

TALITA CRISTINA MOREIRA MORAES CARRARO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA
DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ANFOTERICINA B**

GUARAPUAVA

2013

Talita Cristina Moreira Moraes Carraro

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA
DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ANFOTERICINA B**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, UNICENTRO-PR.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rubiana Mara Mainardes.

Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil.

GUARAPUAVA

2013

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Guarapuava

T146d Carraro, Talita Cristina Moreira Moraes
Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas poliméricas contendo Anfotericina B / Talita Cristina Moreira Moraes Carraro – – Guarapuava, 2013
ix, 73 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, 2013

Orientadora: Rubiana Mara Mainardes

Co-orientador: Najeh Maissar Khalil

Banca examinadora: Marcia Edilaine Lopes, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Bibliografia

1. Farmácia. 2. Ciências Farmacêuticas. 3. Anfotericina B. 4. Nanopartículas. 5. PLGA-PEG. 6. Atividade antifúngica. 7. Citotoxicidade. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

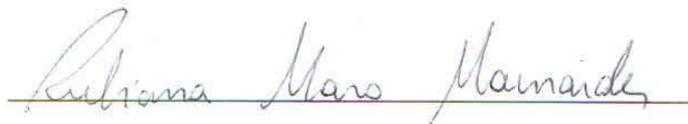
CDD 615

TERMO DE APROVAÇÃO

TALITA CRISTINA MOREIRA MORAES CARRARO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ANFOTERICINA B

Dissertação aprovada em 24/05/2013 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



Profª. Dra. Rubiana Mara Mainardes - Orientadora - UNICENTRO

Presidente



Profª. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro - UEM

Membro



Profª. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski - UEM

Membro

GUARAPUAVA-PR

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha Tainá, por ter me proporcionado viver o amor incondicional e por me esperar sempre com um sorriso no rosto.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças em todos os momentos e por ter traçado um plano maravilhoso para minha vida.

Aos meus pais, por me ensinarem os verdadeiros valores e que mesmo estando longe, andam sempre em meus pensamentos.

Aos meus avós pelas orações, em especial a Vó Maria que sempre acreditou em mim, e torceu por todas as escolhas que já fiz na vida.

Ao meu esposo Jefferson, por ser o primeiro incentivador desta caminhada e por achar que "tudo dá certo no final", sem o seu apoio e paciência eu não teria concluído este projeto. Também sou grata por, durante meus momentos de ausência, cuidar tão bem do que temos de mais valioso.

À todos meus familiares e amigos pessoais, pela paciência quando eu não estava muito "disponível", e pelos pensamentos positivos.

À minha orientadora, Professora Dr^a. Rubiana Mara Mainardes, por acreditar em mim mesmo antes do processo de seleção do mestrado, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e poder compartilhar do seu conhecimento. Meu respeito e admiração pela sua competência, dedicação e paixão pela ciência.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Najeh Maissar Khalil, por toda a contribuição para realização deste projeto, e principalmente por acreditar lá no início que eu "me daria melhor na Nanotecnologia..."

Aos colegas de mestrado, principalmente à Ana Cristina e ao Daniel, por toda colaboração e pelas inúmeras horas de feriados e fins de semana passados no laboratório, sem vocês fazer ciência não seria tão divertido!

Aos demais colegas do Laboratório de Nanotecnologia: Viviane, Carol, Débora, Thaysa, Lori, Ivan, Juliana, Aline, Leizi, Dani, Aline Z., cada um de vocês me ensinou algo e contribuiu enormemente para este trabalho.

Gabi e Clescila,, pelas discussões científicas e não científicas e por toda a ajuda, obrigada e contem sempre comigo para o que precisarem..

Em especial a Lu Dalmolin e a Di, por serem as primeiras a me receberem no Nano e pacientemente me ensinarem tudo o que puderam, à vocês minha admiração e gratidão!

Um agradecimento especial também à Lu Camargo por ser esta pessoa prestativa, competente e pela ajuda em todos os momentos em que precisei.

Quero agradecer também, à todos aqueles que passaram ou que chegaram ao Laboratório de Nanotecnologia, contribuindo para que este grupo de trabalho esteja cada vez mais forte.

Às alunas do Laboratório do Professor Policiano, Nayane e Adriana, obrigada pela ajuda no preparo das amostras para o infravermelho.

Ao Prof. Fauze pelo auxílio com as amostras para a análise de difração de raios X.

À Cris do Biotério Central da UNICENTRO, pela atenção com meus ratos e ao Prof. Ivo pela disponibilidade de espaço e instruções.

À Cassieli, Jhenefer e Raissa, e todas aquelas que me auxiliaram no ensaio in vivo.

À Secretaria de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por toda organização burocrática e ao corpo docente desta pós-graduação que muito contribuíram para meu crescimento profissional.

Aos Professores Paulo Vitor Farago e Paulo Renato de Oliveira, pelas valiosas contribuições na banca de qualificação.

À todo o pessoal da Equipe Pedagógica do Núcleo Regional de Educação de Guarapuava, pelo apoio, pelos conselhos e por me substituírem nas tarefas quando precisei me ausentar.

Enfim, obrigada à todos aqueles que direta ou indiretamente, por atos ou pensamentos, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação."

John Dewey

RESUMO

A anfotericina B (AFB) é um fármaco de largo espectro antifúngico e amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. No entanto, a administração através das formulações convencionais disponíveis apresentam efeitos adversos principalmente associados à citotoxicidade, que limitam seu uso e eficácia terapêutica. No presente estudo, desenvolveu-se nanopartículas poliméricas (NP's) contendo AFB, com o objetivo de redução de toxicidade frente às células humanas e manutenção da eficácia terapêutica do fármaco. As nanopartículas foram obtidas com êxito pelo método de emulsificação/ evaporação do solvente, empregando o copolímero ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), e blendas de PLGA e polietilenoglicol (PEG). Um delineamento fatorial foi conduzido e por meio dele foi possível estabelecer a composição ótima que obteve partículas com diâmetros reduzidos (< 200 nm) e elevados índices de eficiência de encapsulação do fármaco (> 89%). Para quantificação de AFB em solução, um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido e validado de acordo com as normatizações vigentes. A caracterização físico-química incluiu a análise por difração de raios X, que demonstrou padrão amorfo nas NP's indicando a formação de um complexo de inclusão onde o fármaco está molecularmente disperso. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* e eficácia antifúngica indicam que, apesar da presença de oligômeros moleculares de AFB nas formulações, as nanopartículas apresentaram menor toxicidade sobre células em relação ao padrão comercial e ao fármaco livre, e, mantiveram a atividade antifúngica do fármaco conforme ensaio realizado frente à cepas de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Através do experimento *in vivo*, foi possível verificar que a administração das NP's de PLGA e PLGA-PEG contendo AFB, via oral e intraperitoneal, não proporcionou alteração significativa no perfil hematológico, nos níveis plasmáticos de creatinina, uréia, ALT e AST. Comparando-se ao padrão comercial do fármaco, a análise histopatológica indicou que as NP's protegeram o tecido hepático dos danos provocados pela AFB. Dessa maneira, conclui-se que as NP's contendo AFB desenvolvidas no presente estudo apresentam adequadas características físico-químicas, o que as tornam potenciais sistemas de liberação controlada do fármaco, mantendo a atividade antifúngica e minimizando sua citotoxicidade em relação ao padrão comercial.

Palavras-chave: Anfotericina B. Nanopartículas. PLGA-PEG. Atividade antifúngica. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Amphotericin B (AFB) is a broad spectrum antifungal drug and widely used in the treatment of systemic fungal infections. However, through the administration of conventional formulations have adverse effects mainly associated cytotoxicity which limit its use and therapeutic efficacy. In this study, polymeric nanoparticles (NP's) containing AFB were developed, with the goal of reducing toxicity to human cells and maintenance the therapeutic effectiveness of the drug. The nanoparticles were successfully obtained by the emulsification/solvent evaporation method, employing the copolymer poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), and blends of PLGA and polyethylene glycol (PEG). A factorial design was conducted and through it was possible to establish the optimal composition which obtained particles with reduced diameters (< 200 nm) and high rates of drug encapsulation efficiency (> 89%). For quantification of AFB in solution, an analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated according to present norms. The physic-chemical characterization included analysis by X-ray diffraction, which showed amorphous pattern in the indicating the NP's of an inclusion complex in which the drug is molecularly dispersed. The results of the antifungal efficacy and cytotoxicity *in vitro* indicate that, despite the presence of molecular oligomers of AFB in the formulations, nanoparticles showed lower toxicity on cells compared to commercial standard and the free drug and maintained the antifungal activity forward a strains of *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans*. Through the *in vivo* experiment, the administration of PLGA and PLGA-PEG NP's containing AFB, orally and intraperitoneally, provided no significant change in blood profile, plasma levels of creatinine, urea, AST and ALT. Comparing commercial standard of the drug, the histopathological tests indicated that the NP's protected the liver tissue damage caused by AFB. Thus, it is concluded that NP's containing AFB developed in this study have suitable physicochemical characteristics, which make them a potential drug delivery systems of the drug, maintaining the antifungal efficacy and minimizing cytotoxicity against the commercial standard.

Keywords: Amphotericin B. Nanoparticles. PLGA-PEG. Antifungal activity. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica de nanocápsulas e nanoesferas.....	21
Figura 2 - Representação da obtenção do PLGA.....	25
Figura 3 - Representação das técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas.....	26
Figura 4 - Fórmula estrutural da anfotericina B.....	29
Figura 5 - Cromatograma da solução padrão de AFB à 25 µg/mL.....	51
Figura 6 - Curva analítica da AFB em metanol.....	52
Figura 7 - Cromatograma da solução padrão de AFB à 25 µg/mL tratada com NaOH 0,5M, por 1h	54
Figura 8 - Cromatograma da amostra de PVA 1% (v/v).....	55
Figura 9 - Espectros de absorção representando o estado de agregação molecular da AFB livre dissolvida em DMSO: metanol (50:50, v/v); AFB livre dissolvida em DMSO: tampão fosfato (pH 7,4, 0,01 M); NP-AFB-PLGA e, NP-AFB-PLGA-PEG.....	75
Figura 10 - Espectros DRX: (A) PEG e (B) PLGA.....	77
Figura 11 - Espectros DRX: (A) AFB livre; (B) NP-AFB-PLGA; e (C) NP-AFB-PLGA-PEG.....	78
Figura 12 - Espectro no IV das amostras: AFB (A); PLGA (B); PEG (C); Mistura física AFB-PLGA-PEG (D).....	79
Figura 13 - Espectro no IV das amostras: Nanopartículas de PLGA contendo AFB (A); e Nanopartículas de PLGA-PEG contendo AFB (B).....	81
Figura 14 - UFC de <i>C. albicans</i> ATCC 64548, após 24h de incubação, a 37° C, com as amostras nas seguintes concentrações: AFB Deoxi: 0,025 µg/mL; NP-AFB-PLGA-PEG: 0,05 µg/mL; NP-PLGA: 0,5 µg/mL; NP-PLGA-PEG: 0,05.....	84
Figura 15 - UFC de <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112, após 24h de incubação, a 37° C, com agentes antifúngicos na concentração de 0,05 µg/mL.....	86
Figura 16 - A : Percentagem de hemólise produzida pelas nanopartículas poliméricas contendo AFB (25 µg/mL) em função do tempo. B : Percentagem de hemólise produzida pelas nanopartículas poliméricas contendo AFB (50 µg/mL) em função do tempo – comparada a AFB livre.....	88
Figura 17 - A : Percentagem de hemólise produzida pelas nanopartículas	

poliméricas contendo AFB (25 µg/mL) em função do tempo. B: Percentagem de hemólise produzida pelas nanopartículas poliméricas contendo AFB (50 µg/mL) em função do tempo – AFB deoxicolato.....	89
Figura 18 - Fotomicrografias de rins de ratos <i>Wistar</i> machos.....	95
Figura 19 – Fotomicrografias do fígado de ratos <i>Wistar</i> machos	97
Figura 20 – Fotomicrografias do fígado de rato <i>Wistar</i> macho pertencente ao grupo experimental tratado com AFB-DEOXI via oral	99
Figura 21 – Fotomicrografias do fígado de rato <i>Wistar</i> macho pertencente ao grupo experimental tratado com AFB-DEOXI via i.p	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis independentes e dependentes do estudo fatorial $2^2 \times 3^1$ para a otimização de nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B.....	40
Tabela 2 - Combinação dos fatores nas formulações no delineamento fatorial $2^2 \times 3^1$, utilizado no desenvolvimento de protocolos de obtenção de nanopartículas poliméricas contendo AFB.....	41
Tabela 3 - Metodologia e finalidade empregada nos exames bioquímicos.....	48
Tabela 4 - Resultados do teste de especificidade para soluções-padrão de AFB sob condições de estresse.....	53
Tabela 5 - Resultados do teste de precisão para soluções-padrão de AFB	56
Tabela 6 - Resultados do teste de exatidão para soluções-padrão de AFB	57
Tabela 7 - Resultados do teste de robustez para soluções-padrão de AFB	57
Tabela 8 - Composição das formulações constituídas apenas de PLGA como polímero conforme o desenho fatorial $2^2 \times 3^1$ e dados obtidos para o tamanho médio das partículas contendo AFB.....	59
Tabela 9 - ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade, comparando o tamanho médio das partículas de PLGA contendo AFB.....	60
Tabela 10 - ANOVA com desdobramento da interação solventes x polímero, fixando-se a variável polímero na análise do parâmetro diâmetro médio das partículas de PLGA contendo AFB.....	61
Tabela 11 - ANOVA com desdobramento da interação solventes x PLGA, baseando-se no tamanho médio das partículas contendo AFB.....	62
Tabela 12 - Valores correspondentes às diferenças entre as médias de diâmetro e estabelecimento da d.m.s. entre as formulações F4, F5 e F6.....	63
Tabela 13 - Composição das formulações constituídas apenas de PLGA como polímero resultante do desenho fatorial $2^2 \times 3^1$ e dados obtidos para eficiência de encapsulação de AFB nas nanopartículas.....	64
Tabela 14 - ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade, comparando a média da eficiência de encapsulação da AFB nas nanopartículas de PLGA.....	65
Tabela 15 - Valores correspondentes às diferenças entre as médias de eficiência de encapsulação e estabelecimento da d.m.s. entre as formulações de nanopartículas de AFB que empregaram PLGA.....	66

Tabela 16 - Composição das formulações constituídas pela blenda de PLGA – PEG e dados obtidos para o tamanho médio das partículas contendo AFB.....	67
Tabela 17 - ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade, comparando o tamanho médio das partículas de PLGA – PEG contendo AFB.....	68
Tabela 18 - Valores correspondentes às diferenças entre as médias de diâmetro e estabelecimento da d.m.s. entre as formulações F7 até F12.....	69
Tabela 19 - Composição das formulações constituídas de PLGA-PEG resultantes do desenho fatorial $2^2 \times 3^1$, dados obtidos para eficiência de encapsulação de AFB nas nanopartículas.....	70
Tabela 20 - ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade, comparando a eficiência de encapsulação de AFB nas nanopartículas de PLGA-PEG.....	71
Tabela 21 - ANOVA com desdobramento da interação solventes x PLGA-PEG, fixando a variável PLGA-PEG.....	72
Tabela 22 - ANOVA com desdobramento da interação solventes x PLGA-PEG, fixando a variável solventes.....	72
Tabela 23 - Valores correspondentes às diferenças entre as médias de EE e estabelecimento da d.m.s. entre as formulações F8 e F11.....	73
Tabela 24 - Formulações ótimas de acordo com resultados do delineamento fatorial $2^2 \times 3^1$	73
Tabela 25 - Concentração inibitória mínima (CIM) obtida no teste de atividade antifúngica de AFB livre e associada às nanopartículas poliméricas frente à cepa ATCC 64548 de <i>C. albicans</i>	83
Tabela 26 - Concentração inibitória mínima (CIM) obtida no teste de atividade antifúngica de AFB livre e associada às nanopartículas poliméricas frente à cepa ATCC 64548 de <i>Cryptococcus neoformans</i>	85
Tabela 27 - Contagem dos componentes celulares sanguíneos dos animais após o tratamento com nanopartículas de PLGA e de PLGA-PEG contendo AFB e com o fármaco livre.....	91
Tabela 28 - Níveis plasmáticos de alguns marcadores bioquímicos após o tratamento com nanopartículas de PLGA e de PLGA-PEG contendo AFB e com o fármaco livre.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O/A	Água-em-óleo-em-água
AFB	Anfotericina B
AFB-DEOXI	Anfotericina B Deoxicolato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Alanina amino transferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APR	Aumento da permeabilidade e retenção
AST	Aspartato amino transferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	Coefficiente de variação
d.m.s.	Diferença mínima significativa
DLS	<i>Dinamic light scattering</i>
DMGPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	Diesterolifosfatidiglicerol
DMSO	Dimetilsufóxido
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raios X
EC	Etilcelulose
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
HE	Hematoxicilina e eosina
IV	Infravermelho
i.p.	Intraperitoneal
KBr	Brometo de potássio

LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NP	Nanopartícula polimérica
NP's	Nanopartículas poliméricas
NP-AFB	Nanopartículas contendo AFB
NP-AFB-PLGA	Nanopartículas de PLGA contendo AFB
NP-AFB-PLGA-PEG	Nanopartículas de PLGA-PEG contendo AFB
O/A	Óleo-em-água
PDA	<i>Photodiode Array</i>
PEG	Poli(etileno)glicol
PGA	Ácido poli (glicólico)
PHB	Poli (β -hidroxibutirato)
PLA	Ácido poli (lático)
PLGA	Ácido poli (lático- <i>co</i> -glicólico)
PLL	Poli-L-lisina
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Poli (vinilpirrolidona)
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SNC	Sistema nervoso central
UFC	Unidades formadoras de colônias
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Nanotecnologia.....	20
2.2 Nanopartículas poliméricas.....	21
2.2.1 Ácido poli (lático- <i>co</i> -glicólico) – PLGA.....	24
2.2.2 Métodos de obtenção: emulsificação/ evaporação do solvente.....	26
2.3 Anfotericina B – AFB.....	28
2.3.1 Mecanismo de ação antifúngica da AFB.....	30
2.3.2. Aspectos toxicológicos de AFB.....	31
2.3.3. Formulações farmacêuticas de AFB disponíveis comercialmente.....	32
2.3.3.1 Anfotericina B Deoxicolato – AFB-DEOXI.....	32
2.3.3.2 Anfotericina B lipossomal – AFB lipossomal.....	33
2.3.3.3 Anfotericina B – dispersão coloidal.....	33
2.3.3.4 Anfotericina B – complexo lipídico.....	33
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Substâncias e reagentes.....	36
4.2 Equipamentos e acessórios.....	36
4.3 Animais.....	37
4.4 Metodologia.....	37
4.4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise quantitativa de AFB em solução.....	37
4.4.2 Delineamento fatorial: estabelecimento de protocolos de obtenção de nanopartículas poliméricas contendo AFB.....	40
4.4.3 Obtenção das nanopartículas contendo AFB.....	42
4.4.4 Caracterização físico-química.....	42
4.4.4.1 Eficiência de encapsulação do fármaco	42
4.4.4.2 Diâmetro médio da partícula e índice de polidispersidade.....	43
4.4.4.3 Agregação molecular da AFB nas nanopartículas.....	44

4.4.4.4 Espectroscopia: Difração de Raios X.....	44
4.4.4.5 Espectroscopia: Infravermelho	44
4.4.5 Caracterização biológica.....	45
4.4.5.1 Atividade antifúngica – ensaio <i>in vitro</i>	45
4.4.5.2 Toxicidade celular – ensaio <i>in vitro</i>	46
4.4.5.3 Toxicidade celular – ensaio <i>in vivo</i>	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise quantitativa de AFB.....	50
5.2 Obtenção das nanopartículas contendo AFB.....	58
5.3 Delineamento fatorial: estabelecimento da formulação ótima.....	58
5.3.1 Formulações F1 – F6 (PLGA).....	59
5.3.1.1 Diâmetro médio das partículas de PLGA.....	59
5.3.1.2 Eficiência de encapsulação do fármaco das NP's de PLGA.....	64
5.3.2 Formulações F7 – F12 (PLGA-PEG).....	67
5.3.2.1 Diâmetro médio das partículas PLGA-PEG.....	67
5.3.2.2 Eficiência de encapsulação do fármaco nas NP's de PLGA-PEG.....	70
5.3.3 Estabelecimento da formulação ótima.....	73
5.4 Caracterização físico-química.....	74
5.4.1 Agregação molecular de AFB nas nanopartículas.....	74
5.4.2 Espectroscopia: Difração de Raios X.....	76
5.4.3 Espectroscopia: Infravermelho	79
5.5 Caracterização biológica.....	82
5.5.1 Atividade antifúngica – ensaio <i>in vitro</i>	82
5.5.1.1 Resultados para <i>Candida albicans</i>	83
5.5.1.2 Resultados para <i>Cryptococcus neoformans</i>	85
5.5.2 Toxicidade celular – ensaio <i>in vitro</i>	87
5.5.3 Toxicidade celular – ensaio <i>in vivo</i>	90
5.5.3.1 Testes hematológicos.....	91
5.5.3.2 Testes bioquímicos.....	92
5.5.3.3 Testes histopatológicos	94
6 CONCLUSÕES.....	101
7 REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios presentes na área farmacêutica consiste no aperfeiçoamento de fármacos já existentes através do desenvolvimento de novas formulações que sirvam como carreadores diferenciados dessas moléculas no organismo humano. Esse desafio baseia-se na necessidade de melhoria de alguns parâmetros no desempenho do fármaco: adequação do esquema terapêutico através da diminuição das doses; diminuição de efeitos indesejados e toxicidade celular, aumento da eficácia terapêutica, entre outros.

É nessa perspectiva que as nanotecnologias emergem na área farmacêutica. Os avanços nas pesquisas e no desenvolvimento de metodologias para a síntese de sistemas nanoparticulados carreadores de fármacos, material genético, proteínas, vacinas, têm se mostrado cada vez mais evidente (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Os dispositivos em escala nanométrica - objetos do estudo da nanotecnologia - dentre os quais as nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanoemulsões, nanotubos, entre outros, apresentam propriedades físico-químicas peculiares, tais como: ampla área superficial, diâmetro reduzido, ampla capacidade de modificações estruturais, vetorização por adição de ligantes na superfície (MAINARDES, et al., 2009). Estas peculiaridades são frequentemente investigadas e aprimoradas com a finalidade de atender parâmetros farmacológicos importantes como: a) adequação da solubilidade; b) liberação do fármaco a partir da nanoestrutura; c) distribuição no tecido biológico; e d) ação no tecido-alvo.

Neste contexto, as nanopartículas poliméricas (NP's) apresentam elevada versatilidade para emprego no transporte de fármacos com diferentes características físico-químicas, bem como configuram-se como eficientes sistemas de liberação controlada, apresentando inúmeras vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais:

a) Solubilidade: o fato das nanopartículas atuarem como reservatório do fármaco (nanocápsulas) ou como uma matriz onde o ativo está uniformemente distribuído (nanoesferas) (RAO e GECKELER, 2011), confere ao fármaco proteção frente as alterações fisiológicas do meio, independente da rota de administração, e, aliado ao reduzido diâmetro, funciona como vetor passivo do fármaco ao sítio de ação. Os fatores constituintes da nanoestrutura como polímeros e surfactantes, e as variantes envolvidas na obtenção, permitem projetar estruturas diretamente relacionadas às características físico-químicas do fármaco carregado, melhorando desta forma a solubilização do mesmo, independente de sua polaridade.

b) Liberação controlada: a biocompatibilidade e biodegradabilidade dos polímeros constituintes, a indução de determinadas interações soluto-solvente na formulação (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010), aliados as ações possíveis no meio em que as NP's são inseridas, tornam essas estruturas eficientes mecanismos de liberação gradual de fármacos e evitam a ocorrência de doses tóxicas ou subterapêuticas.

c) Biodistribuição: a vetorização passiva das NP's ocorre naturalmente devido ao reduzido diâmetro, morfologia esférica, que proporcionam melhor permeabilidade nas membranas biológicas (JAIN e KUMAR, 2010). A vetorização ativa também é possível de ser atingida através da modificação estrutural da superfície das NP's, com o intuito de minimizar a rápida identificação e remoção pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM), promovendo tempo de circulação sanguínea prolongada e contribuindo para o aumento da biodistribuição do fármaco carregado (MAINARDES, 2007; PESTANA, 2009; VASSILIOU et al., 2010).

No que diz respeito aos polímeros empregados na obtenção de NP's, estes podem ser naturais, como quitosana e albumina por exemplo, (KAYSER; LEMKE; HERNÁNDEZ-TREJO, 2005; NAHAR, et al., 2008) ou sintéticos. Os polímeros sintéticos são largamente empregados em sistemas de liberação de fármacos (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010), por apresentarem capacidade de reabsorção pelo organismo e por serem aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), para uso em humanos (ULBRICHT, 2006), como é o caso do ácido poli (lático) (PLA), do ácido poli (glicólico) e ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA).

Entre os polímeros sintéticos mais utilizados nas nanotecnologias, destacam-se os poliésteres citados acima (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2007). Os polímeros derivados do ácido lático e ácido glicólico apresentam propriedades mecânicas ideais, biocompatibilidade e perfil de biodegradação que favorece a liberação adequada do fármaco veiculado (RAO e GECKELER, 2011).

A anfotericina B (AFB) é um fármaco de amplo espectro antifúngico que vem sendo alvo de inúmeros estudos envolvendo nanotecnologias, pois, a administração através das formulações convencionais apresentam desvantagens farmacológicas como: efeitos adversos, baixa disponibilidade oral havendo necessidade de administração via endovenosa, toxicidade celular, principalmente associada à nefrotoxicidade (DAS e SURESH, 2011).

A AFB consiste no antibiótico de escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, mas sua elevada toxicidade associada principalmente a pacientes imunossuprimidos, limita sua utilização (MENEZES, et al., 2009). As inúmeras peculiaridades químicas da molécula de AFB estão relacionadas ao seu eficiente mecanismo

de ação antifúngica e também a sua toxicidade sobre a membrana plasmática de células de mamíferos (VANDERMEULEN, et al., 2006; WASAN, et al., 2009; OLIVEIRA, 2008).

O aprimoramento da formulação farmacêutica de AFB vêm sendo conduzido há décadas, haja vista, os diferentes sistemas disponíveis no mercado: dispersões micelares, lipossomas, complexo lipídicos, dispersões coloidais (BARRATT, 2000; ARRUDA, 2011; JAIN e KUMAR, 2010; FUKUI, et al., 2003).

Apesar de sua eficácia, essas formulações apresentam problemas de toxicidade após semanas de tratamento, principalmente em casos de sistemas imunológicos debilitados (FILLIPPIN e SOUZA, 2006). Provavelmente a falta de homogeneidade molecular de AFB nos sistemas convencionais permitem a presença de oligômeros moleculares, apresentando portanto, maior toxicidade devido a interação com o colesterol (FRANZINI, 2006; JAIN e KUMAR, 2010). E ainda, a forte interação da AFB com os lipídios presentes nas formulações interferem na liberação do fármaco, o que resulta em diminuição da eficácia terapêutica (SZOKA e TANG, 1993; BOLARD; JOLY; YENI, 1993).

Dessa maneira, as problemáticas relacionadas às formas comerciais disponíveis de AFB estimulam a pesquisa e o desenvolvimento de novos carreadores, como é o caso das nanopartículas, que representam eficientes sistemas de liberação controlada, além de melhorarem a solubilidade do fármaco e a sua distribuição nos tecidos biológicos.

Por estas razões, o presente estudo propõe o desenvolvimento tecnológico, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas poliméricas contendo AFB, com o objetivo de redução de toxicidade frente à células humanas e manutenção de sua atividade terapêutica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que se dedica ao desenvolvimento ou manipulação de dispositivos e sistemas com dimensão nanométrica. A aplicação da nanotecnologia nas mais variadas áreas, especialmente na área da saúde, está em crescente evolução (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012) e explora a peculiaridade das propriedades físico-químicas presentes nos materiais de tamanho submicrométrico.

Em se tratando das áreas da medicina e farmácia é possível elencar algumas das diversas aplicações: veiculação de fármacos (BARRATT, 2000; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012), vacinas (PEEK; MIDDGAUGH; BERKLAND, 2008), material genético (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012) e proteínas (JAHANSHAHI e BABAEI, 2008), constituindo-se como biossensores para uso diagnóstico (JAIN, 2005), cosméticos (MIHRANYAN; FERRAZ; STROMME, 2012), implantes e próteses (LIU e WEBSTER, 2007).

O interesse em todas essas aplicações se deve aos benefícios inerentes, como por exemplo, a rapidez e sensibilidade em usos na medicina diagnóstica, o direcionamento sítio-específico no caso de veiculação de vacinas na medicina preventiva, a vetorização e a liberação prologada no caso dos fármacos.

Diante dessa emergência das nanotecnologias, a veiculação de fármacos vem despertando grande interesse nas pesquisas e em indústrias farmacêuticas (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012), em face da possibilidade de aprimoramento do desempenho de medicamentos existentes no mercado, ou do desenvolvimento de novas formulações.

Os dispositivos nanométricos que servem como carreadores de fármacos podem ser sintetizados a partir de diferentes matérias primas, bem como podem apresentar arranjos estruturais variados. Dentre muitos é possível destacar: lipossomas, nanoemulsões, nanotubos, dendrímeros, micelas poliméricas, e nanopartículas com as mais variadas composições: poliméricas, magnéticas, cerâmicas, lipídica-sólidas, metálicas, entre outros.

Frente a uma aplicação farmacêutica, a seleção do dispositivo nanométrico a ser utilizado no carreamento de fármacos está relacionada a ação desejada e a compatibilidade físico-química com o fármaco em questão. A seguir, focaremos o estudo na classe das nanopartículas poliméricas, um dos dispositivos nanométricos mais explorados.

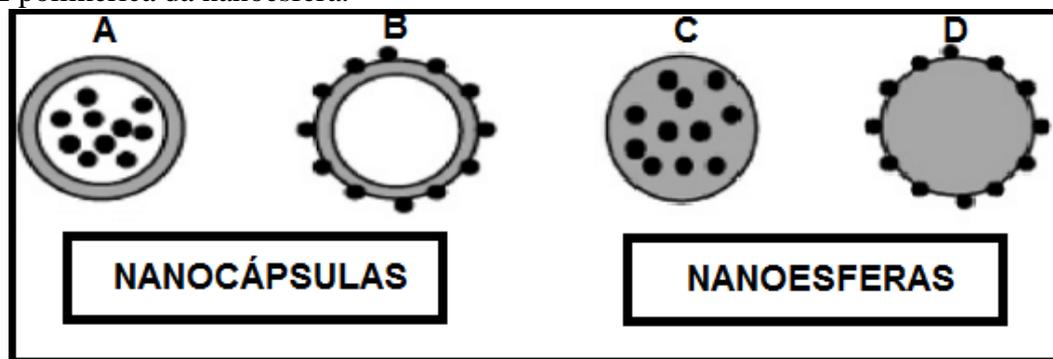
2.2 Nanopartículas poliméricas

As NP's são sistemas coloidais, de tamanho submicrométrico, compostas essencialmente por polímeros naturais ou sintéticos. De acordo com o método por qual são sintetizadas, as NP's adquirem distinta estrutura interna (Figura 1) e podem ser diferenciadas em:

a) Nanocápsulas: são constituídas por um núcleo líquido, do tipo reservatório, podendo ser oleoso ou aquoso, envolto por uma parede polimérica. A molécula a ser transportada pode estar enclausurada no núcleo ou adsorvida à parede polimérica (RAO e GECKELER, 2011; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

b) Nanoesferas; correspondem a matriz sólida composta por polímero, onde a substância carregada encontra-se molecularmente dispersa na matriz ou adsorvida nela (RAO e GECKELER, 2011).

Figura 1 – Representação gráfica de nanocápsulas e nanoesferas. A: fármaco enclausurado no núcleo da nanocápsula. B: fármaco adsorvido na superfície polimérica da nanocápsula. C: fármaco disperso na matriz polimérica da nanoesfera. D: fármaco adsorvido à superfície da matriz polimérica da nanoesfera.



(Adaptado de KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

As principais características das NP's têm estimulado sua ampla investigação conferindo a estas estruturas elevada potencialidade para a veiculação de fármacos, e dizem respeito ao *reduzido diâmetro*, *vetorização* (direcionamento sítio-específico), *biocompatibilidade* e *biodegradabilidade*.

No que diz respeito ao *diâmetro médio da partícula*, esta é uma das propriedades finais que pode ser modulada a partir do método de obtenção considerando-se os parâmetros experimentais envolvidos: temperatura da reação, velocidade de evaporação do solvente,

volume das fases, concentração do tensoativo e velocidade de homogeneização, em se tratando de métodos de emulsificação (RAO e GECKELER, 2011).

Conforme mencionado anteriormente, o diâmetro reduzido das NP's lhes confere inúmeras vantagens farmacocinéticas em comparação a outros sistemas que apresentam dimensões maiores, como a maior capacidade de transpor barreiras biológicas, uma vez que as fenestrações presentes nas barreiras endoteliais são da ordem de nanômetros (ALEXIS, et al., 2008). Além disso, diâmetros reduzidos conduzem a ampliação da área superficial, o que proporciona maior interação com os componentes biológicos (MAINARDES et al., 2009; JAIN e KUMAR, 2010).

Segundo Gupta e Kompella (2006), para que o transporte de um veículo contendo fármaco seja eficiente através da corrente circulatória, é recomendado que esta estrutura não ultrapasse 300 nm de diâmetro. Ademais, a absorção celular das NP's obedece aos mecanismos de fagocitose, quando estas formam agregados ou possuem diâmetro superior a 10 μm ; pinocitose, quando as NP's possuem diâmetros inferiores a 1,0 μm ou encontram-se em solução e, endocitose mediada por receptor, quando as NP's apresentam diâmetros compreendidos entre 25 e 50 nm e possuem ligantes específicos, proporcionando a seletividade da entrega do fármaco a um sítio específico (FARAJI e WIPF, 2009).

A fagocitose é executada por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, enquanto que a pinocitose pode ser conduzida por qualquer tipo celular (RANG, et al., 2007), esta é mais uma vantagem de NP's pois podem ser absorvidas por uma ampla série de alvos celulares, enquanto que estruturas maiores só serão acessadas por componentes do sistema fagocitário mononuclear (SFM).

A *vetorização passiva* das NP's é conseguida de forma natural devido a sua morfologia esférica, reduzido tamanho e ausência de modificação superficial, o que lhe proporciona as vantagens quanto a transposição de barreiras biológicas, conforme já mencionado. A exploração do efeito APR (aumento da permeabilidade e retenção), que ocorre em tecidos alterados patologicamente, também pode ser considerada como vetorização pois pode proporcionar acúmulo de NP's efetuando a liberação do agente terapêutico, isto se deve ao fato de que o sistema linfático está ativo e inúmeras NP's são dirigidas até o tecido lesionado de forma passiva.

Estudos já demonstraram o efeito APR contribuindo para o acúmulo do agente terapêutico liberado das NP's nos tecidos lesionados, como é o caso do trabalho que relata a eficácia antitumoral da cisplatina carregada por NP's de quitosana em ratos portadores de tumores (KIM et al., 2008). Neste estudo, as NP's carregadas com o fármaco se acumularam

com êxito no tumor de modo a demonstrar eficácia antitumoral em comparação com o fármaco livre, como pôde ser demonstrado pelas alterações nos volumes tumorais, pelos pesos corporais dos animais, por ensaios imuno-histológicos e pelas taxas de sobrevivência.

A *vetorização ativa* se dá pela modificação estrutural da superfície da NP, seja pela adição de ligantes, receptores, anticorpos, peptídeos (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012), carga de superfície, ou pela modificação por meio da ligação de polímeros ou tensoativos (REIS et al., 2006). A vetorização ativa proporciona o direcionamento do fármaco carregado a um sítio celular específico, ou, no caso da adição de polímeros e tensoativos á superfície, e neutralidade de cargas de superfície, reduz a captura pelo SFM aumentando as possibilidades de liberação do fármaco no alvo celular.

NP's convencionais, que não apresentam modificação estrutural em sua superfície, apresentam um problema relacionado à rápida remoção da circulação sanguínea após administração intravenosa (OWENS III e PEPPAS, 2006). A remoção destas estruturas a partir do SFM diminui o tempo de meia-vida plasmático reduzindo a probabilidade de atingirem as células alvo como já fora mencionado, uma vez que ficarão retidas no baço, fígado e linfonodos, principais órgãos constituintes do sistema fagocitário (MAINARDES, 2007; PESTANA, 2009; VASSILIOU et al., 2010).

A adição de polímeros hidrofílicos ou tensoativos às superfícies das NP's é amplamente empregada para evitar a adsorção de proteínas plasmáticas. Entre os polímeros utilizados para esse fim estão o polietilenoglicol (PEG), poli (vinilpirrolidona) (PVP), estreptavidina, poli-L-lisina (PLL), polietilenos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010), entre outros. O PEG é o mais utilizado, e corresponde a um polímero aniônico, que apresenta cadeias hidrofílicas flexíveis e é capaz de interagir com a superfície das NP's de modo a formar uma barreira estérica (CANAL et al., 2010).

A ampla utilização do PEG se deve às suas propriedades físico-químicas, como solubilidade aquosa, baixa imunogenicidade e antigenicidade (JUNG et al., 2009), que fazem com que as partículas peguiladas, denominadas - de longa duração - ou - estericamente estabilizadas - não sejam facilmente identificadas e removidas pelo SFM, promovendo portanto, tempo de circulação sanguínea prolongada, contribuindo para a aumento da biodistribuição do fármaco carregado pela NP (MAINARDES; KHALIL; GREMIÃO, 2010).

Quanto ao parâmetro da *biocompatibilidade* e *biodegradabilidade*, estes são adquiridos com base na composição das NP's, principalmente no que diz respeito à base polimérica.

A biodegradabilidade dos sistemas poliméricos, aliada a solubilidade da matriz polimérica, estão diretamente relacionadas às taxas de liberação do fármaco a partir da NP. A liberação sustentada é uma das grandes vantagens exibidas pelas NP's e os mecanismos por quais ela ocorre pode ser: a) desorção das moléculas do fármaco ligadas à superfície; b) difusão através da matriz polimérica ou do núcleo quando for o caso; c) erosão da matriz da partícula ou da parede polimérica e, d) uma combinação dos processos de difusão e erosão.

Os polímeros empregados nas formulações de NP's podem ser sintéticos ou naturais. Dentre os polímeros naturais estão a gelatina, a albumina, a quitosana, no entanto, seu emprego em estudos de nanotecnologia farmacêutica é reduzido em relação aos polímeros sintéticos, devido a limitação de manipulação de suas propriedades físico-químicas. A vantagem dos polímeros sintéticos está relacionada a versatilidade quanto a manipulação de sua organização monomérica, o que resulta em propriedades como degradabilidade e compatibilidade em meio biológico, além de apresentarem elevada pureza em comparação aos polímeros naturais (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

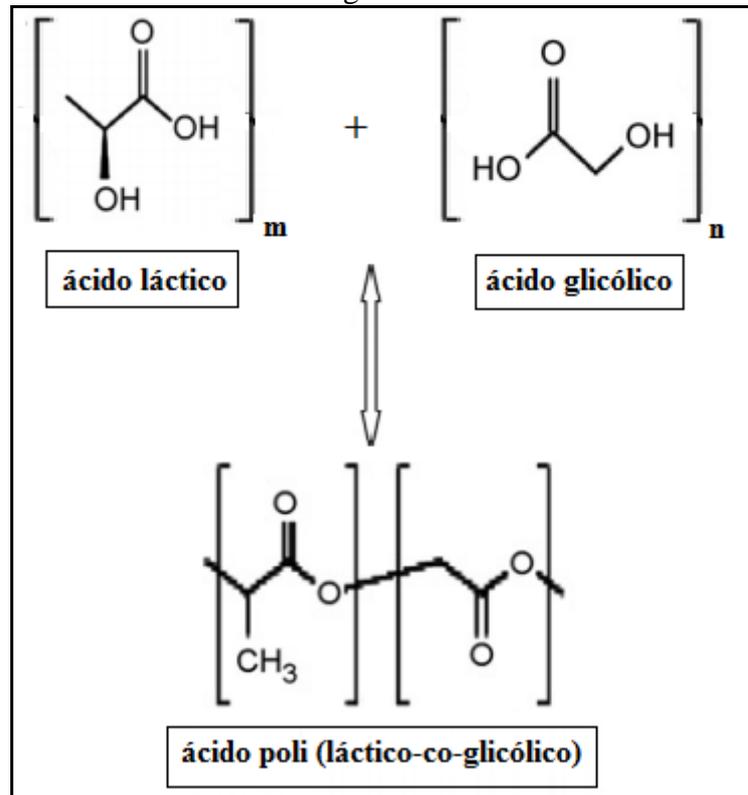
São alguns exemplos de polímeros sintéticos: ácido poli (lático) (PLA), ácido poli (lático-*co*-glicólico) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), seguidos de outros menos explorados tais quais: etilcelulose (EC), poli (β -hidroxibutirato) (PHB), acetato de celulose, poli (acrilato) e poli (metacrilato). Dentre esses, o PLA e o PLGA tem sido amplamente utilizado para o desenvolvimento de NP's devido à excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada capacidade de encapsulação de fármacos hidrófobos (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010).

2.2.1 Ácido poli (lático-*co*-glicólico) – PLGA

O PLGA é um copolímero sintético, biodegradável, biocompatível, formado a partir de monômeros de ácido lático e ácido glicólico, em diferentes proporções (Figura 2).

Os dímeros dos ácidos que compõe o PLGA estabelecem ligações do tipo éster, resultado em um poliéster de cadeia alifática, hidrofóbico. A biodegradabilidade inerente ao PLGA está relacionada à sua hidrólise no organismo, produzindo metabólitos não tóxicos e toleráveis aos tecidos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Os metabólitos correspondem aos monômeros de ácido lático e glicólico, que são totalmente reabsorvidos pelo organismo ao serem incorporados nas rotas metabólicas.

Figura 2 – Representação da obtenção do PLGA. Onde, m = número de unidades de ácido láctico, e, n = número de unidades de ácido glicólico.



(Adaptado de KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Uma vez que os metabólitos oriundos da degradação do PLGA são efetivamente absorvidos pelo organismo, conferindo biocompatibilidade e riscos mínimos à saúde humana, este polímero está regularizado para aplicações biomédicas através da aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e Agência Europeia de Medicina (DANHIER et al., 2012).

A cristalinidade do PLGA é influenciada pelos isômeros moleculares e pela razão molar dos componentes envolvidos em sua obtenção. Polímeros de PLGA na razão molar 50:50 de ácido láctico e glicólico, apresentam caráter amorfo, e conseqüentemente, são hidrolisados mais rapidamente em relação ao padrão cristalino (DANHIER et al., 2012).

Por estas razões, as pesquisas envolvendo o polímero PLGA e o carregamento de fármacos estão em ascensão e incluem: encapsulação de antitumorais, fármacos para controle de diabetes, drogas psicotrópicas, hormônios (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010), antifúngicos (VAN DE VEN, et al., 2012; REN et al., 2009), antioxidantes (SONG, et al., 2011) entre outros.

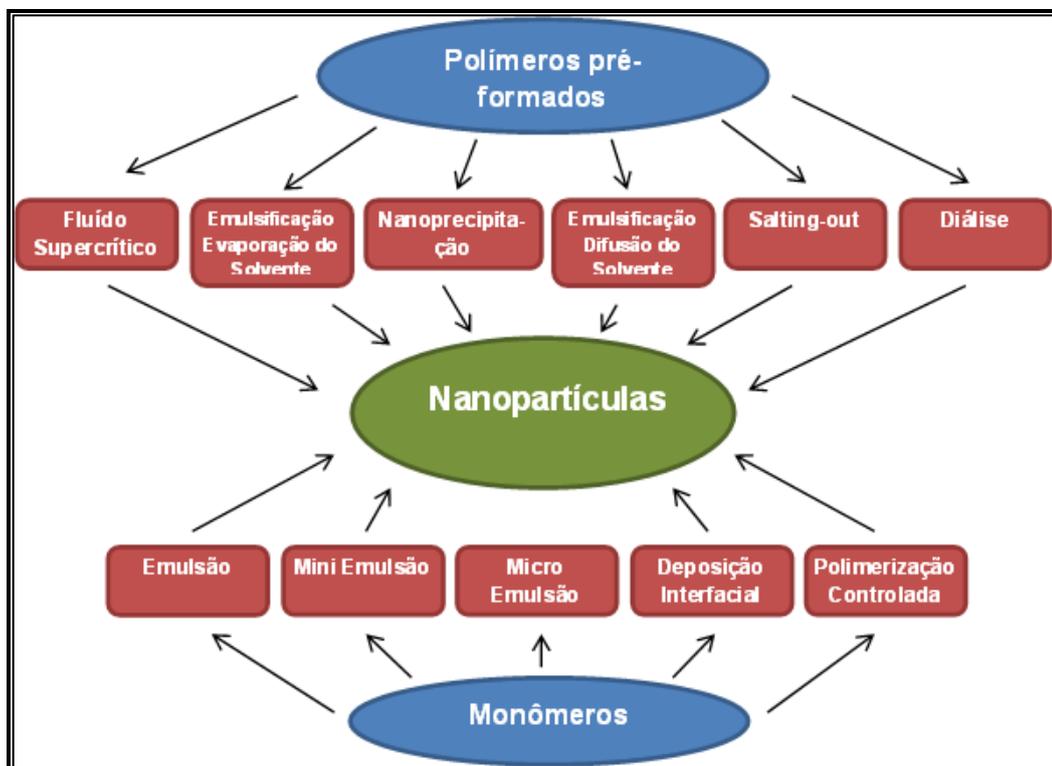
Em síntese, o copolímero PLGA é bastante investigado no campo farmacêutico como potencial matéria prima para o desenvolvimento de NP's, devido à uma série de

características positivas, tais como: a) biodegradabilidade e biocompatibilidade; b) aprovação por agências internacionais para uso em humanos; c) métodos de obtenção adaptados à fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos; d) atuação como sistemas de liberação controlada; e) possibilidade de modificações nas propriedades superficiais; f) proteção do fármaco internalizado frente as agregações fisiológicas do meio (CANAL, et al., 2010; DANHIER et al., 2012).

2.2.2 Métodos de obtenção: emulsificação evaporação do solvente

A possível modulação das variáveis envolvidas na obtenção de NP's pode conferir-lhes propriedades que atendam a finalidade de sua aplicação. Neste sentido, numerosas técnicas de preparação de NP's estão disponíveis (Figura 3), e baseiam-se na dispersão de polímeros pré-formados ou na polimerização a partir de monômeros de polímeros (RAO e GECKELER, 2011).

Figura 3 – Representação das técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas.



(Adaptado de RAO e GECKELER, 2011).

Os métodos baseados na polimerização de monômeros de polímeros apresentam certa desvantagem, pois, as moléculas residuais (monômeros, oligômeros, etc) podem resultar em toxicidade da formulação (REIS; NEUFELD; VEIGA, 2006).

Assim sendo, as técnicas de preparação que utilizam polímeros pré-formados são mais bem aceitas para produção de NP's. Mais especificamente na área farmacológica, os métodos de escolha geralmente são a emulsificação/ evaporação do solvente e a tecnologia do fluido supercrítico. Estas técnicas não evidenciam traços de solvente no produto final, evitando possíveis efeitos toxicológicos nos tecidos em que vão ser empregados (RAO e GECKELER, 2011).

A técnica da emulsificação/ evaporação do solvente foi a primeira metodologia descrita para obtenção de NP's poliméricas (VANDERHOFF; EL AASSER; UGELSTAD, 1979) e ainda é a mais amplamente utilizada. Uma das vantagens desta técnica é a possibilidade de desenvolvimento de estruturas que carregam ativos hidrofílicos ou hidrofóbicos, devido à possibilidade de formação de emulsões duplas água-em-óleo-em-água (A/O/A) ou simples óleo-em-água (O/ A), respectivamente (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A metodologia da técnica da emulsão simples consiste em dissolver o polímero e o fármaco em um solvente orgânico constituindo a fase orgânica da formulação. Converter esta fase orgânica em uma fase aquosa geralmente contendo um agente emulsionante ou estabilizador da emulsão, aplicar alta energia para homogeneização de modo a formar a emulsão (sonicação). Esta emulsão é levada à um evaporador que mantenha agitação constante, pressão negativa e temperatura controlada, de modo que ocorra a evaporação dos solventes, precipitação do polímero e formação de uma suspensão de nanopartículas (REIS et al., 2006).

Após a formação das nanopartículas, estas são recolhidas da suspensão por ultracentrifugação, com lavagens consecutivas com água destilada para remoção de possíveis aditivos (RAO e GECKELER, 2011). Na sequência, deve-se aplicar um técnica de secagem para posterior armazenamento, que pode consistir da liofilização com prévio congelamento ou outra técnica como o *spray drying* (secagem por aspersão).

Ainda através desse método, para o preparo de emulsões duplas acrescentam-se duas etapas ao processo de emulsificação: adiciona-se um surfactante hidrofóbico na emulsão inicial água-em-óleo e um surfactante hidrofílico para estabilização da interface da emulsão A/O/A (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Há vários relatos na literatura sobre a aplicação do método de emulsificação/evaporação do solvente, onde diversas variáveis são analisadas com a finalidade de encontrar influências, detectar interações, aprimorar as formulações e atingir as propriedades finais desejadas para as NP's (VASSILIOU et al., 2010; RAO e GECKELER, 2011; MAINARDES et al., 2010; ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010).

A constituição do fármaco, a estabilidade, a solubilidade, a velocidade de liberação desejada, o alvo terapêutico, são alguns dos fatores a serem analisados previamente a escolha da formulação ideal, do método de síntese e da modificação estrutural necessária ao desenvolvimento de NP's poliméricas carreadoras de fármaco (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

2.3 Anfotericina B (AFB)

As leveduras são fungos oportunistas responsáveis por grande parte das infecções fúngicas em seres humanos, sendo que nas últimas décadas estas infecções invasivas têm aumentado significativamente (WASAN, et al., 2009).

Dentre as infecções sistêmicas causadas por fungos, destacam-se os gêneros *Candida* e *Aspergillus* por causar grande morbidade hospitalar entre imunodeprimidos e até mesmo mortalidade, como é o caso das aspergiloses que registram 85% de casos de morte dentre os pacientes diagnosticados com infecções fúngicas (KLEPSER, 2011).

Apesar de se tratar de um organismo comensal, a levedura do gênero *Candida*, principalmente a espécie *Candida albicans*, é considerada a mais patogênica dentre as leveduras (MENEZES, et al., 2009), sendo responsável por 60% dos casos isolados clinicamente (BARBEDO e SGARBI, 2010). A candidíase representa um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades relacionadas às medidas profiláticas e terapêuticas.

Merece nota também as micoses severas relacionadas ao patógeno *Cryptococcus neoformans*, causador da meningite criptocócica que acomete o sistema nervoso central (SNC) principalmente em pacientes imunocomprometidos. Atualmente, uma das infecções frequentemente relacionadas à mortalidade de pacientes imunossuprimidos, como pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), é a meningite criptocócica (JIANG, et al., 2012).

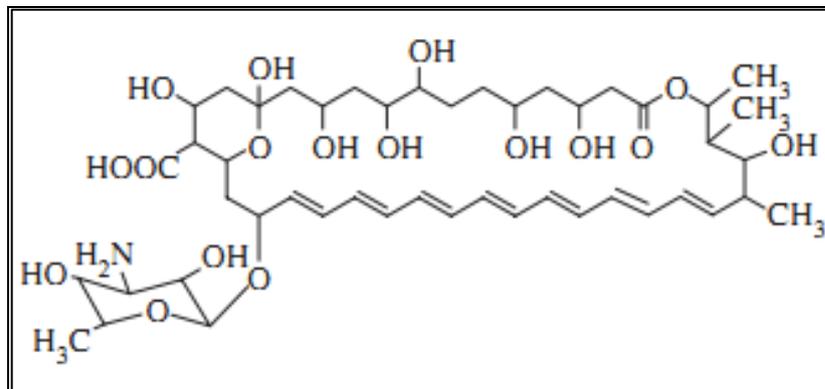
A partir de seu isolamento da bactéria *Streptomyces nodosus* em 1955, a AFB tornou-se o antifúngico de escolha para o tratamento de infecções sistêmicas (GOLD, et al., 1956;

VANDEPUTTE, WACHTEL; STILLER, 1956). A aprovação pelo *FDA* para uso em humanos se deu em 1965, e mesmo diante do surgimento de outros fármacos como os azólicos, a AFB continua sendo amplamente utilizada por conta de seu amplo espectro de ação e eficácia antifúngica (OLIVEIRA, 2008; NAHAR, et al., 2008).

No entanto, a AFB é alvo de pesquisas de aprimoramento farmacêutico mesmo diante de sua alta atividade, uma vez que a sua administração promove o surgimento de vários efeitos indesejados (WASAN et al., 2009).

A estrutura química de AFB é bastante complexa (Figura 4). Possui 37 átomos de carbono organizados em um anel macrocíclico fechado por lactonização. Apresenta uma cadeia de ligações duplas conjugadas não-substituídas na porção hidrofóbica do anel e, na porção hidrofílica oposta, uma cadeia com sete grupos hidroxila livres, o que lhe confere característica anfipática ou anfotérica (OLIVEIRA, 2008; ARRUDA, 2011). Esta característica está relacionada a formação espontânea de sais solúveis tanto em meio básico quanto em meio ácido (FILLIPPIN e SOUZA, 2006).

Figura 4 – Fórmula estrutural da anfotericina B.



(Adaptado de LINCOPAN et al., 2006).

A molécula apresenta aproximadamente 24 Å de comprimento, sendo que em uma de suas extremidades encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um grupamento amina livre, formando uma cadeia lateral frequentemente designada como “cabeça polar” da molécula (FILLIPPIN e SOUZA, 2006; OLIVEIRA, 2008; JUNG, et al., 2009).

O grupo amino é flexível e pode assumir algumas conformações em relação ao anel macrocíclico. O grupo heptaeno é considerado mais rígido, o que se deve à presença de ligações duplas, sendo susceptível a alterações do meio devido à possibilidade de curvatura da cadeia (OLIVEIRA, 2008).

A natureza anfipática da molécula compromete a solubilidade em solventes, incluindo a água, sendo que sua dissolução pode se dar em dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida e propilenoglicol, ou ainda parcialmente em metanol (*United States Pharmacopeia (USP) 35*, 2011; *Farmacopeia Britânica*, 2012). A baixa solubilidade em água compromete a administração através da via oral, sendo recomendada a administração lenta em forma de suspensão micelar, via endovenosa (JUNG et al., 2009; ARRUDA, 2011; FILLIPPIN e SOUZA, 2006).

De acordo com a característica da infecção podem ser necessárias administrações por meio de outras rotas, como é o caso da administração intratecal, em caso de meningites fúngicas (GAZZONI, et al., 2012), tópica, para micoses cutâneas ou intrarticular (GOODMAN e GILMAN, 2006).

A AFB apresenta-se como um pó alaranjado, inodoro, instável em pH baixos, sensível à luz quando em solução (*British Pharmacopeia*, 2012), o tempo de meia-vida é de aproximadamente 15 dias (RANG et al., 2007), possui baixa solubilidade aquosa em pH fisiológico, sendo inferior a 1 mg/mL.

O regime posológico pode variar de acordo com cada formulação de AFB disponível comercialmente, bem como em virtude do patógeno e das circunstâncias da infecção. No entanto, recomenda-se para administrações intravenosas, a submissão à dose teste de 1 mg/Kg durante 2 h de infusão com concomitante observação de possíveis reações. Se não houver registros de reações imediatas, posteriormente conduz-se a administração da dose habitual sugerida pela formulação farmacêutica (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Além de sua ação antifúngica, a AFB tem demonstrado eficiente ação contra a leishmaniose, uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* que consiste em um problema epidemiológico em vários países subdesenvolvidos (KAFETZIS et al., 2005; SUNDAR, et al., 2001; ESPUELAS, et al., 2002).

2.3.1 Mecanismo de ação antifúngica da AFB

O mecanismo de ação antifúngica da AFB baseia-se na interação com os lipídios das membranas plasmáticas, possuindo maior afinidade pelo ergosterol, um esteróide presente na membrana celular fúngica e de alguns protozoários (WASAN et al., 2009). A interação com o ergosterol leva à formação de canais transmembranosos por onde ocorre o extravasamento de metabólitos e íons, prejudicando a multiplicação celular e outras vezes levando à morte do organismo (ESPADA et al., 2008; OLIVEIRA, 2008).

Apesar das constantes pesquisas acerca da ação da AFB, o mecanismo de formação de canais ainda não está totalmente elucidado. Observa-se que diversas propriedades podem afetar a formação do canal da membrana plasmática do fungo, como o pH do meio, o estado físico da membrana celular, a composição lipídica e principalmente a organização molecular da AFB (OLIVEIRA, 2008).

Uma das explicações para a formação dos canais relaciona-se com a propriedade anfifílica da molécula, pois, em meio aquoso (meio polar) onde a AFB é pouco solúvel, suas moléculas arranjam-se de forma a proteger as extremidades apolares e deixar as extremidades polares à mostra. Já em ambientes apolares há melhor solubilidade conferida pelo arranjo da molécula que tende a inverter-se, possibilitando o estado monomérico e proporcionando interação com os lipídios presentes nos arredores de modo a formar um canal (FILLIPPIN e SOUZA, 2006; OLIVEIRA, 2008). Porém, HUANG e colaboradores (2002) discutem acerca de evidências de que as duas organizações moleculares da AFB são capazes de interagir com os ergosteróis.

Salienta-se que a ação da AFB na membrana plasmática do fungo não está associada exclusivamente a interação com ergosterol, mas a presença deste aumenta significativamente a formação dos canais (OLIVEIRA, 2008). A afinidade do fármaco pelo ergosterol é comprovadamente superior que a afinidade por outros esteróides (HILLERY, 1997), demonstrando sua seletividade para com as células fúngicas.

2.3.2 Aspectos toxicológicos da AFB

O mecanismo de toxicidade sobre células sadias ainda não está completamente elucidado. Na literatura relata-se que o efeito tóxico está relacionado ao estado de agregação molecular de AFB, onde os agregados moleculares são propensos à interação com o colesterol, um lipídio análogo presente na membrana plasmática de células animais (HUANG, et al., 2002; FILLIPPIN e SOUZA, 2006; ESPADA et al., 2008).

O mesmo mecanismo de formação de poros transmembranosos ocorre devido à interação com o colesterol, e o extravasamento do conteúdo intracelular compromete a permeabilidade da célula, podendo conduzi-la a apoptose.

Estudos registram que a concentração elevada do fármaco, acima de 5×10^{-6} M, tendem a formação de agregados moleculares (MILLIE et al., 1999; MINONES et al., 2005), e por conseguinte, são potencialmente tóxicos para as células humanas.

Efeitos agudos indesejados foram registrados após a administração intravenosa de AFB, tais quais: febre, calafrios, hipocalemia, náusea, vômitos, hipóxia, hipotensão (GUO, 2001; FILLIPPIN e SOUZA, 2006). As doses repetidas podem levar a aparição de sintomas como: diurese aumentada (GERBAUD et al., 2003), disfunção renal, anemia, leucopenia e trombocitopenia. Episódios cardiovasculares são raros e em geral foram registrados em pacientes com função renal diminuída (FILLIPPIN e SOUZA, 2006). Em casos de aplicação tópica, a AFB pode ser responsável pelo surgimento de erupções na pele (RANG, et al., 2007).

A nefrotoxicidade está quase sempre presente em pacientes submetidos ao tratamento com AFB, e pode apresentar diferentes graus de complexidade, dependendo da dose administrada, do estado imunológico do paciente e do tempo de exposição ao fármaco (FILLIPPIN e SOUZA, 2006). Segundo dados da literatura (VYAS e GUPTA, 2006; TIYABOONCHAI e LIMPEANCHOB, 2007), mais de 80% dos pacientes tratados com AFB apresentam efeitos colaterais relacionados a hepatotoxicidade, hematotoxicidade e nefrotoxicidade.

2.3.3 Formulações farmacêuticas de AFB disponíveis comercialmente

2.3.3.1 Anfotericina B Deoxicolato – AFB-DEOXI

Trata-se do pó liofilizado do fármaco associado a um sal biliar denominado deoxicolato de sódio. É administrado através de infusão após a reconstituição em soro glicosado, formando uma dispersão micelar.

A formulação comercial disponível é o Fungizone® (Bristol-Meyers Squibb), que corresponde a primeira formulação farmacêutica de AFB e é considerada como padrão comercial do fármaco. Esta formulação apresenta problemas de toxicidade após semanas de tratamento, provavelmente devido à falta de homogeneidade na formulação e presença de formas aglomeradas de AFB (JAIN e KUMAR, 2010).

Por esta razão, a terapia antifúngica com AFB-DEOXI pode apresentar inúmeros efeitos colaterais, tais quais: nefrotoxicidade, hematotoxicidade, hepatotoxicidade, anemia, trombocitopenia, hipotensão, hipertensão, leucopenia. (LEGRAND, et al., 1992; GUO, 2001; ARRUDA, 2011).

2.3.3.2 Anfotericina B lipossomal – AFB-lipossomal

Corresponde à primeira formulação lipossomal para AFB e consiste de uma preparação lipossomal de vesículas unilamenaes contendo fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol, diesterilfosfatidiglicerol (DMPG) e AFB (ARRUDA, 2011; JAIN e KUMAR, 2010). A Ambisome® é comercializada sob forma de pó liofilizado que deve ser reconstituído em água estéril.

Diversos estudos demonstraram que Ambisome é tão eficaz quanto AFB-DEOXI no tratamento de infecções fúngicas, sendo até menos tóxica (FILLIPPIN e SOUZA, 2006). Observa-se ainda que as doses recomendadas para as formulações lipossomais (10 mg/kg) são superiores às recomendadas para AFB-DEOXI (1 mg/kg), o que denota a baixa toxicidade da AFB-lipossomal e justifica sua maior eficiência comparando-se a AFB-DEOXI.

2.3.3.3 Anfotericina B - dispersão coloidal

Comercialmente conhecida como Amphocil®, corresponde a uma dispersão coloidal de AFB e colesterilsulfato de sódio, formando partículas que se assemelham a discos com diâmetro aproximado de 120 nm (FILLIPIN e SOUZA, 2006; ARRUDA, 2011). Logo após sua aprovação pelo FDA (1996), inúmeros estudos *in vitro*, em modelos animais e humanos foram conduzidos, confirmando a menor toxicidade em comparação ao fármaco contido em sua formulação padrão (FILLIPIN e SOUZA, 2006).

2.3.3.4 Anfotericina B – complexo lipídico

O nome comercial dado a esta formulação é Abelcet®, um complexo lipídico de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMGPG) e AFB, com diâmetro compreendido entre 2 e 5 µm.

De acordo com dados de HILLERY (1997) Abelcet apresenta toxicidade diminuída em relação a Fungizone, no entanto, demonstra menos efetividade terapêutica devido a níveis plasmáticos inferiores de AFB no organismo.

Igualmente ao padrão comercial de AFB, as formulações lipídicas apresentam efeitos indesejados no organismo humano, principalmente decorrentes da falta de controle na

liberação do fármaco e ainda relacionados à redução da eficácia antifúngica (JAIN e KUMAR, 2010).

Alguns dos fatores associados a esta perda de eficiência terapêutica podem ser elencados, como a baixa solubilidade aquosa e a forte interação com os componentes lipídicos promovendo a alteração do índice terapêutico (BOLARD; JOLY; YENI, 1993). Ademais, a administração deve ser realizada através de infusão, provocando o acúmulo do fármaco devido ao seu lento processo de depuração, o que pode acarretar em citotoxicidade (MINONES, et al., 2005; FUKUI et al., 2003).

Nesta perspectiva, a toxicidade da AFB associada às suas características físico-químicas, limitam sua utilização na terapia, principalmente no que diz respeito aos pacientes imunocomprometidos, sendo necessário o desenvolvimento nanotecnológico de sistemas carreadores de AFB capazes de manter a eficácia terapêutica do fármaco e reduzir seus padrões citotóxicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antifúngica e citotoxicidade *in vitro* e a toxicidade *in vivo* de nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Desenvolver protocolos de obtenção de nanopartículas de PLGA e blendas de PLGA e PEG contendo AFB utilizando delineamento fatorial.

b) Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise quantitativa de AFB em nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG.

c) Caracterizar os sistemas nanoestruturados obtidos quanto aos seus aspectos físico-químicos.

d) Determinar a eficiência de encapsulação da AFB nas nanopartículas.

e) Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas contendo AFB sobre eritrócitos e comparar com o padrão comercial.

f) Realizar testes *in vitro* para avaliar a atividade antifúngica da AFB associada às nanopartículas.

g) Avaliar a toxicidade *in vivo* da AFB associada às nanopartículas de PLGA e de PLGA-PEG após o tratamento subcrônico de ratos saudáveis, comparativamente ao padrão comercial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias e reagentes

- Anfotericina B (Sigma-Aldrich);
- Anfotericina B Deoxicolato (Cristália);
- Diclorometano (Fmaia);
- Álcool polivinílico (PVA), 31000 MW, grau hidrólise 98-99% (Sigma-Aldrich);
- Acetonitrila e Metanol - grau analítico (J.T. Baker);
- Dimetilsufóxido – DMSO, acetato de etila e clorofórmio (Biotec);
- D (+) Sacarose P.A. (Vetec);
- Ácido poli (D-L, láctico-*co*-glicólico), PLGA, 40-75 MW (Sigma-Aldrich);
- Polietilenoglicol (PEG) – 10 Kda (Sigma-Aldrich);
- Água ultrapura;
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec);
- Fosfato de potássio dibásico P.A. (Biotec);
- Heparina sódica (Hipolabor);
- RPMI – 1640 Medium (Sigma-Aldrich);
- Ágar Saboraud-dextrose (Himedia)
- Brometo de potássio espectroscópico (Vetec);
- Xilazina e quetamina (Vetbrands).

4.2 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica (Bel Engineering – Mod. M214A);
- Pipetas monocal (Labmate);
- Dispersor ultrasônico (Unique);
- Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters Alliance) equipado com detector PDA.
- Leitor de microplacas (Spectra Max 190 – Molecular Devices);
- Evaporador rotatório (Marconi - Ma 120);
- Bomba a vácuo (Tecnal – Mod. TE 058);
- Capela para exaustão de gases (Lucadema);

- Ultracentrífuga refrigerada (Cientec CT-15000R);
- Sistema de ultrapurificação de água (MilliQ Gradiente Millipore);
- Membranas filtrantes - acetato de celulose 0,22 µm e PTFE 0,45 µm – (Millipore);
- Centrífuga (Centribio);
- Liofilizador (Terroni – Mod. LD1500);
- Capela de fluxo laminar vertical (Veco);
- Espectrômetro de Infravermelho (Nicolet IR200 FT-IR – Thermo Scientific);
- Equipamento de espalhamento dinâmico da luz (Light Scattering - Brookhaven 90 Plus);
- Desruptor de células ultrasônico (Unique);
- Autoclave vertical AV Plus (Phoenix);
- Difratoômetro de Raios X (Bruker – Mod. D2 PHASER);
- Espectrofotômetro UV-Vis (Jasco).

4.3 Animais

- 32 ratos *Wistar* machos – Biotério Central da UNICENTRO.

4.4. Metodologia

4.4.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise quantitativa de AFB em solução.

Tendo em vista que as farmacopeias não descrevem métodos para análise quantitativa de AFB por CLAE, foi necessário desenvolver um método analítico apropriado e confiável, atendendo as exigências preconizadas na Resolução nº 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, e recomendações do *ICH topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH (2005).

As condições cromatográficas foram estabelecidas com base em testes preliminares e modificações no trabalho de Rodrigues (2012), além de consultas a referências atualizadas.

Os padrões utilizados nas análises foram preparados em metanol, em triplicata, a partir de uma solução padrão de AFB na concentração de 1,0 mg/mL previamente preparada em DMSO.

A validação da metodologia analítica seguiu os seguintes parâmetros:

Linearidade:

As concentrações dos padrões de AFB que constituíram a curva analítica para análise da linearidade foram: 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores correspondentes a área sob a curva serviram para o cálculo da equação da reta através de uma regressão linear, assim como para o cálculo do coeficiente de correlação (r), parâmetro esse que permite estimar a qualidade da curva e por conseguinte sua linearidade no intervalo testado.

Especificidade:

O procedimento experimental realizado foi a submissão dos padrões de AFB 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata, à condições de estresse. Essas condições foram o congelamento das amostras por 24h; a permanência das amostras sob luz visível por 24h; e a variação de pH, pela adição de quantidades de NaOH e HCl (0,5 M) aos padrões por 1h. Os resultados foram avaliados pela observação de picos inesperados e pela percentagem de recuperação.

Considerando o álcool polivinílico (PVA), presente na formulação das nanopartículas como um possível interferente, foi realizado um teste com amostra de PVA 1% (v/v) para análise do tempo de retenção e característica do pico formado, comparando-se às amostras padrão de AFB.

Precisão:

A precisão de repetibilidade (intra-corrída) foi estabelecida a partir de nove determinações, contemplando o intervalo da curva padrão, isto é, três concentrações diferentes: baixa (10 $\mu\text{g/mL}$), média (25 $\mu\text{g/mL}$) e alta (50 $\mu\text{g/mL}$), com três réplicas cada. A precisão intermediária (inter-corrída) foi realizada em dias diferentes, porém, a partir do mesmo procedimento e das três concentrações em triplicata citadas acima. A precisão do método foi verificada através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), que corresponde ao cálculo do desvio padrão dividido pela concentração média obtida multiplicado por 100.

Exatidão:

Avaliou-se a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Três padrões de concentrações conhecidas, baixa (10 $\mu\text{g/mL}$), média (25

$\mu\text{g/mL}$) e alta ($50 \mu\text{g/mL}$), com três réplicas cada, foram injetados no sistema. A exatidão foi expressa pelo DPR e pela percentagem de recuperação que foi calculada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

Robustez:

Para testar a capacidade do método desenvolvido em resistir a pequenas variações, alterações deliberadas foram aplicadas: alteração fase móvel, alteração no fluxo de vazão da fase móvel e alteração de temperatura. O resultado deste ensaio foi determinado por meio da percentagem de recuperação e DPR. Para estas análises foram utilizados os padrões de AFB em concentrações de 10, 25 e $50 \mu\text{g/mL}$, em triplicata.

Limite de detecção:

Para determinação da menor concentração de analito passível de detecção pelo método, foram analisadas soluções de concentrações: 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 e $1,5 \mu\text{g/mL}$ e, a partir dos resultados das áreas dos picos foi construída uma curva padrão. O limite de detecção (LD) foi estabelecido através equação 1, conforme recomenda a ANVISA e ICH (2005):

$$\text{LD} = \sigma/b \times 3,3 \qquad \text{Equação 1}$$

Onde:

σ = desvio padrão médio do intercepto y.

b = inclinação da curva analítica.

Limite de quantificação:

Utilizando as mesmas concentrações de AFB usadas para determinação do LD, estabeleceu-se o limite de quantificação (LQ) do método, com o emprego da equação 2, preconizada pela ANVISA e ICH (2005):

$$\text{LQ} = \sigma/b \times 10 \qquad \text{Equação 2}$$

Onde:

σ = desvio padrão médio do intercepto y.

b = inclinação da curva analítica.

4.4.2 Delineamento fatorial: estabelecimento de protocolos de obtenção de nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG contendo AFB

Um desenho experimental do tipo fatorial $2^2 \times 3^1$ foi empregado com vistas a otimização da formulação para a obtenção de nanopartículas poliméricas contendo AFB com diâmetros reduzidos e alta capacidade de encapsulação do fármaco.

As variáveis envolvidas na formulação foram escolhidas de modo a abranger boa parte dos estudos disponíveis na literatura e estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis independentes e dependentes testadas no estudo fatorial $2^2 \times 3^1$ para a otimização de nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B.

Variáveis independentes	Códigos	Níveis		Variáveis dependentes
		1	2	
Polímeros:				
PLGA (mg)	P	50	100	Diâmetro médio das partículas
PLGA-PEG (mg:mg)	PPEG	50:10	100:20	
Solventes:				
Clorofórmio (μL)	Clo ^a	800	800	Eficiência de encapsulação
Metanol (μL)	Me ^a	800	800	
Acetato de etila (μL)	Ace ^a	800	800	

^a As variáveis Clo, Me e Ace são mutuamente excludentes.

As variáveis independentes corresponderam ao polímero PLGA, testado com duas quantidades de massa diferentes – 50 e 100 mg; a blenda formada por PLGA-PEG, também testada em duas quantidades de massa diferentes – 50:10 (mg:mg) e 100:20 (mg:mg); e os solventes presentes na fase orgânica da formulação: clorofórmio, metanol e acetato de etila. No caso dos solventes orgânicos, eles foram testados um de cada vez, ou seja, são excludentes entre si, uma vez que se esperava encontrar qual deles proporcionaria uma melhor resposta quanto ao tamanho médio da partícula e encapsulação de AFB. Adicionalmente o índice de polidispersão foi mensurado constituindo outra variável dependente.

Os parâmetros de resposta analisados, ou seja, as variáveis dependentes, também estão exibidas na Tabela 1 e corresponderam ao diâmetro médio das nanopartículas (nm), que foi medido por espectroscopia de correlação de fótons (conforme item 4.4.4.2), e a eficiência de encapsulação (EE) da AFB nas nanoestruturas, que foi determinada indiretamente por CLAE (conforme item 4.4.4.1).

Cada formulação foi desenvolvida em triplicata e todos os outros parâmetros

envolvidos na síntese (processo de obtenção, temperatura, agitação, tensoativo, entre outros) foram mantidos constantes para minimizar as flutuações. Todas as combinações possíveis entre os fatores foram testadas (Tabela 2), resultando em 12 formulações - F1 até F12 - desenvolvidas em triplicata.

Tabela 2 – Combinação dos fatores nas formulações resultantes do delineamento fatorial $2^2 \times 3^1$, utilizado no desenvolvimento de protocolos de obtenção de nanopartículas poliméricas contendo AFB.

Formulações ^a	Polímeros		Solventes		
	P ^b (mg)	PPEG ^c (mg:mg)	Cl ^d (μ L)	Me ^e (μ L)	Ace ^f (μ L)
F1	50	-	800	-	-
F2	50	-	-	800	-
F3	50	-	-	-	800
F4	100	-	800	-	-
F5	100	-	-	800	-
F6	100	-	-	-	800
F7	-	50:10	800	-	-
F8	-	50:10	-	800	-
F9	-	50:10	-	-	800
F10	-	100:20	800	-	-
F11	-	100:20	-	800	-
F12	-	100:20	-	-	800

^a n = 3. ^b PLGA; ^c PLGA-PEG; ^d Clorofórmio; ^e Metanol; ^f Acetato de etila.

Os dados obtidos com as variáveis dependentes foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com desdobramento dos graus de liberdade, seguida de Teste de Tukey, e foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

Com o propósito de encontrar duas formulações ótimas frente aos parâmetros analisados, os dados foram divididos em dois grupos para se aplicar o tratamento estatístico: formulações contendo apenas PLGA como polímero (F1 – F6), e as formulações que apresentavam blends poliméricas de PLGA-PEG (F7 – F12).

4.4.3 Obtenção das nanopartículas contendo AFB

As nanopartículas poliméricas foram obtidas pela técnica da emulsificação/evaporação do solvente (VANDERHOFF, 1979; REIS et al., 2006, RAO e GECKELER, 2011), a partir de uma emulsão simples óleo em água (O/A).

Primeiramente, 5,0 mg de AFB foram exatamente pesadas e dissolvidas em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), onde adicionou-se 800 µL de solvente orgânico. Os solventes variaram entre clorofórmio, metanol e acetato de etila, cada qual em uma formulação uma vez que estes componentes são mutuamente excludentes. Em seguida, de acordo com cada formulação, 50 ou 100 mg de PLGA foram pesadas e dissolvidas em 1 mL de diclorometano. Estes fatores corresponderam à fase orgânica da formulação e foram vertidos na fase aquosa que consistiu de 10 mL de álcool polivinílico (PVA) na concentração de 1 % (v).

Esta pré-emulsão foi levada ao disruptor ultrassônico onde foi sonicada à temperatura ambiente durante 5 minutos, obtendo-se uma emulsão O/A. Durante todo o processo de sonicação foi aplicado banho de gelo para evitar a evaporação antecipada do solvente. Os solventes foram rapidamente removidos por rotaevaporação, a 37 ° C, sob pressão negativa.

Por fim, a dispersão de nanopartículas resultante foi isolada da AFB não encapsulada por processo de ultracentrifugação, a 14.000 rpm, 25° C, durante 30 minutos. Após a primeira centrifugação, coletou-se o sobrenadante para posterior análise e ressuspendeu-se o precipitado de NP's com 500 µL de água ultrapura. Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi novamente coletado e o precipitado ressuspensão em 400 µL de sacarose 5 % (m/v). As nanopartículas resultantes foram congeladas e em seguida liofilizadas para armazenamento.

O mesmo processo se deu para a obtenção das nanopartículas à base de blendas de PLGA-PEG, em que apenas o PLGA foi substituído pela mistura física de PLGA com PEG (50 mg de PLGA com 10 mg de PEG ou, por 100 mg de PLGA com 20 mg de PEG).

As NP's contendo AFB foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio, eficiência de encapsulação e agregação molecular, imediatamente após sua preparação e, portanto, previamente ao processo de congelamento e liofilização.

4.4.4 Caracterização físico-química

4.4.4.1 Eficiência de encapsulação do fármaco

A concentração de AFB incorporada às nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG foi

determinada indiretamente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pelo método previamente validado.

O sobrenadante que continha o fármaco livre e que fora coletado durante a etapa de ultracentrifugação, foi diluído em metanol (1:10 – v/v), filtrado em membrana de poro de 0,22 µm e injetado no sistema cromatográfico. As amostras foram medidas em triplicata.

Através deste procedimento estipulou-se a concentração de AFB não incorporada às nanopartículas. Subsequentemente, a eficiência de encapsulação (EE) foi calculada de acordo com a equação 3:

$$E.E.\% = \frac{AFB_{\text{inicial}} - AFB_{\text{livre}}}{AFB_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, AFB_{inicial} corresponde a concentração de AFB adicionada inicialmente à formulação e, AFB_{livre} é a concentração do fármaco não incorporado à partícula, quantificado no sobrenadante após ultracentrifugação. Os valores de EE dos lotes de nanopartículas foram utilizados nos cálculos do delineamento fatorial.

4.4.4.2 Diâmetro médio da partícula e índice de polidispersidade

Para esta análise foi empregada a técnica de espectroscopia de correlação de fótons também conhecida como *dynamic light scattering (DLS)*.

Uma alíquota de 20 µL da suspensão de nanopartículas foi coletada logo após o processo de rotaevaporação e dispersa em 4 mL de água ultrapura, ou seja, dispersa na proporção 1:200 (v/v). A cubeta contendo a amostra foi inserida na câmara de análise do equipamento de modo que o feixe de luz atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. Cada amostra foi mensurada dez vezes e a média e o desvio padrão foram registrados para posterior tratamento estatístico (delineamento fatorial).

As condições do teste foram:

- Ângulo do espalhamento: 90°.
- Temperatura: 25° C.
- Comprimento de onda do laser: 660 nm.

Adicionalmente, com base na mesma amostra mediu-se o índice de polidispersidade que fora registrado como média e desvio padrão (n = 10).

4.4.4.3 Agregação molecular da AFB nas nanopartículas

O estado de agregação da AFB nas nanopartículas foi analisado por espectrofotometria UV-visível, através de varredura na faixa de 300 a 450nm.

Todos os lotes de NP's produzidos foram submetidos ao teste espectrofotométrico, sendo que uma alíquota da ressuspensão de nanopartículas oriundas da primeira centrifugação no processo de obtenção, foi diluída em água ultrapura na proporção 1:50 (v/v) e submetida à análise.

AFB dissolvida em DMSO: metanol (50:50, v/v) e AFB dissolvida em DMSO: tampão PBS (pH 7,4, 0,01M) na proporção 50:50 (v/v), serviram de controles para comparação do estado de agregação molecular. As medidas foram expressas como variação da absorbância da amostra.

4.4.4.4 Espectroscopia: Difração de raios X

As informações sobre a cristalografia dos materiais presentes nas nanopartículas foram obtidas através da análise por difração de raios X (DRX). Os dados foram adquiridos através de um difratômetro que utilizou radiação de Cu K α numa voltagem de 30 kV e corrente de 10 mA, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$. A varredura de raios X foi executada em ângulo aberto de 2θ entre 5 e 60°.

Os difratogramas foram obtidos a partir de amostras de AFB livre, dos polímeros PLGA e PEG separadamente, das formulações de nanopartículas de PLGA contendo AFB (NP-AFB-PLGA) e nanopartículas de PLGA-PEG contendo AFB (NP-AFB-PLGA-PEG), das formulações correspondentes não carregadas de AFB e das misturas físicas dos polímeros e do fármaco.

4.4.4.5 Espectroscopia: Infravermelho

Para identificação dos principais grupos químicos dos compostos nas nanopartículas, aplicou-se uma análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para este ensaio as amostras foram preparadas em brometo de potássio (KBr) espectroscópico de modo a formarem pastilhas que foram analisadas na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

Os dados foram adquiridos a partir de amostras de AFB livre (forma comercial), dos polímeros PLGA e PEG separadamente, das formulações de NP-AFB-PLGA e NP-AFB-

PLGA-PEG e das misturas físicas dos polímeros com o fármaco.

4.4.5. Caracterização biológica

4.4.5.1 Atividade antifúngica – ensaio *in vitro*

Para a avaliação da atividade antifúngica em relação a AFB livre e associada às nanopartículas, utilizou-se as cepas de *Candida albicans* ATCC 64548 (American Type Culture Collection 64548) e de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, cultivadas em ágar Saboraud-dextrose. O ensaio baseou-se na técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*, norma M27 – A2 (NCCLS, 2002) com pequenas modificações.

Foram avaliadas amostras de AFB deoxicolato (padrão disponível comercialmente), AFB livre (Sigma-Aldrich), AFB associada às nanopartículas de PLGA e de PLGA-PEG e nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG não carregadas com o fármaco (inertes), nas concentrações finais de 0,0125; 0,025; 0,05; 0,5 e 5 µg/mL em meio RPMI para o teste com a cepa de *Candida*. Para o teste com a cepa de *Cryptococcus*, as concentrações finais empregadas foram 0,0125; 0,025; 0,05; 0,10 e 0,20 µg/mL.

Os controles positivos para ambos os testes corresponderam ao meio RPMI 1640 medium e inóculo com e sem DMSO. O controle negativo consistiu apenas de meio RPMI 1640 medium. Cada amostra foi analisada em triplicata.

O inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de fungos pela adequada diluição das colônias em salina estéril para obtenção da diluição de 1×10^6 a 5×10^6 UFC (unidades formadoras de colônias) /mL, seguida pela diluição em meio RPMI para obtenção da concentração final de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL, de acordo com a escala de Mc Farland.

As soluções padrão do fármaco foram preparadas em DMSO em uma concentração de 10 mg/mL e, em seguida, diluídas em salina até se atingir as concentrações finais desejadas. Os lotes de nanopartículas carregadas ou não com AFB foram descongeladas, pesadas e preparadas em salina na concentração de 10 mg/mL, das quais subsequentemente se obteve as concentrações finais para teste.

Na microdiluição foi utilizada microplaca de 96 poços, onde em cada poço foram adicionados 95 µL de meio RPMI, 100 µL do inóculo previamente padronizado e 5 µL das amostras testadas. A placa foi incubada a 37°C e a leitura visual foi efetuada após 24 horas,

de modo a estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM), correspondendo a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos fungos na placa.

Para verificação da concentração fungicida mínima (CFM), ou seja, a concentração capaz de exterminar o fungo de modo que nenhuma UFC seja identificada, procedeu-se a semeadura em placas de petri contendo ágar Sabouraud – dextrose e fez-se a contagem de colônias após a incubação por 24 e 48 horas.

A atividade *in vitro* das formulações de nanopartículas contendo AFB foi determinada pela CIM em comparação aos controles do teste.

4.4.5.2 Toxicidade celular - ensaio *in vitro*

Eritrócitos humanos foram o substrato celular utilizado para análise da toxicidade das nanopartículas contendo AFB. Amostras de sangue foram coletadas de voluntários sadios em tubos contendo heparina sódica. Toda a preparação do ensaio baseou-se em descrições da literatura (TORRADO et al., 2008, SOWEMIMO-COKER, 2002). O sangue total coletado foi centrifugado a 4°C, (1200 x g por 10 min), retirando-se o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. Em seguida, a suspensão foi lavada com solução gelada de NaCl 0,85% por três vezes. Glicose (1,08 mg/mL) e os antibióticos penicilina (0,3 mg/mL) e estreptomicina (0,5 mg/mL) foram adicionados a solução de NaCl tamponada utilizada para acertar o volume globular para 1,0 % (JAIN; RAINS; JONES, 2006).

As concentrações de 25 e 50 µg/mL de AFB livre (pó liofilizado), AFB deoxicolato, AFB associada à formulação de nanopartículas de PLGA ou da blenda PLGA-PEG foram incubadas com a solução de eritrócitos a 37°C, sob constante agitação (150 rpm). Controles com as mesmas concentrações de DMSO, água destilada, tampão PBS pH 7,4 NaCl 0,85% e as nanopartículas não carregadas com AFB, também foram incubadas com a solução de eritrócitos. Em tempos pré-determinados: 1, 2, 4, 6, 12 e 24h, a agitação foi interrompida e os tubos centrifugados (1200 rpm por 5 minutos) para retirada do sobrenadante contendo a hemoglobina liberada pela lise dos eritrócitos.

A toxicidade dos sistemas nanoestruturados foi avaliada pela absorbância da hemoglobina verificada pelo espectrômetro de placas, operado em 540 nm (FUKUI et al., 2003). A análise foi efetuada em triplicata e os dados foram exibidos em percentual de hemólise, cujo qual foi calculado de acordo com a equação 4:

$$\% \text{ Hemólise} = 100 \times (\text{Abs}_a - \text{Abs}_{\text{CN}}) / (\text{Abs}_{\text{CP}} - \text{Abs}_{\text{CN}}) \quad \text{Equação 4}$$

Onde, Abs_a corresponde a absorbância da amostra, Abs_{CN} é o controle negativo, ou seja, as hemácias incubadas somente com tampão e Abs_{CP} é a absorbância do controle positivo (TORRADO et al., 2008), ou seja, o que fora considerado 100% de hemólise que no estudo em questão correspondeu a amostra de AFB livre de mesma concentração da amostra em teste.

4.4.5.3 Toxicidade – ensaio *in vivo*

Para os ensaios de toxicidade *in vivo*, foram utilizados 32 ratos *Wistar* machos provenientes do Biotério Central da UNICENTRO, pesando em média 180,32 g (n = 32). Os animais foram adaptados em gaiolas por 5 dias para ambientação, onde tiveram acesso à água e ração *ad libitum*. As condições de luminosidade corresponderam à 12h claro/escuro e a temperatura controlada de 18° - 22° C (SILVA et al, 2011). Após o período de ambientação, iniciou-se o experimento onde os animais permaneceram no ambiente controlado, com a diferença de que foram deixados em jejum alimentar por 8 h antes da administração dos testes.

As vias de administração empregadas foram a via oral (v.o.) ou intraperitoneal (i.p.), o veículo de administração dos testes correspondeu a 1,0 mL de tampão fosfato salina pH 7,4 0,01 M, uma vez ao dia, por 7 dias consecutivos.

Foram constituídos 7 grupos, sendo 5 animais por grupo de acordo com os tratamentos:

- **Grupo 1 – controle negativo:** tampão fosfato salina v.o.
- **Grupo 2:** suspensão de nanopartículas de PLGA contendo AFB – via i.p.
- **Grupo 3:** suspensão de nanopartículas de PLGA-PEG contendo AFB – via i.p.
- **Grupo 4:** suspensão de nanopartículas de PLGA contendo AFB – v.o.;
- **Grupo 5:** suspensão de nanopartículas de PLGA-PEG contendo AFB – v.o.
- **Grupo 6:** padrão comercial de AFB – Deoxicolato – v.o.;
- **Grupo 7:** padrão comercial de AFB – Deoxicolato – via i.p.

Os ratos foram pesados previamente ao início do tratamento, bem como diariamente para o cálculo da dose e para monitoração do ganho ou redução de peso. A dose diária correspondeu a 10 mg/Kg e foi estabelecida de acordo com a extrapolação alométrica

(NEERVANNAN, 2006), considerando a taxa metabólica basal humana e extrapolando para o modelo animal em estudo.

A eutanásia ocorreu no 8º dia de experimento tendo decorrido o tempo experimental de administração do fármaco e das nanopartículas. Nesta ocasião, os animais receberam a associação dos anestésicos xilazina e quetamina via intramuscular, na dose de 20 mg/kg e 50 mg/kg respectivamente, cada uma delas em seringa separada. Após a dormência do animal procedeu-se a decapitação e em seguida as coletas de sangue e tecidos. Todos os ensaios atenderam o disposto na Resolução nº 714/2002 do Conselho Federal de Medicina, que dá providências sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

Testes hematológicos:

Para avaliar se as nanopartículas não comprometeram as funções hematológicas dos animais, procedeu-se uma investigação dos componentes sanguíneos. Primeiramente, cerca de 1,0 mL de sangue e cada animal foi coletado em tubo contendo EDTAK e realizou-se a contagem de células brancas polimorfonucleares e mononucleares, de eritrócitos, dosagem de hemoglobina e pesquisa do hematócrito.

Testes bioquímicos:

Após a coleta do sangue para os testes hematológicos, cerca de 2,0 mL de sangue foram coletados de cada animal em tubo contendo EDTAK, para as análises bioquímicas. As amostras de sangue coletadas foram imediatamente analisadas em um analisador bioquímico semi-automático. Os testes realizados foram: avaliação dos níveis de creatinina e uréia; alanina amino transferase (ALT/GPT); e, aspartato amino transferase (AST/GTO).

A tabela 3 resume as metodologias adotadas para os testes bioquímicos e a que finalidade foram investigados.

Tabela 3 - Metodologia e finalidade empregada nos exames bioquímicos.

Exame	Metodologia	Finalidade
Creatinina	Colorimétrica – (Picrato alcalino – Jaffé) Labtest®	Marcador de função renal.
Uréia	Colorimétrica –(Urease) Labtest®	Marcador de função renal.
ALT/GPT	Cinética UV-IFCC - Labtest®	Marcador de função hepática
AST/GTO	Cinética UV-IFCC - Labtest®	Marcador de função hepática

Testes histopatológicos:

Subsequentemente às coletas de sangue, foram extraídos os rins e o fígado dos animais para a avaliação histopatológica do efeito das nanopartículas nos tecidos.

Os tecidos foram removidos dos animais com o auxílio de pinças anatômicas e tesouras curvas, e então depositados em frasco contendo formol a 10% (v). Os frascos foram encaminhados ao Centro de Anatomia Patológica e Citopatologia Ltda (Guarapuava, Paraná).

Todos os procedimentos aplicados no ensaio *in vivo* foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais – CEUA, da UNICENTRO, conforme parecer favorável nº 034/2012, ofício nº 013/2012.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise quantitativa de AFB em solução

Testes iniciais para a fase móvel foram realizados utilizando acetonitrila, ácido acético, metanol e água em várias proporções, de modo que os picos de AFB apresentavam-se largos e irregulares. Assim, retirou-se o ácido acético da composição da fase móvel e observou-se melhora na apresentação dos picos, sendo que estes se apresentaram mais estreitos e em um tempo de retenção inferior ao anterior.

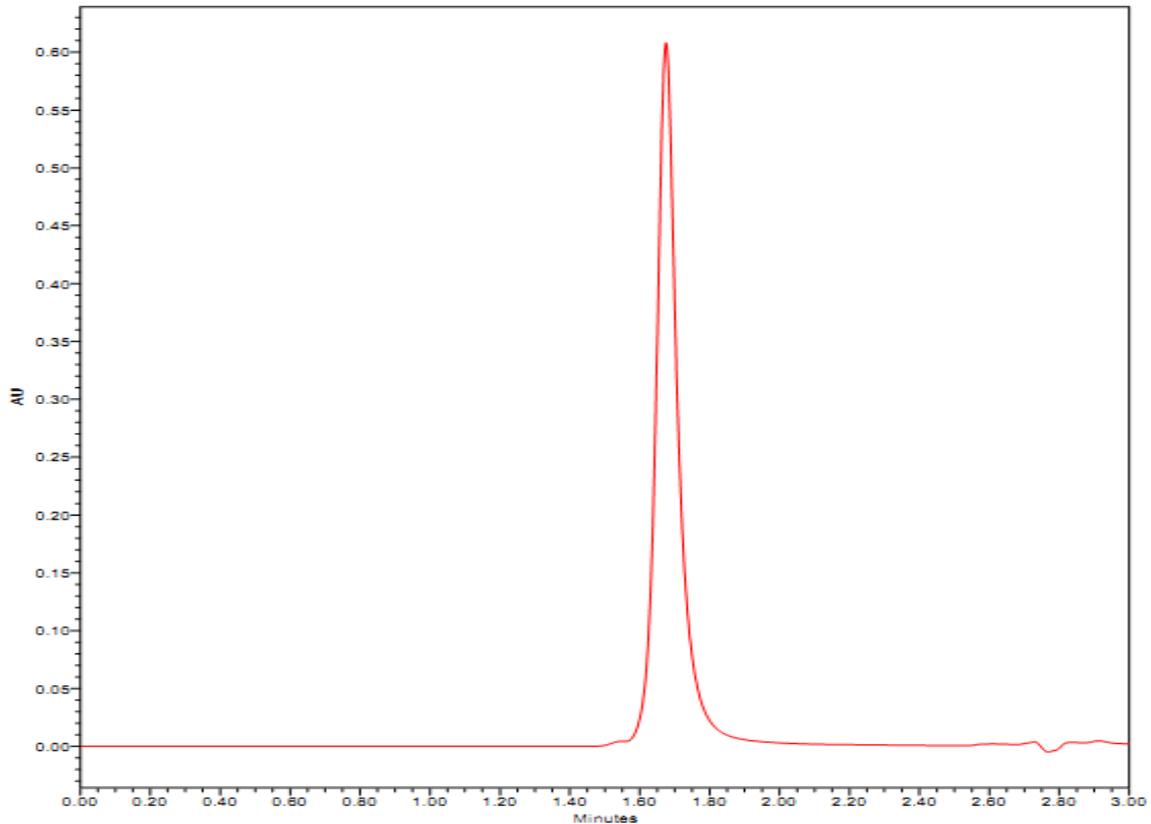
Várias proporções dos componentes acetonitrila, metanol e água foram testadas: 30:60:10, 60:30:10 40:40:20, (v/v/v), com o intuito de melhorar a simetria do pico. A proporção 40:50:10 (v/v/v) de acetonitrila, metanol e água, respectivamente, foi a que apresentou picos mais estreitos e simétricos, além de um tempo de retenção reduzido.

Desta forma, as condições cromatográficas e a fase móvel foram os primeiros parâmetros a serem definidos:

- Fase móvel: acetonitrila, metanol e água – 40: 50: 10 (v/v/v).
- Vazão da fase móvel: 1,0 mL/min.
- Eluição isocrática.
- Detector: PDA – UV-Vis.
- Coluna fase reversa C18 (25cm x 4mm) tamanho de partícula 5 μ m – Xterra Waters.
- Temperatura da coluna: 25° C.
- Comprimento de onda: 408 nm.
- Volume de injeção: 20 μ L.

A fase móvel estipulada mostrou-se eficaz na quantificação de AFB, uma vez que resultou em picos simétricos e praticamente sem ruídos de base, conforme demonstra a Figura 5.

Figura 5 - Cromatograma da solução padrão de AFB de 25 µg/mL. Fase móvel: acetonitrila, metanol e água (40:50:10, v/v/v), λ: 408 nm.

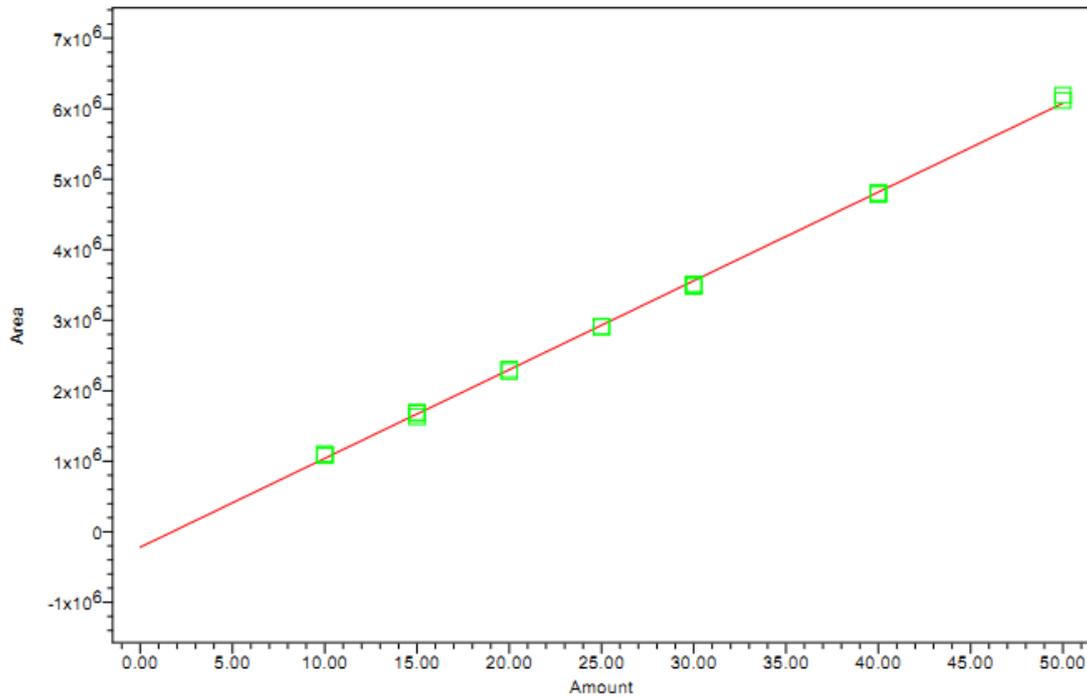


Estas condições cromatográficas foram adequadas para quantificação de AFB no sobrenadante das nanopartículas produzidas, verificando-se um tempo de retenção do pico de aproximadamente 1,7 minutos. Este tempo reduzido de corrida para leitura das amostras constituiu um dos pontos positivos encontrados nesta validação.

Linearidade:

A curva analítica obtida a partir dos sete níveis de concentração (10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 µg/mL) demonstrou a linearidade do método, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Curva analítica de AFB em metanol. Fase móvel: acetonitrila, metanol e água (40:50:10 v/v/v), λ : 408 nm. Equação da reta: $y = 1,26 \cdot 10^5 x - 2,19 \cdot 10^5$ ($r = 0,9995$).



Além dos coeficientes de regressão (a e b na equação da reta), foi obtido o coeficiente de correlação (r), que foi 0,9995. Este foi um resultado importante porque esse parâmetro indica a qualidade da curva analítica, quanto mais próximo a 1,0 for r , menor a dispersão dos pontos experimentais e mais confiável será a determinação das concentrações dos analitos a partir do método cromatográfico estabelecido (RIBANI, 2004).

Especificidade:

Os resultados decorrentes da exposição dos padrões de AFB em metanol (10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, $n = 3$) às condições de estresse estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do teste de especificidade para amostras de AFB sob condições de estresse.

Condições de estresse	Concentração da amostra	Porcentagem de recuperação \pm DPR*	Média de recuperação \pm DPR*
Luz visível por 24 h	10,0 $\mu\text{g/mL}$	96,13 \pm 5,38	97,85 \pm 1,91
	25,0 $\mu\text{g/mL}$	99,90 \pm 1,77	
	50,0 $\mu\text{g/mL}$	97,51 \pm 2,31	
Congelamento por 24h	10,0 $\mu\text{g/mL}$	92,03 \pm 3,58	96,03 \pm 3,61
	25,0 $\mu\text{g/mL}$	99,07 \pm 1,63	
	50,0 $\mu\text{g/mL}$	96,99 \pm 2,19	
Variação de pH: NaOH	10,0 $\mu\text{g/mL}$	--	--
	25,0 $\mu\text{g/mL}$	--	
	50,0 $\mu\text{g/mL}$	--	
Variação de pH: HCl	10,0 $\mu\text{g/mL}$	105,12 \pm 1,88	97,33 \pm 7,07
	25,0 $\mu\text{g/mL}$	95,55 \pm 0,88	
	50,0 $\mu\text{g/mL}$	91,32 \pm 0,95	

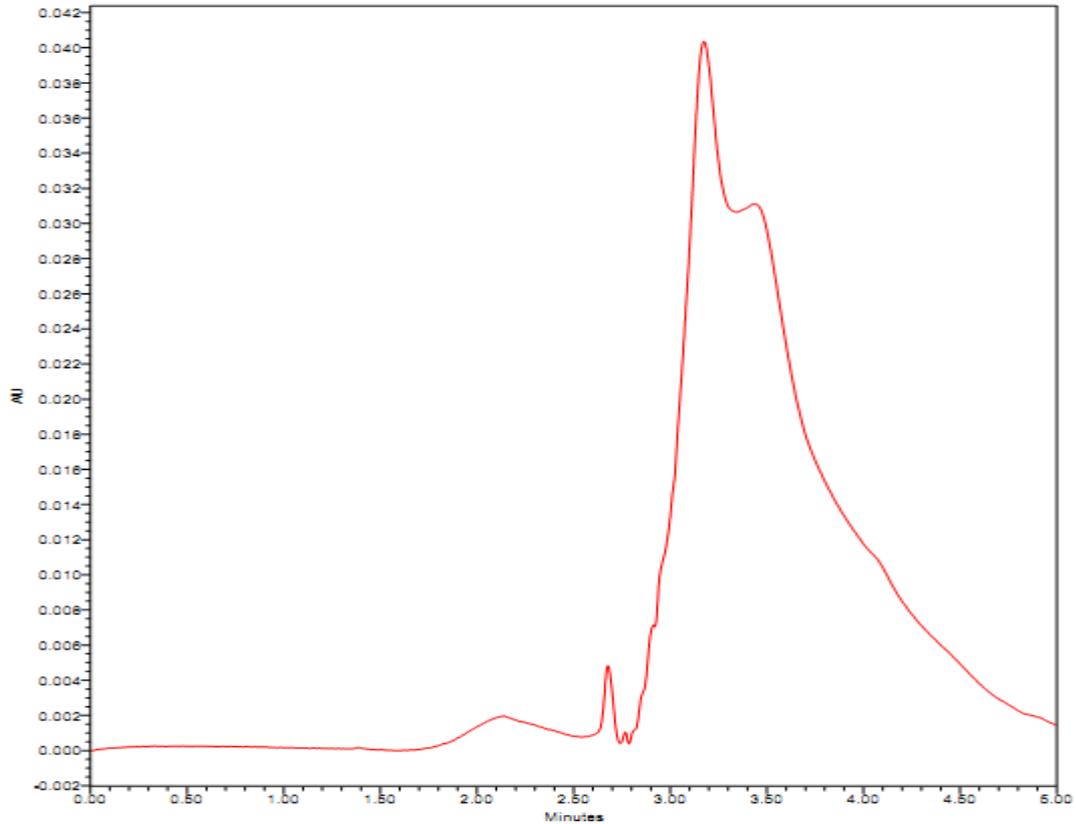
* DPR = Desvio Padrão Relativo (n = 3).

A recuperação elevada, próxima a 100%, atendeu as exigências preconizadas pela legislação e demonstrou que mesmo quando submetida à luz visível a AFB pôde ser quantificada de modo inequívoco, sem o surgimento de picos inesperados. Ou seja, o método analítico demonstrou especificidade mesmo na presença de produtos derivados da fotodegradação característica da amostra.

A recuperação também se manteve satisfatória na leitura das amostras que foram mantidas à -18°C , por 24h, e naquelas submetidas a acidificação através da adição de HCl 0,5M por 1h.

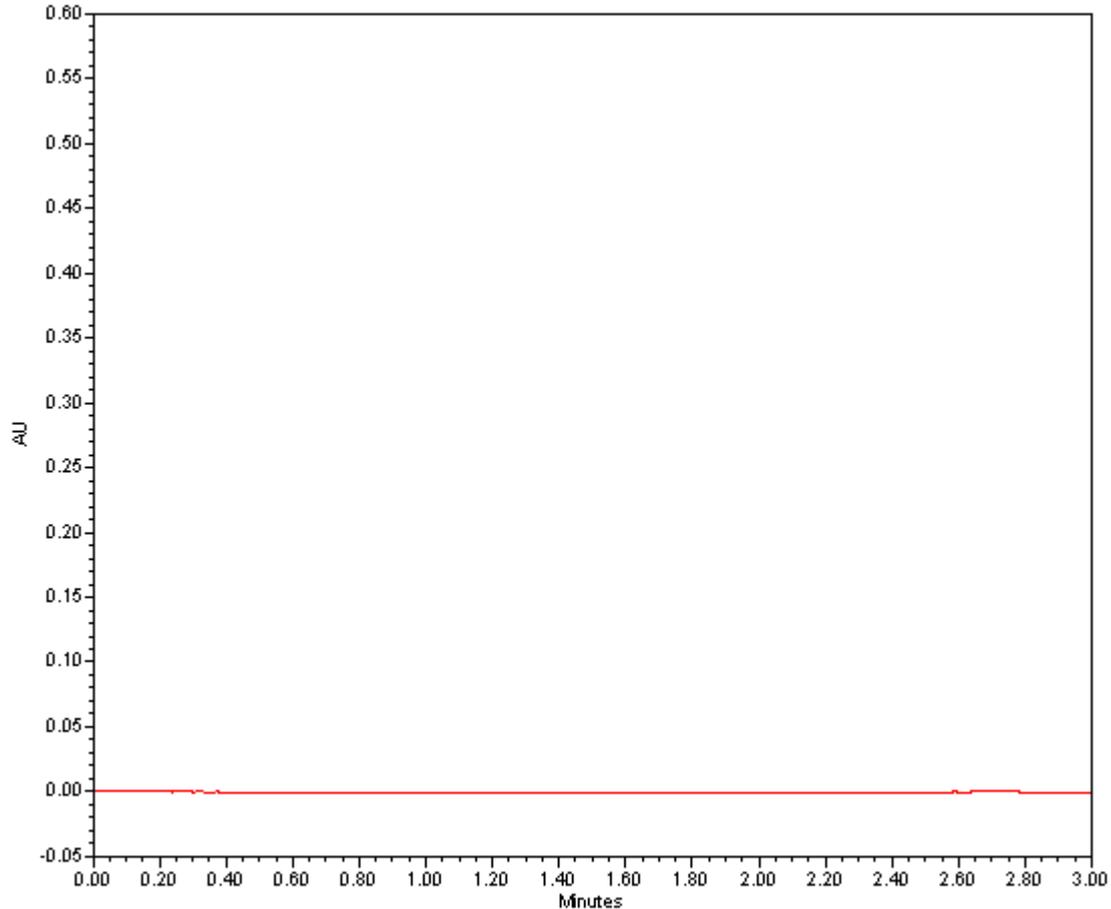
Na leitura da amostra de AFB submetida ao teste de pH envolvendo NaOH 0,5M, houve o surgimento de picos inesperados (Figura 7) e não foi possível a detecção do fármaco. Provavelmente parte da molécula de AFB sofreu esterificação catalisada pelo NaOH, produzindo por conseguinte subprodutos que interferiram na absorvância e consequente quantificação da amostra.

Figura 7 - Cromatograma da amostra de AFB 25 $\mu\text{g/mL}$ tratada com NaOH 0,5M, por 1h. Fase móvel: acetonitrila, metanol e água (40:50:10, v/v/v), λ :408 nm.



Um possível interferente na quantificação indireta de AFB a partir de nanopartículas é o PVA, pois, permanece no sobrenadante após a etapa de centrifugação no desenvolvimento das partículas. A Figura 8 apresenta o pico produzido pelo PVA 1% (v/v) e, de acordo com o tempo de retenção (aproximadamente 2,5 min) e a absorbância apresentada (cerca de 0,0012), afirma-se que este composto não produz interferência na identificação da AFB pelo método cromatográfico.

Figura 8 - Cromatograma da amostra de PVA 1% (v/v). Fase móvel: acetonitrila, metanol e água (40:50:10, v/v/v), λ :408 nm.



Precisão:

Uma vez que a precisão de um método diz respeito a reprodução dos mesmos resultados a cada vez que o procedimento é executado sob as mesmas condições, pode-se afirmar com base nos testes efetuados que o método por CLAE desenvolvido é preciso.

Os resultados estão registrados na tabela 5 e são provenientes de testes conduzidos em dois níveis: intra-corrída ou de repetibilidade, e inter-corrída ou intermediário. A precisão de repetibilidade foi estabelecida a partir de nove determinações, contemplando o intervalo da curva padrão, isto é, três concentrações diferentes: baixa (10 $\mu\text{g/mL}$), média (25 $\mu\text{g/mL}$) e alta (50 $\mu\text{g/mL}$), com três réplicas cada. A precisão intermediária foi realizada em dias diferentes, porém, a partir do mesmo procedimento e a partir das três concentrações em triplicata citadas acima.

Tabela 5 – Resultados do teste de precisão para amostras de AFB.

	Solução Padrão (µg/mL)	Média da concentração medida (µg/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Análise intra-corrida				
Dia 1	10,0	10,57	0,25	2,45
	25,0	25,88	0,60	2,32
	50,0	51,50	0,39	0,75
Análise inter-corridas				
Dia 2	10,0	10,46	0,03	0,29
	25,0	23,97	0,61	2,56
	50,0	48,21	1,69	3,51
Dia 3	10,0	10,58	0,03	0,28
	25,0	26,14	0,71	2,74
	50,0	48,32	0,68	1,42
Dia 4	10,0	10,62	0,12	1,17
	25,0	24,83	0,90	3,64
	50,0	47,16	0,14	0,30

Os resultados confirmam a precisão pois, os valores do coeficiente de variação (CV) foram inferiores a 5%, correspondendo ao pretendido pela Resolução da ANVISA e guia internacional de validação analítica.

Exatidão:

As mesmas amostras utilizadas no teste de precisão serviram para a análise do parâmetro de exatidão do método. Tal exatidão foi confirmada devido à proximidade dos valores obtidos em comparação aos valores teóricos.

A percentagem de recuperação foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Tabela 6), com critério de aceitação compreendido entre os valores de 95 e 105% de recuperação (ANVISA, 2003).

Tabela 6 - Resultados do teste de exatidão para amostras de AFB.

Solução padrão AFB ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Desvio padrão relativo (%)
10	104,66	0,29
25	95,88	2,56
50	96,43	3,51

Robustez:

Algumas alterações no método cromatográfico foram aplicadas para testar a capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. As variações foram: alterações de proporções da fase móvel, alteração no fluxo de vazão do aparelho (0,9 e 1,1 mL/min) e alterações na temperatura da coluna (20° e 30° C). O resultado deste ensaio foi expresso por meio da percentagem de recuperação e desvio padrão relativo (DPR) e está detalhado na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do teste de robustez para amostras de AFB.

Variações	Recuperação (%) \pm DPR		
	10 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
Fluxo 0,9 mL/min	105,16 \pm 0,38	104,96 \pm 0,84	102,57 \pm 0,88
Fluxo 1,1 mL/min	93,78 \pm 0,46	93,24 \pm 1,14	100,46 \pm 0,15
Temperatura 20° C	94,65 \pm 0,39	97,79 \pm 0,37	95,41 \pm 1,56
Temperatura 30° C	96,56 \pm 0,25	96,58 \pm 0,58	103,58 \pm 1,22
Fase Móvel	102,77 \pm 0,20	104,09 \pm 0,69	101,99 \pm 0,68

Nas condições cromatográficas originais o fluxo estabelecido era de 1,0 mL/min e a pequena variação de 0,1 mL para mais e para menos, proporcionou uma recuperação próxima a 100%, indicando a robustez do método. O parâmetro temperatura foi alterado em 5° C, para mais e para menos, e igualmente não houve alterações significativas na percentagem de recuperação.

A fase móvel no método original constituía de 40% de acetonitrila, 50% de metanol e 10% de água e a variação efetuada para o teste correspondeu a 45% de acetonitrila, 50% de metanol e 5% água, ou seja, uma pequena variação que resultou numa recuperação média dos três padrões de 102,95%.

Esse ensaio foi útil para demonstrar que o método de CLAE desenvolvido apresenta

robustez, pois, manteve sua resposta em meio a pequenas e deliberadas alterações de análise.

Limites de detecção e quantificação:

Empregando as equações 1 e 2 (item 4.3.1.) e os valores da inclinação da curva e desvio padrão do intercepto com o eixo Y, foi possível estabelecer o LD e o LQ do método.

O LD foi de 0,16 µg/mL e o LQ foi de 0,49 µg/mL, valores que denotam sensibilidade do método e confiabilidade para análises de concentrações baixas de analito, como é o caso da quantificação de AFB no sobrenadante das nanopartículas e detecção em ensaios de liberação prolongada.

5.2 Obtenção das nanopartículas contendo AFB

As nanopartículas foram obtidas com êxito através do método de emulsificação/evaporação do solvente, por meio de uma emulsão simples O/ A. Foram desenvolvidos doze lotes de nanopartículas contendo AFB, em triplicata, os quais serviram para o estudo fatorial com o objetivo de encontrar uma formulação ótima de PLGA e outra da blenda PLGA-PEG.

Este método é amplamente utilizado na produção de nanopartículas poliméricas para carreamento de fármacos, onde é possível associar ativos hidrofílicos e hidrofóbicos (RAO e GECKELER, 2011).

No caso da AFB, um fármaco hidrofóbico, as taxas de associação obtidas foram bastante interessantes, uma vez que a menor eficiência de encapsulação registrada foi $71,2 \pm 20,3\%$ para as NP's de PLGA e $62,8 \pm 1,5\%$ para as NP's de PLGA-PEG.

Ademais, o método se mostrou eficiente na produção de partículas com diâmetro reduzido, pois, as formulações definidas como ótimas através do delineamento fatorial, atingiram diâmetros de $169,8 \pm 6,9$ nm (PLGA-PEG) e $181,4 \pm 12,4$ nm (PLGA).

A relativa simplicidade de reprodução do método, as características do fármaco que foi encapsulado, a indicação para produção de nanopartículas a partir de polímeros biodegradáveis, bem como, a possibilidade de controlar alguns parâmetros envolvidos na preparação (velocidade homogeneização, intensidade sonicação, volume das fases aquosas ou orgânicas, etc), fizeram com que esse método fosse eleito como ideal para o presente trabalho

5.3 Delineamento fatorial: estabelecimento da formulação ótima

A escolha das variáveis independentes do delineamento fatorial foi influenciada por

outros estudos como o de Rao e Geckeler (2011), por exemplo, que afirma que a concentração de polímero e o solvente utilizado na formulação afetam diretamente as propriedades finais de nanopartículas poliméricas (NP's), preparadas a partir do método de evaporação do solvente.

O protocolo fatorial resultou em 12 formulações de nanopartículas contendo AFB (NP-AFB), consideradas as possíveis combinações de variáveis independentes (conforme descrito no item 4.4.2. – tabela 2). Os dados da mensuração das variáveis independentes foram divididos em dois grupos para análise: as formulações constituídas de PLGA como polímero (F1 - F6), e àquelas constituídas a partir de blends de PLGA e PEG (F7 - F12). Sendo assim, aqui serão discutidas também separadamente.

5.3.1 Formulações F1 – F6 (PLGA)

5.3.1.1 Diâmetro médio das partículas de PLGA

A Tabela 8 descreve as seis formulações testadas no delineamento envolvendo o polímero PLGA, bem como demonstra os valores obtidos para o tamanho médio da partícula.

Tabela 8 – Composição das formulações constituídas apenas de PLGA como polímero resultante do desenho fatorial $2^2 \times 3^1$ e dados obtidos para o tamanho médio das partículas contendo AFB.

Formulações	Polímero	Solventes			Variável dependente
	PLGA (mg)	Clorofórmio (µL)	Metanol (µL)	Acetato de etila (µL)	Diâmetro médio das partículas (nm)*
F1	50	800	-	-	255,2 ± 57,5
F2	50	-	800	-	338,2 ± 22,1
F3	50	-	-	800	189,5 ± 9,0
F4	100	800	-	-	301,8 ± 38,1
F5	100	-	800	-	705,5 ± 235,8
F6	100	-	-	800	181,4 ± 12,4

* Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n=3).

O diâmetro médio da partícula é um importante parâmetro a ser considerado na otimização de uma formulação, pois, influencia as características biofarmacêuticas e o perfil de liberação do fármaco a partir da nanoestrutura (HERMANS et al., 2012).

Como demonstra a Tabela 8, as formulações desenvolvidas no presente estudo apresentaram um diâmetro médio de acordo com o esperado, haja vista que para NP's contendo fármacos é aceitável diâmetros menores que 300 nm (GUPTA e KOMPELLA, 2006). No entanto, observa-se que as formulações que empregaram metanol como solvente (F2 e F5), e a que empregou clorofórmio combinado a concentração de 100 mg do polímero (F4), apresentaram diâmetros superiores a 300 nm. A formulação F5 (100 mg PLGA e metanol) foi a que apresentou maior diâmetro médio: 705,5 nm (n = 3).

Para avaliar esta divergência nos tamanhos de partículas encontrados, a partir da influência de cada variável e de uma possível interação entre elas, foi conduzida ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade (Tabela 9).

Tabela 9 – ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade, comparando o tamanho médio das partículas de PLGA contendo AFB.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>SQ^a</i>	<i>QM^b</i>	<i>Valor F calculado</i>
Solvente (S)	2	362133,643	181066,821	17,785*
Polímero (P)	1	82377,405	82377,405	8,091*
Interação (S x P)	2	123350,804	61675,402	6,058*
Tratamento	5	567861,852	-	-
Resíduo	12	122168,233	10180,686	-
Total	17	690030,085	-	-

^a Soma dos quadrados. ^b Quadrados médios.* Estatisticamente significativo = F calculado > F tabelado (p < 0,05).

Conforme indica o valor de F na tabela 9, os resultados demonstraram significância estatística não só dos fatores isolados – (S) e (P) - como também uma interação entre eles – (S x P). Ou seja, o tamanho das partículas desenvolvidas é diretamente afetado pela combinação da concentração de polímero - 50 ou 100 mg - e o solvente empregado.

Frente a esta interação, procedeu-se o estudo do desdobramento da interação (S x P), (Tabela 10), para encontrar qual interação era favorável, ou seja, qual solvente combinado ao PLGA poderia ser considerado ideal.

Tabela 10 – ANOVA com desdobramento da interação solventes x polímero, fixando-se a variável polímero na análise do parâmetro diâmetro médio das partículas de PLGA contendo AFB.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>SQ^a</i>	<i>QM^b</i>	<i>Valor F calculado</i>
PLGA x Clo	1	3266,667	3266,667	0,321 ^{NS}
PLGA x Me	1	202363,935	202363,935	19,877*
PLGA x Ace	1	97,607	97,607	0,009 ^{NS}
Resíduo	12	122168,233	10180,686	-

^a Soma dos quadrados. ^b Quadrados médios. Clo: clorofórmio, Me: metanol e Ace: acetato de etila. NS: não significativo. * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Foi possível observar através do valor de F da Tabela 10 que, quando utilizou-se clorofórmio ou acetato de etila combinado a qualquer concentração de PLGA dentre as testadas (50 ou 100 mg) não houve uma interação significativa ($p > 0,05$), sendo possível detectar o efeito deles somente em separado.

Observando-se o valor de F calculado para o metanol, 19,877 e comparando-se ao valor de F tabelado: 4,75, α : 5%, afirma-se que o metanol apresentou forte interação com o PLGA de modo a influenciar o diâmetro das NP's. Esta forte interação pode ser a explicação para os tamanhos maiores das formulações F2 e F5 que empregaram este solvente.

Outro estudo investigando o efeito do metanol no diâmetro médio de formulações nanotecnológicas, concluiu que a adição de metanol resultou em um aumento do diâmetro da partícula (KHAN et al., 2011). Tal fato pode ser explicado pela característica prótica do metanol que diminui sua constante dielétrica pela facilidade em doar prótons e que é inversamente proporcional ao tamanho da partícula (KHAN et al., 2011).

Uma vez que a interação do solvente já estava elucidada, prosseguiu-se na investigação da interação (S x P) para se obter qual a concentração ideal de polímero para a promoção da interação adequada com o solvente. Neste sentido, foi conduzido um estudo de desdobramento estatístico isolando-se os solventes como um todo e variando as duas concentrações de PLGA. Os dados desse desdobramento estão explicitados na Tabela 11.

Tabela 11 – ANOVA com desdobramento da interação solventes x PLGA, baseando-se no tamanho médio das partículas contendo AFB.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>SQ^a</i>	<i>QM^b</i>	<i>Valor F calculado</i>
Solventes x P ₅₀ ^c	2	33333,787	16666,893	1,637 ^{NS}
Solventes x P ₁₀₀ ^d	2	452150,660	226075,330	22,206*
Resíduo	12	122168,233	10180,686	-

^a Soma dos quadrados. ^b Quadrados médios. ^c 50mg PLGA. ^d 100mg PLGA. NS: não significativo. * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Analisando os resultados do valor de F na Tabela 11, observou-se que 50 mg de PLGA não produziram efeito sobre o tamanho das amostras, já 100 mg do polímero produziram efeito significativo. Esse resultado diverge do que fora descrito na bibliografia onde altas quantidades de polímero são desfavoráveis, pois levam a formação de partículas maiores, devido ao aumento da frequência de colisão das unidades e conseqüente coalescência das gotículas de modo a formar partículas maiores (BECK-BROICHSITTER et al., 2012 VITORINO et al., 2011).

A explicação para o resultado positivo encontrado no presente trabalho ao empregar 100 mg do polímero pode estar relacionada a concentração do surfactante, haja vista que no método de emulsificação evaporação do solvente a formação das partículas se dá gota a gota. NP's com reduzido diâmetro só serão obtidas pela cobertura adequada de surfactante entre a interface aquosa e orgânica, de modo a garantir a estabilidade da gota na emulsão e evitar a coalescência durante a evaporação do solvente (BECK-BROICHSITTER et al., 2012). Assim, o volume e a concentração de surfactante, 10 mL, álcool polivinílico, 1% (v/v) foi adequado para produção de partículas de diâmetro reduzido.

De acordo com os resultados dos desdobramentos (Tabelas 10 e 11), e baseando-se na hipótese de que a formulação ótima é aquela que apresenta interação entre seus componentes, poderia inferir-se que as formulações ótimas de PLGA para a produção de NP's com diâmetro reduzido seriam aquelas que empregaram o metanol como solvente (Tabela 10) e 100 mg de PLGA (Tabela 11).

No entanto, conforme mencionado anteriormente, apesar de haver uma forte interação de 100 mg de PLGA com o metanol, esta não foi uma interação favorável pois, produziu partículas de diâmetros muito elevados, não sendo positivo apontá-la como a formulação ótima.

Neste sentido, apoiando-se na informação da Tabela 11 que registra 100 mg de PLGA como concentração ótima para interação com os solventes, foi aplicado o Teste de Tukey para se obter a diferença mínima significativa (d.m.s.) entre as formulações F4, F5 e F6, ou seja, aquelas que empregaram a concentração de 100 mg de PLGA.

Para o Teste de Tukey, empregou-se do valor de q (3 tratamentos e 12 graus de liberdade = 3,77), para o cálculo da d.m.s.:

$$\text{d.m.s.} = q \times (\text{QM}_{\text{resíduo}} / r)^{1/2} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

$$q = 3,77$$

$$\text{QM}_{\text{resíduo}} (\text{quadrado médio do resíduo}) = 10180,686$$

$$r (\text{número de repetições}) = 3$$

O valor encontrado para d.m.s. foi 219,619 e este serviu para se estabelecer as diferenças entre as médias de tamanho das formulações (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores correspondentes às diferenças entre as médias de diâmetro e estabelecimento da d.m.s. entre as formulações F4, F5 e F6.

Pares de médias ^a	Δ^b (nm)	d.m.s.	Conclusão
F4 x F5	403, 70	219,619	Há diferença estatística
F4 x F6	120,40	219,619	Não há diferença estatística
F5 x F6	524,10	219,619	Há diferença estatística

^a F4: 100 mg PLGA e clorofórmio; F5: 100 mg de PLGA e metanol; F6: 100 mg de PLGA e acetato de etila. ^b Diferença entre médias do diâmetro das partículas.

A conclusão do Teste de Tukey apresentada na Tabela 12 levou em consideração a afirmação de que diferença estatisticamente significativa entre as médias se dá quando Δ for maior ou igual a d.m.s. Assim sendo, interpretou-se que a formulação contendo clorofórmio (F4) e aquela contendo acetato de etila (F6), produzem o mesmo efeito sobre o tamanho das partículas, uma vez que são estatisticamente iguais entre si. A formulação F5 que emprega o metanol como solvente apresentou d.m.s. em relação a F4 e F6, logo, foi possível excluí-lo porque além de produzir as maiores NP-AFB, é estatisticamente diferente das outras duas formulações que apresentaram os menores diâmetros para as NP-AFB.

Desse modo, concluiu-se que a concentração ideal de PLGA para produção de NP-AFB de diâmetros reduzidos é de 100 mg, e, os solventes que apresentam melhor resultado

frente aos demais são é o acetato de etila e o clorofórmio. Sendo que não há uma d.m.s entre estes dois solventes, estabeleceu-se o acetato de etila para a formulação ótima por produzir as menores partículas, $181,4 \pm 12,4$ nm ($n = 3$), comparando-se com o clorofórmio, $301,8 \pm 38,1$ nm ($n = 3$).

Esse resultado corrobora com os achados em outros estudos como o de Mainardes e Evangelista (2005), ou o de Freytag e colaboradores (2000), que encontrou os menores diâmetros nas partículas quando aplicado o acetato de etila como solvente. Uma boa explicação diz respeito a característica do solvente de rápida partição na fase aquosa (externa) da emulsão devido a miscibilidade parcial em água. Essa rápida partição é acompanhada da precipitação do polímero e produção de partículas pequenas, no entanto, muitas vezes essa característica pode conferir diminuída incorporação do fármaco na partícula (FREYTAG et al., 2000).

5.3.1.2 Eficiência de encapsulação do fármaco nas NP's de PLGA

A mesma análise fatorial foi aplicada ao parâmetro de eficiência de associação da AFB às nanopartículas. A Tabela 13 exhibe os resultados para as formulações empregando PLGA como polímero.

Tabela 13 – Composição das formulações constituídas apenas de PLGA como polímero resultante do desenho fatorial $2^2 \times 3^1$ e dados obtidos para eficiência de encapsulação de AFB nas nanopartículas.

Formulações	Polímero	Solventes			Variável dependente
	PLGA (mg)	Clorofórmio (μ L)	Metanol (μ L)	Acetato de etila (μ L)	Eficiência de encapsulação (%)*
F1	50	800	-	-	$71,2 \pm 20,3$
F2	50	-	800	-	$95,5 \pm 0,9$
F3	50	-	-	800	$91,6 \pm 2,30$
F4	100	800	-	-	$73,2 \pm 14,4$
F5	100	-	800	-	$95,3 \pm 2,50$
F6	100	-	-	800	$94,0 \pm 1,30$

* Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Os altos índices de eficiência de encapsulação constituem um resultado significativo para o presente estudo, demonstrando que a formulação desenvolvida é eficiente para associar o fármaco a estrutura polimérica.

Para avaliar a influência das variáveis testadas no delineamento sobre a EE, procedeu-se ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade resultando nas informações disponíveis na Tabela 14.

De acordo com o valor de F obtido pela ANOVA na Tabela 14, apenas os solventes empregados na síntese das NP's produzem efeito sobre a quantidade de fármaco a ser associado. No entanto, como não houve interação significativa desses solventes com o polímero ou a blenda de polímeros testados, conclui-se que a ação dos solventes se dá de modo isolado.

Tabela 14 – ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade, comparando a média da eficiência de encapsulação da AFB nas nanopartículas de PLGA.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>SQ^a</i>	<i>QM^b</i>	<i>Valor F calculado</i>
Solvente (S)	2	1923,013	961,506	17,785*
Polímero (P)	1	0,023	0,023	8,091 ^{NS}
Interação (S x P)	2	11,666	5,833	6,058 ^{NS}
Tratamento	5	1934,702	-	-
Resíduo	12	1272,009	106,001	-
Total	17	3206,711	-	-

^a Soma dos quadrados. ^b Quadrados médios. *Estatisticamente significante $p < 0,05$. NS = não significativo.

Para dar prosseguimento aos estudos de escolha da formulação ótima, aplicou-se o Teste de Tukey para identificar a d.m.s. entre as formulações de acordo com a equação previamente reportada (Equação 5), com as modificações referentes aos valores, onde:

$$q = 4,75$$

$$QM_{\text{resíduo}} \text{ (quadrado médio do resíduo)} = 106,001$$

$$r \text{ (número de repetições)} = 3$$

O valor encontrado para d.m.s. foi 28,235 e as diferenças entre as médias de tamanho das formulações estão expostas na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores correspondentes às diferenças entre as médias de eficiência de encapsulação e estabelecimento da d.m.s. entre as formulações de nanopartículas de AFB que empregaram PLGA.

Pares de médias^a	Δ^b (nm)	d.m.s.	Conclusão
F1 x F2	24,264	28,235	ND
F1 x F3	22,347	28,235	ND
F1 x F4	1,950	28,235	ND
F1 x F5	24,090	28,235	ND
F1 x F6	20,357	28,235	ND
F2 x F3	1,917	28,235	ND
F2 x F4	22,314	28,235	ND
F2 x F5	0,174	28,235	ND
F2 x F6	3,907	28,235	ND
F3 x F4	20,397	28,235	ND
F3 x F5	1,743	28,235	ND
F3 x F6	1,990	28,235	ND
F4 x F5	22,140	28,235	ND
F4 x F6	18,407	28,235	ND
F5 x F6	3,733	28,235	ND

^a F1: 50 mg PLGA e clorofórmio; F2: 50 mg de PLGA e metanol; F3: 50 mg de PLGA e acetato de etila; F4: 100 mg PLGA e clorofórmio; F5: 100 mg de PLGA e metanol; F6: 100 mg de PLGA e acetato de etila. ^b Diferença entre médias do diâmetro das partículas. ND: não há diferença estatística.

O fato de não ter havido diferença significativa entre a percentagem de EE das formulações empregando PLGA (Tabela 15), confirma os dados da ANOVA que demonstraram que também não há interação entre as variáveis estudadas frente a EE das NP-AFB.

Desse modo, a escolha da formulação ótima se deu através da análise do valor absoluto de EE das amostras, onde as duas maiores médias – $95,5 \pm 0,9\%$ e $95,3 \pm 2,50\%$ – corresponderam a F2 e F5, respectivamente, ou seja, aquelas contendo metanol combinadas a qualquer concentração do polímero.

Esse resultado corrobora com a análise do tamanho das NP's, onde as formulações contendo metanol influenciaram fortemente as propriedades finais da partícula. Em relação ao parâmetro do diâmetro médio esta influência do metanol foi negativa (partículas com diâmetro superior a 300nm), em contraste, em relação ao parâmetro da eficiência de

encapsulação de AFB, a influência do metanol foi positiva, fornecendo as percentagens de EE mais altas.

Logo, dentre as formulações testadas a F2 (50 mg de PLGA e metanol), foi considerada ótima para produção de nanopartículas com maior teor de associação da AFB, $95,5 \pm 0,9\%$.

Esse resultado coincide com o estudo de Moraes e colaboradores (2009), que empregou um estudo fatorial para otimizar a formulação de nanocápsulas de PLGA carregadas com benzocaína. Entre outras variáveis o pesquisador analisou duas concentrações do polímero (50 e 100 mg) frente a eficiência de encapsulação, sendo que a formulação ideal foi a que aplicou 100 mg de PLGA, apresentando $73,2 \pm 0,3 \%$. No entanto, devido ao baixo potencial zeta apresentado e a probabilidade de instabilidade em solução associada a esse fato, esta formulação foi substituída por aquela que empregou 50 mg de PLGA, uma vez que apresentou potencial zeta maior.

5.3.2 Formulações F7 – F12 (PLGA - PEG)

5.3.2.1 Diâmetro médio das partículas PLGA – PEG

A Tabela 16 descreve as seis formulações que empregaram a blenda PLGA – PEG, os solventes testados e os respectivos tamanhos de partícula.

Tabela 16 – Composição das formulações constituídas pela blenda de PLGA – PEG e dados obtidos para o tamanho médio das partículas contendo AFB.

Formulações	Polímero		Solventes		Variável dependente
	PLGA - PEG (mg:mg)	Clorofórmio (μL)	Metanol (μL)	Acetato de etila (μL)	Diâmetro médio das partículas (nm)*
F7	50:10	800	-	-	$300,5 \pm 42,4$
F8	50:10	-	800	-	$337,8 \pm 86,0$
F9	50:10	-	-	800	$172,1 \pm 2,6$
F10	100:20	800	-	-	$406,3 \pm 94,7$
F11	100:20	-	800	-	$644,5 \pm 209,4$
F12	100:20	-	-	800	$169,8 \pm 6,9$

* Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

Observando-se a Tabela 16, conclui-se que as NP-AFB produzidas a partir de blends de PLGA – PEG apresentaram diâmetros médios maiores que as NP-AFB de PLGA e muitos valores superiores a 300 nm, o que não condiz com o exposto por outros estudos de que NP's contendo fármacos devem medir até 300 nm (GUPTA e KOMPELLA, 2006).

Apenas as formulações F9 e F12, que empregaram acetato de etila como solvente, é que produziram NP's com diâmetro inferior a 300 nm. Há de se observar que considerando o desvio padrão, a formulação F7 também apresentou diâmetro médio de partícula inferior a 300 nm, carecendo então de um tratamento estatístico para elucidação destes resultados.

Neste sentido, ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade (Tabela 17) foi aplicada para formulações de PLGA - PEG (F7 – F12). Esta análise permitiu identificar que não havia interação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o polímero e o solvente, sendo que seus efeitos só são percebidos isoladamente.

Tabela 17 – ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade, comparando o tamanho médio das partículas de PLGA – PEG contendo AFB.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>SQ^a</i>	<i>QM^b</i>	<i>Valor F calculado</i>
Solvente (S)	2	309585,191	154792,595	14,968*
Polímero (P)	1	86057,175	86057,175	8,321*
Interação (S x P)	2	71869,458	35934,729	3,475 ^{NS}
Tratamento	5	467511,820	-	-
Resíduo	12	124098,970	10341,580	-
Total	17	591610,791	-	-

^a Soma dos quadrados. ^b Quadrado médios.* Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Como não houve uma interação significativa entre polímero e solvente dentre as formulações de PLGA - PEG, partiu-se diretamente para o estabelecimento da d.m.s. através do Teste de Tukey, onde q (6 tratamentos e 12 graus de liberdade) = 4,75, $QM_{\text{resíduo}}$ (quadrado médio do resíduo) = 10341,58, r (número de repetições) = 3. O valor encontrado para d.m.s. foi 278,887 e as diferenças entre as médias de tamanho das formulações baseadas em PLGA-PEG estão representadas na Tabela 18.

Tabela 18 – Valores correspondentes às diferenças entre as médias de diâmetro e estabelecimento da d.m.s. entre as formulações F7 até F12.

Pares de médias^a	Δ^b (nm)	d.m.s.	Conclusão
F7 x F8	37,267	278,887	ND
F7 x F9	130,733	278,887	ND
F7 x F10	105,800	278,887	ND
F7 x F11	344,00	278,887	DE*
F7 x F12	128,400	278,887	ND
F8 x F9	168,00	278,887	ND
F8 x F10	68,500	278,887	ND
F8 x F11	306,733	278,887	DE*
F8 x F12	165,667	278,887	ND
F9 x F10	236,533	278,887	ND
F9 x F11	474,733	278,887	DE*
F9 x F12	2,333	278,887	ND
F10 x F11	238,200	278,887	ND
F10 x F12	234,200	278,887	ND
F11 x F12	472,400	278,887	DE*

^aF7: 50 mg PLGA: 10 mg PEG e clorofórmio; F8: 50 mg PLGA: 10 mg PEG e metanol; F9: 50 mg PLGA: 10 mg PEG e acetato de etila; F10: 100 mg PLGA: 20 mg PEG e clorofórmio; F11: 100 mg PLGA: 20 mg PEG e metanol; F12: 100 mg PLGA: 20 mg PEG e acetato de etila. ^b Diferença entre médias do diâmetro das partículas. ND: não há diferença estatística. *DE: há diferença estatística.

Segundo o teste de Tukey as únicas diferenças significativas se deram em relação à formulação F11, que corresponde à proporção 100:20 (mg:mg) de PLGA – PEG e metanol. Este resultado reproduziu o ocorrido com a formulação somente de PLGA, onde o metanol mais uma vez mostrou sua influência isolada na característica final da partícula.

Um incoerência foi registrada no Teste de Tukey onde F10 (100 mg PLGA: 20 mg PEG) e clorofórmio, não apresentaram d.m.s. perante F11 (100 mg PLGA: 20 mg PEG e metanol). Consiste em uma incoerência, pois F10 é igual a todas as outras formulações e F11 é diferente de todas as outras, não podendo ser verdadeira a afirmação de que F10 = F11. Esta incoerência pode ser atribuída a uma variação ao acaso, que pode ter ocorrido devido ao número insuficiente de repetições.

Logo, uma vez que não há d.m.s. dentre as formulações excetuando-se F11, procedeu-se a eleição da formulação ótima pela observação dos valores absolutos dos diâmetros médios

das partículas: F10 > F8 > F7 > F9 > F12. Excluindo-se F11 que apresentou d.m.s. em relação às demais e produziu as partículas de maior diâmetro ($644,5 \pm 209,4$ nm – n= 3).

Como se busca o menor tamanho registrado para as NP's, a formulação ótima corresponde a F12 ($169,8 \pm 006,9$ nm), que emprega a proporção de 100:20 mg PLGA-PEG e o solvente da fase oleosa como sendo o acetato de etila.

Mais uma vez os resultados apontam para um adequado emprego do surfactante na formulação, estabilizando as gotas durante a fase de evaporação do solvente para evitar colisão e coalescência entre partículas, característica de casos onde estão envolvidas altas concentrações de polímero (BECK-BROICHSITTER et al., 2012). Ademais, o fato de que uma maior velocidade de homogeneização leva à produção de partículas menores pode estar contribuindo para a produção de NP's com reduzido diâmetro no presente estudo (BECK-BROICHSITTER et al., 2012).

Aliado a estas evidências, a parcial miscibilidade do acetato de etila e sua tendência a formar partículas pequenas contribuem para a eleição da F12 como formulação ótima, conforme mencionado anteriormente.

5.3.2.2 Eficiência de encapsulação do fármaco nas NP's de PLGA – PEG

Os resultados obtidos para eficiência de encapsulação da AFB nas NP's contendo PLGA – PEG estão exibidos na Tabela 19.

Tabela 19 – Composição das formulações constituídas de PLGA-PEG resultantes do desenho fatorial $2^2 \times 3^1$, dados obtidos para eficiência de encapsulação de AFB nas nanopartículas.

Formulações	Polímero		Solventes		Variável dependente
	PLGA-PEG (mg:mg)	Clorofórmio (µL)	Metanol (µL)	Acetato de etila (µL)	Eficiência de encapsulação (%)*
F7	50:10	800	-	-	$63,9 \pm 5,4$
F8	50:10	-	800	-	$84,7 \pm 3,2$
F9	50:10	-	-	800	$92,8 \pm 2,9$
F10	100:20	800	-	-	$62,8 \pm 1,5$
F11	100:20	-	800	-	$97,1 \pm 0,8$
F12	100:20	-	-	800	$89,3 \pm 4,0$

* Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

Igualmente ao ocorrido com o diâmetro médio, os valores de eficiência de encapsulação do fármaco nas NP's de PLGA-PEG foram piores que as médias obtidas para o mesmo parâmetro com as NP's de PLGA. Ainda assim, as taxas de EE registradas são satisfatórias uma vez que em outros estudos, como é o caso de Derakhshandeh e colaboradores (2007), as percentagens de encapsulação em nanopartículas de PLGA não ultrapassam 33,50%.

A análise de variância aplicada aos dados de EE está descrita na Tabela 20 e demonstra que houve interação significativa entre solvente e polímero, produzindo influência sobre as taxas de associação de AFB ao fármaco.

Tabela 20 – ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade, comparando a eficiência de encapsulação de AFB nas nanopartículas de PLGA – PEG.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>SQ^a</i>	<i>QM^b</i>	<i>Valor F calculado</i>
Solvente (S)	2	3054,874	1527,437	136,002*
Polímero (P)	1	31,469	31,469	2,802 ^{NS}
Interação (S x P)	2	221,634	110,817	9,867*
Tratamento	5	3307,977	-	-
Resíduo	12	134,772	11,231	-
Total	17	3442,749	-	-

^a Soma dos quadrados. ^b Quadrado médios.* Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). NS: não significativo.

A influência produzida pela interação entre solventes e polímeros foi elucidada através do desdobramento estatístico para encontrar qual ou quais solventes estavam interagindo com a blenda PLGA-PEG. Neste caso, fixou-se os valores de PLGA-PEG e comparou-se com os solventes, conforme descreve a Tabela 21:

Tabela 21 – ANOVA com desdobramento da interação solventes x PLGA-PEG, fixando a variável PLGA-PEG.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>SQ^a</i>	<i>QM^b</i>	<i>Valor F calculado</i>
PLGA-PEG x Clorofórmio	1	1,602	1,602	0,143 ^{NS}
PLGA-PEG x Metanol	1	233,127	233,127	20,757*
PLGA-PEG x Acetato de etila	1	18,375	18,375	1,636 ^{NS}
Resíduo	12	134,772	11,231	-

^a Soma dos quadrados. ^b Quadrados médios. * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). NS: não significativo.

Através do valor de F (Tabela 21) observou-se que o solvente metanol presente na formulação produzia efeito significativo sobre a EE de AFB nas partículas. Tal fato corrobora com o encontrado no item 5.3.2.1, onde o metanol também esteve diretamente relacionado as maiores percentagens de encapsulação.

Subsequentemente, para avaliar qual concentração de PLGA-PEG estava interagindo com o solvente e assim determinar a combinação de variáveis adequada para obtenção da maior taxa de associação de AFB, aplicou-se novo desdobramento dos graus de liberdade, desta vez fixando-se os valores dos solventes e alterando as proporções de PLGA-PEG (Tabela 22).

Tabela 22 – ANOVA com desdobramento da interação solventes x PLGA-PEG, fixando a variável solventes.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>SQ^a</i>	<i>QM_b</i>	<i>Valor F calculado</i>
Solventes x PPEG ₅₀ ^c	2	1337,739	668,869	59,556*
Solventes x PPEG ₁₀₀ ^d	2	1938,770	969,385	86,313*
Resíduo	12	134,772	11,231	-

^a Soma dos quadrados. ^b Quadrados médios. ^c 50 mg PLGA: 10 mg PEG; ^d 100 mg PLGA: 20 mg PEG. * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Nesse ensaio, ambas as concentrações de PLGA-PEG empregadas produziram efeito significativo ($p < 0,05$) frente à EE, conforme demonstra o valor de F na Tabela 22. Este resultado denota que a formulação ótima empregaria metanol (conforme indicação de interação na Tabela 21) e uma concentração de PLGA-PEG situada entre os valores testados que foram 50:10 (mg:mg) e 100:20 (mg:mg).

Sabendo-se que o solvente ideal para interação com as duas concentrações da blenda PLGA-PEG foi o metanol, procedeu-se o teste de Tukey entre as formulações que envolveram o metanol como solvente - F8 e F11 - para averiguar se há d.m.s. entre as médias de EE apresentadas.

O valor calculado para d.m.s. foi 7,604 e a comparação de médias está representada na Tabela 23:

Tabela 23 – Valores correspondentes às diferenças entre as médias de EE e estabelecimento da d.m.s. entre as formulações F8 e F11.

Pares de médias ^a	Δ^b (nm)	d.m.s.	Conclusão
F8 x F11	12,467	7,604	Há diferença estatística

^a F8: 50 mg PLGA: 10 mg PEG e metanol; F11: 100 mg PLGA: 20 mg PEG e metanol; ^b Diferença entre médias do diâmetro das partículas.

Considerando que Δ foi maior que d.m.s. (Tabela 23), concluiu-se que as duas formulações de metanol são diferentes entre si, logo, a formulação considerada ideal correspondeu a F11 por apresentar média de encapsulação de $97,1 \pm 0,8\%$, e este valor foi significativamente diferente de $84,7 \pm 3,2\%$ relativo a F8.

5.3.3 Estabelecimento da formulação ótima

Os resultados obtidos para a formulação ótima de acordo com o delineamento fatorial estão expressos na Tabela 24:

Tabela 24 – Formulações ótimas de acordo com resultados do delineamento fatorial $2^2 \times 3^1$.

Variáveis independentes	PLGA		PLGA-PEG	
	Variáveis dependentes	Formulação ótima	Variáveis dependentes	Formulação ótima
Diâmetro médio da partícula	100 mg PLGA e acetato de etila	F6	100:20 mg PLGA-PEG e acetato de etila	F12
Eficiência de Encapsulação	50 mg PLGA e metanol	F2	100:20 mg PLGA-PEG e metanol	F11

Para que fosse possível dar continuidade ao presente estudo procedendo à caracterização das NP-AFB-PLGA e das NP-AFB-PLGA-PEG, foi preciso indicar a combinação de variáveis que atendesse aos dois parâmetros: a) menor diâmetro médio e; b)

maior EE Para esta indicação, apenas uma formulação de PLGA e uma formulação de PLGA-PEG poderia ser estabelecida como ótima para atender os dois parâmetros de resposta.

A partir da Tabela 24, analisando primeiramente as nanopartículas desenvolvidas a partir de PLGA, a formulação ótima correspondeu a F6, pois além de possuir a melhor interação de variáveis para produção das NP's com as menores médias de diâmetro, ainda possui alta EE de AFB ($94 \pm 1,30\%$). Do contrário, se fosse apontada F2, as partículas apresentariam a mais alta EE do fármaco, porém, teria diâmetros médios muito elevados ($338,2 \pm 22,1$ nm), o que seria indesejável no desenvolvimento das NP's.

Ainda com base na Tabela 24, para as NP's que foram desenvolvidas a partir de blendas de PLGA-PEG, a formulação ótima correspondeu a F12, pelo mesmo motivo anterior, se fosse apontada F11 como formulação ótima as partículas apresentariam a mais alta E.E. do fármaco, mas em contrapartida uma média de diâmetro muito elevada ($644,5 \pm 209,4$ nm).

Por fim, estabeleceu-se como formulações ótimas F6 e F12, e prosseguiu-se com os trabalhos de caracterização.

5.4 Caracterização físico-química

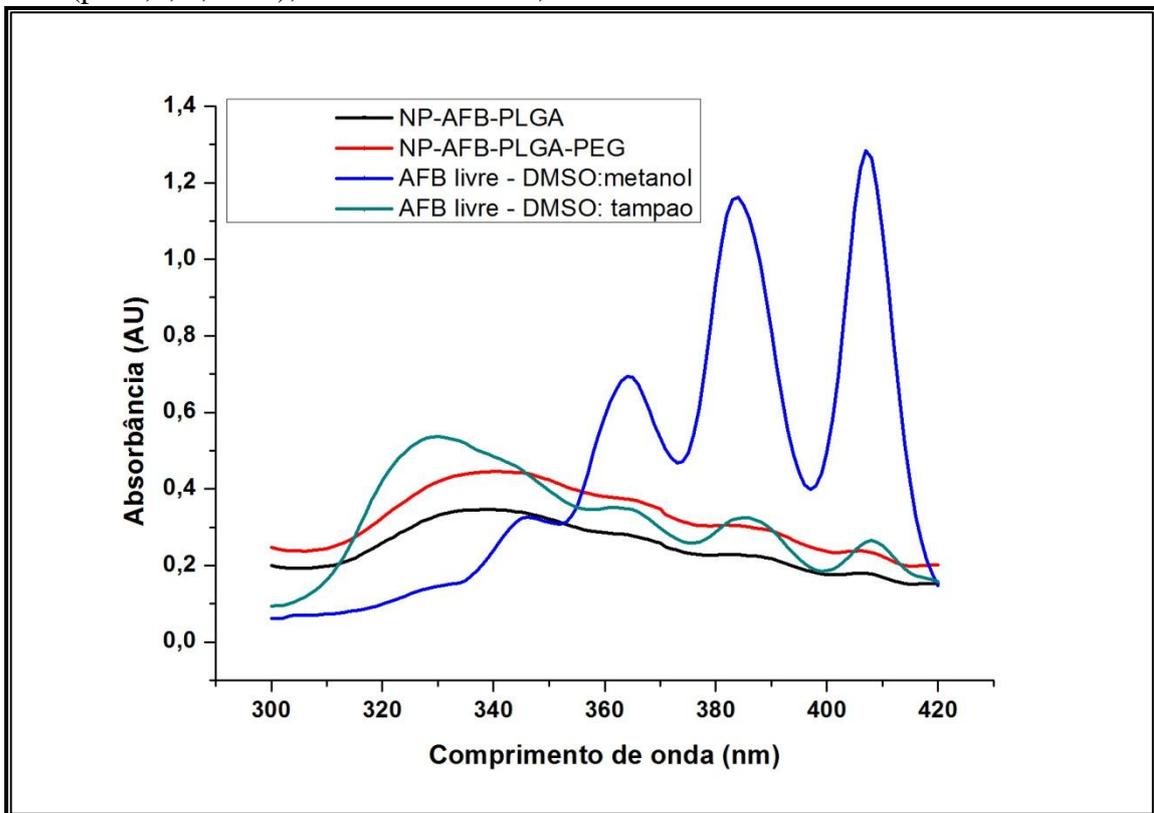
5.4.1 Agregação molecular de AFB nas nanopartículas

As peculiaridades da estrutura da molécula de AFB é alvo de inúmeros estudos, uma vez que não está totalmente elucidado seu mecanismo de ação e os aspectos diretamente relacionados à toxicidade celular (OLIVEIRA, 2008).

A característica anfipática de AFB promove insolubilidade em meio aquoso, o que colabora para a auto agregação molecular e a formação de oligômeros (FILLIPPIN e SOUZA, 2006). A toxicidade celular está relacionada principalmente às formas oligoméricas insolúveis, cujas quais, apresentam seletividade pelo colesterol presente nas membranas plasmáticas de células de mamíferos (TORRADO et al., 2008).

Para avaliar o perfil molecular de AFB predominante nas NP's desenvolvidas no presente estudo, alíquotas da ressuspensão de nanopartículas foram analisadas por espectrofotometria com varredura na faixa de 300 a 450 nm. A Figura 9 exhibe o espectro de absorção das amostras de NP's, bem como dos controles de AFB livre que serviram como modelos de agregados moleculares ou monômeros solúveis.

Figura 9 – Espectros de absorção representando o estado de agregação molecular de AFB livre dissolvida em DMSO: metanol (50:50, v/v); AFB livre dissolvida em DMSO: tampão fosfato (pH 7,4, 0,01 M); NP-AFB-PLGA e, NP-AFB-PLGA-PEG.



Segundo dados da literatura, os picos característicos da AFB quando na forma de monômeros solúveis, e, portanto menos tóxicos correspondem às posições 362, 383 e 405 nm (OLIVEIRA, 2008). Na Figura 9 é possível identificar facilmente esse padrão representado pela linha azul, que além dos picos mencionados apresenta um quarto pico na região de 344 nm. Tal comportamento já foi encontrado em outros estudos (TIYABOONCHAI e LIMPEANCHOB, 2007) e é possível atribuir este desdobramento de banda à presença de isômeros na solução ou transição entre diferentes estados de vibração da molécula.

Em contraste, quando na forma de agregados moleculares, o perfil de absorção de AFB apresenta uma banda alargada posicionada antes da posição 336 nm, seguida de três picos de menor intensidade, quase indistinguíveis e geralmente posicionados em 365, 384 e 408 nm, sendo este último de menor intensidade (JAIN e KUMAR, 2010). Tal perfil se enquadra no espectro obtido a partir de AFB dissolvida em DMSO: tampão fosfato (pH 7,4 e 0,01 M) – 50:50, v/v (Figura 9).

As bandas encontradas nas amostras NP-AFB-PLGA e NP-AFB-PLGA-PEG (Figura 9), são equivalentes ao perfil agregado, não sendo possível distinguir se há formas monoméricas presentes no sistema.

Outras pesquisas relatam que é possível a coexistência de monômeros, dímeros e oligômeros nos sistema, como foi o caso do estudo pioneiro de Ernst e colaboradores (1981) que empregou a técnica de absorção óptica e dicroísmo circular para investigar o espectro de agregação da AFB. Este estudo revelou que a formação de agregados se dá em decorrência de dois estágios: o primeiro leva a formação de dímeros e pode ser estabilizado pela saturação das interações hidrofóbicas; o segundo estágio levaria a formação de grandes aglomerados moleculares a partir da união destes dímeros.

Ainda que o estado de agregação encontrado para as nanopartículas não tenha sido conforme o esperado, estas estruturas configuram potencial veículo para administração de AFB, pois exibem baixa toxicidade celular em relação à droga livre e ao padrão comercial (dados demonstrados adiante), provavelmente decorrente da liberação gradual e prolongada do fármaco a partir da nanoestrutura.

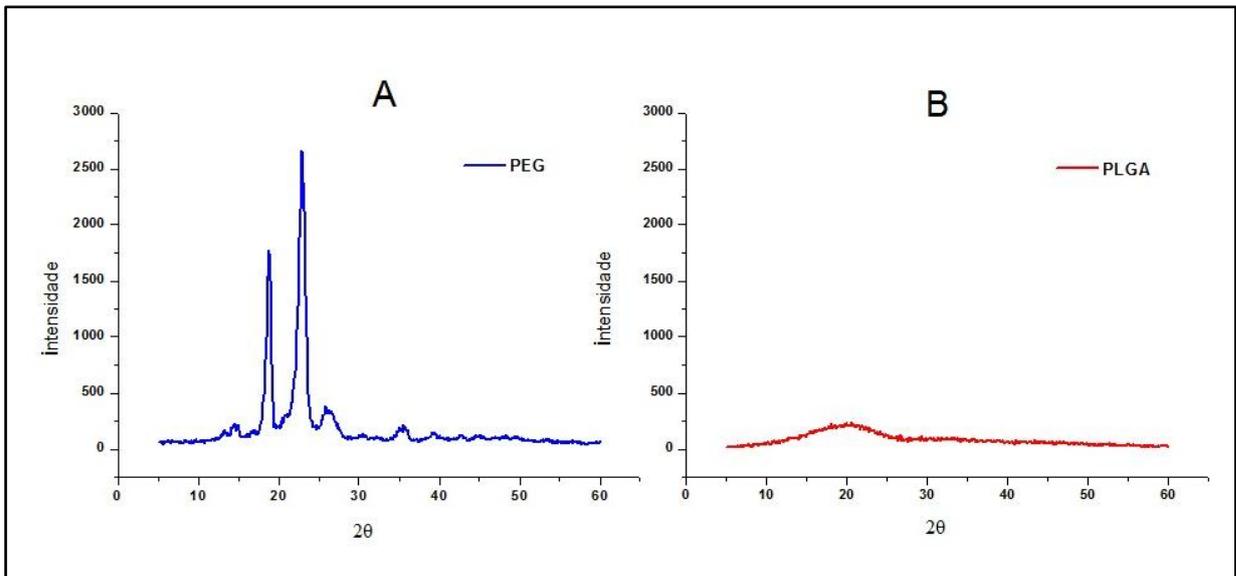
5.4.2 Espectroscopia: Difração de Raios X

As interações fármaco e polímero em um sistema nanoestruturado, bem como o estado físico da formulação, se cristalina ou amorfa, desempenham função importante no controle da liberação do fármaco (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010).

Fármacos cristalinos, como é o caso da AFB, possuem baixa solubilidade aquosa em comparação com sua forma amorfa e, por conseguinte baixa biodisponibilidade em meio fisiológico (SENNA e NAKAYAMA, 2009). Assim, vários trabalhos dedicam-se a encontrar mecanismos que sejam capazes de aperfeiçoar essas características, como é o caso do trabalho de Kürti e colaboradores (2011) que conclui que nanopartículas melhoram o perfil de dissolução e biodisponibilidade do fármaco meloxicam devido ao aumento da área de superfície e amorfização do fármaco.

De acordo com o difratograma obtido (Figura 10 - B) e com base nas informações do fabricante, o copolímero PLGA, ácido poli (D-L,láctico-*co*-glicólico) – 50:50) apresenta estrutura amorfa, observada através de uma banda larga entre 10° e 40° (UHRICH et al., 1999; FORMARIZ, 2008), e no difratograma da Fig. 10 - A pôde ser observado entre 10° e 30°. O PEG, outro polímero empregado no desenvolvimento das formulações em estudo, apresenta-se em caráter semicristalino (KÜRTI et al., 2011) com picos característicos em 2θ: 14; 19; 23; e 26° (VASSILIOU et al., 2010), como pode ser facilmente observado na Figura 10 – A).

Figura 10 – Espectros DRX: (A) PEG. (B) PLGA.

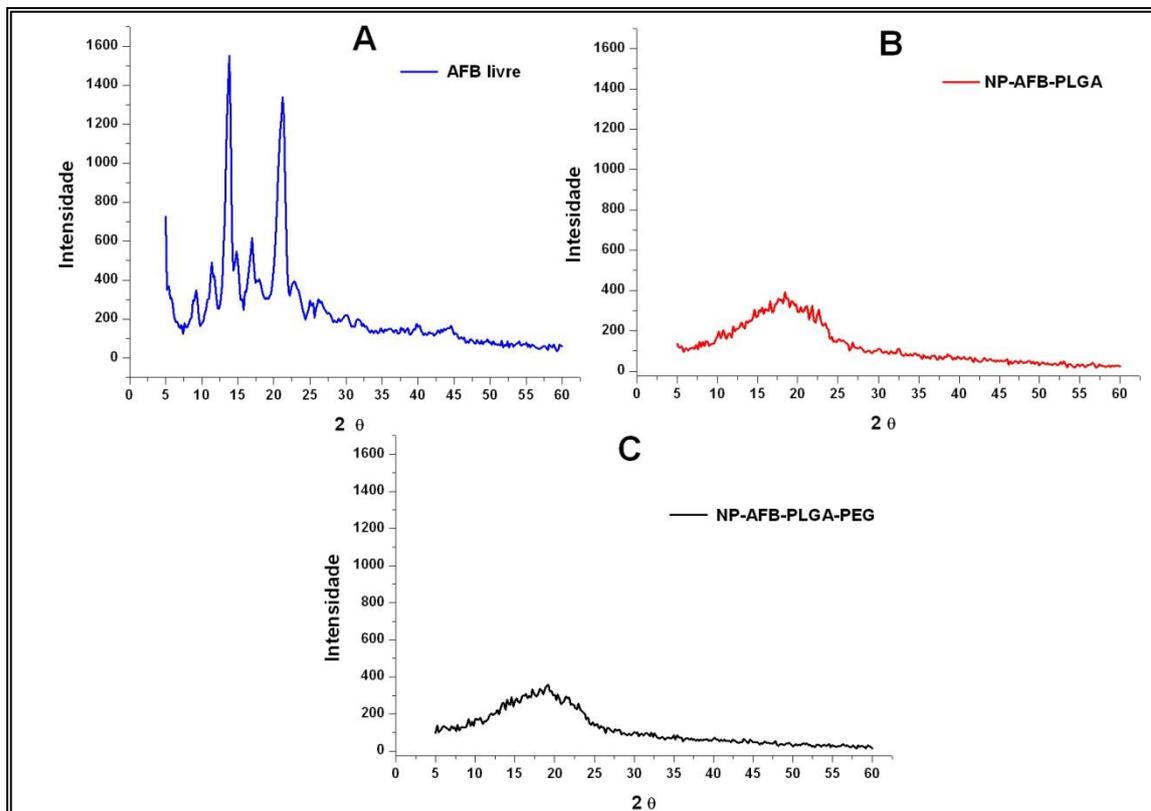


Segundo a literatura (FRANZINI, 2010) a AFB apresenta picos característicos de forma cristalina em 2θ : 14,24; 17,37 e 21,72. A análise por DRX conduzida no presente estudo confirma o padrão cristalino da AFB, conforme pode-se visualizar na Figura 11 - A, onde os picos de alta intensidade foram registrados nos ângulos de difração em 2θ : 11,40; 13,80; 17,00; e 21,20.

A Figura 11 demonstra em (B) e (C) os difratogramas das formulações de NP-AFB-PLGA e NP-AFB-PLGA-PEG, respectivamente. As duas amostras exibem um padrão muito similar entre si, e notadamente diferente do padrão exibido na Figura 11 - A, o que pode indicar a forte influência do fármaco alterando significativamente as nanoestruturas existentes.

A ausência de picos de alta intensidade no intervalo de 10° a 40° na Figura 10, B e C caracterizam as formulações como amorfas, indicando a formação de um complexo de inclusão – fármaco e polímeros (FRANZINI, 2010). O desaparecimento dos picos de alta intensidade na Figura 10, B e C, além de indicarem amorfização da AFB e do PEG, sugere que o fármaco está molecularmente disperso no sistema polimérico.

Figura 11 – Espectros DRX: (A) AFB livre. (B) NP-AFB-PLGA (C) NP-AFB-PLGA-PEG.



A amorfização do fármaco já foi relatada na literatura (FORMARIZ, 2005; KÜRTI, 2011) e pode ser resultante do processo de complexação com os polímeros. No caso em pauta, a AFB possui caráter anfifílico o que proporciona inserção entre as lamelas dos polímeros e interação com os mesmos, de modo a alterar as propriedades estruturais do sistema (PESTANA, 2009).

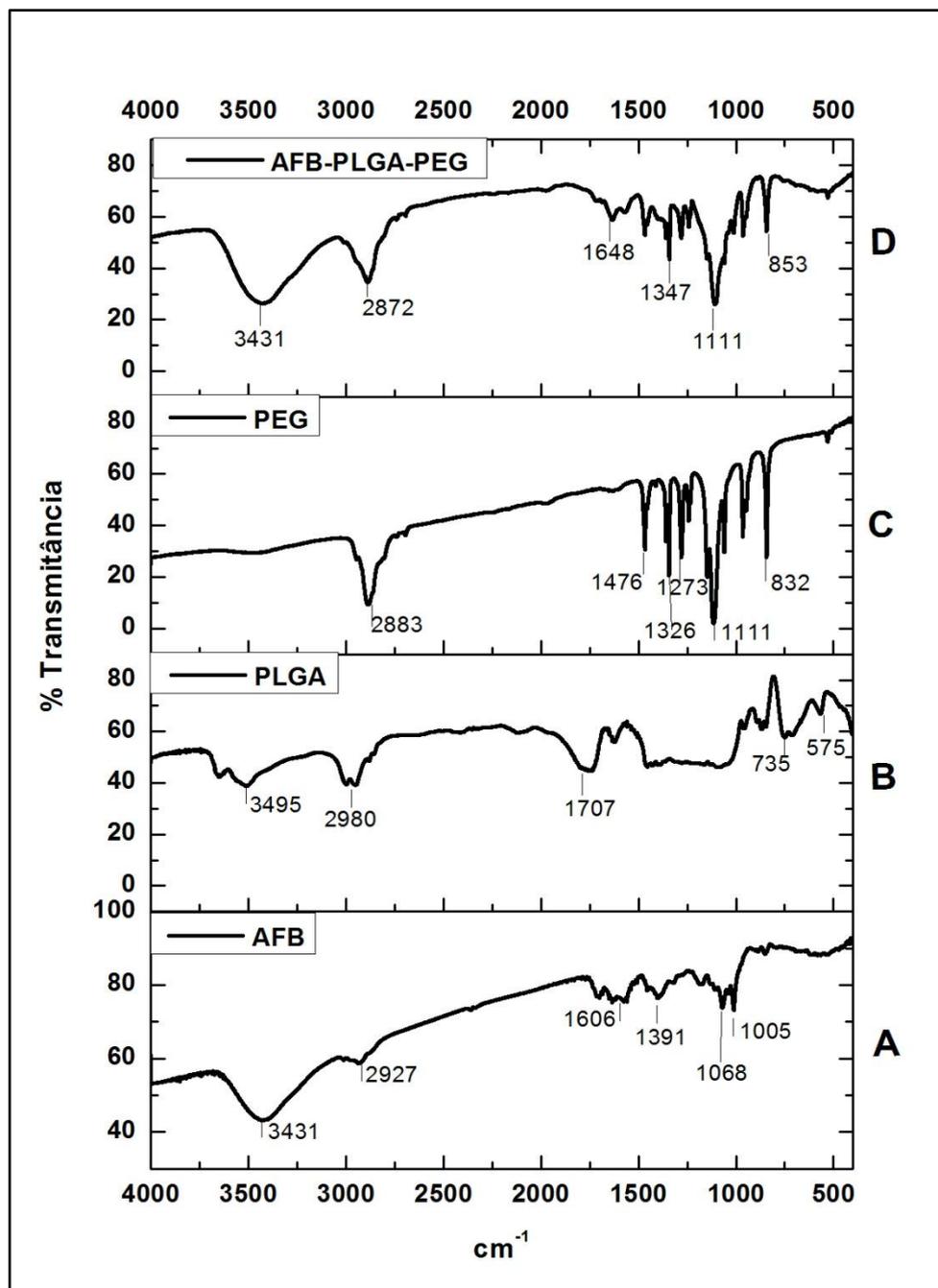
Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os achados de outras análises de DRX envolvendo nanopartículas, como é o caso de Jeon e colaboradores (2000) que analisaram o padrão de difração de nanopartículas de PLGA carregadas com norfloxacina e constataram que os picos característicos da cristalinidade da droga haviam desaparecido no difratograma, comprovando a amorfização que o fármaco havia sofrido. Esse mesmo estudo investigou as nanopartículas de PLGA inertes e confirmou o padrão amorfo, compatível com a característica não cristalina do polímero.

Em conclusão, a complexação do PLGA amorfo, do PEG semicristalino e da AFB cristalina, levaram a uma alteração de cristalinidade que resultou na formulação de nanopartícula com caráter amorfo, portanto, propensa a melhor dissolução de AFB.

5.4.3 Espectroscopia: Infravermelho

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos para confirmar os principais grupos químicos dos compostos nas nanopartículas e verificar a integridade do fármaco após sua encapsulação. A Figura 12 apresenta espectros de absorção na região do infravermelho da AFB, PLGA, PEG e a mistura física destes três componentes.

Figura 12 – Espectro no IV das amostras: AFB (A); PLGA (B); PEG (C); Mistura física AFB-PLGA-PEG (D).



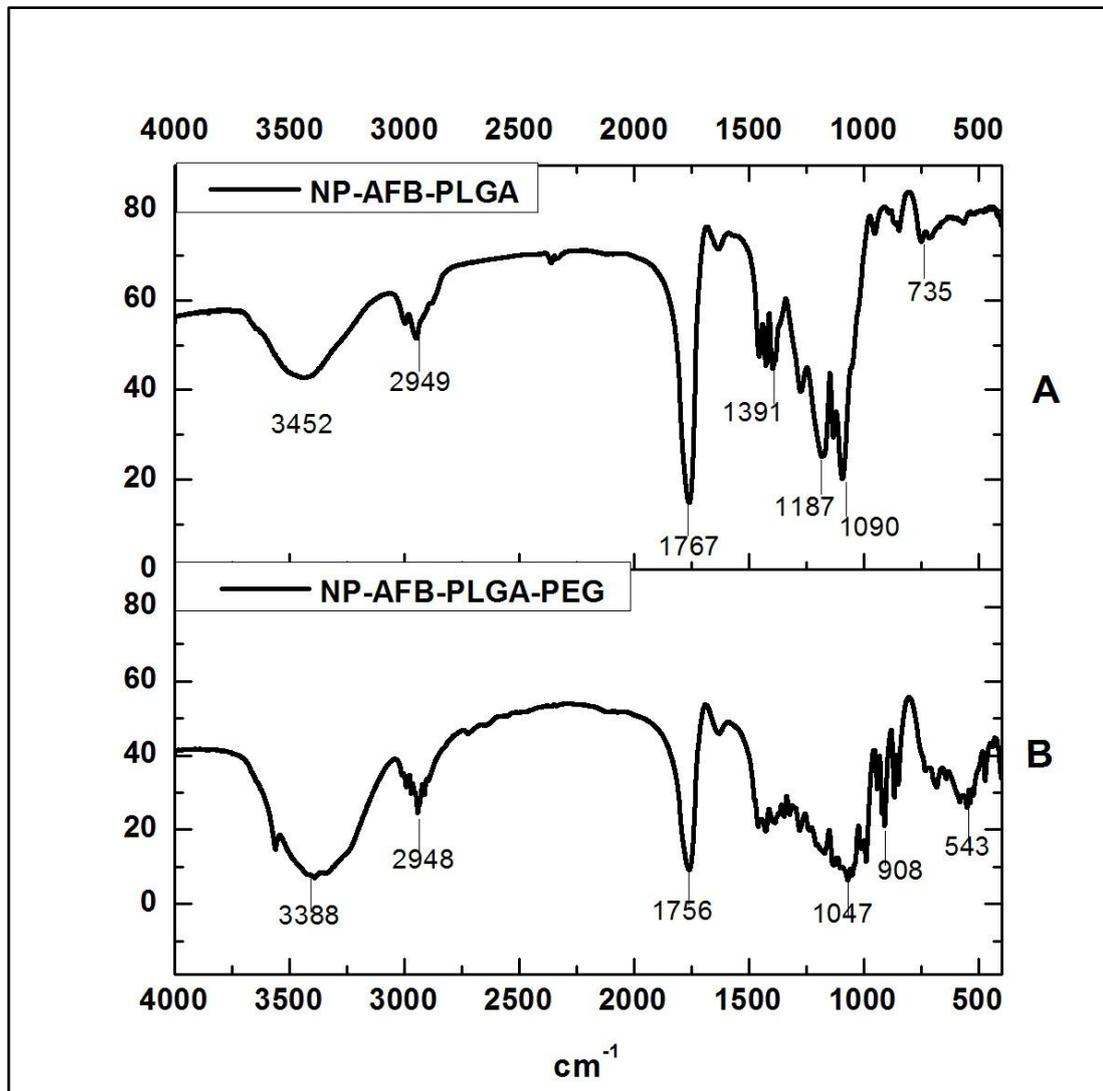
O espectro da AFB no IV (Figura 12 – A) apresenta as bandas características do fármaco: uma banda em 3431 cm^{-1} compatível com a região de número de ondas associado ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação OH; em 1606 cm^{-1} a banda de absorção corresponde à ligação NH_2 no plano de curvatura; em 1068 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico da ligação CO; e a banda de absorção na região de 1005 cm^{-1} corresponde à deformação fora do plano da ligação CH, característica de um polieno (DAS e SURESH, 2011).

Na Figura 12 – B é possível identificar as bandas de absorção do copolímero PLGA na região entre 3500 e 3200 cm^{-1} a banda característica da ligação OH do grupo carboxila terminal do polímero, do grupo funcional éster em 1707 cm^{-1} , além da banda em 2980 cm^{-1} que está compreendida na faixa de absorção correspondente à deformação axial de carbonos sp^2 e sp^3 (SILVA JUNIOR, 2007).

Segundo Mainardes (2007) são duas as bandas de absorção no IV características do PEG, a primeira consiste em uma banda intensa em 1110 cm^{-1} , devido ao estiramento assimétrico C-O-C, cuja qual foi registrada no espectro do PEG (Figura 12 – C) em 1111 cm^{-1} , e a segunda compreende a uma banda larga na região entre 3500 e 3200 cm^{-1} , característica da ligação OH do grupo carboxila terminal do polímero, porém, que não ficou evidente no espectro da Figura 12 – C.

As bandas de absorção características dos polímeros e do fármaco isolados são facilmente identificadas no espectro da mistura física destes componentes como pôde ser observado na Fig. 12 – D. Tal observação foi reproduzida no espectro das nanopartículas desenvolvidas a partir de PLGA e AFB (Fig. 13 – A), onde podem ser observadas as bandas características do PLGA em 3452 , 2949 e 735 cm^{-1} e as bandas características da AFB apareceram em 3452 , 2949 e 1090 cm^{-1} .

Figura 13 – Espectro no IV das amostras: Nanopartículas de PLGA contendo AFB (A); Nanopartículas de PLGA-PEG contendo AFB (B).



No espectro IV das nanopartículas de AFB desenvolvidas a partir da blenda PLGA-PEG (Fig. 13 – B), além das bandas significativas indicando a presença de PLGA, PEG e AFB, registra-se a presença de uma banda de forte intensidade na região de 1756 cm^{-1} . Como esta banda também está presente no espectro de NP-AFB-PLGA (Fig. 13 – A), sugere-se que a banda nesta faixa próxima a região de 1739 cm^{-1} seja atribuída ao estiramento do grupo carbonila, C=O e ao estiramento assimétrico do grupo C-O-C, estas características podem ser atribuídas a formação de um copolímero PLGA-PEG (DRUMOND e WANG, 2004).

A partir das análises de IV foi possível afirmar que as nanopartículas desenvolvidas apresentaram as mesmas características químicas de quando analisados seus componentes

isoladamente, além de sugerirem a integridade da estrutura química do fármaco após o processo de obtenção das NP's.

5.5 Caracterização biológica

5.5.1 Atividade antifúngica – ensaio *in vitro*

Embora existam registros de resistência adquirida a azólicos, a espécie *C. albicans* é naturalmente sensível aos fármacos antifúngicos (BARBEDO, 2010). No caso de AFB os relatos de resistência são mínimos, mas seu uso vem sendo discutido devido à sua elevada toxicidade (MENEZES et al., 2009).

A ocorrência de amostras de *Cryptococcus neoformans* resistentes aos antifúngicos é mais comum, e está relacionada a recorrência da infecção (PEREZ, 2007). A AFB também é padrão ouro no tratamento da infecção causada por *Cryptococcus*, no entanto, a maioria das formulações disponíveis demonstra ineficácia devido a resistência do patógeno bem como apresenta uma reduzida penetração no SNC, não alcançando os níveis terapêuticos necessários para a meningite criptocócica (SHAO, et al., 2012).

O mecanismo de ação antifúngica de AFB baseia-se na seletividade do fármaco pelo ergosterol presente na membrana celular do fungo (ESPADA et al., 2008; WASAN et al., 2009). A interação de AFB com a membrana promove a formação de poros e o consequente extravasamento de íons e conteúdo intracelular, ocasionando a morte da célula devido ao aumento de permeabilidade ou impedindo o organismo de conduzir sua multiplicação celular de forma eficiente.

Foram testadas duas formulações de nanopartículas carregadas com AFB, frente às cepas de *C. albicans* ATCC 64548 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112. O teste antifúngico foi conduzido no sentido de averiguar a atividade da NP-AFB em comparação ao padrão comercial e à droga livre, através da observação do crescimento da levedura em contato com os agentes, e, estabelecimento da CIM.

No presente estudo a CIM foi verificada por inspeção visual da turbidez após 24 e 48h de incubação dos agentes antifúngicos encapsulados ou em sua forma livre com as leveduras.

5.5.1.1 Resultados para *Candida albicans*

Através da Tabela 25 foi possível observar que a CIM da AFB em sua forma livre foi de 0,025 µg/mL após 24h de incubação e foi confirmada com 48h de ensaio. As NP-AFB-PLGA apresentaram CIM de 0,5 µg/mL em 24h e esse valor foi confirmado pela inspeção após 48h de incubação. As NP-AFB-PLGA-PEG apresentaram CIM de 0,05 µg/mL nas primeiras 24h de ensaio, sendo dez vezes inferior ao valor encontrado para as NP's de PLGA, no entanto, esse valor não foi confirmado após 48h de estudo apresentando turvação no meio, logo, a CIM das NP-AFB-PLGA-PEG após 48h correspondeu ao mesmo valor encontrado para as nanopartículas de PLGA: 0,5 µg/mL.

Tabela 25 – Concentração inibitória mínima (CIM) obtida no teste de atividade antifúngica de AFB livre e associada à nanopartículas poliméricas frente a cepa ATCC 64548 de *C. albicans*.

Agentes antifúngicos	CIM 24 h (µg/mL, n=3)	CIM 48 h (µg/mL, n=3)
AFB deoxicolato	0,025	0,05
AFB livre	0,025	0,025
Nanopartículas de AFB-PLGA	0,5	0,5
Nanopartículas de AFB-PLGA-PEG	0,05	0,5

A AFB deoxicolato demonstrou os mesmos parâmetros de inibição que a droga livre, ocorrendo apenas uma mudança após 48h de incubação com as leveduras, onde a CIM aumentou de 0,025 µg/mL para 0,05 µg/mL.

Diante desses resultados, presume-se que as nanopartículas desenvolvidas são eficazes quanto à inibição do crescimento de colônias de *C. albicans*, pois, a CIM encontrada para ambas as formulações ficou compreendida na faixa recomendada pela norma M27-A2, que foi estipulada com base em testes realizados com duas cepas de *Candida sp.* (ATCC 22019 e 6258).

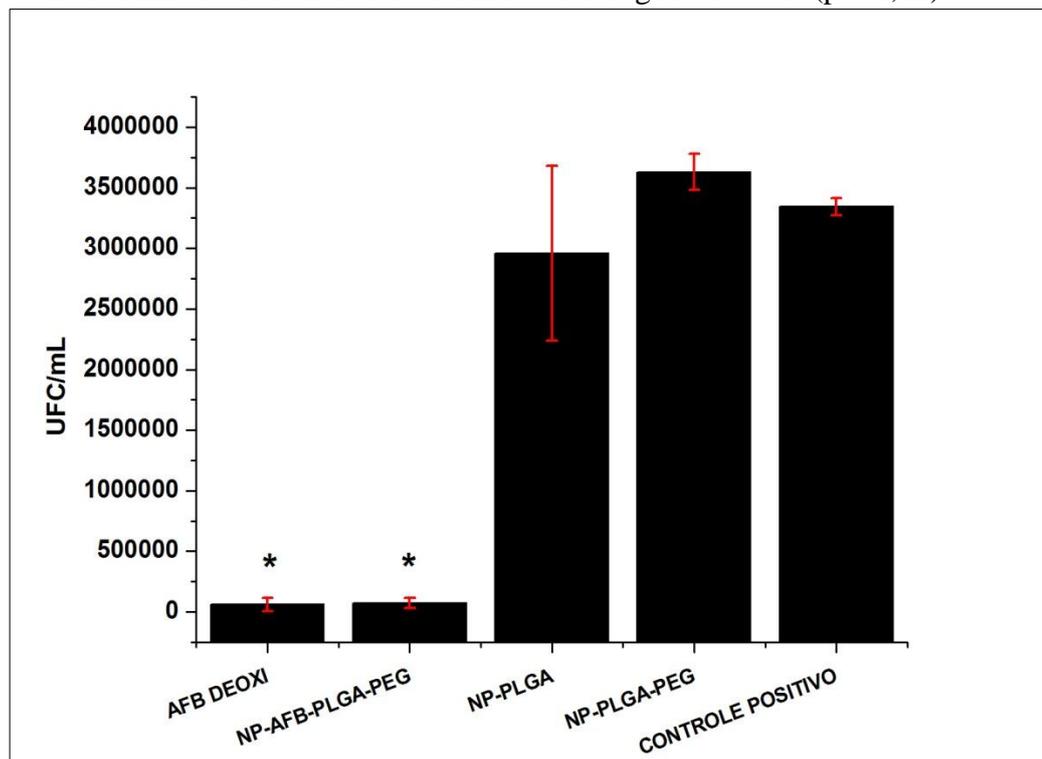
Embora a CIM das formulações poliméricas tenha sido superior a da AFB livre, o emprego dessas NP's continua atendendo o propósito de manter a ação antifúngica e minimizar a citotoxicidade, haja vista os resultados positivos aferidos nos testes de toxicidade sobre células (item 5.5.2.).

A característica das nanopartículas de possuírem liberação lenta e gradual do fármaco (VASSILIOU et al., 2010; VAN DE VEN et al., 2012), também suporta a afirmação de que as NP's desenvolvidas são tão eficazes na inibição do crescimento de colônias de *C. albicans*, quanto a droga livre ou sua formulação comercial padrão. Devido a lenta liberação do

fármaco a partir da nanopartícula, ainda que a concentração de AFB fosse 0,5 µg/mL, esta concentração não estava imediatamente disponível, como é o caso da droga livre, mas sim foi acumulada gradualmente ao longo de tempo.

Para avaliar uma possível diminuição das unidades formadoras de colônias (UFC), foi realizada a semeadura em placa contendo Ágar Sabouraud-dextrose seguida de incubação por 24h. O teste também serviu para verificar se a CIM das amostras testadas correspondia a CFM, conferindo inviabilidade celular a colônia de fungos. Os resultados estão sumarizados na Figura 14.

Figura 14 – UFC de *C. albicans* ATCC 64548, após 24h de incubação, a 37° C, com as amostras nas seguintes concentrações: AFB Deoxi: 0,025 µg/mL; NP-AFB-PLGA-PEG: 0,05 µg/mL; NP-PLGA: 0,5 µg/mL; NP-PLGA-PEG: 0,05. Os dados estão demonstrados considerando a média da triplicata e o desvio padrão. * UFC/mL de AFB Deoxi e NP-AFB-PLGA-PEG foi estatisticamente diferente das demais e iguais entre si ($p < 0,05$).



Não houve crescimento de colônias na placa onde foi semeada a CIM das NP-AFB-PLGA (0,5 µg/mL), por isso este teste não está representado na Figura 14. A inviabilidade celular demonstrada por esse fato caracteriza a CIM como sendo também CFM e este resultado é favorável para o presente estudo uma vez que corrobora com a informação anterior de que as nanopartículas são capazes de carrear a AFB e manter sua atividade

antifúngica. Ademais, nota-se que a formulação NP-AFB-PLGA mostrou-se mais eficaz que a AFB-DEOXI, uma vez que sua CIM é também CFM.

Igualmente, os resultados do teste de semeadura em placa da CIM de AFB livre com os cultivos de fungos não está demonstrado na Figura 14, pois, correspondeu a CFM e desta forma não apresentou nenhuma UFC. Observa-se que a NP-AFB-PLGA foi tão eficaz contra os fungos quanto a AFB livre, pois ambas não demonstraram algum crescimento de colônias após 24h de plaqueamento.

Em contraste, a AFB deoxicolato permitiu o crescimento de células, e este foi estatisticamente equivalente a formulação de nanopartículas de AFB que empregam a blenda PLGA-PEG, demonstrando que a formulação apresentou ação antifúngica tão eficiente quanto o padrão comercial do fármaco.

Na Figura 14 é possível identificar também o número de UFC do controle positivo, e das nanopartículas de PLGA e PEG que não estavam associadas à AFB. Os valores obtidos para estes controles não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$), evidenciando que nenhum componente da formulação possui ação contra os microrganismos, reduzindo a possibilidade de interferências nos resultados.

5.5.1.2 Resultados para *Cryptococcus neoformans*

De acordo com a Tabela 26, verificou-se que a CIM da AFB em sua forma livre (Sigma-Aldrich) foi de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ após 24h de incubação, enquanto que a AFB deoxicolato não apresentou CIM após 24h ou 48h passível de detecção por inspeção visual. As NP-AFB-PLGA apresentaram CIM de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ em 24h e após 48h de incubação a CIM foi de 0,10 $\mu\text{g/mL}$ indicando um resultado melhor que o apresentado pelo fármaco livre e pela forma de AFB usualmente presente nas formulações comerciais (AFB-deoxicolato), o que representa um resultado positivo e confirma a eficiência antifúngica das formulações de nanopartículas.

Tabela 26 – Concentração inibitória mínima (CIM) obtida no teste de atividade antifúngica de AFB livre e associada à nanopartículas poliméricas frente a cepa ATCC 90112 de *Cryptococcus neoformans*.

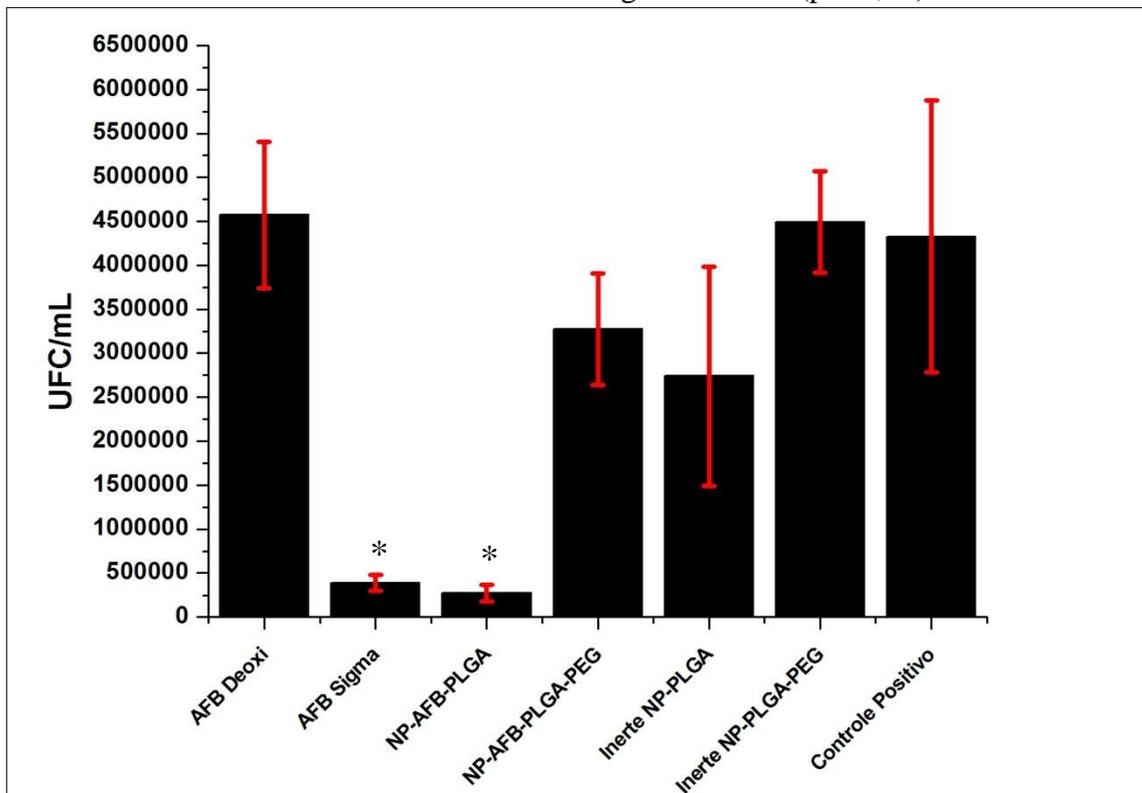
Agentes antifúngicos	CIM 24 h ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$)	CIM 48 h ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$)
AFB livre	0,05	*
AFB deoxicolato	*	*
Nanopartículas de AFB-PLGA	0,05	0,10
Nanopartículas de AFB-PLGA-PEG	*	*

* Não foi observada inibição de crescimento dos fungos.

As NP-AFB-PLGA-PEG não apresentaram CIM após 24h de ensaio e esse resultado foi confirmado visualmente após 48h. Tal comportamento já fora encontrado em testes anteriores realizados pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Nanotecnologia, bem como se mostra igual ao resultado obtido para AFB deoxicolato, que também não apresentou CIM após verificação de turvação com 24 e 48h. Esta resistência do patógeno pode ser explicada pela maior ou menor quantidade de ergosterol presente na parede celular do fungo (PFALLER, 2005; PEREZ, 2007), uma vez que o mecanismo de ação do fármaco baseia-se na interação com este lipídio.

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) também foi efetuada no teste com *Cryptococcus* através da semeadura em placa e incubada por 24 horas. Os resultados estão sumarizados na Figura 15.

Figura 15 – UFC de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, após 24h de incubação, a 37° C, com agentes antifúngicos na concentração de 0,05 µg/mL. Os dados estão demonstrados considerando a média da triplicata e o desvio padrão. * UFC/mL de AFB Sigma e NP-AFB-PLGA foi estatisticamente diferente das demais e iguais entre si ($p < 0,05$).



Na Figura 15 é possível identificar que os valores de UFC/mL do controle positivo, onde havia apenas meio de cultivo e inóculo, das nanopartículas inertes de PLGA-PEG (não associadas à AFB) e do padrão comercial do fármaco (AFB Deoxi), não diferiram

estatisticamente ($p < 0,05$), demonstrando que a AFB deoxicolato não foi eficiente contra ao crescimento da cepa além de evidenciar que nenhum componente da formulação de nanopartículas possui ação contra os microrganismos, indicando a impossibilidade de interferências nos resultados.

Notadamente, o resultado positivo neste teste corresponde à formulação de nanopartículas de PLGA contendo AFB. Esta formulação apresentou reduzido número de UFC/mL em comparação ao controle positivo. Se comparado ao fármaco livre (AFB Sigma), não há diferença estatística ($p < 0,05$), demonstrando que a formulação NP-AFB-PLGA é tão eficiente quanto AFB Sigma, e aproximadamente 16 vezes mais eficiente que AFB deoxicolato frente ao fungo *Cryptococcus neoformans*.

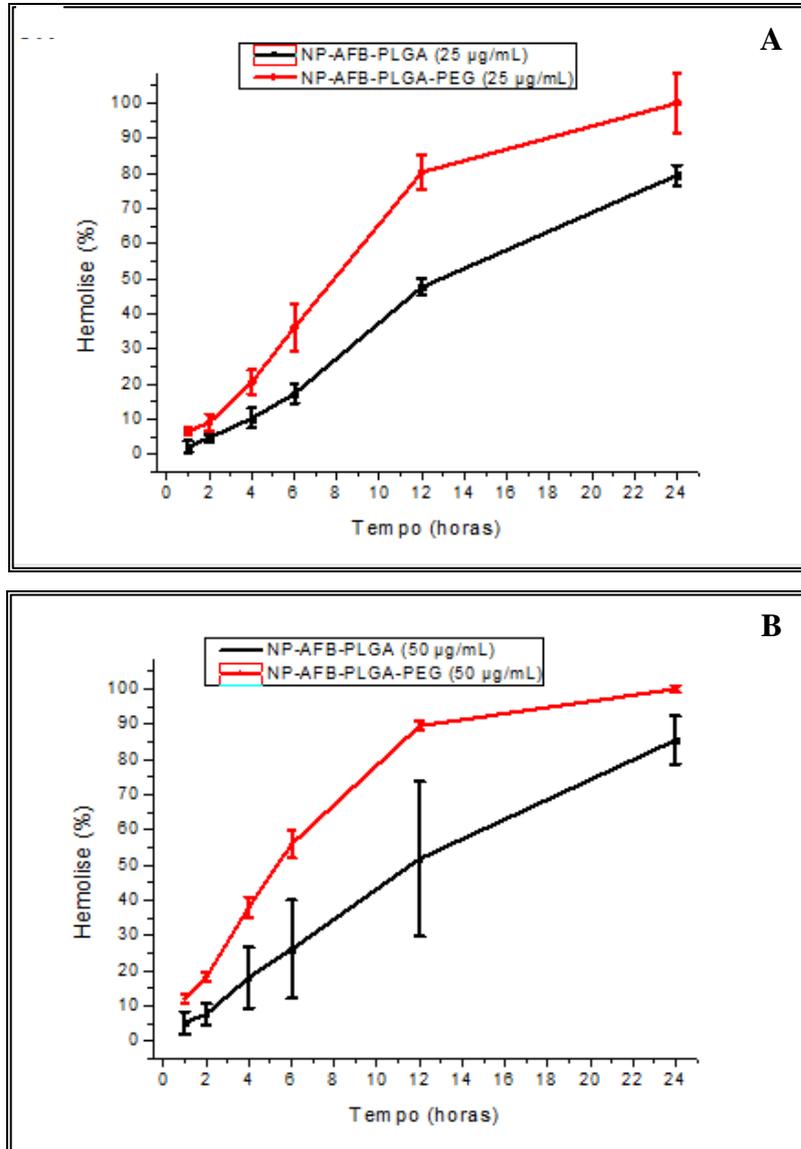
5.5.2 Toxicidade celular – ensaio *in vitro*

A citotoxicidade da AFB é um dos fatores limitantes quanto à utilização deste fármaco na terapia antifúngica (JAIN e KUMAR, 2010). Para averiguar se esta citotoxicidade estava presente nas formulações poliméricas contendo AFB, realizou-se um ensaio com eritrócitos humanos, por constituírem um bom modelo para estudo de permeabilidade e danos provenientes da ação tóxica de fármacos poliênicos (VAN DE VEN et al, 2012).

A Figura 16 A e B demonstra a percentagem de hemólise provocada pelas formulações em função do tempo, comparando-se a AFB livre na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ para (A) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (B). Estas concentrações de AFB livre foram caracterizadas como hemólise total, uma vez que provocaram elevada lise nas células nos primeiros 60 minutos de incubação.

De acordo com a Figura 16, a AFB nas nanopartículas compostas pela blenda PLGA-PEG apresentou maior percentual de toxicidade celular comparação com a AFB presente nas nanopartículas de PLGA ($p < 0,05$). Em ambos os casos (A e B), o caráter hidrofílico do PEG pode ter conferido menor estabilidade à estrutura em meio aquoso, proporcionando uma liberação do fármaco mais rápida do que ocorreu na formulação de PLGA. No entanto, ainda que no tempo 24h a formulação de NP-AFB-PLGA-PEG nas duas concentrações testadas tenha atingindo 100% de hemólise, esta NP continua sendo menos tóxica ($p < 0,05$) sobre células do que o controle (AFB livre).

Figura 16 - A – Percentagem de hemólise produzida pelas nanopartículas poliméricas contendo AFB (25 µg/mL) em função do tempo. **B** - Percentagem de hemólise produzida pelas nanopartículas poliméricas contendo AFB (50 µg/mL) em função do tempo. AFB livre nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL foi considerada como hemólise total (100%) em A e B, respectivamente.

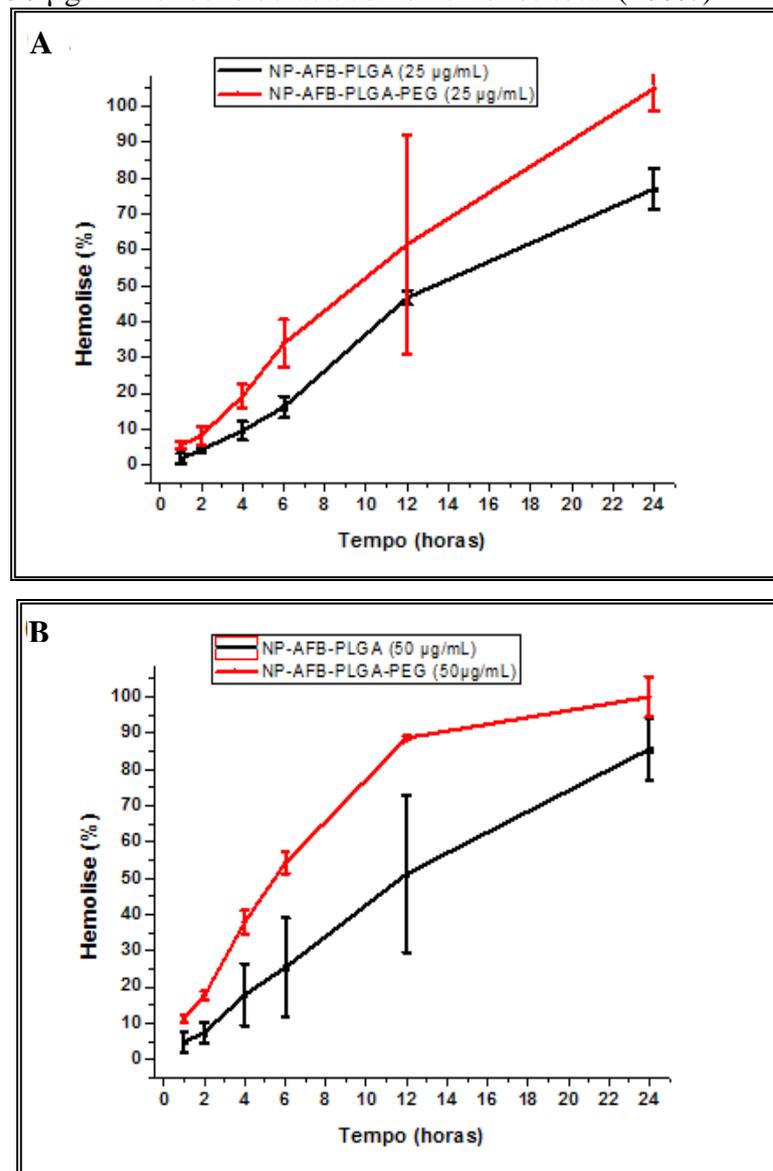


A comparação da atividade hemolítica da formulação de PLGA e da PLGA-PEG de mesma concentração em um mesmo tempo de análise, indica um perfil tempo - dependente de lise das hemácias (TORRADO et al. 2008). A explicação mais coerente para o caráter tempo - dependente está relacionada à liberação do fármaco a partir da NP que se dá de forma gradativa e prolongada. Tal comportamento pode estar relacionado ao fato de que a AFB liberada a partir das nanoestruturas não atinge o limiar necessário para produzir toxicidade celular (ADAMS, 2003), e a toxicidade só deverá surgir ao longo do tempo pelo acúmulo de AFB disponível no meio, principalmente na forma molecular agregada (LEGRAND, 1992).

O acúmulo do fármaco em meio aquoso pode favorecer a formação de agregados moleculares insolúveis (ESPADA et al., 2008), que são altamente seletivos para o colesterol da membrana celular, provocando a formação de poros e consequente lise celular.

Comparando-se as formulações poliméricas com a AFB deoxicolato (Figura 17 A e B), que corresponde à formulação de referência no mercado (ESPADA et al., 2008), observa-se o menor índice hemolítico para as nanopartículas contendo AFB compostas por PLGA e um maior índice hemolítico para a AFB a partir das nanopartículas compostas por PLGA-PEG, decorridas 24h de estudo.

Figura 17 – A: Percentagem de hemólise produzida pelas nanopartículas poliméricas contendo AFB (25 µg/mL) em função do tempo. AFB deoxicolato na concentração 25 µg/mL foi considerada como hemólise total (100%). **B** - Percentagem de hemólise produzida pelas nanopartículas poliméricas contendo AFB (50 µg/mL) em função do tempo. AFB deoxicolato na concentração 50 µg/mL foi considerada como hemólise total (100%).



Igualmente ao ocorrido na comparação com AFB livre, embora a formulação de PLGA-PEG tenha atingido 100% de hemólise ao final do estudo, ainda mostrou-se menos citotóxica que o padrão comercial, que, decorridos 60 minutos de ensaio já lisou totalmente o sistema celular em estudo.

A confirmação do perfil de lise eritrocitária da formulação PLGA-PEG carece de mais estudos e pode ser necessário o incremento da formulação.

A hemólise não foi constatada nas nanopartículas de PLGA ou de PLGA-PEG que não continham AFB associada, confirmando biocompatibilidade dos polímeros empregados nas formulações, bem como ressaltando que o padrão hemolítico está associado unicamente ao fármaco. Controles contendo apenas DMSO, solvente empregado na formulação para dissolução de AFB, também foram aplicados no estudo e não apresentaram lise eritrocitária em ambas concentrações testadas (25 e 50 µg/mL).

De acordo com as percentagens de hemólise apresentadas pelas nanoestruturas testadas no presente estudo, pode-se considerar as nanopartículas poliméricas como potenciais carreadores de AFB, pois, são capazes de liberar uma concentração de AFB inferior a necessária para a formação de poros na membrana plasmática das células de mamíferos ao longo do tempo, através de um perfil de liberação gradual e prolongado. Portanto, as NP's parecem ser menos tóxicas que ao fármaco em sua forma livre e que o padrão comercial.

5.5.3 Toxicidade – ensaio *in vivo*

Em relação ao peso corporal dos ratos, este foi aferido diariamente para o cálculo das doses a serem administradas e não foram registradas alterações significativas em nenhum dos grupos, comprovando que o tratamento com nanopartículas poliméricas contendo AFB não provocaram alterações no quadro nutricional dos ratos.

Quanto aos aspectos clínicos dos animais durante o experimento, foi observada diarreia no quarto dia nos ratos pertencentes aos grupos 6 e 7, tratados com a formulação comercial - AFB deoxicolato, v.o. e via i.p.

No oitavo dia, decorrido o tempo de tratamento dos animais com as nanopartículas e com o fármaco livre, procedeu-se a eutanásia e subsequente coleta de amostras.

5.5.3.1 Testes hematológicos

A Tabela 27 demonstra os valores obtidos para os componentes celulares do sangue dos animais após o período experimental de 7 dias, onde doses de 10 mg/kg/dia foram administradas v.o. e via i.p.

Tabela 27 – Contagem dos componentes celulares sanguíneos dos animais após o tratamento com nanopartículas de PLGA e de PLGA-PEG contendo AFB e com o fármaco livre. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n = 5).

Animais	Hemograma			
	Eritrócitos (milhões/ mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Volume Globular (%)	Leucócitos (unidades/ mm ³)
Grupo 1 (controle)	7,97 \pm 0,13	14,35 \pm 0,35	43,10 \pm 0,70	12250 \pm 2757,72
Grupo 2	7,06 \pm 0,52	12,62 \pm 0,85	36,90 \pm 2,55	17700 \pm 2264,21
Grupo 3	7,82 \pm 0,27	13,58 \pm 0,46	39,92 \pm 1,85	20300 \pm 4663,15
Grupo 4	7,86 \pm 0,47	14,44 \pm 0,72	41,92 \pm 2,39	16360 \pm 8708,50
Grupo 5	7,92 \pm 0,42	14,34 \pm 0,48	42,20 \pm 2,15	9960 \pm 2080,38
Grupo 6	7,15 \pm 1,01	13,36 \pm 1,50	39,02 \pm 4,32	10520 \pm 719,03
Grupo 7	7,33 \pm 0,49	12,98 \pm 1,14	38,12 \pm 2,90	11520 \pm 2320,99

Grupo 1: receberam tampão fosfato salina v.o.; Grupo 2: receberam NP-AFB-PLGA i.p.; Grupo 3: receberam NP-AFB-PLGA-PEG i.p.; Grupo 4: receberam NP-AFB-PLGA v.o.; Grupo 5: receberam NP-AFB-PLGA-PEG v.o.; Grupo 6: receberam AFB deoxicolato v.o.; Grupo 7: receberam AFB deoxicolato i.p.

Não houve diferença estatística comprovada com grau de confiabilidade de 95%, entre o grupo controle e qualquer outro grupo, diante de qualquer componente celular.

Uma vez que os leucócitos participam do mecanismo de defesa do organismo, a contagem dos leucócitos totais é muito empregada para detecção de possíveis agentes infecciosos ou corpos estranhos. Conforme dados da Tabela 27, não registrou-se alteração significativa do número de leucócitos em relação ao controle, indicando que não houve processo inflamatório ou outro dano que resultasse em leucopenia ou leucocitose. De acordo com dados da literatura, pacientes tratados com AFB em formulações convencionais apresentam quadros de leucopenia (FILLIPPIN e SOUZA, 2006). Essa observação indica que as formulações de nanopartículas poliméricas contendo AFB não provocaram alterações hematológicas nos animais durante o experimento.

Na mensuração dos eritrócitos não houve alteração significativa em relação às amostras controle. Resultados similares foram obtidos por Ren e colaboradores (2009), que ao estudar a eficácia terapêutica de nanopartículas poliméricas de AFB, não detectou diferença estatística entre a contagem das células sanguíneas dos animais em relação ao grupo controle.

A partir deste resultado especula-se que as NP's liberaram o fármaco de forma lenta, não havendo a concentração necessária para interação com o colesterol presente nos eritrócitos, ou ainda, não atingindo a concentração de AFB necessária para a formação dos aglomerados moleculares, presentes na maioria dos casos de ataque às células sadias. No entanto, tal afirmação carece da aplicação de outros experimentos como o teste de liberação controlada a partir de equipamento de célula de Franz por exemplo.

5.5.3.2 Testes bioquímicos

A toxicidade crônica da AFB é de peculiar preocupação uma vez que na terapêutica o seu uso se estende por duas a três semanas (REN et al., 2009), e, além disso, a AFB é amplamente utilizada para tratamento de infecções fúngicas oportunistas, onde os pacientes apresentam fragilidade em seu sistema imunológico e fazem uso de outros medicamentos com potencial toxicidade celular.

É neste sentido que o presente experimento analisou os níveis plasmáticos de marcadores de função renal e hepática, investigando a toxicidade das formulações de nanopartículas associadas à AFB, bem como a ação da formulação comercial AFB deoxicolato em comparação aos padrões exibidos por amostras do grupo controle, que não recebeu alguma formulação de AFB.

Os níveis de creatinina no sangue foram medidos no intuito de identificar possíveis danos na função renal, principalmente no que diz respeito a filtração glomerular. Os dados da Tabela 28 demonstram que não houve alteração significativa nos níveis de creatinina, indicando que as NP's não demonstraram dano renal, passível de detecção por análise sanguínea.

Tabela 28 – Níveis plasmáticos de alguns marcadores bioquímicos após o tratamento com nanopartículas de PLGA e de PLGA-PEG contendo AFB e com o fármaco livre. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n = 5).

Animais	Marcadores bioquímicos			
	Creatinina K (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
Grupo 1 (controle)	0,63 \pm 0,09	45,88 \pm 13,76	105,78 \pm 32,05	446,85 \pm 110,24
Grupo 2	0,42 \pm 0,07	55,52 \pm 6,90	72,08 \pm 27,91	332,67 \pm 206,54
Grupo 3	0,52 \pm 0,10	85,18 \pm 41,13	77,94 \pm 23,75	442,13 \pm 144,51
Grupo 4	0,58 \pm 0,08	57,12 \pm 14,70	89,48 \pm 25,60	325,47 \pm 140,34
Grupo 5	0,50 \pm 0,08	47,86 \pm 7,23	100,14 \pm 14,44	386,63 \pm 105,77
Grupo 6	0,52 \pm 0,06	46,62 \pm 4,38	98,98 \pm 17,83	416,99 \pm 85,61
Grupo 7	0,40 \pm 0,04	42,67 \pm 12,87	93,99 \pm 21,84	487,35 \pm 99,86

Grupo 1: receberam tampão fosfato salina v.o.; Grupo 2: receberam NP-AFB-PLGA i.p.; Grupo 3: receberam NP-AFB-PLGA-PEG i.p.; Grupo 4: receberam NP-AFB-PLGA v.o.; Grupo 5: receberam NP-AFB-PLGA-PEG v.o.; Grupo 6: receberam AFB deoxicolato v.o.; Grupo 7: receberam AFB deoxicolato i.p.

Em complemento, os níveis da uréia foram investigados e estão dispostos na Tabela 28, onde pode-se perceber que não houve diferença significativa entre os dados do controle e os outros grupos. A uréia é produzida pelo fígado e excretada pelos rins, quando esta excreção falha, ou por causas pré-renais como é o caso de insuficiência cardíaca congestiva, ou por causas renais como nefrites, insuficiência renal aguda ou crônica, a uréia começa a acumular-se no sangue devido à velocidade da filtração glomerular estar diminuída. (PEIXOTO, 2008).

Como os grupos de ratos estavam perfeitamente saudáveis previamente ao início do experimento, descarta-se a interferência de fatores externos e ainda, salienta-se o bom desempenho das NP's, uma vez que não causaram danos renais nos animais, com base na análise dos níveis de uréia e creatinina.

Olson e colaboradores (2008) avaliaram as propriedades tóxicas de duas formulações de AFB diante de testes *in vitro* e *in vivo*. Igualmente ao ocorrido no presente estudo, não encontraram alterações significativas nos exames hematológicos e bioquímicos, no entanto, nos testes histopatológicos foi possível identificar danos renais e necrose tubular aguda em muitas amostras. Esse estudo corrobora para a necessidade de análise histológica em complemento as avaliações bioquímicas, uma vez que as pesquisas envolvendo o fármaco AFB sempre apontam para algum nível de toxicidade celular.

Para avaliar a hepatotoxicidade, um dos efeitos colaterais provocados pelo uso de AFB

(FILLIPPIN e SOUZA, 2006), os níveis das enzimas transaminases, alanina amino transferase (ALT) e, aspartato amino transferase (AST) foram analisados. Não houve elevação significativa comparando-se os grupos tratados ao grupo controle, denotando que a administração de nanopartículas contendo AFB não provocou alterações nos níveis séricos das transaminases.

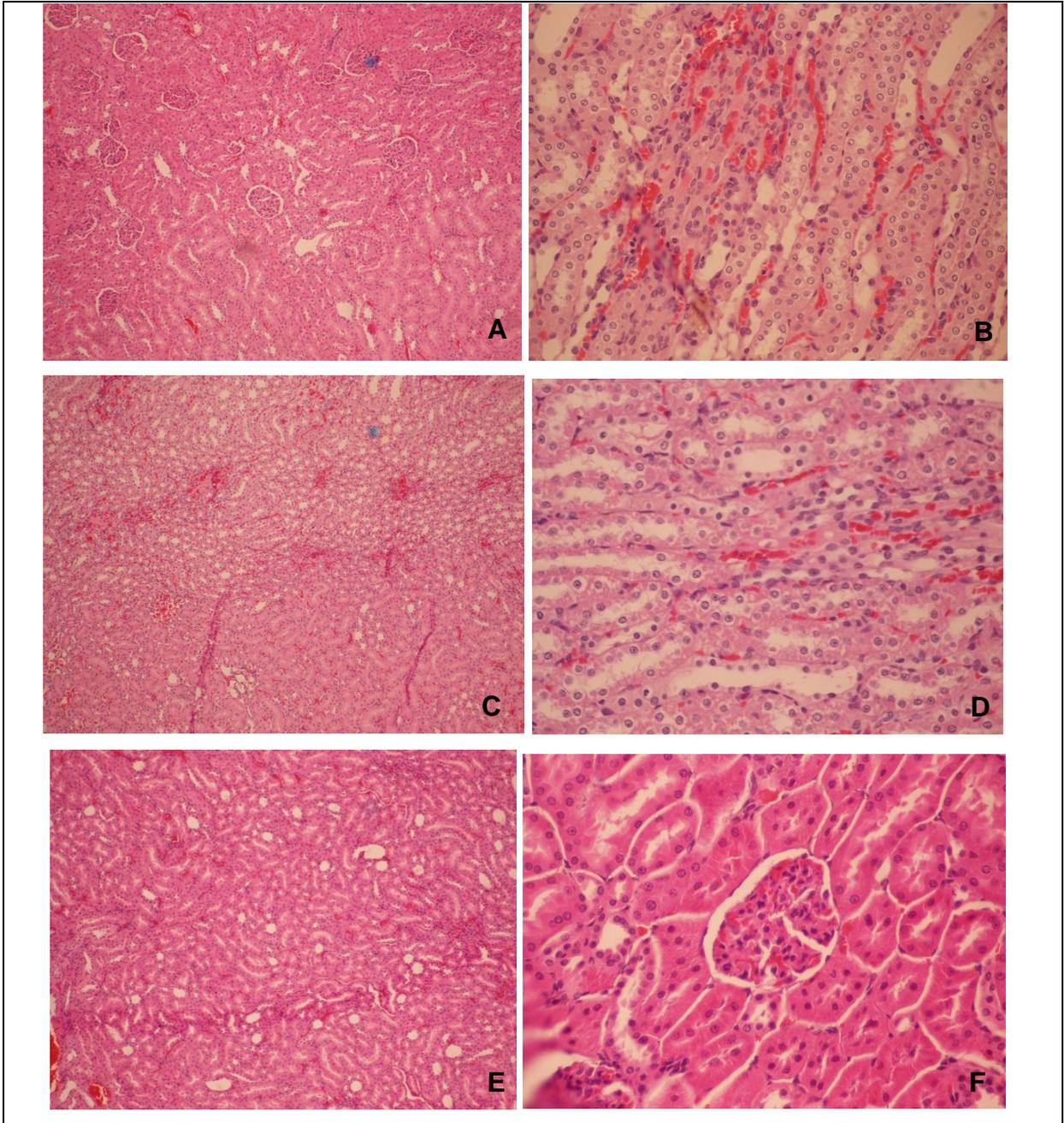
A administração intraperitoneal e oral de nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG contendo AFB em ratos saudáveis, não induziu aumento ou alterações dos níveis dos marcadores biológicos de danos renais e hepáticos em relação ao grupo de animais que não recebeu as formulações ou AFB livre.

5.5.3.3 Testes histopatológicos

A partir dos tecidos coletados, fígado e rins, foram produzidas lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE). A análise das lâminas se deu por microscopia de luz utilizando-se uma câmera digital acoplada que capturou as imagens para inspeção visual. O método de análise baseou-se na comparação com as lâminas dos animais pertencentes ao grupo controle e na inspeção do estado celular dos tecidos.

Os resultados para as análises dos rins estão sumarizados na Figura 18.

Figura 18 – Fotomicrografias de rins de ratos *Wistar* machos pertencentes ao grupo controle tratado com solução tampão (A e B); grupo tratado com suspensão de NP- AFB-PLGA via i.p. (C); grupo tratado com suspensão de NP- AFB-PLGA via oral (D); grupo tratado com suspensão de NP- AFB-PLGA-PEG via i.p. (E); grupo tratado com suspensão de NP- AFB-PLGA-PEG via oral (F). HE, aumento de 100x em A, C e E, e 400x em B, D e F.



Como é possível observar nos cortes histológicos dos rins dos animais do grupo controle apresentados nos quadros A e B da Figura 18, não há alterações celulares e a arquitetura geral está preservada, conforme o esperado pois os animais foram tratados com tampão fosfato salina. Na Figura 18 – A é possível identificar a integridade dos corpúsculos renais da zona cortical, já em B, nota-se a parte interna da zona medular renal com

celularidade e configuração adequadas.

Comparativamente, na Figura 18 – C e D, o tecido renal da zona cortical e medular está preservado, indicando que o tratamento com NP's de PLGA e PLGA-PEG contendo AFB, via intraperitoneal, não causou nenhum dano renal aos animais. A Figura 18 – E, corresponde à zona medular do rim de um animal do grupo tratado com NP-AFB-PLGA via oral, e igualmente ao demonstrado pelo controle (B), não apresenta nenhuma alteração celular. Na amostra de rim do grupo tratado com NP-AFB-PLGA-PEG via oral (Figura 18 – F), é possível identificar o folheto visceral da cápsula e Bowman rodeado por túbulos contorcidos proximais, com celularidade e morfologia adequadas.

O dano renal proveniente do tratamento com AFB já está bem descrito: lesão glomerular devido ao espessamento da membrana basal e lesão tubular com degeneração generalizada de ramo ascendente da alça de Henle (TUON et al. 2013). Esta descrição não foi constatada nos cortes histológicos dos rins no presente estudo, o que sugere que as nanopartículas desenvolvidas não são nefrotóxicas.

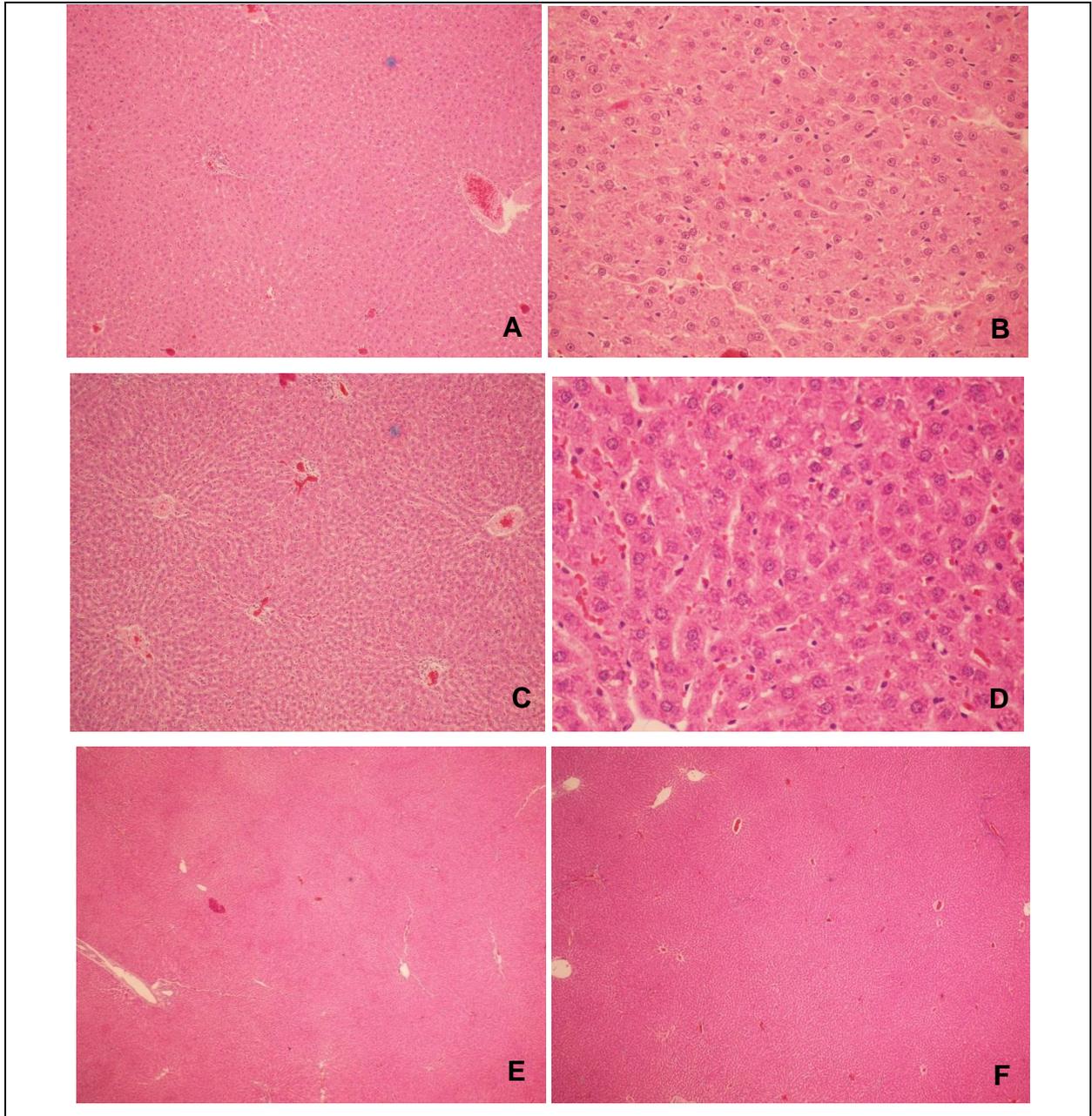
Os resultados encontrados no presente trabalho são significativos, pois em outros estudos como o de Olson e colaboradores (2008) que comparou a eficácia e toxicidade de duas formulações comerciais de AFB *in vivo*, danos celulares como necrose tubular renal foram encontrados, indicando a toxicidade da formulação disponível comercialmente.

Em outro estudo (ESPUELAS et al., 2003) analisou-se a toxicidade de duas formulações poliméricas de AFB em comparação a AFB-DEOXI, e dentre outros ensaios, verificou-se o acúmulo de AFB nos rins de ratos infectados com *C. albicans*. Os níveis de acúmulo do fármaco proveniente das NP's foram significativamente menores que o encontrado para AFB-DEOXI.

Muito embora nos presente estudo não tenham sido detectadas alterações renais também nos grupos tratados com AFB-DEOXI (v.o e i.p.), os resultados corroboram com o disponível na literatura, de que formulações nanoestruturadas são promissores carreadores de AFB para o tratamento antifúngico. Possivelmente, se o tempo experimental fosse estendido, se os animais estivessem sob quadro de imunossupressão, seria possível detectar alterações renais provenientes do tratamento com AFB-DEOXI, que talvez sejam passíveis de detecção microscópica somente após determinado nível de cronicidade.

No que diz respeito ao tecido hepático, as fotomicrografias estão apresentadas nas Figuras 19 a 21.

Figura 19 – Fotomicrografias do fígado de ratos *Wistar* machos pertencentes ao grupo controle tratado com solução tampão (A e B); grupo tratado com suspensão de NP- AFB-PLGA via i.p. (C); grupo tratado com suspensão de NP-AFB-PLGA-PEG via i.p. (D); grupo tratado com suspensão de NP-AFB-PLGA via oral (E); grupo tratado com suspensão de NP-AFB-PLGA-PEG via oral (F). HE, aumento de 100x em A e C, 400x em B e D, e 40x em E e F.



Todos os animais pertencentes ao grupo controle e aos grupos tratados com nanopartículas contendo AFB, apresentaram morfologia e celularidade hepática adequadas. Na Figura 19 – A é possível observar o parênquima hepático apoiado em tecido conjuntivo denso e em B, os hepatócitos apresentaram coloração compatível para HE, onde a basofilia e eosinofilia indicaram a integridade funcional das organelas (JUNQUEIRA e CARNEIRO,

2008).

A Figura 19 – C corresponde a uma amostra de fígado de animal pertencente ao grupo tratado com NP-AFB-PLGA (via i.p.), onde é possível observar espaços porta onde os hepatócitos formam placas celulares na direção do centro lobular, e os espaços entre eles está ocupado por capilares sinusóides, tal qual a descrição de Junqueira e Carneiro (2008).

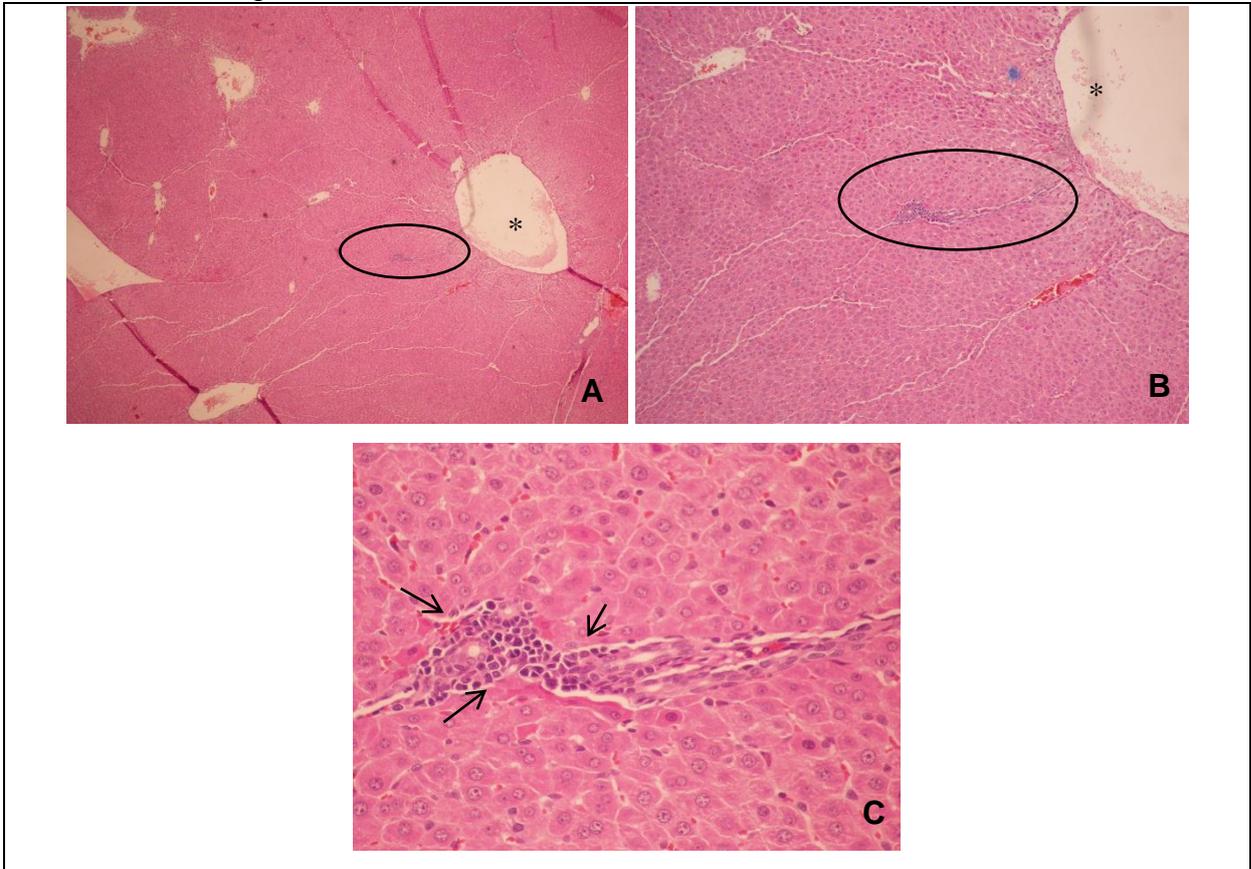
Nas Figuras 19 - D e F, verifica-se celularidade e estrutura geral preservada, bem como na Figura 19 – E, onde pode-se observar os hepatócitos com morfologia e coloração adequadas, comparativamente à Figura 19 – B.

Em outros estudos envolvendo nanotecnologia, danos hepáticos ou acúmulo das estruturas no fígado foram relatados. Como é o caso de Ji e colaboradores (2009) que administraram dois tipos de nanotubos de carbono de parede múltipla intravenosamente em camundongos, em doses de 10 e 60 mg/kg e analisaram o fígado após 15 e 60 dias. Como resultado, encontraram alterações inflamatórias severas na região portal, necrose celular e necrose focal no fígado dos animais.

Martins (2011) analisou o efeito da administração oral de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em camundongos, em diferentes dosagens, por 7 dias. A extração do tecido se deu no 7º e 30º após o tratamento, e o fígado dos animais apresentou acúmulo de material amorfo, provavelmente nanotubos, além de apresentar infiltrado inflamatório e apoptose celular.

Em contrapartida aos achados histopatológicos para os grupos tratados com NP's, os cortes histológicos do fígado dos animais pertencentes aos grupos tratados com AFB-DEOXI, indicaram traços de infiltrado inflamatório, como pode ser observado a partir da Figura 20.

Figura 20 – Fotomicrografias do fígado de rato *Wistar* macho pertencente ao grupo experimental tratado com AFB-DEOXI via oral. **A:** aumento 40x; **B:** aumento 100x; **C:** aumento 400x. **Asterisco** - veia centro-lobular; **elipse** – infiltrado inflamatório; **setas** – células inflamatórias do tipo linfocitárias. HE.

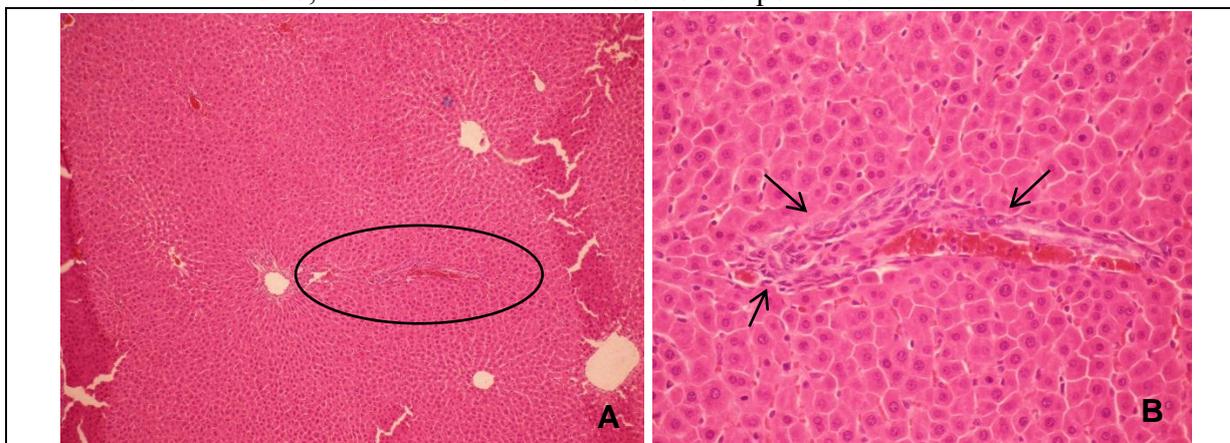


A Figura 20 apresenta discreta quantidade de células inflamatórias do tipo linfocitárias em um dos espaços sinusoidais. Esta deposição de células linfocitárias caracteriza o dano hepático periportal, que promove uma resposta inflamatória mononuclear (MARTINS, 2011).

O fígado apresenta como uma de suas funções principais a degradação de substâncias tóxicas absorvidas no trato gastrointestinal ou produzidas em outras regiões do corpo (KUMAR et al., 2005), além de ser o principal mecanismo de eliminação da AFB. Para confirmação de dano celular hepático, a avaliação se dá pela presença e infiltrado inflamatório no espaço porta ou no parênquima hepático (MARTINS, 2011).

Os padrões histológicos da inflamação crônica no fígado são o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário portal e periportal e também foram verificados no fígado de animais pertencentes ao grupo experimental que recebeu AFB-DEOXI via i.p. (Figura 21).

Figura 21 - Fotomicrografias do fígado de rato *Wistar* macho pertencente ao grupo experimental tratado com AFB-DEOXI via i.p. **A:** aumento 40x; **B:** aumento 400x. **Elipse** – infiltrado inflamatório; **setas** – células inflamatórias do tipo linfocitárias. HE.



Igualmente ao ocorrido com as amostras histológicas do fígado dos animais tratados experimentalmente com AFB-DEOXI via oral, nas amostras do grupo que recebeu AFB-DEOXI intraperitonealmente constam infiltrados inflamatórios crônicos linfoplasmocitários, em grau discreto periportal.

Tal alteração histopatológica confirma o dano hepático, bem como corrobora com o disposto na literatura acerca da hepatotoxicidade da formulação AFB-DEOXI disponível para tratamentos antifúngicos.

É o caso do trabalho de Espuelas e colaboradores (2003) que investigaram a eficácia e toxicidade de novas formulações nanoestruturadas para AFB, frente à AFB-DEOXI. Os pesquisadores analisaram entre outros ensaios, o acúmulo do fármaco nos tecidos de animais com mensuração efetuada 24h após o término do tratamento com as formulações, em doses de 0,5 µg/mL. Os resultados apontaram para 4,3 µg de AFB por grama de tecido hepático no tratamento com AFB-DEOXI, enquanto que apenas 1,8 µg de AFB por grama de tecido hepático no tratamento com nanopartículas de AFB.

Apoiando-se em dados da literatura e através das análises histopatológicas do presente estudo, foi possível inferir que o tratamento por 7 dias com nanopartículas poliméricas contendo AFB, não alterou a estrutura e funcionalidade renal e hepática dos animais utilizados no experimento. Em contrapartida, comprovadamente a formulação padrão, AFB-DEOXI, demonstrou dano hepático nos animais que receberam a suspensão via oral ou i.p.

6 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método analítico simples e confiável por CLAE para quantificação de AFB em solução e validado de acordo com o preconizado pelas normas vigentes.

O delineamento fatorial aplicado no presente estudo constituiu-se como ferramenta útil para a otimização da formulação de nanopartículas de PLGA e de blendas de PLGA-PEG contendo AFB. A partir do delineamento fatorial foi possível estabelecer a composição ótima das NP's para obtenção de partículas com diâmetros reduzidos e elevados valores de eficiência de encapsulação do fármaco.

Para o caso do PLGA a composição ótima com base nas duas variáveis independentes estudadas foi de 100 mg de PLGA e o solvente acetato de etila. Para o caso da blenda PLGA-PEG, a composição ótima empregou 100 mg de PLGA associada a 20 mg de PEG e o acetato de etila como solvente. Tais formulações constituem-se como inovações tecnológicas e o depósito de pedido de patente já foi efetivado sob o número de protocolo: 015110002865.

As nanopartículas de PLGA e de blendas PLGA-PEG foram obtidas com êxito através do método de emulsificação/ evaporação do solvente. Esse método permitiu encapsular elevados índices de AFB, comprovando que a emulsão simples foi adequada para encapsulação de AFB, um fármaco hidrofóbico.

A caracterização físico-química demonstrou que as nanopartículas desenvolvidas apresentaram estreita faixa de distribuição de tamanho e reduzido diâmetro médio. As análises por espectrofotometria denotaram que a AFB encontra-se em seu estado molecular agregado nas NP's, não diferindo dos vários estudos envolvendo AFB disponíveis na literatura.

A avaliação das nanopartículas desenvolvidas por meio de DRX permitiu observar que a complexação do PLGA amorfo, do PEG semicristalino e da AFB cristalina, levaram a uma alteração de cristalinidade dos componentes que resultou na formulação de nanopartícula com caráter amorfo, portanto, propensa a melhor dissolução de AFB em meio fisiológico.

O teste antifúngico *in vitro* comprovou que as NP's contendo AFB são tão eficazes na inibição do crescimento de colônias de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*, quanto à droga livre ou sua formulação comercial padrão

Através da avaliação *in vitro* da atividade hemolítica das formulações foi possível definir um perfil tempo - dependente de lise das hemácias, onde a liberação de AFB a partir das NP's se deu de forma gradativa e prolongada. NP-AFB-PLGA-PEG mostrou-se mais hemolítica que NP-AFB-PLGA em função do tempo, provavelmente devido ao caráter

hidrofílico do PEG que conferiu maior molhabilidade à estrutura libertando a AFB mais rapidamente do que NP-AFB-PLGA.

Embora as NP's contendo AFB tenham atingido 100% de hemólise ao final do estudo de toxicidade celular, ainda apresentaram-se menos citotóxicas do que o padrão comercial e do que o fármaco livre.

Os estudos *in vivo* em ratos *Wistar* comparando os efeitos das nanopartículas desenvolvidas com o padrão comercial – AFB deoxicolato foram importantes ao demonstrar dano hepático provocado pela AFB-Deoxi, enquanto não foram detectadas alterações celulares nos rins ou fígado dos animais que receberam as formulações de NP's.

A administração de NP-AFB-PLGA e NP-AFB-PLGA-PEG, por via oral e intraperitoneal, não proporcionou alteração significativa no perfil hematológico exibido pelos animais em comparação ao grupo controle. Não foram detectadas alterações significativas nos níveis plasmáticos de creatinina, uréia, ALT e AST, que indicassem danos nefro ou hepatotóxicos.

Dessa maneira, pode-se afirmar que as NP's desenvolvidas a partir de PLGA e da blenda de PLGA-PEG apresentam adequadas características físico-químicas que as tornam potenciais sistemas de liberação controlada de AFB, capazes de manter a atividade antifúngica do fármaco e diminuir sua citotoxicidade em relação ao padrão comercial.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, M. M.; KWON, G. S. R. Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length. *Journal of Controlled Release*, v. 87, p.23–32, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução – RE nº 889, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, p. 505-515, 2008.

ARRUDA, G. J. B. *Estratégias tecnológicas para aumento de solubilidade e diminuição de toxicidade do fármaco antifúngico anfotericina B*. Monografia (Curso Farmacêutico-Bioquímico) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2011.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G.; Candidíase. DST - *J bras Doenças Sex Transm*, v. 22, p. 22-38, 2010.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 3, p.163-171, 2000.

BECK-BROICHSITTER, M.; SCHMEHL, T.; GESSLER, T.; SEEGER, W.; KISSEL, T.; Development of a biodegradable nanoparticle platform for sildenafil: Formulation optimization by factorial design analysis combined with application of charge-modified branched polyesters. *Journal of Controlled Release*, v. 157, p. 469–477, 2012.

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

BRITISH Pharmacopoeia, London: Her Majesty`s Stationery Office, 2012.

CANAL, F.; VICENT, M. J.; PASUT, G.; SCHIAVON, O. Relevance of folic acid/polymer ratio in targeted PEG–epirubicin conjugates. *Journal of Controlled Release*, v. 146, p. 388–399, 2010.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, v.161, p. 505-522, 2012.

DAS, S.; SURESH, P. K. Nanosuspension: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface..Application to amphotericin B. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v.7, p. 242-247, 2011.

DERAKHSHANDEH, K.; ERFAN, M.; DADASHZADEH, S. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.66, p.34–41, 2007.

DRUMOND, W.S.; WANG, S. H. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (Ácido Lático B-Glicol Etilênico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 14, p. 74-79, 2004.

ESPADA, R., VALDESPINA, S., ALFONSO, C., RIVAS, G., BALLESTEROS, M. P., ESPUELAS, M. S.; LEGRAND, P.; LOISEAU; P. M.; BORIES, C.; BARRAT, G.; IRACHE, J. M.; *In vitro* antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(ϵ -caprolactone) nanospheres. *J Drug Target*, v.10, p.593–99, 2002.

ESPADA, R.; VALDESPINA, S.; ALFONSO, C.; RIVAS, G.;BALLESTEROS, M. P.; TORRADO, J. J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 361, p. 64–69, 2008.

ESPUELAS, M. S.; LEGRAND, P.; CAMPANERO,M. A.; APPEL, A.; CHÉRON, M.; GAMAZO, C.; BARRATT, G.; IRACHE, J. M. Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 419–427, 2003.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 75, p. 96–106, 2010.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorgan. Med. Chem.*, v.17, p. 2950-2962, 2009.

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

FORMARIZ, T. P. Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista Júlio e Mesquita Filho, Araraquara, 2008.

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.

FRANZINI, C. M. Complexo de inclusão de anfotericina B com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista Júlio e Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

FRANZINI, C. M. *Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

FREYTAG, T. DASHEVSKY, A., TILLMAN, L., HARDEE, G. E., BODMEIER, R., Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *Journal of Controlled Release*, v.69, p.197–207, 2000.

FUKUI, H.; KOIKE, T.; NAKAGAWA, T.; SAHEKI, A.; SONOKE, S.; TOMII, Y.; SEKI, J. Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid

nanosphere (LNS®), with commercial lipid-based formulations. *Int. J. Pharm.*, v. 267, p. 101-112, 2003.

GAZZONI, A. F.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; GUARRO, J. Efficacy of intrathecal administration of liposomal amphotericin B combined with voriconazole in a murine model of cryptococcal meningitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.39, p. 223-227, 2012.

GERBAUD, E.; TAMION, F.; GIRAULT, C.; CLABAULT, K.; LEPRETRE, S.; LEROY, J.; BONMARCHAND, G. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional amphotericin B to liposomal amphotericin B (AmBisome). *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 51, p. 473-475, 2003.

GOLD, N.; STOUT, H.A.; PAGANO, J.F.; DONOVICK, R. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. I. In vivo studies. *Antibiot. Annu.*, v. 1955-1956, p. 579-586, 1956.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Ed. Mac Graw Hill, Rio de Janeiro, 11ª Edição. p. 971-974, 2006.

GUO, L.S.S. Amphotericin B colloidal dispersion: an improved antifungal therapy. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 47, p. 149-163, 2001.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. *Nanoparticles Technology for Drug Delivery*. Taylor & Francis. New York, v. 159, 2006.

HERMANS, C.; PLAS, D. V.; EVERAERT, A.; WEYENBERG, W.; LUDWIG, A. Full factorial design, physicochemical characterisation and biological assessment of cyclosporine A loaded cationic nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.82, p. 27-35, 2012.

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 Deliver. Rev.*, v. 24, p. 345-363, 1997.

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

ICH Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.

JAHANSHAHI, M.; BABAEI, Z. Protein nanoparticle: a unique system as drug delivery vehicles. *Afr. J. Biotech.*, v. 7, p. 4926, 2008.

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

JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, v.358, p.37-54, 2005.

JAIN, S. K.; RAINS, J.; JONES, K. Effect of curcumin on protein glycosylation, lipid peroxidation, and oxygen radical generation in human red blood cells exposed to high glucose levels. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, p. 92–96, 2006.

JEON, H. J.; JEONG, H. I.; JANG, M. K.; PARK, Y. H.; NAH, J. W. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v.207, p. 99-108, 2000.

JI, Z; ZHANG, D; LI, L; SHEN, X; DENG, X; DONG, L; WU, M; LIU, Y. The hepatotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in mice. *Nanotechnology*, v. 20, p. 9, 2009.

JUNG, S.H.; LIM, D.H.; JUNG, S.H.; LEE, J.E.; JEONG, K.; SEONG, H.; SHIN, B.C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 37, p. 313-320, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11ª Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 388 p., 2008.

KAFETZIS, D. A.; VELISSARIOU, I.M.; STABOULI, S.; MAVRIKOU, M.; DELIS, D.; LIAPI, G.. Treatment of pediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int J Antimicrob Agents*, v. 25, p.26–30, 2005.

KAYSER, O., LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 6, p. 3-5, 2005.

KHAN, Z.; AL-THABAITI, S. A.; OBAID, A. Y.; KHAN, Z. A.; AL-YOUBI, A. O. Effects of solvents on the stability and morphology of CTAB-stabilized silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v,390, p.120-125, 2011.

KIM, J.H.; KIM. Y.S; PARK, K.; LEE, S.; NAM, H. Y.; MIN, K. H.; et al. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Control Release*, v. 127, p. 41-49, 2008.

KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. *J.Crit. Care*, v. 26, p. 225.e1-225, 2011.

KUMAR, V; ABBAS, A; FAUSTO, N; ROBBINS, S; COTRAN, R. Bases patológicas das doenças, tradução da 7ª edição, Elsevier, 2005.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf., B*, v. 75, p. 1-18, 2010.

KÜRTI, L.; KUKOVECZ, A.; KOZMA, G.; MÁRIA, R. A.; DELI, A.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles. *Powder Technology*, v. 212, p. 210-217, 2011.

LEGRAND, P.; ROMERO, E. A.; COHEN, B. E. et al. Effect of aggregation and solvent on the activity of amphotericin B on human erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.36, p.2518–22, 1992.

LINCOPAN, N.; BORELLI, P.; FOCKB, R.; MAMIZUKAB, E. M.; RIBEIRO, A. M. C.; Toxicity of an effective amphotericin B formulation at high cationic lipid to drug molar ratio. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.58, p.175–183, 2006.

LIU , H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials*, v.28, p.354-369, 2007.

MAINARDES, R. M. *Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina*. 2007. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2007.

MAINARDES, R. M., GREMIÃO, M. P. D., BRUNETTI, I. L., DA FONSECA, L. M., KHALIL, N. M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *J. Pharm. Sci.*, v. 98, p. 257-267, 2009.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C.; Praziquantel-loaded PLGA nanoparticles: preparation and characterization. *Journal of Microencapsulation*, v. 22, p. 13-24, 2005.

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 395, p.266–271, 2010.

MARTINS, N. M. B. *Alterações histológicas causadas por nanotubos de carbono de paredes múltiplas em camundongos*. Dissertação (Mestrado em Nanociências) Centro Universitário Franciscano, 2011.

MENEZES, T.; ALVES, A.; VIEIRA, J.; MENEZES, S.; ALBES, B.; MENDONCA. L. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.3, p. 184-191, 2009.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*, v. 57, p. 875-910, 2012.

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

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

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 385, p. 113-142, 2010.

MORAES, C. M.; MATOS, A. P.; PAULA, E.; ROSAB, A. H.; FRACETO, L. F. Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. *Materials Science and Engineering B*, v. 165, p. 243–246, 2009.

NAHAR, M.; MISHRA, D.; DUBEY, V.; JAIN, N. K. Development, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 4, p. 252-261, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standards- 2 ed. NCCLS document M27-A2. Pennsylvania: NCCLS – 2002.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, v.5, p.715-731, 2006.

OLIVEIRA, T. R. *Caracterização estrutural de agregados formados pelo antibiótico anfotericina B e lipídios catiônicos: uma possível formulação farmacológica*. 2008. Dissertação (Mestrado em Física Geral) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OLSON, J. A.; ADLER-MOORE, J. P.; JENSEN, G. M.; SCHWARTZ, J.; DIGNANI, M. C.; PROFFITT, R. T. Comparison of the Physicochemical, Antifungal, and Toxic Properties of Two Liposomal Amphotericin B Products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 259–268, 2008.

OWENS III, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonizations, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 307, p. 93-102, 2006.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomed-Nanotechnol.*, v. 8, p. 147-166, 2012.

PEEK, L. J.; MIDDAUGH, C. R.; BERKLAND, C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.60, p. 915–928, 2008.

PEREZ, G. S. *Monitoramento de antifúngicos em plasma e líquor e pacientes portadores de meningite criptocócica e AIDS através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – UV/Vis.* Tese (Mestrado em Fármacos e Medicamentos – Área de Produção e Controle Farmacêuticos) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2007.

PESTANA, K. C. *Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral: Estudo estrutural, liberação in vitro e farmacocinética pré-clínica.* 109 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C., TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DOERN, G. V.; DIEKEMA, D. J. Global Trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 – 2004). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 2163-2167, 2005.

RANG, H. P., DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. *Farmacologia.* Ed. Elsevier, 5 Edição, p. 693-694, 2007.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.*, v. 36, p. 887-913, 2011.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; VEIGA, A. J. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 2, p. 8-21, 2006.

REN, T.; XU, N.; CAO, C.; YUAN, W.; YU, X.; CHEN, J.; REN, J. Preparation and Therapeutic Efficacy of Polysorbate-80-Coated Amphotericin B/PLA-b-PEG Nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science*, v. 20, p.1369–1380, 2009.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, C. D. Obtenção e avaliação da eficácia e toxicidade *in vitro* de nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo anfotericina B. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, Guarapuava, 2012.

SHAO, K.; WU, J.; CHEN, Z.; HUANG, S.; LI, J.; YE, L.; LOU, J.; ZHU, L.; JIANG, C. A brain-vectored angiopep-2 based polymeric micelles for the treatment of intracranial fungal infection. *Biomaterials*, v. 33, p. 6898-6907, 2012.

SILVA, M. H. M.; PACHECO, M. R.; GIRARDI, A. M.; BARALDI-ARTONI, S. M.; BARREIRO, F. R. Avaliação morfológica dos hepatócitos de ratos diabéticos tratados com neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) e estreptozotocina 6 CH. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 15, p. 111-119, 2011.

SOWEMIMO-COKER, S. O. Red Blood Cell Hemolysis During Processing. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 16, 46-60, 2002.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 3. p. 20-31, 2007.

SENNA, M.; NAKAYAMA, S. Preparation and properties of nano-amorphous organic and inorganic particles via chemical and mechanochemical routes, *J. Alloys Compd.* v. 483, p. 265–270, 2009.

SILVA JUNIOR, A. A. *Micropartículas de ácido poli lático-co-glicólico obtidas por “spray drying” para liberação prolongada intra-ocular de fármacos.* (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SONG, Z.; FENG, R.; SUN, M.; GUO, C.; GAO, Y.; LI, L.; ZHAI, G. Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 354, p. 116-123, 2011.

SUNDAR, S.; AGRAWAL, G.; RAI, M.; MAKHARIA, M. K.; MURRAY, H.W.; Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomized trial. *Biomedical M Journal*, v.323, p.419–22, 2001.

SZOKA, F.C.; TANG, M. Amphotericin B formulated in liposomes and lipid based systems: a review. *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 363-375, 1993.

TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 392, p. 142-149, 2007.

TORRADO, J.J., ESPADA, R., BALLESTEROS, M.P., TORRADO-SANTIAGO, S. Amphotericin B formulation and drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 97, p. 2405–2425, 2008.

TORRADO, J.J.; BALLESTEROS, M.P.; RIVAS, G.; ALFONSO, C.; VALDESPINA, S.; ESPADA, R. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 361, p. 64–69, 2008.

TUON, F. F.; KOENIG, F.; JACOMETTO, D.; ROCHA, J. L. Are there risk factors for acute renal failure in adult patients using deoxycholate amphotericin B? *Rev. Iberoam. Micol.* v. 30, p.21–24, 2013.

ULBRICHT, M. Advanced functional polymer membranes. *Polymer*, v. 47, p. 2217–2262, 2006.

UHRICH, E. K., CANIZZARO, M. S., LANGER, S. R., SHAKESHEFF, M. K.; Polymeric system for controlled drug release. *Am. Chem. Soc.*, v. 99, p. 3181-3198, 1999.

UNITED STATES PHARMACOPEIA-NATIONAL FORMULARY: USP35 NF30. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

VAN DE VEN, H.; PAULUSSEN, C.; FEIJENS, P. B.; MATHEEUSSEN, A.; ROMBAUT, P.; KAYAERT, P.; et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *Journal of Controlled Release*, v.161, p. 795-803, 2012.

VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J.L.; STILLER, E.T. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a Streptomycete. II The isolation and properties of the crystalline amphotericins. *Antibiot. Annu.*, v. 1955-1956, p. 587-591, 1956.

VANDERHOFF, J. W.; EL ASSER, M. S.; UGELSTAD, J. Polymer emulsification process. US Patent 4, 177, 1979.

VANDERMEULEN, G.; ROUXHET, L.; ARIEN, A.; BREWSTER, M. B.; PRÉAT, V. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethyleneglycol)-block-poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.309, p.234–240, 2006.

VASSILIOU, A. A.; PAPADIMITRIOU S. A.; BIKIARIS, D. N.; MATTHEOLABAKIS, G.; AVGOUSTAKIS, K. Facile synthesis of polyester-PEG triblock copolymers and preparation of amphiphilic nanoparticles as drug carriers. *Journal of Controlled Release*, v.148, p.388–395, 2010.

VITORINO, C.; CARVALHO, F. A.; ALMEIDA, A. J.; SOUSA, J.; PAIS, A. A. C. C. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 84, p.117–130, 2011.

VYAS, S.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, p. 417-432, 2006.

WASAN, E. K.; BARLETT, K.; GERSHKOVICH, P.; SIVAK, O.; BANNO, B.; WONG, Z.; GAGNON, J.; GATES, B.; LEON, C. G.; WASAN, K. M. Development and characterization of oral lipid-based Amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. *Int. J. Pharm.*, v. 372, p. 76-84, 2009.