compararam-se médias de liberação porcentual de AmB em determinados tempos, ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma boa descrição de sistemas microemulsionados é necessário determinar o diagrama de fases que descreve as condições experimentais nas quais é possível combinar os componentes visando obter sistemas transparentes e de baixa viscosidade (OLIVEIRA et al., 2005).

A análise detalhada dos diagramas de fase demonstrou que a mistura dos componentes em diferentes proporções pode gerar vários tipos de agregados nos limites desses diagramas. Assim, no domínio dos agregados pode-se verificar a formação de microemulsões, emulsões e sistemas semitransparentes. Nessas várias formas de agregação, microemulsões podem influenciar diferentemente a velocidade de liberação dos fármacos (GABBOUN et al., 2001).

5.1. DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNÁRIO PARA O SISTEMA ESTABILIZADO POR FS:OS:Tw

A construção de diagramas de fase pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar as condições experimentais em que são formadas as MEs e em que proporções dos componentes outras estruturas podem estar presentes (FORMARIZ, 2004). Foi elaborado um diagrama de fases (Figura 11) para um sistema constituído por FS:OS:Tw como tensoativos na proporção 1:1:1, CHO como fase oleosa e tampão fosfato 50mmol.L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa.

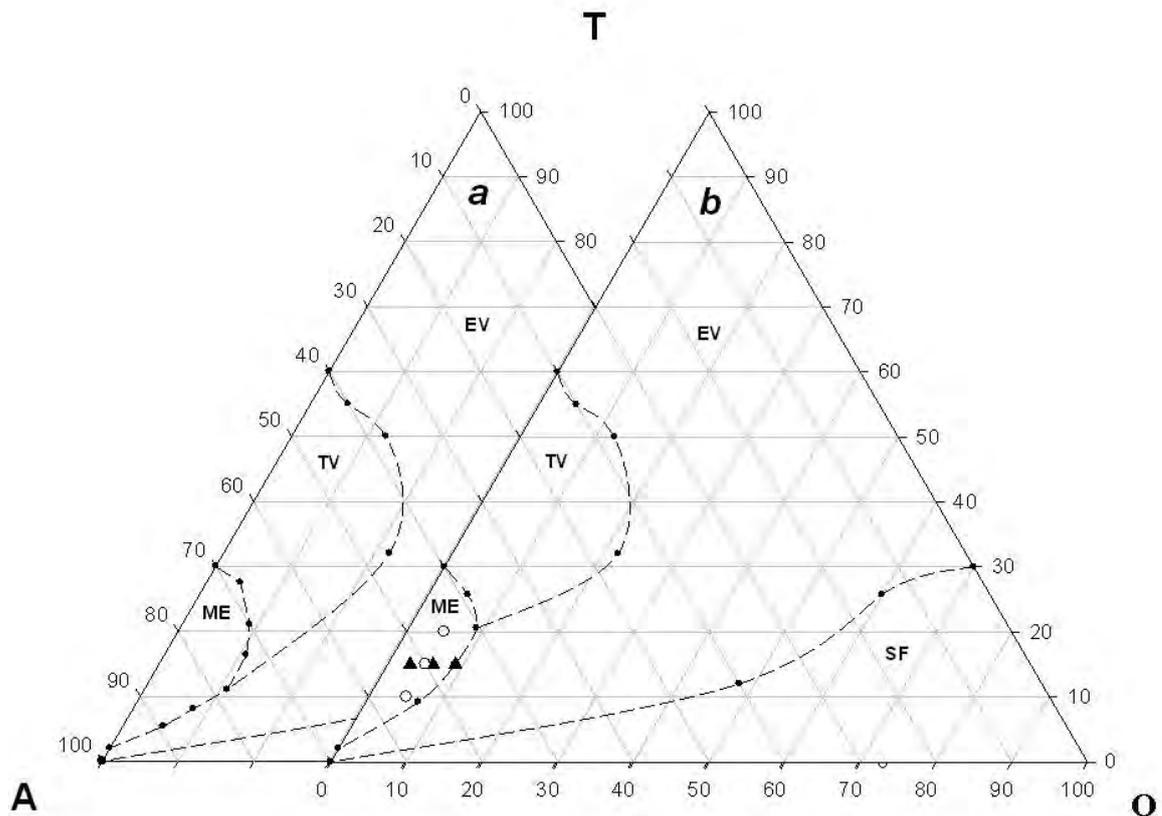


Figura 11: Diagrama de fases (a) sem AmB e (b) contendo AmB para o sistema estabilizado com mistura de tensoativos FS:Tw:OS na proporção 1:1:1 (m:m), CHO como fase oleosa e tampão fosfato 0,05M pH 7,4 como fase aquosa. As regiões definidas no diagrama de fases foram (TV) sistema transparente viscoso, (SF) separação de fases, (ME) microemulsão e (EV) emulsão viscosa. Símbolos vazios (\circ) representam aumento de proporção de fase tensoativo e os pontos cheios (\blacktriangle) representam aumento da fase oleosa.

Através do diagrama de fases pseudo ternário obtido observou-se que é possível adicionar grandes volumes de fase aquosa e volumes significantes de fase oleosa, originando MEs e mantendo estabilidade termodinâmica de sistemas O/A (OLIVEIRA et al., 2005).

Observa-se uma região predominante no diagrama de fases de formação de sistemas opacos (emulsões) classificadas como emulsões convencionais em proporções de tensoativos acima de 30% que vão se tornando mais extensas, à medida que a proporção de fase oleosa vai se elevando e conseqüentemente diminuindo a fase aquosa. Esse fato pode ser devido à fosfatidilcolina de soja, a qual possui EHL igual a 4, o que restringe a capacidade do sistema em incorporar fase aquosa (TROTТА, 1999; TROTТА et al., 2002).

Sistemas microemulsionados O/A foram obtidos em regiões de predomínio de fase aquosa (70%) tendendo à diluição infinita acompanhada de proporção de fase oleosa até 11%. Após esse limite os sistemas ficaram opacos, apresentando regiões de transição para as emulsões convencionais. Verificou-se ainda que essa região foi formada em uma faixa de tensoativos até o limite de 30% apresentando uma região mais proeminente com aproximadamente 15% de tensoativo e no máximo 10% de fase oleosa. Acima dessa proporção de tensoativos o sistema tornou-se opaco com transição para emulsões convencionais.

A transparência apresentada por esses sistemas ocorreu através de modificações na tensão interfacial entre água e óleo onde valores transientes negativos podem ser alcançados chegando, posteriormente a um equilíbrio que leva a formação de gotículas diminutas, portanto, microemulsões. A composição do tensoativo e suas proporções podem levar o sistema a valores de energia próximos de zero. Sabe-se que a razão entre o tensoativo e o co-tensoativo é extremamente importante para alcançar a estabilidade termodinâmica (OLIVEIRA et al., 2009). Quando a proporção de tensoativos foi elevada e respectivamente

a proporção de fase aquosa diminuída para uma faixa de 40% um aumento da viscosidade pode ser verificado formando sistemas com característica semitransparente (TV).

Sistemas microemulsionados convergem para os dois vértices dos diagramas pseudo-ternários onde predominam a fase aquosa e oleosa, respectivamente, separadas por uma região de transição entre emulsões ou sistemas transparentes para microemulsões, mas que pode ser transformada em ME A/O ou O/A, dependendo da proporção entre as fases aquosa e oleosa. Além disso, foi verificado que a incorporação de AmB nas MEs não alterou significativamente essa região no diagrama de fases. Na presença de AmB, a área de ME começou a aparecer com aproximadamente 70% de fase aquosa, sem, contudo modificar de forma significativa os limites de fase oleosa em 10%. Porém, observou-se que a presença de AmB ligada à fase oleosa, promoveu o aumento dos diâmetros médios em proporções acima de 9%, restringindo levemente a área de ME formada.

5.2. ANÁLISE DA VARIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS GOTÍCULAS DA FASE INTERNA POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ.

O fenômeno de dispersão da luz pelas microemulsões pode ser avaliado de maneira eficiente através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, a qual fornece informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas da ME e permite a determinação do diâmetro de suas gotículas. Porém, como o sistema é concentrado, ou seja, com elevada proporções de fase dispersa, a interpretação torna-se dificultada em razão de interações intergotículas. Para suprimir a interação entre gotículas, a diluição do sistema microemulsionado com a fase dispersante é aconselhável (LAWRENCE & REES, 2000; ABOOFAZELI et al., 2000; FORMARIZ et al., 2005).

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

liberação do fármaco. MEs contendo fármacos em sua composição de uma maneira geral apresentam diâmetros das gotículas da fase interna maiores em relação às vazias. Amostras desenvolvidas a partir da fixação de uma das fases (tensoativo ou fase oleosa) foram avaliadas em função das medidas de diâmetro médio de gotículas da fase interna. As formulações selecionadas foram divididas em dois grupos (Tabela 4): no primeiro, a fase oleosa foi mantida em 5%, variando-se o tensoativo de 5 a 20% (A a D) e, no segundo grupo a proporção de tensoativo foi mantida constante em 15%, variando-se a fase oleosa de 3 a 12% (E a H). Os volumes de fase também foram determinados.

Tabela 4: Composição das amostras para avaliação do tamanho das gotículas da fase interna do sistema em função do volume de fases e do tensoativo.

Grupos	Amostras	Fase oleosa (%)	Tensoativo (%)	Fase aquosa (%)	Volume de fase	Razão O/S
1	A	5	5	90	0,13	1
	B	5	10	85	0,16	0,5
	C	5	15	80	0,25	0,33
	D	5	20	75	0,32	0,25
2	E	3	15	82	0,20	0,2
	F	6	15	79	0,26	0,4
	G	9	15	76	0,30	0,6
	H	12	15	73	0,36	0,8

As amostras selecionadas para esse estudo e suas composições podem ser visualizadas na Figura 12.

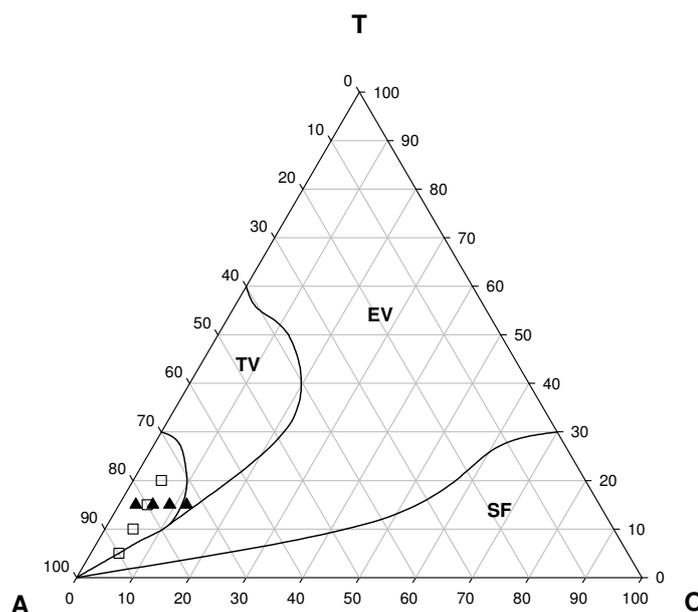


Figura 12: Representação das amostras selecionadas no diagrama de fases elaborado. As regiões definidas no diagrama de fases foram (TV) sistema transparente viscoso, (SF) separação de fases, (ME) microemulsão e (EV) emulsão viscosa. Símbolos vazios (○) representam aumento de proporção de fase tensoativo e os pontos cheios (▲) representam aumento da fase oleosa

As Figuras 13 e 14 ilustram o comportamento dos diâmetros das gotículas da fase interna com o aumento de proporção da fase oleosa e do tensoativo na presença e ausência de AmB. Foi observado que as alterações dos diâmetros das gotículas da fase interna são dependentes dos dois componentes, tensoativo e fase oleosa, uma vez que os mesmos na presença ou ausência de AmB diminuem com o aumento do conteúdo de tensoativo e aumentam com o aumento de fase oleosa. No caso dos tensoativos, ocorreu a diminuição pronunciada dos diâmetros das gotículas das ME em ausência de AmB e favoreceu a formação de sistemas característicos de MEs sendo transparentes e mostrando que a relação entre os tensoativos da mistura resultaram em um efeito favorável na redução da tensão interfacial, estabilizando MEs com valores de tensão mínimos para sua formação (PESTANA et al., 2008).

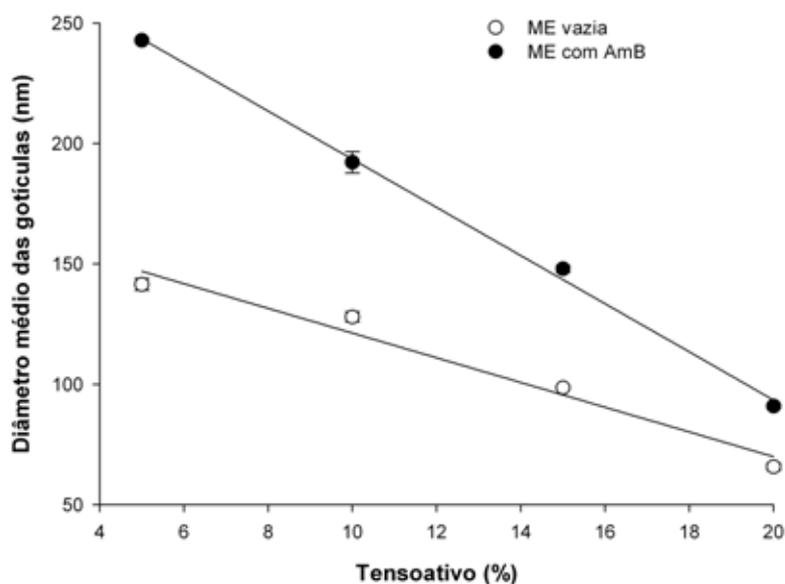


Figura 13: Efeito da proporção do tensoativo no diâmetro das gotículas com proporção fixa de fase oleosa em 5%.

Para as MEs em ausência de AmB, o aumento da proporção de tensoativo resultou em uma diminuição dos diâmetros das gotículas de 141 para 66nm. Essa redução pode ser explicada pelo particionamento das moléculas de tensoativo na interface óleo-água reduzindo a tensão interfacial, o que sugeriu a habilidade do tensoativo na estabilização do sistema promovendo diminuição da área superficial quanto menor a energia livre de superfície (NIRAULA et al., 2004).

Para as amostras com AmB o diâmetro das gotículas diminuiu de 243 para 91nm numa razão de aproximadamente 2,5 vezes com o aumento gradual da proporção de tensoativos. Verificou-se que o aumento promoveu uma termodinâmica favorável. Nessas condições foi possível chegar a diâmetros diminutos da fase interna. Observou-se uma maior inclinação da curva, a qual demonstra um efeito mais acentuado do tensoativo em região de maior concentração. Sugere-se que como a molécula do fármaco, por ser anfifílica

apresenta afinidade pelo filme interfacial, acentuando o efeito do tensoativo na estabilização das gotículas proporcionando diminuição ainda maior dos diâmetros.

Com o aumento gradual de fase oleosa e manutenção das proporções de tensoativo o perfil é oposto (Figura 14).

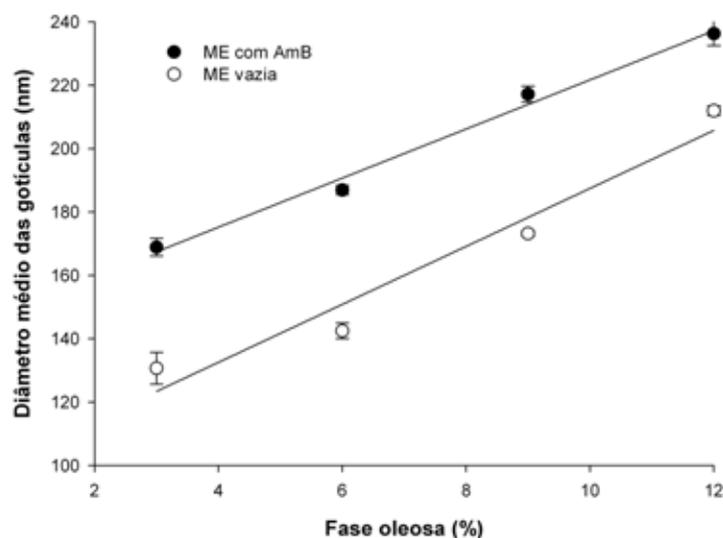


Figura 14: Efeito da proporção de fase oleosa no diâmetro das gotículas com proporção fixa de tensoativo de 15%.

Quando o sistema foi submetido à stress com elevação do conteúdo de fase oleosa foi possível observar um aumento gradual dos diâmetros das gotículas para ambos os sistemas, contendo ou não AmB. Para as vazias verificou-se um aumento de 130 para 212nm. Este fato demonstra que a proporção de tensoativo e sua combinação não são suficientes para estabilizar completamente a energia remanescente da interface. Esta energia foi criada com o aumento da área interfacial durante a formação do sistema onde ocorreu a divisão das gotículas de óleo em unidades menores gerando aumento de área superficial e incapacidade do tensoativo na manutenção de uma termodinâmica favorável.

Para as MEs contendo AmB o mesmo comportamento foi observado nas mesmas condições, sendo que os diâmetros aumentaram de 169 para 232nm. Quando o fármaco foi

adicionado ao sistema, houve um aumento do raio hidrodinâmico. Esse resultado pode ser explicado através das características químicas da molécula de AmB, as quais são anfifílicas, e porções do fármaco podem incorporar na interface óleo/água promovendo um aumento no volume local das gotículas. Esse fato ocorre devido à influência da cadeia carbônica da AmB, que se particiona na interface óleo-água, aumentando o diâmetro das mesmas. No entanto, entre as amostras incorporadas com AmB, o raio hidrodinâmico não apresentou diferença significativa com o aumento da concentração de fase oleosa, o que sugere igual eficiência do tensoativo na estabilização das gotículas na presença do fármaco. É também possível verificar que pequenas proporções de AmB ionizada pode se organizar na interface óleo e água nos espaços entre as moléculas de tensoativo, e dessa forma, aumentar o diâmetro médio das gotículas (FORMARIZ et al., 2006).

5.3. INCORPORAÇÃO DE AmB NAS MEs EM FUNÇÃO DAS PROPORÇÕES DE TENSOATIVO E VOLUME DE FASE INTERNA

A proporção de AmB incorporada aos sistemas e sua relação com as proporções de tensoativo e volume de fase interna foi avaliada. Os gráficos de incorporação determinados neste experimento demonstraram que a solubilização da AmB foi diretamente dependente tanto do volume de fase oleosa quanto de tensoativo tendo esses dois componentes um papel fundamental nos parâmetros de incorporação.

A análise da solubilidade de AmB foi realizada através de análise matemática utilizando um modelo que considera a fase oleosa das MEs como uma fase distinta da fase aquosa e que o tensoativo se organiza na interface O/A. Dessa forma se faz necessário a determinação dos volumes de fase (ϕ) das MEs, o qual foi definido como (Mackay, 1982):

$$\phi = 1 - \omega \cdot \delta \quad (5)$$

Onde ω é a relação entre a fração percentual da fase aquosa e δ é a densidade da ME.

A Figura 15 apresenta a variação da concentração de AmB incorporada em relação ao volumes de fase interna da ME.

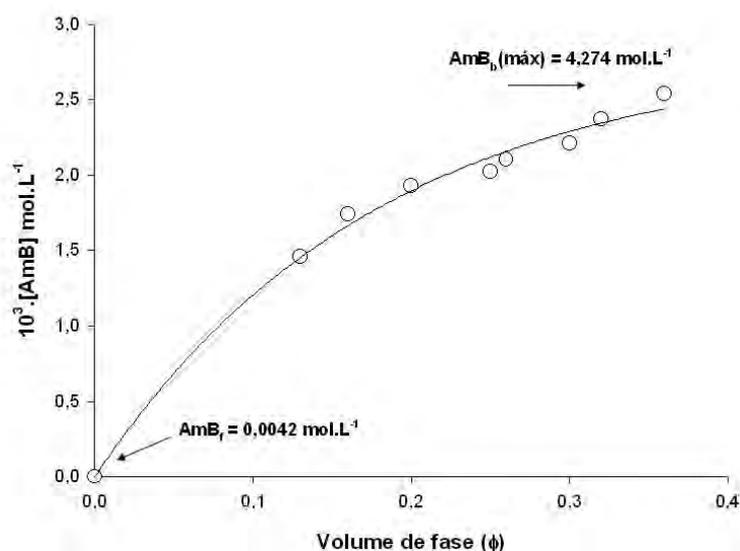
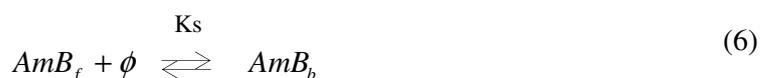


Figura 15: Efeito do volume de fase da ME, na incorporação da AmB a 25°C. $r = 0,997$

O fenômeno de incorporação de fármacos em MEs pode ser direcionado pela partição da AmB nas gotículas da fase oleosa que dependem da interação hidrofóbica entre o fármaco e as gotículas (OLIVEIRA et al., 2009). Tendo a AmB uma extensa cadeia carbônica sugere-se um aumento de sua solubilidade em sistemas com volumes de fase interna mais elevados, pois uma afinidade deve ser estabelecida. A concentração de AmB aumentou conforme o volume de fases foi aumentado, apresentando um fator de solubilidade (S_{∞}) em torno de 1000 quando comparado com a solubilidade intrínseca do fármaco em água. Dessa forma pode-se inferir que a fase oleosa e sua contribuição apresentam um efeito fundamental nesse processo.

Considerando os valores de pKa 5,5 e 10 referentes às funções carboxilato e amina respectivamente, nas condições experimentais estabelecidas, a AmB encontra-se na forma zwitteriônica. Verifica-se que essa interação apresenta influência mais significativa quando formas não-dissociadas permanecem no meio e se ligam mais facilmente à fase oleosa.

A incorporação de AmB na fase oleosa das MEs pode ser representada através do equilíbrio:



onde AmB_f e AmB_b representam proporção de AmB na fase aquosa e dissolvida pelo efeito do volume de fase das MEs, respectivamente..

A constante de associação K representa o particionamento de AmB entre as fases oleosa (interna) e aquosa (externa) e pode ser descrita:

$$K_s = \frac{AmB_b}{AmB_f \cdot \phi} \quad (7)$$

A concentração de AmB ligada às gotículas da fase oleosa (AmB_b), somada à concentração de AmB na fase aquosa (AmB_f) resultam na concentração total de AmB no sistemas ME (Eq. 8) e permite definir uma equação que representativa da variação da concentração de AmB dissolvida pelo efeito da variação do volume de fases (Eq.9)

$$AmB = AmB_f + AmB_b \quad (8)$$

$$AmB_s = \frac{AmB_f + AmB_b \cdot K_s \cdot \phi}{1 + K_s \cdot \phi} \quad (9)$$

Tendo como base as equações descritas, um ajuste dos dados experimentais foi realizado para determinação dos valores da constante de associação (K_s), cujo valor para as

MEs em pH 7,4 foi de 220 mmol.L⁻¹. Além disso, determinou-se a concentração máxima de AmB solubilizada na ME (AmB_{Máx}) sendo de 4,274mol.L⁻¹ determinada pela extrapolação dos dados, o qual levou a concentrações máximas relacionadas à volumes de fase correspondentes ao patamar no diagrama de solubilidade.

Os resultados refletem que a AmB_f demonstra uma importante interação com as gotículas da fase interna, originando AmB_b. Essas interações estabelecidas influenciam positivamente no processo de liberação “*in vitro*”, sendo dessa forma um fator de fundamental relevância.

A solubilidade de AmB também foi avaliada, relacionando-a à variação de tensoativo no sistemas. Como se trata na realidade de uma mistura de tensoativos (FS:Tw:Os) na proporção 1:1:1 foi estabelecida uma média das massa molares na mistura tensoativa.

A Figura 16 mostra os resultados que refletem a influência das proporções de tensoativo no aumento das concentrações molares de AmB incorporada.

Racionalizando a proporção de tensoativo presente na ME como um fator influente na concentração máxima de AmB dissolvida, o ajuste dos dados experimentais para o cálculo de K_s foi realizado através da equação 10.

$$AmB_s = \frac{AmB_a + AmB_o \cdot K_s \cdot [T]}{1 + K_s \cdot [T]} \quad (10)$$

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

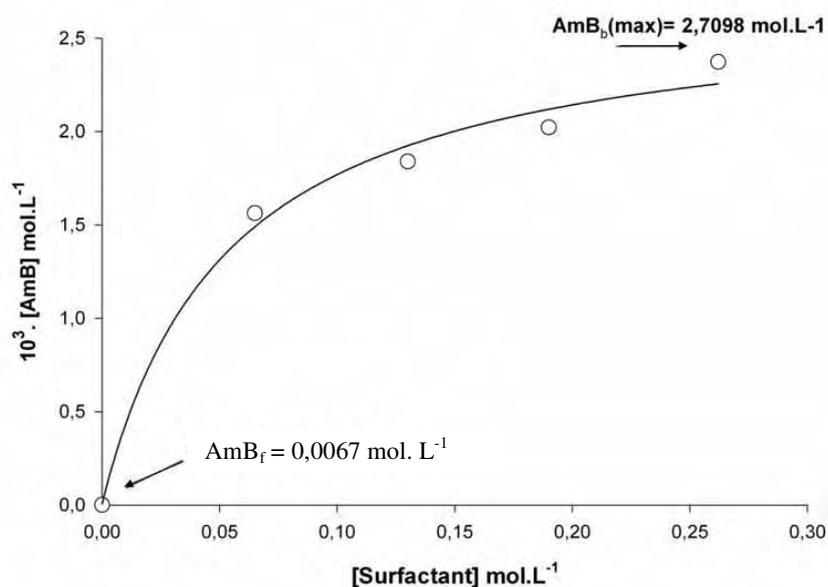


Figura 16: Efeito das proporções de tensoativo na incorporação de AmB a 25°C. $r = 0,995$

A concentração de AmB aumentou conforme a proporção de tensoativo foi aumentada, apresentando um fator de solubilidade (S_{∞}) em torno de 400 quando comparado com a solubilidade intrínseca do fármaco em água. Assim como o volume de fases, pode-se atribuir ao tensoativo um efeito também de grande influência nesse processo.

O valor de K_s para MEs em pH 7,4 obtido através das equações descritas, foi de 53,7 mmol.L⁻¹ e concentração máxima determinada de AmB solubilizada na ME ($AmB_{m\acute{a}x}$) de 2,7098 mol.L⁻¹ em valores de tensoativos correspondentes ao patamar no diagrama de solubilidade.

Os resultados refletem que a AmB_f demonstra uma importante interação com o filme interfacial óleo:água e da mesma forma essas interações estabelecidas influenciam positivamente no processo de liberação “*in vitro*”.

Uma análise comparativa do potencial de incorporação, realizada considerando a influência do volumes de fase interna e a proporção de tensoativos presentes no sistema, mostra valores de K_s maiores pelo efeito do volume de fase. Esse fato demonstra, que esse parâmetro apresenta um efeito mais favorável na incorporação, or, o qual apresentou valor de K_s menor. Outro fator observado em relação ao volume de fase diz respeito à maior capacidade de incorporação de concentrações máximas de AmB (AmB_b) a qual foi de aproximadamente 63% maior em relação ao tensoativo.

Uma análise dos resultados leva à sugestão de que o volume de fase considera a fase interna como um todo, sendo a fase oleosa somada ao filme interfacial constituído pelo tensoativo. Essa associação gera uma área de maior dimensão quando comparada à área formada pelo tensoativo. Essa última além de ser considerada isoladamente, ao promover estabilização do sistema, gera uma diminuição dos diâmetros das gotículas, levando à uma menor área de superfície.

Apesar desses resultados observa-se ainda uma sensibilidade maior por parte do tensoativo no perfil de incorporação que possibilita a saturação do sistema em menores concentrações molares do que o volume de fase.

5.4. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Na natureza, os fluidos encontrados em maior quantidade escoam de maneira newtoniana. Caracterizam-se por apresentar, em escoamentos isotérmicos, valores constantes para a viscosidade, podendo ser modelados pela de lei de Newton. O modelo Newtoniano descreve a viscosidade de um fluido, submetido a um escoamento cisalhante, como uma constante de proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de velocidade do fluido (BIRD, STEWART & LIGHTFOOT, 1996).

É muito estudado que a deformação de materiais pode levar a efeitos intensos em sua estrutura que radicalmente mudam as propriedades reológicas do material.

Quando a viscosidade assume outro comportamento, sem proporcionalidade entre a tensão e o gradiente de cisalhamento e devido a fatores citados anteriormente, ela passa a ser chamada de viscosidade aparente e o escoamento passa a ser denominado escoamento não Newtoniano. Dentre as substâncias que exibem esse tipo de comportamento podem-se citar soluções, suspensões de sólidos em líquidos, emulsões, materiais que possuem efeitos viscosos e elásticos. Dos tipos de fluidos não newtonianos, aqueles com comportamento pseudoplástico são os mais freqüentemente encontrados em aplicações práticas (BIRD, STEWART & LIGHTFOOT, 1996).

A tixotropia de materiais pseudoplásticos é descrita na literatura para descrever uma ruptura reversível da estrutura de sistemas particulados submetidos a stress e é usualmente utilizada para o entendimento da diminuição da viscosidade com o tempo a taxa de cisalhamento constante e formação de uma área de histerese entre as curvas ascendentes e descendentes (MUJUMDAR et al., 2001; MASALOVA et al., 2005).

Dessa forma, a viscosidade diminui temporariamente recuperando-se com o tempo. Por esse motivo esses sistemas são chamados de tempo-dependentes. Enquanto as forças de cisalhamento aplicadas agem para romper as ligações dos elementos estruturais, as unidades separadas tendem a reorganizar tais ligações. Tanto o rompimento da estrutura como a reorganização estão em processo simultâneo. Um estado de equilíbrio é geralmente alcançado quando as taxas de rupturas e reorganização são iguais. A estrutura em equilíbrio é geralmente uma função da taxa de cisalhamento aplicada, e tende para uma maior desorganização em taxas mais altas de cisalhamento (MUJUMDAR et al., 2002). O efeito reverso conhecido como reopexia, é observado raramente. Reopexia é definida como a

solidificação de um sistema através de movimento leve e regular (MASALOVA et al., 2005)..

As análises dos resultados do comportamento reológico possibilitaram verificar que as amostras, de forma geral se apresentaram como fluidos não Newtonianos do tipo pseudoplástico. Para materiais pseudoplásticos, a viscosidade diminui sob aplicação de uma tensão de cisalhamento, propriedade conhecida como *shear thinning*, mas sua estrutura é gradualmente recuperada quando esta é removida (SCHARAMM, 2006). Essa informação pode ser verificada pela presença da área de histerese apresentada entre as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas, a qual demonstrou a magnitude da tixotropia. O *shear thinning* garante a capacidade de a formulação ser adequada para administração oral, pois o cisalhamento no momento da administração causa o afinamento do fluxo (CARVALHO, 2009).

As propriedades de fluxo influenciam cada etapa do processo farmacêutico tais como o fluxo de produção, a cadeia produtiva, o envase, e remoção do conteúdo do recipiente antes da aplicação para o local de ação e colabora na suposição de seu comportamento “in vivo”. As mudanças de comportamento tempo dependentes fornecem formulações farmacêuticas com comportamento reológico passíveis de sofrer modificações, a qual freqüentemente afeta o perfil de liberação de fármacos contidos em sistemas terapêuticos. Há dois extremos nos comportamento reológico. Um comportamento elástico o qual se refere à habilidade de uma formulação recuperar a estruturação original quando uma força aplicada é removida. O outro é conhecido como plástico ou viscoso que é conhecido como propriedade de líquidos ideais também chamados de comportamento Newtoniano onde nenhuma deformação ocorre quando uma força é aplicada. Uma modificação tempo dependente na viscosidade de formulações farmacêuticas é desejada devido à sua exigência no controle de liberação de fármacos (LEE et al., 2009).

A reologia ajuda a estabelecer um entendimento teórico das relações entre as propriedades e as microestruturas do sistema (SIDDIG et al., 2006).

Os diferentes tipos de curva de fluxo têm seus correspondentes tipos de curva de viscosidade. As curvas de fluxo representam duas partes do experimento, a curva ascendente que indica o aumento da taxa de cisalhamento, e a curva descendente, quando a taxa de cisalhamento é reduzida continuamente. Os ensaios de fluxo foram realizados com as formulações contendo AmB ou na sua ausência.

Uma forma de avaliar o comportamento foi através de um gráfico de τ versus γ' (curva de fluxo), que foi construído com um aumento da taxa de cisalhamento até um determinado valor, em seguida diminuindo até o ponto inicial. A Figura 17 mostra a influência da proporção do tensoativo sobre o comportamento reológico das MEs com proporção fixa de fase oleosa na ausência do fármaco.

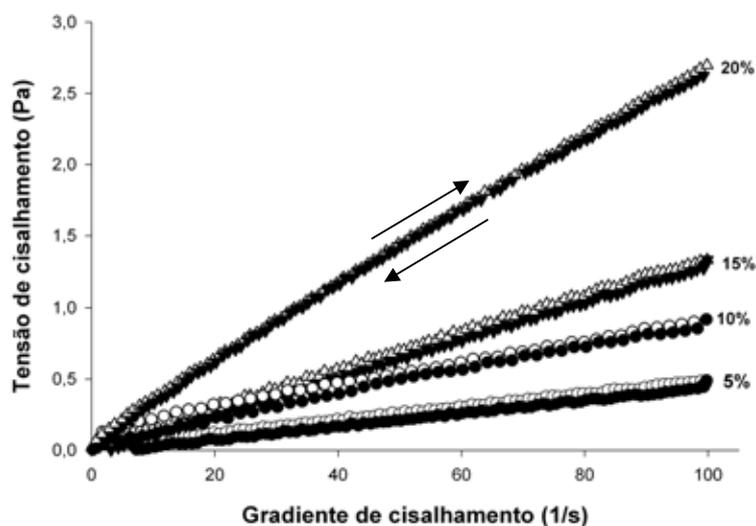


Figura 17: Comportamento reológico das MEs vazias em função da proporção de tensoativo. Curvas ascendentes (símbolos vazios) e curvas descendentes (símbolos cheios).

O comportamento Não Newtoniano pseudoplástico foi verificado quando a viscosidade aparente do fluido diminuiu com o aumento da taxa e/ou da tensão de

cisalhamento como é o caso das amostras citadas. Nota-se, no entanto, que a tensão aplicada necessária para promover alguma alteração nos sistemas vai aumentando gradualmente com a elevação de 5 para 20% de tensoativo. Esse fato mostrou o efeito do tensoativo na estruturação desses sistemas. Os valores de tensão e viscosidade são importantes propriedades a serem avaliadas em um material uma vez que a tixotropia depende principalmente do cisalhamento e do grau de dispersão. Um aumento do valor da tensão indica um fortalecimento gradual da rede da estrutura tri-dimensional de formulações tixotrópicas (LEE et al., 2009). Em todas as amostras, a tixotropia pode ser observada, apesar de pequena. Propriedades tixotrópicas apresentam um papel fundamental na eficácia terapêutica de formulações farmacêuticas por contribuir no tempo de retenção do fármaco no sítio alvo melhorando sua disponibilidade sistêmica. Um comportamento não Newtoniano de um sistema tixotrópico é expresso com valores que são necessários para romper a estrutura sólida e iniciar um fluxo plástico. A forma mais adequada para se medir a tixotropia é descrever a resposta de um material ao cisalhamento devido a uma deformação. A área entre as curvas ascendentes e descendentes é conhecida como área de histerese. (MALASOVA et al., 2005).

As amostras com AmB também foram avaliadas (figura 18)

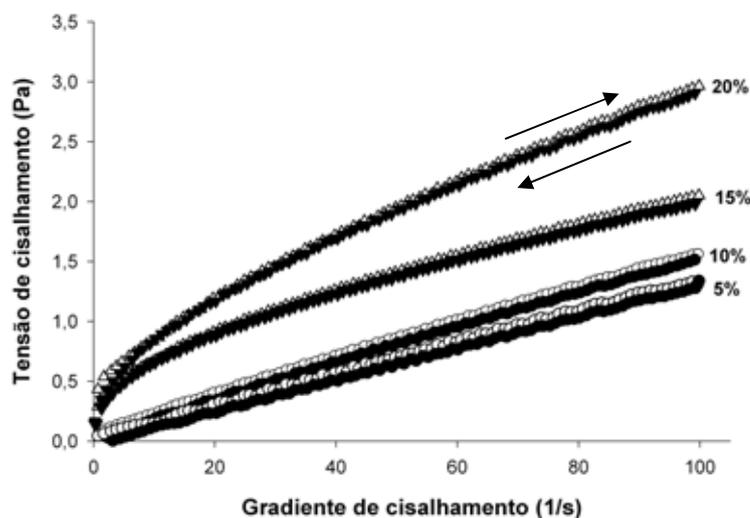


Figura 18: Comportamento reológico das MEs contendo AmB em função da proporção de tensoativo (5 a 20%). Curvas ascendentes (símbolos vazios) e curvas descendentes (símbolos cheios).

A Figura 18 mostra o efeito da proporção de tensoativo sobre o comportamento reológico dos sistemas na presença da AmB. Verifica-se comportamento semelhante aos resultados da ME sem AmB, ou seja, comportamento não Newtoniano do tipo tixotrópico, sugerindo que as gotículas presentes no sistema apresentam interações com a vizinhança de forma sutil, podendo se observar uma área de histerese entre as curvas ascendentes e descendentes, em todas as amostras. Outro fator importante analisado se refere às tensões aplicadas nessas amostras, as quais foram mais altas que as tensões aplicadas nas mesmas amostras sem AmB, o que sugere que o fármaco também demonstrou efeito sobre a viscosidade e estruturação dos sistemas.

Para as amostras compostas por aumento gradual de fase oleosa de 3 a 12% mantendo proporção fixa de tensoativo (Figura 19) o comportamento foi semelhante

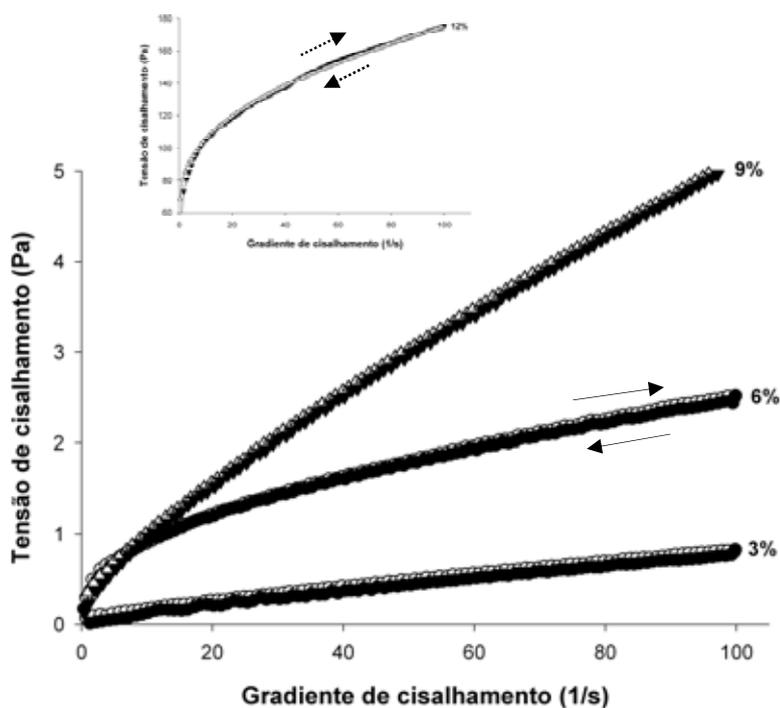


Figura 19: Comportamento reológico das MEs vazias, variando a porcentagem de fase oleosa (3 a 12%). Curvas ascendentes (símbolos vazios) e curvas descendentes (símbolos cheios). No insert: Amostra contendo 12% de fase oleosa.

Um comportamento pseudoplástico também foi observado na presença do fármaco, apresentando tixotropia sutil, assim como as amostras anteriores. As amostras apresentaram característica macroscópica de moderada viscosidade, a qual aumentou com o aumento da fase oleosa (CHO). Verificou-se, em relação às amostras anteriores, que a tensão aplicada nas mesmas foi muito maior mostrando sistemas de viscosidade mais acentuada e provavelmente maior estruturação.

Quando as amostras com AmB foram avaliadas observou-se comportamento semelhante em relação às amostras anteriores (Figura 20).

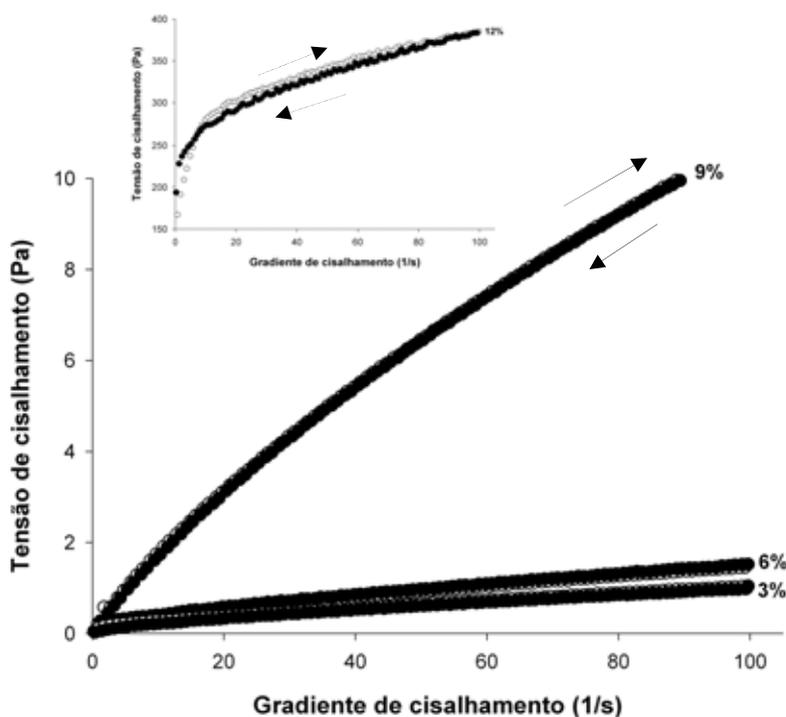


Figura 20: Comportamento reológico das MEs contendo AmB, variando a porcentagem de fase oleosa (3 a 12%). Curvas ascendentes (símbolos vazios) e curvas descendentes (símbolos cheios). No insert: Amostra contendo 12% de fase oleosa.

Após a obtenção dos reogramas das MEs contendo AmB observou-se que o comportamento pseudoplástico tixotrópico se manteve e que a presença de fármaco estruturou ainda mais os sistemas, podendo ser observado um aumento de tensão de cisalhamento aplicada principalmente para as amostras com fase oleosa acima de 9%. Conclui-se dessa forma que tanto o tensoativo como o CHO apresentam efeito importante na estruturação dos sistemas. Para confirmar essas afirmações e utilizando um modelo de lei de potência (Eq.11), calculou-se o valor de n para caracterizar o comportamento de fluxo (Não Newtoniano pseudoplástico e tixotrópico) e k (índice de consistência) para caracterizar a viscosidade do material.

$$\tau = k.\dot{\gamma}^n \quad (11)$$

Onde k é um parâmetro relacionado à consistência (índice de consistência) e n é o índice de escoamento. Neste modelo, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa fluido pseudoplástico, e $n = 1$ fluido newtoniano. Para todas as formulações, na presença e ausência do fármaco, os valores de n são $n < 1$ (Tabela 5).

Tabela 5: Índices de consistência (k) e de fluxo (n) das formulações em ausência e presença de AmB a 25 °C.

Amostras	ME		ME-AmB	
	K	n	K	n
A (5% T)	0,010	0,8308	0,031	0,8465
B (10% T)	0,017	0,8377	0,171	0,9446
C (15% T)	0,043	0,7535	0,212	0,4885
D (20% T)	0,060	0,8914	0,229	0,5522
E (3% FO)	0,031	0,7088	0,057	0,6224
F (6% FO)	0,178	0,7271	0,191	0,5833
G (9% FO)	0,322	0,4437	0,358	0,7677
H (12% FO)	60,64	0,2275	189,49	0,1528

T-tensoativo; FO-Fase oleosa

Para as amostras sem fármaco os valores de k obtidos para as amostras A e B se apresentaram próximos, indicando que a viscosidade desses sistemas é aparentemente similar. Para C e D este índice aumentou gradualmente indicando aumento da viscosidade. Para estas formulações, o índice de fluxo (n) é diferente de 1, indicando comportamento reológico não newtoniano, fato que possibilitou a sugestão de um aumento gradual de estruturação destas formulações à medida que a proporção de tensoativo foi aumentada. Para as amostras E, F e G os valores de k foram mais elevados em relação às amostras anteriores mostrando que o aumento de fase oleosa aumentou a estruturação desses sistemas elevando seus valores de viscosidade. A amostra H apresentou uma considerável elevação de k e redução do valor de n , indicativo de um maior grau de estruturação desta formulação, a qual

sendo comparada macroscopicamente com as demais, apresenta alta viscosidade. Já para as amostras com AmB, todas apresentaram aumento nos índice de k e diminuição de n de forma geral. A amostra H apresentou valores de k bastante elevados e valores de n muito baixos. Todas essas informações revelam o comportamento pseudoplástico tixotrópico dos sistemas avaliados. Os valores de k dos sistemas na presença ou ausência de AmB estão apresentados nas Figuras 21 e 22.

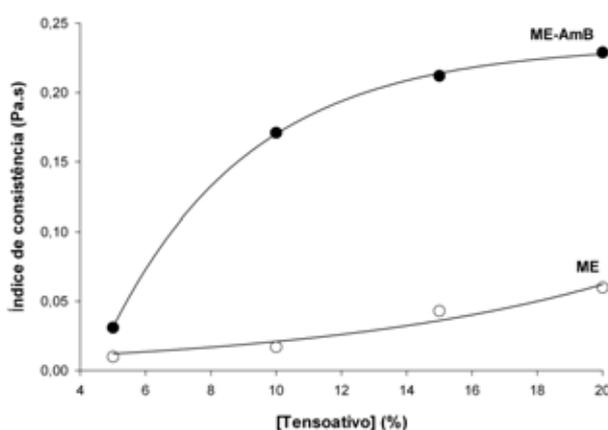


Figura 21: Índices de consistência (k) das ME em ausência e presença de AmB em função do aumento de tensoativo.

A Figura 21 confirma que os valores de k das ME em ausência de AmB aumentam discretamente com a porcentagem de tensoativo. Esse aumento de viscosidade foi perceptível em proporções a partir de 15% de tensoativo sendo mais acentuado com 20%. Sabe-se que a fase interna de sistemas óleo-água aumenta com a fração de volume de fase interna. Esse comportamento está relacionado a modelos que calculam o diâmetro considerando também a presença da camada de tensoativo ao redor do núcleo oleoso (GRASSI, 2006).

A incorporação do fármaco alterou marcadamente k do sistema a partir de 5% de tensoativo, aumentando gradativamente para as proporções mais elevadas do mesmo. No

caso da fase oleosa (Figura 22) um efeito semelhante foi observado e foi ainda mais proeminente, quando se analisa o índice de consistência das MEs em ausência e presença de AmB em função da fase oleosa.

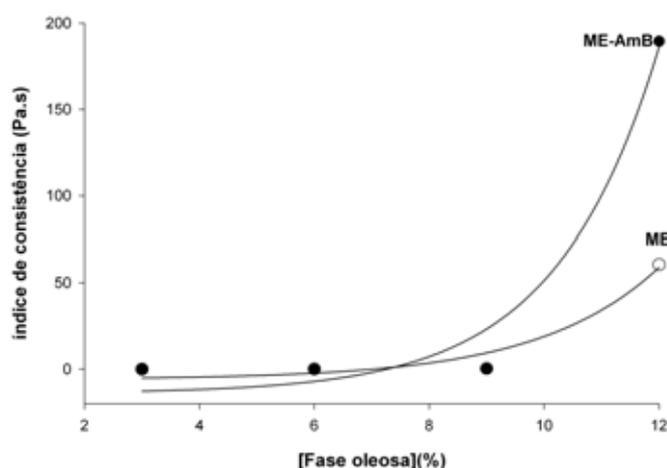


Figura 22: Índice de consistência das ME em ausência e presença de AmB em função do aumento de fase oleosa.

É importante observar que os valores de k das MEs em ausência ou presença de AmB sofreram grande influência da proporção de fase oleosa. Em valores mais baixos de fase oleosa não houve diferença marcante nesses valores. Partindo de 9% de fase oleosa k começou a se elevar e em 12% aumentou marcadamente em ausência do fármaco e com AmB cerca de 4 vezes. Desta forma, pode-se atribuir o aumento de k , o qual reflete a viscosidade dos sistemas, tanto à fase oleosa como ao tensoativo. Entretanto pode-se ressaltar que o fator mais influente é a fase oleosa, a qual modula consideravelmente a viscosidade dos sistemas, assim como a presença do fármaco.

5.5. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Materiais isotrópicos e anisotrópicos podem ser diferenciados por essa técnica. As propriedades ópticas desses materiais podem ser utilizadas para se obter informações sobre a estruturação ou não de materiais, tais como MEs e sistemas mais organizados tais como mesofases líquido-cristalinas. Essa técnica é utilizada para verificar a presença de sistemas de fundo escuro conhecidos pela desorganização estrutural. As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 23 a 26 foram obtidas sob o plano da luz polarizada e apresentam diferenças em seu conteúdo de fase oleosa e tensoativo. As fotomicrografias (Figura 23) contém proporções fixas de fase oleosa variando a proporção de tensoativos.

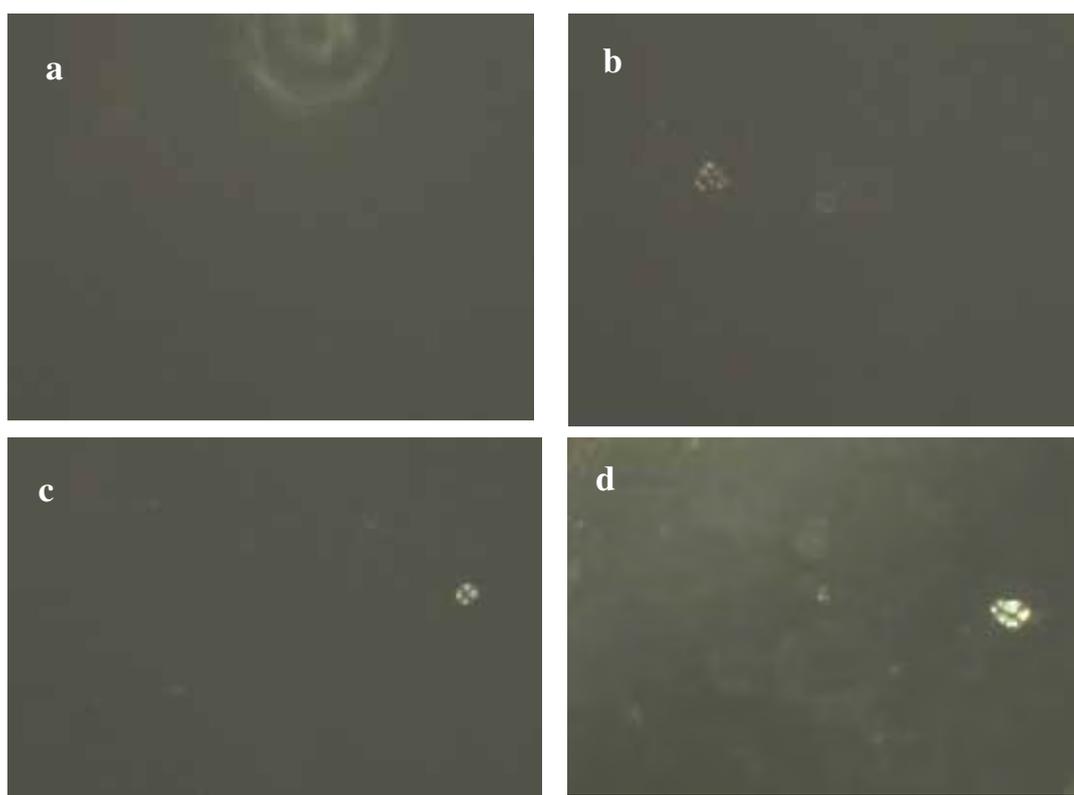
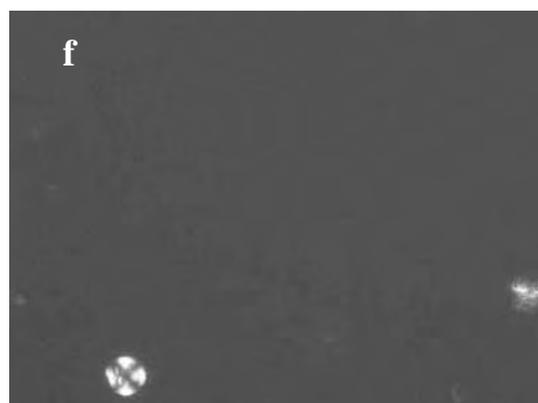
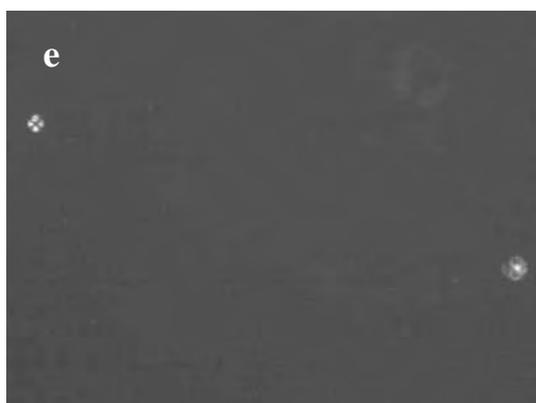


Figura 23: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (**a**:5%; **b**:10%;**c**:15%; **d**:20%), mantendo-se a fase oleosa em 5% m/m.

Após a obtenção das imagens verificou-se que apenas as amostras contendo concentrações a partir de 10% de tensoativo desviaram o plano de luz polarizada, resultando

no aparecimento de “cruzes de malta”, características de estruturas de fase lamelar. Os resultados se encontram de acordo com a análise reológica que mostrou aumento da viscosidade a partir da mesma amostra e aumento de tensão aplicada para as amostras à medida que a proporção de tensoativo aumenta. Esse fato relaciona-se à capacidade de estruturação dos sistemas proporcionada pelos tensoativos. A obtenção desse tipo de sistemas heterogêneos formados por água, óleo e mistura de tensoativos pode ser atribuído à formação de microgotas ou sistemas líquido-cristalinos de fase cúbica quando a viscosidade se apresenta bastante elevada se assemelhando a um gel rígido.

O aumento da proporção de fase oleosa com tensoativo fixo também foi avaliado. Os sistemas apresentaram diferenças estruturais quando a proporção de fase oleosa, representada pelo CHO variando nas formulações desenvolvidas, exibindo pouca estruturação sob o plano da luz polarizada em proporções menores. As fotomicrografias (Figura 24) sugerem que nas concentrações de 3 % de CHO houve pequena interferência na estruturação das fases, mantendo constante a viscosidade (ver análise reológica), apesar do aparecimento de pequenas cruzes de malta. Porém a partir de 6% de CHO observa-se de forma mais acentuada o aumento de “cruzes de malta”, características de estrutura de fase lamelar (Figura 24 f, g e h), indicando que a variação na porcentagem do volume de fase oleosa interferiu no grau de estruturação dos sistemas, tornando-os mais ordenados (GABBOUN et al., 2001).



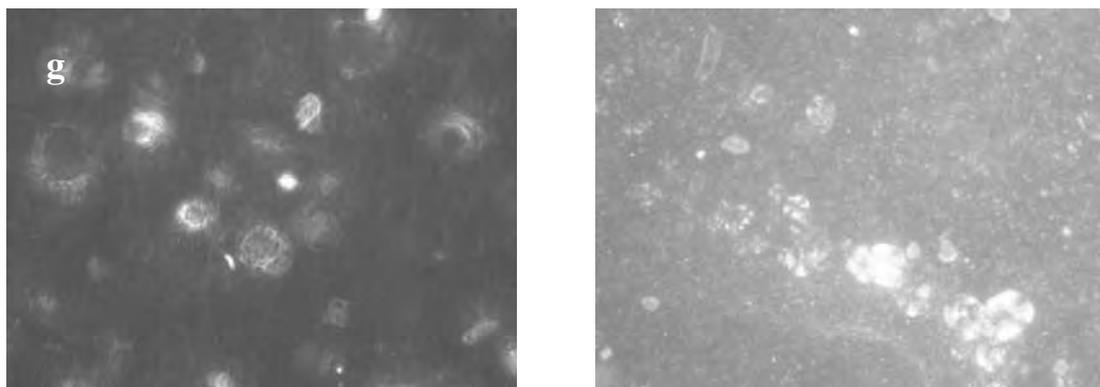
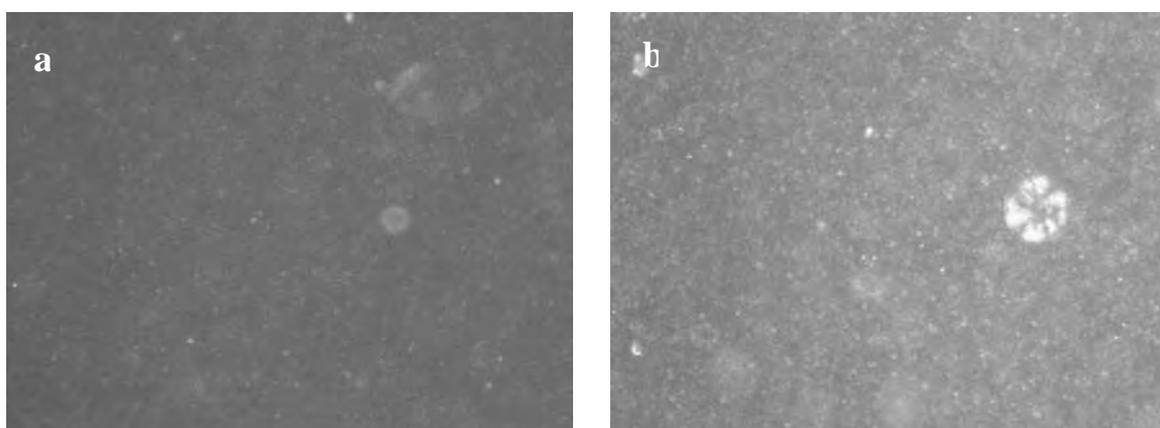


Figura 24: Fotomicrografia de luz polarizada dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (**e**:3%; **f**:6%;**g**:9%; **h**:12%), mantendo-se o tensoativo em 15% m/m.

Os resultados da microscopia de luz polarizada apresentados na Figura 24 indicaram da mesma forma que nas amostras anteriores que o aumento na proporção de fase oleosa promoveu aumento na organização estrutural dos sistemas

Entretanto, quando a AmB foi incorporada ao sistema a estruturação foi ainda mais favorecida, levando a formação de estruturas com menor mobilidade. Esse resultado é válido tanto para amostras desenvolvidas com aumento de tensoativo em proporções graduais (Figura 25 a, b, c e d) quanto para amostras desenvolvidas com aumento de fase oleosa em proporções graduais (e, f, g e h) (Figura 26).



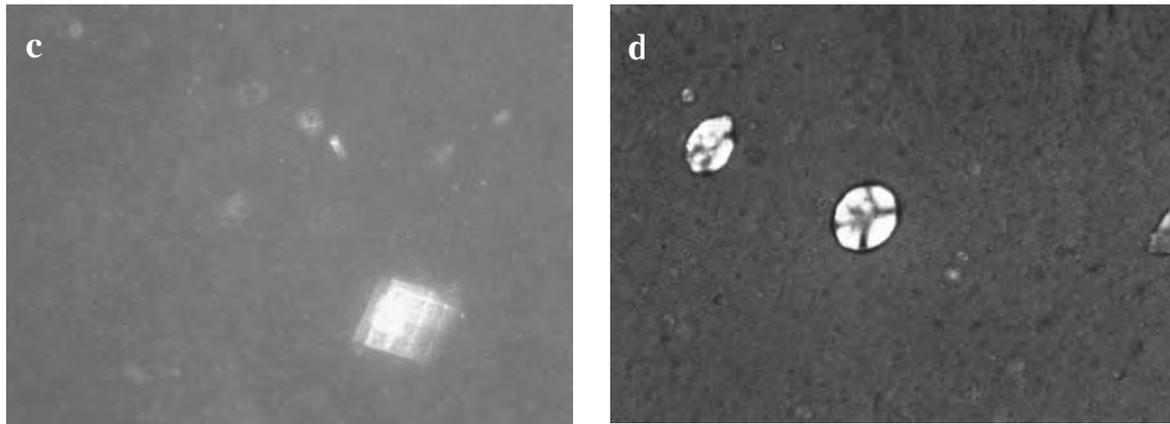


Figura 25: Fotomicrografia de luz polarizada dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (**a**:5%; **b**:10%;**c**:15%; **d**:20%), mantendo-se o fase oleosa em 5% m/m, contendo AmB.

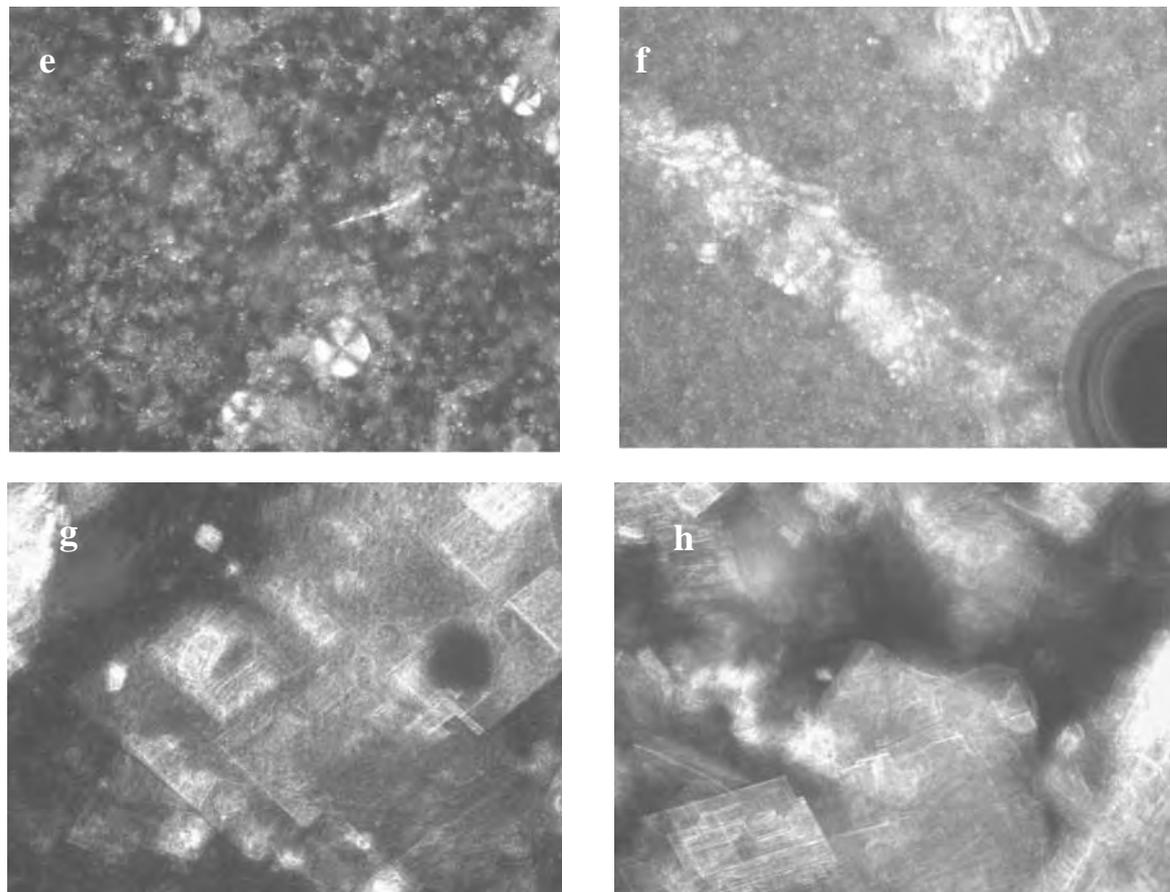


Figura 26: Fotomicrografia de luz polarizada dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (**e**:3%; **f**:6%;**g**:9%; **h**:12%), mantendo-se fixo o tensoativo em 15% m/m, contendo AmB.

Esse comportamento também pode ser comparado com avaliação do índice de consistência (k) dos sistemas em função da fase oleosa e do tensoativo (Figuras 21 e 22) que mostraram um aumento mais acentuado da viscosidade com o aumento da concentração de CHO. Com a incorporação de AmB no sistema a viscosidade aumentou ainda mais e esse fato deve estar associado à formação da fase lamelar com o CHO, que segundo a literatura apresenta-se como uma substância formadora de fluidos viscoelásticos (FORMARIZ et al., 2005).

Assim, à medida que aumenta a concentração de CHO e/ou o fármaco é incorporado ao sistema tanto o CHO como a AmB favorecem ainda mais a formação de cristais. Entretanto, sabe-se da literatura que quando a concentração de CHO aumenta no sistema, a sua cristalização é favorecida e ocorre na forma de bicamadas lamelares, levando a uma estrutura com menor mobilidade e a um aumento no grau de empacotamento das gotículas (STIDDER et al., 2005).

5.6. DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE AmB em β CD, HP- β CD, SB- β CD e ME- β CD.

Para elucidar esse fato é necessário conhecer algumas características físico-químicas das CDs estudadas as quais estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6: características físico-químicas das CDs

Ciclodextrina	Solubilidade em água (mg/mL)	Massa molecular
β CD	>18	1135
HP- β CD	>500	1400
ME- β CD	>500	1312
SB- β CD	>500	2163

Fonte: LOFTSSON, 2007).

Para a avaliação da capacidade de solubilidade de AmB nas CDs uma curva analítica de AmB em metanol foi elaborada (Figura 27). O experimento foi realizado em triplicata.

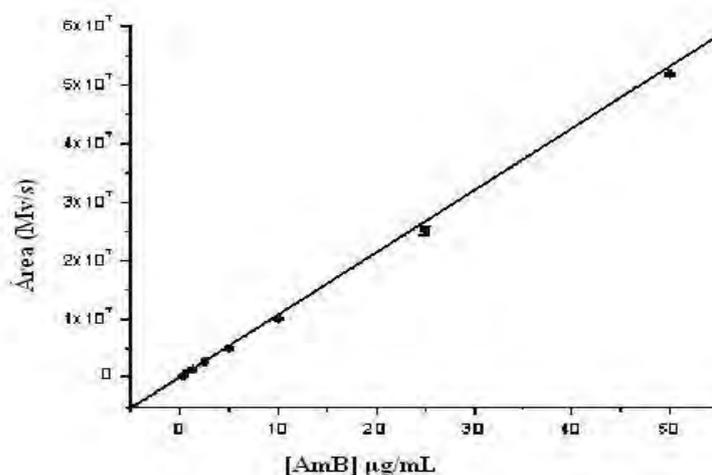


Figura 27: Curva analítica da AmB em metanol a 410nm. $r^2 = 0,995$

Substituindo os valores encontrados na equação da reta tem-se:

$$y = 1,0644 \cdot 10^6 \cdot x + (-14088,02) \quad (12)$$

A Figura 28 exibe o cromatograma típico da AmB e seu o tempo de retenção.

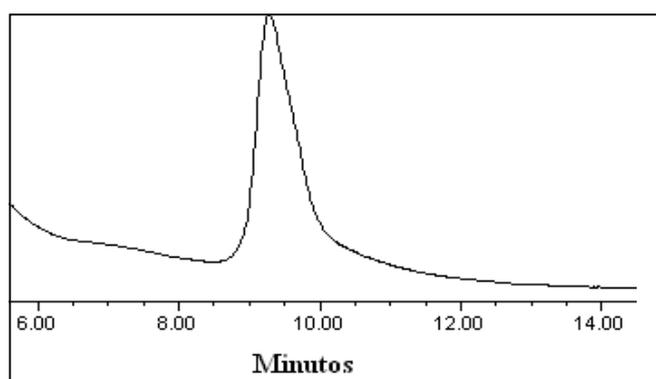


Figura 28: Cromatograma típico da AmB em metanol a 410nm. Tempo de retenção em torno de 9 minutos.

O experimento foi conduzido com as CDs em concentrações molares equivalentes de 50mmol.L⁻¹. Os resultados obtidos estão representados no diagrama obtido (Figura 29).

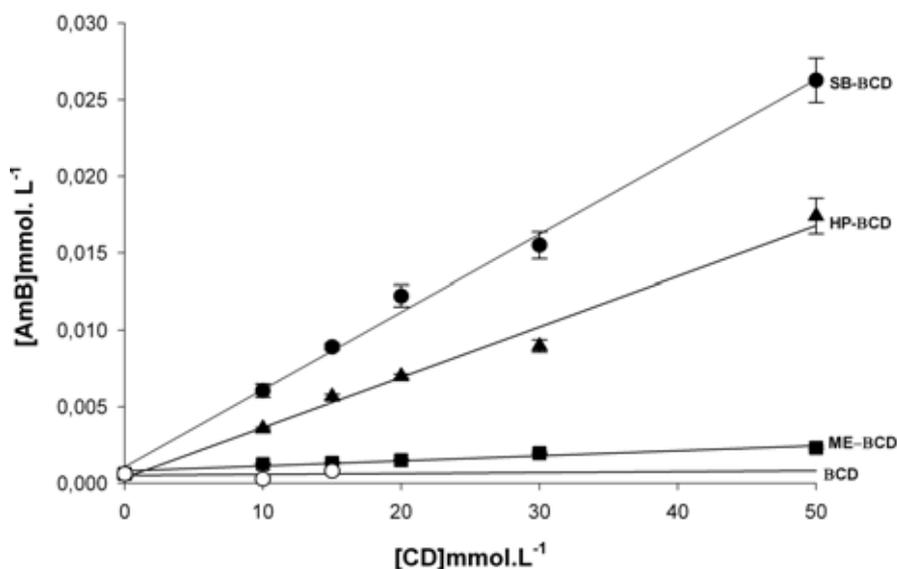


Figura 29: Diagrama de solubilidade da AmB em SB-βCD, ME-βCD e HP-βCD e βCD

As análises de incorporação de AmB nas CDs preparadas em tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4 revelaram que a SB-βCD se mostrou mais eficaz que as demais CDs testadas. É possível verificar que a βCD e ME-βCD apresentaram baixa capacidade de complexação com o fármaco. Uma característica importante que difere as CDs é a massa molecular de cada uma delas, em especial da SB-βCD que se destaca das demais nesse sentido. Sabe-se ainda que um dos fatores mais preponderantes para a formação de complexos de inclusão é a compatibilidade geométrica relacionada ao tamanho e forma da molécula. Esta compatibilidade de tamanhos pode não corresponder à totalidade de molécula a incluir. Há casos em que apenas uma parte da estrutura do hóspede fica incluída na cavidade. A polaridade desse segmento é um fator condicionante da formação do complexo. Há ainda, de considerar o caráter hidrofóbico do hóspede (SALTÃO et al., 2001).

No caso da AmB pode-se sugerir que como sua molécula apresenta uma forma alongada e a estequiometria pode ter sido facilitada pelo posicionamento dos radicais sulfo butil éter. Os resultados obtidos nesse experimento mostram claramente um aumento da solubilidade de AmB na presença da CDs, sendo que quanto maior a concentração de CD maior o aumento da solubilidade do fármaco .

Também verificou-se na faixa de concentração de CDs testadas que nos complexos formados, identificou-se um desvio positivo na linearidade, indicando a presença de complexos de estequiometria 1:1 ou seja, a solubilidade aumenta de acordo com a concentração de CDs. Foi possível observar (Tabela 7) o aumento de solubilidade de AmB de acordo com cada CD.

Tabela 7: Aumento de solubilidade de AmB em cada CD estudada

CD UTILIZADA	SOLUBILIDADE AmB
SB- β CD	42,83 vezes
HP- β CD	28,33 vezes
ME- β CD	3,78 vezes
β CD	1,30 vezes

Os dados da análise estatística mostram (Tabela 8) os coeficientes das regressões lineares ajustadas aos valores de solubilidade de AmB em função de concentrações (0 a 50 mmol.L⁻¹) de CDs.

Tabela 8: Coeficientes de regressão linear, erros padrão, limites inferior (LI) e superior (LS) de intervalos de confiança de 95% para o coeficiente de regressão e coeficiente de correlação de Pearson, de acordo com a CD utilizada

CD	Coef. de regressão	Erro padrão	IC (95%)		r
			LI	LS	
β CD	0,00001	0,00001	-0,00002	0,00004	0,177
ME- β CD	0,00003 *	0,00000	0,00003	0,00004	0,966
HP- β CD	0,00033 *	0,00001	0,00030	0,00035	0,990
SB- β CD	0,00051 *	0,00002	0,00048	0,00055	0,991

* significativo pelo teste t de Student ($p < 0,001$)

Enquanto pelo teste t de Student o coeficiente de regressão correspondente à β CD não é significativamente diferente de zero ($p > 0,05$), todos os outros coeficientes de regressão são significativamente maiores do que zero ($p < 0,001$). Assim, há indicação de aumento significativo da solubilização de AmB em função da concentração da CD. Como os intervalos de confiança para os coeficientes de regressão não se sobrepõem pode-se estabelecer as CDs com maior efeito sobre a solubilidade de AmB. Na ordem da responsável pela maior solubilização até a menor tem-se: SB- β CD > HP- β CD > ME- β CD > β CD.

5.7. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE (Ks)

É importante ressaltar que a habilidade de uma dada concentração de CD solubilizar uma determinada dose de fármaco é dependente de alguns fatores tais como a solubilidade intrínseca do fármaco e sua constante de ligação com as CDs (CARRIER et al., 2007).

O ajuste do todo ou de uma parte da molécula hóspede na cavidade da CD determina a estabilidade do complexo de inclusão e a seletividade do processo de complexação.

Entretanto o valor da constante de estabilidade do complexo fármaco:CDs é uma ferramenta muito valiosa relacionada à força de ligação do complexo e é de grande importância no entendimento e avaliação da formação de complexos de inclusão. Uma grande faixa de constantes de estabilidade (K_s) também chamadas de constantes de ligação 0 a 100.000 M^{-1} tem sido encontrada na literatura para complexos, no qual zero corresponde a ausência de ligações entre a CD e o fármaco (MAESTRELLI et al., 2005).

As constantes de estabilidade das amostras anteriores foram determinadas realizando uma análise relativa aos dados fornecidos pela curva analítica.

Para βCD , $\text{ME-}\beta\text{CD}$, $\text{HP-}\beta\text{CD}$ e $\text{SB-}\beta\text{CD}$ verificou-se que as constantes apresentaram resultados respectivamente crescentes e estão de acordo com os resultados obtidos na análise de solubilidade ilustrada na Figura 28 (Equação 13)

$$K_s = \frac{\text{Inclinação}}{S_0(1 - \text{Inclinação})} \quad (13)$$

Para βCD tem-se que:

$$K_s(\beta\text{CD}) = \frac{6,138 \cdot 10^{-6}}{5,198 \cdot 10^{-4} \times (1 - 6,138 \cdot 10^{-6})}$$

$$K_s(\beta\text{CD}) = 11,82 \text{ mol.L}^{-1}$$

Para $\text{ME-}\beta\text{CD}$ tem-se que:

$$K_s(\text{ME}\beta\text{CD}) = \frac{3,2959 \cdot 10^{-5}}{8,1514 \cdot 10^{-4} \times (1 - 3,2959 \cdot 10^{-5})}$$

$$K_s(\text{ME}\beta\text{CD}) = 40,40 \text{ mol.L}^{-1}$$

Para $\text{HP-}\beta\text{CD}$ tem-se que:

$$K_s (HP\beta CD) = \frac{3,2837 \cdot 10^{-4}}{3,5732 \cdot 10^{-4} \times (1 - 3,2837 \cdot 10^{-4})}$$

$$K_s (HP\beta CD) = 919,8 \text{ mol.L}^{-1}$$

Para SB- β CD tem-se que:

$$K_s (SB\beta CD) = \frac{5,0475 \cdot 10^{-4}}{1,077 \cdot 10^{-3} \times (1 - 5,0475 \cdot 10^{-4})}$$

$$K_s (SB\beta CD) = 5047 \text{ mol.L}^{-1}$$

O perfil avaliado com o estudo das constantes de estabilidade confirmaram maior efetividade de todas as CDs derivadas na complexação de AmB em relação à β CD, que é a CD de origem. Entretanto SB- β CD mostrou claramente uma maior eficiência frente às demais. O melhor desempenho dessa CD está relacionado aos radicais substituídos presentes em sua molécula (sufobutil), os quais aumentam as regiões hidrofóbicas das moléculas de CD pelo nivelamento da borda da cavidade e expansão dos sítios de ligação com o fármaco sem causar impedimento estérico. Nos casos de menor K_s algum efeito estérico de bloqueio, devido à presença de outros radicais substituintes, pode dificultar a inclusão das moléculas hóspedes, o que poderia explicar a menor eficácia de complexação por HP- β CD e ME- β CD. (ASTRAY et al., 2009).

Os valores encontrados indicaram dessa forma, uma maior associação da AmB com a SB- β CD seguido de HP- β CD, ME- β CD e β CD nos complexos de inclusão obtidos. Valores de K_s mais elevados sugerem o favorecimento da passagem do princípio ativo através da membrana celular aumentando sua biodisponibilidade.

Outro fator importantíssimo que elucida o perfil estudado é relação da solubilidade das ciclodextrinas em água com suas constantes de estabilidade (K_s) representada na Figura 30.

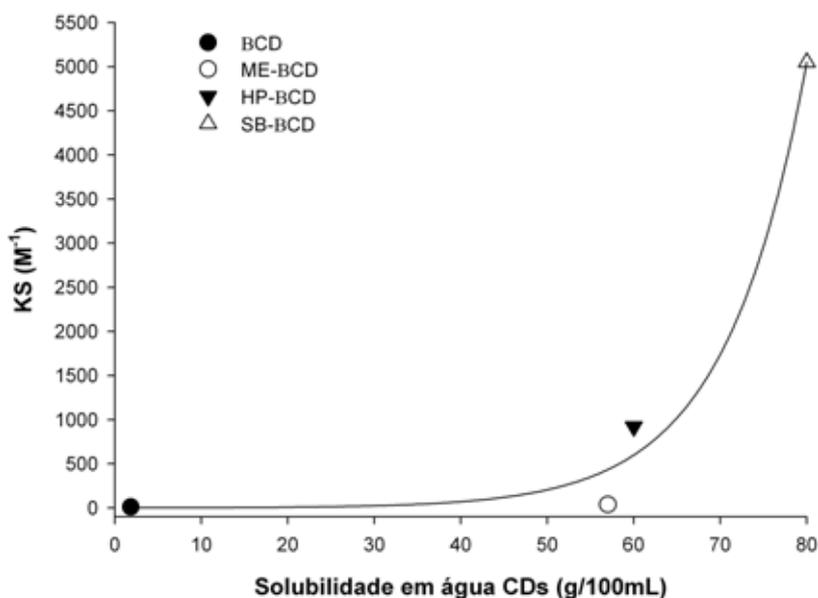


Figura 30: Efeito da solubilidade das CDs em relação ao K_s .

Observou-se o perfil apresentado (Figura 30) quando se relacionou a constante de incorporação (K_s) com a solubilidade das CDs em água. Segundo Thompson (2006), a extensão da solubilização de fármacos será determinada pela máxima quantidade de moléculas de CDs que podem ser dissolvidas em água, pela constante de ligação do complexo e pela solubilidade intrínseca do fármaco. Dessa forma pode-se justificar a maior capacidade de solubilização de AmB na SB- β CD e realizar uma relação entre os valores de K_s obtidos e a solubilidade em água dessas estruturas. Dessa forma constatou-se que as alterações estruturais repercutem-se nas propriedades físico-químicas das ciclodextrinas modificadas, assim, estas apresentam diferentes valores de solubilidade. Este resultado está de acordo com o diagrama de solubilidade (Figura 29), justificando o aumento de

incorporação de fármaco em função do aumento da solubilidade das CDs em água o que provavelmente promoveu a presença de mais moléculas das CDs dissolvidas por unidades de área em uma razão crescente SB- β CD > HP- β CD > ME- β CD > β CD.

É ainda descrito na literatura que a magnitude das constantes de ligação interfere na biodisponibilidade do fármaco. Se K_s for muito elevado uma diminuição da biodisponibilidade relacionado ao fármaco isolado pode acontecer e se K_s for muito pequeno poderá não ocorrer o efeito da CD (CARRIER et al., 2007).

Diante dos resultados de K_s obtidos para as CDs estudadas e das características da AmB, tais como massa molecular e estrutura, pode-se concluir que a constante para HP- β CD e SB- β CD se encontram dentro dos parâmetros como efetivo. Para HP- β CD pode considerar o valor de K_s também muito interessante diante da insolubilidade quase que absoluta da AmB em meio aquoso. A ME- β CD e a β CD se mostraram as menos eficazes nesse sentido correspondendo a outros resultados que serão descritos a seguir.

5.8. INCORPORAÇÃO DE AmB NAS MICROEMULSÕES DESENVOLVIDAS CONTENDO β CD, HP- β CD, ME- β CD E SB- β CD.

As CDs são conhecidas por permitirem a encapsulação molecular de fármacos com características hidrofóbicas, alterando-lhes a solubilidade, aumentando a estabilidade e, em alguns casos, melhorando a biodisponibilidade. Contudo, a capacidade destes sistemas funcionarem como sistemas de vetorização de fármacos por si só é inexistente. Tem-se observado a tendência para conjugar as potencialidades das ciclodextrinas com novos sistemas terapêuticos, como lipossomas, nanopartículas e micropartículas, na tentativa de resolver as limitações apresentadas por cada um deles (DALMORA et al., 2001).

Após a caracterização física química com as MEs desenvolvidas, uma amostra foi selecionada para a incorporação das CDs. Essa seleção se deu em função da determinação

dos diâmetros médios das gotículas da fase interna, da isotropia apresentada e da viscosidade. A amostra contém 10% de tensoativo e 5% fase oleosa, e 85% de fase aquosa correspondendo a amostra B da tabela 3.

Para a execução do experimento foi desenvolvida uma curva analítica (Figura 31)

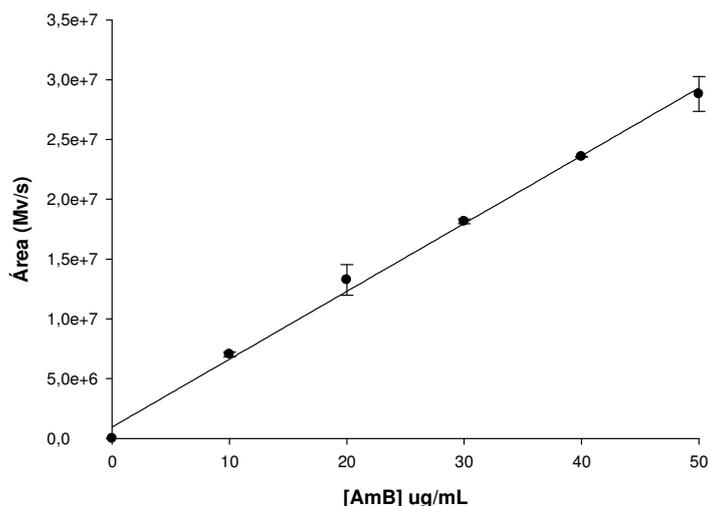


Figura 31: Curva analítica da AmB em tampão, em 410nm por CLAE.

A curva forneceu a equação da reta segundo a equação abaixo onde $r^2=0,9980$.

$$y = 567226,93 \cdot x + 951537,88 \quad (14)$$

Aplicando os valores de área na equação foi possível obter os valores de concentração de AmB para cada CD testada e para o tampão.

Apesar de ser possível incorporar fármacos hidrofóbicos em MEs e outros sistemas de liberação, o êxito desta operação está dependente da razão que existe entre a massa de fármaco e a massa de lipídio e das características do próprio fármaco, uma vez que este tipo de molécula vai se acomodar na interface. Em lipossomas sabe-se que durante o processo de incorporação dos complexos ocorre a liberação de alguma quantidade de fármaco do interior da CD e que esse fato é dependente da sua constante de estabilidade e deve-se à competição

que ocorre com os lipídios da vesícula. As melhores condições para a incorporação dos complexos é quando os fosfolipídios que constituem os lipossomas apresentam ponto de fusão elevado, ou quando existe CHO em quantidades equimolares em relação aos fosfolipídios. A Figura 32 mostra as diferenças na incorporação em cada sistema selecionado contendo diferentes CDs.

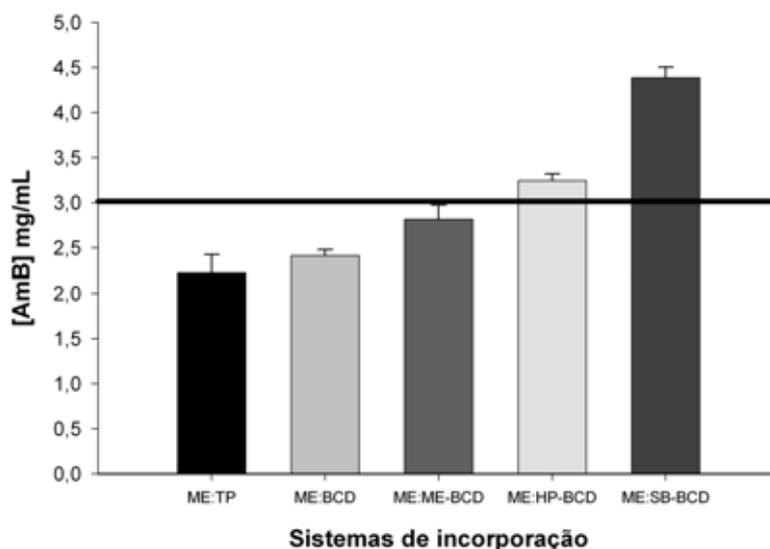


Figura 32: Incorporação de AmB em ME contendo 10% de tensoativo e 5% fase oleosa, e fase aquosa contendo β CD, HP- β CD, SB- β CD, ME- β CD e solução tampão fosfato 50mmol. L⁻¹ pH 7,4.

Legenda: ME contendo tampão como fase aquosa (ME:TP), ME contendo solução de β CD como fase aquosa, (ME: β CD), ME contendo solução de HP- β CD como fase aquosa (ME: HP- β CD), ME contendo solução de ME: β CD como fase aquosa (ME:ME: β CD) e ME contendo solução de SB- β CD como fase aquosa.

A composição da ME estudada foi selecionada em função da MLP e a isotropia a apresentada por essas amostras assim como sua viscosidade. As MEs estudadas (Figura 32) contém concentrações equimolares de CHO e FS o que permitiu a estabilidade e incorporação de AmB em todos os sistemas. Assim como em resultados anteriores as MEs contendo CDs promoveram aumento de incorporação de AmB seguindo o mesmo perfil já descrito anteriormente. A SB- β CD duplicou o conteúdo de fármaco incorporado quando

introduzido em MEs. É importante ressaltar que todas as CDs estudadas melhoraram o perfil de incorporação das MEs proporcionando um efeito sinérgico. A β CD foi a CD que promoveu efeito menos acentuado dentre as CDs incorporadas nas em MEs. É notável ainda a HP- β CD e SB- β CD apresentaram incorporação de AmB em concentrações acima da média em relação à ME- β CD e β CD.

A concentração de AmB aumentou marcadamente com o aumento do volume de fases da ME. O aumento da incorporação de AmB e em ME contendo CDs também foi avaliada para cada CD. Como já esperado todas as CDs aumentaram o potencial de incorporação de AmB nas MEs. Entretanto a capacidade de incorporação apresentou mais efetividade na presença de SB- β CD e HP- β CD respectivamente em relação às demais. Dessa forma, constatou-se a efetividade dessas CDs, em especial da SB- β CD, no aumento da solubilidade da AmB. Pode-se inferir que, devido a sua alta solubilidade, dentre outros fatores, uma grande proporção de SB- β CD seguida por HP- β CD pode estar sendo utilizada para aumentar a solubilidade da AmB nas condições experimentais.

Constatou-se que a solubilidade aquosa de AmB foi significativamente aumentada pela complexação com CDs em associação com MEs mostrando que o efeito sinérgico da Microemulsão:CD na capacidade de incorporação de AmB foi um fator muito relevante nessa análise. Autores já têm investigado a prévia complexação de compostos hidrofóbicos com CDs para posterior adição em sistemas de liberação e consideram essa prática uma estratégia inteligente para aumentar de maneira ainda mais eficiente a solubilização de fármacos pouco solúveis (MAESTRELLI et al., 2005).

Diante dos resultados obtidos sugere-se que ambos ME e CDs possuem características muitas valiosas pela sua possibilidade de utilização na solubilização e liberação prolongada da AmB.

Em função da avaliação pouco satisfatória da β CD, e da obtenção de resultados mais relevantes com as CDs modificadas, os experimentos foram conduzidos apenas com ME- β CD, HP- β CD e SB- β CD.

5.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar diretamente a estrutura e distribuição dos cristais formados pelas amostras de AmB, CDs e complexos de inclusão com as CDs.

Fotomicrografias das amostras de AmB, das CDs e dos complexos de inclusão com SB- β CD e HP- β CD e ME- β CD foram obtidas (Figuras 33 a 39). Essa análise foi realizada tendo como propósito, comparar os compostos puros e os complexos de inclusão liofilizados, onde é permitido visualizar o aspecto das amostras de forma global, e suas diferenças entre si, indicando aspectos físicos típicos de cada uma.

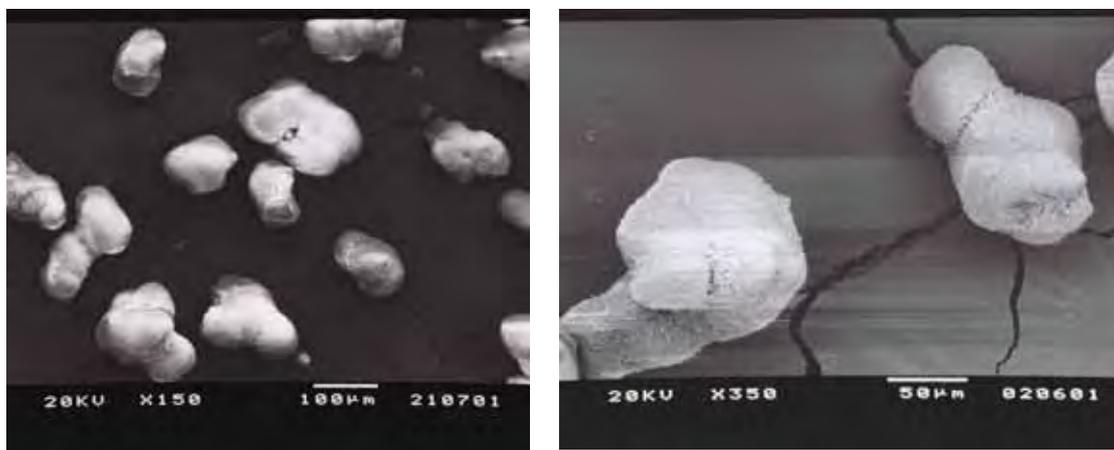


Figura 33: Microscopia eletrônica de varredura da AmB. Aumento de 150 e 350x.

Verificou-se para AmB (Figura 33) um tipo de estrutura bem definida, com características de um sólido cristalino. Percebe-se ainda os tamanhos médios dos cristais em torno de 100 μ m quando observado longitudinalmente apresentando variações médias. Assim

como na literatura, o cristal desse fármaco apresentou-se alongada apresentando estruturas mais volumosas em sua extremidade.

Posteriormente foram obtidas imagens da SB- β CD (Figura 34).

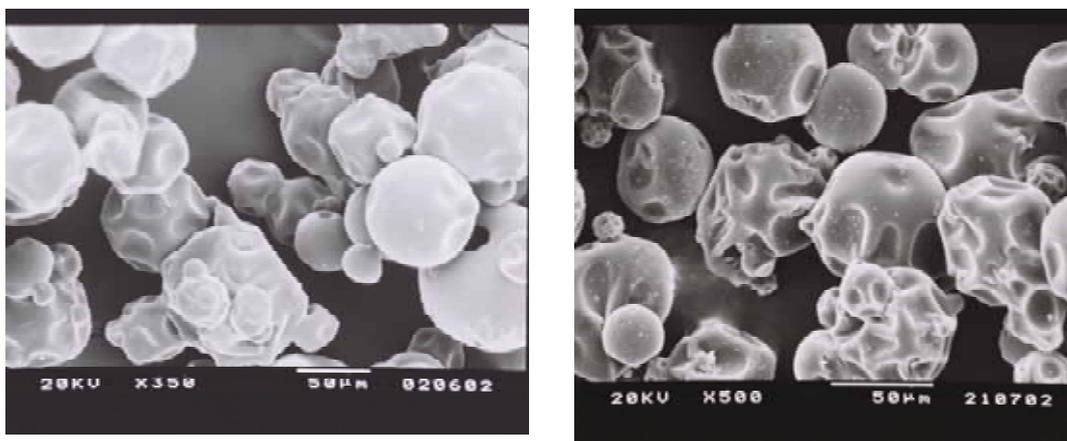


Figura 34: Fotomicrografias de varredura de SB- β CD. Aumento de 350 e 500x.

As fotomicrografias da SB- β CD revelam estruturas arredondadas, bem definidas e apresentando concavidades que são características de produtos atomizados pela técnica de “spray dryer”. A ocorrência de concavidades na superfície das partículas está relacionada com a rápida evaporação das gotículas do líquido durante o processo de spray drying (FÁVARO-TRINDADE et al., 2010). Em relação às dimensões dessas moléculas verifica-se tamanho variado sendo bem observadas dimensões médias de 50 μ m.

A figura 35 mostra as fotomicrografias das amostras do complexo de inclusão SB- β CD:AmB e permite verificar modificações de morfologia.

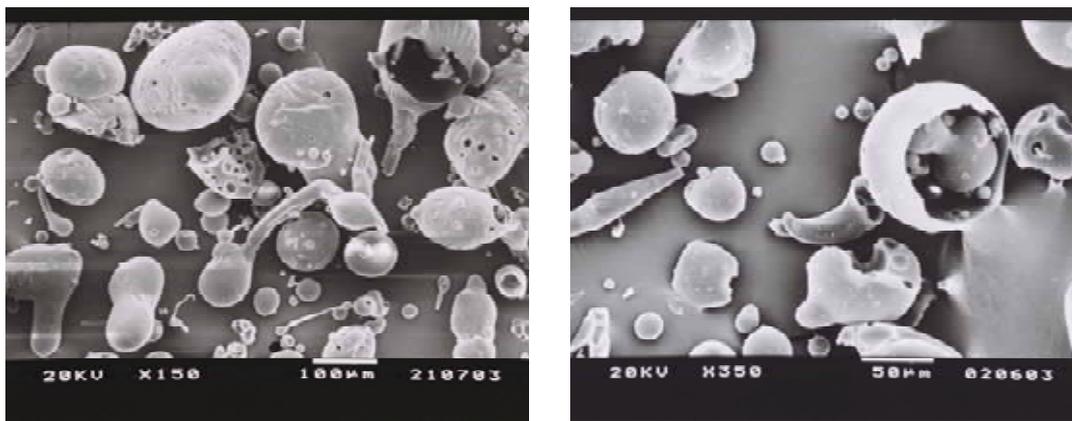


Figura 35: Fotomicrografias de varredura do complexo SB- β CD:AmB. Aumento de 150 e 350x.

As fotomicrografias do complexo de inclusão AmB:SB- β CD apresentaram um padrão diferenciado das imagens das amostras isoladas. Verificou-se a presença de estruturas bem esféricas e de formatos regulares assim como as imagens da CD pura em questão. Sugere-se ainda a presença de moléculas de AmB pela presença de algumas estruturas alongadas apresentando dimensões semelhantes às citadas para o fármaco. Entretanto é conhecido que alguns fármacos podem perder sua cristalinidade passando para um estado amorfo quando são complexados com CDs, o que dificulta ou impede sua visualização (MURA et al., 2005).

Observam-se ainda sulcos na estrutura de algumas moléculas as quais podem ser atribuídos à CD estudada. A HP- β CD (Figura 36) apresentou estrutura muito diferenciada da SB- β CD.

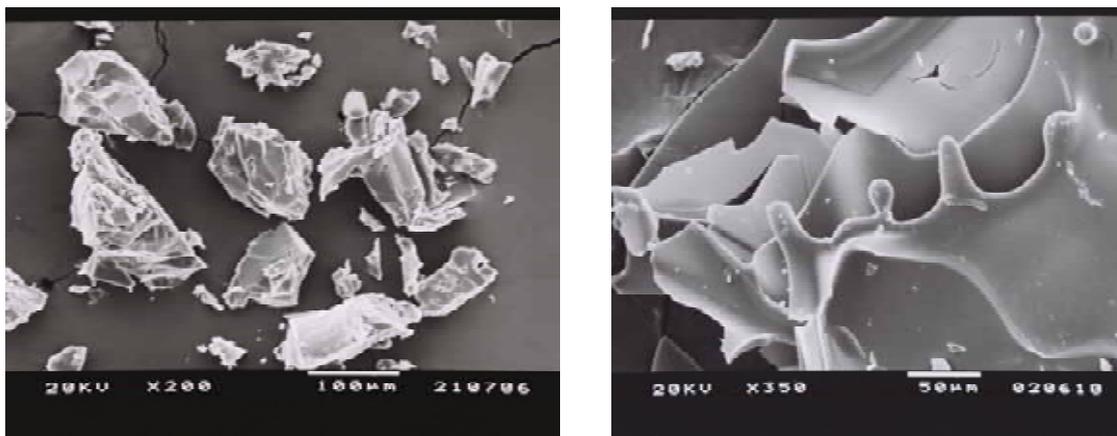


Figura 36: Fotomicrografia de varredura da HP:βCD. Aumento de 200 e 350x

Verificou-se uma estrutura de padrão amorfo assim como encontrado na literatura onde as mesmas não se apresentam arredondadas, como no caso da SB-βCD. Já para o complexo obtido algumas observações podem ser feitas (Figura 37).

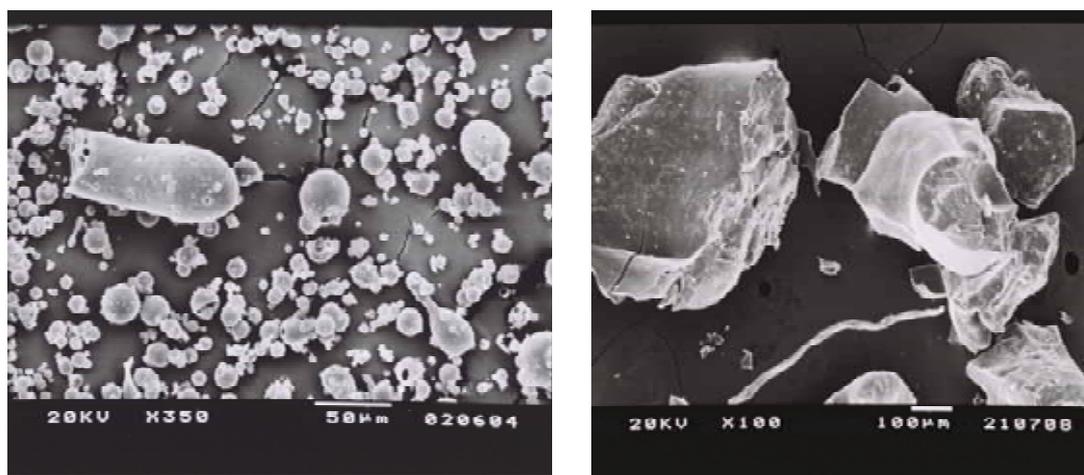


Figura 37: Fotomicrografia de varredura do complexo HP-βCD: AmB. Aumento de 100 e 350x.

As análises por MEV facilitaram a observação dos cristais isolados do fármaco e uma estrutura amorfa para as CDs isoladas. Pode-se observar alterações na estrutura cristalinas da AmB, pois verificou-se da mesma maneira que não foi possível observá-la assim como no complexo mostrado anteriormente. Ainda de acordo com Williams et al., (1998) a perda da cristalinidade é uma evidência da formação de complexos de inclusão.

Um fator que pode ser observado é a dimensão da estrutura do complexo que se apresentou bem maior que a HP: β CD isolada.

Para as MEV da ME- β CD (Figura 38) e seu complexo de inclusão com AmB (Figura 39) observou-se uma modificação completa no estado da CD e da AmB, fatos esses constatados pela não visualização do fármaco e o aparecimento de um padrão totalmente amorfo do complexo de inclusão.

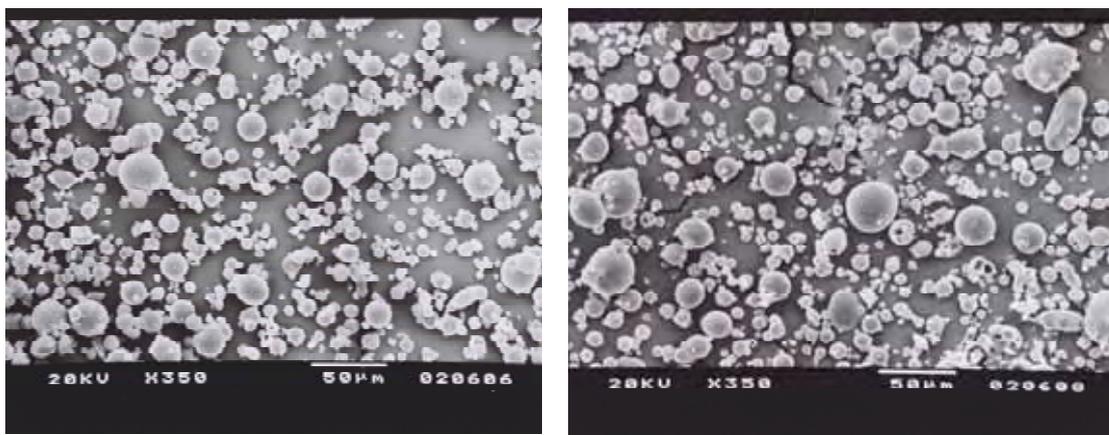


Figura 38: Fotomicrografia de varredura do da ME- β CD. Aumento de 350x

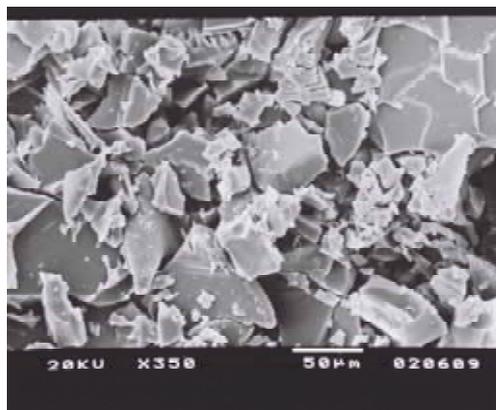


Figura 39: Fotomicrografia de varredura do complexo ME- β CD:AmB. Aumento de 350x.

5.10. ANÁLISE TÉRMICA

5.10.1. CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC), TERMOGRAVIMETRIA (TG) E TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (DTG)

A calorimetria diferencial exploratória (DSC) é uma técnica muito hábil em monitorar e quantificar os eventos térmicos ocorridos em cada amostra e identificar a temperatura na qual esses eventos ocorrem, porém não revela as causas desses eventos. Alterações nas estruturas de materiais podem ocorrer por modificações no aquecimento utilizando temperatura controlada. O DSC permite desenhar conclusões em relação às propriedades estruturais de uma amostra. A exata natureza dessas transições térmicas deve ser acompanhada por técnicas complementares tal como difração de raios X para auxiliar na diferenciação de perda de água e decomposição de substâncias ou compostos (BUNJES & UNRUH 2007).

Quando moléculas de fármacos são complexadas com CDs seu ponto de fusão geralmente se desloca para diferentes temperaturas ou desaparecem. Os termogramas foram analisados qualitativamente por observação dos eventos endo e exotérmicos em relação à estabilidade térmica da AmB, de β CD, HP- β CD, ME- β CD e SB- β CD dos complexos de inclusão formados (Figuras 40 a 51). Para os estudos da análise térmica da AmB e dos complexos inclusão curvas de DSC, TG e DTG do fármaco e das CDs foram obtidas.

A análise da degradação térmica de AmB ilustrada na Figura 40 permitiu relatar a ocorrência de 3 eventos e suas perdas de massa. Abaixo de 100°C observou-se uma perda de água característica dessas análises e posteriormente observou-se que entre 150 e aproximadamente 500°C se processa sua degradação. Verificou-se o primeiro evento endotérmico em torno de 150°C, ocorrendo perda de massa e, portanto início de sua degradação. Observou-se que sua perda de massa total quando isolada é de aproximadamente 80%. O segundo evento é exotérmico ocorreu entre 389 e 550°C, sendo este o segundo ponto de degradação do fármaco. Ambos os eventos foram confirmados pelas perdas de massa em TG/DTG.

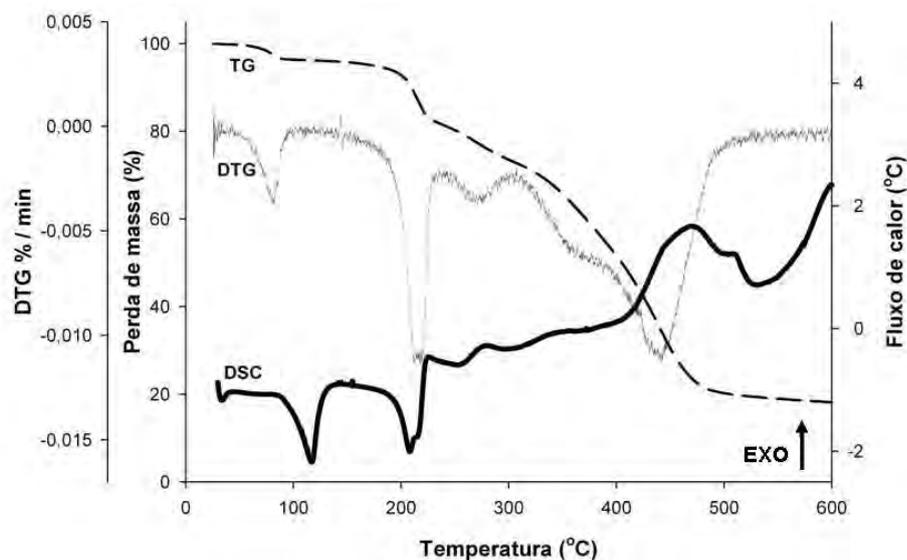


Figura 40: Curvas de DSC e TG/DTG da AmB em atmosfera de nitrogênio em taxa de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

As curvas de DSC e termogramas de TG/DTG da HP- β CD, SB- β CD e ME- β CD estão mostrados nas Figuras 41 a 43.

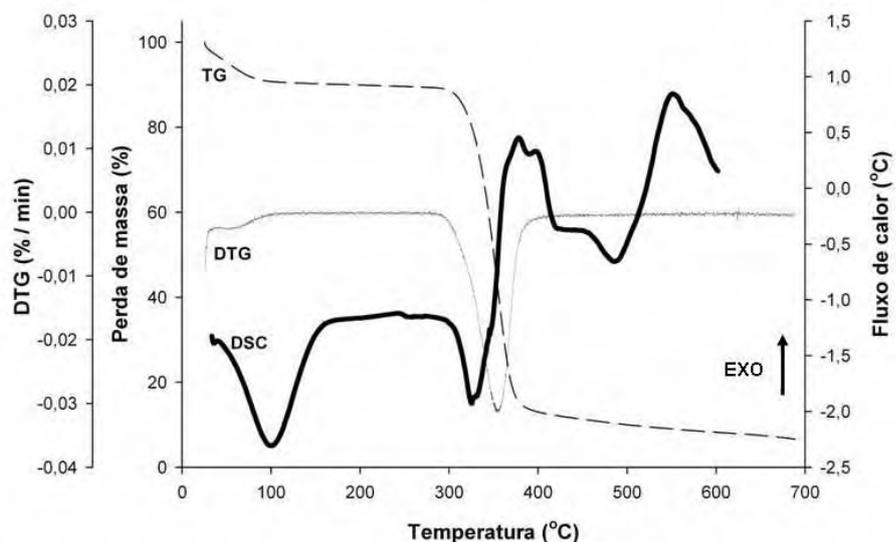


Figura 41: Curvas de DSC e TG/DTG da HP- β CD em atmosfera de nitrogênio em taxa de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

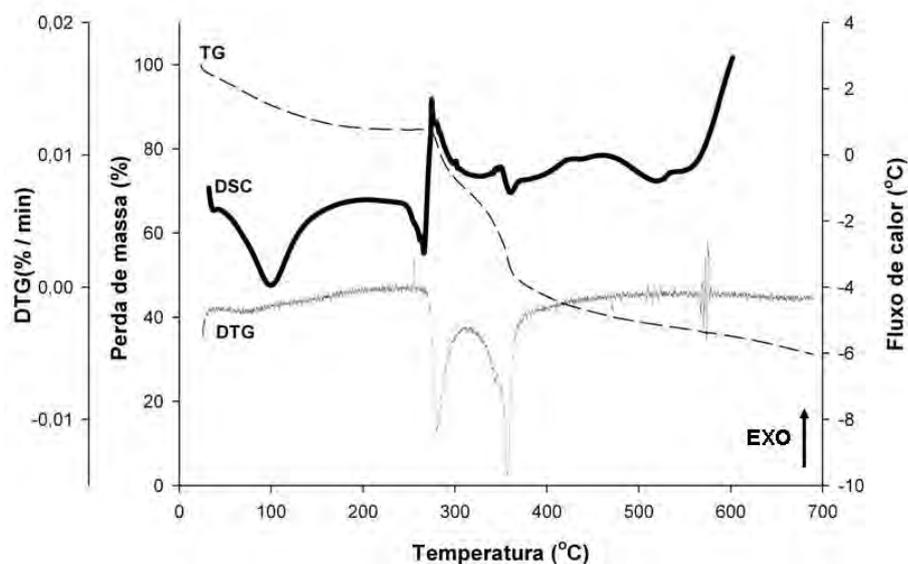


Figura 42: Curvas de DSC e TG/DTG da SB-βCD em atmosfera de N₂ em taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹

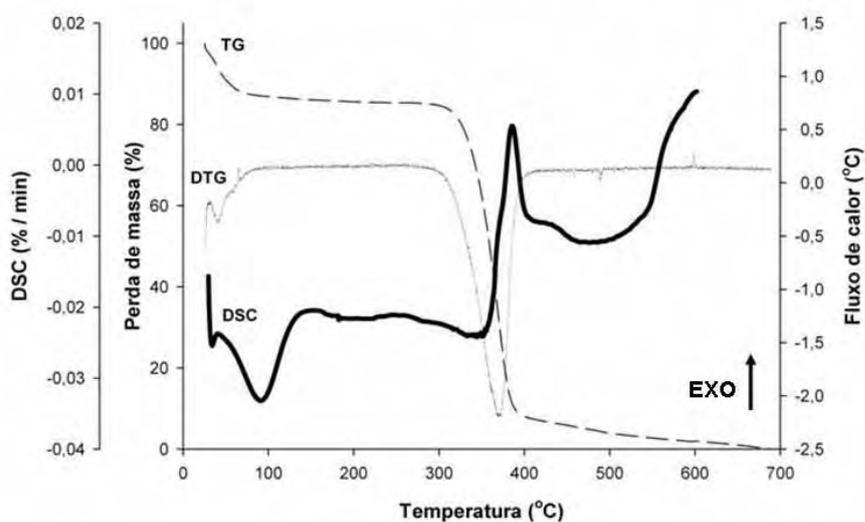


Figura 43: Curvas de DSC e TG/DTG da ME-βCD em atmosfera de N₂ em taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹

Realizando uma análise na degradação térmica das CDs puras observou-se três eventos, os quais consistem de um evento inicial em temperatura abaixo de 100°C, o qual provavelmente é devido à perda de água absorvida e água de cristalização. O segundo

evento aconteceu em uma faixa de temperatura entre 260 e 400°C. No último estágio ocorreu a formação de resíduo em temperaturas acima de 400°C. É ainda possível avaliar as perdas de massa ao final do experimento, relacionadas a cada CD (Tabela 9).

Tabela 9: Temperaturas de degradação e perda de massa de cada CD estudada.

CD	T (°C) evento	Perda de massa (%)
ME-βCD	300 a 400	90
SB-βCD	300 a 400	68
HP-βCD	300 a 400	95

A fim de se observar possíveis interações entre as CDs e a AmB, análises de DSC, TG e DTG foram realizadas para o fármaco, para as CDs, e os complexos de inclusão obtidos. A Figura 44 apresenta uma curva de TG/DTG típica de CDs.

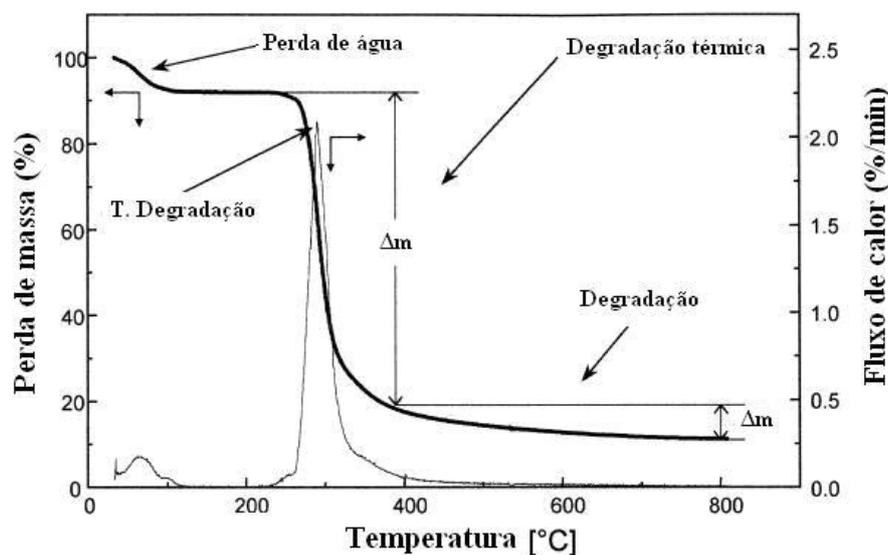


Figura 44: curvas típicas e TG de CDs em nitrogênio

A literatura relata que as dimensões das CDs podem variar a temperatura de degradação. As CDs estudadas apresentam diferenças nas dimensões apenas em função dos radicais ligados à estrutura básica (heptâmero). Portanto, não se observou grandes variações em suas temperaturas de degradação das CDs quando isoladas, apresentando a SB- β CD uma temperatura um pouco mais baixa (TROTTA et al., 2002). As análises das CDs e suas derivadas ilustram os dados sendo a SB- β CD (Figura 45) a CD primeiramente avaliada.

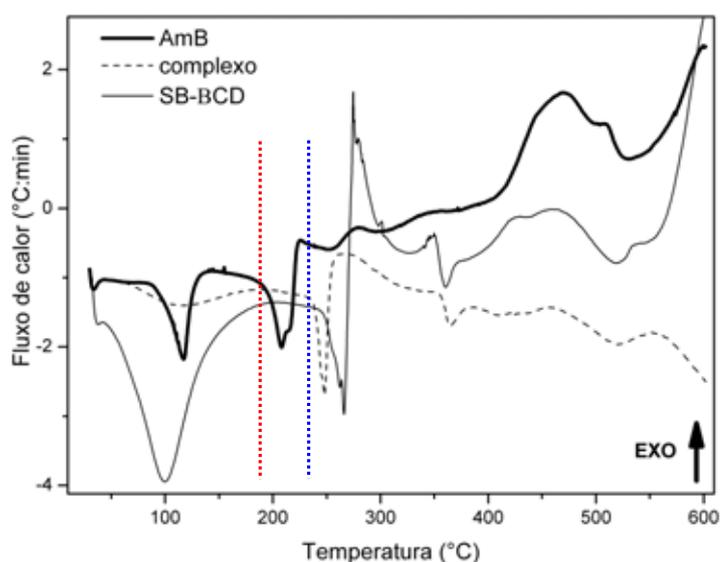


Figura 45: Curvas de DSC da AmB, SB-BCD e seu complexo de inclusão. Primeiro evento fusão: --- (AmB) e --- (Complexo)

Nas curvas de DSC obtidas a partir do fármaco, CD e complexo de inclusão, três eventos podem ser verificados, sendo um evento endotérmico inicial de perda de água, um segundo evento que é atribuído à fusão dos compostos e um terceiro evento atribuído à degradação dos mesmos. No caso da AmB observa-se em 151°C um pico atribuído a fusão do fármaco. O terceiro evento ocorre em torno de 300°C sugerindo o início da degradação térmica do fármaco. Já para SB- β CD verifica-se também um evento em 262°C devido provavelmente à sua fusão, seguido por sua degradação em aproximadamente 360°C. Já o

complexo de inclusão obtido apresentou um pico de fusão em temperatura intermediária à do fármaco e do CD pura, sendo de 254°C, sugerindo a real formação dos complexos de inclusão e maior proteção da AmB quando a mesma está interagindo com a CD.

Posteriormente a TG e DTG das amostras puras e dos complexos de inclusão foram avaliados. As TGs da AmB, da SB- β CD e do complexo foram verificados conjuntamente e confirmam os dados de DSC (Figura 46).

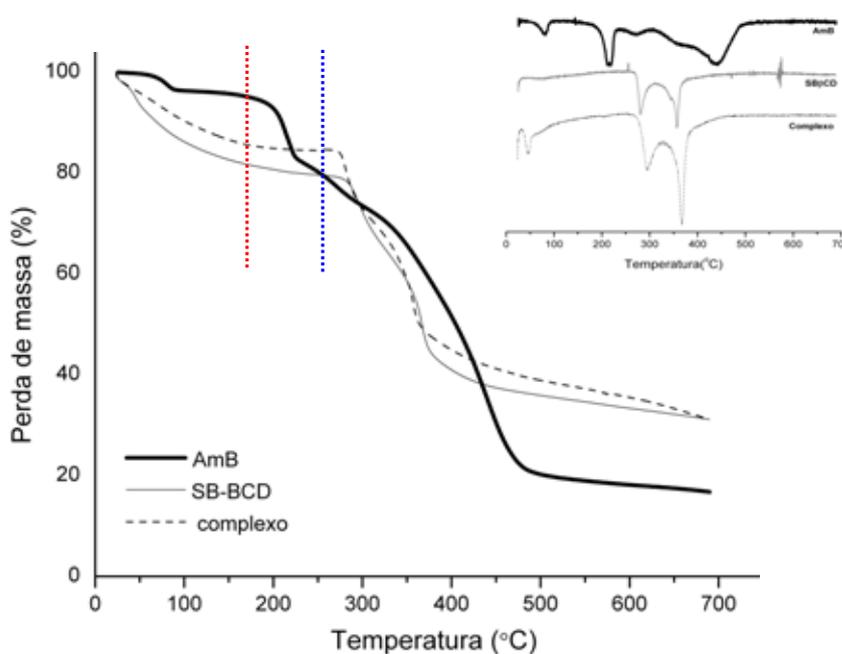


Figura 46: TG de amostras de AmB pura, da SB- β CD e do complexo de inclusão AmB:SB- β CD. Inset: DTG AmB, SB- β CD e complexo SB- β CD:AmB. Primeiro evento fusão: --- (AmB) e --- (Complexo).

É facilmente observado que a AmB apresenta seu primeiro evento de degradação em temperatura consideravelmente inferior ao complexo SB- β CD:AmB. Em relação à perda de massa pode-se dizer que a da AmB isolada é de 75,8%, contrastando com o complexo que perde 68,8% de massa em uma faixa de temperatura semelhante. Ainda é possível relatar

que o complexo apresenta um resíduo final de aproximadamente 30% de massa e a AmB de 15%.

As análises de DSC seguidas de TG/DTG da AmB, HP- β CD e seu complexo de inclusão também foram realizadas e as curvas estão dispostas na figura 47.

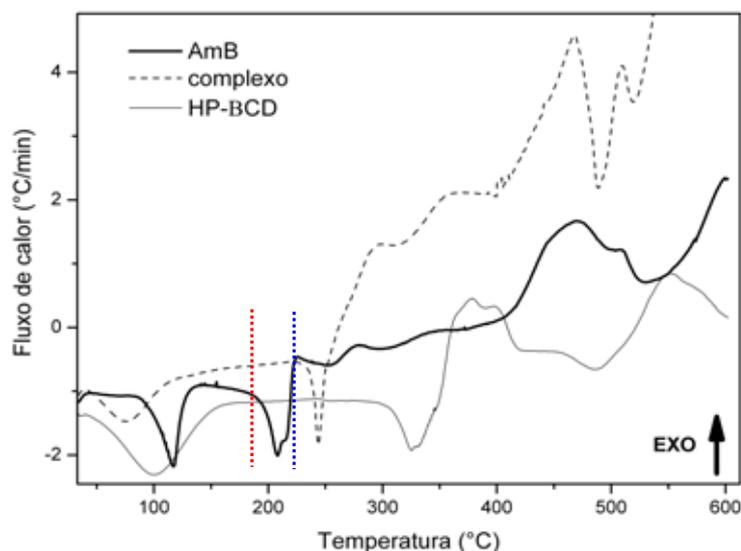


Figura 47: Curvas de DSC da AmB, HP- β CD e seu complexo de inclusão. Primeiro evento fusão: - - - (AmB) e - - - (Complexo)

Nos termogramas de HP- β CD e do complexo formado um perfil semelhante é observado. Tanto a CD quanto o complexo apresentam um evento de perda de água inicial em torno de 100°C apresentando em seguida as temperaturas de fusão de 283 e 260°C para a HP- β CD e para o complexo com AmB respectivamente.

Eventos endotérmicos relacionados à degradação das amostras estudadas ocorrem no complexo em uma faixa de 450 e 520°C seguido por eventos exotérmicos em temperaturas acima de 500°C. Através das curvas pode-se verificar que o complexo degrada em temperatura intermediária entre os outros dois compostos o que sugere uma interação real entre o fármaco e a CD avaliada

Posteriormente foi realizada a análise de TG/DTG da HP- β CD e seu complexo com AmB (Figura 48).

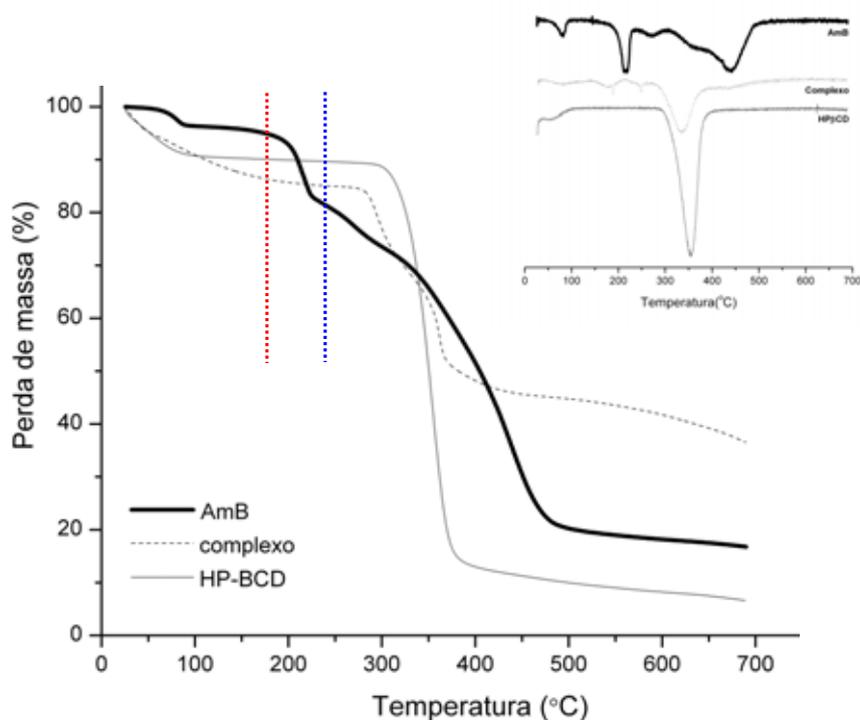


Figura 48: TG de amostras de AmB pura, da HP- β CD e do complexo de inclusão AmB:HP- β CD. Insert: DTG AmB, HP- β CD e complexo HP- β CD:AmB. Primeiro evento fusão: --- (AmB) e ---- (Complexo)

Nas análises de TG/DTG é possível visualizar que a HP- β CD e o complexo HP-AmB tem início de sua degradação térmica em temperaturas de 283 e 260°C respectivamente e superiores a da AmB que ocorre em 151°C. Ainda como ponto positivo verifica-se uma massa residual do complexo de aproximadamente 38,8% sendo bem maior do que o fármaco e a HP- β CD isolada. A perda de massa real do complexo foi de 61,2%.

Posteriormente as análises de DSC da AmB, ME- β CD e do seu complexo foram realizadas (Figura 49).

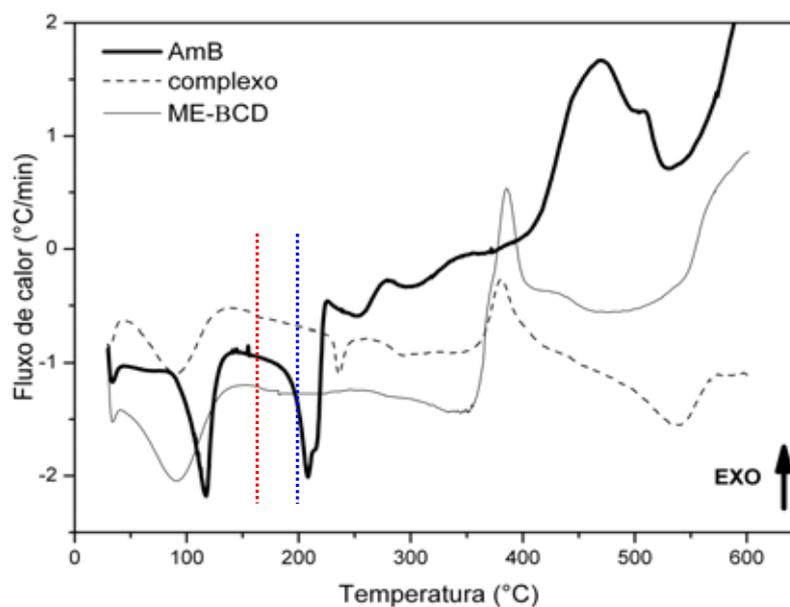


Figura 49: Curvas de DSC de AmB, da ME-βCD e seu complexo de inclusão. Primeiro evento fusão: --- (AmB) e --- (Complexo)

Os termogramas de DSC da ME-βCD apresentam perdas de desidratação características das moléculas e posteriormente um evento endotérmico em torno de 283°C para a ME-βCD sendo atribuído à fusão da CD. Dois eventos referentes ao complexo de inclusão formado podem ser vistos, sendo o primeiro em torno de 220°C. Como nos termogramas das demais CDs a temperatura de fusão do complexo se mostra intermediária entre a AmB e a CD avaliada sugerindo da mesma forma proteção do fármaco por possível interação com a CD. O segundo evento agora exotérmico ocorre tanto para ME-βCD como para o complexo em torno de 375°C e são correspondentes à degradação desses compostos.

Nas análises de TG/DTG existe a confirmação desses eventos e demonstração das perdas de massa correspondentes a cada amostra envolvida (Figura 49).

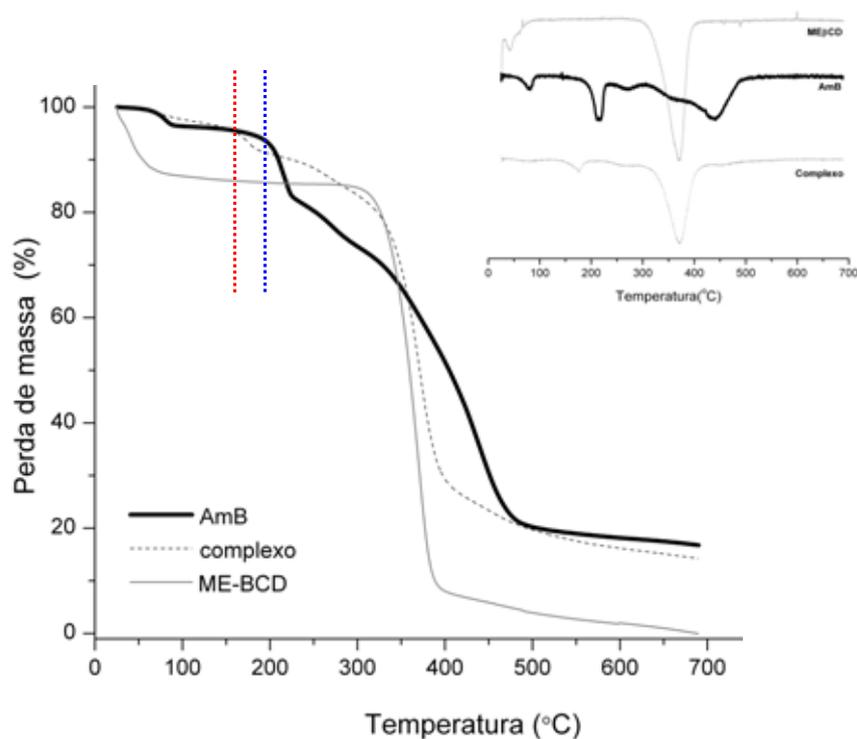


Figura 50: TG de amostras de AmB pura, da ME- β CD e do complexo de inclusão AmB:ME- β CD. Inset: DTG AmB, ME- β CD e complexo ME- β CD:AmB

É importante verificar que o resíduo do complexo corresponde a 17% considerando a perda total de massa. Até aproximadamente 250°C a ME- β CD apresenta maior porcentagem de perda de massa do que o complexo com AmB, que segue o mesmo perfil até 700°C e mostra que a complexação com AmB promoveu um efeito positivo para a CD e em temperaturas um pouco mais elevadas (até 350°C) diminui a perda de massa da AmB pura. Em altas temperaturas as perdas de massa da AmB e do complexo são semelhantes.

A Tabela 10 mostra as temperaturas de degradação e as perdas de massa observadas em TG e DTG.

Tabela 10: Temperaturas de degradação e perdas de massa de cada amostra avaliada

Amostra	T _{degradação} (°C)			Δ massa (%)
	Evento 1	Evento 2	Evento 3	
Anfotericina B	151 a 245	245 a 303	303 a 512	75,83
SB-βCD	262 a 310	310 a 375	----	68
Complexo SB:AmB	254 a 325	325 a 450	---	68
ME-βCD	293 a 421		----	90
Complexo ME:AmB	198 a 294		294 a 425	83
HP-βCD	283 a 379	----	----	95
Complexo HP:AmB	220 a 273	327 a 424	----	61,2

Verificando os dados (Tabela 11) observa-se de forma geral que o complexo SB:AmB apresenta temperatura inicial de degradação menos elevada, comparada com os outros complexos, além de um residual de massa de aproximadamente 30%.

Essa análise demonstrou, dentre outros fatos, uma forte interação entre o fármaco e as CDs estudadas, sugerindo real formação de complexos de inclusão e ainda que a ME:AmB proporciona uma maior proteção do fármaco contra temperaturas elevadas, diminuindo assim a possibilidade de degradação.

A seguir foi realizada a comparação das DSCs da AmB e dos complexos formados (Figura 51).

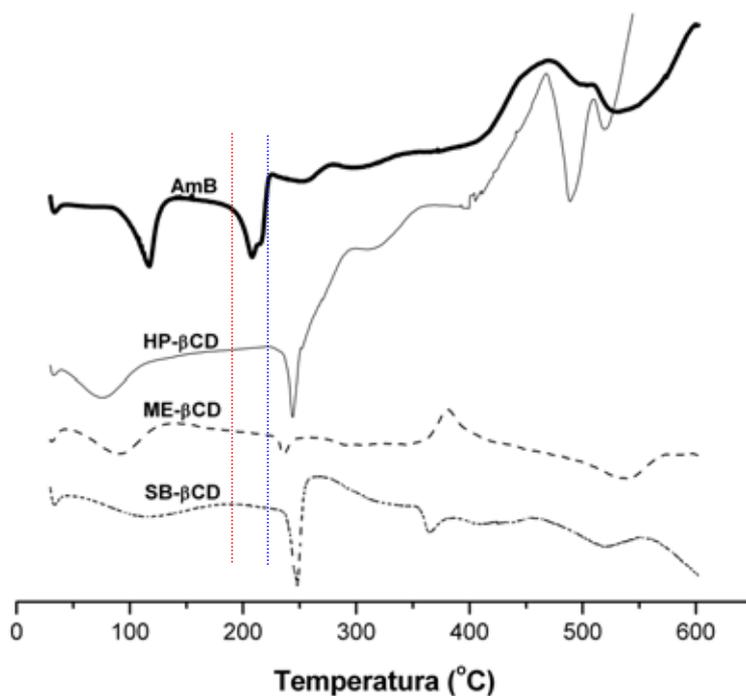


Figura 51: Curvas de DSC de (.....) AmB e (.....) dos complexos de inclusão formados

A partir da análise comparativa entre a AmB e os complexos obtidos fica explícito que a AmB apresenta ponto de fusão mais baixo que os pontos de fusão dos complexos isolados. Pode-se observar que todas as CDs avaliadas deslocam o pico de fusão da AmB pura e que esse resultado reflete as interações do fármaco com as CDs e a eficiência da formação de complexos de inclusão, pois a complexação do fármaco com as CDs eleva os pontos de fusão da AmB. Esse comportamento térmico reflete a estabilidade que a complexação proporciona à AmB. As CDs mais eficientes nesse sentido são a SB-βCD e HP-βCD atribuindo essa sugestão às temperaturas de fusão de cada amostra.

No intuito de confirmar os resultados apresentados difração de raios X e análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas.

5.11. DIFRAÇÃO RAIOS X

A difração de raios X foi utilizada tanto para verificar se as CDs se apresentavam na forma amorfa ou cristalina, como para identificar a evolução estrutural das fases cristalinas formadas após a incorporação de AmB no sistema. De forma geral, as interações fármaco-sistema desempenham um importante papel no controle da liberação. Entretanto, a razão de liberação de fármacos incorporados em sistemas com estrutura cristalina dependerá do grau e do tipo de estrutura cristalina formada assim como das características físico-químicas do fármaco. Essas propriedades tornam possível a utilização de sistema com estrutura cristalina como veículos carreadores de fármacos, os quais podem ser capazes de controlar a liberação das substâncias neles incorporados (GABBOUN et al., 2001).

Dependendo da técnica de preparação e conseqüentes níveis de hidratação, as amostras de β CD e derivadas podem existir em diferentes formas de cristal e algumas delas mais ou menos transformadas em outra fase sendo cristalina ou amora. O comportamento peculiar tem sido atribuído a fenômenos reversíveis e irreversíveis (CHAROENCHAITRAKOOL et al., 2002)

A Figura 52 mostra os difratogramas de AmB e SB- β CD compostos puros, e os sistemas binários desenvolvidos compostos de AmB:SB- β CD preparados na razão molar 1:1 fármaco:CD.

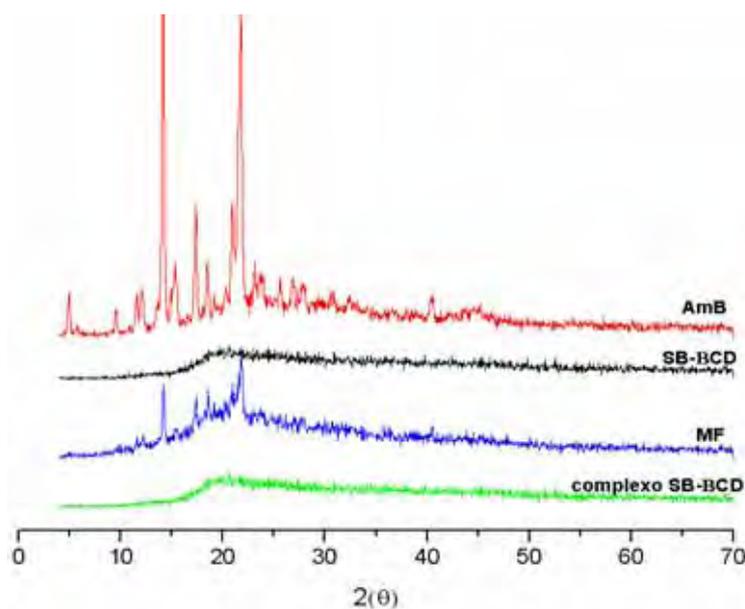


Figura 52: Difratoograma de raios X de anfotericina B (AmB), Sulfobutil éter β CD (SB- β CD), Mistura física (MF) e complexo de inclusão SB- β CD:AmB.

O difratograma da AmB revelou picos de alta intensidade nos ângulos de difração tendo os mais acentuados em $2\theta = 14,24, 17,37$ e $21,72$ mostrando que o fármaco se apresenta na forma de material cristalino. Já o difratograma da SB- β CD pura demonstrou uma natureza amorfa sem a presença de picos cristalinos. A mistura física exibe os principais picos de difração da AmB sobrepostos com o perfil amorfo da CD. Entretanto esses picos desapareceram nos complexos exibindo apenas um perfil amorfo, indicando a formação de complexos de inclusão (CHAROENCHAITRAKOOL et al., 2002). Traçando uma comparação com os termogramas das análises de TG/DTG, DSC e RMN que evidenciam a formação dos complexos pode-se concluir que de fato que a complexação de AmB com a SB- β CD foi concluída, porém com formação de novas fases sólidas não cristalinas, onde o fármaco perdeu sua cristalinidade.

Resultados semelhantes podem ser verificados (Figura 53) com o complexo AmB:HP- β CD.

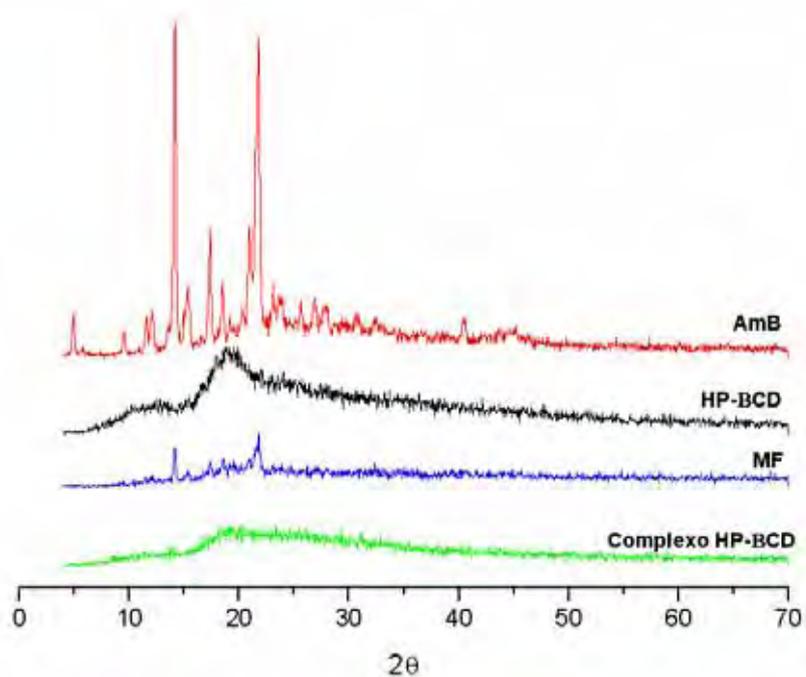


Figura 53: Difratoograma de raios x de anfotericina B (AmB), Hidroxipropil β CD (HP- β CD), Mistura física (MF) e complexo de inclusão HP- β CD:AmB.

Foi observado também para HP- β CD uma natureza amorfa (BADR-ELDIN et al., 2008). Observações similares foram sugeridas por outros autores tais como Bayomi et al (2002) e Manosroi et al (2005). Há autores que sugerem a presença de alguns domínios cristalinos no difratograma dessa CD. A Metil β CD apresenta padrão semelhante ao da SB- β CD (Figura 54).

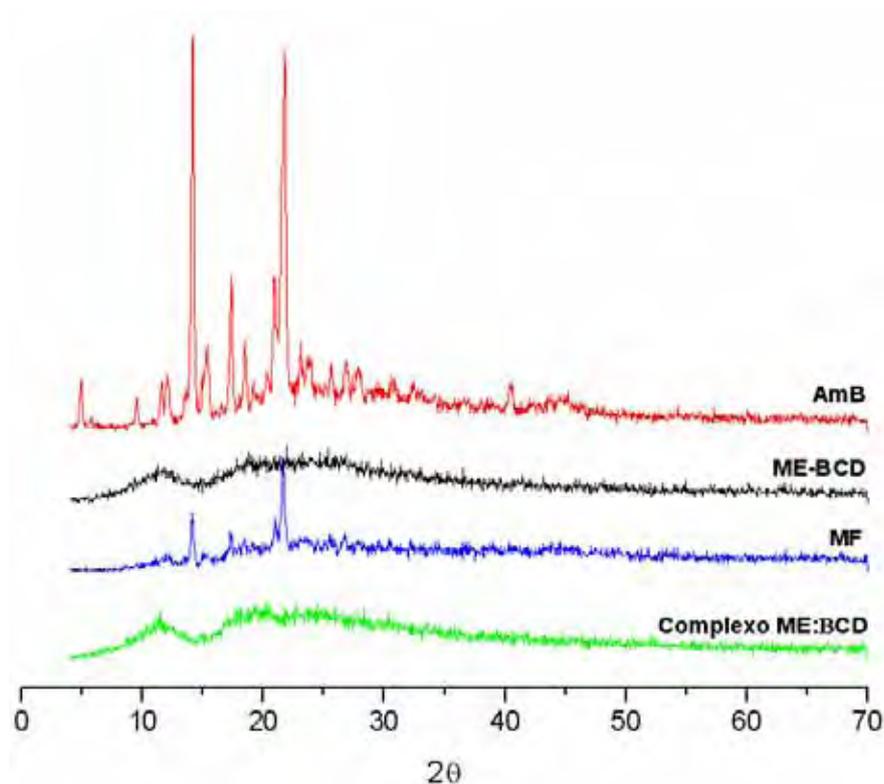


Figura 54: Difratoograma de raios X de AmB, Metil β CD (ME- β CD), Mistura física (MF) e complexo de inclusão ME- β CD:AmB.

ME- β CD mostrou um difratograma demonstrando estrutura também com padrão difuso caracterizando estrutura amorfa. Os difratogramas das misturas físicas analisadas correspondem à superposição dos componentes puros mostrando os padrões verificados igualmente sendo possível observar os picos da AmB pura de forma evidente. Entretanto quando analisados os sistemas binários com os componentes complexados (AmB:CDs) um padrão não similar foi observado e os picos do fármaco são muito pouco evidentes. Embora uma drástica redução dos picos tenha sido observada e um padrão difuso tenha sido apresentado, indicando a ausência do fármaco, pode-se encontrar na literatura sugestões que a amorfização de fármacos pode ser uma consequência do processo de complexação. Dessa forma é possível que os dados de raios-X não consigam discriminar que o sistema complexo seja verdadeiro complexo de inclusão quando apresentado isoladamente.

Entretanto tendo em vista os resultados das análises de e DTG, TG, DSC, que mostram claramente a presença de AmB nos complexos desenvolvidos, pode-se sugerir a formação de novas fases sólidas não cristalina que podem creditar a formação de complexos de inclusão (WILLIAN et al., 1998 apud BADR-ELDIN et al., 2008).

5.12. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) também tem sido muito utilizada para a caracterização dos complexos de inclusão, através da observação das mudanças que ocorrem com os sinais de hidrogênio (^1H) ou de carbono (^{13}C) da molécula da ciclodextrina ou hóspede, ao estarem complexados (CONNORS, 1996). Alguns trabalhos reportaram o uso desta técnica, pois se trata de uma ferramenta útil nos estudos de formação de complexos de inclusão. Este processo vai sempre ocorrer quando existir compatibilidade geométrica e de polaridade entre a ciclodextrina e a molécula hóspede (RAMOS et al., 1999, 2003).

Durante o processo de complexação, os átomos situados em direção ao interior da cavidade da ciclodextrina vão sofrer uma mudança considerável em torno de seu ambiente, causada basicamente pela saída de moléculas de água e entrada de uma molécula de caráter apolar. O mesmo vai suceder com os núcleos da molécula hóspede que serão incluídos no interior da ciclodextrina, passando de um meio polar (solução) para um de caráter apolar (cavidade da ciclodextrina). Portanto, os sinais de RMN tanto da ciclodextrina como da molécula a ser incluída, terão uma variação de deslocamento químico, por estarem envolvidos no processo de complexação (DJEDAINI et al., 1991).

A caracterização das interações fármaco-sistema, através da determinação da estequiometria e da constante de formação do complexo, utiliza técnicas de RMN como uma das mais comuns. Consiste na análise dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono

(^{13}C) ou hidrogênio (^1H) pertencentes à molécula hóspede e ciclodextrina, em misturas de diferentes proporções [hóspede]/[CD]. Os espectros de RMN da AmB (Figura 55), das CDs e dos complexos formados estão apresentados nas figuras a seguir e foram realizados utilizando DMSO deuterado (DMSO- d_6) como solvente.

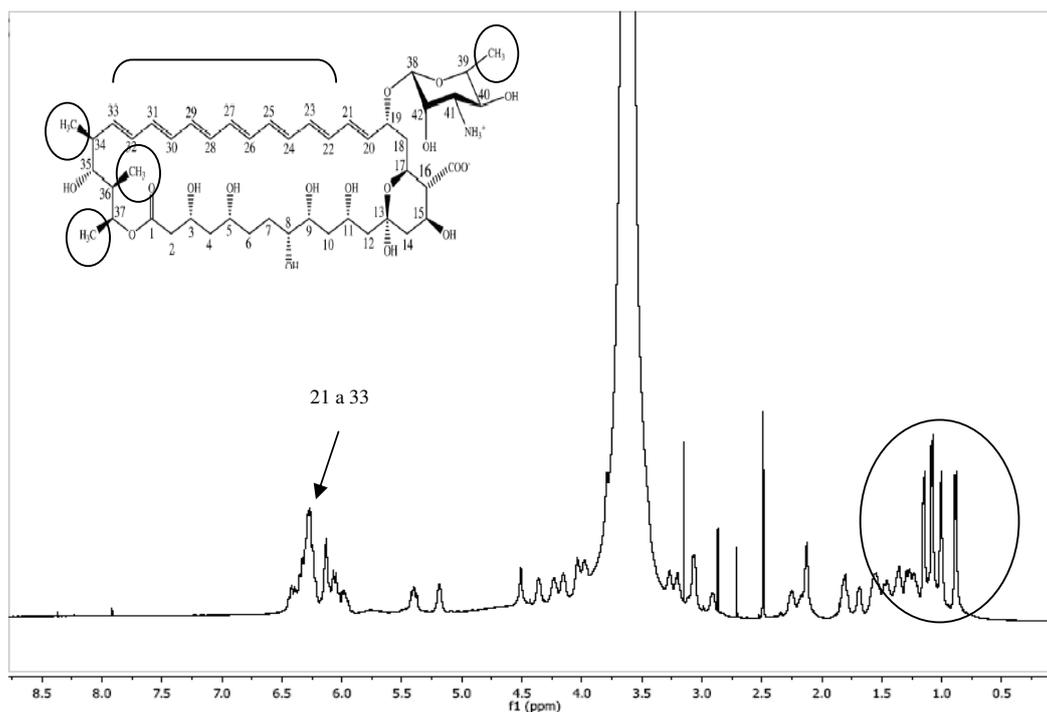


Figura 55: Espectro de RMN ^1H AmB em DMSO- d_6 a 500MHz

Segundo CHOI (2008) é possível atribuir sinais ao espectro de ^1H à molécula de AmB (Figura 55). Os sinais de hidrogênios dos grupos metílicos do fármaco foram identificados entre δ 0,5 e 2,0 e os sinais dos hidrogênios olefínicos em torno de 6,0. Após a avaliação do espectro do fármaco, espectros das CDs estudadas, seus complexos de inclusão também foram estudados para verificação das interações que ocorreram entre a CD e a molécula hóspede. A Figura 56 representa o espectro de hidrogênio da SB- β CD.

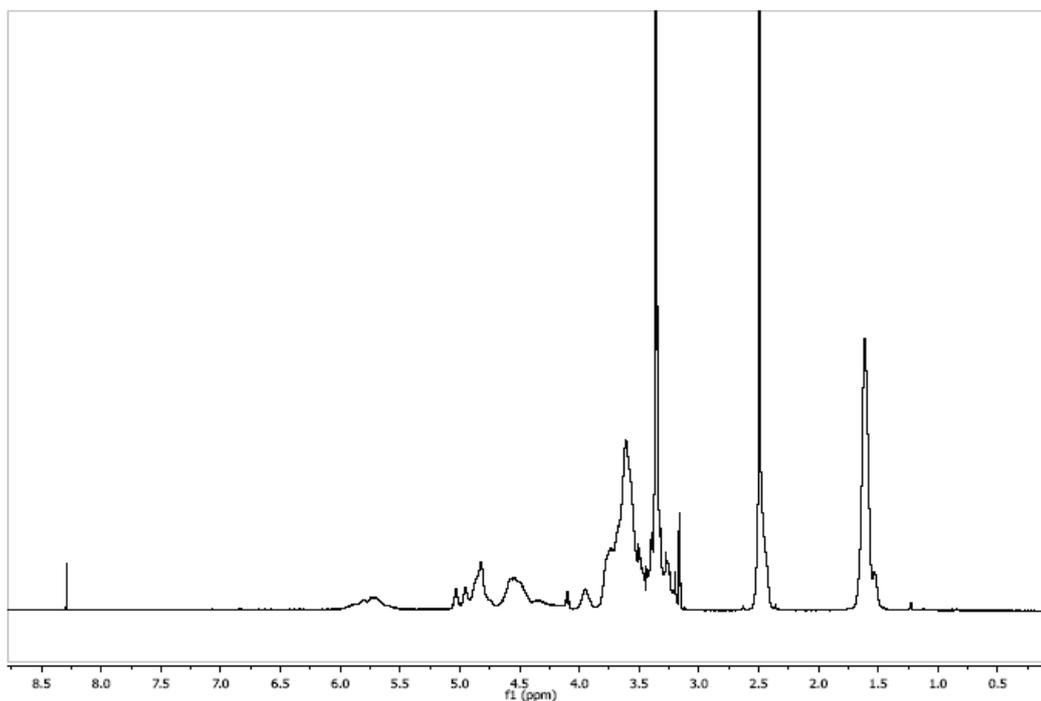


Figura 56: Espectro de RMN ^1H SB- β CD em DMSO- d_6 a 500MHz

No espectro referente à SB- β CD (Figura 56) algumas regiões foram selecionadas através de sua expansão para uma melhor avaliação de possíveis deslocamentos químicos (δ) ou aparecimento de novos sinais que pertençam à molécula isolada para se obter informações a respeito da complexação da CD com a AmB.

A primeira região avaliada foi comparada com o complexo desenvolvido (Figura 57).

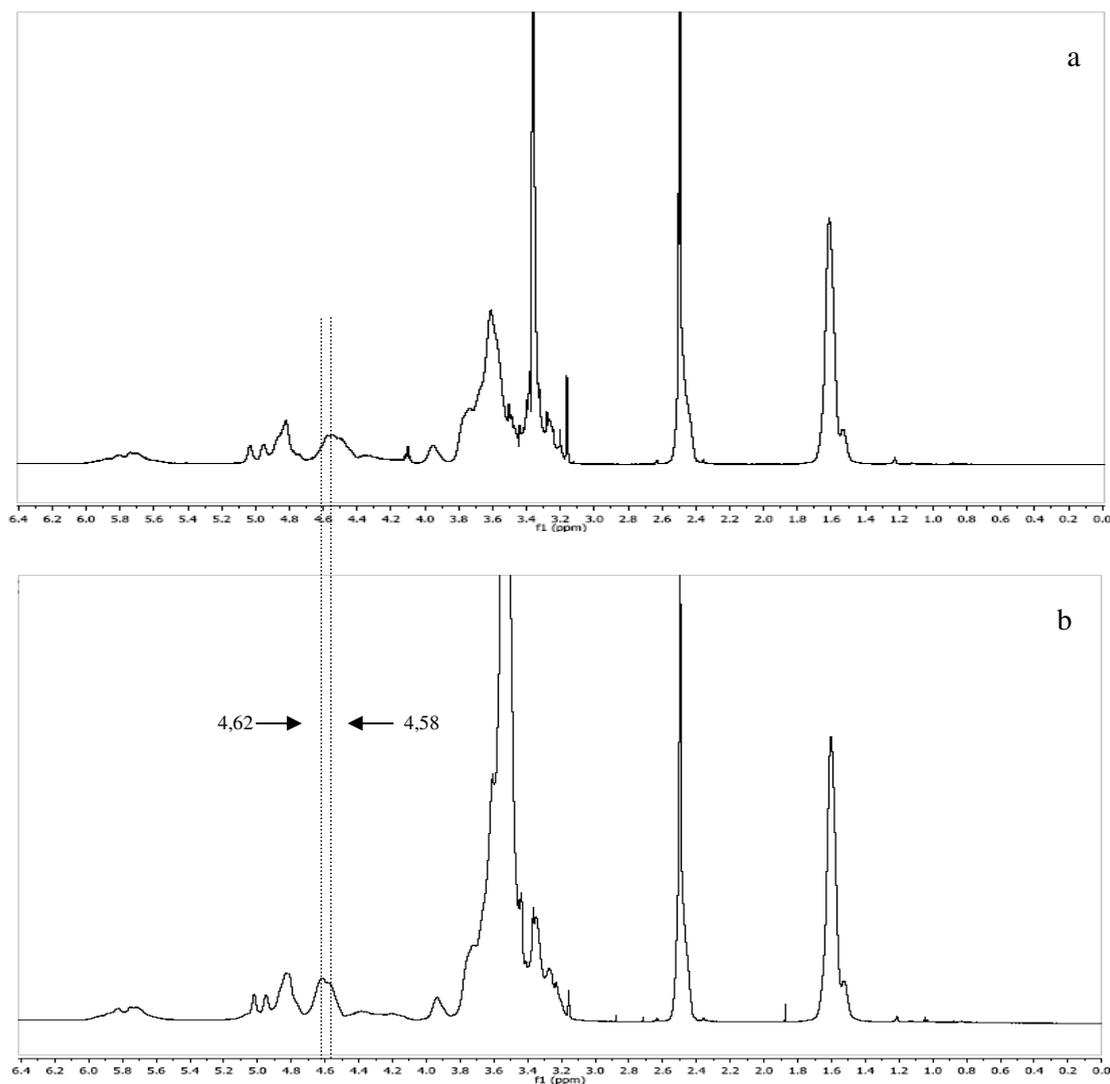


Figura 57: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ^1H da SB- β CD(a) e do complexo SB- β CD:AmB (b) em DMSO - d_6 em 500MHz.

Foi observado um deslocamento químico em δ 4,58 para a CD que desloca para δ 4,62 no complexo formado. Esse deslocamento pode ser atribuído a uma interação molecular entre hidrogênios da molécula da AmB e grupos OH presentes da CD. Análise em outra região da molécula também pode ser discutida (figuras 58 a, b e c).

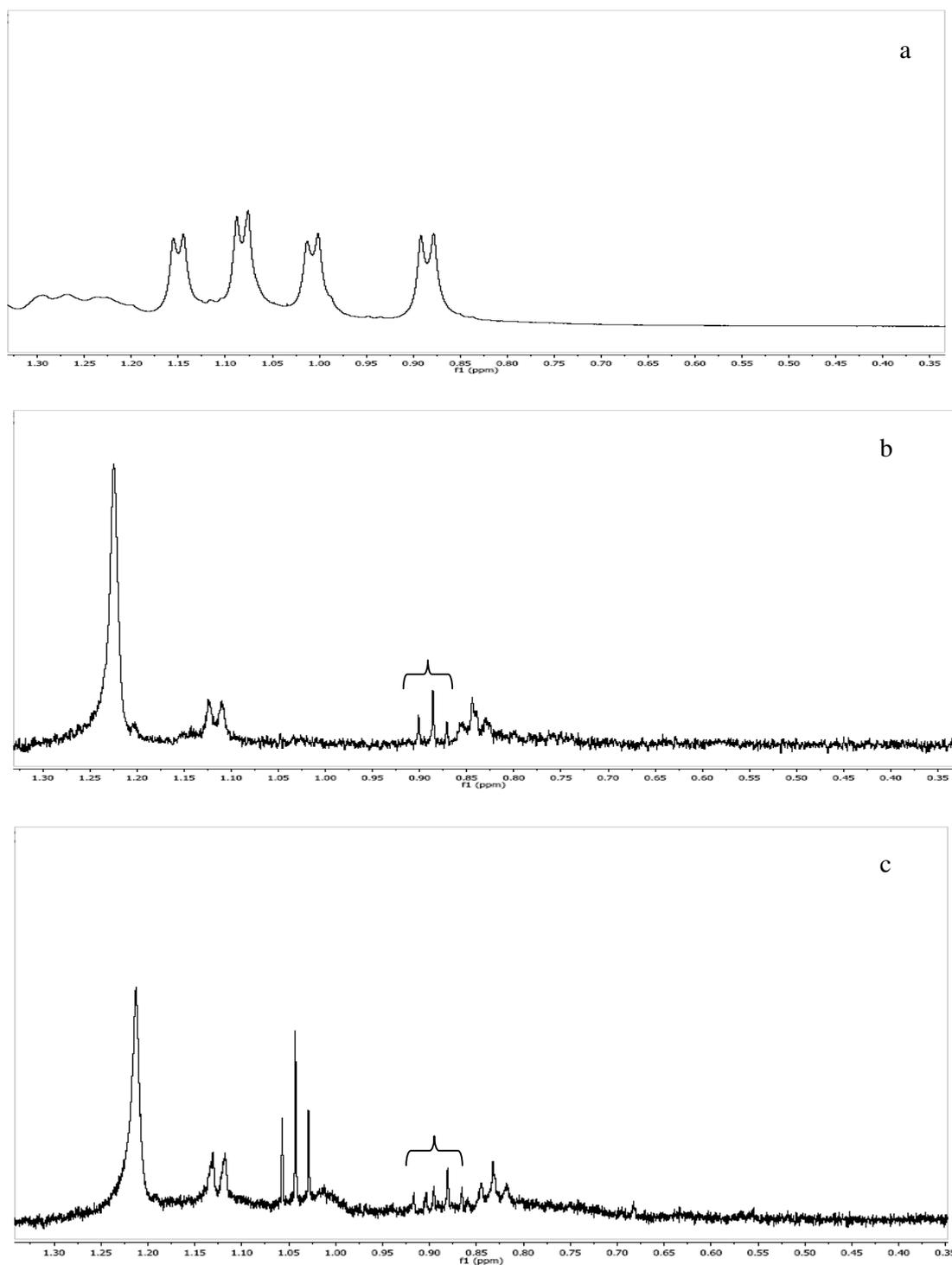


Figura 58: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ^1H da AmB(a), da SB- β CD(b) e do complexo SB- β CD:AmB(c) em DMSO- d_6 em 500MHz.

Depois de obtidos os espectros é possível realizar uma análise comparativa dos espectros da AmB, da SB- β CD e do complexo de inclusão SB- β CD:AmB formado. Verifica-se na molécula de AmB, em uma região de δ 0,85 a 1,10 a presença de 4 dubletos correspondentes aos grupos metílicos da AmB, sendo uma localizada no hidrogênio da metila ligado ao carbono 39 do anel glicosamina da molécula e as outras três, nos hidrogênios das metilas ligados aos carbonos 34, 36 e 37 (ver figura 1).

Constantes de acoplamento (J) podem ser observadas através das interações entre hidrogênios vizinhos. Calculando J tem-se valores de 5 (H^+ das metilas do C^{37}) 6 (H^+ das metilas dos C^{34} e C^{36}) e 7 (H^+ das metilas do C^{39}) Hz. Nessa mesma região entre δ 0,80 e 0,95 nos espectros de SB- β CD e do complexo SB- β CD:AmB pode-se observar modificações, as quais estão possivelmente relacionadas com os grupamentos metílicos supracitados da AmB. Sinais adicionais aos da SB- β CD podem ser visualizados no espectro do complexo. Na SB- β CD encontram-se sinais em δ 0,83 e 0,90 que apresentam constantes de acoplamento de 5,0 e 7,0 Hz. Dessa forma sugere-se que os picos adicionais e algumas constantes de acoplamento encontradas no complexo se assemelham às da AmB, sugerindo também interação do fármaco com a CD nessa região e a formação de complexos de inclusão. O mesmo tipo de avaliação foi realizado mediante análise comparativa entre os espectros da AmB com HP- β CD (Figura 59) e o complexo (Figuras 60 a, b e c).

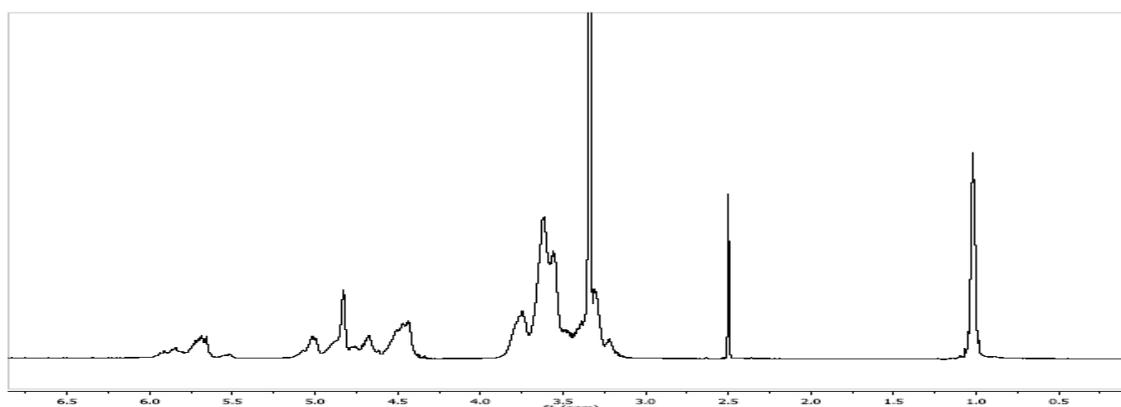


Figura 59: Espectro de RMN 1H HP- β CD em DMSO- d_6 a 500MHz

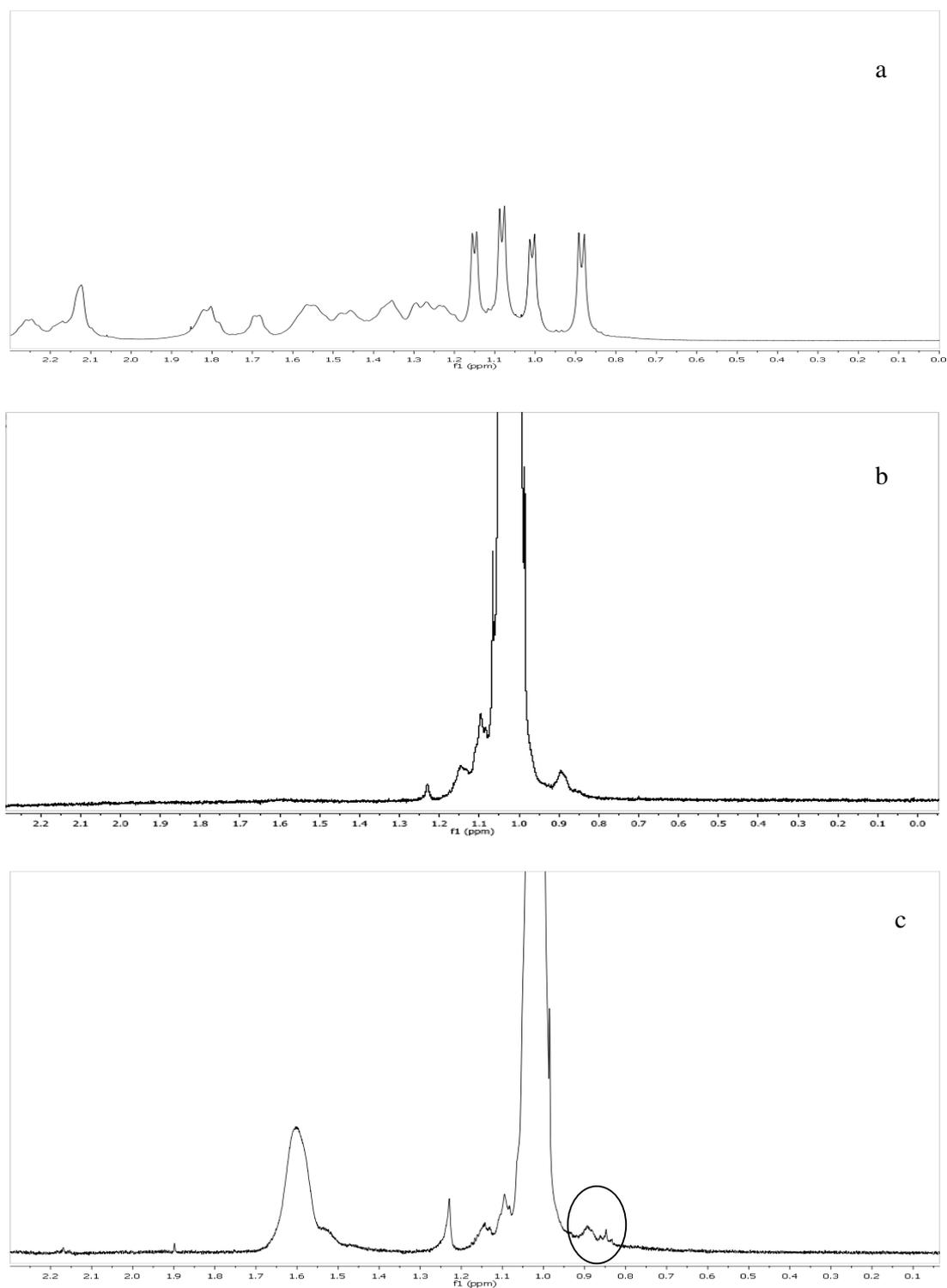


Figura 60: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ^1H da AmB(a), da HP-BCD(b) e do complexo HP- β CD:AmB(c) em DMSO- d_6 a 500 MHz.

Na avaliação da região situada entre δ 0,8 e 0,9 dos espectros da AmB (Figura 60a) com a HP- β CD (Figura 60b) e seu complexo de inclusão com AmB (Figura 60c) também apresentou modificações. Verifica-se o aparecimento de sinais nos espectro do complexo em δ 0,836; 0,848 e 0,862. As constantes de acoplamento calculadas foram 7 e 6 Hz sugerindo o aparecimento de grupamentos metílicos da AmB atribuindo esse resultado a formação de interações das OH da CD com as moléculas de H da AmB formando também complexos de inclusão.

D₂O (água deuterada) é utilizada para a análise de compostos insolúveis em solventes orgânicos, como sais ou compostos muito polares. Tal solvente também é utilizado para se confirmar a presença de hidrogênios susceptíveis a troca isotópica de hidrogênios “ativos” em uma determinada amostra. O espectro de RMN ¹H desta deve ser primeiramente obtido em DMSO-d₆ e subseqüentemente, adicionam-se algumas gotas de D₂O, agita-se o tubo de RMN e o espectro de RMN-¹H é novamente obtido, quando se observa que os sinais dos hidrogênios “ativos” desaparecem.

Com o intuito de tentar atribuir a interação na região entre δ 4,0 a 5,5 à moléculas de Hidrogênio, o solvente utilizado até então, o DMSO-d₆ foi substituído por DMSO-d₆:D₂O pois o deutério da água pode promover substituições com os hidrogênios das hidroxilas da CD possivelmente presentes nessa região (Figura 61).

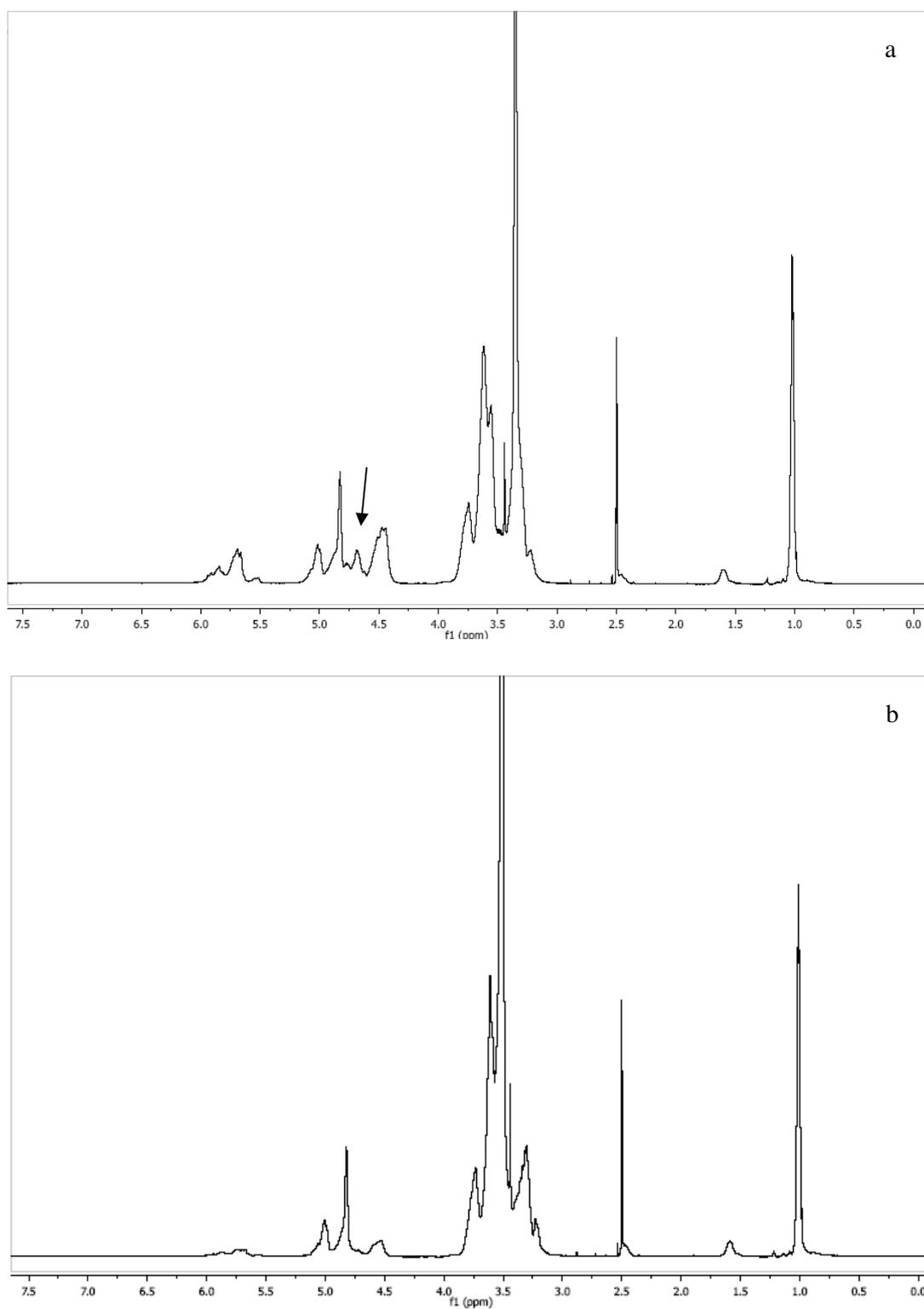


Figura 61: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN ^1H dos complexos HP-BCD:AmB em DMSO- d_6 (a) em DMSO- d_6 : D_2O (b) a 500MHz.

Observa-se em δ 4,75, o desaparecimento do pico que aparecia no espectro em DMSO- d_6 (a). Quando se procede à utilização de D_2O como parte do solvente (b), o mesmo desaparece no espectro. Esse resultado sugere que a molécula da CD promove interações com a AmB nessa região tratando-se de um hidrogênio hidroxílico. Esse resultado pode ser extrapolado para a SB- β CD que apresenta deslocamento químico nessa mesma região. O espectro da ME- β CD também foi avaliado através de análise comparativa com o espectro de seu complexo de inclusão e AmB isolados (Figura 62).

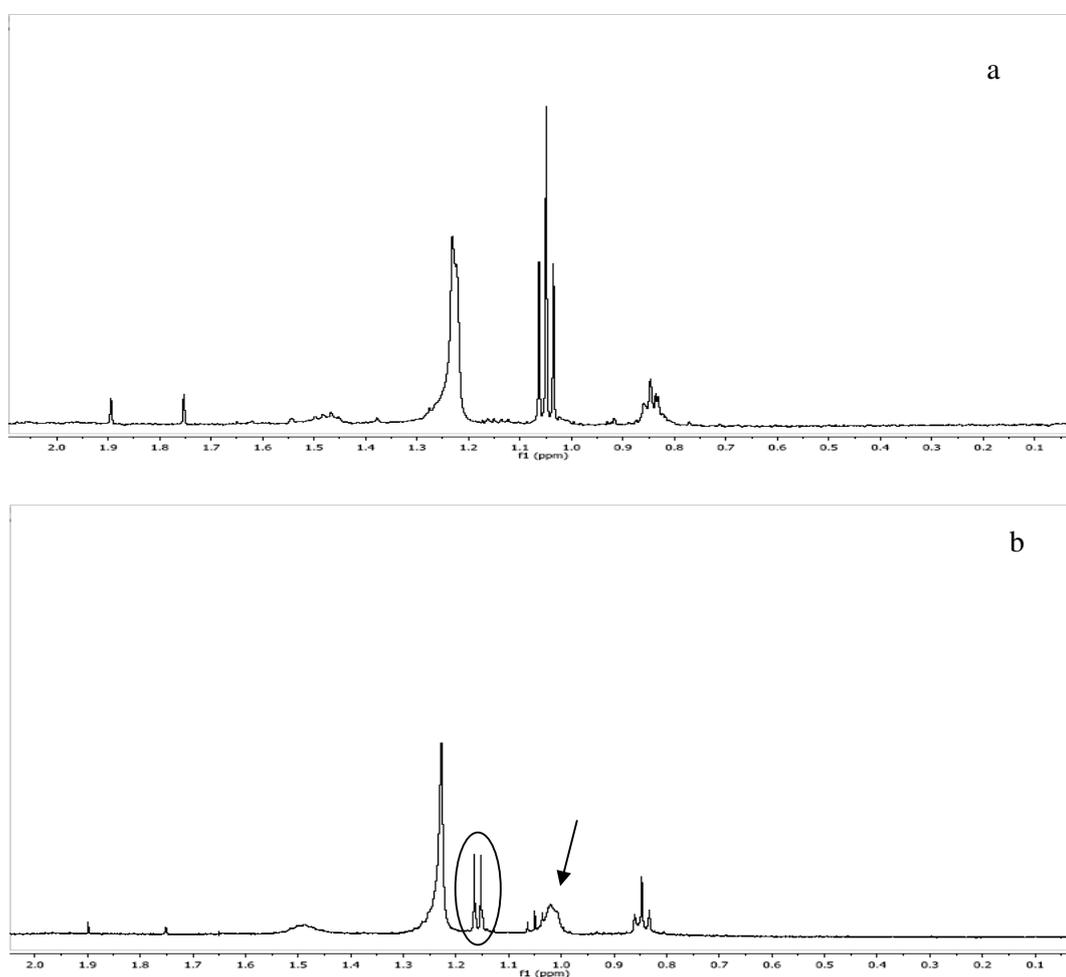


Figura 62: Comparação entre as ampliações dos espectros de RMN 1H da ME- β CD(a) e complexo ME- β CD (b) em DMSO- d_6 a 500MHz.

Modificações importantes foram observadas pela comparação entre os dois espectros. A primeira relaciona-se à presença de um tripleto em δ 1,05 no espectro da ME- β CD, o qual também se observa no espectro do complexo, porém acompanhado de um novo sinal em δ 1,02 provavelmente oriundo dos grupamentos metílicos da AmB, já que J foi calculado nesse sinal apresentando valor de 7 assemelhando-se com J dos grupamentos metílicos do fármaco. Outro dubleto que pode ser atribuído aos grupamentos metílicos do fármaco apareceu entre δ 1,1 e 1,2 e apresenta uma constante de acoplamento de 5, exatamente igual aquele calculado para aos grupamentos metílicos ligadas ao H^+ das metilas ligadas ao C^{37} da AmB. Essas modificações ocorridas e mostradas em todos as amostras dos complexos de inclusão com SB- β CD, HP- β CD e ME- β CD sugerem interações importantes entre as CDs e o fármaco e confirmam os resultados de DSC que também mostram indícios da formação desses complexos.

5.13. AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE AmB DAS MES DESENVOLVIDAS

Uma grande variedade de compostos lipofílicos pode ser solubilizada nas gotículas das MEs, assim a solubilidade de fármacos pode ser aumentada. A difusão de fármacos a partir de gotículas de óleo para os tecidos ocorre através da passagem do mesmo para a fase aquosa que basicamente funciona como uma barreira devido à baixa solubilidade desses compostos em água. Nesse caso MEs são utilizadas para retardar a liberação de fármacos, sendo que a fase oleosa funciona como um reservatório. Como descrito por alguns autores a avaliação da liberação do fármaco a partir de um sistema coloidal não pode ser considerada uma tarefa simples. Existem duas maneiras para avaliar a liberação de fármacos a partir de MEs sendo que a técnica de difusão da membrana é a mais eficaz. Outros métodos apresentam desvantagens uma vez que a ME deve ser colocada normalmente no meio

aquoso e posteriormente diluída. Desta forma, a ME não manterá a sua estrutura original, pois o raio de gotículas de óleo pode mudar e certamente as condições estruturais podem se modificar. A técnica de difusão da membrana evita variações na estrutura da ME sendo esse um dos motivos que tornam a liberação de fármacos adequada (WASHINGTON & EVANS, 1995).

A distribuição do fármaco a partir de MEs acontece entre as três fases (óleo, água, tensoativo). Assim, a diferença inicial de concentração do fármaco entre os meios doador e o receptor induz a difusão do fármaco através da membrana interposta e determina a conseqüente transferência de moléculas do fármaco a partir de micelas do tensoativo e gotas de óleo ao redor de fase aquosa (SIROTTI et al., 2002).

A difusão do fármaco das MEs pode ser explicada pela capacidade do fármaco de modificar o equilíbrio do filme interfacial e determinação de uma ruptura parcial de micelas. Este fato se dá devido a uma redução inicial da concentração de fármaco na fase aquosa da ME, devido ao início da liberação. Como conseqüência, as moléculas de tensoativo originadas estão disponíveis para aumentar a solubilidade do fármaco na fase aquosa da ME.

Alguns fatores que envolvem a liberação de fármacos são:

- ✓ a superfície da membrana;
- ✓ a área interfacial óleo-água;
- ✓ a área interfacial da micela;
- ✓ os volumes da fase oleosa, do tensoativo, da fase aquosa e da fase receptora respectivamente.

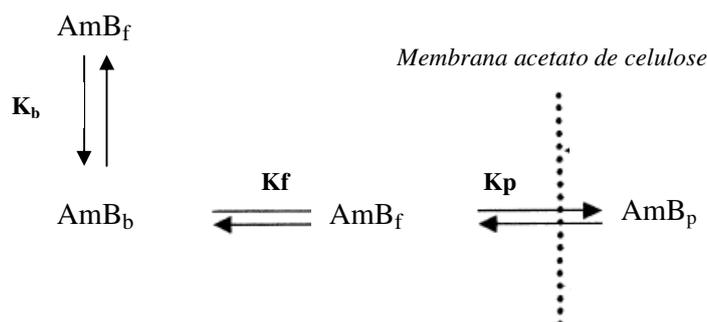
O processo de liberação da AmB a partir do sistema microemulsionado pode ser analisado através de constantes que são essenciais para esse estudo:

K_b - constantes de associação

K_f - constante de liberação

K_p - constante de permeação

e descritos através do esquema representado na (figura 63):



Onde os subscritos f, b e p referem-se às concentrações de AmB na fase aquosa e ligada nas gotículas da fase interna, e AmB permeada no meio receptor respectivamente.

Esquema 2: Esquema do processo de liberação de Fármacos a partir de MEs

(DALMORA et al., 2001).

O coeficiente de permeabilidade de fármacos inseridos em MEs é calculado baseando-se na concentração total do fármaco nas duas fases: a interna e a externa, e propõe os passos limitantes para que ela ocorra. No ensaio de dissolução “*in vitro*” é estabelecido que apenas o fármaco dissolvido na fase externa da ME (aquosa) apresenta habilidade para permear a membrana. Dessa forma as frações do fármaco dissolvidas na fase interna oleosa devem ser transferidas para a fase externa antes de se difundirem no meio receptor, podendo-se sugerir valores de K_f menores que K_b (VANDAMME, 2002). Ainda sabe-se que se o fármaco apresentar característica hidrofóbica muito baixa ele deve ser liberado das gotículas da fase interna mais rapidamente gerando um valor de K_b muito baixo promovendo um gradiente de concentração mais alto no lado interno da membrana em relação ao lado externo. Assim o fármaco permeia através da membrana mais rapidamente.

Pode-se, portanto, estabelecer que a liberação do fármaco dos sistemas esteja ocorrendo em duas etapas. A primeira etapa envolvendo a saída da AmB de estrutura interna das ME 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.

Esse fenômeno, no processo de liberação da forma comercial de AmB, assim como a anfotericina solubilizada apenas em DMSO, pode ser observado pois o fármaco encontra-se totalmente disponível no lado interno da membrana podendo ser liberado mais rapidamente para meio receptor. Realizando uma comparação entre anforicin[®] e AmB-DMSO observou-se um perfil de liberação bem mais rápido para a forma comercial (Figura 64). Como já descrito anteriormente a AmB, nesse medicamento, se encontra na forma de solução micelar, solubilizada por um tensoativo, apresentando dessa forma mais afinidade pelo meio receptor que a AmB-DMSO pelo fato de o DMSO apresentar constante dielétrica mais baixa que da água sendo portanto mais favorável, promovendo um meio de maior afinidade do fármaco.

Os sistemas emulsionados revelam um efeito importante na liberação da AmB tendo ela uma compartimentalização nas gotículas da fase oleosa proporcionando valores de K_b mais elevados não permitindo a rápida difusão da AmB para a fase aquosa. Nessas condições menor concentração de AmB é encontrada do lado interno da membrana criando um menor gradiente nos lados interno e externo da membrana fazendo com que a liberação seja mais prolongada.

Dessa forma avaliando as constantes descritas é válido ressaltar que se K_b for elevado promovendo a retenção do fármaco, então $K_f < K_l$ e a fração livre de AmB não

acumulou na superfície da membrana, sendo assim, a passagem do fármaco livre da ME controla todo o processo de liberação do fármaco. De fato a presença de ME e das CDs principalmente SB- β CD proporcionou liberação prolongada “*in vitro*” em função do tempo, apresentando um aumento acentuado da curva de dissolução. Os fatores envolvidos nesses parâmetros são os constituintes e o processo de formação dos sistemas.

Como já citado anteriormente MEs tem sido descritas na literatura como sistemas reservatórios permitindo liberação lenta de fármacos e proporcionando um efeito prolongado para uma grande variedade de fármacos, porém é também muito conhecido que fármacos complexados com CDs, são seguidos de aumento de possibilidade de liberação lenta das moléculas do fármaco da cavidade das CDs (LOFTSSON & DUCHENE, 2007).

Os resultados do estudo de liberação “*in vitro*” de AmB foram obtidos a partir de seis amostras, sendo uma em MEs contendo tampão fosfato como fase aquosa, a outra sendo a forma comercial, o fármaco em solução e as demais contendo HP- β CD, SB- β CD e ME- β CD.

Para avaliar o perfil de liberação *in vitro* de AmB das MEs, foram retiradas alíquotas do meio receptor no tempo máximo de 12 horas.

A Figura 63 ilustra o perfil de liberação de MEs contendo ou não várias CDs.

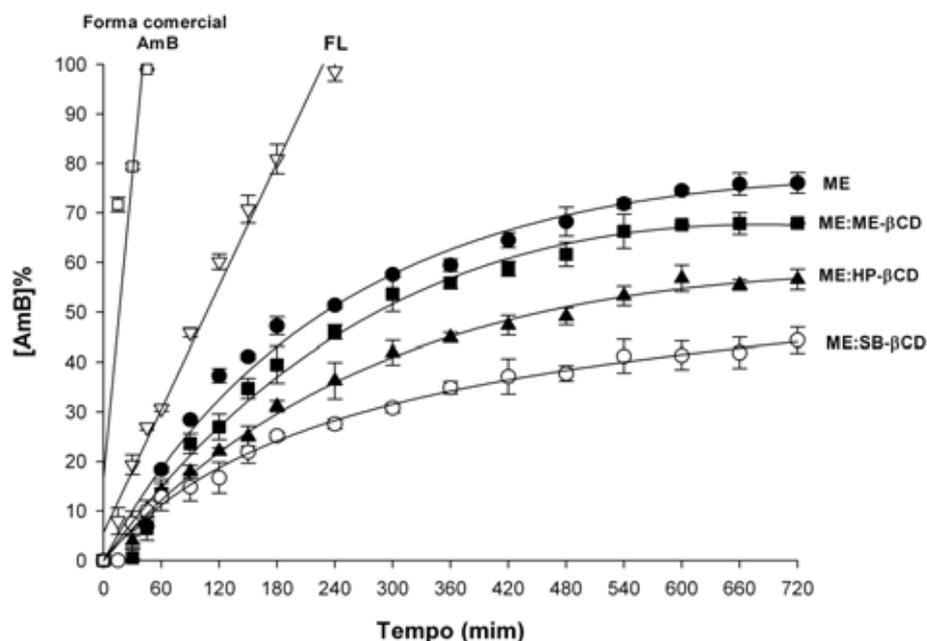


Figura 63: Perfil de liberação de AmB em MEs contendo CDs a partir das médias de três determinações (ponto) e desvio padrão (barra vertical), onde FL = fármaco livre, ME = microemulsão, ME:ME- β CD = microemulsão:metil- β CD, ME:HP- β CD = microemulsão:hidroxipropil- β CD, ME:SB- β CD = microemulsão:sulfobutiléter- β CD.

Todas as formulações testadas apresentaram o mesmo perfil em comparação com o fármaco livre e uma das formas comerciais disponíveis, o qual se encontra na forma de dispersão micelar. Este apresentou um perfil imediato de liberação, quando comparado com as amostras contendo CDs.

A Figura 64 apresenta as curvas de porcentagem de liberação para a molécula de AmB em presença e ausência de CDs em função do tempo (720 minutos) na temperatura 25°C. Pela análise das curvas se observa que a liberação total da AmB (100%) em solução (FL) ocorreu após 240 minutos de estudo, em contraste com os resultados obtidos para a AmB complexada, em que somente menores concentrações destes foram liberados no mesmo intervalo de tempo

Percebe-se claramente que a liberação de AmB do sistema microemulsionado desenvolvido utilizando apenas tampão como fase aquosa e sem a adição de qualquer CD (ME), já difere do perfil de liberação da AmB livre ou da forma comercial. Essa constatação reflete diretamente o efeito da componente hidrofóbica da AmB na incorporação na fase oleosa da ME. Pode-se racionalizar que quanto mais intensa for a interação da AmB com as gotículas de fase oleosa, mais limitada será a liberação.

Em relação à forma comercial é notável uma modificação no tempo de liberação em relação à ME em ausência de CDs, pois a forma comercial é liberada totalmente em torno de 45 minutos e no mesmo período de tempo menos de 10% da concentração de AmB havia sido liberada da ME.

A incorporação de AmB no sistema CD:AmB inserido em MEs apresentou um grande efeito no processo de liberação. A análise dos resultados mostrados na Figura 46 revelou que a adição do complexo CD:AmB afetou a liberação “in vitro” 1,77 vezes em relação à ME em ausência de CDs no caso de ME:SB- β CD. Dessa forma verifica-se uma retenção adicional de 16 vezes em relação à forma comercial. Outro fator importante, já mencionado em sistemas MEs, foi a retenção de AmB na fase interna desses sistemas permitindo uma liberação regular sob um longo intervalo de tempo, quando comparado com a AmB em solução e com a forma comercial.

Realizando uma comparação com os outros sistemas testados, verifica-se em 12h uma concentração liberada da AmB em ME-TP, ME-ME, ME-HP e ME-SB de respectivamente 75, 65, 53 e 42%. Esse resultado mostra a habilidade da ME como sistema de liberação prolongada, e atividade potencial de cada CD num efeito aditivo da retenção do fármaco e de liberar prolongadamente a AmB.

Verifica-se que há uma diferença considerável nos resultados comparando a ME-TP e a ME-ME sendo que a liberação dessas duas amostras se processa com uma média de 10%

de diferença no conteúdo de fármaco. Um aumento no tempo de liberação de aproximadamente 3 vezes já pode ser observado comparando-se ME-ME em relação ao fármaco livre.

Para a análise da ME-HP verifica-se que no tempo em que o experimento foi conduzido, um total de 53% foi liberado, ou seja, aproximadamente a metade do total incorporado no sistema. Enquanto o fármaco livre é liberado (100%) em 4h, a AmB incorporada em ME-HP foi liberada nesse mesmo tempo em apenas 35% de seu conteúdo aumentando o tempo em quase 3 vezes.

Os resultados já se mostram muito mais expressivos quando se compara a liberação das duas amostras supracitadas com a ME-SB. Após 12 horas, aproximadamente 42% de AmB foi liberado nas mesmas condições das amostras anteriores, mostrando nitidamente um maior aprisionamento das moléculas do fármaco na estrutura interna do sistema binário desenvolvido, que compreende além das gotículas da ME, a cavidade das moléculas de CD.

O potencial de prolongamento do tempo de liberação de AmB inserida nas microemulsões contendo HP- β CD, ME- β CD e SB- β CD pode ser justificado pela alta solubilidade aquosa das CDs, podendo relacionar esse parâmetro aos valores de K_s encontrados relacionados ao diagrama de solubilidade das CDs com AmB.

A análise estatística foi realizada, e através dos dados obtidos na Figura 64 onde estão representadas as médias e desvios padrão de liberação percentual de AmB nas MES, sugere perfis semelhantes, mas distinguíveis quanto a porcentagem de AmB liberada.

A liberação não se esgotou aos 720 minutos para as quatro MEs, tendo a análise de variância indicado diferenças significativas entre as porcentagens médias de liberação de AmB ($p < 0,001$). Pelo teste de Tukey estabeleceu-se a seguinte ordenação das MES quanto à média percentual de liberação ($p < 0,001$): SB- β CD < HP- β CD < ME- β CD < ME-TP.

Na verdade, essa diferença significativa entre as quatro MEs foi comprovada a partir de 240 minutos.

Com as observações acima, pode-se inferir que a complexação do fármaco com as ciclodextrinas contribui para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de AmB mais eficientes. O interesse na determinação do efeito das MEs associadas ou não a outros sistemas farmacêuticos na liberação *in vitro* de AmB, visa a determinação e avaliação dos parâmetros da formulação, tais como conteúdo de tensoativo e fase oleosa.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível obter as seguintes conclusões:

- Através da utilização de FS:Tw:OS 1:1:1 como sistema tensoativo foi possível obter MEs O/A;
- O aumento do diâmetro médio das gotículas é diretamente proporcional ao volume de fase oleosa e inversamente proporcional a proporção de tensoativos e aumenta com a incorporação do fármaco ao sistema;
- Os sistemas estudados se comportam como fluidos não Newtonianos do tipo pseudoplástico.
- Observa-se um comportamento tixotrópico para todas as amostras em todas as proporções de tensoativo ou de fase oleosa, apresentando influência na viscosidade dos sistemas;
- A viscosidade dos sistemas aumentou com a fração de volume de fase interna e de tensoativo apresentando comportamento mais acentuado com o aumento da fase oleosa;
- A incorporação do fármaco alterou a viscosidade dos sistemas os quais apresentaram índices de consistência mais elevados em função da presença do fármaco;
- A organização estrutural dos sistemas é mais depende da proporção de CHO do que o tensoativo, sendo mais acentuada pela incorporação do fármaco;
- As Ciclodextrinas apresentaram grande importância no aumento da solubilização da AmB sendo a SB- β CD a mais eficiente seguido por HP- β CD, ME- β CD e β CD sendo esses dados estatisticamente avaliados;
- Foi selecionada a ME contendo 10% de tensoativo, 5% de fase oleosa e 85% de fase aquosa;

- A incorporação de CDs na ME selecionada mostrou aumento no índice de incorporação de AmB frente à ME sem CD.
- As constantes de estabilidade dos complexos formados demonstraram associação mais eficaz entre a AmB e HP- β CD e SB- β CD;
- A microscopia eletrônica de varredura mostrou diferenciação nas amostras sugerindo modificação no estado cristalino do fármaco;
- A Análise térmica revelou claramente modificações nas temperaturas de fusão do fármaco e das CDs quando comparadas ao complexo formado, mostrando ainda uma maior proteção da AmB quando complexadas com CDs;
- As medidas de DRX indicaram a presença de um padrão cristalino para a AmB e amorfo para as CDs, sendo possível visualizar picos do fármaco na mistura física e seu desaparecimento no complexo confirmando amorfização da AmB e sugerindo formação de complexos de inclusão;
- Análise de RMN de H^1 mostrou deslocamentos químicos nos espectros dos complexos de inclusão e a presença de sinais da AmB, principalmente correspondentes aos seus grupos metílicos nos espectros dos complexos, sugerindo eficiência na complexação;
- O perfil de liberação de AmB dos sistemas mostrou que as MEs estudadas comportam-se como sistemas reservatórios “*in vitro*”, retardando a liberação do fármaco, sendo a presença das CDs de fundamental importância nesse parâmetro;
- O ensaio de liberação mostrou que as MEs liberaram em torno de 75% da AmB incorporada em 12h; já ME- β CD, HP- β CD e SB- β CD apresentam potencial na retenção do fármaco respectivamente no mesmo tempo de análise, em relação ao fármaco livre e o anforicín[®]. A análise estatística mostrou relevância nesses resultados com valor de significância de $p < 0,001$ sendo essa evidência muito forte.

-
- As MEs desenvolvidas contendo CD, em especial SB- β CD apresentaram grande potencial como sistemas de liberação de fármacos, fato esse que conduz à continuidade das pesquisas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M.J., LAWRENCE, C.W., WICKS, S.R. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant. **Int. J. Pharm.** v.111, n.1, p. 63-72, 1994.

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

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.

ASTRAY, G.; GONZALES BARREIRO, C; MEJUTO, J.C.; RIAL OTERO, R, SIMAL-GÁNDARA, J.A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids.** v.23, p.1631-1640, 2009.

AZEVEDO, C.H.; CARVALHO, J.P.; VALDUGA, C.J.; MARANHAO, R.C. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. **Gynecol. Oncol.** v.97, p.178-182, 2005.

BADR-ELDIN, S. M; ELKHESHEN S.A., GHORAB, M.M. Inclusion complexes of tadalafil with natural and chemically modified β -cyclodextrins. I: Preparation and in-vitro evaluation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.70, p.819–827, 2008.

BAYOMI, M.A.;ABANUMANY, K.A.; AL-ANGARY, A.A. Effect of inclusion complexation with cyclodextrins on photostability of nifedipine in solid state. **Int. J. Pharm.**, v.243, p.107–117, 2002.

BAYRAK, Y; ISCAN, M. Studies on the phase behavior of the system non-ionic surfactant/alcohol/alkane/H₂O. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp.*, v.269, p. 99-103, 2005.

BEKERSKY, I.; FIELDING, D.B.; LAWRENCE, I. Lipid-based amphotericin B formulations: from animals to man. **Pharm. Sci. Technol. Today.**, v.2, p.230-236, 1999.

BENNETT, J. E. Fármacos antimicrobianos. In: **Hardman J.G; Limbird L.E. As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Interamericaca do Brasil, 2003. cap. 49, p.971-974.

BIRD, R.B., STEWART, W.E., LIGHTFOOT, E.N. *Transport Fenomena*, John Wiley and Sons, New York, 1996.

- BLANCO, J.; VILA JATO, J.L.; OTERO, F.; ANGUIANO, S. Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v.17,n.7, p. 943-957, 1991.
- BOSWELL G. W., BUELL D., BEKERSKY I. AmBisome (Liposomal Amphotericin B): a comparative review. **J. Clin. Pharm.** v. 38, p.583-592, 1998.
- BREWSTER, M.E.; LOFTOSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Del. Rew.** v.59, p.645-666, 2007.
- BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Adv. Drug Del. Rew.** v.39, p.379-402, 2007.
- CANTO, G.S., DALMORA, S.L., OLIVEIRA, A.G. Piroxicam encapsulated in liposomes: characterization and in vivo evaluation of topical anti-inflammatory effect. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.25, p.1235-1239, 1999
- CARRIER, R.L; AHMED, I.; MILLER, L.A.. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **J. Control Rel.**, v.123, p.78-99, 2007.
- CARVALHO, F.C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina.** 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- CHAKRABORTY, K.K.; NAIK, S.R. Therapeutic and hemolytic evaluation of *in-situ* liposomal preparation containing amphotericin b complexed with different chemically modified β -cyclodextrins. **J. Pharm. Sci.**, v.6, n.2, p.231-237, 2003.
- CHAROENCHAITRAKOOL M., DEHGHANI F., FOSTER N. R. Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.**, v.239, p. 103-112, 2002.
- COHEN, B.E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **Int. J. Pharm.**, v.162, p.95-106, 1998.
- CHOI, K.; BANG, J.; KIM, P.; SONG, C. Amphotericin B incorporated polymeric micelles composed of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/dextran graft copolymer. **Int. J. Pharm.**, v.355, p.224-230, 2008
- CONNORS, K. E. Measurement of Cyclodextrin Complex Stability Constants. In: JERRY, L. ATWOOD et al. **Comprehensive Supramolecular Chemistry** (Part II), 1996, v.3, 205-241.
- CORDONNIER, C.; MOHTY, M.; FAUCHER, C.; PAUTAS, C.; ROBIN, M.; VEY, N.; MONCHECOURT, F.; MAHI, L.; RIBAUD, P. Safety of a weekly high dose of liposomal amphotericin B for prophylaxis of invasive fungal infection in immunocompromised patients: PROPHYSOME Study. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.31, p.135-141, 2008.

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

CORRÊA, N.M.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.41, 2005.

CRUZ, D'J.O.; UCKUN, M.F., Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraceptive**, Stoneham, v.64, p.113-123, 2001.

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

DALMORA, M.E.; 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.

DIAS, M.L.N.; CARVALHO, J.P.; RODRIGUES, D.G.; MARANHÃO, R.C. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. **Cancer. Chemother. Pharmacol.**, v.59, p.105-111, 2007.

DISMUKES, W.E. Guidelines from the infections diseases society of América. **Clin. Infect. dis.**, v.30, p.653-657, 2000.

DJEDAINI, F.; PERLY, B. Nuclear Magnetic Resonance of Cyclodextrins, derivatives and Inclusion Compounds. In: **New Trends in cyclodextrins and derivatives.**, Paris: Ed. Santé, p.215-246, 1991.

DUCHENE, D.; BOCHOT, A.; CHEN YU S.; PÉPIN C.;SEILLER, M. Cyclodextrins and emulsions. **Int. J. Pharm.**, v.266, p.85-90, 2003.

ENOCH, D.A; LUDLAN, H.A.; BROWN, N.M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p.809-818, 2006.

ESPADA, R.; VALDESPINA, C.A.; RIVAS, G.; BALLESTEROS, M.P.; TORRADO, J.J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. **Int. J. Pharm.**, v.361, p.64-69, 2008.

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

FAVARO-TRINDADE, C.S.; SANTANA A.S.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.;TRINDADE, M.A.; NETO, F.M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids.**, v.24, p.336-340, 2010.

FERREIRA, D.A.; FERREIRA, A.G.; VIZZOTTO, L.; FELDMAN NETO, A. OLIVEIRA, A.G. Analysis of the molecular association of rifampicin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.40, p.43-51, 2004.

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

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

FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V.H.S.; SILVA JÚNIOR, A. A. ; SCARPA, M. V. ; SANTILLI, C. V.; OLIVEIRA, A. G. . Doxorubicin biocompatible microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids Surf. B, Biointerfaces.**, v.51, p.54-61, 2006.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L.A, SARMENTO, V.H.V.; SANTILLI, C.V. TABOSA DO EGITO , E.S.; OLIVEIRA, A.G. Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids Surf. B, Biointerfaces.** v.60, p. 28–35, 2008.

FORMARIZ, T.F. **Incorporação de doxorubicina 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.

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

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

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.**, Amsterdam, v.212, p.73-80, 2001.

GABRIELSKA, J.; GAGOS, M.; GUBERNATOR, J., GRUSZECKI, W.I. Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: A ¹H NMR study. **FEBS Letters.**, v. 580, p.2677–2685, 2006.

GAGÓS, M.; GRUSZECKI, W.I. Organization of polyene antibiotic amphotericin B at the argon–water interface. **Biophys. Chem.** v. 137, p.110-115, 2008.

- GRASSI, M.; GRASSI G.; LAPASIN R.; COLOMBO I. Drug Release from Microemulsions. In: **Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms: A Physical and Mathematical Approach**. New York: Taylor & Francis Group, LLC., 2006. cap.8.
- HANN, I.M., PRENTICE, H.G. Lipid-based amphotericin B: a review of the last years of use. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.17, p.161-169, 2001.
- HARTSEL, S.C.; BAAS, B.; BAUER E.; FOREE, L.T.; KINDT JR, K.; PREIS, H.; SCOTT, A.; KWONG, E.H.; RAMASWAMY, M.; WASAN, K.M. Heat induced superaggregation of amphotericin B modifies its interaction with serum proteins and lipoproteins and stimulation of TNF. **J. Pharm. Sci.**, v.90, p.124-33, 2001.
- HEREĆ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K.; MORZYCKI, J. W.; GRUSZECKI, W.I. An effect of antibiotic amphotericin B on ion transport across model lipid membranes and tonoplast membranes. **Biochem. Pharm.**, v.70, p.668-675, 2005.
- HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instr.**, v.4, p.117-212, 1965.
- 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.
- HOOSHMAND-RAD, R.; CHU, A.; GOTZ, V.; MORRIS, J.; BATTY, S.; FREIFELD, A. Use of amphotericin B lipid complex in elderly patients. **J. Infect.**, v.50, p.277-287, 2005.
- INSELMANN, G.; INSELMANN, U.; HEIDEMANN, H. T. Amphotericin B and liver function. **Eur. J. Int. Med.** v.13, p.288-292, 2002.
- JULLIAN, A.C.; MOYANO, L.B.; YANEZ, C.A, OLEA-AZAR, C.B. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. **Spectrochim. Acta. Part A, Mol. Biomol Spectrosc.**, v.67, n.1, p.230-234, 2007.
- KAWACHI, E. Y.; **Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio em Ambientes confinados no sistema Renex-100 / cicloexano / brine**. Campinas. Instituto de química, 115f. Tese de Doutorado, Departamento de físico-química – UNICAMP, 2002.
- LACHMAN, L; LIBERMAN, H.; KANIG, L.J. **Teoria e Prática na indústria farmacêutica**. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2001, p.1143.
- LAMAALLAM, S.; BATALLER, H.; DICHARRY, C.; LACHAISE, J. Formation and stability of miniemulsions produced by dispersion of water/oil/surfactants concentrates in a large amount of water. **Colloids Surf A: Physicochem. Eng. Aspects.**, v.270–27 2005.
- LANIADO-LABORIN, R., VARGAS, M.N.C. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.26, n.4, p.223-27, 2009.
- LARABI, M.; GULIK, A.; DEDIEU, J.P.; LEGRAND, P.; BARRATT, G.; CHERON, M. New lipid formulation of amphotericin B: spectral and microscopic analysis. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**. v. 1664, p. 172-181, 2004.

- LASIC, D.D., PAPAHAJOPOULOS, D. **Medical applications of liposomes**. Ed. Elsevier. Amsterdam, p.182, 1998.
- LAWRENCE, M.J.; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.45, p.89-121, 2000.
- LEE, C. H., MOTURI, V., LEE, Y. **Thixotropic property in pharmaceutical formulations**. *Journal of Controlled Release*, v. 136, 88-98, 2009.
- LEGRAND, F.X.; SAUTHIER, M.; FLAHAUT, C.; HACHANI, J.; ELFAKIR, C.; FOURMENTIN, S.; TILLOY, S.; MONFLIER, E. Aqueous Hydroformylation Reaction Mediated by Randomly Methylated β -Cyclodextrin: How Substitution Degree Influences Catalytic Activity and Selectivity. **J. Mol. Catal. A. Chem.**, v.303, n.1-2, p. 72-77, 2008.
- LOFTOSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications: Historical Perspectives. **Int. J. Pharm.** v. 329, p.1-11, 2007.
- LONGXIAO, L.; SUYAN Z. Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with cyclodextrin and hydroxypropyl-cyclodextrin. **J. Pharm. Biomol. Anal.**, v.40, p.122-127, 2006.
- LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J.M. Antifúngicos de uso sistêmico. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v.21, p.366-80, 2003.
- LUMBRERAS, C., LERMA F.A., CARRERAS, E., CISNEROS, J.M., GARNACHO, J., MARTÍN-MAZUELOS, E., PAMAN, J., QUINDOS, G., RUBIO, C., TORRE-CISNEROS, J., JUAN LUIS RODRÍGUEZ TUDELA, J.L.R. Update on invasive fungal infections: the last two years. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v 25, n.1, p. 19-27, 2007.
- MACKAY, R.A. (1982) Reactions in microemulsions. The ion-exchange model. **J.Phys.Chem.** v.86, p.4756-4758, 1982.
- MAESTRELLI, F.; FUENTES, M.G.; MURA, P.; ALONSO, M.J. A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. **Eur. J. Pharm Biopharm.**, v.63, p.79-86, 2006.
- MASALOVA, I.; TAYLOR, M.; KHARATIYAN, E.; MALKIN, A.Y. Rheopexy in highly concentrated emulsions. **J. Rheol.**, v.49, n. 4, p.839-849, 2005.
- MANOSROI, J.; APRIYANI, M.G.; FOE, K.; MANOSROI, K. Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, **Int. J. Pharm.**, v.293, 235-240, 2005.
- MERTINS, O.; SEBBEN, M.; SCHENEIDER, P.H.; POHLMANN, A.R.; SILVEIRA, N.P. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina de soja através de RMN de ^1H e de ^{31}P . **Quim. Nova.**, v.31, n.7, p.1856-1859, 2008.
- MINÑONES, J.JR; CONDE, O.; DYNAROWICZ,-LATKA, P.; CASAS, M. Penetration of amphotericin B into DOPC monolayers containing sterols of cellular membranes. **Colloids Surf. A Physicochem Eng Asp.**, v.270-271, p.129-137, 2005.

- 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.
- MUNÓZ, P.; GUINEA, J.; NARBONA, M.T.; BOUZA, E. Treatment of invasive fungal infections in immunocompromised and transplant patients: AmBiload trial and other new data. **Int. J. Antimicrobiol. Agents.**, Suppl. 32, v.2, 9, S125-S131, 2008.
- MUJUMDAR, A.; BERIS, A. N.; METZNET, A.B. Transient phenomena in thixotropic systems. **J. Non-Newtonian Fluid Mech.**, v.102, p.157-178, 2002.
- MURA, P.; FURLANETTO, S.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, G.; CORTI, G.; PINZAUTI, S. Interaction of naproxen with ionic cyclodextrins in aqueous Solutions and in the solid state. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.37, p.987-994, 2005.
- MURAKAMI, F.S.; LANGA, K.L.; MENDESA, C.; CRUZ, A.P.; CARVALHO FILHO., SILVA, M.A.S. Physico-chemical solid-state characterization of omeprazole sodium: Thermal, spectroscopic and crystallinity studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.49. p.72-80, 2009.
- NIRAULA, B.B.; CHUM, T.K.; OTHMAN,H.; MISRAN, M. Dinamic-interfacial properties of dodecyl- β -D maltoside and dodecyl- β -D fructofuranosyl- α -D glucopyranosyde at dodecane/water interface. **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.**, v.248. p.157-166, 2004.
- NOOMEN, A.; HBAIED, S.; LOPEZ-PARROT, H.; KALFAT, R.; FESSI, H.; AMDOUNI, N.; CHEVALIER, Y. Emulsions of β -cyclodextrins grafted to silicone for the transport of antifungal drugs., **Mater. Sci. Eng. A. Struct. Mater.**, v.28, p.705-715, 2008.
- OLIVEIRA, A. G. ; CHIAVACCI, Leila A ; SCARPA, M. V. ; EGITO, E. S.T. . Microemulsions: physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications. In: Songjun Li (Ed). (Org.). Current foccus on **Colloids and Surfaces**. ed. Kerala: Transword Research Network, 2009, v. 0, p. 57-84.
- OLIVEIRA, A. G. ; CARDILLO, J. A. ; SCARPA, Maria Virgínia ; WANCZINSKI, Bruna Juliana ; SILVA-JÚNIOR, A. A. . Estudos sobre a liberação controlada e vetorização de drogas através de lipossomas. **RBM. Rev. Bras. Med.**, v. 62, n. 6, p. 238-244, 2005.
- OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V., CORREA, M.A, CERA, L.F.R., FORMARIZ, T.P microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**. v.27, p.131-138, 2004
- OSTERMANN, H.; BRYAN, J. New therapeutic approaches to managing invasive fungal Infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v.30, p.377-380, 2007.
- PESTANA, K.C.; FORMARIZ, T.P.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids Surf. B Biointerfaces.**, v.66(2), p.253-259, 2008.

PRETE, A.C.L.; MARIA, D.A.; RODRIGUES, D.G.; VALDUGA, C.J.; IBANEZ, O.C.; MARANHAO, R.C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. **J. Pharm. Pharmacol.** v.58, p.801-808, 2006.

RAMAN, I.A., SUHAIMI, H., TIDDV, G.J.T. Liquid crystals and microemulsions formed by mixtures of a non-ionic surfactant with palm oil and its derivatives. **Adv. Colloid. Interface. Sci.**, v.106, p.109-127, 2003.

RAMOS C. P.; ALVAREZ, E.; AL-SOUFI, W.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ N. E.; VÁZQUEZ TATO, J. Complexation of bile salts by natural cyclodextrins. **Supramol. Chem.**, v.15, p.33, 2003.

RAMOS C. P.; ALVAREZ, E.; AL-SOUFI, W.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ N. E.; VÁZQUEZ TATO, J. Complexation of Sodium Cholate and Sodium Deoxycholate by β -Cyclodextrin and Derivatives. **Langmuir**, v.15, p.5489-5495, 1999.

REX, J. H. O desafio das infecções Fúngicas no século XXI. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/fungos21.html>. Acesso em: 09/12/2009.

RIBEIRO, S.S.L.; FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and sulfobutyl ether derivate in solution and solid state. **J. Pharm. Sci.**, p.253-266, 2003.

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

ROGERIO, A.P.; DORAB, C.L.; ANDRADE, E.L.; CHAVESA, L.F.C.S.; SENNA, E.L.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. **Pharm. Res.**, v.61, n.4, p.288-297, 2010.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.37, n.1, p.1-17, jan./abr., 2001.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**. Fundamentos Teóricos e Práticos. São Paulo: Artiber, 2006.

SCOOT, H. Theology. In: REMINGTON, J.P., ed. **The science and practice of pharmacy**. 20 ed. Philadelphia: Editora Lippincott, 2000. cap.23, p.335-335.

SHAO, P.; HUANG, L.; HSUEH, P. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.30, p.487-495, 2007.

SIDDIG, M. A.; RADIMANC, S.; JAN L. S.; MUNIANDY, S. V. Rheological behaviors of the hexagonal and lamellar phases of glucagon (APG) surfactant. **Colloid. Surf. A: Physicochemical Eng Asp.**, v.276, p.15-21, 2006.

SILVA, C.R.S.H. **Estudo de sistemas microemulsionados para aplicação na extração e formulações de própolis**. Natal, 2001. 106p. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2001.

- SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnol. Adv.**, v.20, p.341-359, 2002.
- SIROTTI, C.; COCEAMI, N.; COLOMBO, I.; LAPASIN, R.; GRASSI, M. Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case. **J. Membrane Sci.**, v.204, p.401-412, 2002.
- SPAMER, E.; MÜLLER, D.G.; WESSELS, P.L.W.; VENTER, J.P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.16, n.4-5, p.247-253, 2002.
- STIDDER, B.; FRAGNETO, G.; ROSER, S.J. Effect of low amounts of cholesterol on the swelling behavior of floating bilayers. **Langmuir.**, v.21, p.9187-9193, 2005.
- THOMPSON, D.O. **Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery Systems: A Case Study of the Development of a New Excipient-Sulfobutylether β -Cyclodextrin (CAPTISOL)**, INFORMA healthcare, London-New York, 2006.
- TIPHINE, M.; HERBRECHT R.; LETSCHER-BRU V. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transpl. Infect. Dis.**, v.1, p.273-283, 1999.
- TOKUMOTO, M. S. **Evolução estrutural durante a transição sol-gel em suspensões coloidais aquosas de SnO₂: abordagem reológica**. 1996, 95f. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.
- TROTTA, M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. **J. Control. Rel.**, 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.
- VANDAMME, F. Microemulsion as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Curr. Eye Res.**, v.21, p.15-34, 2002.
- VENEGAS, B.; DAMIÁN, J.G.; CELIS, H.; BLAKE, I.O.A Amphotericin B channels in the bacterial membrane: Role of sterol and temperature. **Biophys. J.**, v.85, p.2323-2332, 2003.
- VANDERMEULEN, G.; ROUXHET, L.; ARIEN, A.; BREWTER, M.E.; PRÉAT, V. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly (ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. **Int. J. Pharm.**, v.309, p.234-240, 2006.
- VIJAN, L.E.; TOPOLA, C. The characterizing of the interaction of amphotericin B with cholesteryl esters. **J. Mol. Liq.**, v.147, p.135-138, 2009.
- WASHINGTON, C.; EVANS, K. Release rate measurements of model hydrophobic solutes from submicron triglyceride emulsions. **J. Contr. Rel.**, v. 33, p. 383-390, 1995.

WENZ, G. Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.33, p.803, 1994.

WILLIAMS, R.O.; MAHAGUNA, V.; SRIWONGJANYA, M. Characterization of a inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.46, p. 355-360, 1998.

YUAN, C.; JIN, ZHENGYU, J.; LI, XUEHONG. Evaluation of complex forming ability of hydroxypropyl- β -cyclodextrins. **Food Chem.**, v.106, p.50-55, 2008.