



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRONIO PORTELA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento tecnológico de emulgel de anfotericina B: estudo de formulação e
tratamento da leishmaniose cutânea em modelo experimental**

ILUSKA MARTINS PINHEIRO

Teresina - Piauí

2014

ILUSKA MARTINS PINHEIRO

Desenvolvimento tecnológico de emulgel de anfotericina B: estudo de formulação e tratamento da leishmaniose cutânea em modelo experimental

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho.

Co-orientador:

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho.

Teresina - Piauí

2014

ILUSKA MARTINS PINHEIRO

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EMULGEL DE ANFOTERICINA
B: ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO E TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA EM MODELO EXPERIMENTAL

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal do
Piauí, como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 05 / 12 / 2014

BANCA EXAMINADORA



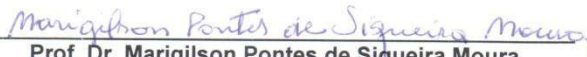
Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho.
Curso de Farmácia- Universidade Federal do Piauí (Orientador)



Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho
Universidade Federal do Piauí
(Examinador Externo)



Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim
Universidade Federal do Piauí
(Examinador Interno)



Prof. Dr. Marigilson Pontes de Siqueira Moura
Universidade Federal do Vale do São Francisco
(Examinador Externo)

Teresina – Piauí
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRO-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Dedico aos meus queridos pais Abraão (in memoriam) e Maria Félix, por seu esforço em caminhar em busca dos meus sonhos. Um dia, seguraram na minha mão e conduziram-me no caminho da escola. Foi assim que tudo começou.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado. Por tudo de bom que faz na minha vida.

À minha mãe Maria Félix, pela dedicação, amor e conforto.

Aos meus irmãos, Izanio e Abraão Terceiro, pelo incentivo, pelos sorrisos, brincadeiras e palavras de conforto nos momentos difíceis.

Ao meu marido Helano, pela paciência, compreensão, incentivo e amor. Por alegrar e compartilhar todos os dias da minha vida. Por acreditar e me fazer acreditar no meu potencial.

À minha filhinha Isabela, que veio completar minha vida.

Ao meu orientador prof. André Luis e meu co-orientador prof. Fernando Aécio, pela imensa paciência, empenho, dedicação, amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por contribuir de forma direta para meu crescimento profissional.

Aos amigos da Farmácia-Escola (Gláucia Laís Nunes, Ivana Carvalho, Lucas Lopes, Lucas Soliano, Vitor e José Terceiro) e aos amigos do NPPM (Camila Ernanda e Lucas Brito) pela presteza em ajudar.

Ao prof. Sidney, Bruna, Lucinaldo, Lailres, pela colaboração com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE / HPLC).

Aos meus colegas mestrandos Alysson Kenned de Freitas Mesquita, Ana Cristina Sousa Gramoza Vilarinho, Angélica Gomes Coelho, Antonio Jefferson Pereira Sousa, Cristina Alves de Sousa Lages, Francisco Rodrigo de Asevedo Mendes de Oliveira, George Laylson da Silva Oliveira, Hellen Kelen Maria Medeiros Coimbra Viana, Jurandy do Nascimento Silva, Kátia da Conceição Machado, Katrícia Maria Feitosa Cardoso, Marcela Rosado Drumond Taimo, Oskar Almeida Silva e Sean Telles Pereira por tudo que passamos juntos.

À minha amiga Ana Karina Marques Fortes Lustosa, mesmo distante, sempre presente, nos momentos em que precisei.

E ainda, à Farmácia-Escola da UFPI, ao LAPETRO e ao NPPM pelo apoio na realização desse projeto.

*"Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
Mas continue em frente de qualquer jeito".*

Martin Luther King

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Leishmanioses: Aspectos gerais.....	21
3.2 Anfotericina B.....	25
3.3 Formas Farmacêuticas Tópicas.....	26
3.4 Componentes do emulgel.....	31
4. CAPÍTULO I: Formulações contendo anfotericina B para uso tópico e transdérmico: uma prospecção tecnológica.....	35
Resumo.....	36
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Metodologia.....	38
Resultados e discussão.....	39
Conclusão.....	47
Referências.....	47
5. CAPÍTULO II: Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de anfotericina B em emulgel e cinética de liberação <i>in vitro</i>.....	49
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Metodologia.....	53
Resultados e discussão.....	56

Conclusão.....	62
Referências.....	62
6. CAPÍTULO III: Desenvolvimento tecnológico de emulgel de anfotericina B com promotor químico de liberação cutânea.....	65
Resumo.....	66
Abstract.....	66
Introdução.....	67
Metodologia.....	68
Resultados e discussão.....	70
Conclusão.....	78
Referências.....	79
7. CAPÍTULO IV: Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> de emulgel de anfotericina B: uma alternativa para o tratamento da leishmaniose cutânea.....	82
Resumo.....	83
Abstract.....	84
Introdução.....	84
Metodologia.....	85
Resultados e discussão.....	88
Conclusão.....	95
Referências.....	95
8. CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
ANEXOS.....	108
APÊNDICE.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/O	Água-em-óleo
AmB	Anfotericina B
AmB-D	Anfotericina B desoxicolato de sódio
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
CV%	Desvio padrão relativo
Σ	Média
DP	Desvio padrão
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
EPO	<i>European Patent Office</i>
GTP	Guanosina trifosfato
IFN- γ	Intérferon gama
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
LC	Leishmaniose cutânea
LIPS	Organogel de Lecitina
LM	Leishmaniose Mucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
μm	Micrômetro
nm	Nanômetro

NPPM	Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais
NK	Células matadoras naturais
O/A	Óleo-em-água
OA	Ácido oléico
OMS	Organização Mundial de Saúde
r^2	Coefficiente de correlação linear
Sb ⁺⁵	Antimoniais pentavalentes
SB	Estrato basal mais interior
SC	Estrato córneo superficial
SG	Estrato granuloso
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SS	Estrato espinhoso
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
UV/Vis	Ultra-violeta/visível
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Ciclo da Leishmaniose.	23
Figura 2	Estrutura química da anfotericina B.	26
Figura 3	A pele com suas 3 camadas: Epiderme, derme e hipoderme.	27
Figura 4	Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular).	28
Figura 5	Estrutura química do polaxamer.	32
Figura 6	Estrutura química da lecitina.	33
Figura 7	Estrutura química do palmitato de isopropila	33
Figura 8	Estrutura química do miristato de isopropila	34
Figura 9	Estrutura química do ácido oléico	34

CAPÍTULO I

Figura 1	Figura do Número de patentes depositadas por escritórios.	39
Figura 2	Figura da Evolução anual do número de patentes depositadas.	40
Figura 3	Figura da Evolução anual de publicações na <i>Web of Science</i> com o termo Anfotericina tópica.	41

CAPÍTULO II

Figura 1	Esquema de preparo do emulgel.	54
Figura 2	Varreduras realizadas para avaliação da especificidade do método	57
Figura 3	Curva de calibração da AmB por espectrofotometria na região do visível	58
Figura 4	Perfil de cinética de liberação de AmB com e sem promotor de liberação cutânea (ácido oléico).	62

CAPÍTULO III

Figura 1	Esquema do preparo do emulgel.	69
Figura 2	Gráfico da determinação do pH das formulações antes e depois do ciclo gelo-degelo.	72
Figura 3	Gráfico da determinação da viscosidade das formulações antes do ciclo gelo-degelo.	73
Figura 4	Gráfico da determinação da viscosidade das formulações depois do ciclo gelo-degelo.	73
Figura 5	Gráfico da determinação da espalhabilidade das formulações antes do ciclo gelo-degelo.	74
Figura 6	Gráfico da determinação da espalhabilidade das formulações depois do ciclo gelo-degelo.	74
Figura 7	Gráfico da determinação da condutividade das formulações antes e depois do ciclo gelo-degelo.	75
Figura 8	Gráfico da determinação do teor das formulações antes e depois do ciclo gelo-degelo.	75
Figura 9	Distribuição do tamanho de gotículas (μm) pelo número de gotículas observada para a formulação de Emulgel de AmB na presença ou ausência de promotor químico de liberação.	76

CAPÍTULO IV

Figura 1	Efeito do emulgel de PLO (placebo) sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, infectados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> .	89
Figura 2	Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, infectados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> , utilizando-se emulgel de anfotericina B sem promotor de permeação cutânea.	90
Figura 3	Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, infectados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> , utilizando-se emulgel de anfotericina B com ácido oléico como promotor de permeação cutânea.	90
Figura 4	Quantificação de parasitos recuperados de camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i> .	91
Figura 5	<i>Imprint</i> de células do baço de camundongo BALB/c pertencentes aos diversos grupos após recidiva em infecção por <i>Leishmania major</i> .	92
Figura 6	Análise histopatológica das lesões de pele de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania major</i> sem tratamento (Controle) e tratados com emulgel de AmB (Grupo A), emulgel de AmB e promotor ácido oléico a 5% (Grupo B).	95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Patentes da Tecnologia Formas Farmacêuticas Tópicas com anfotericina B, pesquisa no campo de resumo, nas bases INPI, EPO, USPTO e WIPO.	39
Tabela 2	Levantamento de patentes com formulação farmacêutica contendo anfotericina B para uso tópico e seus processos de inovação tecnológica.	43

CAPÍTULO II

Tabela 1	Precisão da AmB por espectrofotometria no visível.	59
Tabela 2	Exatidão expressa em percentagem de AmB por espectrofotometria no visível.	59
Tabela 3	Robustez com variação de marca de metanol (Vetec e Dinâmica) por espectrofotometria no visível.	60
Tabela 4	Robustez com mudança da forma de agitação (manual e magnética) por espectrofotometria no visível.	60

CAPÍTULO III

Tabela 1	Planejamento quantitativo e qualitativo das formulações de emulgel de AmB na presença ou ausência de promotor químico de permeação cutânea.	69
Tabela 2	Fluxos de liberação para diferentes promotores químicos	78

Desenvolvimento tecnológico de emulgel de anfotericina B: estudo de pré-formulação e tratamento da leishmaniose cutânea em modelo experimental. ILUSKA MARTINS PINHEIRO. Orientador: Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. UFPI: 2014.

RESUMO

A leishmaniose cutânea é uma doença parasitária negligenciada, cujo tratamento é de difícil acesso. Dentre os fármacos que tem utilidade clínica no tratamento da leishmaniose destaca-se a anfotericina B (AmB), que tem sua utilização por via oral e parenteral limitada pela sua toxicidade. Assim, o desenvolvimento de formulação tópica como alternativa terapêutica é essencial para permitir maior adesão e efetividade ao tratamento. O presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento de emulgel de AmB com a finalidade de aumentar a permeação do fármaco e minimizar problemas relacionados à toxicidade. Nesse estudo, preparou-se organogel com AmB e diferentes promotores químicos de permeação cutânea. Realizou-se ensaios de estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo a temperatura de $5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e validou-se metodologia analítica por espectrofotometria no UV/Vis para quantificação do princípio ativo na formulação, segundo RE n° 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disso, realizou-se cinética de liberação *in vitro* utilizando membrana artificial de celulose 5 μm com células de difusão tipo Franz. Por fim, investigou-se estudo *in vivo* utilizando camundongos BALB/c e acompanhou-se a evolução das lesões através dos seguintes parâmetros: tamanho das lesões, recuperação de parasitos em fragmentos de pele e realização de histopatológico. A formulação de emulgel de AmB com ácido oléico 5% resistiu à estabilidade preliminar e no ensaio de cinética de liberação apresentou desempenho superior à formulação controle. *In vivo*, essa formulação apresentou regressão significativa no tamanho das lesões, menor recuperação de parasitos em fragmentos de pele e maior tempo de recidiva da patologia após término do tratamento. Com isso, o bom desempenho do emulgel obtido viabiliza a formulação para novas investigações como promessa de tratamento alternativo eficaz para leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Anfotericina B, emulgel, liberação cutânea, *Leishmania major*.

Technological development emulgel amphotericin B: a study of pre-formulation and treatment of cutaneous leishmaniasis in an experimental model. Iluska Martins Pinheiro.

Advisor: Dr. André Luis Menezes Carvalho. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences UFPI: 2014.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is a neglected parasitic disease whose treatment is difficult to access. Among the drugs that have clinical utility in the treatment of leishmaniasis stands out amphotericin B (AmB), which has limited their use by oral and parenteral route by its toxicity. Thus, the development of topical formulation as a therapeutic alternative is essential to allow greater compliance and treatment efficacy. This study aims to develop emulgel of AmB in order to increase the permeation of the drug and minimize problems related to toxicity. In this study, organogel was prepared with AmB and different chemical permeation promoters. We conducted preliminary tests of stability (freeze-thaw cycle the temperature of 5 ± 0.5 ° C and 45 ± 0.5 ° C) and is validated analytical methodology by spectrophotometry UV / Vis quantification of the active ingredient in the formulation according RE n ° 899/2003 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA). In addition, we performed in vitro release kinetics using artificial cellulose membrane with 5µm Franz type diffusion cells. Finally, we investigated the in vivo study using BALB / c mice followed the evolution of lesions using the following parameters: size of the lesions, recovery of parasites in skin fragments and conducting histopathology. The emulgel formulation of AmB with 5% oleic acid resisted preliminary stability and release kinetics assay showed performance higher than the control formulation. In vivo, this formulation showed significant regression in lesion size, lower recovery of parasites in skin fragments and longer relapse of disease after completion of treatment. Thus, the good performance of the emulgel obtained enables the formulation for further investigation as a promise of effective alternative treatment for cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Amphotericin B, emulgel, leishmania.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea é uma doença parasitária negligenciada e endêmica em mais de 70 países, inclusive no Brasil, transmitida pela picada de mosquitos fêmeas flebotômíneos (CHATTOPADHYAY, 2011). Trata-se de um problema de saúde pública mundial e acomete principalmente pessoas de classe econômica mais desfavorecida ou que vivam próximo de áreas atingidas pelo desmatamento e urbanização, que antes serviam de habitat natural para o mosquito (BRASIL, 2010).

Esta doença apresenta lesões de pele deformando e desfigurando os pacientes acometidos. Esse fato, afasta o paciente do convívio social, marginalizando-o. Até o momento, o tratamento é realizado por derivados antimoniais pentavalentes ou por formulações parenterais contendo anfotericina B como princípio ativo (BRASIL, 2010).

São tratamentos de difícil acesso, já que necessitam internação, e não são indicados para muitos pacientes, como gestantes, devido seus inúmeros efeitos colaterais. Além disso, a utilização dessas substâncias é limitada pela sua toxicidade, pela elevada resistência e pelo custo elevado. Diante disso, a síntese de uma formulação tópica como alternativa terapêutica torna-se mais viável visto que facilita o acesso do paciente ao tratamento, dada a praticidade do uso e reduz os custos com internação (CARVALHO, 2013).

Diante disso, novos tratamentos que promovam muitas vantagens em relação às formulações tradicionais como, por exemplo, a liberação sustentada de ativos, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar a estabilidade física e química de moléculas lábeis e minimizar os efeitos colaterais (muito presentes nas alternativas terapêuticas usuais, como antimônio pentavalente, pentamidina ou anfotericina B) são essenciais para permitir maior adesão e efetividade ao tratamento (TIUMAN, 2011).

Quanto à anfotericina B, de acordo com a literatura, a molécula é muito complexa. Consiste de um anel macrolídeo, fechado por lactonização, formado por uma rígida cadeia lipofílica e, no lado oposto, por uma cadeia hidroxilada, o que lhe confere uma característica anfifílica. Sua solubilidade é dependente do pH e devido a complexidade da molécula ela apresenta uma variação interna de pKa (DAMASCENO, 2010).

Constata-se a relevância desse assunto mediante a quantidade de artigos publicados na base de dados *Web of Science* e na busca de patentes em escritórios como EPO, INPI, USPTO e WIPO, principalmente utilizando-se descritores referentes à anfotericina B.

Observa-se que os Estados Unidos destaca-se como o país com a maior quantidade de registros de patentes encontradas. Isso confirma que os países desenvolvidos vem investindo no desenvolvimento tecnológico de formulações que facilitem a adesão terapêutica e reduzam problemas com reações adversas.

De fato, o desenvolvimento de novas tecnologias farmacêuticas como novos sistemas transportadores ou de liberação de fármacos têm conduzido os estudos com a finalidade de atingir tratamentos alternativos para essa patologia (ASSCHE, 2011; SINGH, 2012).

No futuro, com o aumento do incentivo às universidades brasileiras através de financiamentos de projetos de pesquisas por parte do governo federal ou mesmo da parceria com empresas nacionais, novas tecnologias estarão disponíveis.

O objetivo desse estudo é desenvolver emulgel para veiculação de AmB com promotor químico de liberação para uso tópico como alternativa terapêutica no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

Essa dissertação está dividida da seguinte maneira: Capítulo I "Formulações contendo anfotericina B para uso tópico e transdérmico: uma prospecção tecnológica", com panorama sobre a relevância do assunto na comunidade científica; Capítulo II "Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de anfotericina B em emulgel e cinética de liberação *in vitro*", que viabilizará o desenvolvimento tecnológico de emulgel de AmB como tratamento alternativo da leishmaniose cutânea; Capítulo III "Desenvolvimento tecnológico de emulgel de anfotericina B com promotor químico de liberação cutânea", que prepara uma formulação tópica com ensaios de controle de qualidade e *performance* e Capítulo IV "Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* de emulgel de anfotericina B: uma alternativa para o tratamento da leishmaniose cutânea", que demonstra atividade terapêutica da formulação tópica em animais, indicando ser promissora no tratamento alternativo da leishmaniose cutânea.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver emulgel para a veiculação da AmB por via cutânea, com a finalidade de favorecer a absorção e minimizar problemas relacionados à toxicidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter as formulações de AmB utilizando diferentes promotores químicos de liberação (ácido oléico, cineol e geraniol);
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação da AmB por espectrofotometria no UV/Vis;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e avaliar a estabilidade preliminar das formulações de AmB;
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* de preparações de AmB em membrana artificial, utilizando célula de Franz;
- Avaliar atividade terapêutica *in vivo* através do tratamento da lesão ulcerativa em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major*.
- Realizar análises histopatológicas dos tecidos dos animais submetidos ao tratamento com emulgel.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmanioses: Aspectos gerais

O termo “doenças tropicais negligenciadas (DTNs)” refere-se a um grande e complexo grupo de doenças infecciosas parasitárias e bacterianas. Ele representa um dos mais graves problemas de saúde pública, que aflige mais de 1 bilhão de pessoas – cerca de um sexto da população mundial – a maioria das quais vivem nos países mais pobres e nas áreas mais marginalizadas. Um exemplo dessas DTNs são as leishmanioses, que apresentam apenas 0,6% do total de recursos internacionais destinados à assistência à saúde a fim de gerir e desenvolver novas terapias para tratar essa importante doença (CORDEIRO, 2012).

As leishmanioses são doenças infecciosas zoonóticas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Existem cerca de trinta espécies conhecidas de *Leishmania*, das quais dez estão presentes na Europa, Ásia e África e as outras vinte no continente americano. A maioria delas é capaz de infectar diferentes tipos de hospedeiros vertebrados, como roedores, marsupiais, edentados, felinos, canídeos e humanos. Dentre todas estas espécies, especula-se que aproximadamente vinte e uma infectam o homem podendo ocasionar doenças (PIRES *et al.*, 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a LTA está distribuída em 88 países e apresenta incidência global anual da forma cutânea estimada em 1 a 1,5 milhões de casos. É uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades e também pelo envolvimento psicológico, com reflexo no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2010).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um problema de saúde pública importante, haja vista que afeta milhões de pessoas que vivem em zonas endêmicas (ALBUQUERQUE, 2010). É uma enfermidade polimórfica da pele e das mucosas, caracterizada pela presença de lesões ulcerosas indolores, únicas ou múltiplas (forma cutânea simples), lesões nodulares (forma difusa) ou lesões cutaneomucosas (NEVES, 1997).

No Brasil, segundo dados do Sinan, foram notificados em 2009, 23.399 casos confirmados de LTA, sendo 94,1% casos novos e 4,6% recidivas. Com relação às manifestações clínicas, 93,7% dos casos apresentaram forma clínica cutânea e 6,2%, manifestação clínica mucosa. Do total de pacientes, em 2009, apenas 73,5% (17.203) evoluíram para cura, 16 pacientes

foram a óbito devido a LTA, e 122 foram a óbito por outras causas, destacando que 21,2% não possuía informação sobre a evolução do caso (PELISSARI, 2011).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil, o ano de 2012 apresentou taxa de incidência de Leishmaniose Tegumentar Americana de 11,86 (casos por 100.000 habitantes), sendo que o estado do Amazonas apresentou a maior taxa de incidência (144,31), seguido pelo Amapá e Mato Grosso. Dentre as 27 unidades da federação brasileira, o estado do Piauí encontra-se em 17º lugar, com 3,13, quanto a taxa de incidência (BRASIL, 2012).

Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes a Ordem *Diptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. O gênero *Lutzomyia* é considerado o de maior importância por conter espécies transmissoras de patógenos aos humanos, com ampla distribuição no Brasil desde regiões do sul até o norte do país (BRASIL, 2010).

A epidemiologia da leishmaniose é extremamente complexa e pode ser alterada pela ocorrência de mudanças em qualquer posição no ciclo: vetor-reservatório-homem. O desmatamento e a urbanização são exemplos de alterações que são seguidas por mudanças principalmente, em reservatórios e na população de insetos vetores. No Brasil, já foram identificadas seis espécies do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As principais são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) shawi* encontradas em estados das regiões Norte e Nordeste (Silveira *et al.* 2002; Brasil 2007). Até o momento, no Estado do Amazonas, a infecção ocorre no homem pelas espécies *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* (REIS, 2013).

A infecção humana é iniciada pela inoculação do parasito, em sua forma promastigota, no sangue humano pela fêmea infectada do flebótomo. Posteriormente, a forma promastigota do parasito é fagocitada para o interior dos macrófagos, dentro se transforma na forma amastigota não-flagelado e se multiplica por divisão binária até o rompimento desses macrófagos. Com esse rompimento, as formas amastigotas se espalham pelo sangue podendo infectar novos macrófagos ou contaminar um novo flebótomo fêmea, quando este fizer a sucção do sangue do vertebrado contaminado. No aparelho digestivo do flebótomo, a forma amastigota transforma-se em seu interior na forma promastigota, reiniciando o ciclo. A doença inicia-se por mecanismos específicos imunes não devidamente estabelecidos. Cães,

raposas e roedores também podem servir como reservatórios (CUNHA, 2011; GUERRIERI, 2013).

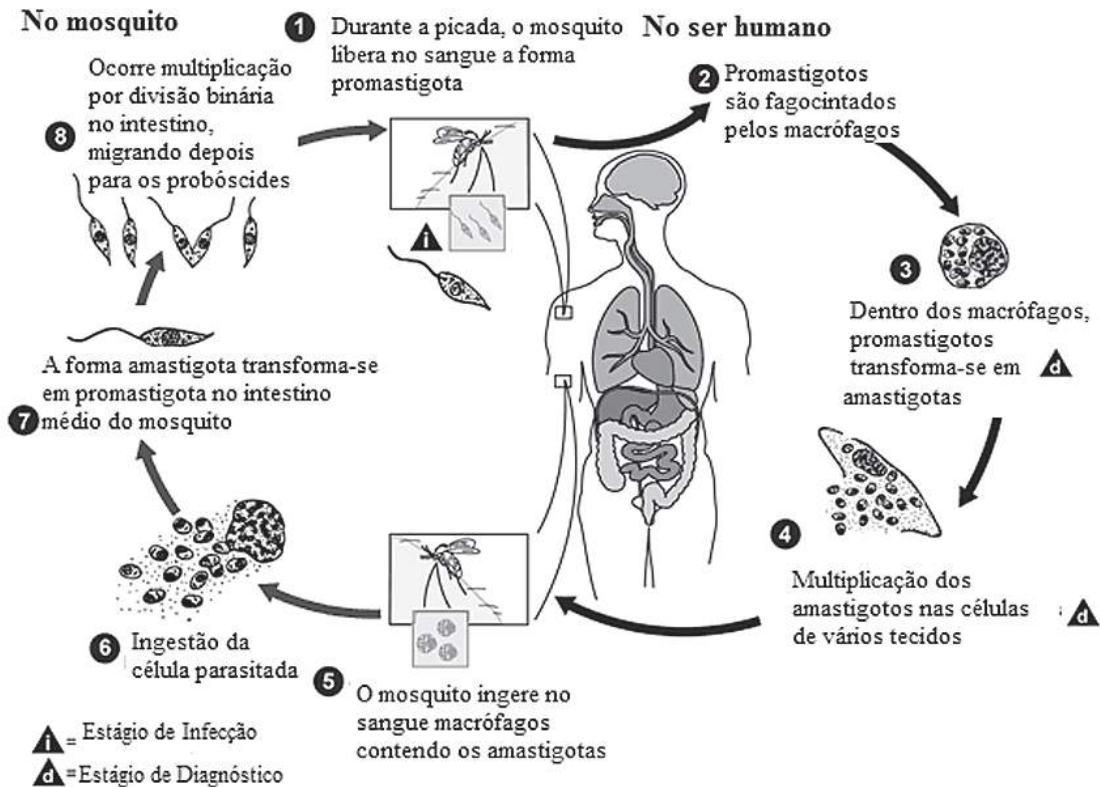


Figura 1. Ciclo da Leishmaniose.

Fonte: CUNHA, 2011¹.

O espectro clínico da LT em humanos inclui a leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose cutânea difusa. As manifestações clínicas da doença são determinadas pelas características do hospedeiro, da espécie de leishmania envolvida e da resposta imune do indivíduo infectado (ALMEIDA, 2011).

O principal mecanismo de defesa contra a leishmaniose é a resposta imune associada às células T. Na Leishmaniose Tegumentar, a resposta imune é complexa e não há relação entre a resposta Th1 e a proteção contra a doença, visto que os pacientes com LC e LM causadas pela *L. braziliensis* apresentam uma intensa resposta celular e ainda assim desenvolvem a doença.

¹ No lugar do termo fagocitandos, leia-se fagocitados.

Uma possibilidade para explicar este fato é que uma exacerbada produção de IFN- γ e TNF- α pode ser danosa para o tecido e as mesmas citocinas envolvidas na morte do parasito podem estar associadas a patogênese das LC e LM (ALMEIDA, 2011).

Desde a década de 1940, o tratamento das leishmanioses consiste na administração de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) e, no caso de resistência, o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal podem ser usadas. Existem dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (BRASIL, 2010; SIFAQUI, 2014).

A miltefosina, um hexadecilfosfocolina, foi inicialmente estudada como um agente anti-tumoral, mas recentemente foi descrita por exibir atividade *in vitro* e *in vivo* contra o parasita da leishmaniose, sendo utilizada na Índia e Etiópia, na leishmaniose visceral e na Colômbia, Bolívia e Guatemala, na leishmaniose cutânea. Apesar de menos graves, apresenta efeitos colaterais como distúrbios gastrintestinais e teratogenicidade, portanto, não é recomendada para mulheres em idade fértil (GODINHO, 2012).

Os antimoniais pentavalentes são drogas consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *leishmania*. Tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP. A exposição das formas amastigotas por quatro horas, nas doses de 150 a 500mg de Sb^{+5} /mL, resultou em um decréscimo de certos substratos, dose dependente de CO_2 . Se expostos a 500 mg de Sb^{+5} /mL, observou-se a queda no nível de produção de CO_2 a partir da glicólise, facilitando a destruição do parasito (BRASIL, 2010).

O Desoxicolato de Anfotericina B é o fármaco de primeira escolha em gestantes e em pacientes com leishmaniose mucosa infectados pelo HIV; e segunda escolha em pacientes que não apresentaram resposta satisfatória ao antimonial pentavalente. A dose inicial deve ser 1 mg/kg/dia por via endovenosa diariamente ou em dias alternados, sem ultrapassar a dose total de 50 mg em cada aplicação. Deve ser administrada até atingir as seguintes doses totais: Forma cutânea: 1 a 1,5 g; Forma mucosa: 2,5 a 3 g. O medicamento deve ser administrado no período entre duas e seis horas (BRASIL, 2009).

Seus efeitos adversos incluem: Febre, cefaléia, náuseas, vômitos, anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento da função renal e distúrbios do comportamento (BRASIL, 2009).

No Brasil, a Anfotericina B lipossomal está registrada na Anvisa para o tratamento da leishmaniose visceral. Não existe registro para uso na leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo considerado fármaco *off label* para esta. Os efeitos adversos desse fármaco são:

febre, cefaléia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios, flebite no local da infusão, dor lombar. Alguns cuidados devem ser tomados, tais como: monitorar função renal, potássio e magnésio sérico; repor o potássio quando indicado (BRASIL, 2009).

Os fármacos que se tem utilidade clínica no tratamento da leishmaniose ainda não são altamente eficazes e nenhuma vacina eficiente está disponível, infelizmente a leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando, principalmente os países mais pobres e os países em desenvolvimento, sendo assim os programas de controle ainda são precários e a mortalidade e a morbidade por leishmaniose em todo mundo são comuns, mas a eficácia do tratamento esta intimamente ligada a vários fatores como a respostas imune e clínica do hospedeiro, a suscetibilidade ao agente da leishmaniose e os tratamentos são avaliados na base da eficácia, tolerância e viabilidade da administração, além de custos do tratamento (ZAULI, 2010). Assim, constata-se na literatura que diversos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de desenvolver formulações alternativas, demonstrando a relevância do desenvolvimento de novos sistemas transportadores de AmB.

3.2 Anfotericina B

Conforme Damasceno (2010) identificou na literatura “a anfotericina B é um pó amarelo, alaranjado, sensível à luz e ao calor, inativa em baixos valores de pH, praticamente insolúvel em água, solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida e em propilenoglicol, muito levemente solúvel em metanol e praticamente solúvel em etanol. Além disso, sua solubilidade é dependente do pH e devido a complexidade da molécula ela apresenta uma variação interna de pKa (5,7 para –COOH e 10 para NH₂)”.

A molécula de AmB consiste de um anel macrolídeo, fechado por lactonização, formado por uma rígida cadeia lipofílica, contendo sete duplas ligações (heptaeno) e no lado oposto por uma cadeia hidroxilada com sete grupos hidroxilas livres o que lhe confere uma característica anfifílica. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina com um grupo amino livre formado por uma ligação α -glicosídica (DAMASCENO, 2010).

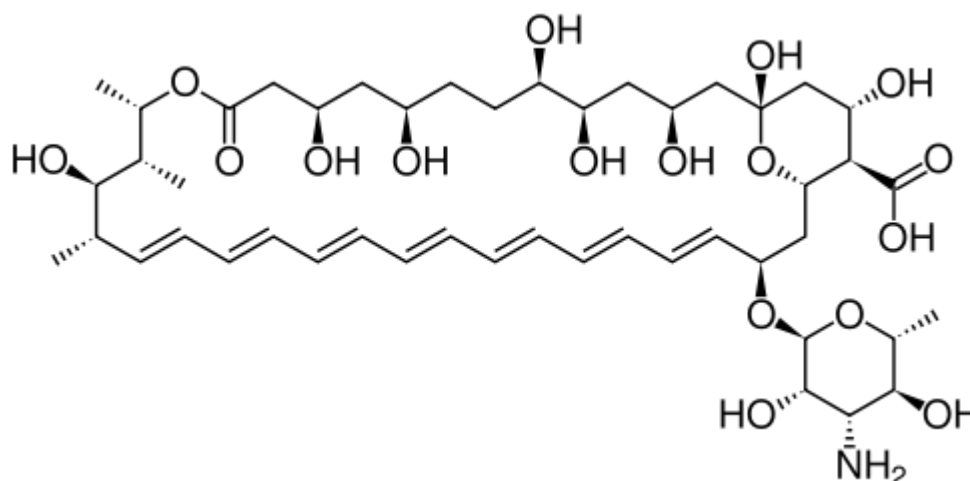


Figura 2. Estrutura química da anfotericina B.

Fonte: ALVES; LIBERAL; OLIVEIRA (2009) disponível em www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0809/anfotericina/index.html

A AmB é um antibiótico com utilidade limitada pela nefrotoxicidade grave, o que pode levar à insuficiência renal. No que diz respeito às atividades antimicótica e antiparasitárias da AmB (como por ex., contra a *Leishmania spp.*) levaram à investigação intensiva nos últimos anos, para encontrar novas formulações com nefrotoxicidade reduzida, tais como lipossomas, emulsões e nanopartículas, com o objetivo de reduzir a quantidade de AmB livre no sangue, em concentrações abaixo do nível tóxico e entregar o fármaco de maneira eficiente no local de ação. Isso levou ao lançamento de produtos inovadores, como o complexo lipídico-AmB (Abelcet[®]), o produto lipossomal (AmBisome[®]), suspensões coloidais (Amphocil[®], Amphil[®] e Amphotec[®]) e a solução de detergente (Fungizone[®]) (LEMKE,2010).

Outros estudos experimentais ainda encontram-se em andamento, como por exemplo, a interação de medicamentos leishmanicidas (anfotericina B e miltefosina) em monocamadas de lipídios (PHAM, 2013).

3.3 Formas Farmacêuticas Tópicas

A pele representa um dos órgãos mais extensos do corpo. Constitui uma via potencial de aplicação de medicamentos devido seu fácil acesso e sua grande superfície. As limitações desta via de administração estão principalmente associadas com a função de barreira da pele que impõem grandes limites à absorção de fármacos (LIRA, 2003).

As duas funções principais da pele são atuar como uma barreira física eficaz contra as influências ambientais indesejadas, bem como prevenir a excessiva perda de água do corpo. A pele é composta de epiderme, derme e tecido adiposo subcutâneo (Figura 3) (SMEDEN, 2014).

A epiderme é a camada mais externa da pele e consiste de quatro camadas distintas. Cada camada exibe uma das etapas sequenciais de diferenciação dos queratinócitos, o tipo de célula principal na epiderme. As camadas incluem o estrato córneo superficial (SC), estrato granuloso (SG), estrato espinhoso (SS), e o estrato basal mais interior (SB); sendo as três últimas consideradas a parte da epiderme viável (espessura: 50-100 μm), enquanto que o SC (espessura: 10-20 μm) é a parte da epiderme não viável e o produto final de diferenciação (SMEDEN, 2014).

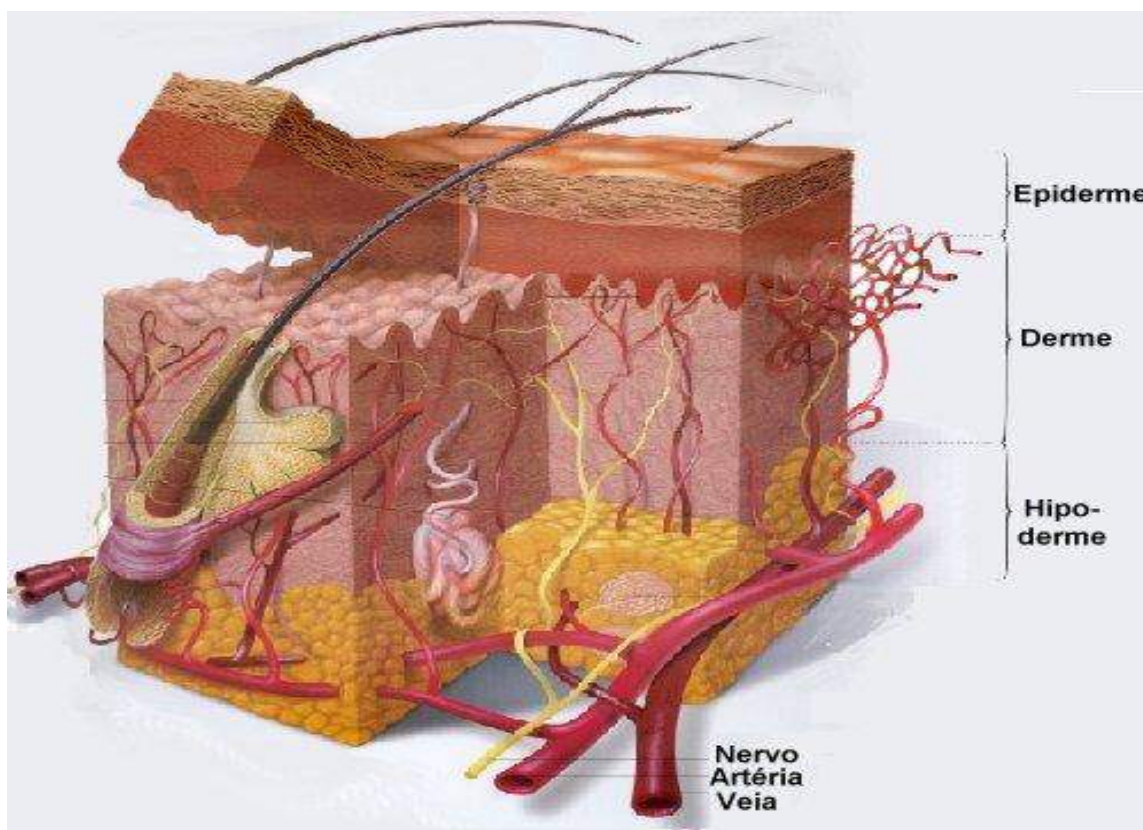


Figura 3: A pele com suas 3 camadas: Epiderme, derme e hipoderme.

Fonte: <http://www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/images/pele3d.jpg>

O estrato córneo é constituído por células mortas (corneócitos) embebidas numa matriz de lipídio e a estrutura SC é muitas vezes comparada com uma parede de tijolos, na qual os corneócitos são os tijolos e a matriz de lipídio é a argamassa. A matriz de lipídio forma uma via intercelular contínua no SC que é considerada uma via importante para a difusão de

substâncias através da SC. As principais classes de lipídios na SC são ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres (OGURI, 2014).

Os lipídios são os responsáveis pela função de barreira à perda de água e entrada de substâncias do estrato córneo. Assim, os componentes do estrato córneo são considerados como estruturas controladoras da taxa de permeação transcutânea de xenobióticos, fato relevante para administração de fármacos pela via tópica (LUSTOSA, 2012).

No tratamento de patologias da pele, o fármaco contido no medicamento aplicado deve ser capaz de penetrar e ficar retido na pele por um determinado tempo. A penetração de um fármaco na pele depende de um grande número de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas do fármaco, as características do veículo farmacêutico e a condição da pele em que será aplicado o produto (ALLEN Jr., 2007).

Todavia, a penetração através do estrato córneo ocorre principalmente por meio de duas vias, sendo elas: via intercelular, onde o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos pela matriz lipídica intercelular, e via transcelular, onde o fármaco atravessa os corneócitos e a matriz lipídica (Figura 4) (WILLIAMS, 2004).

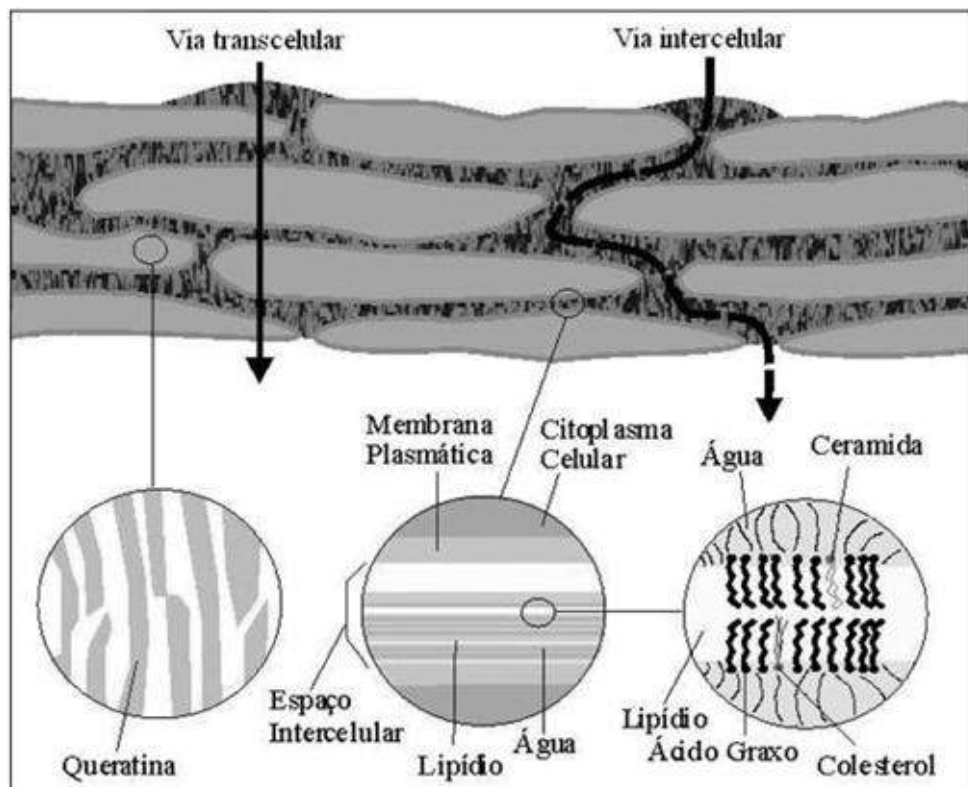


Figura 4. Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular).

Fonte: GRATIERI, 2008.

Por vezes não é possível a utilização das vias de administração mais comuns, como é o caso da via oral, uma vez que há fármacos que são sensíveis às transformações metabólicas que podem ocorrer tanto no trato gastrointestinal como no fígado. Por vezes também pode haver a necessidade de tratamentos locais, como no caso das doenças de pele e, portanto, a via tópica é a mais adequada. O uso de medicamentos exclusivamente tópicos tem como objetivo maximizar a concentração do fármaco no tecido alvo. Alguns compostos são indicados para permanecerem na superfície da pele, enquanto que outras substâncias destinam-se a atingir a epiderme viável ou a derme (LOURENÇO, 2013).

Pomadas, cremes e géis são formas farmacêuticas semissólidas destinadas à aplicação tópica. A maioria delas é utilizada pelos efeitos dos agentes terapêuticos que contêm. São utilizadas tanto por seus efeitos tópicos quanto sistêmicos (ALLEN Jr., 2007).

As pomadas são em geral, compostas por hidrocarbonetos líquidos numa matriz de hidrocarbonetos sólidos de elevado ponto de fusão. Enquanto a maioria das pomadas tem por base a parafina líquida ou a vaselina, há outros tipos alternativos. O polietileno pode ser incorporado em parafina líquida resultando numa matriz plástica. As misturas de polietilenoglicóis podem resultar em produtos com a consistência de uma pomada e solúveis em água (LACHMAN, 2001).

Cremes farmacêuticos são preparações semissólidas que contêm um ou mais agentes medicinais dissolvidos ou dispersos em emulsões óleo-em-água ou água-em-óleo ou em outros tipos de bases removíveis por água (ALLEN Jr., 2007).

Para estabilizar este tipo de formulação é frequente recorrer-se a agentes emulsivos, sendo os mais utilizados para esta função os tensoativos, como é o caso do lauril sulfato de sódio. No entanto, devido ao potencial de irritação causado pelos mesmos, estes têm sido substituídos por carbômeros ou celuloses. Outro problema dos tensoativos é a sua capacidade em emulsificar e remover os lipídios naturais da pele, provocando sensação de pele seca. No entanto, estes problemas já não são visíveis com a utilização de emulsificantes poliméricos (LOURENÇO, 2013).

Os cremes O/A são facilmente laváveis com água e por esta razão são melhor aceitos do que os cremes A/O, para além de não deixarem uma película oleosa à superfície da pele. Os cremes O/A apresentam também a vantagem de serem miscíveis com os exsudados cutâneos, o que pode ter interesse quando da veiculação de substâncias bacteriostáticas ou bactericidas (LOURENÇO, 2013).

Emulsão farmacêutica é uma dispersão em que a fase dispersa é composta de pequenos gotículas que se encontram distribuídos em um veículo no qual é imiscível. Nas emulsões, a

fase dispersa é a fase interna e a fase dispersante é a fase externa ou contínua. Emulsões apresentando fase interna oleosa e fase externa aquosa são emulsões óleo-em-água (o/a). Em contrapartida, emulsões apresentando fase interna aquosa e fase externa oleosa são denominadas emulsões água-em-óleo (a/o). Devido à fase externa de uma emulsão ser contínua, uma emulsão o/a pode ser diluída ou aumentada com água ou com preparação aquosa e uma emulsão a/o, com líquido oleoso ou mistura miscível em óleo. São caracterizadas como sistemas dispersos, constituídos por dois líquidos imiscíveis estabilizados por um agente emulsionante, geralmente, um polímero. Polímeros e copolímeros acrílicos, combinados ou não com tensoativos iônicos ou não iônicos, formam emulsões estáveis do tipo óleo em água (O/A). Os principais exemplos de emulsificantes poliméricos são copolímeros de elevada massa molar derivados do ácido acrílico e do alquil metacrilato, contendo ligações cruzadas por éteres alílicos do pentaeritritol ou da alil sacarose (ALLEN Jr., 2007; VILLANOVA *et al.*, 2010).

Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que quando dispersos em meio aquoso assumem conformação doadora de viscosidade à preparação. Logo, pode-se definir o gel como uma preparação semissólida composta de partículas coloidais que não se sedimentam (ficam dispersas). De acordo com as características dos polímeros, os géis podem apresentar natureza iônica ou não-iônica. Os géis de natureza não-iônica possuem estabilidade em ampla faixa de pH, tornando possível a veiculação de substâncias de caráter ácido, como os alfa-hidroxiácidos. Já os de caráter aniônico são pH dependentes, ou seja apresentam-se estáveis em pH neutro ou próximo do neutro (CORRÊA *et al.*, 2005).

Os géis são uma classe relativamente nova de forma farmacêutica criada pela retenção de grandes quantidades de líquido aquoso ou hidroalcoólico, em uma rede de partículas coloidais sólidas, que podem consistir em substâncias inorgânicas, tais como sais de alumínio ou polímeros orgânicos de origem natural ou sintética. Eles têm um componente aquoso superior que permite uma maior dissolução do fármaco, e também permite a migração fácil do fármaco por meio de um veículo que é, essencialmente, um líquido, em comparação com o unguento ou base de creme. Estes são superiores em termos de uso e aceitabilidade do paciente, porém, apesar das muitas vantagens dos hidrogéis, a principal limitação é na liberação de fármacos hidrofóbicos (KHULLAR, 2012).

Quando géis e emulsões são usadas em forma combinada, são conhecidos como emulgel. Nos últimos anos, tem havido um grande interesse na utilização de novos polímeros, com funções complexas como emulsionantes e espessantes, porque a capacidade de gelificação destes compostos permite a formulação de emulsões e cremes estáveis por meio da redução da

superfície e da tensão interfacial e, ao mesmo tempo, do aumento da viscosidade da fase aquosa. Emulgel para uso dermatológico tem várias propriedades favoráveis, tais como ser tixotrópico, apresentar vida útil longa, aparência sem gordura, espalha-se facilmente, facilmente removível e agradável (KHULLAR, 2012; SINGLA, 2012).

O produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira (“shelf-life”), pois durante o armazenamento, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação. Além dessa vantagem, a obtenção de formulações de uso tópico com caráter tixotrópico é bastante almejada, pois elas se deformam durante a aplicação, ou seja, tornando-se mais fluídas facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra. Por outro lado, é interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado para que o produto não escorra sobre a pele após aplicação devido a uma recuperação muito lenta da sua estrutura e também de um valor não muito baixo, pois isso pode acarretar em baixa espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (CORRÊA *et al.*, 2005; PANWAR, 2011).

O emulgel é constituído por um veículo, agentes emulsivos e gelificantes e promotores de penetração. Relativamente ao veículo, esse possui uma fase aquosa, que pode ser constituída por água ou álcoois e por uma fase oleosa, constituída por óleos minerais ou parafina. Estas formulações também contêm agentes emulsivos, como por exemplo, os polietilenoglicóis, que são usados com o objetivo de controlar a estabilidade das formulações. Os agentes gelificantes são usados com a finalidade de aumentar a consistência/viscosidade da formulação, sendo que o carbopol é muito utilizado. Por último, também se utilizam os promotores de penetração de modo a promover a absorção de fármacos através da pele. Exemplos destes agentes são: ácido oléico e linoléico, mentol e uréia (LOURENÇO, 2013).

3.5 Componentes do emulgel

Vários estudos demonstraram que *pluronic lecithin organogel* (organogel de lecitina - PLO) têm a capacidade única para entregar os medicamentos através da pele para um sítio específico quando outras vias de administração não são viáveis (BELGAMWAR, 2008; LEHMAN, 2001).

PLO não é irritante para a pele, absorve rapidamente, e é praticamente inodoro. Ele consiste de micelas de polímero semelhante invertidas. É melhor usado com fármacos de peso molecular inferior a 500 Da (BELGAMWAR, 2008; SAHOO *et al.*, 2011).

PLO é um sistema de duas fases consistindo de uma fase de oleosa (lipofílica) e uma fase de aquosa (hidrofílica). Os componentes químicos do PLO são *pluronic F-147* ou polaxamer 407[®], lecitina de soja, palmitato ou miristato de isopropila, sorbato de potássio, ácido sórbico e água (BELGAMWAR, 2008; BODDU, 2014).

O *pluronic F-147* ou polaxamer 407[®], utilizado na concentração entre 15 e 50%, é uma cera branca usada como agente emulsionante, solubilizante e molhante; é um copolímero de cadeia longa que tem a propriedade única de ser sólido à temperatura ambiente e líquido à temperatura refrigerada. Assim, em contato com a pele o gel facilita a adesão do produto (BELGAMWAR, 2008; UR-REHMAN, 2011; HEMELRIJCK; MULLER-GOYMANN, 2013).

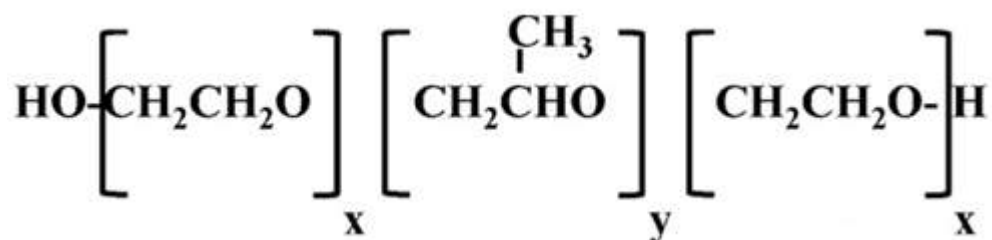


Figura 5. Estrutura química do polaxamer.

Legenda: As letras x e y representam cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas, respectivamente.

Fonte: UR-REHMAN, 2011.

As lecitinas são tensoativos de origem natural que apresentam alta afinidade com as membranas celulares (FRONZA *et al.*, 2004). Entretanto, na utilização dessas substâncias é necessário observar o grau de pureza por elas apresentado, pois suas propriedades físicas e emulsionantes dependem da composição e da concentração dos fosfolípidos e dos ácidos graxos presentes em cada amostra (CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2003).

Classificados como tensoativos de natureza anfótera, as lecitinas são misturas complexas de fosfolípidos extraídos da gema de ovo ou da soja, cujo maior componente é a fosfatidilcolina (PARK *et al.*, 1999; BELGAMWAR, 2008). Apresentam elevada lipofilicidade, possuem maior grau de compatibilidade com diversas substâncias e são menos sensíveis às alterações de pH ou à adição de eletrólitos (BILLANY, 2005).

A lecitina é pensada para ser um potencializador de permeação, uma vez que aumenta a fluidez da epiderme, do estrato córneo. É utilizado como dispersantes, emulsionantes e agente estabilizante (BELGAMWAR, 2008; BHATIA, 2013).

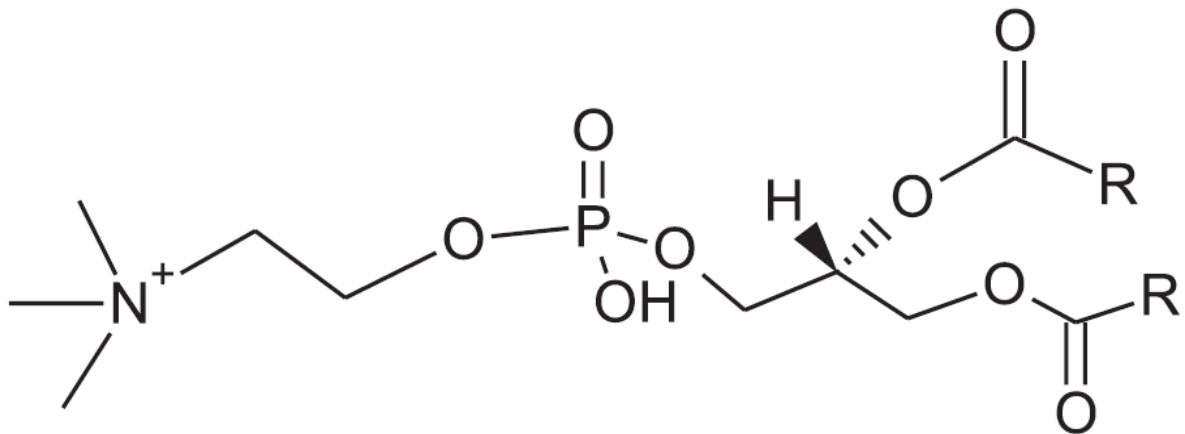


Figura 6. Estrutura química da lecitina.

Fonte: MERTINS, 2008.

O palmitato ou miristato de isopropila atua como um emoliente não-oleoso, com excelente capacidade de espalhabilidade e usado para solubilizar a lecitina. É um líquido claro, incolor, praticamente inodoro viscoso que solidifica a baixa temperatura. O sorbato de potássio, ácido sórbico são usados como conservantes do tipo antioxidante. A água atua como um agente de estabilização e de formação de estrutura no processo de formação do PLO. É também usada para solubilizar o *Pluronic F-127* e drogas polares (BELGAMWAR, 2008).

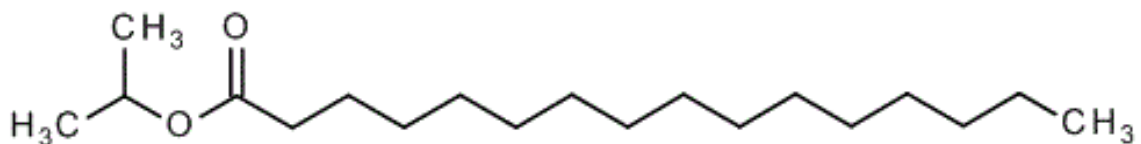


Figura 7. Estrutura química do palmitato de isopropila.

Fonte: www.merckmillipore.com

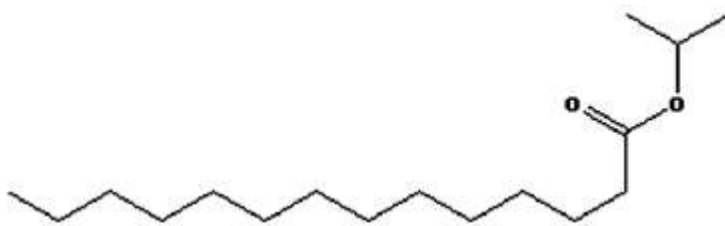


Figura 8. Estrutura química do miristato de isopropila.

Fonte: MATHOUT & WOODMAN, 2012.

O ácido oleico (OA) é um promotor rotineiramente usado e seu mecanismo de ação tem sido amplamente estudado *in vitro*. Os resultados desses estudos indicam que a OA modula principalmente o domínio extracelular lipídico do SC. Por exemplo, a medida em que o OA diminui a temperatura de transição de fase dos lipídios do SC é diretamente correlacionada com a quantidade de ácidos graxos do SC, bem como a sua capacidade de aumentar a permeabilidade *in vitro* de um fármaco co-administrado (NAIK, 1995).

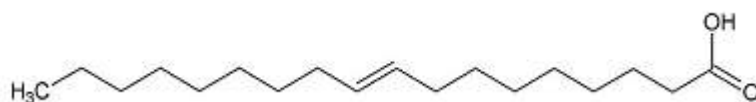


Figura 9. Estrutura química do ácido oléico.

Fonte: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/8686/6136>

Os sistemas de liberação lipídicos são constituídos de lipídios naturais e/ou sintéticos, com grande variedade de aplicações nas áreas farmacêutica e biomédica. A incorporação de fármacos de reduzida hidrossolubilidade permite algumas vantagens em relação a algumas formulações convencionais incluindo um aumento da segurança e redução de efeitos adversos (como irritação), ou aumento da atividade e melhora da farmacocinética do fármaco, tornando o sistema muito promissor para determinadas situações (BRUXEL, 2012).

CAPÍTULO I:

Formulações contendo anfotericina B para uso tópico e transdérmico: uma prospecção tecnológica

(Artigo a ser submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada)

Formulações contendo anfotericina B para uso tópico e transdérmico: uma prospecção tecnológica

Iluska Martins Pinheiro, Kayo Alves Figueiredo, Fernando Aécio de Amorim Carvalho, André Luis Menezes Carvalho

Resumo

O tratamento das leishmanioses inclui a abordagem tópica ou sistêmica. A baixa solubilidade da AmB em meio aquoso, sua alta toxicidade nas dispersões convencionais e a baixa taxa de absorção por via oral tem estimulando o desenvolvimento de novos sistemas de administração deste fármaco. O objetivo desse trabalho é realizar uma prospecção tecnológica de formas farmacêuticas de uso tópico contendo anfotericina B no tratamento das leishmanioses, observando o panorama mundial e estabelecendo perspectivas para uso futuro desse tipo de inovação tecnológica. Em relação à quantidade total de patentes, considera-se pequena em relação à relevância do assunto, mas isso justifica-se devido a Leishmaniose Tegumentar Americana ser uma doença negligenciada de predominância em países com baixo índice de desenvolvimento.

Palavras - Chave: Prospecção tecnológica, leishmaniose, anfotericina B, tópica.

Abstract

Treatment of leishmaniasis includes topical or systemic approach. The low solubility of AmB in aqueous medium, their high toxicity and low in the conventional dispersions rate of oral absorption is stimulating the development of new systems for the administration of the drug. The aim of this study is to perform a technological exploration of dosage forms for topical use containing amphotericin B in the treatment of leishmaniasis, observing the world panorama and establishing prospects for future use of this kind of technological innovation. In relation to the total number of patents, it is considered small in relation to the relevance of the subject, but this is justified because of American Cutaneous Leishmaniasis is a neglected disease of prevalence in countries with low level of development.

Keywords: Technological forecasting, leishmaniasis, amphotericin B, topical.

1. Introdução

O tratamento das leishmanioses, a mais de 50 anos baseia-se no uso de antimoniais pentavalentes, de uso parenteral, esse é o tratamento preconizado em muitos países para a forma visceral e cutânea da doença. Para as formas cutâneas, há a possibilidade de desenvolvimento de formas farmacêuticas tópicas que facilitem a adesão ao tratamento, por serem menos tóxicas, de fácil utilização e sem a necessidade de acompanhamento médico durante sua administração.

O tratamento das leishmanioses inclui a abordagem tópica ou sistêmica. A terapia parenteral convencional baseia-se na utilização de antimoniais pentavalentes. A anfotericina B (AmB), fármaco de segunda escolha, pode ser utilizada quando o tratamento com os antimoniais não é indicado ou no caso de falha terapêutica. A formulação convencional da AmB é uma dispersão coloidal na qual o fármaco associa-se ao desoxicolato de sódio (AmB-D). Embora efetivo, o tratamento com essa formulação é frequentemente acompanhado de toxicidade. As formulações lipídicas comercialmente disponíveis surgem como forma de superar esse inconveniente. É conhecido que tais sistemas diminuem a toxicidade relacionada à AmB, porém seu alto custo e dificuldades de preparo em escala industrial impedem seu amplo uso (CALDEIRA, 2011).

Os sistemas de liberação de fármacos apresentam inúmeras vantagens, entre elas a capacidade de prolongar e controlar a liberação da substância ativa, proteger as moléculas contra degradação no meio fisiológico, veicular fármacos hidrofóbicos pela via parenteral e conduzir à redução dos efeitos colaterais indesejáveis decorrentes de flutuações plasmáticas causadas pela administração de várias doses diárias do medicamento ou da ampla distribuição do fármaco no organismo (GRANADA, 2007).

Atualmente existe um grande interesse na liberação seletiva de fármacos e sistemas carreadores têm sido bastante estudados com objetivo de melhorar a seletividade e eficiência das formulações, principalmente em escala nanométrica (GRANADA, 2007). O impacto da nanociência e da nanotecnologia no campo da liberação controlada de drogas é de abrangência multifatorial, propiciando o desenvolvimento de métodos e produção e caracterização de agentes bioativos e permitindo evoluir de maneira promissora desde a etapa laboratorial até a aplicação clínica (YOUAN, 2008). Estudos demonstraram que a otimização do domínio hidrofóbico com nanocarreadores de óxido de polietileno-poli(ϵ -caprolactona) com base na solubilização e entrega de anfotericina B mostrou-se eficiente, com reduzida

atividade hemolítica em comparação ao Fungizone[®] (AmB lipossomal) (FALAMARZIAN et al., 2010).

Outro estudo revelou que sistemas lipídicos foram capazes de interagir fortemente com as moléculas de AmB, formando uma entidade molecular nova, na qual o fármaco está associado aos lipídios, que apresenta propriedades físico-químicas distintas da AmB isolada. Quando o complexo AmB-carreador é forte e inerte, ele permanece intacto após introdução na circulação sanguínea, mas pode se ligar a lipoproteínas. O complexo lipídico de AmB (Abelcet[®]) pode se ligar a lipoproteínas de alta densidade (HDL) e permanecer na circulação sanguínea, não induzindo toxicidade (VYAS, GUPTA, 2006).

BRIME e colaboradores (2004) demonstraram que a administração de Amb 1mg/Kg em microemulsão O/A e estabilizada por fosfatidilcolina para aplicação endovenosa apresentou menor toxicidade, boa eficácia e estabilidade, em relação a AmB convencional, sendo um sistema de liberação viável para o fármaco.

Assim, o objetivo desse trabalho é realizar uma prospecção tecnológica de formas farmacêuticas de uso tópico contendo anfotericina B no tratamento das leishmanioses, observando o panorama mundial e estabelecendo perspectivas para uso futuro desse tipo de inovação tecnológica.

2. Metodologia

Para o desenvolvimento desta prospecção foi realizada a busca em bases de patentes (no *abstract* e título) utilizando-se descritores referentes à caracterização e propriedades de AmB em forma farmacêutica tópica em relação à sua utilização no tratamento de formas cutâneas da leishmaniose.

Na metodologia foram realizadas buscas nas bases de dados de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), no *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), no *European Patent Office* (EPO) e na *World Intellectual Property Organization* (WIPO). Estas foram utilizadas por serem bases de busca de patentes gratuitas, de fácil acesso e utilização e bastante abrangentes contendo as principais informações sobre a tecnologia de interesse.

Os artigos publicados com a palavra Anfotericina/*Amphotericin* contida no título e/ou no resumo e que estava relacionada a leishmaniose foram pesquisados na base de dados *Web of Science* para avaliar-se a relevância do assunto na comunidade científica.

Além disso, buscou-se o texto da patente para conferir o assunto, observando-se tipo de tecnologia e forma farmacêutica desenvolvida.

3. Resultados e Discussão

De acordo com a Tabela 1, observa-se que a maioria das patentes referentes a anfotericina B está relacionada ao uso tópico e que o maior número de depósitos encontra-se no escritório da USPTO (Figura 1), fato que justifica-se por ser uma base de dados americana, reconhecida por muitos países que incentivam a pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias.

Tabela 01: Patentes da Tecnologia Formas Farmacêuticas Tópicas com anfotericina B, pesquisa no campo de resumo, nas bases INPI, EPO, USPTO e WIPO.

Palavra-chave	INPI	EPO	USPTO	WIPO
<i>Anfotericina + tópico</i>	1	0	0	0
<i>Anfotericina + transdérmico</i>	0	0	0	0
<i>Amphotericin + topical</i>	0	0	18	9
<i>Amphotericin +transdermal</i>	0	0	4	0
TOTAL	1	0	22	9

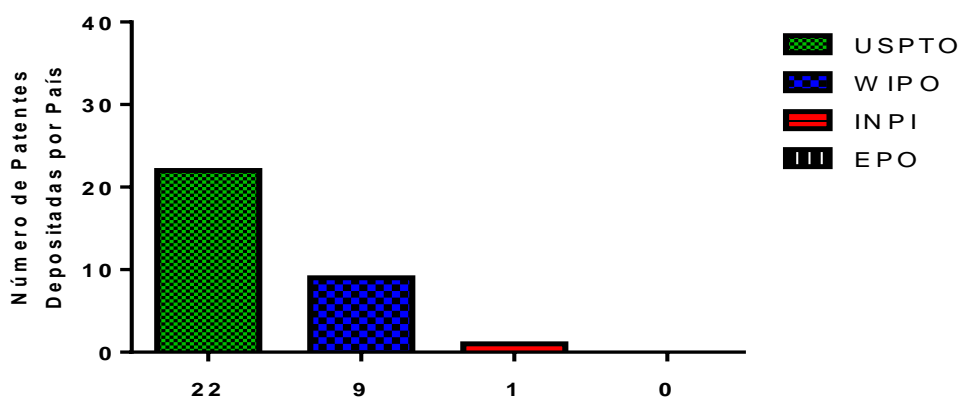


Figura1. Número de patentes depositadas por escritórios

Fonte: Autoria própria (2014).

No escritório brasileiro INPI, encontrou-se o registro de apenas uma patente realizada por indústria farmacêutica de grande porte do país. A invenção tem como objetivo o processo de obtenção de composições contendo a anfotericina B na sua forma superagregada capazes de tratar infecções causadas por fungos, parasitas e outros agentes susceptíveis ao antibiótico supracitado (PI 0105500-3). Trata-se de uma formulação estável da anfotericina B na sua forma superagregada em presença de desoxicolato de sódio, liofilizada e estéril, reunindo os

requisitos para uma formulação injetável de uso enteral, parenteral ou tópico, com toxicidade reduzida se comparada às formas convencionais que veiculam a anfotericina B (RODRIGUES JUNIOR et al, 2004). Observou-se ainda que o desenvolvimento dessa inovação foi fruto de parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais. Parcerias desse tipo tem sido desenvolvidas no Brasil mas, ainda, de maneira muito tímida.

No levantamento de patentes, observa-se a ocorrência de grupos de pesquisa organizados em alguns países e o maior número de depósito de patentes no ano de 2003 (Figura 2). Dentre as patentes pesquisadas, destaca-se um depósito realizado no EPO intitulada *Topical amphotericin B formulations and production method thereof* (WO2012042072) que traz formulação de anfotericina B associada a ciclodextrina com ação antiparasitária (antileishmaniose) em diferentes formas farmacêuticas, dentre elas gel e creme (uso tópico). A referida patente traz como inovação o preparo de novas formulações de anfotericina B associada a um melhor desempenho farmacoterapêutico (melhor ação farmacológica e menor toxicidade) (BILBAO et al, 2012).

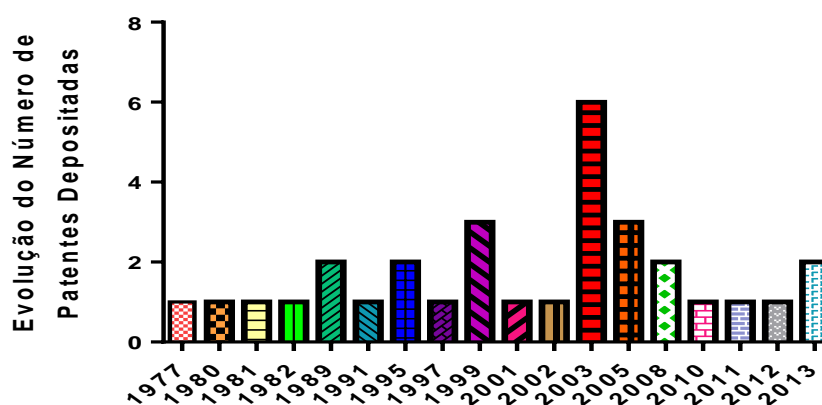


Figura2. Evolução anual do número de patentes depositadas.

Fonte: Autoria própria (2014).

Ainda no escritório EPO, destaca-se a patente *Lipid based pharmaceutical preparations for oral and topical application* (WO2010036947), cuja inovação refere-se a composições que compreendem compostos farmacêuticos e lipídeos, incluindo, por exemplo, soluções, complexos, micelas, emulsões, lipossomas ou partícula lipídica, e mistura de micelas e vesículas; métodos de preparação e utilizações no tratamento de doenças e método para a liberação tópica de agentes ativos. Em algumas formas de realização, a invenção refere-se a composição que compreende os compostos ativos para o uso no tratamento de infecções relacionadas com a pele (AHAMD, 2010).

A importância dessa patente dá-se pelo fato de que muitos trabalhos foram direcionados ao desenvolvimento de preparações lipídicas como veículo para fármacos, como lipossomas, complexos lipídicos e emulsões. Os lipossomas foram inicialmente utilizados para estudar o fluxo de íons através das membranas celulares, mas as principais razões dos estudos posteriores foram a necessidade de reduzir a toxicidade e a possibilidade de utilização dos mecanismos farmacocinéticos dessas formulações, a fim de melhorar a distribuição de fármacos nos órgãos-alvo (FILIPPIN, 2006).

A Anfotericina B (AmB) é um agente importante no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas graves. Apesar de seu histórico comprovado, os seus efeitos secundários conhecidos e toxicidade, por vezes, vai exigir a interrupção/suspensão da terapia, apesar de tratar-se de uma infecção fúngica sistêmica com risco de vida. A maior parte dos esforços para melhorar a AmB foram focados na preparação da AmB com um conjugado de lipídios. A administração de AmB é limitada pela toxicidade relacionada com a perfusão, um efeito tido como resultado da produção de citocina pró-inflamatória. A principal toxicidade aguda do desoxicolato de AmB inclui náuseas, vômitos, calafrios, febre, hipertensão ou hipotensão e hipóxia. Seu principal efeito adverso crônico é a nefrotoxicidade (LANIADO-LABORÍN *et al.*, 2009).

A busca por alternativa terapêutica é consolidada por maior número de artigos publicados no *Web of Science* com o descritor “anfotericina tópica” no ano de 2010 (Figura 3). Isso provavelmente justifica-se pelo fato de que fatores de risco crescentes estão fazendo das leishmanioses um problema de saúde pública em muitos países (NGURE *et al.*, 2009).

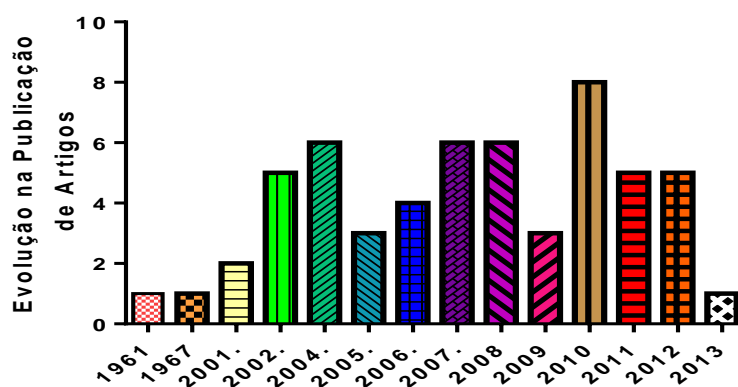


Figura 3. Evolução anual de publicações na *Web of Science* com o termo Anfotericina tópica.

Fonte: Autoria própria (2014).

No levantamento de patentes com formulação farmacêutica contendo anfotericina B para uso tópico e seus processos de inovação (Tabela 2), observa-se que os Estados Unidos destaca-se como o país com a maior quantidade de registros de patentes encontradas. Isso confirma que os países desenvolvidos vem investindo no desenvolvimento tecnológico de formulações que facilitem a adesão terapêutica e reduzam problemas com reações adversas.

Observa-se, ainda, que, dentre as patentes norte-americanas, existe um grupo de pesquisadores nesse assunto localizado no estado da Califórnia; sendo esse grupo envolvido no registro de alguns documentos de patentes.

Quanto à quantidade total de patentes, considera-se pequena em relação à relevância do assunto, mas isso justifica-se devido a leishmaniose tegumentar americana (LTA) ser uma doença negligenciada de predominância em países com baixo índice de desenvolvimento. Constata-se na literatura que diversos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de desenvolver formulações alternativas, demonstrando a relevância do desenvolvimento de novos sistemas carreadores de anfotericina B.

De fato, a tecnologia farmacêutica tem realizado e desenvolvido vários sistemas transportadores de fármacos. Essa área de pesquisa está em plena expansão e a grande maioria dos trabalhos investiga e apresenta soluções em vários aspectos como na liberação, biodistribuição e/ou dissolução dos fármacos (AISTER, 2006).

Tabela 2. Levantamento de patentes com formulação farmacêutica contendo anfotericina B para uso tópico e seus processos de inovação tecnológica.

Número da Patente	Classificação	Inovação	Título	Proprietário ou depositário
PI 0105500-3 A2	C07H 15/00; A61K 31/7028; A61P 31/00; A61P 33/00	Processo de obtenção de composições contendo a anfotericina B na sua forma superagregada em presença de desoxicolato de sódio, liofilizada e estéril, numa formulação injetável de uso enteral, parenteral ou tópico, com toxicidade reduzida, capazes de tratar infecções causadas por fungos, parasitas e outros agentes susceptíveis ao antibiótico supracitado.	Processo de obtenção de dispersões coloidais de anfotericina b; composições a base de anfotericina b de uso enteral, parenteral e tópico; uso destas composições no tratamento de micoses sistêmicas e infecções parasitárias.	Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA. (BR/SP)
WO2005077360	A61K31/00;A61K31/4164; A61K31/4178; A61K31/4196; A61K31/496; A61K31/506; A61K31/704; A61K31/7048	Esta invenção refere-se a um método de tratamento de otite externa utilizando uma combinação de medicamentos tópicos, incluindo um ou mais agentes antifúngicos, um composto de cefalosporina, um composto macrólido, um composto de fluoroquinolona, estreptomina, ou canamicina.	Combination medication and method for treatment of otitis externa.	LANE, E. M.
WO2012042072 (A1)	A61K31/7048; A61K47/40; A61K47/48; A61K9/06; A61K9/08	Relaciona-se com a preparação de novas formulações de anfotericina B para administração tópica, formando um complexo com ciclodextrina, que devido sua baixa afinidade provoca a liberação da maior parte do agente anti-fúngico, o que leva a uma ação antiparasitária (antileishmaniasis), e antimicótica (cutânea, mucocutânea e superfície); com diferente forma farmacêutica: gel, creme, pomada e gotas.	Topical Amphotericin B Formulations And Production Method Thereof	BILBAO, P.R. E.; BOLAS, F. F.; DEA AYUELA, M. A.; MOLERO, M. P. G.; NOMBELA, C. C.; RUIZ, S. H. K.; SERRANO, L. R.; TORRADO, D. J. J.; VEGAS, S. M. del C.
WO2005032528 (A2)	A61K31/00; A61K31/4164; A61K31/7042	Esta invenção refere-se a um método de tratamento de otite externa, e, em particular, otite externa da etiologia do fungo, com uso de medicação tópica, incluindo agentes antifúngicos.	Method of treatment of otitis externa	LANE, E. M [US] ± (LANE, E. M.)
WO03041500 (A1)	A01N43/90; A61K47/10; A61K47/12; A61K47/20; A61K47/26; A61K9/00	A presente invenção refere-se a formulações de Pimaricina (natamicina), que são úteis para o tratamento e a supressão de infecções tópicas, tais como as causadas por vários agentes patogênicos, incluindo fungos e leveduras, que são resistentes a compostos de azole e anfotericina B.	Topical formulations of natamycin/pimaricin	ANDERSSON, B. S
WO2010036947 (A2)	A61K31/506; A61K31/58; A61K47/44; A61P17/14; A61K31/506; A61K31/58; A61K47/44; A61P17/00	Refere-se a composições que compreendem compostos farmacêuticos e lipídeos, incluindo, por exemplo, soluções, complexos, micelas, emulsões, lipossomas ou partícula lipídica, mistura de micelas e vesículas; métodos de preparação e utilizações no tratamento de doenças e método para a liberação tópica de agentes ativos. Em algumas formas de realização, refere-se ao uso no tratamento de infecções relacionadas com a pele.	Lipid based pharmaceutical preparations for oral and topical application	AHAMD, A. [US]; AHMAD, I. [US]; AHMAD, M. U [US]; ALI, S. M [US]; Sheikh, S. [US]
WO2008036292 (A2)	A61K31/4178; A61K31/4196; A61K31/496; A61K31/7034; A61K38/13; A61K31/4164; A61K31/4196; A61K31/496; A61K31/7028; A61K38/12	Esta invenção refere-se a um método de tratamento de otite externa utilizando uma combinação de medicamentos tópicos, incluindo um ou mais agentes antifúngicos, e um ou mais agente antibacteriano.	Method for treating otitis externa	LANE, E. M
WO03039435 (A2)	A61K31/7048; A61K47/28; A61K9/19; A61K47/18; A61K47/38	A presente invenção tem como objetivo o processo de obtenção de composições contendo anfotericina B na sua forma superagregante na presença de desoxicolato de sódio, seco por congelamento (liofilizado) e estéril, unindo os requisitos para uma	Process of obtaining colloidal dispersions of amphotercin b	GONCALVES, G. S. [BR]; JUNIOR, J. M. R. [BR]

WO9927940 (A1)	A61K47/10; A61K9/127; A61K9/00; A61K47/10; A61K9/00; A61K9/127;	formulação injetável para utilização entérica, parenteral ou tópica, com toxicidade reduzida em comparação com formas convencionais capaz de tratar infecções provocadas por fungos, parasitas e outros agentes sensíveis a este antibiótico. Composições e métodos para o tratamento tópico de infecções por fungos ou protozoários da pele ou unhas são descritos. As composições incluem uma formulação lipídica da anfotericina B, que está disperso num veículo aquoso contendo cerca de 2% a cerca de 35% em volume de etanol em relação à água.	Formulations for topical treatment of skin infections	BARENHOLZ, Y.[IL];FRANKEN-BURG, S.[IL]; GLICK, D. [IL]; KLAUS, S. N
WO8910739 (A1)	A61K47/48; A61K9/18	A presente invenção envolve uma composição de matéria compreendendo anfotericina B e hidroxialquilo-gama-ciclodextrina(2-hidroxiopropil-gama-ciclodextrina). A administração é preferivelmente parenteral. A infecção fúngica disseminada preferencialmente tratada é uma infecção por fungos, como a <i>Candida albicans</i> , um <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida aparapsiloses</i> ou infecção <i>Torulopsisglabrata</i> .	Hydroxyalkylcyclodextrin-antifungal polyene antibiotics complexes	ANAISSE,E. J. [US];BODEY, Gerald P [US]; PITHA, J. [US]
US 20070123477 A1	A61K 31/70 (20060101)	A presente invenção compreende composições e formulações compreendendo anfotericinaB, com um ou mais excipientes e métodos de preparação.	Compositions comprising amphotericin B, methods and systems	MALCOLMSON, R. (CA); KUGLER, A. (CA); SWEENEY, T. D. (CA); WASHCO, K. (CA); MILLER, D. (CA)
US 20060105968 A1	A61K 31/70 (20060101)	Um método para o tratamento de infecções fúngicas num mamífero que inclui administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição com anfotericinaB e um veículo farmacologicamente aceitável. Anfotericina B HP está associada com a diminuição da toxicidade em mamíferos e células medida pela viabilidade celular e da expressão de marcadores de citocinas. Permite a redução das reações adversas ao uso de produtos de anfotericina B.	Compositions comprising highly purified amphotericin B	CLEARY, J. D. (MS); CHAPMAN, S. W. (MS), KRAMER, R. E. (MS)
US006844004 b2	A01N 43/90 (20060101); A61K 47/12 (20060101); A61K 47/10 (20060101); A61K 9/00 (20060101)	A presente invenção refere-se a formulações de Pimaricina (também chamado de natamicina), que são úteis para o tratamento e a supressão de infecções tóxicas, tais como as causadas por vários agentes patogênicos, incluindo fungos e leveduras, que são resistentes a compostos de azol e anfotericina B.	Topical formulations of natamycin/pimaricin	ANDERSSON,B. S. (TX)
US006664241 b2	C07H 17/00 (20060101); C07H 17/08 (20060101); A61K 031/70 (); C07H 017/08	A presente invenção proporciona duas novas classes de derivados de amida de polienomacrolídeos úteis para o tratamento ou prevenção de infecções fúngicas; Os mesmos são mais do que os antibióticos de polienoconvencionais, tais como a anfotericinaB e éster metílico de Anfotericina B solúveis em água.	Water-soluble amide derivatives of polyene macrolides and preparation and uses thereof	CHANG, C. C. (MA); DANG,B. T. (CA); BALDWIN, C. J. (CA); LOURY, D. J. (CA); SIMON, R. J. (CA); WEBB, R. R. (CA)
US006562796 B2	C07H 17/00 (20060101); C07H 17/08 (20060101); A61K 031/70 (); C07H 017/08	Proporciona uma nova classe de derivados de macrolídeo polieno que apresentam atividade antifúngica surpreendentemente superior e solubilidade em água em relação ao éster metílico anfotericina B(AME). Além disso, os novos derivados de macrolídeo polieno melhoraram a solubilidade em água e menor toxicidade do que tanto a anfotericina B(AmB) e EMA.	Derivatives of polyene macrolides and preparation and use thereof	BALDWIN, C. J. (CA);CHANG, C. C. (CA); DANG, B. T. (CA)
US006406713 B1	A61K 9/127 (20060101); A61K 9/16 (20060101); A61K 009/127	Os métodos e composições são descritos para os complexos lipídicos não lipossômicos(adimiristoiolfatidilcolinaedimiristoiolfatidilglicerol) em associação com fármacos hidrofóbicos tóxicos, tais como a anfotericinaB.	Methods of preparing low-toxicity drug-lipid complexes	JANOFF, A. S. (PA); MADDEN, T. D. (CA); CULLIS, P. R. (CA); KEARNS, J. J. (NJ); DURNING, A. G. (PA)
US005883120A	A61K 31/35 (20060101); A61K 031/335 (); A61K 031/34	Esta invenção relaciona-se com a descoberta de propriedades para uma série de poliéteres de lactona macrocíclicos (espongiestatinas) e que inibiu o crescimento de leveduras e fungos filamentosos em difusão em disco e macrodiluição em caldo (para espongiestatina 1); ensaios Espongiestatinas 2-7 também demonstrou atividade antifúngica em métodos de difusão em disco. São também descritos para o tratamento de infecções causadas por <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> e	Antifungal activity of the spongiestatinas	PETTIT, G. R. (AZ)

US005874104A	A61K 31/70 (20060101); A61K 9/127 (20060101); A01N 025/32 (); A61K 031/70	As formulações que consistem em pequenas partículas de fosfolípido unilamelares que encapsulam antibióticos antifúngicos de polieno e métodos para a utilização de tais composições para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. As partículas estão na forma de vesículas, que compreendem anfotericinaB, de preferência e /ou nistatina, fosfatidilcolina de ovo e colesterol. Estas vesículas podem também ter uma superfície de amina modificada.	Treatment of systemic fungal infections with phospholipid particles encapsulating polyene antibiotics	ADLER-MOORE, J. (CA); GAMBLE, R. C. (CA); PROFFITT, R. T. (CA)
US005616334A	A61K 9/16 (20060101); A61K 9/127 (20060101); A01N 025/32 (); A01N 057/26 (); A61K 031/685	Os métodos e composições são descritos para os complexos lipídicos não lipossômicos (adimiristoilfosfatidilcolinaadimiristoilfosfatidilglicerol), em associação com fármacos hidrofóbicos tóxicos, tais como a anfotericinaB.	Low toxicity drug-lipid systems	JANOFF, A. S. (PA); BONI, L. (NJ); MADDEN, T.D. (CA); CULLIS; P. R. (CA); LENK, R. P. (NJ); KEARNS, J. J. (NJ); DURNING, A. G. (PA); KLIMCHAK, R. (NJ); PORTNOFF, J. (PA)
US005444052A	A61K 31/70 (20060101); A61K 31/08 (20060101); A61K 31/075 (20060101); A61K 47/10 (20060101)	As infecções fúngicas são tratadas através da administração de uma combinação de(a) anfotericina B, e(b) um éter de glicerol selecionados a partir do grupo que consiste de(i) HOCH.sub.2CHOHCH.sub.2OR, (ii) HOCH.sub. 2CH(OR.sub.1) CH.sub.2OH, e(iii) as suas combinações, em que ReR.sub.1são selecionados independentemente de entre ogrupoconsistindode-C.sub.8 C.sub.18eC.sub.8-C.sub.18 alquênol. O éter de glicerol atua sinergicamente para reduzir a concentração inibitória mínima de anfotericina B. A combinação é particularmente eficaz contra espécies <i>Cryptococcus</i> e <i>Candida</i> .	Amphotericin B composition with enhanced fungal activity	PIERINGER, R. A. (PA); HAYNES, M. P. (FL); VED, H. S. (PA); CABACUNGA, E. A.(PA)
US005389373 A	A61K 9/107 (20060101); A61K 009/107	Um processo para a preparação de uma emulsão de óleo-em-água de um medicamento que é fracamente solúvel em água em que o fármaco (por exemplo, anfotericinaB) é dissolvido em uma solução de pH elevado ou baixo, antes da formação da emulsão de drogas. A solução de pH elevado, é de preferência uma solução de NaOH e/ou KOH 0,5 M e a solução de pH baixo é, preferivelmente, uma solução de HCl 0,5 M. Uma emulsão de drogas produzida pelo processo, também é fornecida, em que a droga está principalmente associada com as gotículas de óleo.	Preparation of oil-in-water emulsions of drugs	DAVIS, S. S. (GB); WASHINGTON, C. (GB)
US005043107A	A61K 9/127 (20060101); A61K 009/133 (); B01J 013/02	As formulações que consistem em pequenas partículas de fosfolípido unilamelares que encapsulam antibióticos antifúngicos de polieno e métodos para a utilização de tais composições para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas são descritos. As partículas estão na forma de vesículas, que compreendem um antibiótico antifúngico de tipo polieno, anfotericina B, de preferência e / ou nistatina, fosfatidilcolina de ovo e colesterol.	Preparation small unilamellar vesicles including polyene antifungal antibiotics	ADLER-MOORE, J. (CA); GAMBLE, R. C. (CA); PROFFITT, R. T. (CA)
US004883785 A	A61K 47/48 (20060101); C08B 37/00 (20060101); A61K 031/70 (); C07H 017/08	Um complexo formado de um agente anti-fúngico de polieno, tais como anfotericina B, e de ciclodextrina, de preferência. Y-ciclodextrina, é fornecida. O complexo melhorou solubilidade em água e a estabilidade da anfotericina B. A solução pode ser liofilizada como se desejar para conseguir uma maior solubilidade.	Complex of anti-fungal agent and cyclodextrin and method	CHOW, W. (NJ); CHEN, S. C. (NJ); TIMMINS, P. (GB)
US004820292 A	A61L 15/16 (20060101); A61L 15/44 (20060101); A61L 15/24 (20060101); A61L 26/00 (20060101); C08K 005/41 (); C08K 005/34 (); C08K 005/15 (); C08K 005/10	Um teste de sensibilidade antimicrobiana e testes estrato são divulgados para avaliar a sensibilidade de diversos agentes anti-microbianos em relação aos contaminantes microbianos identificáveis. O estrato de teste compreende um polímero tal como o poli (2-hidroxietilmetacrilato), referida como PHEMA, um solvente orgânico, tal como polietileno-glicol (PEG), um plastificante de ligação de hidrogênio, tal como dimetilsulfóxido (DMSO), um agente anti-microbiano tal como a sulfadiazina de prata, mafenida, nistatina, nitrofurazona, nitrato de prata, bacitracina, gentamicina, anfotericina B, nitrato de céσιο, ou outros agentes anti-microbianos.	Anti-microbial sensitivity test and testing stratum	KOROL, B. (FL); NATHAN, P. (OH)

US004342750 A	A61K 35/00 (20060101); A61K 31/70 (20060101); A61K 035/00 (); A61K 031/70 (); A61K 031/71	As composições administradas por via oral para o tratamento da hipertrofia prostática benigna. Estas composições contêm uma dose eficaz de N-acilo de anfotericina B. Além disso, o método de tratamento da hipertrofia prostática benigna, com tais composições é aqui descrito	Method for treating benign prostatic hypertrophy with N-acyl amphotericin B	GORDON, H. W. (NY)
US004308375 A	C07H 17/08 (20060101); C07H 17/00 (20060101); C07H 017/08	Um método para a purificação de antibióticos poliéno insolúveis em água, tais como a anfotericina e nistatina; está previsto que o método inclui a fase de passar uma mistura de antibiótico de poliéno disperso em metanol através de uma coluna de permuta de íons em que bactérias gram-negativas e gram-positivas são removidos do antibiótico.	Method for purifying water-insoluble polyene antibiotics	TANG, W. W. (NJ)
US004195172	C07H 17/00 (20060101); C07H 17/08 (20060101); C07H 017/08	São descritos os novos compostos, sais de N-metilglucamina de derivados de N-glicosil de macrolídeos poliéno em particular sais de N-metilglucamina de derivados de N-glicosil de anfotericina B e nistatina. Estes compostos apresentam alta atividade farmacológica em algumas infecções fúngicas tópicas e sistêmicas.	Salts of N-glycosyl derivatives of polyene macrolides, especially N-methylglucamine salts as well as the method of their preparation	FALKOWSKI, L. (PL); KOWSZYK-GINDIFER, Z. (PL); PLOCIENNIK, Z. (PL); ZIELINSKI, J. (PL); DAHLIG, H. (PL); GOLIK, J. (PL); JAKOBS, E. (PL); KOLODZIEJCZYK, P. (PL); BYLEC, E. (PL); ROSLIK-KAMINSKA, D. (PL); WAGNER, W. (PL); PAWLAK, J. (PL); BOROWSKI, E. (PL)
US004062941	A61K 38/43 (20060101); C12N 9/14 (20060101); A61K 037/48	A presente invenção engloba um método para o tratamento de infecções fúngicas em animais, compreendendo a administração a enzimas líticas fúngicas células extraídas de <i>Coprinus</i> , <i>Lycoperdon</i> , ou <i>Bolbitius</i> em conjunto com agentes antifúngicos convencionais (AmB ou nistatina). É particularmente útil no tratamento de infecções por fungos oportunistas, tais como <i>A. fumigatus</i> e <i>C. albicans</i> .	Method for treating fungal infections using cell lytic enzymes	DAVIES, D.A. L. (EN)
US008513204	A61K 31/70 (20060101)	Compreende composições e formulações com AmB, com um ou mais excipientes, métodos de preparação.	Compositions comprising amphotericin B, methods and systems	MALCOLMSON, R. (CA); KUGLER, Alan (CA); SWEENEY, T. D. (CA); WASHCO, K. (CA); MILLER, D. (CA)
US007326691	A61K 9/14 (20060101); A61K 31/70 (20060101)	A composição inclui as partículas com, pelo menos, cerca de 95% em peso de AmB, em que as partículas têm um diâmetro médio de massa que varia de cerca de 1,1 µm a cerca de 1,9 µm. Uma outra composição também inclui partículas com, pelo menos, cerca de 95% em peso de AmB, em que pelo menos cerca de 80% em peso das partículas têm um diâmetro geométrico que varia de cerca de 1,1 µm a cerca de 1,9 µm. Outra composição inclui partículas com AmB em que as partículas têm um diâmetro médio de massa inferior a cerca de 1,9 µm, e em que a AmB tem um nível de cristalinidade de pelo menos cerca de 20%.	Compositions comprising amphotericin B, methods, and systems	DUDDU, S. (CA); PALAKODATY, S. (CA); LECHUGA-BALLESTEROS, D. (CA); MILLER, D. (CA); KUGLER, A. R. (CA); FRANTZ, C. (CA); TAN, T. (CA); MALCOLMSON, R. (CA); WASHCO, K. (CA); SWEENEY, T. (CA); TARARA, T. E. (CA); DWIVEDI, S. (CA); ELDON, M. A. (CA)
US006664241 B2	C07H 17/00 (20060101); C07H 17/08 (20060101); A61K 031/70 (); C07H 017/08	A presente invenção proporciona duas novas classes de derivados de amida de polienomacrolídeos úteis para o tratamento ou prevenção de infecções fúngicas. Os novos derivados de amida de polienomacrolídeos apresentam atividade antifúngica e são mais do que os antibióticos de poliéno convencionais, tais como a AmB e éster metílico de AmB solúveis em água.	Water-soluble amide derivatives of polyene macrolides and preparation and uses thereof	CHANG, C. C. (MA); DANG, B.T. (CA); BALDWIN, C. J. (CA); LOURY, D. J. (CA); SIMON, R. J. (CA); WEBB, R. R. (CA)
US006562796 B2	C07H 17/00 (20060101); C07H 17/08 (20060101); A61K 031/70 (); C07H 017/08	A presente invenção proporciona uma nova classe de derivados de macrólido poliéno úteis para o tratamento ou prevenção de infecções fúngicas. Os mesmos apresentam atividade antifúngica surpreendentemente superior e solubilidade em água em relação ao éster metílico anfotericina B (AME); além disso, melhoraram a solubilidade em água e menor toxicidade do que tanto a AmB e EMA.	Derivatives of polyene macrolides and preparation and use thereof	BALDWIN, C. J. (CA); CHANG, C. C. (CA); DANG, B. T. (CA)

4. Conclusão

Acredita-se que, no futuro, com o aumento do incentivo às universidades brasileiras através de financiamentos de projetos de pesquisas por parte do governo federal ou mesmo da parceria com empresas nacionais, novas tecnologias estarão disponíveis, como já se observa nos países desenvolvidos. Observa-se ainda que tais tecnologias tenham a perspectiva de contribuir para que populações menos favorecidas economicamente tenham acesso à saúde por meio da terapia para doenças negligenciadas, como é o caso das leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- AHAMD, A.; AHMAD, I.; AHMAD, M.U.; ALI, S. M.; Sheikh, S. Lipid based pharmaceutical preparations for oral and topical application. WO2010036947. 1 de abril de 2010.
- AISTER, A. Formes galéniques nouvelles em cancérolgie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.64, n.1, p. 23-35, 2006.
- BILBAO, R. P. E; BOLAS, F. F.; DEA AYUELA, M. A.; MOLERO, Martin-Portugues G.; NOMBELA, C. C.; RUIZ, S. H. K.; SERRANO, L. R.; TORRADO, D. J. J; VEGAS, S. M. del C. Topical amphotericin B formulations and production method thereof. WO2012042072. 5 de abril de 2012.
- CALDEIRA, L. R. Nanoemulsões carregadas com anfotericina B para o tratamento das leishmanioses: uma nova abordagem. Universidade Federal de Minas Gerais. Curso de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Dissertação de mestrado. Belo Horizonte, Minas Gerais: 2011.
- FALAMARZIAN, A.; LAVASANIFAR, A. Optimization of the hydrophobic domain in poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) based nano-carriers for the solubilization and delivery of Amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 313–320, 2010.
- FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficácia terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p. 167-194, 2006.
- GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C. L.; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p.129-139, 2007.

- LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.26, n. 4, p. 223-227, 2009.
- NGURE, P. K.; KIMUTAI, A.; NG'ANG'A, Z. W.; RUKUNGA, G.; TONUI, W. K. A review of Leishmaniasis in Eastern Africa. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 23, n. 2, p. 79-86, 2009.
- RODRIGUES JÚNIOR, J. M.; GONÇALVES, G. S. Processo de obtenção de dispersões coloidais de anfotericina B; composições à base de anfotericina B de uso enteral, parenteral e tópico; uso destas composições no tratamento de micoses sistêmicas e infecções parasitárias. PI 0105500-3.22 de junho de 2004.
- VYAS, S. P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 417-432, 2006.
- YOUAN, B.B.C. Impact of nanoscience and nanotechnology on controlled drug delivery. **Nanomedicine**, v. 3, n. 4, p.401-406, 2008.

CAPÍTULO II:

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de anfotericina B em emulgel e cinética de liberação *in vitro*

(Artigo a ser submetido à revista American Latin Journal of Pharmacy)

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de anfotericina B em emulgel e cinética de liberação *in vitro*

Iluska Martins Pinheiro, Gláucia Laís Nunes Lopes, Ivana Pereira Santos Carvalho, Lucas Fernando Lopes Araújo, Lucas Solyano Almeida de Oliveira, Fernando Aécio de Amorim Carvalho, André Luis Menezes Carvalho

RESUMO

As doenças negligenciadas (dentre elas as leishmanioses) afetam predominantemente as populações mais pobres. Essas doenças são assim denominadas porque os investimentos em pesquisa geralmente não revertem em desenvolvimento e ampliação de acesso a novos medicamentos, pois as indústrias farmacêuticas são principalmente orientadas pelo lucro, e o retorno financeiro exigido dificilmente seria alcançado no caso de doenças que atingem populações marginalizadas. A anfotericina B (AmB) é indicada para o tratamento da leishmaniose cutânea; porém, a AmB possui baixa biodisponibilidade por via oral e sua utilidade por via parenteral é comprometida devido à alta incidência de reações adversas. Assim, há necessidade de desenvolver formulações de baixo custo, como emulgel de AmB, para uso tópico. Nesse processo, é necessário validar método analítico de quantificação de baixo custo e mais acessível. O objetivo deste estudo é validar método analítico por espectrofotometria para a quantificação de AmB em emulgel seguindo todos os parâmetros relacionados pela ANVISA (RE nº 899/2003) e avaliar a liberação de anfotericina B em emulgel através de membrana sintética, comparando os resultados obtidos na presença ou ausência de ácido oléico como promotor químico de liberação. O método foi validado através dos testes de linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. Na validação por espectrofotometria UV/Vis, o método apresentou linearidade na faixa de 1 a 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com variação da precisão inferior a 5% e exatidão entre 100,6 e 100,8%; demonstrou correlação linear ($r = 0,9999$) e especificidade e robustez. O método, portanto, mostrou-se sensível, preciso e exato, estando adequado para análise da AmB na forma farmacêutica emulgel. O ensaio de cinética de liberação *in vitro* por meio de células de Franz demonstrou que a adição de ácido oléico 5% como promotor químico de liberação melhorando a absorção da AmB através de membranas, duplicando a quantidade absorvida no tempo de 6 horas de aplicação em relação à mesma formulação sem o promotor, demonstrando que a formulação

emulgel de AmB 3% com ácido oléico 5% é promissora alternativa terapêutica para tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chaves: Anfotericina B, Validação espectrofotométrica, Método analítico.

ABSTRACT

Neglected diseases (leishmaniasis among her) predominantly affects the poor. These diseases are so named because investments in research generally does not accrue in developing and expanding access to new medicines because pharmaceutical companies are primarily driven by profit, and the financial return required hardly be achieved in the case of diseases that affect marginalized populations. Amphotericin B (AmB) is indicated for the treatment of cutaneous leishmaniasis; However, AmB has low bioavailability orally and parenterally its usefulness is compromised due to high incidence of adverse reactions. Thus, there is need to develop formulations for low cost, as of AmB emulgel for topical use. In this process, it is necessary to validate analytical method for quantification of low cost and more accessible. The aim of this study is to validate the analytical method for the spectrophotometric quantification of AmB in emulgel following all the parameters related by ANVISA (RE n ° 899/2003) and evaluate the release of amphotericin B in emulgel through synthetic membrane, comparing the results obtained in the presence or absence of oleic acid as a chemical promoter release. The method was validated through tests of linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification. Validation by UV / Vis spectrophotometry method was linear in the range from 1 to 6 with 1 µg.mL-variation of less than 5% precision and accuracy between 100.6 and 100.8%; showed linear correlation ($r = 0.9999$) and specificity and robustness. The method, therefore, was sensitive, precise and accurate, and is suitable for analysis of AmB in emulgel dosage form. The test in vitro release kinetics by Franz cells demonstrated that the addition of 5% oleic acid as a chemical promoter release of AmB improved absorption across membranes doubling the amount absorbed in time of 6 hours of application in relation to same formulation without the promoter, indicating that the formulation of AmB emulgel 3% oleic acid is 5% promising therapeutic alternative for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Amphotericin B, spectrophotometric Validation, Analytical Method.

1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas (dentre ela as leishmanioses), muitas vezes denominadas de doenças tropicais negligenciadas, correspondem a um grupo de doenças infecciosas que afeta predominantemente as populações mais pobres e vulneráveis e contribui para a perpetuação dos ciclos de pobreza. Essas doenças são assim denominadas porque os investimentos em pesquisa geralmente não revertem em desenvolvimento e ampliação de acesso a novos medicamentos, testes diagnósticos, vacinas e outras tecnologias para sua prevenção e controle (WERNECK, 2011).

O problema é particularmente grave em relação à disponibilidade de medicamentos, já que as atividades de pesquisa e desenvolvimento das indústrias farmacêuticas são principalmente orientadas pelo lucro, e o retorno financeiro exigido dificilmente seria alcançado no caso de doenças que atingem populações marginalizadas, de baixa renda e pouca influência política, localizadas, majoritariamente, nos países em desenvolvimento (WERNECK, 2011).

A anfotericina B (AmB) atua sobre o ergosterol presente na membrana das células. Ela possui baixa biodisponibilidade por via oral e sua utilidade é comprometida por uma alta incidência de reações adversas, incluindo febre, calafrios, náuseas, vômitos, dor de cabeça e disfunção renal com anemia associada, hipocalemia e hipomagnesemia, quando administrado por via parenteral. Esses fatores conduziram ao desenvolvimento de preparações comerciais de vesículas de fosfolipídios para utilização terapêutica. No entanto, a utilidade destes novos produtos é muito limitada pelos seus elevados custos (BUTANI, 2014).

A AmB é indicada para o tratamento da leishmaniose mucocutânea americana, embora não se considere fármaco de primeira eleição (RATH *et al.*, 2003). Mesmo com a sua elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos (DISMUKES, 2000), a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica têm assegurado que a AmB permaneça como fármaco de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos (FILIPPIN *et al.*, 2006). Assim, há necessidade de desenvolver formulações de baixo custo, as quais tiveram um aumento de interesse nos anos recentes com uso de veículos tópicos que podem modificar a penetração da droga na pele.

Métodos analíticos baseados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são descritos em compêndios oficiais e na literatura para quantificação de Anfotericina B. Porém, CLAE é um método de análise longo e com alto custo para as empresas farmacêuticas e centros de pesquisa (BETETA, 2002; GAIESA *et al.*, 2013).

A espectrofotometria na região do visível possui como vantagens o baixo custo e a fácil execução, possibilitando a obtenção de alta sensibilidade e seletividade. A seletividade e sensibilidade do método espectrofotométrico no visível dependem somente das reações químicas responsáveis pelo desenvolvimento da cor e não da tecnologia dos equipamentos. Os custos envolvidos no desenvolvimento e aplicação do ensaio espectrofotométrico dependem somente dos reagentes utilizados (MRUTYUNJAYA, 2008).

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por um processo de avaliação denominada validação que deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

O objetivo deste estudo é validar método analítico por espectrofotometria para a quantificação de AmB em emulgel seguindo todos os parâmetros relacionados pela ANVISA (RE nº 899/2003) e avaliar a liberação de anfotericina B em emulgel através de membrana sintética, comparando os resultados obtidos na presença ou ausência de ácido oléico (OA) como promotor químico de liberação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Validação analítica por espectrofotometria UV/Vis

Materiais

Preparou-se a forma farmacêutica de emulgel utilizando lecitina de soja e palmitato de isopropila (EMBRAFARMA, São Paulo, Brasil), polaxamer 407 (GALENA, São Paulo, Brasil), anfotericina B (VALDEQUÍMICA, São Paulo, Brasil) e ácido oléico (CRISTÁLIA, Brasil). Preparou-se as concentrações das alíquotas empregadas nas análises espectrofotométricas utilizando metanol (VETEC e DINÂMICA, São Paulo, Brasil) em triplicata a partir de uma solução inicial de AmB na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Utilizou-se espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu[®], modelo UV-1800 e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico no comprimento de onda 405,4 nm.

Preparo do emulgel

Obteve-se o organogel de Lecitina pela mistura da fase oleosa (LIPS) em uma fase gelificada (Gel de Polaxamer 407[®]), na proporção 30:70, por agitação mecânica. Incorporou-se a AmB a 3% na fase oleosa por agitação manual até solubilização. Quando necessário,

variou-se o teor de AmB em 20%: preparou-se três formulações de AmB nas concentrações 3,2; 4,0 e 4,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que representam as concentrações de 80%, 100% e 120% (m/m), respectivamente. Adicionou-se o promotor de permeação cutânea ácido oléico (OA) a 5% após incorporação de AmB.

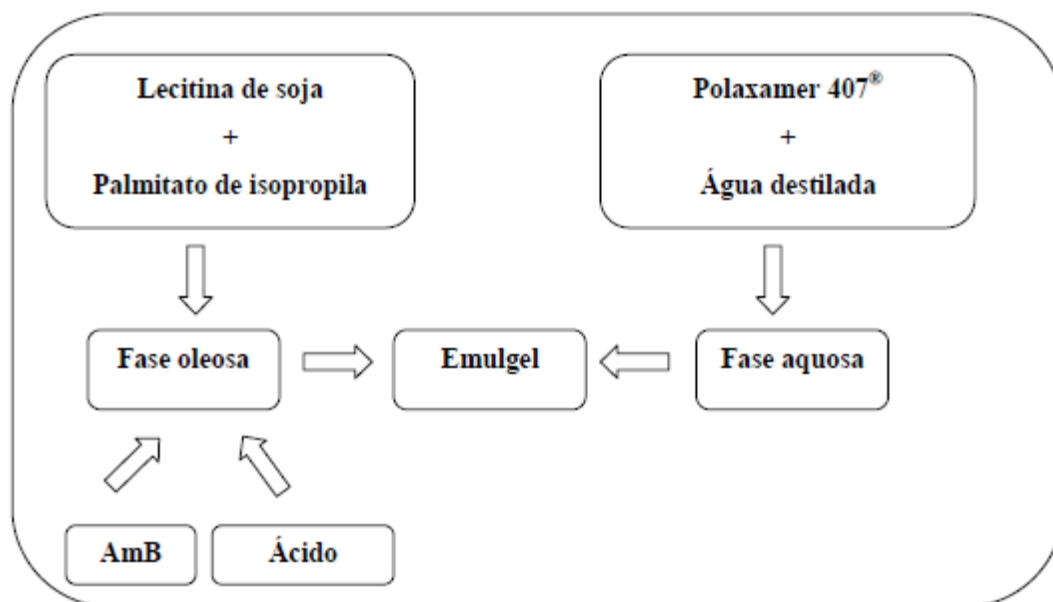


Figura 1. Esquema de preparo do emulgel.

Parâmetros da Espectrofotometria UV/Vis

Especificidade

Verificou-se os ensaios de especificidade na concentração 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando a formulação do placebo, do emulgel de AmB 3% sem promotor e com o promotor químico (ácido oléico 5%) para a verificação de interferentes. Realizou-se os espectros de absorvância na faixa entre 200 e 500 nm e a partir dos dados, construiu-se o gráfico da especificidade.

Linearidade

Utilizou-se a média de três intervalos com repetições autênticas que contemplavam seis concentrações da solução de AmB 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Após relação linear visual, analisou-se os resultados estatisticamente para definir o coeficiente de correlação (mínimo aceitável $r = 0,99$), a equação de regressão linear, o ajuste linear e o desvio padrão relativo (SOBRINHO, 2008). Realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA).

Utilizou-se os valores correspondentes a absorvância no ponto de maior absorção (405,4 nm) 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 sua linearidade no intervalo testado.

Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Utilizou-se as fórmulas propostas na Resolução da ANVISA RE nº899/2003.

$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$	$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$
--------------------------------	---------------------------------

Onde:

- ✓ DP_a = Desvio padrão do intercepto com o eixo Y;
- ✓ IC = Inclinação da curva de calibração.

Precisão

Estabeleceu-se a precisão de repetibilidade (intra-corrída) a partir de alíquotas da AmB para o ponto da curva analítica ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o procedimento foi realizado em sextuplicata, e em seguida foi repetido todo o procedimento. A precisão intermediária (inter-corrída) foi realizada com analistas diferentes em dias diferentes a partir do mesmo procedimento e da concentração citadas acima em sextuplicata. Calculou-se a precisão do método por meio do desvio padrão relativo (DPR) e do coeficiente de variação (CV%), que corresponde ao cálculo do desvio padrão dividido pela concentração média obtida multiplicado por 100.

Exatidão

Formulou-se três amostras de AmB. Pesou-se o emulgel para preparar alíquota de cada amostra. Solubilizou-se as amostras em metanol PA utilizando agitação magnética por trinta minutos. Em triplicata, a solução foi diluída para a obtenção das concentrações 3,2; 4,0 e 4,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que representam as concentrações de 80%, 100% e 120%, respectivamente. Em seguida, realizou-se leitura no equipamento. 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 aplicou-se: alteração da marca do solvente e alteração da agitação (magnética e manual). O resultado deste ensaio foi determinado por meio da percentagem de recuperação e DPR. Para estas análises foram utilizados as alíquotas de AmB em concentrações de 3,2; 4,0 e 4,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata, que representam as concentrações de 80%, 100% e 120%, respectivamente.

Cinética de liberação in vitro

Realizou-se estudo de cinética de liberação *in vitro* utilizando células do tipo Franz. Conectou-se conjunto de seis células de Franz ao banho-maria na temperatura de 37°C. Preencheu-se as células com solução tampão fosfato pH 7,4. Fixou-se membrana sintética de celulose na parte superior das células e aplicou-se amostra das formulações sobre as membranas. Coletou-se amostras de 3 mL nos intervalos de tempo: 0,5; 1; 2; 3; 4 e 6 horas. A cada coleta, repôs-se igual volume do tampão fosfato pH 7,4 no compartimento receptor.

Análises estatísticas

Realizou-se análise estatística dos resultados de validação através do programa Origin 8.0[®] análise de variância simples de uma via (ANOVA) ou através do teste t-Student ($\alpha = 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação analítica por espectrofotometria UV/Vis

Inicialmente, realizou-se levantamento na literatura sobre a solubilidade da anfotericina B. Em seguida, realizou-se teste de solubilidade com diferentes solventes (álcool etílico, álcool metílico, dimetilsulfóxido) de acordo com a USP35. Verificou-se o comportamento do fármaco frente a diferentes solventes para definir o mais adequado ao desenvolvimento do método analítico, levando em consideração o poder de solubilização do fármaco, custo e sensibilidade do fármaco frente ao comprimento de onda utilizado (ALVES *et al.*, 2010). Assim, definiu-se o metanol PA como solvente de escolha, visto atender melhor aos requisitos e não apresentar interferentes.

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda incidente (ROCHA, 2004).

A Especificidade e Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A especificidade e seletividade do método foram demonstradas pela sobreposição dos espectros de soluções preparadas com quantidades apropriadas da matriz (placebo do emulgel) e da matriz contendo quantidade determinada de anfotericina B (emulgel com AmB e emulgel de AmB e OA), obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm (Figura 2).

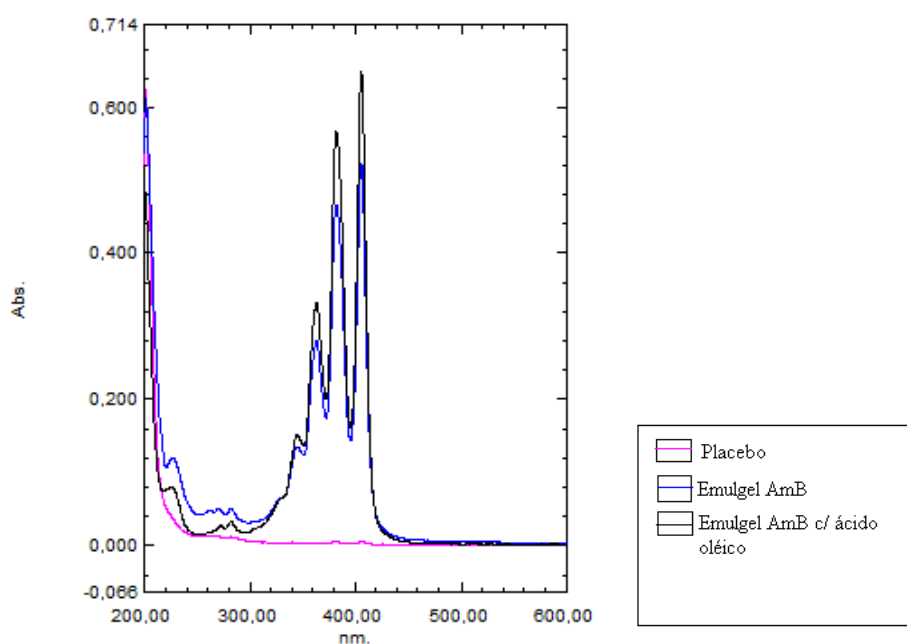


Figura 2. Varreduras realizadas para avaliação da especificidade do método.

O método validado mostrou-se simples e acessível para as determinações. Foi possível verificar que o método analítico é bastante específico, pois não apresentou nenhum interferente nas amostras placebo. De fato, “a Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado” (BRASIL, 2003).

Observando a linearidade, o coeficiente de correlação (r^2) apresentou valor igual a 0,9999, e a equação da reta foi $y = 0,1402x + 0,0083$ (Figura 3), esses resultados demonstram a relação linear na faixa de 1 a 6 $\mu\text{g/mL}$, de acordo com o preconizado na RE 899/2003 (BRASIL, 2003). Por meio do teste analítico ANOVA a curva mostrou-se linear e sem falta de ajuste sendo o valor de F 0,15 e F-crítico 3,26. Os valores dos limites encontrados foram $LD = 0,0397$ e $LQ = 0,0602$.

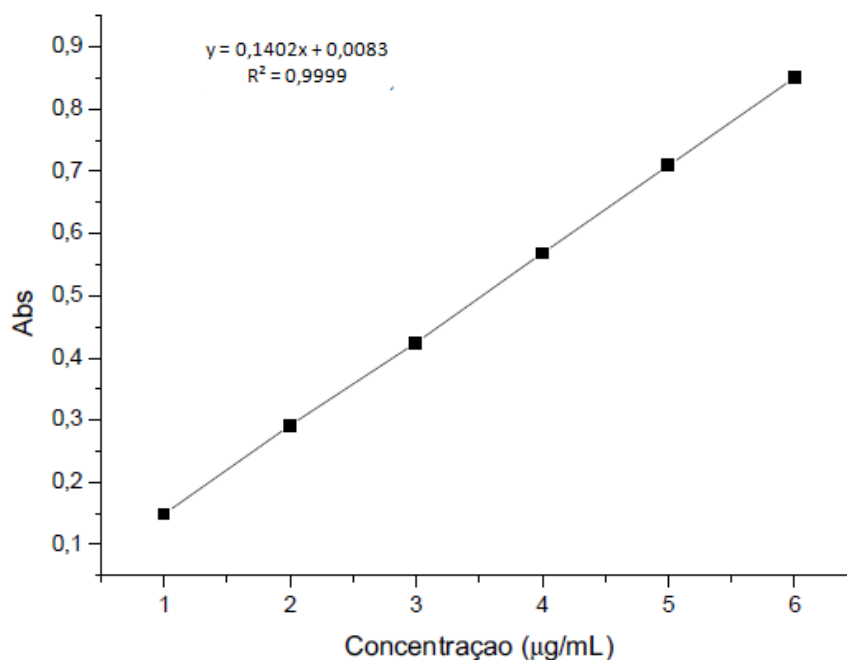


Figura 3: Curva de calibração da AmB por espectrofotometria na região do visível.

A precisão é um importante parâmetro analítico e representa a variação dos resultados em uma série de análises de uma amostra em condições semelhantes ou diferentes de análises. O teste de precisão pode avaliar os critérios de repetibilidade, precisão intermediária e de reprodutibilidade (STRECK, 2011).

A precisão intermediária foi avaliada comparando-se os resultados obtidos entre dois analistas, em dias distintos, no mesmo laboratório. Isso foi realizado a fim de se verificar se no mesmo laboratório o método fornece os mesmos resultados (FAVORETTO, 2010; MOHAMED, 2008). O método mostrou-se preciso, a repetibilidade obteve CV% entre 2,81 e 2,91%, estando de acordo com a resolução RE 899/2003 (BRASIL, 2003), onde diz que o método apresenta repetibilidade se o desvio padrão relativo (ou CV%) for inferior a 5,0%. O estudo da precisão intermediária também atendeu a resolução uma vez que o valor obtido para

o CV% foi entre os valores 1,52 e 2,96% (Tabela 1). A comparação por teste t de Student ($p=0,05$) mostrou não haver diferença significativa nos resultados obtidos pelos dois analistas.

Tabela 1: Precisão da AmB por espectrofotometria no visível.

ENSAIO		CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	MÉDIA (Σ)	DP	CV%
Repetibilidade (n=6)		4,0	3,87	0,11	2,91
Precisão intermediária (n=6)	Analista 1 – 1º Dia	4,0	3,96	0,12	2,96
	Analista 2 – 2º Dia	4,0	3,97	0,06	1,52

Legenda: DP: Desvio padrão; CV – Coeficiente de variação.

Para analisar a exatidão do método, utilizou-se a curva $y = 0,1402x + 0,0083$ com $r^2=0,9999$; a exatidão está dentro dos limites determinados pela RE 899/2003 (BRASIL, 2003) e não mostrou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 2).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). A exatidão do método pode ser expressa como a porcentagem da recuperação de uma quantidade conhecida de fármaco adicionado à amostra. Esta amostra pode ser a forma farmacêutica ou somente o placebo (mistura dos excipientes). O ensaio de exatidão descreve ainda o grau de veracidade dos resultados obtidos da análise quantitativa (STRECK, 2011).

Tabela 2: Exatidão expressa em porcentagem de AmB por espectrofotometria no visível.

CONCENTRAÇÃO TEÓRICA ($\mu\text{g/mL}$)	CONCENTRAÇÃO MÉDIA	
	EXPERIMENTAL ($\mu\text{g/mL}$)	EXATIDÃO %
3,2	3,22	100,61
4,0	4,09	100,19
4,8	4,84	100,85

O método foi considerado robusto e não apresentou diferenças estatisticamente significativas, considerando um intervalo de confiança de 95%, não apresentando grandes variações com a mudança de marca de metanol, Vetec e Dinâmica, (Tabela 3) e também modificando o tipo de agitação, manual e magnética (Tabela 4).

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003).

Tabela 3: Robustez com variação de marca de metanol (Vetec e Dinâmica) por espectrofotometria no visível.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Mudança de marca de metanol			
	Marca A (Σ) (n=3)	CV%	Marca B (Σ) (n=3)	CV%
3,2	3,30	0,80	3,28	0,68
4,0	4,15	4,9	3,97	1,90
4,8	4,89	1,11	4,90	1,23

Legenda: CV – Coeficiente de variação.

Tabela 4: Robustez com mudança da forma de agitação (manual e magnética) por espectrofotometria no visível.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Agitação			
	Manual (Σ) (n=3)	CV%	Magnética (Σ) (n=3)	CV%
3,2	3,23	0,29	3,24	0,29
4,0	4,15	0,19	4,10	1,77
4,8	4,80	0,73	4,81	1,15

Cinética de liberação in vitro

Quando um produto é aplicado topicamente, o fármaco precisa ser liberado do seu veículo antes de entrar em contato com a superfície da epiderme. A velocidade de liberação de um fármaco a partir de determinada formulação depende diretamente das características físico-químicas do veículo e do fármaco. As principais características da formulação que irão comandar essa etapa são a solubilidade do fármaco no veículo, atividade termodinâmica e interação do fármaco com componentes do veículo que irão afetar no seu coeficiente de partição (BEMVINDO, 2006).

A Farmacopéia Americana sugere o uso de sistema de célula de difusão vertical (Vertical Diffusion Cell - VDC), conhecida popularmente por Célula de Franz, como ensaio de desempenho para produtos tópicos (UEDA, 2009).

O ácido oléico (OA) é um ácido mono-insaturado, também conhecido por ômega-9, que é encontrado em várias gorduras animais e vegetais e nas bicamadas de lípidos da pele. Ele tem sido usado como um emulsionante ou agente solubilizante e é um favorecedor da penetração na pele em produtos farmacêuticos. O aumento da permeabilidade da pele pela OA está relacionada com uma perturbação seletiva das bicamadas lipídicas entre as células presentes no estrato córneo (SRISUK, 2012).

No ensaio de cinética de liberação *in vitro* por meio de células de Franz com quantificação realizada por espectrofotometria UV/Vis, observamos que a adição de ácido oléico 5% como promotor químico de liberação melhorou a absorção da AmB através de membranas duplicando a quantidade absorvida no tempo de 6 horas de aplicação em relação a mesma formulação sem o promotor (Figura 4). Foi realizada análise estatística dos perfis de liberação de AmB através do teste t de Student no qual pode-se verificar que os mesmos são significativamente diferentes entre si (Tabela 7).

Esse resultado confirma a literatura que diz que “amplo número de ácidos graxos e seus ésteres tem sido utilizados como promotores de permeação. Uma tendência geral que se tem observado é que os ácidos graxos insaturados são mais efetivos na promoção da absorção percutânea de fármacos que os seus homólogos” (MARTINS, 2002), categoria na qual inclui-se o ácido oléico.

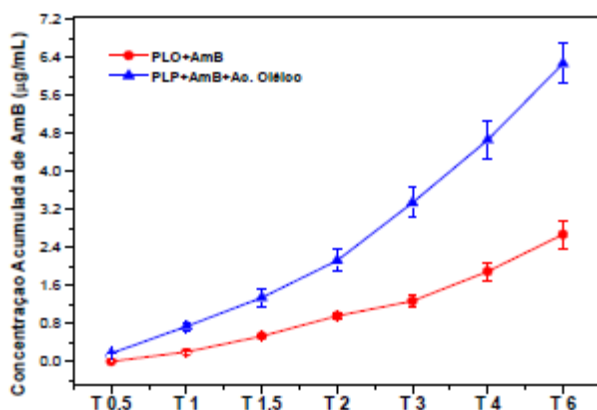


Figura 4. Perfil de cinética de liberação de AmB com e sem promotor de liberação cutânea (ácido oléico).

Nesse método foi possível quantificar a liberação de AmB que, no emulgel de AmB teve fluxo (J) de $0,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$ e no emulgel de AmB e ácido oléico foi de $1,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$.

CONCLUSÃO

Os ensaios realizados evidenciaram que a AmB em emulgel pode ser quantificada por espectrofotometria UV/Vis suprimindo todos os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação preconizados pela Resolução n°899/2003 da ANVISA. Além disso, as amostras derivadas dos estudos de cinética puderam ser quantificadas através do método desenvolvido mostrando que o emulgel de AmB e o ácido oléico é uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

ALVES, L. D. S., *et al.* 2010. **Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no uv-vis.** Química Nova, vol. 33(9), p.1967-1972.

BETETA, B. B. *Desarrollo y caracterización Farmacotécnica y farmacológica de nuevas Formulaciones parenterales de Anfotericina B.* 2002. 243p. Dissertação (Mestrado). Universidad complutense de Madrid.

BEMVINDO, C.S. **Estudo comparativo de liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais.** 2006. 110p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Brasília: ANVISA, 2003.

BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. (2014). **Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116, 351-358.

DISMUKES, W. E. (2000). **Introduction to antifungal drugs.** *Clinical Infectious Diseases*. v.30: 653-657.

FAVORETTO, L. B.; *et al.* 2010. **Validação de método espectrofotométrico na região do UV para quantificação de famotidina em cápsulas.** *Química Nova*.v.33(7), p.1585-1589.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. BRAZ. J. (2006). **Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B.** *Pharmaceutical Sciences*. v.42: 167-194.

GAÏES A, E.; BEN ALIA, R.; TRABELSIA, S.; JEBABLIA, N.; SALOUAGEA, I.; CHARFIA, R. R. F. L.(2013). **Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'amphotéricine B par chromatographie liquide à haute performance.** *Revue francophone des laboratoires*, 449, 67-70.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. 2002. **Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos:uma nova aplicação para as ciclodextrinas.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.v.38 (1), p.33-54.

MOHAMED, A. A. **Kinetic and maximum-absorbance spectrophotometric methods for the determination of olanzapine.** *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* 2008, v.139(9), p.1005-1010.

MRUTYUNJAYA, R. R. **Visible spectrophotometry as a tool for the assay of selected drugs**. Tese (Philosophy in Chemistry) - Andhra University, Visakhapatnam, India, 2008.

RATH, S.; TRIVELLIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. DE; MARZAL, P. C. **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte**. *Química Nova* (2003). v.26: 550-555.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. 2004. **Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria uv-vis**. *Química Nova*, v.27, p.807-812

SRISUK, P.; *et al.* **Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment**. *International Journal of Pharmaceutics*, 427 (2012) 426– 434.

SOBRINHO, T. J. da S. P, *et al.* 2008. **Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.v.44(4), p.683-689.

STRECK, L. et. al. **Validação de método analítico por espectrofotometria uv para sistema emulsionado lipídico contendo benznidazol**. *Química Nova*, Vol. 34, No. 8, 1459-1463, 2011.

UEDA, C.T. *et al.* **Topical and transdermal drug products**. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Pharmacopeial Forum, v.35, p.750 – 764, 2009. In: GOEBEL, K. Estudo de liberação in vitro do diclofenaco dietilamônio em especialidades farmacêuticas. 2012. 97p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. *UNITED STATES PHARMACOPEIA – NATIONAL FORMULARY: USP35 NF30*. Rockville: United States Pharmacopeia, 2011.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. (2011). **Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil**. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*, 16, 39-62.

CAPÍTULO III:

Desenvolvimento tecnológico de emulgel de anfotericina B com promotor químico de liberação cutânea

(Artigo a ser submetido à revista African Journal of Pharmacy and Pharmacology)

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EMULGEL DE ANFOTERICINA B COM PROMOTOR QUÍMICO DE LIBERAÇÃO CUTÂNEA

I. M. PINHEIRO^{1*}, I. P. CARVALHO¹, C. E. S. DE CARVALHO¹, L. M. BRITO¹, A. B. S. DA SILVA¹, A. M. C. JÚNIOR¹, F. A. DE A. CARVALHO¹ and A. L. M. CARVALHO¹

Universidade Federal do Piauí –UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella- Bairro Ininga- Teresina-PI, CEP 64049-550, Brasil

*Corresponding author: Universidade Federal do Piauí –UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella- Bairro Ininga- Teresina-PI, CEP 64049-550, Brasil. Tel: +55 86 32155953. E-mail: ilusasmartins@uol.com.br

RESUMO

A leishmaniose cutânea é uma doença endêmica e negligenciada no mundo. Seu tratamento é realizado preferencialmente com antimonias pentavalentes ou anfotericina B (AmB), como segunda escolha, nos casos de contra-indicação do anterior ou resistência das cepas. A AmB é alvo de pesquisas de aprimoramento farmacêutico, dentre eles a administração tópica. Esse estudo teve como objetivo desenvolver emulgel de AmB com promotor químico de liberação cutânea. Obteve-se emulgel de AmB com ácido oléico, cineol e geraniol. Avaliou-se a estabilidade preliminar e realizou-se estudo de cinética de liberação *in vitro*. O emulgel de AmB apresentou melhor estabilidade físico-química quando associado ao ácido oléico como promotor químico de liberação, indicando que a formulação é promissora para estudos *in vivo* no tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Anfotericina B, promotor liberação, emulgel.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is endemic and neglected disease in the world. The treatment is carried out preferably with pentavalent antimonias or amphotericin B (AmB), as a second choice, in case of contraindication or the previous resistance of the strains. The AmB is the subject of research of pharmaceutical enhancement, including topical administration. This study aimed to develop emulgel of AmB with chemical promoter of skin release. Obtained

emulgel of AmB with oleic acid, cineole and geraniol. Evaluated the preliminary stability and performed *in vitro* release kinetics study. The emulgel of AmB showed better physical and chemical stability when associated with oleic acid as a chemical promoter clearance, indicating that the formulation is promising for *in vivo* studies in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Key-words: Amphotericin B, release promoter, emulgel.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma família de doenças causada por várias espécies do parasita protozoário flagelado do gênero *Leishmania*. É considerada uma das doenças tropicais negligenciadas (DTNs) no mundo. Ela é endêmica e, na forma mais grave, a doença pode causar desfiguração, bem como a morte. Os compostos antimoniais pentavalentes tem sido considerados o tratamento de escolha para a leishmaniose cutânea, mas apresentam muitos efeitos adversos e desvantagens, como por exemplo, são tóxicos, requerem injeção diária, apresentam entre 20-45% de taxa de reincidências e, às vezes, são ineficazes devido ao desenvolvimento de cepas resistentes (Eisa, 2011).

A Anfotericina B (AmB) é um antibiótico natural que pertence ao grupo dos polienos. Esta molécula anfipática tem uma estrutura assimétrica, cíclica com uma cadeia hidrófoba, uma cadeia hidrofílica e um açúcar do grupo amina, possui um perfil de solubilidade muito limitado, sendo quase completamente insolúvel em água. A AmB é alvo de pesquisas de aprimoramento farmacêutico e mesmo diante de sua alta atividade a sua administração provoca o surgimento de vários efeitos indesejados. Além disso, sua veiculação em formulações à base de lipídios pode reduzir a toxicidade comparando com a forma convencional e permite assim, que doses mais elevadas sejam administradas (Wasan, 2009; Pham, 2013).

De acordo com Silva, J. *et al.* (2009) “a administração tópica oferece muitas vantagens como a ausência de efeito de primeira passagem, indolor e possuir facilidade de aplicação. Todavia, uma eficácia tópica só é obtida a partir de fármacos potentes com adequado grau de penetração na pele. Isto tem levado a um crescente interesse pela utilização de promotores de permeação em formulações tópicas, assim como o uso de sistemas de liberação de fármacos com esta capacidade promotora de permeação”.

A eficácia clínica de um fármaco aplicado por via tópica depende, não só das suas propriedades farmacológicas, mas também da sua disponibilidade no local de ação. Geralmente, os tensoativos (como lecitina de soja) são adicionados às formulações para solubilizar ingredientes lipofílicos ativos e deste modo conseguem solubilizar lipídios dentro do estrato córneo (Chorilli, 2007). Esse estudo teve como objetivo desenvolver emulgel de anfotericina B com promotor químico de permeação cutânea.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

A forma farmacêutica de emulgel foi preparada utilizando lecitina de soja, palmitato de isopropila e miristato de isopropila (EMBRAFARMA, São Paulo, Brasil), polaxamer 407[®] (GALENA, São Paulo, Brasil), desoxicolato de anfotericina B (VALDEQUÍMICA, São Paulo, Brasil), ácido oléico (CRISTÁLIA, Brasil), cineol e geraniol (SIGMA-ALDRICH).

Obtenção de emulgel de anfotericina B

Para a obtenção do emulgel de anfotericina B pesou-se o Polaxamer 407[®] e colocou-o para intumescer sob refrigeração por 24 horas (*over night*). Na sequência, pesou-se os componentes necessários a cada fase oleosa e deixou-se em repouso a temperatura ambiente por 24 horas. A incorporação da anfotericina B aconteceu quando concluída a total solubilização do fármaco na fase oleosa e, por último, a adição da fase aquosa. Após 24 horas do preparo das formulações, observou-se macroscopicamente a homogeneização e estabilização das formulações (Figura 1).

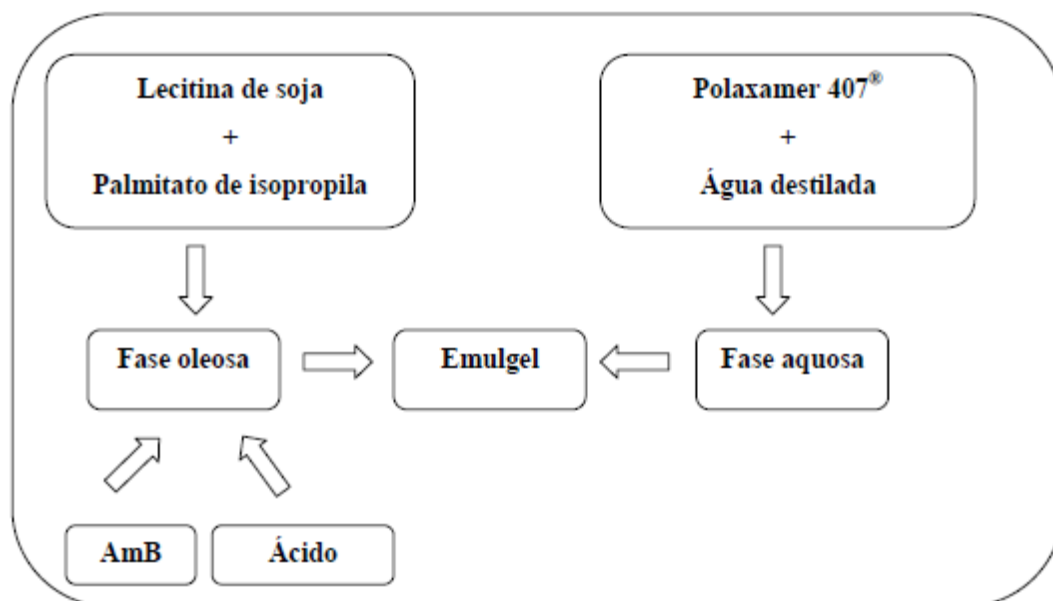


Figura 1. Esquema de preparo do emulgel de AmB com ácido oléico.

Preparou-se diversas formulações de emulgel de AmB num planejamento quantitativo e qualitativo de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Planejamento quantitativo e qualitativo das formulações de emulgel de AmB na presença ou ausência de promotor químico de permeação cutânea.

Componentes	Formulações							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Lecitina de soja + palmitato de isopropila	30%	30%	30%	30%				
Lecitina de soja + miristato de isopropila					30%	30%	30%	30%
Ácido oléico	5%				5%			
Cineol		5%				5%		
Geraniol			5%				5%	
Anfotericina B	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
Gel Polaxamer 20% qsp	62%	62%	62%	62%	62%	62%	62%	62%

Avaliação da estabilidade preliminar e estudo de cinética de liberação in vitro

Inicialmente, submeteu-se as amostras ao teste de centrifugação (3.000 rpm/30 min), utilizando 1 g de amostra. Em seguida, realizou-se avaliação da estabilidade preliminar das amostras-teste, a fim de verificar previamente o comportamento da formulação mediante variações extremas de temperatura, com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus

componentes, como preconiza o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004). Para isso, submeteu-se 8 amostras a 6 ciclos de 24 h a $45 \pm 2^\circ\text{C}$, e 24 h a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 dias. Antes e após os ciclos as formulações foram analisadas quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH, espalhabilidade, viscosidade, condutividade, teor, análise microscópica e estudo de cinética de liberação *in vitro* utilizando células do tipo Franz (Parsaee, 2002; Jain, 2011).

Realizou-se estudo de cinética de liberação *in vitro* utilizando células do tipo Franz. Conectou-se células de Franz ao banho-maria na temperatura de 37°C . Fixou-se as células sobre agitadores magnéticos. Preencheu-se as células com solução tampão fosfato pH 7,4. Fixou-se membrana sintética de celulose na parte superior das células e aplicou-se amostra (0,3 g) das formulações sobre as membranas. Coletou-se amostras de 3 mL nos intervalos de tempo: 0,5; 1; 2; 3; 4 e 6 horas. A cada coleta, repôs-se igual volume do tampão fosfato pH 7,4 no compartimento receptor. Procedeu-se ao ensaio em triplicata para cada formulação.

No estudo de cinética de liberação *in vitro*, quantificou-se a AmB por meio de método analítico por espectrofotometria UV/Vis previamente validado.

Análise estatística

Na análise estatística dos resultados obtidos na avaliação físico-química das formulações, utilizou-se o software OriginPro8.0[®] e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para concentração múltipla dos dados paramétricos utilizou-se a análise de variância de amostras pareadas seguida pelo teste t de Student. A análise de significância foi considerada quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de emulgel de anfotericina B

As formulações foram produzidas em escala de bancada e mostraram-se de cor amarelada, brilhosa e com sensorial viscoso de forma farmacêutica tipo emulgel. Após 24 horas do preparo das formulações, a análise macroscópica não evidenciou nenhuma alteração das características organolépticas. Todas as formulações apresentavam-se homogêneas, de cor amarela e odor característico, sendo encaminhadas para os testes de estabilidade preliminar.

Emulgel são emulsões do tipo água em óleo ou óleo em água que são gelificadas pela mistura de um agente de gelificação. É um veículo estável para fármacos hidrofóbicos;

apresenta uma elevada aceitabilidade pelos pacientes visto que possui as vantagens do gel e da emulsão, como ser tixotrópico, facilmente removível e emoliente (Jain *et al.*, 2010).

Estabilidade preliminar

O ensaio de estabilidade representa uma fase fundamental e crucial no desenvolvimento e avaliação de medicamentos, pois a instabilidade de uma formulação ou preparação farmacêutica modifica requisitos essenciais como a qualidade, segurança e eficácia (Silva *et al.*, 2009; Khunt, 2012). Por isso, o teste de estabilidade preliminar teve importância ao direcionar o desenvolvimento da formulação, a qual foi submetida a condições extremas de temperatura e centrifugação visando acelerar possíveis processos de instabilidade na formulação.

O primeiro teste realizado para avaliação da estabilidade preliminar das formulações com caráter eliminatório foi o de centrifugação. Após as formulações de emulgel terem sido submetidas à força centrífuga para acelerar possíveis processos de instabilidade, não se observou a ocorrência de desestruturação da cadeia polimérica do emulgel, ou seja, todas as formulações foram aprovadas no teste de centrifugação.

No entanto, a não ocorrência de sinais de instabilidade no emulgel não assegura sua estabilidade, mas somente indica que o produto poderia ser submetido, sem necessidade de reformulação, a outras condições de tensão, como o ciclo gelo-degelo (Isaac *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008).

Depois das amostras terem sido submetidas ao teste de ciclo gelo-degelo e a uma força centrífuga de 3000 rpm por 30 min, as formulações F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8 apresentaram sinais macroscópicos de instabilidade, ou seja, o ensaio de ciclo gelo-degelo provocou a desestruturação da cadeia polimérica do emulgel nessas formulações.

Os valores de pH obtidos por potenciometria direta das amostras de emulgel antes e depois do ciclo gelo-degelo estão representados graficamente na Figura 2. Não houve variação significativa de pH na formulação F1, o que indica uma compatibilidade inicial dos componentes da formulação. O pH da pele apresenta-se levemente ácido podendo variar entre 4,6 e 5,8 (Gonçalves *et al.*, 2009; Baibhay, 2012). Todas as formulações apresentaram valores de pH compatível com o pH da pele e não produziria qualquer irritação, mostrando-se promissoras para uso tópico (Figura 2).

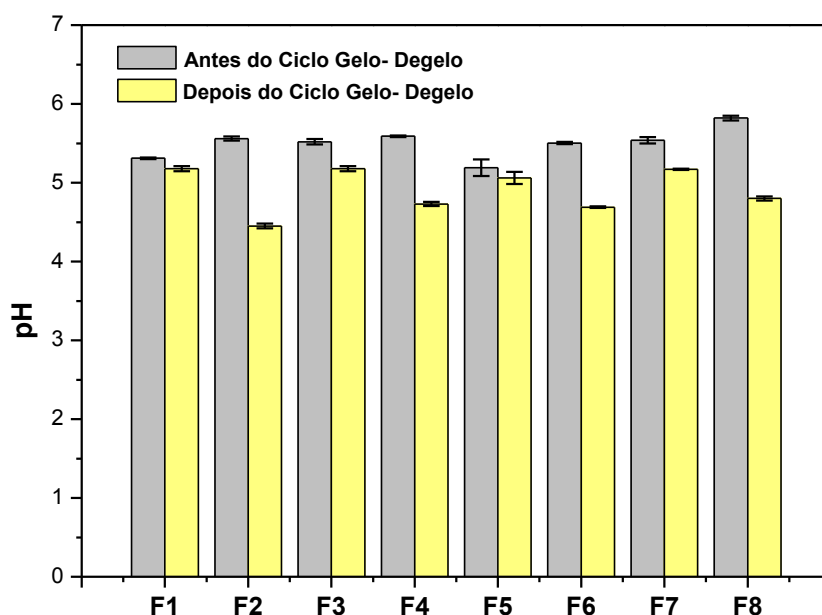


Figura 2: Gráfico da determinação do pH das formulações antes e depois do ciclo gelo-degelo.

A viscosidade da formulação é outro fator que afeta a liberação do fármaco, uma vez que pode reduzir a velocidade de difusão do mesmo, ou seja, verifica-se que há uma proporcionalidade inversa entre a viscosidade e a velocidade de liberação. Quanto maior a viscosidade, menor a difusão do fármaco (Yener, 2009). De acordo com as Figuras 3 e 4, observamos que as viscosidades das formulações reduzem à medida que aumenta a velocidade de rotação do equipamento. Isso é característico de sistemas não-newtonianos.

Segundo Lahoud (2010), para que um corpo flua deve-se realizar sobre ele uma força denominada força de cisalhamento, que gerará um gradiente de deformação. Esta é dependente da resistência interna da substância, ou seja, de sua viscosidade. De acordo com a viscosidade, podemos dividir os fluidos em duas classes (de acordo com suas propriedades de fluidez e deformação): newtonianos e não-newtonianos. Para os fluidos newtonianos o valor da viscosidade será constante, independente da velocidade (ou da tensão) de cisalhamento. Quanto aos fluidos não-newtonianos, a viscosidade varia, pois depende de vários fatores como estrutura da substância e tempo de repouso.

Após o ciclo gelo-degelo, observou-se que a viscosidade aumentou para as formulações. De acordo com Leonardi *et al* (2000), o aumento da viscosidade apresentado pode ser decorrente da evaporação da água das formulações.

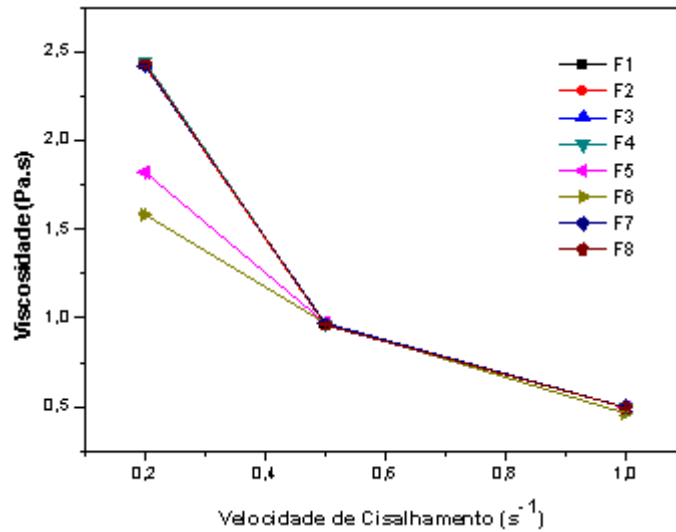


Figura 3: Gráfico da determinação da viscosidade das formulações antes do ciclo gelo-degelo.

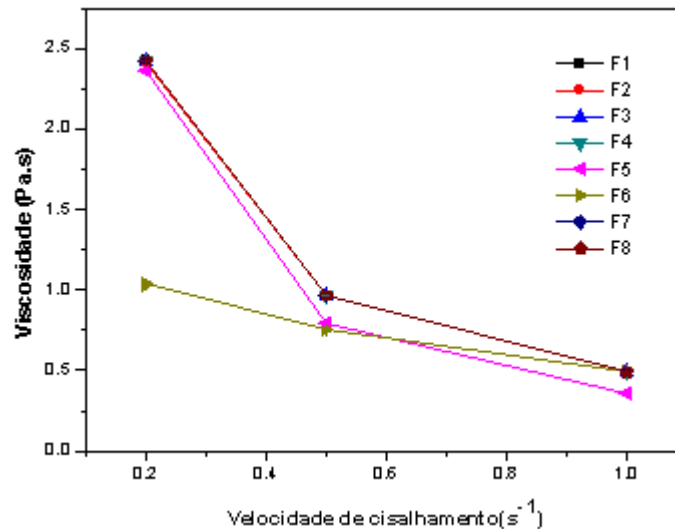


Figura 4: Gráfico da determinação da viscosidade das formulações depois do ciclo gelo-degelo.

De acordo com Silva Junior (2009), “preparações semisólidas sofrem fortes influências quanto ao espalhamento e a aderência na pele, extrusão das embalagens e liberação de princípios ativos”.

O teste de espalhabilidade determina modificações na área de abrangência do produto, podendo facilitar ou dificultar a aplicação do mesmo (Cordeiro, 2013). Os testes de espalhabilidade realizados mostraram que a relação entre as áreas e o esforço-limite dos emulgel preparados foram estatisticamente iguais. Isso confirma os resultados observados nos ensaios de viscosidade.

Ao observarmos a Figura 5, é evidente que na formulação F5 ocorre a maior mudança de comportamento evidenciando sua instabilidade. Os dados referentes à espalhabilidade são

importantes, pois se a formulação produzida tiver melhores características, ela poderá ser utilizada de maneira mais agradável no momento de sua aplicação sobre a pele lesada e em menor quantidade, levando a uma redução do consumo dessa preparação com a mesma eficácia terapêutica.

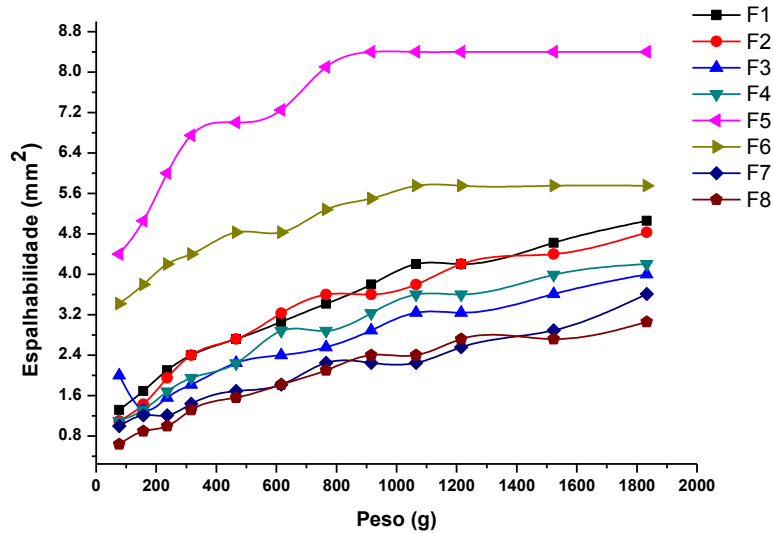


Figura 5: Gráfico da determinação da espalhabilidade das formulações antes do ciclo gelo-degelo.

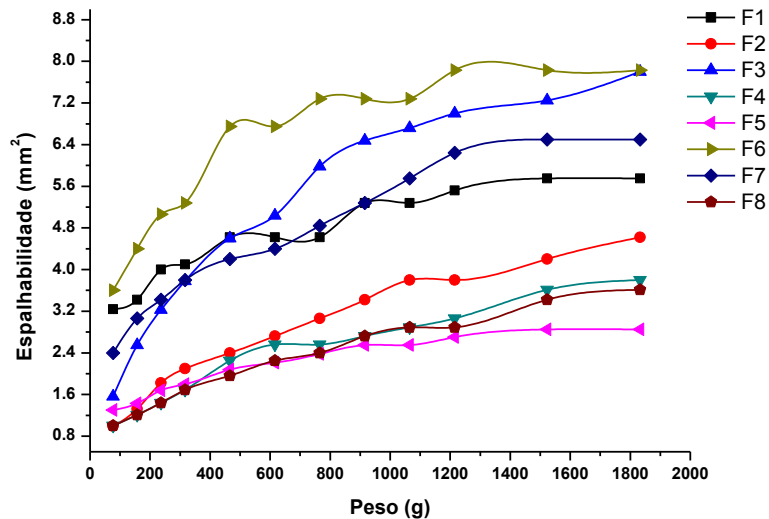


Figura 6: Gráfico da determinação da espalhabilidade das formulações depois do ciclo gelo-degelo.

Todas as formulações apresentaram-se satisfatórias quanto à variância da condutividade com exceção da formulação F7 que apresentou alteração de condutividade

elétrica no ciclo gelo-degelo, desqualificando-a para uso visto que grande alteração de condutividade elétrica relaciona-se a instabilidade física da formulação (Figura 7).

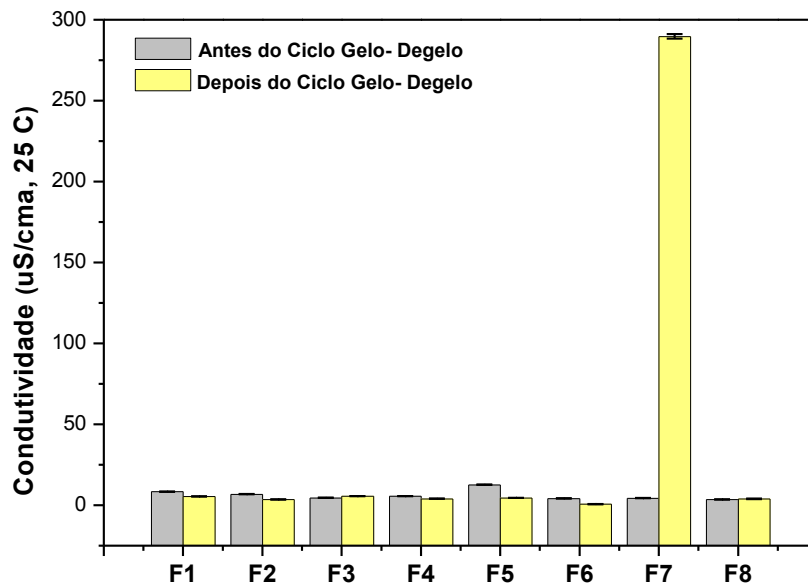


Figura 7: Gráfico da determinação da condutividade das formulações antes e depois do ciclo gelo-degelo.

De acordo com a Figura 8, observa-se que, quanto ao teor, somente a formulação F5 apresentou variação significativa após ciclo gelo-degelo para $p < 0,05$. De fato, era visível a separação de fases nessa formulação após o ciclo gelo-degelo e mesmo após agitação com bastão de vidro para em seguida pesar-se amostra para realizar análise do teor, a mesma ainda apresentava-se heterogênea macroscopicamente.

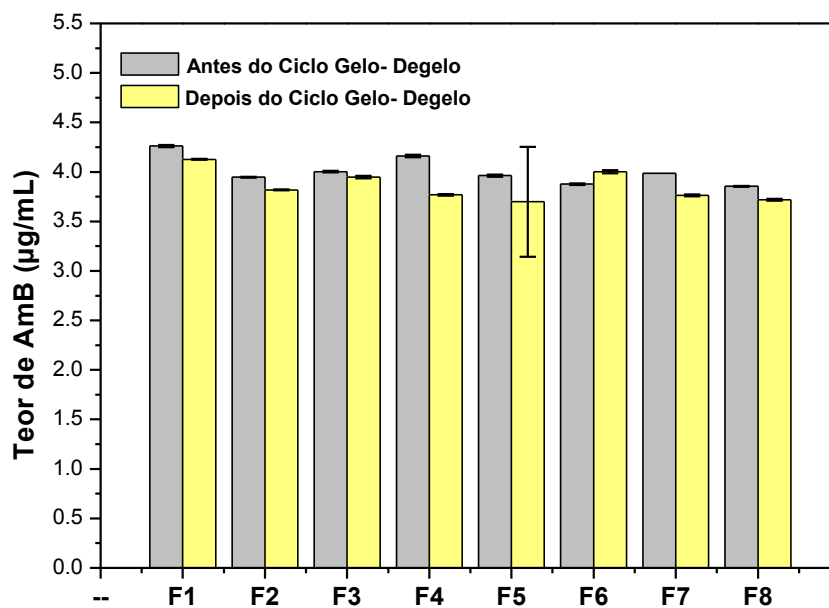


Figura 8: Gráfico da determinação do Teor de AmB das formulações antes e depois do ciclo gelo-degelo.

De acordo com a Figura 9, observa-se que a Formulação F1 apresentou número de gotículas distribuídos de maneira equilibrada em dois tamanhos de gotículas (0 a 5 μm e 5 a 10 μm); para a formulação de emulgel de AmB sem promotor químico de liberação, as gotículas estão distribuídas em dois tamanhos, mas não segue um padrão de equilíbrio na distribuição, ocorrendo quase o dobro da quantidade de gotículas no tamanho 0 a 5 μm em relação à quantidade de gotículas com tamanho 5 a 10 μm . Por último, na análise do placebo, observa-se que a maioria das gotículas encontra-se no tamanho 0 a 5 μm e uma pequena quantidade no tamanho 5 a 10 μm .

A caracterização do diâmetro de gotícula tem sido utilizada na investigação da estabilidade física. Fenômenos de instabilidade de sistemas emulsionados como agregação, floculação e coalescência podem ser acompanhados através da evolução do diâmetro médio, bem como da distribuição do tamanho de gotícula (Fronza, 2004).

De fato, o tamanho de gotícula constitui um dos parâmetros importantes na avaliação da estabilidade física da formulação, uma vez que os fenômenos como floculação e coalescência podem ser monitorados pela evolução do diâmetro médio bem como pela distribuição deste (Billany, 2005; Fronza, 2004). A incorporação de fármacos pode influenciar o diâmetro e a distribuição das gotículas (Marcato, 2009).

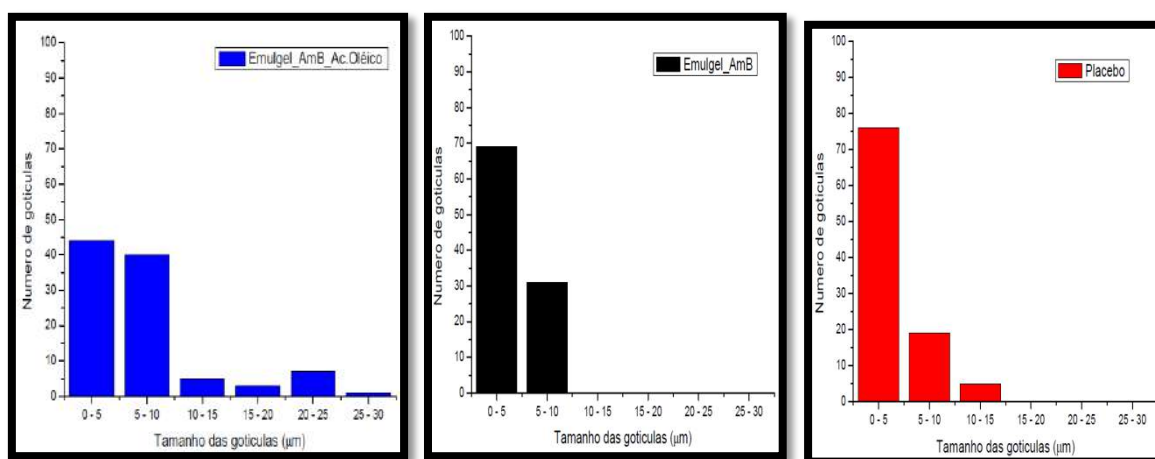


Figura 9: Distribuição do tamanho de gotículas (μm) pelo número de gotículas observada para as formulações de emulgel de AmB na presença ou ausência de promotor químico de permeação cutânea.

Dentre os ensaios realizados, a cinética de liberação *in vitro* por meio de células de Franz foram que trouxeram os resultados mais interessantes. A adição de cineol a 5% como promotor de permeação apresentou a melhor liberação da AmB através de membranas no

tempo de 6 horas de aplicação (Figura 10), visto que a quantidade acumulada (Q_{6h}) foi de 6,78 (Tabela 2). Porém, essa formulação não foi aprovada após o ciclo gelo-degelo, visto que apresentou separação de fases como sinal de instabilidade farmacotécnica.

Assim, a segunda formulação com melhor desempenho, ou seja, a formulação contendo ácido oléico a 5% apresentou-se estável após o ciclo gelo-degelo. De fato, a “administração transdérmica de fármacos é uma alternativa atraente para a administração de sistemas terapêuticos em relação a técnicas convencionais. Um desafio na concepção de sistemas de administração transdérmica de drogas é o de ultrapassar a barreira natural de transporte na pele (Karande, 2009).

Terpenos são uma escolha popular para potenciadores de permeação em estudos de distribuição transdérmica de fármacos. O efeito de um terpeno específico na pele depende de suas exatas propriedades físico-químicas, em particular a sua lipofilicidade. Em geral, os terpenos menores, com grupos não polares são melhores intensificadores da permeação da pele (Karande, 2009), como é o caso do ácido oléico.

O ácido oléico é um potencializador de permeação pois induz, reversivelmente, um temporário aumento da permeabilidade da pele. Estudos relatam sua ação a partir de 1% de concentração (Meenaksh, 2013).

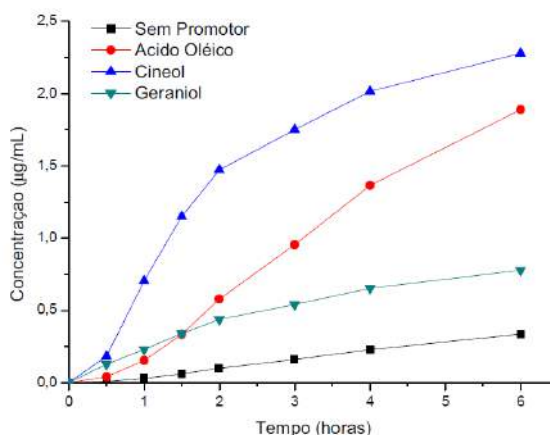


Figura 10: Gráfico da cinética de liberação de emulgel de anfotericina B com os diferentes promotores de permeação (ácido oléico, cineol e geraniol).

A utilização dos ensaios de liberação de fármacos *in vitro* tem assumido importância crescente, uma vez que permite o controle da produção e do produto acabado e valida alterações efetuadas no produto, após comercialização, bem como modificações introduzidas durante os processos de aumento de escala de produção. Os estudos de liberação são igualmente de fundamental importância para determinação do comportamento do fármaco em

relação ao veículo e ao sistema no qual se encontra incorporado, permitindo verificar, inclusive, a existência de interação entre o ativo e os componentes da formulação (Mendonça, 2009).

Os resultados de fluxos a partir dos ensaios de liberação para as formulações com ácido oléico, cineol e geraniol foram, respectivamente, 0,304, 0,100 e 0,045 $\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$ (Tabela 2). Esses resultados demonstram que a liberação é três vezes maior quando utiliza-se o ácido oléico como promotor químico de liberação.

Diante dos parâmetros analisados, observou-se que as formulações apresentam perfis de liberação diferentes, sendo que a formulação contendo cineol como promotor químico de liberação apresentou maior quantidade liberada. No entanto, essa formulação apresentou separação de fases após ciclo gelo-degelo, fato que a exclui de continuar em nossos estudos.

Segundo Loch (2011), os produtos tixotrópicos tendem a ter maior vida de prateleira, pois durante o armazenamento estes apresentam viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação. Além disso, se deformam durante a aplicação, tornam-se mais fluidas facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade no momento em que se encerra a aplicação. A formulação F1, que contém ácido oléico como promotor químico, apresentou-se com características indicando melhor estabilidade físico-química.

Tabela 2: Parâmetros de liberação para diferentes promotores químicos.

Promotor químico	Fluxo($\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$)	Q_{6h}	r^2
Ácido oléico	0,304	5.62	0.9854
Cineol	0,100	6.78	0.9627
Geraniol	0,045	2.31	0,9741

Legenda: Q_{6h} : quantidade acumulada em 6 horas; r^2 : coeficiente de correlação.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados dos testes realizados, notou-se que na análise de condutividade realizada antes e após ciclo gelo-degelo, houve diferença significativa na formulação contendo geraniol. Em análise macroscópica, as formulações contendo cineol ou geraniol apresentaram separação de fases após o ciclo gelo-degelo, indicando instabilidade farmacotécnica. Assim, a formulação de emulgel de anfotericina B apresenta melhor estabilidade físico-química quando associado ao ácido oléico como promotor químico de liberação sendo promissora para estudos *in vivo* no tratamento da leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Brasília: ANVISA, 2004.v.1. 52p.

Baibhay, J.; Gurpreet, S.; Rana A. C.; Seema, S. (2012). Development and Characterization of Clarithromycin Emulgel for topical delivery. *International Journal of Drug Development & Research*, **4**, 310-323.

Mendonça, C. C. et al. (2009). Emulsões O/A contendo cetoconazol 2%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação *in vitro*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **30**, 35-46.

Billany, G. (2005). Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Editora Artmed 2ed. p. 353-356.

Chorilli, M, Brizante1, A. C., Rodrigues, C. A. and Salgado, H. R. N. (2007). Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Farmácia*, **88**, 7-13.

Cordeiro, M. S. F.; Costa, J. K. B.; Lima, C. G.; Campelo Junior, J. D. C.; Melo, A. F. M. (2013). Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). *Revista Brasileira de Farmácia* **94**, 148-153.

Eissa, M. M., Amer, E. I., Sawy, S. M. F. El. (2011). Leishmania major: activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, **128**, 382-390.

Fronza, T., Campos, A. and Teixeira, H. (2004). Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, **23**, 558-566.

Gonçalves, G.M.S., Campos, P.M.B.G.M. (2009). Aplicação de métodos de biofísica no estudo de eficácia de produtos desmocosméticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **45**, 1-10.

Isaac, V. L. B., Cefali, L. C., Chiari, B. G., Oliveira, C. C. L. G., Salgado, H. R. N. and Corrêa, M. A. (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **29**, 81-96.

Jain, A. et al. (2010). Development and characterization of ketoconazole emulgel for topical drug delivery. *Der Pharmacia Sinica*, **1**, 221-231.

Jain A, Deveda P, Vyas N, Chuhan J, Khambete H, Jain S. (2011). Development of antifungal emulsion based gel for topical fungal infection(s). *Int J Pharm Res Devp*, **2**, 18-22.

Khunt, D. M.; Mishra, A. D.; Shah, D. R. (2012). Formulation Design & Development of Piroxicam Emulgel. *International Journal of PharmTech Research*, **4**, 1332-1344.

Lahoud, M. H.; Campos, R. (2010). Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. *Visão Acadêmica*, **11**, 65-73.

Leonardi, G.R.; beraldi, P.; Freitas, P.C.D.; Campos, P.M.M. Produto de uso tópico com Aloe vera. *Cosmet. Toiletries*, v.12, n.5, p.44-53, 2000. In: PIANOVSKI, Aline Rocha *et al* . Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 44, n. 2, Jun. 2008.

Lima, C. G., Vilela, A. F. G., Da Silva, A. A. S., Piannovski, A. R., Silva, K. K., Carvalho, V. F. M., De Muis, C. R.; Machado, S. R. P. and Ferrari, M. (2008). Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). *Revista Brasileira de Farmácia*, **89**, 239-245.

Loch, C. R.; De Marco, M. G.; Schwedersky, M. B.; Haas, S. E. (2011). Avaliação físico-química e determinação do comportamento reológico de emulsões de cetozonazol 2% comercializados em farmácias magistrais no município de Erechim/RS. *Revista Brasileira de Farmácia* **92**, 299-305.

Marcato, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p.01-37, 2009.

Meenaksh, D. Emulgel: a novel approach to topical drug delivery. (2013). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **4**, 847-856.

Parsaee, S; Sarbolouki, M. N.; Parnianpour, M. (2002). In vitro release of Diclofenac diethylammonium from lipid-based formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, **241**, 185-190. doi: 10.1016/S0378-5173(02)00238-7.

Pham, T. T., Barratt, G., Michel, J. P., Loiseau, P. M. and Saint-Pierre-Chazalet, M. (2013). Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B – miltefosine-loaded nanocochleates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **106**, 224-233. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.041.

Silva, J. A., De Santana, D. P., Bedor, D. G. C., Borba, V. F. da C., Lira, A. A. M. and Do Egito, E. S. T. (2009) Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Química Nova*, **32**, 1389-1393.

Silva, K. E. R.; Alves, L. D. S.; Soares, M. F. R.; Passos, R. C. S.; Faria, A. R.; Rolim Neto, P. J. (2009). Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **30**, 129-135.

Wasan, E. K., Bartlett, K., Gershkovich, P., Sivak, O., Banno, B., Wong, Z., Gagnon, J., Gates, B., Leon, C. G.; Wasan K. M. (2009). 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*. *International Journal of Pharmaceutics*, **372**, 76-84. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.01.003.

Yener, G., Dal, O. and Üner, M. (2009). Effect of Vehicles on Release of Meloxicam from Various Topical Formulations. *The Open Drug Delivery Journal*, **3**, 19-23. doi:10.2174/1874126600903010019.

CAPÍTULO IV:

Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* de emulgel de anfotericina B: uma alternativa para o tratamento da leishmaniose cutânea

(Artigo submetido à revista Parasitology Today)

AValiação DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VIVO* DE EMULGEL DE ANFOTERICINA B: UMA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

I. M. PINHEIRO^{1*}, I. P. CARVALHO¹, C. E. S. DE CARVALHO¹, L. M. BRITO¹, A. B. S. DA SILVA¹, A. M. C. JÚNIOR¹, F. A. DE A. CARVALHO¹ and A. L. M. CARVALHO¹

Universidade Federal do Piauí –UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella- Bairro Ininga- Teresina-PI, CEP 64049-550, Brasil

*Corresponding author: Universidade Federal do Piauí –UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella- Bairro Ininga- Teresina-PI, CEP 64049-550, Brasil. Tel: +55 86 32155953. E-mail: iluskasmartins@uol.com.br

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa que pode ser fatal quando negligenciada. A falta de responsividade para antimoniais fez a anfotericina B ser utilizada como medicamento alternativo. Entretanto, os tratamentos atuais são limitados, fato que tem levado a um crescente interesse em desenvolver novas alternativas terapêuticas. O presente estudo objetiva avaliar o potencial terapêutico *in vivo* de emulgel de anfotericina B 3% com ácido oléico 5% como promotor de penetração química no tratamento da leishmaniose cutânea em modelo experimental. Utilizou-se cepas de *Leishmania major* MHOM/IL/80/Friendlin de *Leishmania major*. Os animais foram inoculados pela via subcutânea. Após desenvolvimento das lesões leishmanióticas, nodulares ou ulcerativas, foram divididos em três grupos (Controle, Grupo A e Grupo B) e tratados duas vezes ao dia, durante doze dias. Mensurou-se o peso dos animais e observou-se o tamanho das lesões. Realizou-se análise histopatológica de fragmentos de pele lesões e do baço nos animais tratados com os diferentes regimes (Controle, Emulgel de AmB 3% e emulgel de anfotericina B 3% com ácido oléico 5%). Observou-se que quando submetidos ao tratamento com emulgel de AmB 3%, no período do estudo, tanto formulação com promotor como sem promotor, as lesões ulcerativas regridem gradativamente ou até completa cura. Realizou-se a quantificação do número médio de parasitos recuperados no sítio da inoculação após o tratamento para cada grupo e as diferenças foram consideradas significativas. Na análise histopatológica de todos os animais, independente do regime de tratamento, observou-se muitos elementos celulares destruídos e lesão inflamatória crônica na derme profunda; a diferença está na intensidade desses achados

e no tempo decorrido da doença. Os animais submetidos ao tratamento com emulgel de AmB e ácido oléico 5% como promotor de penetração cutânea apresentaram melhor resposta terapêutica *in vivo*. Isso evidencia que a formulação apresenta boas perspectivas para terapia da leishmaniose cutânea indicando ser uma alternativa terapêutica.

Palavras-chave: Anfotericina B, promotor liberação, emulgel, leishmania.

ABSTRACT

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is an infectious disease that can be fatal when neglected. The lack of responsiveness antimonial made to amphotericin B is used as an alternative medicine. However, current treatments are limited, a fact that has led to a growing interest in developing new therapies. This study aims to evaluate the therapeutic potential *in vivo* emulgel amphotericin B 3% to 5% oleic acid as a chemical penetration enhancer for the treatment of cutaneous leishmaniasis in an experimental model. Was used strains of *Leishmania major* MHOM/IL/80/Friendlin *Leishmania major*. The animals were inoculated subcutaneously. After development of leishmanial, nodular or ulcerative lesions were divided into three groups (control, Group A and Group B) were treated twice daily for twelve days. Measured the weight of the animals and noted the size of the lesions. Histopathology was performed fragments skin lesions and spleen of animals treated with the different schemes (Control AmB Emulgel of 3% emulgel amphotericin B and 3% 5% oleic acid). It was observed that when subjected to treatment with AmB emulgel of 3% during the study period, both formulation as promoter without promoter, ulcerative lesions regress or gradually till complete cure. Was performed to quantify the average number of parasites recovered from the inoculation site after treatment for each group and differences were considered significant. Histopathology of all animals, regardless of treatment regimen, there are many destroyed cellular elements and chronic inflammatory lesions in the deep dermis; the difference is in the intensity of these findings and the time of the disease. The animals submitted to treatment with emulgel of AmB and 5% oleic acid as penetration promoter showed better therapeutic response *in vivo*. This shows that the formulation has good prospects for cutaneous leishmaniasis therapy indicating that an alternative therapy.

Key-words: Amphotericin B, release promoter, emulgel, leishmania.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Compreende uma grande espectro de

doenças que vão desde lesão localizada à leishmaniose mucocutânea desfigurante, o que pode ser fatal quando negligenciada (Medeiros, 2011; Machado, 2012; Guimarães, 2013). Na última década, a falta de responsividade para antimoniais, a primeira linha de tratamento, aumentou substancialmente, principalmente em áreas endêmicas, como a Índia (Medeiros, 2011; Machado, 2012; Guimarães, 2013).

Ainda não existe uma vacina eficaz e a primeira linha de tratamento são os compostos antimoniais pentavalentes. Dentre alternativas tem-se o antibiótico poliênico anfotericina B, porém, ambas são caras e exigem administração por via endovenosa. (Mohammadzadeh, 2013; Leprohon, 2014; Brotherton, 2014). Porém, os tratamentos atuais são limitados, têm o potencial para desenvolver resistência, são caros, são de longa duração e possuem elevada toxicidade (Medeiros, 2011; Machado, 2012; Guimarães, 2013).

Tem havido grandes esforços para desenvolver novas formulações com anfotericina B para substituir aquelas baseadas em formulações lipídicas, mas ainda não existe, na clínica, sistema de entrega não lipídico para anfotericina B (Carvalho, 2013; Leprohon, 2014).

Uma formulação para administração tópica seria interessante, pois oferece muitas vantagens como a ausência de efeito de primeira passagem, é indolor e possui facilidade de aplicação. Além disso, a formulação tópica pode ser usada para manipular a função de barreira da pele, favorecendo, por exemplo, a absorção de antibióticos por via tópica como alternativa à via parenteral (Silva, 2009; Panwar, 2011).

Porém, para obter-se eficácia tópica é necessário adequado grau de penetração na pele e isso é conseguido com a utilização de promotores de penetração em formulações tópicas, assim como o uso de sistemas de liberação de fármacos com esta capacidade promotora de permeação (Silva, 2009).

Assim, o presente estudo objetiva avaliar o potencial terapêutico *in vivo* de emulgel de anfotericina B 3% com ácido oléico 5% como promotor de penetração química no tratamento da leishmaniose cutânea em modelo experimental. Essa formulação foi desenvolvida em outro trabalho e apresentou-se promissora em todos os ensaios de controle de qualidade preliminares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo do emulgel

Para a obtenção do emulgel de anfotericina B pesou-se o Polaxamer 407[®] e colocou-o para intumescer sob refrigeração por 24 horas (*over night*). Na sequência, pesou-se os componentes necessários a cada fase oleosa e deixou-se em repouso a temperatura ambiente

por 24 horas. A incorporação da anfotericina B aconteceu quando concluída a total solubilização do fármaco na fase oleosa e, por último, a adição da fase aquosa. Após 24 horas do preparo das formulações, observou-se macroscopicamente a homogeneização e estabilização das formulações (Belgamwar, 2008; Ur-Rehman, 2011).

Avaliação da atividade leishmanicida in vivo

Animais

Utilizaram-se camundongos machos e fêmeas da espécie *Mus musculus* BALB/c, com idade de 2 a 3 meses e peso entre 20 e 25 gramas, mantidos sob condições de controle de temperatura a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA/UFPI 011/14).

Utilizaram-se cepas de *Leishmania major* MHOM/IL/80/Friendlin de *Leishmania major*, obtidas no Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais – NPPM-UFPI, mantidas por sucessivas passagens em camundongos BALB/c e replicadas em frascos de cultivo celular com meio de cultura de Schneider's (Sigma Chemical Co, St Louis, USA) inativado e solução de penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL e 50 µg/mL de estreptomicina Sigma Chemical Co, St Louis, USA) e mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (Tuladhar, 2015; Rafiee, 2014).

Obtenção das massas de *L. major* para infecção

Para obtenção das massas de parasitas dos estoques, distribuiu-se 5 mL de meio de Schneider's em frascos de cultivo celular com capacidade nominal para 50 mL de meio de cultura e incubou-se em estufa a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 dias. Depois de constatada a viabilidade e ausência de contaminantes, as promastigotas infectantes (fase estacionária de crescimento) foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C . Ressuspendeu-se o sedimento obtido em solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e centrifugou-se nas mesmas condições. O processo foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação, as promastigotas foram ressuspensas em 1 mL de solução salina fisiológica estéril, contando-se em câmara de Neubauer e ajustando-se a concentração desejada.

Infecção

Os animais foram tricotomizados na região da base da cauda e inoculados pela via subcutânea com 1×10^6 promastigotas, ajustados a um volume de 50 µL de inóculo.

Tratamento

Após desenvolvimento das lesões leishmaniótica, nodulares ou ulcerativas, no sítio de inoculo, os animais foram divididos em três grupos (n=8) de acordo com o tratamento a serem submetidos: grupo controle (grupo placebo), grupo emulgel + AmB 3% (grupo A) e grupo emulgel + AmB 3% + promotor de permeação (grupo B). O tratamento começou no momento do surgimento de, pelo menos, nódulos na maioria dos animais, antes da formação das lesões ulcerativas em todos.

Os animais foram distribuídos nos grupos antes do início do tratamento de maneira que ficasse equilibrada a quantidade de animais com nódulos e lesões em cada grupo.

Os animais foram tratados duas vezes ao dia, durante doze dias, com 50 µL da formulação tópica em cada aplicação indicada para cada grupo, utilizando-se um micropipetador automático. O volume aplicado foi suficiente para cobrir toda a área da lesão ulcerativa no início do tratamento.

Avaliação da eficácia do tratamento

Aspecto físico

Mensurou-se o peso dos animais no início, meio e final do tratamento. Continuou-se verificando o peso dos animais por 4 semanas após o término do tratamento.

Aspecto clínico

Os animais foram acompanhados antes, durante e após o tratamento através da observação diária das lesões, ou seja: presença do nódulo, de úlcera, infecção secundária, surgimento de metástases e cicatrização.

Acompanhamento da lesão ulcerativa

A avaliação quantitativa da ação das formulações utilizadas neste experimento foi pela mensuração semanal do diâmetro da lesão ulcerativa/nódulo com um paquímetro Messen[®]. Como parâmetro, foi tomado o diâmetro entre as bordas externas da úlcera no sentido perpendicular à linha dorsal (a) e o diâmetro, entre as bordas externas, do eixo vertical coincidente a linha dorsal da lesão no animal (b). Após a realização das duas medidas, calculou-se a média do diâmetro.

Após o término do tratamento, os animais continuaram a ser acompanhados por um período de 35 dias tendo suas lesões mensuradas semanalmente para verificar possíveis alterações das mesmas.

Análise histopatológica

Realizou-se análise histopatológica de fragmentos de pele lesões e do baço nos animais tratados com os diferentes regimes. Observou-se o processo infeccioso pós-tratamento desencadeado pela formação de lesão ulcerativa, desenvolvido individualmente, bem como os processos infecciosos secundários decorrentes da doença.

Análise estatística

Na avaliação físico-química das formulações, a análise estatística dos resultados obtidos, em triplicata, utilizou-se o software Origin Pro8.0[®] e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para concentração múltipla dos dados paramétricos utilizou-se a análise de variância de amostras pareadas seguida pelo teste t de Student. A análise de significância foi considerada quando o $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa de fármacos com atividade antileishmania requer condições muito específicas como a utilização de camundongos da linhagem BALB/c, que é muito suscetível à infecção por *L. major*, sendo utilizada em diversas pesquisas visto que a infecção experimental por *L. major* desenvolve um espectro de formas clínicas que são semelhantes aos humanos (Assche, 2011; Alavizadeh, 2012; Daifalla, 2012).

Muitos estudos demonstram que o momento inicial do tratamento pode influenciar significativamente a evolução da doença e que lesões cutâneas se tornam grosseiramente normais com redução da carga parasitária (Eissa, 2012; Carvalho, 2013).

No presente trabalho, observou-se o desenvolvimento de lesões causadas pela infecção com *L. major* em camundongos BALB/c conforme descrito na literatura por Ghotloo (2015). Inicialmente, verificou-se uma pápula de coloração avermelhada no sítio do inóculo, progredindo no decorrer de 3 a 4 semanas, para a formação de um nódulo que, em alguns casos, evoluiu gradativamente com o surgimento de uma úlcera bem circunscrita de bordas abauladas.

O diâmetro dos nódulos variou entre 2,7 e 9,4 mm enquanto que o das úlceras variou entre 1,7 mm e 5,0 mm. Sobre as úlceras forma-se uma espessa crosta capaz de fechar por completo toda a abertura da ferida, dificultando a aplicação das formulações e favorecendo o desenvolvimento de processo infeccioso secundário. Quando esse quadro se instala, observa-se facilmente a presença de material de consistência purulenta que flui facilmente sob leve pressão, através da borda da ferida. Nesses casos, com auxílio da ponteira, procedeu-se a

retirada da crosta das úlceras molhando as lesões com água filtrada, visualizando-se com clareza a extensão da lesão.

Observou-se que quando submetidos ao tratamento com emulgel de AmB 3%, tanto formulação com promotor como sem promotor, as lesões ulcerativas regridem gradativamente ou até completa cura (cicatrização, epitelização e surgimento e crescimento dos pêlos). Esse processo levou em média 19 dias, após o início do tratamento (Figura 1, 2 e 3). Entretanto, em alguns animais a recidiva ocorreu logo após o término do tratamento (26 dias). Nesses casos, as úlceras se formaram rapidamente assumindo grandes proporções e, em alguns casos, a úlcera apresentou aspecto irregular e necrosado.

Observou-se que os animais pertencentes ao Grupo B (emulgel de AmB com ácido oléico 5% como promotor de permeação cutânea) apresentaram nódulo e durante o tratamento os nódulos não evoluíram para úlcera. Pelo contrário, os nódulos reduziram de tamanho. Observou-se ainda que, um dos animais pertencentes a esse grupo e que apresentava lesão nodular, após receber tratamento, não apresentou lesão ao término do tratamento (Figura 3). Porém, com o decorrer dos dias após término do tratamento a lesão reapareceu. Esse fato não configura a cura do animal, mas é um indicativo positivo da atividade terapêutica eficaz no tratamento desta doença.

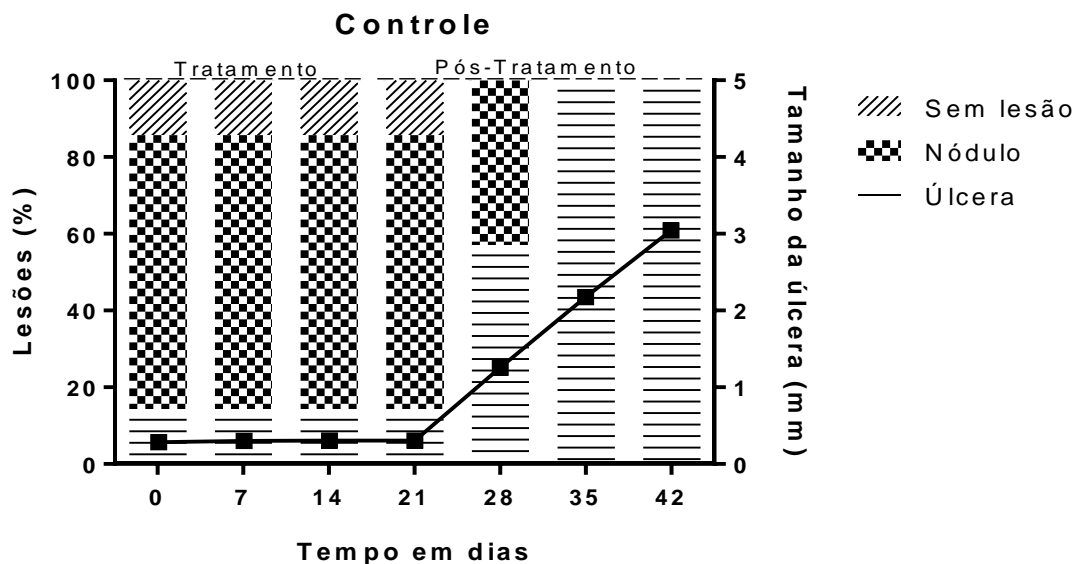


Figura 1: Efeito do emulgel (placebo) sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, infectados com 1×10^6 promastigotas infectantes de *L. major*.

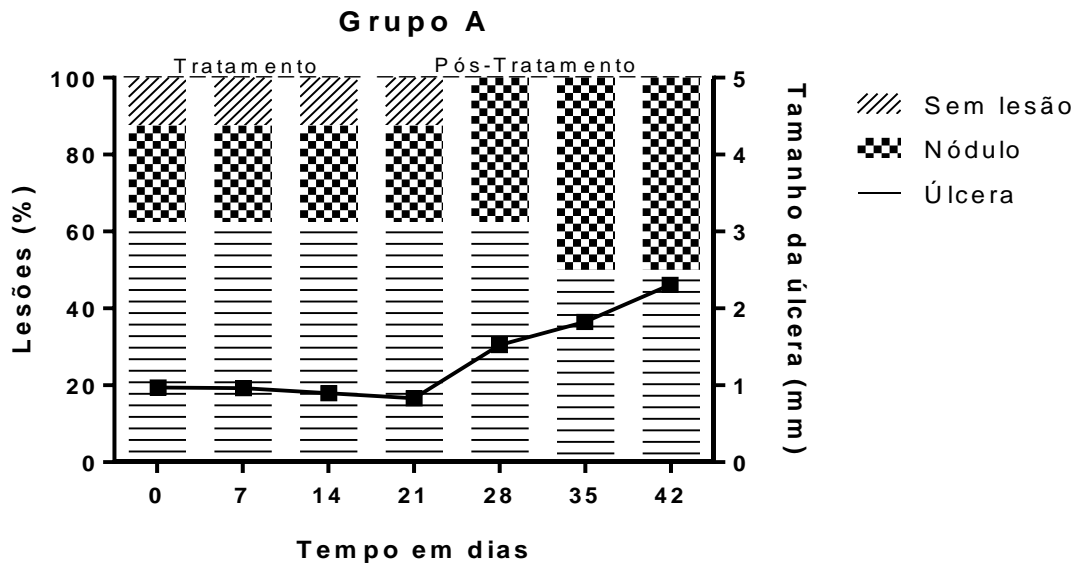


Figura 2: Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, infectados com 1×10^6 promastigotas infectantes de *L. major*, utilizando-se emulgel de AmB 3% sem promotor de permeação cutânea.

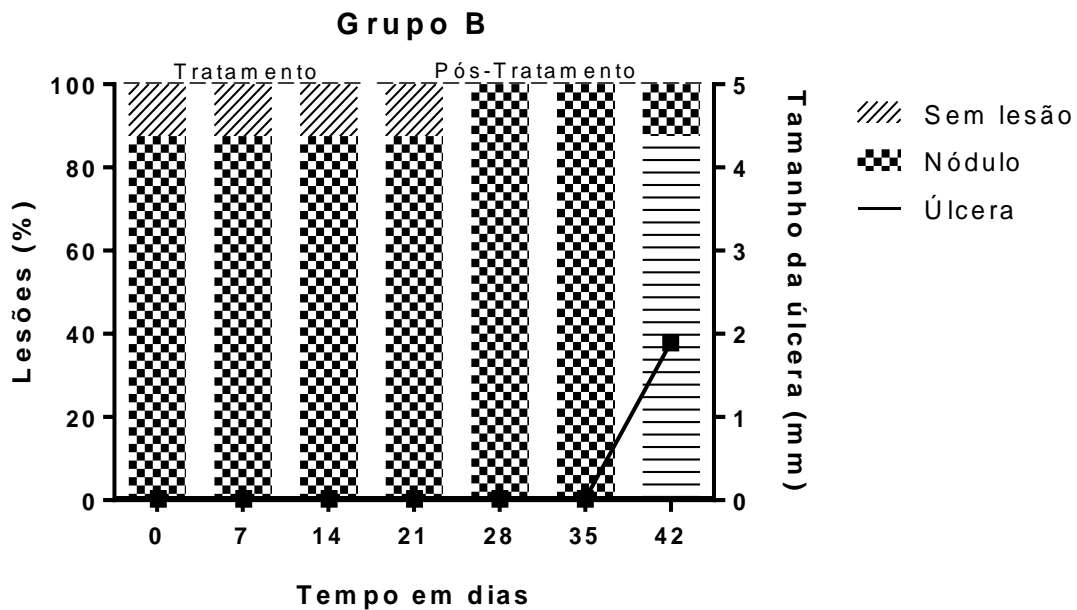


Figura 3: Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, infectados com 1×10^6 promastigotas infectantes de *L. major*, utilizando-se emulgel de AmB 3% com ácido oléico a 5% como promotor de permeação cutânea.

Nossos resultados mostram que pela distribuição do número médio de parasitos recuperados no sítio da inoculação após o tratamento para cada grupo, podemos afirmar que no grupo tratado com formulação emulgel de AmB (grupo A) houve redução da quantidade de leishmania obtidas a partir de amostras de tecido da borda da lesão, já o grupo tratado com emulgel de AmB com promotor de permeação ácido oléico a 5% (grupo B) teve essa redução mais acentuada da quantidade de parasitos recuperados. Observou-se também que a média do número de parasitos recuperados do sítio de infecção do grupo controle quando comparados aos grupos tratados é sempre maior (Figura 4). Estudos mostram que em animais infectados experimentalmente o tamanho das lesões cutâneas causadas pelos parasitos podem não estar correlacionado com o número de parasitos no sítio da lesão (Titus *et al.*,1985). Na verdade, lesões cutâneas podem curar, mas ainda conter parasitos, assim a capacidade de determinar a carga parasitária de animais infectados torna-se importante na avaliação de um tratamento.

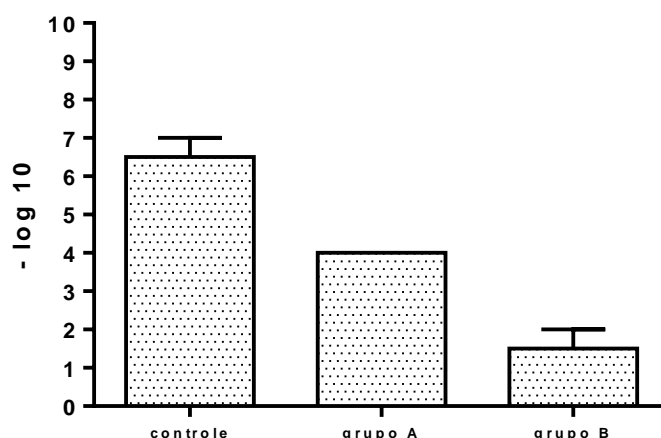


Figura 4. Quantificação de parasitos recuperados de camundongos BALB/c infectados com *L. major*. Média do número de parasitos viáveis recuperados do sítio de infecção da borda da lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. major*. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Newman-Keuls e as diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

Observamos que o baço de todos os animais do experimento não apresentou muita alteração de tamanho, o que é indicativo de que não houve visceralização da doença; a visualização do *imprint* desses órgãos confirmou esse fato (Figura 5). Na lâmina do baço dos animais do Grupo Controle, observou-se presença de muitas células polimorfonucleares e presença de *L. major* na forma amastigota fora das células do baço (células de Kupfer) confirmando o quadro de infecção (Hezarjaribi, 2014).

Em ambas as lâminas do baço dos animais do Grupo A (tratamento com emulgel de AmB sem promotor) quanto no Grupo B (emulgel de AmB com promotor de permeação ácido oléico a 5%), observamos presença de muitas células polimorfonucleares. Não encontramos nenhuma forma de *L. major*, mas esse fato não significa a cura da patologia, a qual só pode ser confirmada pela análise histopatológica dos fragmentos de pele do animal (Figura 5).

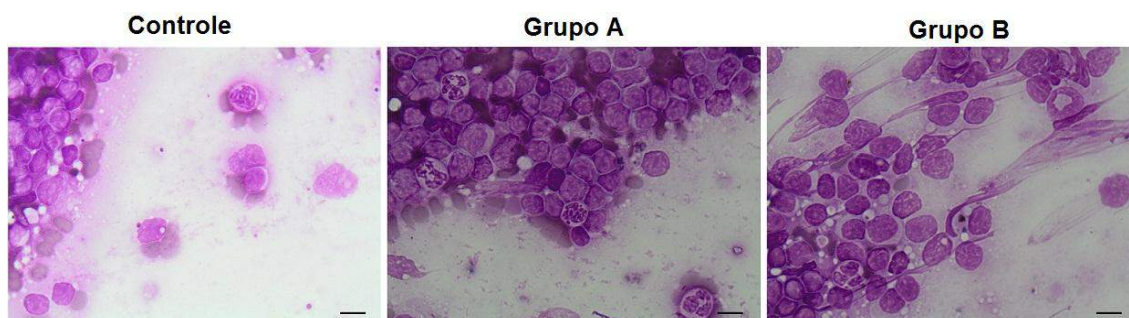


Figura 5: *Imprint* de células do baço de camundongo BALB/c infectados com *L. major* e submetidos aos diferentes regimes de tratamento, após recidiva. Escala 50 μ m.

Na análise histopatológica de todos os animais, independente do regime de tratamento, observou-se muitos elementos celulares destruídos e lesão inflamatória crônica na derme profunda (Figura 6).

Estudos relatam que a lipofilicidade é um parâmetro importante no desenvolvimento de agentes leishmanicidas (Fabri, 2014). Assim, a AmB é uma molécula anfipática, com estrutura assimétrica, cíclica com uma cadeia hidrófoba, uma cadeia hidrofílica e um açúcar do grupo amina; possui um perfil de solubilidade muito limitado, sendo quase completamente insolúvel em água (Wasan, 2009).

A AmB é alvo de pesquisas de aprimoramento farmacêutico e mesmo diante de sua alta atividade a sua administração provoca o surgimento de vários efeitos indesejados. Além disso, sua veiculação em formulações à base de lipídios pode reduzir a toxicidade comparando com a forma convencional e permite assim, que doses mais elevadas sejam administradas (Pham, 2013). Além disso, já possui atividade leishmanicida constatada e vem sendo utilizada na forma endovenosa (Neves, 2011).

Na análise histopatológica, os animais do grupo Controle apresentaram lesão ulcerada e, em alguns casos metástase; a pele apresentou reação inflamatória crônica, produtiva moderada, com presença de macrófagos, na derme superficial, com formas amastigotas no seu

interior. Observou-se também formação de abscessos e micro abscessos com formação de cápsula fibrosa; há coleção de macrófagos parasitados e vacuolados, que dá o aspecto de um tecido adiposo (Figura 6).

Os resultados acima encontram-se de acordo com a literatura, onde (Charret 2013) relata que na avaliação histopatológica, as lâminas das secções das lesões revelaram diferentes intensidades de infiltração inflamatória celular em camundongos infectados tratados e não-tratados.

A apoptose é um processo de morte celular programada, o qual é caracterizado por uma série de eventos envolvendo alterações nos aspectos morfológicos e bioquímicos. Em parasitas, a apoptose parece ser a forma de morte celular predominante, em resposta a agentes quimioterapêuticos tais como anfotericina B (Machado, 2012; Elamin, 2014).

Os numerosos estudos experimentais de leishmaniose cutânea envolvendo *L. (L.) major* permitiram uma visão mais abrangente dos aspectos clínicos, patológicos, fisiológicos e imunológicos da doença. Os camundongos da linhagem BALB/c tem uma elevada susceptibilidade para reconhecer *L. major*. O trabalho realizado em modelos animais experimentais tem aumentado o nosso entendimento das respostas imunes associadas à resistência e susceptibilidade à infecção. A resistência está relacionada com a predominância de populações de células T CD4⁺ Th1 e CD8⁺ Tc1, que são responsáveis pela ativação de macrófagos para destruir os parasitas intracelulares e/ou para fazer a lise das células infectadas por meio de uma rede complexa de citocinas. IFN- γ (intérferon-gama) e TNF- α (fator de necrose tumoral tipo alfa) são mediadores importantes que induzem a produção de NO (óxido nítrico) pelos macrófagos, os quais são, por conseguinte, capaz destruir o parasita, como evidenciado em modelos experimentais. Em contraste, a susceptibilidade está relacionada com as células do tipo CD4⁺ Th2 e a produção de interleucina (IL) -4, IL-5 e IL-13 (Carneiro, 2014; Passero, 2010).

A forma cutânea da LTA pode evoluir para a cura espontânea ou progredir para a formação de pápulas, nódulos ou úlceras dependendo, basicamente, do tipo de resposta imunitária que o indivíduo irá desenvolver - Th1 ou Th2. Por outro lado, essa resposta inflamatória dependerá de aspectos ainda não totalmente conhecidos, tais como fatores genéticos do hospedeiro (existência de genes promotores do Fator de Necrose Tumoral, resposta efetiva de células NK (natural killer cells) frente à IL-12 e produção adequada de intérferon-gama, dentre outras) e a espécie de leishmania responsável pela infecção (Neves, 2011).

Muitos dos animais pertencentes ao Grupo Controle morreram antes da data marcada para eutanásia, devido sua debilidade física, conseqüente de seu estado patológico avançado pela infecção por *L. major*.

Quanto aos animais tratados com emulgel de AmB (Grupo A), os resultados da análise histopatológica mostraram formação de micro abscessos, constituídos de inúmeros macrófagos parasitados com formas amastigotas (Figura 6).

Por último, os animais tratados com emulgel de AmB com ácido oléico 5% como promotor de permeação cutânea (Grupo B), demonstraram presença de fibroblastos desorganizados que caracterizam um processo de cicatrização rudimentar; observa-se a presença de macrófagos parasitados com formas amastigotas, porém de maneira bem menos evidente que no Grupo A (Figura 6).

Tanto no Grupo A como no Grupo B, após término do tratamento, observou-se morte de animais devido à infecção por *L. major*, porém, isso ocorreu de maneira menos evidente no Grupo B.

Na literatura, estudos relatam que a utilização de AmB em formas farmacêuticas parenterais demonstraram atividade terapêutica com redução do tamanho das lesões e, quando comparados com os animais do grupo controle as lesões reduziram em até 40%. Porém, não observou-se cura completa e lesões recidivaram decorrido algum tempo após o término do tratamento (Yardley, 2000).

Em relação ao ácido oléico presente na formulação, Karande (2009) relata que terpenos são uma escolha popular para potenciadores de permeação em estudos de distribuição transdérmica de fármacos. O efeito de um terpeno específico na pele depende de suas exatas propriedades físico-químicas, em particular a sua lipofilicidade. Em geral, os terpenos menores, com grupos não polares são melhores intensificadores da permeação da pele, como é o caso do ácido oléico.

O ácido oléico é um potencializador de permeação pois induz, reversivelmente, um temporário aumento da permeabilidade da pele. Estudos relatam sua ação a partir de 1% de concentração (Meenaksh, 2013).

Conforme descritas nos resultados, a análise histopatológica revelou várias alterações nas camadas da derme. Vale ressaltar que independentemente do tipo de regime de tratamento a que o animal foi submetido, em se tratando de lesões associadas à infecção por leishmania, o padrão de achados clínicos é o mesmo. A diferença está na intensidade desses achados e no tempo decorrido da doença (Monzote, 2014).

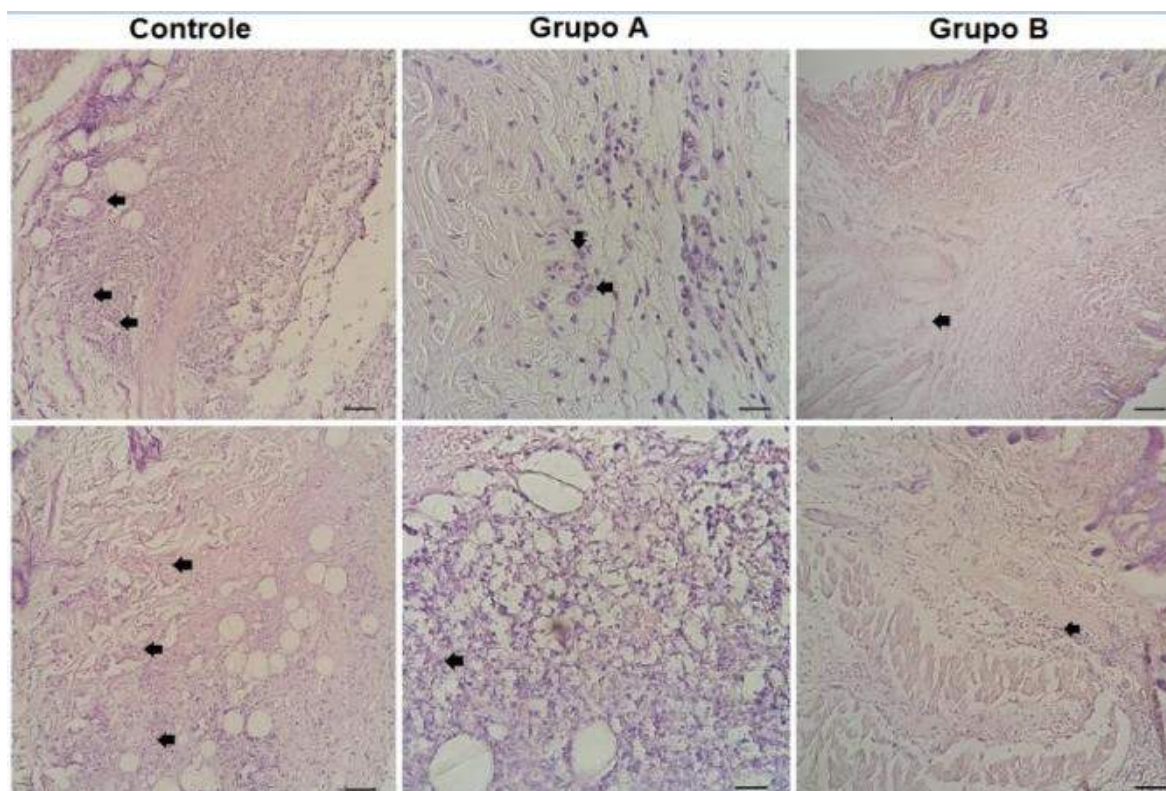


Figura 6: Análise histopatológica das lesões de pele de camundongo BALB/c infectados com *L. major* sem tratamento (Controle) e tratados com emulgel de anfotericina B (Grupo A), emulgel de AmB e promotor ácido oléico a 5% (Grupo B).

CONCLUSÃO

Demonstrou-se que os animais submetidos ao tratamento com emulgel de AmB e ácido oléico 5% como promotor de liberação cutânea apresentaram melhor resposta terapêutica *in vivo* caracterizada por redução do tamanho das lesões, menor quantidade de parasitas recuperados em fragmentos de pele, rudimentar processo de cicatrização, não-visceralização da doença e reincidência mais tardia das lesões em comparação com os animais que receberam apenas emulgel de AmB 3%. Isso evidencia que a formulação tópica apresenta boas perspectivas como terapia alternativa para leishmaniose cutânea, mais acessível, porém recomendando-se mais estudos.

REFERÊNCIAS

Alavizadeh, S. H.; Badiee, A.; Khamesipour, A.; Jalali, S. A.; Firouzmand, H.; Abbasi, A.; Jaafari, M. R. (2012). The role of liposome-protamine-DNA nanoparticles containing

CpG oligodeoxynucleotides in the course of infection induced by *Leishmania major* in BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 132, 313-319. doi:10.1016/j.exppara.2012.06.014.

Assche, T. V.; Deschacht, M.; Luz, R. A. I.; Maes, L.; Cos, P. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology.(2011). *Free radical biology & Medicine*, 51, 337-351. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011.

Belgamwar, V. S.; Pandey, M. S.; Chauk, D. S.; Surana, S. J. Pluronic lecithin organogel. (2008) *Asian Journal of Pharmaceutics* 2, 134-138.

Brotherton, M.; Bourassa, S.; Légar, D.; Poirier, G. G.; Droit, A.; Ouellette, M. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum* (2014). *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 4, 126-132. doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.05.002.

Carneiro, M. B., De Andrade e Sousa, L. M., Vaz, L. G., Dos Santos, L. M., Vilela, L., de Souza, C. C., Gonçalves, R., Tafuri, W. L., Afonso, L. C., Côrtes, D. F.; Vieira, L.Q. (2014). Short-term protection conferred by Leishvacin® against experimental *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice. *Parasitology International* 63, 826 –834. doi: 10.1016/j.parint.2014.07.010.

Carvalho, R. F.; Ribeiro, I. F.; Miranda-Vilela, A. L.; Souza Filho, J.; Martins, O. P.; Silva, D. O. C.; Tedesco, A. C.; Lacava, Z. G. M.; Bão, S. N.; Sampaio, R. N. R. (2013). Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Experimental Parasitology* 135, 217–222. doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.008.

Charret, K. S.; Lagrota-Cândido, J.; Carvalho-Pinto, C. E.; Hottz, C. F.; Lira, M. F.; Rodrigues, R. F.; Gomes, A. O.; Bernardino, A. M.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Leon, L.

L.; Amaral, V. F. (2013). The histopathological and immunological pattern of CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* after treatment with pyrazole carbohydrazide derivates. *Experimental Parasitology* **133**, 201-210. doi: 10.1016/j.exppra.2012.11.022.

Daifalla, N. S.; Bayih, A. G.; Gedamu, L. (2012). Leishmania donovani recombinant iron superoxide dismutase B1 protein in the presence of TLR-based adjuvants induces partial protection of BALB/c mice against Leishmania major infection. *Experimental Parasitology* **131**, 317-324. doi.org/10.1016/j.exppara.2012.05.002.

Eissa, M. M.; Amer, E. I.; Mossallam, S. F.; Gomaa, M. M. Baddour, N. M. (2012). Miltefosine for Old World cutaneous leishmaniasis: An experimental study on Leishmania major infected mice **48**, 261-271. doi.org/10.1016/j.ajme.2012.04.003.

Elamin, M. H.; Al-Maliki, S. S. (2014). Leishmanicidal and apoptotic activities of oleuropein on *Leishmania major*. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **52**, 880-888. doi:10.5414/CP202102.

Fabri, R. L.; Garcia, R. A.; Florêncio, J. R.; Carvalho, L. O.; Pinto, N. C. C.; Coimbra, E. S.; Fagundes, E. M. S.; Ribeiro, A.; Scio, E. (2014). Pentacyclic triterpenoids from *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Roem. & Schult.) K. Shum: in vitro cytotoxic and leishmanicidal and in vivo anti-inflammatory and antioxidative activities. *Medicinal Chemistry Research* **23**, 5294-5304. doi:10.1007/s00044-014-1093-y.

Ghotloo, S.; Hoseini, M. H. M. Alimohammadian, M. H.; Khaze, V.; Memarnejadian, A.; Rostami, A. (2015). Immunomodulatory effects of chitin microparticles on *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Parasitology International* **64**, 219-221. doi.org/10.1016/j.parint.2014.12.007.

Guimarães, T. T.; Pinto, M. C. F. R.; Lanza, J. S.; Melo, M. N.; Monte-Neto, R. L.; Melo, I. M. M.; Diogo, E. B. T.; Ferreira, V. F.; Camara, C. A.; Valença, W. O.; Oliveira, R. N.; Frezárd, F.; Silva Junior, E. N. (2013). Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant *Leishmania* parasites: Synthesis of novel α - and nor- α -lapachone based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *European Journal of Medicinal Chemistry* **63**, 523-530. doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.038.

Hezarjaribi, H. Z.; Ghaffarifar, F.; Dalimi, A.; Sharifi, Z. (2014) Evaluation of protective effect of IL-22 and IL-12 on cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 940-945. doi:10.1016/S1995-7645(14)60166-8.

Leprohon, P.; Fernandez-Prada, C.; Gazanion, E.; Monte-Neto, R.; Ouellette, M. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania* (2014). *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.09.005

Karande, P.; Mitradotri, S. (2009). Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**, 2362-2373. doi:10.1016/j.bbamem.2009.08.015.

Machado, M.; Pires, P.; Dinis, A. M.; Santos-Rosa, M.; Alves, V.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C.; Sousa, M. C. (2012) Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. *Experimental Parasitology* **130**, 223–231. doi:10.1016/j.exppara.2011.12.012.

Medeiros, M. G. F.; Silva, A. C.; Citó, A. M. G. L.; Borges, A. R.; Lima, S. G.; Lopes, J. A. D.; Figueiredo, R. C. B. Q. (2011). In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitology International* **60**, 237–241. doi:10.1016/j.parint.2011.03.004.

Meenaksh, D. Emulgel: a novel approach to topical drug delivery. (2013). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **4**, 847-856.

Mohammadzadeh, M.; Behnaz, F.; Golshan, Z. (2013) Efficacy of glucantime for treatment of cutaneous leishmaniasis in Central Iran. *Journal of Infection and Public Health* **6**, 120-124. doi.org/10.1016/j.jiph.2012.11.003.

Monzote, L.; Pastor, J.; Scull, R.; Gille, L. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice (2014). *Phytomedicine* **21**, 1048-1052. doi:10.1016/j.phymed.2014.03.002.

Neves, L. O.; Gadelha, E. P. N.; Guerra, J. A. O.; Talhari, S.; Talhari, A. C.; Silva Junior, R. M.; Ferreira, L. C. L. (2011). Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiro de Dermatologia* **86**, 1092-1101.

Panwar, A. S.; Upadhyay, N.; Bairagi, M.; Gujar, S.; Darwhekar, G. N.; Jain, D. K. (2011) Emulgel: a review. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science* **1**, 333-343.

Passero, L. F.; Marques, C.; Vale-Gato, I.; Corbett, C. E.; Laurenti, M. D.; Santos-Gomes, G. (2010). Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of leishmania (viannia) shawi. *Parasitology International*, **59**, 159-165. doi: 10.1016/j.parint.2009.12.010.

Pham, T. T.; Barratt, G.; Michel, J. P.; Loiseau, P. M. ; Saint-Pierre-Chazalet, M. (2013). Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B – miltefosine-loaded nanocochleates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **106**, 224-233. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.041.

Rafiee, A.; Riazi-rad, F.; Darabi, H.; Khaze, V.; Javadian, S.; Ajdary, S.; Bahrami, F.; Alimohammadian, M. H. (2014) Ferroporfirin-encapsulated nanoparticles reduce infection and improve immunity in mice infected with *Leishmania major*. *International Journal of Pharmaceutics* **466**, 375-381. doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.039.

Silva, J. A., De Santana, D. P., Bedor, D. G. C., Borba, V. F. da C., Lira, A. A. M. and Do Egito, E. S. T. (2009) Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Química Nova*, **32**, 1389-1393.

Titus, R. G., Marchand, M., Boon, T.; Louis, J. A. (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology*, **7**, 545-555.

Tuladhar, R.; Oghumu, S.; Dong, R.; Peterson, A.; Sharpe, A. H.; Satoskar, A. R. Ox40L-Ox40 pathway plays distinct roles in regulating Th2 responses but does not determine outcome of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. (2015) *Experimental Parasitology* **148**, 49-55. doi.org/10.1016/j.exppra.2014.11.002.

Ur-Rehman, T.; Tavelin, S.; Gröbner, G. (2011) Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics* **409**, p.19–29. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.017.

Wasan, E. K., Bartlett, K., Gershkovich, P., Sivak, O., Banno, B., Wong, Z., Gagnon, J., Gates, B., Leon, C. G.; Wasan K. M. (2009). 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*. *International Journal of Pharmaceutics*, **372**, 76-84. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.01.003.

Yardley, V.; Croft, S. L. (2000). A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents* **13**, 243-248.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados, concluímos que:

- Obtivemos as formulações de AmB utilizando diferentes promotores químicos de liberação (ácido oléico, cineol e geraniol);
- Desenvolvemos e validamos método analítico para quantificação da AmB por espectrofotometria no UV/Vis, possibilitando quantificar a liberação de AmB no emulgel;
- Caracterizamos as propriedades físico-químicas e avaliamos a estabilidade preliminar das formulações de AmB, destacando-se a formulação que continha palmitato de isopropila e ácido oléico na fase oleosa;
- Avaliamos a cinética de liberação *in vitro* de preparações de AmB em membrana artificial, utilizando célula de Franz e a formulação com ácido oléico mostrou liberar maior quantidade de AmB;
- Avaliamos atividade terapêutica *in vivo* através do tratamento da lesão ulcerativa em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major*. Durante o tratamento, os animais que receberam emulgel de AmB e ácido oléico e apresentaram nódulo, não evoluíram para úlcera. Pelo contrário, os nódulos reduziram de tamanho. Porém, com o decorrer dos dias após término do tratamento a lesão reapareceu.
- Realizamos análises histopatológicas dos tecidos dos animais submetidos ao tratamento com emulgel, observando através do *imprint* do baço que não houve visceralização da doença e na microscopia, observamos menor número de leishmanias nas lâminas dos animais tratados com emulgel de AmB e ácido oléico do que naqueles tratados apenas com emulgel de AmB em comparação com o grupo controle, mostrando que o emulgel é uma alternativa promissora para o tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. C. L. de; *et al.* Estudo da prevalência de Leishmaniose Tegumentar Americana com repercussão na cavidade bucal no município de Alagoa Grande (PB). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, p.108-112, 2010.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, p.497-506, 2011.

ALLEN Jr., L. V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Editora Artemed, 8ed., p.301-322, 2007.

ASSCHE, T. V.; *et al.* Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, p.337–351, 2011.

BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Editora Artmed 2ed. p. 353-356, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. Atual. – Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde.2012. consultado em 26/04/2014; 23:07h. disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0204.def>

BRUXEL, F.; *et al.* Nannoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Revista Química Nova**, v.35, p.1827-1840, 2012.

CARVALHO, R. F. DE; *et al.* Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Experimental Parasitology**, v.135, p.217–222, 2013.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, MD. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, p.7–12, 2011.

CORRÊA, N. M., *et al.* Avaliação do Comportamento Reológico de Diferentes Géis Hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p.73-78, 2005.

CORDEIRO, A. T.; *et al.* Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania major*. **Biochimie**, v.94, p.1739-1748. 2012.

CUNHA JÚNIOR, A. S. C.; *et al.* Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p.385-391, 2003.

CUNHA, L. C.; *et al.* A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de Chagas e leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, p.105-124, 2011.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 558-66, 2004.

GODINHO, J. L. P.; *et al.* Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, p.326-331. 2012.

GONÇALVES, G.M.S.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Aplicação de métodos de biofísica no estudo de eficácia de produtos desmocosméticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, p.1-10, 2009.

GUZZI, SILVANE. Desenvolvimento, estudo de estabilidade e teste in vivo da formulação gel com extrato e fraçãoenriquecida de *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth. Dissertação mestrado. Toledo, UFSC, 2011. p.128. Dissertação de Mestrado em Farmacologia.

GUERRIERI, D.; *et al.* M. Biochemical effects of riluzole on *Leishmania* parasite. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 250-254, 2013.

HEMELRIJCK, C. van; MULLER-GOYMANN, C. C. Rheological characterization and permeation behavior of poloxamer 407-based systems containing 5-aminolevulinic acid for potential application in photodynamic therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, 437, p.120-129, 2012.

KHULLAR, R.; *et al.* Formulation and evaluation of mefenamic acid emulgel for topical delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.20, p.63-67, 2012.

LEHMAN, L.; KEIPERT, S. y GLOOR, M. Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharm**, v.52, p.129-136, 2001

LEMKE, A.; *et al.* Delivery of amphotericin B nanosuspensions to the brain and determination of activity against *Balamuthia mandrillaris* amebas. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, p. 597-603, 2010.

LIRA, A. A. M. Estudo de permeação *in vitro* e avaliação térmica de emulgel tópico a base de lapachol. Recife, UFPE, 2003. 81p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

LOURENÇO, A. R. N. Administração tópica de fármacos - das restrições aos desafios. Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2013. 51p. Dissertação Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p.01-37, 2009.

MATHOUT, R. M.; WOODMAN, T. J. Applications of NMR in the characterization of pharmaceutical microemulsions. **Journal of Controlled Release**, v.161, p.62-72, 2012.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 435, p. 3– 9, 2012.

NAIK, A.; PECHTOLD, L. A. R. M.; POTTS, R. O.; GUY, R. H. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. **Journal of Controlled Release**, v. 37, p. 299-306, 1995.

OGURI, M.; *et al.* The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomebranes**, v. 1838, p.1851-1861, 2014.

PANWAR, A. S. *et al.* Emulgel: a review. **Asian Journal of Pharmacy and Life Science**, v.1, p.333-343, 2011.

PARK, K.; *et al.* Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v.183, n.2, p.145-154, 1999.

PHAM, T. T. H.; *et al.* Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B – miltefosine-loaded nanocochleates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.106, p.224-233, 2013.

PELLISSARI, D. M.; *et al.* Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v.20, p.107-110, 2011.

PIRES, A. M. S.; *et al.* Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. **Revista Ciência & Saúde**, v.14, p.30-39, 2012.

REIS, S. R.; *et al.* Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. **Revista Acta Amazônica**, v. 43, p.121-124, 2013.

SAHOO, S.; *et al.* (2011). Organogels: Properties and Applications in drug delivery. **Source: Designed Monomers and Polymers**, v. 14, p.95–108, 2011.

SIFAOU, I.; *et al.* Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of *Leishmania* species and their correlation with the antioxidant activity. **Experimental Parasitology**, v.141, p. 106-111, 2014.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.5, p.485-497, 2012.

SINGLA, V, *et al.* Emulgel: a new platform for topical drug delivery. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**.v.3, p.485-498, 2012.

SILVA, L.F.J.S. da. Nova associação de digluconato de clorexidina e cloridrato de lidocaína em gel urogenital. Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da qualidade e da estabilidade da formulação. Rio de Janeiro, UFRJ, 2009. 80p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

SMEDEN, J. Van; *et al.*The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta – molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1841, p.295-313, 2014.

TIUMAN, T. S.; *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v.15, p.525-532, 2011.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GRÖBNER, G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v.409, p.19–29, 2011.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de polímeros. **Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.20, p.51-64, 2010.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.603-618, 2004.

ZAULI, R.C.; *et al.* In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (leishmania) amazonenses* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.15, p.68-76, 2010.

ANEXOS

ANEXO A:

Resumo estendido publicado no Anais do II Workshop de Projetos e Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Pinheiro, I. M.; Carvalho, I. P.; Oliveira, D. H. B.; Lopes, G. L. N.; Carvalho, A. L. M. **LIBERAÇÃO IN VITRO DE EMULGEL DE ANFOTERICINA B**. Anais do II workshop de projetos e dissertações, v.4, p.34-39. 2013. disponível em <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/Anais%20II%20Workshop.pdf>

ANEXO B:

Trabalho apresentado no II Simpósio LATINO-Americano de Biotecnologia do Nordeste

Oliveira, L. S. A.; Araújo, L. F. L.; Pinheiro, I. M.; Lopes, G. L. N.; Oliveira, V. M. V.; Carvalho, F. A. A.; Carvalho, A. L. M. **DESENVOLVIMENTO DE EMULGEL DE ANFOTERICINA B A BASE DE ÓLEO DE CAJÚ (ANACARDIUM OCCIDENTALE L) PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA.**



ANEXO C:

Trabalho apresentado no II Simpósio LATINO-Americano de Biotecnologia do Nordeste

Oliveira, L. S. A.; Araújo, L. F. L.; Pinheiro, I. M.; Lopes, G. L. N.; Oliveira, V. M. V.; Carvalho, I. P.; Carvalho, A. L. M. **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANFOTERICINA B CARREADA EM ORGANOGEL TÓPICO DE LECTINA DE SOJA.**



ANEXO D:

Trabalho apresentado no II Simpósio LATINO-Americano de Biotecnologia do Nordeste

Araújo, L. F. L.; Oliveira, L. S. A.; Ribeiro, A. A. M.; Pinheiro, I. M.; Terceiro Neto, J. A.; Carvalho, F. A. de A.; Carvalho, A. L. M. **UTILIZAÇÃO DE TERPENOS COMO PROMOTORES DE LIBERAÇÃO IN VITRO DE FORMULAÇÃO TÓPICA DE ANFOTERICINA B PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.**



APÊNDICE



Ilustração 15: Camundongo (*Mus musculus*) com lesão tipo nódulo após infecção por *Leishmania major*.

Fonte: Arquivo pessoal, PINHEIRO, I.M.



Ilustração 16: Camundongo (*Mus musculus*) com lesão tipo úlcera após infecção por *Leishmania major*.

Fonte: Arquivo pessoal, PINHEIRO, I.M.



Ilustração 17: Camundongo (*Mus musculus*) sem lesão após infecção por *Leishmania major* e tratamento com emulgel de anfotericina B com ácido oléico 5% como promotor de permeação cutânea (Grupo B).

Fonte: Arquivo pessoal, PINHEIRO, I.M.

Desenvolvimento de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de anfotericina B em emulgel

Materiais

Para o preparo do emulgel foram utilizados Lecitina de soja (Embrafarma) e palmitato de isopropila (All Chemistry), Polaxamer 407[®] (Embrafarma), água destilada, sorbato de potássio (Embrafarma) e anfotericina B (teor = 844 µg.mg⁻¹) (Valdequímica).

Os reagentes e solventes empregados foram edetato de sódio PA (Dinâmica), dimetilsulfóxido PA (DMSO PA) (Vetec), álcool metílico grau CLAE (Sigma-Aldrich) e água ultra-purificada (Milli-Q[®]). Ainda, foram utilizadas membrana filtrante 0,45µm (Millex Millipore[®]) e filtro de seringa.

Para os ensaios de liberação, utilizou-se banho-maria com circulação a 37°C, células de Franz, solução tampão fosfato pH 7,4.

Equipamentos

Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] LC-10AT VP (CLAE) equipado com bomba binária modelo LC 10AT VP, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10AV VP, controlador SCL-10A VP, integrador automático computadorizado com software LC Solution[®], injetor manual, forno para coluna CTO-10A VP, degaseificador DGU-14A e coluna de separação cromatográfica de fase reversa C₁₈ (Novapak[®]).

Preparo das amostras

Pesou-se o padrão, dissolveu-se em DMSO PA de maneira que a concentração final fosse 1000µg.mL⁻¹. A partir dessa solução, pipetou-se alíquotas diferentes e diluiu-se com álcool metílico CLAE, obtendo-se 7 soluções de diferentes concentrações (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg.mL⁻¹).

Parâmetros cromatográficos

As condições cromatográficas foram otimizadas para determinação da anfotericina no emulgel e estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas usadas na quantificação de anfotericina B em emulgel

Característica	Descrição
Coluna	C18 fase reversa, 4,6mm x 25 mm, partícula com 5µm de tamanho de diâmetro
Volume	20µL
Fluxo de injeção	1mL.min ⁻¹
Detecção	405nm
Fase móvel	Álcool metílico : Solução de EDTA 0,05M (80:20 v/v)

A validação do método analítico foi realizada segundo os critérios propostos pela resolução da ANVISA RE n°899/2003. Os parâmetros avaliados no desenvolvimento deste trabalho foram especificidade, linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, robustez, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Especificidade

Verificou-se através observação do cromatograma de soluções preparadas com a formulação do placebo, do emulgel de AmB 3% sem promotor e com o promotor (ácido oléico 5%) para a verificação de interferentes na mesma concentração teórica.

Linearidade

As concentrações das alíquotas de AmB que constituíram a curva analítica para análise da linearidade foram: 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde foram obtidas a partir de uma solução-mãe de AmB ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As curvas analíticas foram feitas em triplicata.

Utilizou-se os valores correspondentes a absorbância no ponto de maior absorção (405,4 nm) 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 sua linearidade no intervalo testado.

Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para realizar o cálculo utilizou-se as fórmulas propostas na Resolução n°899/2003.

$\text{LD} = \frac{\text{DPa} \times 3}{\text{IC}}$	$\text{LQ} = \frac{\text{DPa} \times 10}{\text{IC}}$
---	--

Onde:

- ✓ DP_a = Desvio padrão do intercepto com o eixo Y;
- ✓ IC = Inclinação da curva de calibração.

Precisão

A precisão do método foi avaliada a partir de análises realizadas por 2 analistas e repetidas em dois dias diferentes. Verificou-se a precisão do método através do coeficiente de variação (CV%).

Exatidão

A exatidão foi verificada variando-se a concentração entre 80 e 120%; representa a porcentagem da recuperação de uma quantidade conhecida de fármaco adicionado à amostra.

Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise com variação do comprimento de onda (404 e 406nm) e através da variação da exposição à luz (amostra exposta ou protegida da luz).

Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados de validação foi realizada através do programa Origin 8.0[®] análise de variância simples de uma via (ANOVA) ou através do teste t-Student ($\alpha = 0,05$).

Resultados

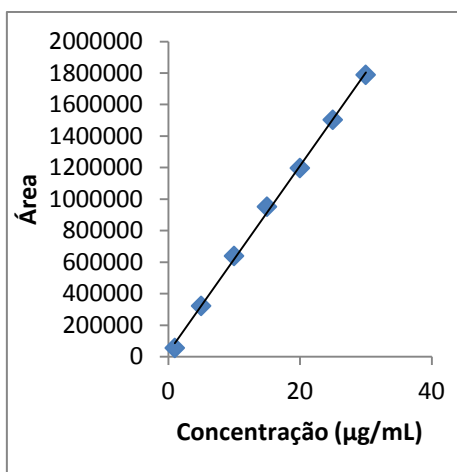


Figura 1. Curva analítica determinada a partir da concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) x área das diferentes concentrações de anfotericina B.

Tabela 2. Valores de DPR para as diferentes concentrações da curva analítica

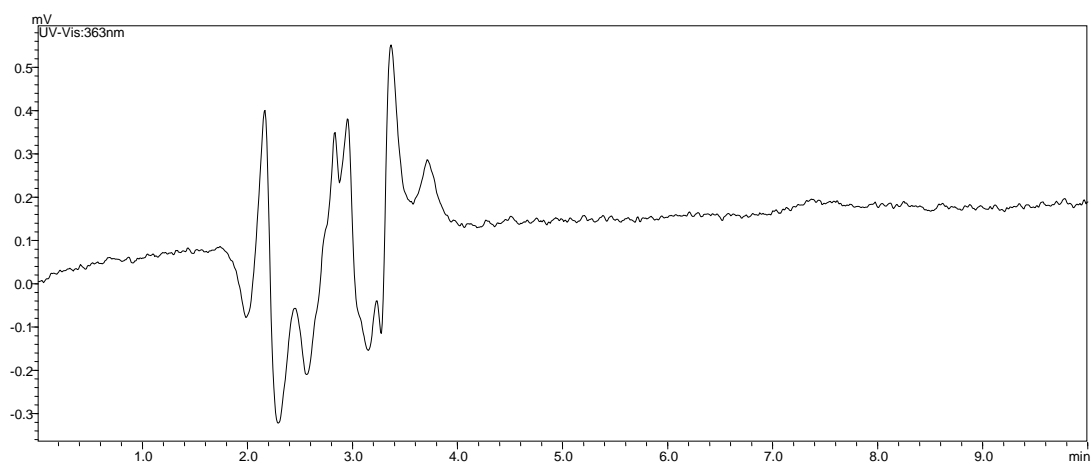
Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DPR (%)
1,0	6071,113
5,0	36150,8
10,0	43754,22
15,0	108874,7
20,0	145775,9
25,0	123055,4
30,0	158090,9

Legenda: DPR (%) – Desvio padrão relativo em percentagem.

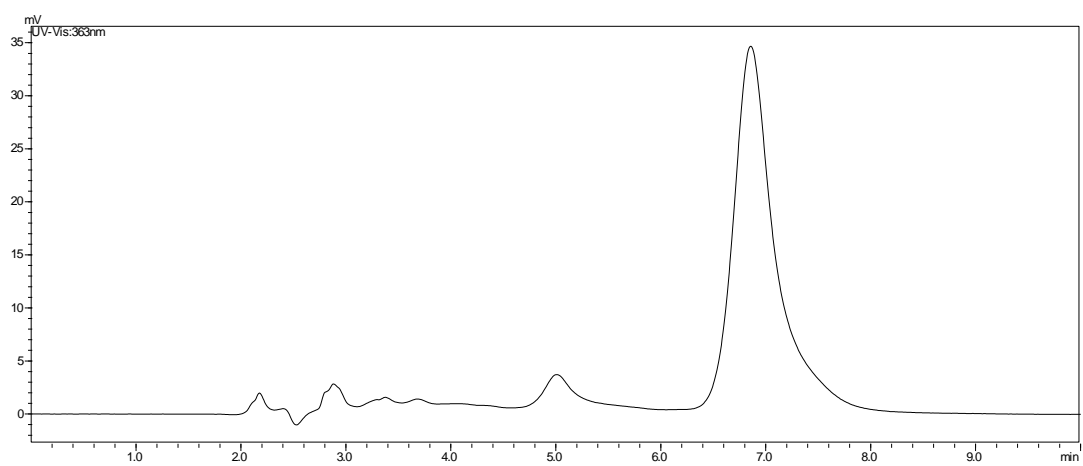
Conforme cromatograma demonstrado na Figura 2A, pode-se observar que no tempo de retenção da anfotericina B (aproximadamente 7 min) não há sinal cromatográfico, constatando-se então que esta pode ser utilizada como controle para detecção do ativo.

De acordo com a Figura 2b, tem-se o sinal da anfotericina B na concentração de 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bem definido (aprox. 7 min), o que resulta em boa sensibilidade do método de análise desenvolvido. Vale ressaltar que preparou-se solução da amostra do emulgel de anfotericina B e ácido oléico, na concentração 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o cromatograma não apresentou diferença no sinal. Dessa maneira, constata-se que o método é específico e seletivo.

A



B



C

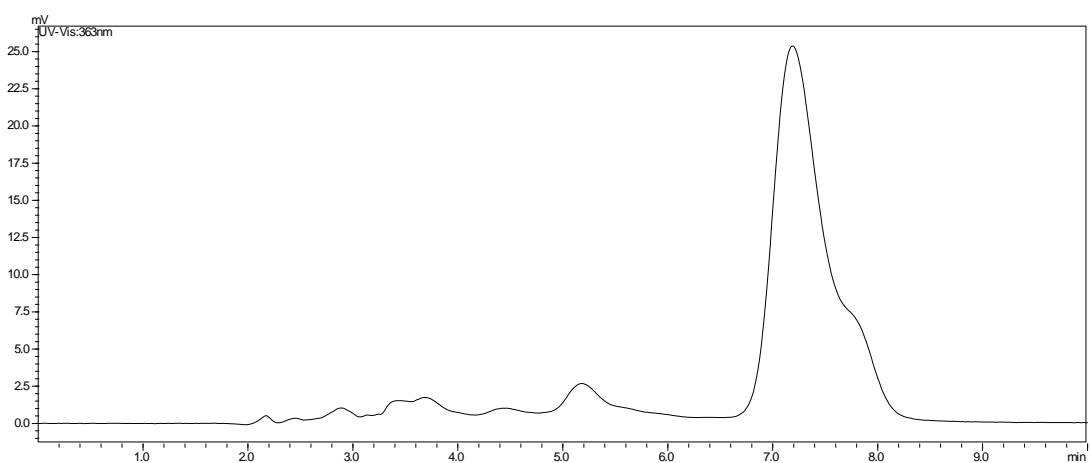


Figura 2. Cromatograma da solução contendo placebo do emulgel (a), emulgel de anfotericina B (b) e emulgel de anfotericina B e ácido oléico (c).

CURVA ANALÍTICA

Curva 01		Curva 02		Curva 03		Média		DP
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	
1	51301.9	1	62803.2	1	53681.3	1	55928.8	6071.113
5	281600.2	5	349447	5	337162.7	5	322736.6333	36150.8
10	657491.1	10	671774.2	10	589864.4	10	639709.9	43754.22
15	966313.7	15	1053624.1	15	837215.4	15	952384.4	108874.7
20	1188810.4	20	1347565.2	20	1056410.8	20	1197595.467	145775.9
25	1502746.7	25	1627473	25	1381369.8	25	1503863.167	123055.4
30	1781666.8	30	1950900.7	30	1634987.1	30	1789184.867	158090.9

$$r^2 = 0.996750932$$

$$\text{(Inclinação) } a = 59560.03567$$

$$\text{(Intercepto) } b = 16652.4313$$

$$r^2 = 0.998157283$$

$$\text{(Inclinação) } a = 64893.69197$$

$$\text{(Intercepto) } b = 26408.00728$$

$$r^2 = 0.997307392$$

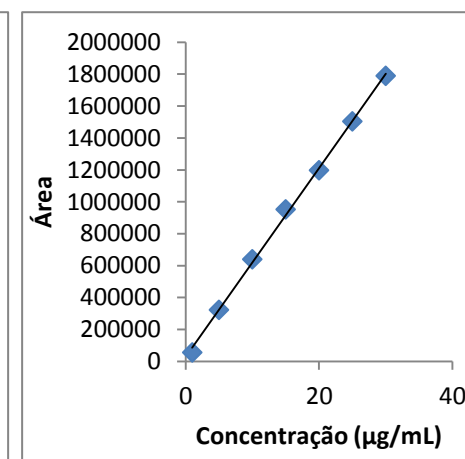
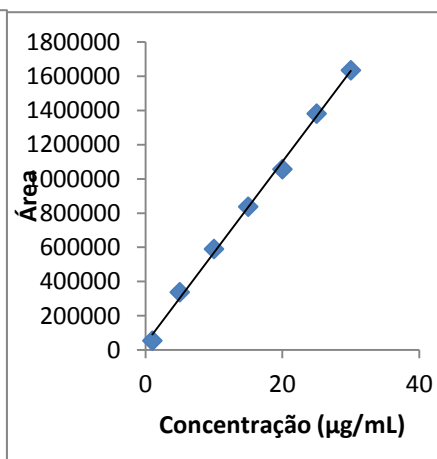
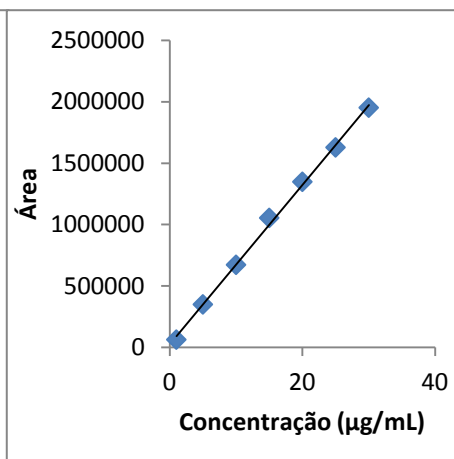
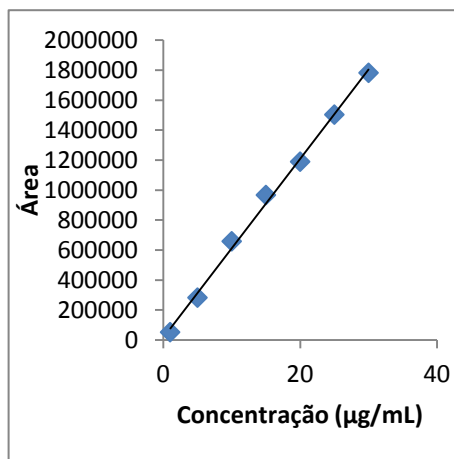
$$\text{(Inclinação) } a = 53225.25716$$

$$\text{(Intercepto) } b = 35544.89165$$

$$r^2 = 0.998675181$$

$$\text{(Inclinação) } a = 59226.32827$$

$$\text{(Intercepto) } b = 26201.77675 \quad 9447.918$$



PRECISÃO

Dia	Analista	N	a	b	Área	Conc. exp	Conc Teorica	Recuperação				
Dia 01	Analista 01	1	59226.33	26201.77675	926135	15.19481706	15.198	0.999790569	100	99.97905686	0.2533	
		2	59226.33	26201.77675	990095	16.27474219	15.018	1.083682394	100	108.3682394	0.2503	
		3	59226.33	26201.77675	959551	15.7590256	15.228	1.034871657	100	103.4871657	0.2538	
		4	59226.33	26201.77675	944561	15.5059287	15.03	1.031665249	100	103.1665249	0.2505	
		5	59226.33	26201.77675	996184	16.37755119	15.024	1.090092598	100	109.0092598	0.2504	
		6	59226.33	26201.77675	962241	15.80444459	15.102	1.046513348	100	104.6513348	0.2517	
									Média	104.7769303		
									CV =	3.408881801		
		Analista 02	1	59226.33	26201.77675	971676	15.96374874	15.036	1.061701832	100	106.1701832	0.2506
	2		59226.33	26201.77675	1005649	16.53736188	15	1.102490792	100	110.2490792	0.25	
	3		59226.33	26201.77675	1015655	16.70630701	15.132	1.104038264	100	110.4038264	0.2522	
	4		59226.33	26201.77675	1042162.8	17.15387485	15.006	1.143134403	100	114.3134403	0.2501	
5	59226.33		26201.77675	969002	15.9185999	15.024	1.059544722	100	105.9544722	0.2504		
6	59226.33		26201.77675	1009541	16.6030759	15.114	1.098522952	100	109.8522952	0.2519		
								Média	109.4905494			
								CV =	3.108995121			
Dia 02	Analista 01	1	59226.33	26201.77675	1009143.6	16.59636604	15.066	1.101577462	100	110.1577462	0.2511	
		2	59226.33	26201.77675	1113485	18.35810618	15.354	1.195656258	100	119.5656258	0.2559	
		3	59226.33	26201.77675	995912.3	16.37296371	15.114	1.08329785	100	108.329785	0.2519	
		4	59226.33	26201.77675	1006311	16.54853934	15.192	1.089293005	100	108.9293005	0.2532	
		5	59226.33	26201.77675	996919.9	16.38997641	15.21	1.077578988	100	107.7578988	0.2535	
		6	59226.33	26201.77675	997612.4	16.40166885	15.168	1.081333653	100	108.1333653	0.2528	
									Média	110.4789536		
									CV =	4.529835749		
		Analista 02	1	59226.33	26201.77675	1042162.8	17.15387485	15.006	1.143134403	100	114.3134403	0.2501
	2		59226.33	26201.77675	1024812.1	16.86091899	15.09	1.117357124	100	111.7357124	0.2515	
	3		59226.33	26201.77675	1047451.5	17.24317129	15.114	1.140874109	100	114.0874109	0.2519	

4	59226.33	26201.77675	975835.5	16.03397933	15.096	1.062134296	100	106.2134296	0.2516
5	59226.33	26201.77675	944754.9	15.50920258	15.09	1.027780158	100	102.7780158	0.2515
6	59226.33	26201.77675	1032350	16.98819178	15.042	1.129383844	100	112.9383844	0.2507
								Média	110.3443989
								CV =	4.748536701

EXATIDÃO

80%	59226.32827	26201.77675	797038.5	13.01510233	15.492	0.840117631	100	84.01176306	0.2582
	59226.32827	26201.77675	802761.7	13.11173503	15.216	0.861707087	100	86.17070868	0.2536
	59226.32827	26201.77675	826848.4	13.5184241	15.468	0.873960699	100	87.39606993	0.2578
								Média	
								=	
								CV =	1.713480346
100%	59226.32827	26201.77675	954035.7	15.66590316	15.18	1.032009431	100	103.2009431	0.253
	59226.32827	26201.77675	984370.3	16.17808416	15.246	1.061136309	100	106.1136309	0.2541
	59226.32827	26201.77675	984151.7	16.17439323	15.282	1.058395055	100	105.8395055	0.2547
								Média	
								=	
								CV =	1.60835871
120% (repetição)	62013.55177	44179.78752	1169050.1	18.13910477	15.144	1.197775011	100	119.7775011	0.2524
	62013.55177	44179.78752	1328029.2	20.70272345	15.144	1.367057808	100	136.7057808	0.2524
	62013.55177	44179.78752	1323857.4	20.63545106	15.45	1.3356279	100	133.56279	0.2575
								Média	
								=	
								CV =	9.004436287
120%	59226.32827	26201.77675	1051680.4	17.31457366	15.468	1.119380247	100	111.9380247	0.2578

59226.32827	26201.77675	1062510.9	17.49743996	15.426	1.134282378	100	113.4282378	0.2571
59226.32827	26201.77675	1019113	16.76469321	15.09	1.110980332	100	111.0980332	0.2515
							Média	112.1547652
							=	
							CV =	1.180125312

ROBUSTEZ

Condição	N	a	b	Área	Conc. exp	Conc. Teorica			Recuperação	
404nm C/ Luz	1	59226.33	26201.78	933311.6	15.31598952	15.24	1.004986189	100	100.4986	0.254
	2	59226.33	26201.78	948246.6	15.56815778	15.246	1.021130643	100	102.1131	0.2541
	3	59226.33	26201.78	955359	15.68824626	15.27	1.027390063	100	102.739	0.2545
							Média =	101.7836		
							CV =	1.155968		
404 nm S/ Luz	1	59226.33	26201.78	940917.6	15.44441214	15.348	1.00628174	100	100.6282	0.2558
	2	59226.33	26201.78	915846.5	15.02110209	15.03	0.99940799	100	99.9408	0.2505
	3	59226.33	26201.78	965477.7	15.85909427	15.144	1.047219643	100	104.722	0.2524
							Média =	101.7636		
							CV =	2.584929		
406 nm c/Luz	1	59226.33	26201.78	942787.1	15.47597749	15.24	1.015484087	100	101.5484	0.254
	2	59226.33	26201.78	916792.5	15.03707471	15.246	0.986296387	100	98.62964	0.2541
	3	59226.33	26201.78	953669.5	15.6597201	15.27	1.025521945	100	102.5522	0.2545
							Média =	100.9101		
							CV =	2.037697		
406nm s/ luz	1	59226.33	26201.78	932081.9	15.2952268	15.24	1.003623806	100	100.3624	0.254
	2	59226.33	26201.78	965279.5	15.85574778	15.246	1.039993951	100	103.9994	0.2541
	3	59226.33	26201.78	983266.2	16.15944211	15.27	1.058247683	100	105.8248	0.2545
							Média =	103.3955		