



**INSTITUTO
FEDERAL**
Rio de Janeiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Campus Realengo

Curso de Graduação
em Farmácia

Fernanda dos Santos Ocampo

**Desenvolvimento e
caracterização de
carreadores lipídicos
nanoestruturados
de anfotericina B**

Rio de Janeiro

2021

FERNANDA DOS SANTOS OCAMPO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE
ANFOTERICINA B**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial a
obtenção do grau de bacharel em Farmácia
pelo Instituto Federal de Educação Ciência e
Tecnologia do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Ferreira Ribeiro
Orientadora: Prof^a Dr^a Beatriz Ferreira de
Carvalho Patricio

RIO DE JANEIRO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Karina Barbosa dos Santos

Bibliotecária - CRB 7 nº 6212

O15

Ocampo, Fernanda dos Santos
Desenvolvimento e caracterização de arreadores Lipídicos
Nanoestruturados de Anfotericina B. / Fernanda dos Santos Ocampo, 2021.
61f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto
Federal do Rio de Janeiro, 2021.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Ana Ferreira Ribeiro.

Coorientador(a): Prof^a. Dra. Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio

1. Anfotericina B. 2. Leishmaniose. 3. Desenho experimental. 4.
Carreadores lipídicos. 5. Nanoestruturados. I. Instituto Federal do Rio de
Janeiro. Campus Realengo. II. Ribeiro, Ana Ferreira. III. Patricio, Beatriz Ferreira
de Carvalho. IV. Título.

COBIB/CReal

CDU 615

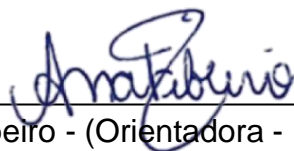
FERNANDA DOS SANTOS OCAMPO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE ANFOTERICINA B

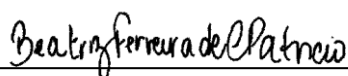
Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao Instituto
Federal do Rio de Janeiro como
requisito parcial para a obtenção
do grau de Bacharel em
Farmácia

Aprovado em 04/08/2021

Banca Examinadora



Prof. Dsc. Ana Ferreira Ribeiro - (Orientadora - IFRJ/ Campus Realengo)



Prof. Dr^a Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio - (Orientadora - UNIRIO)



Prof. Dr^a Flavia Fernandes Ferreira da Silva - (Membro Externo –
Farmanguinhos/Fiocruz)



Prof. Dr^a Michelle Alvares Sarcinelli - (Membro Externo – Farmanguinhos/
Fiocruz)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus por ter permitido e me concedido saúde e determinação para não desanimar durante todo o curso de graduação e a realização deste trabalho, além de possibilitar que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos.

A meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, pelo amor, carinho, apoio incondicional e incentivo demonstrado ao longo de toda minha vida, e principalmente no o período de tempo em que me dediquei a esta graduação.

A minha orientadora, Professora Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio, por me guiar no desenvolvimento desse TCC e tantos outros relatórios e apresentações, por ser fonte de inspiração como profissional e pessoa, por todos os conselhos, pela ajuda, confiança e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

A minha orientadora, Professora Ana Ferreira Ribeiro pelo suporte prestado no tempo que tivemos, por ser uma referência como mestre e pelos ensinamentos que me concedeu desde as aulas de farmacotécnica até esse período final do curso.

Ao professor, Francisco Alexandrino Junior por me ajudar desde o início no projeto de iniciação científica, pelas excelentes aulas e explicações que me concedeu, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso, por ser atencioso, prestativo e disposto a ajudar a qualquer momento.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Micro e Nanotecnologia, pela participação e doação do seu tempo e disponibilidade em cada etapa de atuação no período do meu projeto de iniciação científica.

Agradeço aos meus amigos, parceiros de curso e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

Ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte essencial e contínuo aos projetos executados no laboratório, permitindo o desenvolvimento e acesso de muitos pesquisadores a vários projetos de pesquisa ao longo dos anos, que acarretam em resultados, conhecimento e saúde para toda a população.

OCAMPO, F.S. Desenvolvimento e Caracterização de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de Anfotericina B. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

RESUMO

A leishmaniose é uma das principais doenças tropicais negligenciadas (DTN). Dentre os fármacos utilizados na terapêutica para o tratamento desta destaca-se a anfotericina B (AmB). Este fármaco apresenta baixa solubilidade em meios aquosos e baixa permeabilidade no trato gastrointestinal (TGI), por conta dessas características, há apenas formulações intravenosas de AmB disponíveis comercialmente. No entanto, essas apresentam efeitos adversos mais frequentes como náuseas, vômitos, febre, cefaleia, hipotensão, anemia e outros graves como nefrotoxicidade, além do alto custo e necessidade de hospitalização do paciente. Logo, o desenvolvimento de uma formulação oral de AmB tem o potencial de melhorar alguns desses empecilhos. As nanopartículas lipídicas destacam-se por facilitarem a permeação de fármacos pelas membranas das células do trato gastrointestinal e a absorção pela via linfática, assim como também possuem elevada biocompatibilidade, custo relativamente baixo e fácil transposição de escala em nível industrial. Dentre essas, destacam-se os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que são sistemas formados por uma mistura de tensoativo, lipídios sólidos (LS) e lipídios líquidos (LL), que devem ser miscíveis, garantindo, assim, o encapsulamento do fármaco. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um CLN contendo AmB para uso oral. Para isso, utilizou-se um desenho fatorial D-ótimo, no qual foram combinados 2 grupos de LS contendo 5 compostos ao todo, 2 LL e 2 tensoativos não iônicos. Foram elaboradas 16 formulações e como resposta do desenho experimental (variáveis dependentes) foram avaliados o tamanho das partículas (TP), índice de polidispersão (PDI) e concentração de AmB ([AmB]). Os resultados demonstram que, dentre as formulações avaliadas, a formulação 12 com a proporção Inwitor 900 (4%), Capmul MCM (1%), Tween 20 (5%) e água (90%) foi a que apresentou melhores resultados nos três parâmetros avaliados ([AmB] de 2 mg/g, 119 nm e PDI de 0,3). Entretanto, a formulação 1 com proporção Emprove® (4%), Phosal® 50 PG (1%), Poloxamer 188 (5%) e água (90%) apresentou maior ([AmB] de 4,84 mg/g) e bom PDI de 0,3, porém o TP (5086,0 nm) demonstrou valores muito altos, o que inviabilizaria a utilização para uma formulação por via oral, necessitando assim de mudanças nos processos produtivos para otimização desses parâmetros. Assim, conclui-se que a formulação desenvolvida apresenta elevada [AmB] e parâmetros biofarmacêuticos condizentes com o preconizado na literatura para adequada absorção oral. Testes adicionais de otimização dos CLN devem ser realizados a fim de avaliar seu desempenho *in vivo*.

Palavras-chave: Anfotericina B; leishmaniose, desenho experimental; Carreadores lipídicos nanoestruturados.

OCAMPO, F.S. Development and Characterization of Amphotericin B Nanostructured Lipid Carriers. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the main neglected tropical diseases (NTD). Among the drugs used in therapy for the treatment of potentially fatal leishmaniasis amphotericin B (AmB) stands out. This drug has low solubility in aqueous media and low permeability in the gastrointestinal tract (GIT), because of that, there are only commercially available AmB intravenous formulations. However, they present common side effects like nausea, vomiting, fever, headache, hypotension, anemia and more severe ones like nephrotoxicity. In addition, these formulations have high cost and demand hospitalization of the patient. Therefore, the development of an AmB oral formulation has the potential to eliminate these obstacles. Lipid nanoparticles stand out for facilitating the permeation of drugs through the membranes of cells in the gastrointestinal tract and absorption through the lymphatic route, as well as they also have high biocompatibility, relatively low cost and easy scale-up to industrial level. Among them, nanostructured lipid carriers (CLN) stand out, systems formed by a mixture of surfactant, solid lipids (LS) and liquid lipids (LL), which must be miscible, thus ensuring the encapsulation of the drug. Therefore, this work aimed to develop a CLN containing AmB for oral use. For this, a D-optimal factorial design was used, in which 2 groups of LS containing 5 compounds in total, 2 LL and 2 nonionic surfactants were combined. Sixteen formulations were developed and as a response to the experimental design (dependent variables) the particle size (TP), polydispersion index (PDI) and AmB concentration ([AmB]) were evaluated. The results demonstrate that, among the formulations evaluated, formulation 12 with the proportion Inwitor 900 (4%), Capmul MCM (1%), Tween 20 (5%) and water (90%) showed the best results in the three parameters evaluated ([AmB] of 2 mg/g, 119 nm and PDI of 0,3). Nonetheless, formulation 1 Composed by Emprove[®](4%), Phosal[®] 50 PG (1%), Poloxamer 188 (5%) and water (90%) showed higher AmB concentration([AmB] of 4.84 mg/g) and good PDI of 0.3, but the TP (5086.0 nm) showed very high values, which would make the use of an oral formulation unfeasible, thus requiring changes to optimize the production parameters. In conclusion, the formulation 12 presents high [AmB] levels and biopharmaceutical parameters consistent with those recommended in the literature for adequate oral absorption. Additional CLN optimization tests should be performed in order to assess their performance *in vivo*.

Keywords: Amphotericin B; leishmaniose; design experiment, Nanostructured lipid carriers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo.	17
Figura 2- Status de endemidade da leishmaniose visceral no mundo.	19
Figura 3- Estrutura química da anfotericina B, evidenciando suas propriedades anfífilas e anfotéricas.	22
Figura 4- Principais nanocarreadores dispostos em ordem cronológica.	25
Figura 5- Esquema mostrando a instabilidade dos nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) versus Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). O LS não deixa o fármaco se acomodar sendo expulso da matriz nos NLS, enquanto nos CLN, o fármaco se encaixa nas imperfeições e não é expulso da matriz.	26
Figura 6- Ilustração com a classificação dos CLNs.	27
Figura 7- Descrição esquemática do método de microemulsão.	29
Figura 8- Estrutura molecular (A) Emprove®, (B) Imwitor 900®, (C) Gelucire ® 44/14 e (D) Sterotex ®.	31
Figura 9- Amostras após o processo de fusão das fases e sonicação (A), centrifugação de 3 amostras diferentes (B) e liofilização de 3 amostras com aspecto viscoso e seco (C).	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Excipientes utilizados no desenho experimental como variáveis independentes para o preparo das formulações.	35
Quadro 2- Formulações propostas pelo desenho experimental para avaliação dos componentes do CLN contendo AmB.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores numéricos adotados na codificação de cada experimento utilizado no delineamento experimental.	39
Tabela 2- Resultado da caracterização de tamanho e PDI e	41
Tabela 3 - Resultado do R2 e R2 ajustado obtido a partir dos modelos de tamanho, PDI e eficiência de encapsulamento.	42
Tabela 4- Análise do p-valor para o modelo de concentração da AmB, tamanho e PDI.	43

LISTA DE SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AmB	Anfotericina B
AmB-D	Anfotericina B Desoxicolato
AmB-L	Anfotericina B Lipossomal
AmB-CL	Anfotericina B em Complexo Lipídico
ABCD	Anfotericina B em dispersão coloidal
ABLC	Complexo Lipídico de Anfotericina B
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
DCM	Diclorometano
DMPC	Diesteroilfosfatidilcolina
DMPG	Diesteroilfosfatidilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOC	Desoxicolato de Sódio
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EE%	Eficiência de Encapsulação
ELISA	Imunofluorescência Indireta
FA	Fase Aquosa
FO	Fase Oleosa
HAP	Homogeneização à Alta Pressão
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IFA	Insumo farmacêutico ativo
LC	Leishmaniose Cutânea
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LL	Lipídio Líquido
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LS	Lipídio Sólido
LV	Leishmaniose Visceral
MEG	Monoestearato de Glicerila
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas

OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PCS	Espectroscopia de Correlação de Fótons
PDI	Índice de polidispersão
RIFI	Imunoenzimático
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TGI	Trato Gastrointestinal
UV/Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	LEISHMANIOSE: DEFINIÇÃO, AGENTE ETIOLÓGICO, TRANSMISSÃO E VETOR.....	15
1.1.1	Leishmaniose Cutânea	16
1.1.2	Leishmaniose mucocutânea (LMC)	17
1.1.3	Leishmaniose Visceral	18
1.2	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	19
1.3	ANFOTERICINA B COMO TRATAMENTO PARA AS LEISHMANIOSES	20
1.4	NANOTECNOLOGIA PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COM AMB.....	24
1.5	CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS.....	26
1.5.1	Método de produção dos CLN	28
1.5.2	Parâmetros Físico-químicos dos CLN	29
1.6	LIPÍDIOS UTILIZADOS E SUAS PROPRIEDADES.....	31
1.6.1	Lipídios Líquidos	32
1.6.2	Lipídios Sólidos	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	GERAL	34
2.2	ESPECÍFICOS	34
3	METODOLOGIA	35
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.2	PREPARO DOS CLN	36
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS CLN.....	37
3.3.1	Tamanho de gotícula e índice de polidispersão	37
3.4	QUANTIFICAÇÃO DA AMB NOS CLN	37
3.4.1	Curva analítica	37
3.4.2	Quantificação da AmB	38
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	CURVA ANALÍTICA.....	40
4.2	RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	41
4.3	CURVA DE CALIBRAÇÃO	45

4.4	INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO LS-LL NA ENCAPSULAÇÃO.....	45
4.5	INFLUÊNCIA DO LL E LS NA ENCAPSULAÇÃO DA AMB.....	46
4.6	INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO LS-TENSOATIVO NA ENCAPSULAÇÃO DA AMB E TAMANHO DE PARTÍCULA	48
5	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE: DEFINIÇÃO, AGENTE ETIOLÓGICO, TRANSMISSÃO E VETOR

A leishmaniose é uma das principais doenças tropicais negligenciadas (DTN). Ela é causada por protozoários pertencentes ao reino *Protista*, filo *Protozoa*, subfilo *Sarcomastigophora*, classe *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (URQUHART *et al.*, 1998). Este protozoário digenético é encontrado sob duas formas: flagelada denominada promastigota, e aflagelada denominada amastigota, intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema fagocitário dos hospedeiros vertebrados (DUNAISKI, 2006). É transmitida a humanos pela picada de insetos da fêmea dos flebotomíneos infectados da ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gêneros *Lutzomyia*, subgêneros *Nyssomyia* e *Psychodopygus* (BRASIL, 2013).

São conhecidas 30 espécies de *Leishmania*, dentre elas, aproximadamente 20 delas são patogênicas para o homem (ASHFORD, 2000). A leishmaniose é uma infecção de caráter zoonótico, pois além do homem, consegue atingir animais selvagens e domésticos (BARRAL *et al.*, 1991). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2006).

A leishmaniose está distribuída mundialmente, mas a doença é endêmica em todos os continentes, exceto Oceania, com mais prevalência em regiões tropicais e subtropicais (BRASIL, 2014). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que a cada ano ocorram entre 700.000 e 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose no mundo (WHO, 2021). Nas duas últimas décadas houve um acréscimo na incidência da doença devido à migração de pessoas nas áreas endêmicas, as mudanças ambientais e climáticas e a degradação das condições socioeconômicas (GOTO e LINDOSO, 2010; WHO, 2018).

As apresentações clínicas da doença diferem de acordo com a espécie do parasito *Leishmania* que acomete o paciente. Podem variar desde a forma assintomática, lesões cutâneas e úlceras mucocutâneas até a forma visceral e letal.

Assim, as leishmanioses são classificadas em três formas clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2018). A última é a forma mais severa e quase sempre fatal, se não tratada (WHO, 2017; WHO, 2010).

Hoje, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e estão sob risco de infecção. Estima-se que 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC ocorram anualmente (WHO, 2021). Nas Américas, as leishmanioses estão presentes em 18 países e a forma clínica mais comum é a LC (OPAS, 2019).

As infecções por leishmaniose, como muitas outras DTNs, estão fortemente relacionadas à pobreza (ALVAR; BERN; YACTAY, 2006), e ocorrem principalmente em áreas rurais de países em desenvolvimento (ALVAR; BERN; MAGUIRE, 2008), onde as populações encontram barreiras para cuidados de saúde, saneamento, habitação e mudanças ambientais, como desmatamento (BIRLEY; MOLYNEUX; WALSH, 1993).

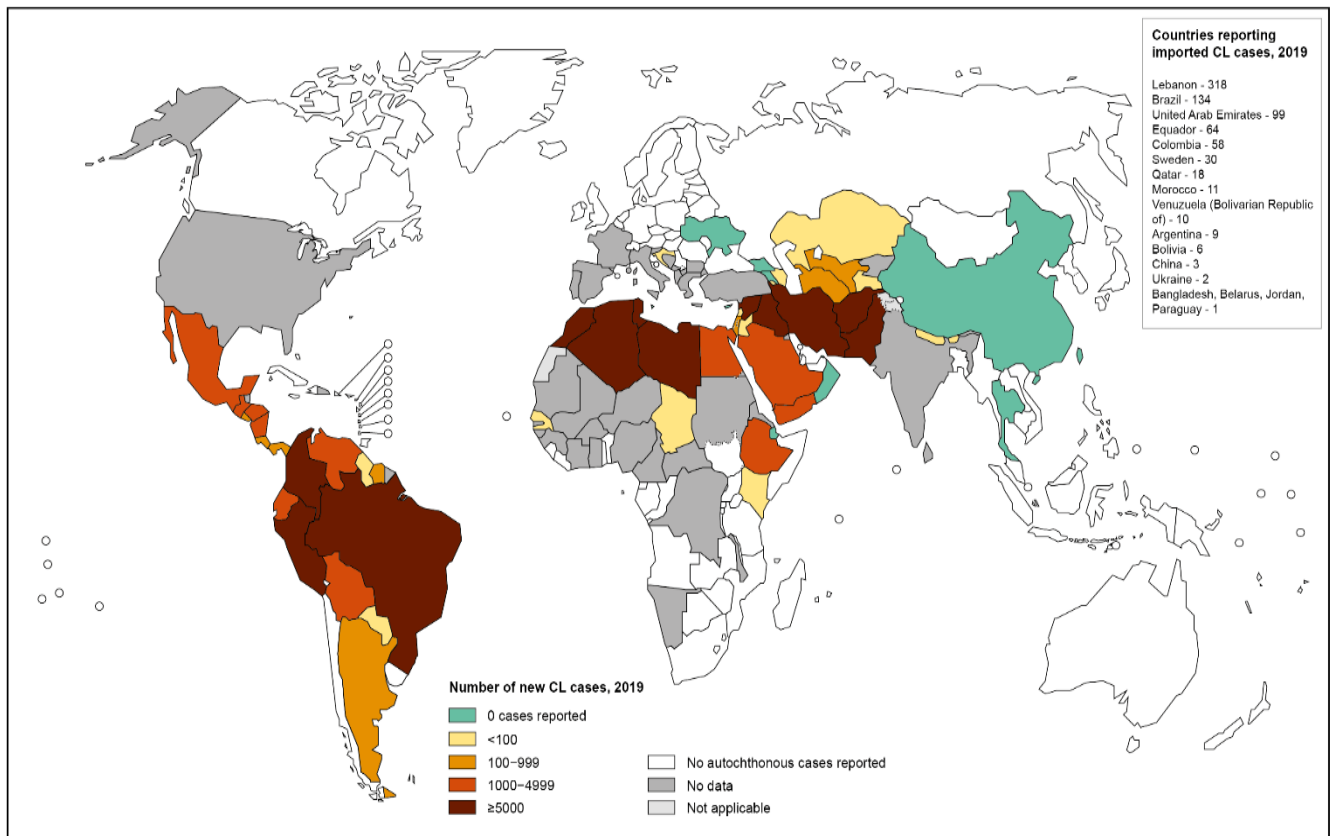
1.1.1 Leishmaniose Cutânea

A LC é a forma menos grave das doenças e é causada por várias espécies, como *L. major* e *L. tropica* na Europa, Ásia e África, e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis* em várias regiões da América Central e do Sul (GOTO; LINDOSO, 2012). A doença cutânea simples apresenta-se como ulcerativa singular ou lesões nodulares no local ou próximo ao local da exposição ao inseto, e são geralmente encontrados em áreas descobertas do corpo, como rosto, antebraços e pernas e evoluem ao longo de semanas a meses. O tempo de cicatrização pode levar de 3 a 18 meses em mais de 90% dos casos (MANDELL; BENNETT, 2005). O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos (BRASIL, 2010).

Em 2018, mais de 85% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Iraque, República Islâmica do Paquistão, República Árabe Síria e Tunísia (WHO, 2020). Estima-se que ocorram anualmente entre 600.000 e 1 milhão de novos casos desse tipo de leishmaniose em todo o mundo (WHO, 2021).

Na Figura 1 observa-se a incidência da leishmaniose cutânea no mundo em 2019. No continente americano, Brasil, Peru e Colômbia representam os países com maior índice de casos. Na África visualiza-se Marrocos, Argélia, Tunísia e Líbia. Já no continente asiático Iraque, Irã, Afeganistão e Paquistão englobam os países com altas taxas de leishmaniose cutânea.

Figura 1- Status de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo.



Fonte: OMS, 2020 (Adaptado).

1.1.2 Leishmaniose mucocutânea (LMC)

A LMC é causada por *L. braziliensis*, que pode ser devido à extensão, ou metástase do parasita, do local da pele com a doença até um local em tecido mucocutâneo. Essa forma da doença pode se desenvolver em meses (1 a 3) a anos após a resolução das lesões primárias, sendo muitas vezes uma infecção desfigurante resultante da destruição local crônica de tecido do nariz, boca, orofaringe, nasofaringe e pálpebras e pode, progressivamente, afetar a função respiratória e dificultar nutrição (OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

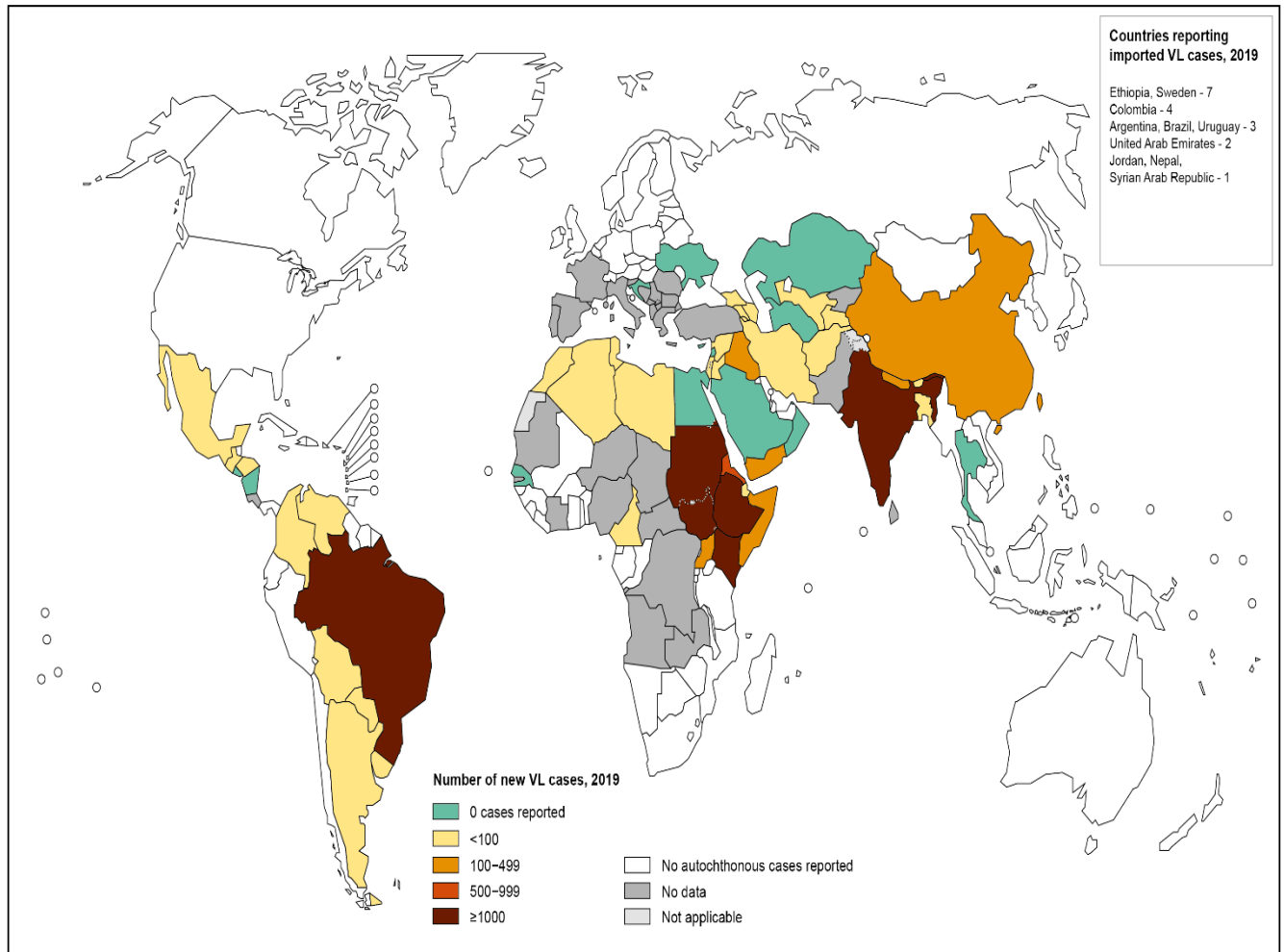
1.1.3 Leishmaniose Visceral

A LV, também conhecida como calazar, resulta da invasão dos parasitas e macrófagos infectados por parasitas do local inicial da infecção cutânea para o sangue e depois para os fagócitos dentro do sistema reticuloendotelial (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Na Índia, Paquistão, China e África, a LV é causada por *L. donovani* e no Mediterrâneo é *L. infantum* (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Nas américas, essa forma da doença também é causada por *L. infantum*, que é encontrada principalmente no Brasil (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013). O período de incubação da LV varia de 10 dias a 24 meses, com média entre 2 a 6 meses (BRASIL, 2006). Os sintomas incluem febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia (geralmente baço muito maior que o fígado), linfadenopatia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001). A morte geralmente ocorre devido a infecções bacterianas secundárias graves na doença avançada (KAFETZIS, 2003; WERNECK *et al.*, 2003).

Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo anualmente, sendo relatados à OMS apenas 25 a 45% dos casos, e em 2019, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (OMS, 2021). A taxa de mortalidade desse tipo de leishmaniose é de 10%, apresentando-se como a segunda infecção parasitária tropical mais letal do mundo, perdendo apenas para Malária (HANDLER *et al.*, 2015).

Na Figura 2, pode-se constatar que o Brasil concentra a maior quantidade dos casos na América. No continente Africano, observa-se a presença de muitos surtos de LV na região Oriental (Sudão, Etiópia e Quênia), já na Ásia apresenta-se o maior número de casos na Índia e China.

Figura 2- Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo.



Fonte: OMS, 2020 (Adaptado).

1.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Na realização do diagnóstico da Leishmaniose utiliza-se algumas técnicas tanto para a humana como na canina. A sensibilidade de cada método de diagnóstico pode variar de acordo com cada técnica, a qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (BRASIL, 2010). O diagnóstico laboratorial da leishmaniose se constitui fundamentalmente de três grupos de exames: os exames parasitológicos que são feitos através da demonstração do parasito por exame direto ou cultivo de material obtido dos tecidos infectados (medula óssea, pele ou mucosas da face) por aspiração, biópsia ou raspado das lesões; exames sorológicos como o teste cutâneo de Montenegro, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e *Enzyme Linked*

Immuno Sorbent Assay (ELISA) que são métodos imunológicos que avaliam a resposta de células do sistema imunológico e a presença de anticorpos anti-*Leishmania*; e exame molecular de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) que detectam a presença de ácidos nucleicos do parasito (FIOCRUZ, 2021).

Para iniciar o tratamento, é necessário a confirmação do diagnóstico levando em consideração a critérios clínicos e laboratoriais, ou, quando não for possível a realização dos exames laboratoriais, ou os mesmos obtiverem resultados negativos, devem ser levados em conta os critérios clínicos e epidemiológicos (BRASIL, 2007).

Os medicamentos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sb+5). Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb+5/kg/dia, havendo 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, 2017). Entretanto, esses produzem diversos efeitos adversos severos como pancreatite aguda, insuficiência renal e cardiotoxicidade. Logo, devido a toxicidade e o aumento das taxas de resistência do parasita registrados em diferentes regiões do mundo causando a diminuição da eficácia desses fármacos, busca-se fármacos alternativos (TIUMAN *et al.*, 2001). Assim, não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, os medicamentos de segunda escolha são a anfotericina B (AmB) e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina). O primeiro é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular (BRASIL, 2017).

1.3 ANFOTERICINA B COMO TRATAMENTO PARA AS LEISHMANIOSES

A AmB além da ação antifúngica, é comercialmente o medicamento leishmanicida mais potente disponível, com ação nas formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (THAKUR; NARAYAN, 2004). Seu início de uso para este objetivo se deu a partir de 1960 como possibilidade para o tratamento de LV e LC (BVS, 2021).

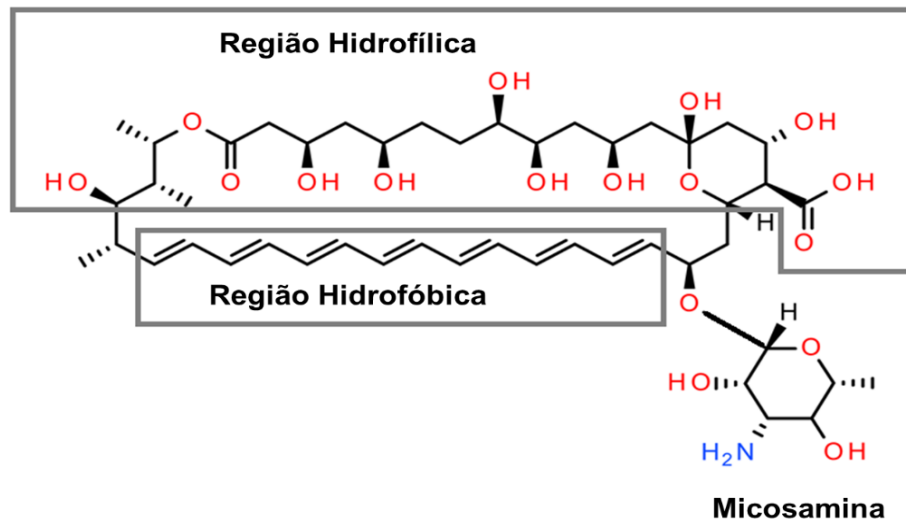
Esse fármaco possui preferência de interação com o ergosterol, esteroide presente na parede celular fúngica e do parasita. Tal fato acarreta na formação de

poros transmembranares, resultando em um rápido efluxo de íons K^+ e Mg^{2+} ; influxo de H^+ ; e inibição da glicólise. Por consequência, ocasiona a acidificação do interior do microrganismo e precipitação do citoplasma, causando a morte celular (FILIPPIN; SOUZA, 2006; LEMKE *et al.*, 2005). Além disso, a AmB também causa dano oxidativo às células com a formação de radicais livres e, subsequentemente, aumento da permeabilidade da membrana (OSAKA *et al.*, 1997).

Apesar da AmB se ligar preferencialmente ao ergosterol, também pode ligar-se ao colesterol, o esterol mais abundante encontrado nas membranas de células de mamíferos (GHANNOUM; RICE, 1999), por isso sua administração em humanos deve ser controlada. Devido a essa interação, esse fármaco pode causar graves efeitos adversos em humanos e é considerado um dos antibióticos mais tóxicos (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). Os efeitos adversos mais frequentes são náuseas, vômitos, febre, cefaleia, hipotensão, anemia e principalmente nefrotoxicidade (LEMKE; KAYSER; KIDERLEN, 2005).

A AmB apresenta uma complexa estrutura contendo um anel não aromático, além dela ser dividida em uma região hidrofílica (poliol) e uma região hidrofóbica (cadeia heptadiênica), esta última sendo responsável pela formação de quatro bandas no espectro de absorção ultravioleta-visível (UV/Vis) na faixa 420-320 nm (FILIPPIN E SOUZA, 2006; SERRANO; LALATSA, 2017). Além do mais, possui caráter anfotérico em função da presença de uma porção aniônica (ácido carboxílico) e catiônica (grupamento micosamina). A presença desses grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (Figura 3), assim como a ocorrência de simetria na ionização dos grupamentos amino e ácido carboxílico, proporcionam relevante diminuição na solubilidade aquosa da AmB em pH fisiológico ($<1\text{mg.L}^{-1}$ em $\text{pH} \sim 7,4$) (LIPINSKI *et al.*, 2001). Por conta disso, esse fármaco possui baixa solubilidade nos fluidos gastrintestinais e é pouco permeável através das membranas biológicas do trato gastrintestinal (FLEISHER *et al.*, 1999). Sendo, portanto, classificado como fármaco de classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON; LENNERNÄS *et al.*, 1995). Assim, observa-se biodisponibilidade oral que varia entre 0,2% a 0,9% (HALDE; NEWCOMER *et al.*, 1957), que resulta em falha terapêutica mesmo após administração oral de doses tão elevadas quanto 16 g/dia (HALDE; NEWCOMER *et al.*, 1957).

Figura 3- Estrutura química da anfotericina B, evidenciando suas propriedades anfílicas e anfotéricas.



Fonte: modificado de Faustino e Pinheiro (2020).

Devido à baixa absorção e biodisponibilidade oral, há apenas formulações intravenosas de AmB disponíveis comercialmente (GHADI; DAND, 2017). A primeira disponibilizada é utilizada até os dias atuais (Fungizone[®], Bristol-Meyers Squibb), e constitui-se de 50 mg de AmB, aproximadamente 41 mg de desoxicolato de sódio (DOC) (utilizado para solubilizar a AmB) e 20,2 mg de tampão fosfato. Apesar dessa formulação ser considerada por muitos anos o padrão-ouro para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e leishmaniose, uma progressiva substituição por formulações lipídicas contendo AmB tem ocorrido principalmente devido a nefrotoxicidade pelo uso do Fungizone[®] (FALCI; PASQUALOTTO, 2015). Tal fato ocorre possivelmente devido a dois mecanismos envolvidos: o primeiro é um mecanismo vascular com disfunção do fluxo sanguíneo renal e o segundo é resultado de lesões diretas à célula tubular, resultando na redução da taxa de filtração glomerular, distúrbios hidroeletrólíticos e ácido-básicos (BERDICHEVSKI, 2003).

Nas formulações lipídicas, este efeito adverso é reduzido. Uma explicação seria que a AmB lipossomal (AmB-L), como outras formulações lipídicas, possui afinidade maior por lipoproteínas de alta densidade (HDL) do que lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (WALSH *et al.*, 2001). A ligação às moléculas de HDL ocasiona a captação pelo sistema reticuloendotelial, que possui alta expressão de receptores HDL (diferente do tecido renal, com expressão aumentada de receptores LDL). A

captura preferencial de AmB-L pelos macrófagos hepáticos e esplênicos do sistema reticuloendotelial e concentração renal baixa contribui para a redução da nefrotoxicidade e para a melhora do índice terapêutico de AmB-L, em comparação à Fungizone® (WALSH *et al.*, 2001).

Existem, hoje, três formulações lipídicas disponíveis no mercado. A primeira delas, Ambisome®, na qual a AmB está encapsulada em lipossomas. Essa formulação possui em sua composição além do insumo farmacêutico ativo (IFA), fosfatidilcolina de soja hidrogenada, distearoil fosfatidilglicerol e colesterol. Os componentes são fornecidos liofilizados como um pó e devem ser reconstituídos em água imediatamente antes do uso, produzindo lipossomas com um diâmetro médio de 60-70 nm (ADLER-MOORE, PROFFITT, 2002).

A segunda formulação seria Abelcet® é o complexo lipídico de AmB (AmB-CL) que consiste em um complexo macromolecular constituído de diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) (FILIPPIN; SOUZA, 2006). A formulação possui toxicidade reduzida comparando com a Fungizone®. Por fim, Amphotec® ou Amphocil® é a dispersão coloidal de AmB (ABCD) em sulfato de colestera sódica, formulada em partículas discóides ou microdiscos com diâmetro médio de 122 nm (ROBINSON; NAHATA, 1999). Essa formulação apresenta uma eficácia antifúngica parecida ao AmB-D sendo menos citotóxico (BAGINSKI; CZUB, 2009).

Dentre as formulações lipídicas, AmB-L e ABLC são as mais usadas na prática clínica e disponíveis no mercado brasileiro. A AmB está disponível no SUS por meio do Componente Estratégico da Assistência Farmacêutica na forma de apresentação: AmB solução injetável 50 mg, AmB complexo lipídico solução injetável 100 mg e AmB lipossomal solução injetável 50 mg. No caso do tratamento específico de Leishmaniose apenas são empregadas na forma injetável primeira ou a última formulação (BRASIL, 2015).

Ressalta-se, no entanto, que apesar das formulações lipídicas de AmB apresentem vantagens significativas com relação aos efeitos adversos, elas ainda possuem desvantagens quanto ao alto custo, necessidade de administração por via parenteral e hospitalização do paciente (NEVES *et al.*, 2011).

1.4 NANOTECNOLOGIA PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COM AMB

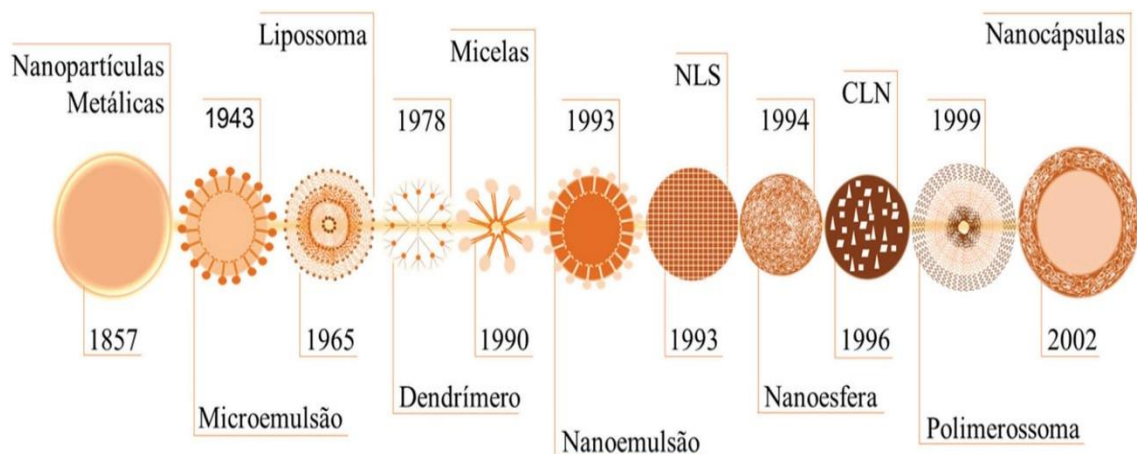
O desenvolvimento de formulações que permitam a administração oral da AmB, e, portanto, um tratamento ambulatorial para leishmanioses e pacientes com doenças fúngicas, parece ser uma possível alternativa para melhorar a adesão do paciente ao tratamento. Esse tipo de formulação apresenta maior aceitação e adesão do paciente ao tratamento, sendo também mais segura (AL-QUADEIB *et al.*, 2015). Dessa forma, diversos estudos têm sido conduzidos com intuito de desenvolver formulações alternativas e que possibilitem a administração desse fármaco pela via oral (AL-QUADEIB *et al.*, 2015). Dentro das alternativas, a nanotecnologia tem se destacado por suas vantagens (TAMJIDI *et al.*, 2013).

Os nanocarreadores podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de formulações com administração oral por facilitarem a absorção no trato gastrointestinal de fármacos com baixa solubilidade e permeabilidade, além de possibilitar que esse processo ocorra pela via linfática, evitando assim, efeito de primeira passagem (FANG *et al.*, 2008). Além disso, esse sistema possui elevada biocompatibilidade, custo relativamente baixo e fácil transposição de escala laboratorial para nível industrial (TAMJIDI *et al.*, 2013; BELOQUI *et al.*, 2017; GANESAN; NARAYANASAMY, 2017; GHADI; DAND, 2017). Ainda, esses sistemas de liberação de fármacos têm oferecido importantes avanços no tratamento de leishmanioses. Visto que um dos maiores problemas no tratamento dessa doença consiste no fato de que a *Leishmania spp* infecta o macrófago, e, portanto os fármacos tradicionais utilizados no tratamento possuem dificuldade de serem internalizados por essas células e assim agir contra o parasita (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016).

Os nanocarreadores mais utilizados como sistemas de liberação são nanopartículas metálicas, lipídicas e poliméricas, além de lipossomas e nanocristais, como procedimento para o avanço da eficácia e segurança no tratamento de leishmanioses (ALMEIDA *et al.*, 2017; GUTIÉRREZ *et al.*, 2016). No entanto, destaca-se que o uso de formulações lipídicas como forma de veicular fármacos lipossolúveis e/ou com baixa absorção oral vem crescendo na literatura de uma forma geral (FRICKER *et al.*, 2010; POUTON; PORTER, 2008).

Os sistemas lipídicos nanoestruturados mais encontrados com interesse farmacêutico são os lipossomas (LOPEZ-BERESTEIN *et al.*, 1983; HOSPENTHAL, ROGERS, MILLS, 1988; HOSPENTHAL, GRETZINGER, ROGERS, 1989; CHOPRA *et al.*, 1991), as microemulsões, as nanoemulsões (KIRSH *et al.*, 1988; MIYAZAKI *et al.*, 1990; CHAVANET *et al.*, 1992), as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005; ETHERIDG *et al.*, 2013). A Figura 4 esquematiza em ordem cronológica a descrição a literatura desses sistemas nanoestruturados.

Figura 4- Principais nanocarreadores dispostos em ordem cronológica.



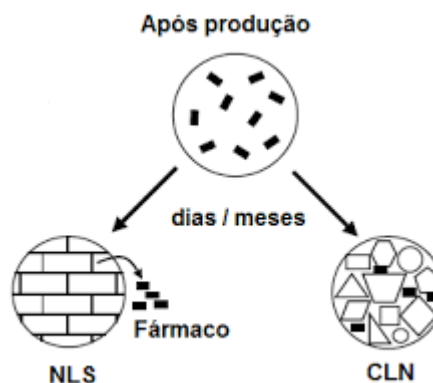
Fonte: Apolinário e colaboradores (2020).

Ainda na década de 90 surgiram as NLS (Figura 4), que são compostas de uma matriz lipídica, sólida a temperatura corporal, na qual o fármaco ficaria disperso (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). Essas vieram com o intuito de combinar diferentes características encontradas em outros tipos de sistemas de liberação nanoparticulados, como a possibilidade de escalonamento, baixa toxicidade (assim como emulsões e lipossomas); e possibilidade de liberação controlada, devido a presença de matriz sólida (similar a nanopartículas poliméricas) (SCHWARZ; MEHNERT, 1999).

Contudo rapidamente foram detectadas algumas limitações desse sistema como baixa concentração de fármaco incorporado e principalmente a expulsão do mesmo ao longo do período de estocagem (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a). Tal fenômeno é comum devido ao processo de cristalização dos lipídios, ou seja, as moléculas se reorganizarem em busca de uma forma mais estável e com maior grau

de compactação, deixando pouco espaço para o fármaco, como mostrado na Figura 5 (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b). Este efeito tende a ser mais pronunciado para fármacos com moléculas grandes como a AmB (TAMJIDI *et al.*, 2013).

Figura 5- Esquema mostrando a instabilidade dos nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) *versus* Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). O LS não deixa o fármaco se acomodar sendo expulso da matriz nos NLS, enquanto nos CLN, o fármaco se encaixa nas imperfeições e não é expulso da matriz.



Fonte: MULLER; RADTKE; WISSING, 2002.

1.5 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Como alternativa para este possível problema de estabilidade das NLS foram desenvolvidos os CLN. Eles são formados por uma mistura de lipídios sólidos (LS) com lipídios líquidos (LL) que devem ser espacialmente incompatíveis, garantindo, assim, a presença de imperfeições na matriz lipídica. Dessa forma, a utilização da mistura de lipídio sólido e líquido nesse sistema retarda a transição polimórfica e diminui o índice de cristalinidade, aumentando tanto a estabilidade do sistema, como a eficiência de encapsulação (MARCATO, 2009), uma vez que, nesse espaço, seria possível acomodar o fármaco, aumentando a capacidade de sua incorporação e reduzindo sua expulsão durante o tempo de estocagem (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a).

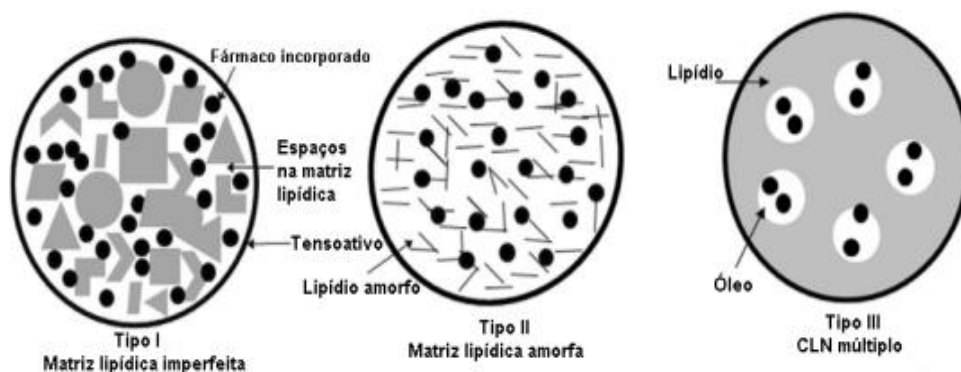
Os CLN apresentam vantagens em relação as NLS como: maior capacidade de carregar alguns ativos tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, menor quantidade de água na dispersão, impedir ou minimizar a expulsão do medicamento durante o armazenamento (melhor estabilidade física), utilizar lipídios biodegradáveis e

biocompatíveis e evitar solventes orgânicos na sua produção (JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2016).

Além disso, os CLN apresentam potencial para administração por via oral por facilitarem a permeação de fármacos pelas membranas das células do trato gastrointestinal e a absorção pela via linfática, evitando assim efeito de primeira passagem (FANG *et al.*, 2008). Também possuem elevada biocompatibilidade, custo relativamente baixo e fácil transposição de escala em nível industrial (TAMJIDI *et al.*, 2013; BELOQUI *et al.*, 2017; GANESAN; NARAYANASAMY, 2017; GHADI; DAND, 2017). Dessa forma, os CLN proporcionam recursos para que o desenvolvimento de formulações para administração por via oral ocorra de forma eficiente e promissora.

Embora esse sistema apresente numerosas vantagens, estas estão diretamente relacionadas as suas propriedades físico-químicas, que, por sua vez, dependem da composição e dos parâmetros de produção (TAN *et al.*, 2010). Os CLN podem apresentar-se na forma de três modelos distintos de incorporação de acordo com o método de produção e composição da mistura dos lipídios (Figura 6) (MARQUES, 2009).

Figura 6- Ilustração com a classificação dos CLNs.



Fonte: adaptado de (TAMJIDI *et al.*, 2013).

O Tipo I consiste na mistura de lipídios diferentes (LS e LL), fazendo com que haja distanciamento entre as cadeias dos ácidos graxos, e assim produza lacunas entre os triglicerídeos, e conseqüentemente ocorra a formação de cristais imperfeitos. Essas imperfeições geram mais espaço para acomodar maior quantidade do ativo,

umentando, desta maneira, a eficiência de encapsulamento. Este modelo é conhecido como “CLN imperfeito” (MARCATO, 2009).

No Tipo II, conhecido como “CLN amorfo”, ocorre quando alguns tipos de lipídios que não recristalizam após o tempo de arrefecimento, e assim produzem estruturas amorfas que favorecem a não ocorrência do processo de expulsão do fármaco (MARCATO, 2009).

Já o Tipo III, chamado de “CLN múltiplo”, pode ser considerado um análogo da emulsão água em óleo em água, isto é, uma dispersão de óleo em lipídio sólido em água. Neste modelo, a solubilidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é excedida levando a uma separação de fase e formação de nanocompartimentos de óleo dentro da matriz lipídica sólida. Geralmente, os princípios ativos possuem maior solubilidade em óleos do que em LS, assim o fármaco é dissolvido no óleo além de permanecer protegido pelo LS (MARCATO, 2009).

Sendo assim, pode-se desenvolver CLN de acordo com os critérios e objetivos escolhidos na etapa de elaborar uma formulação, como por exemplo: CLN com maior capacidade de encapsulação do ativo, menor expulsão do fármaco e maior incorporação do ativo que possui maior solubilidade no LL. Logo, o tipo de lipídio, assim como a mistura dos mesmos podem influenciar a organização estrutural dos CLN, proporcionando a modificação de características físicas das dispersões como diâmetro, tamanho, capacidade de encapsulamento do fármaco, assim como outros (CARVALHO, 2016). Portanto, o estudo prévio dos excipientes utilizados na produção desses CLN é imprescindível para a obtenção do resultado esperado ser alcançado.

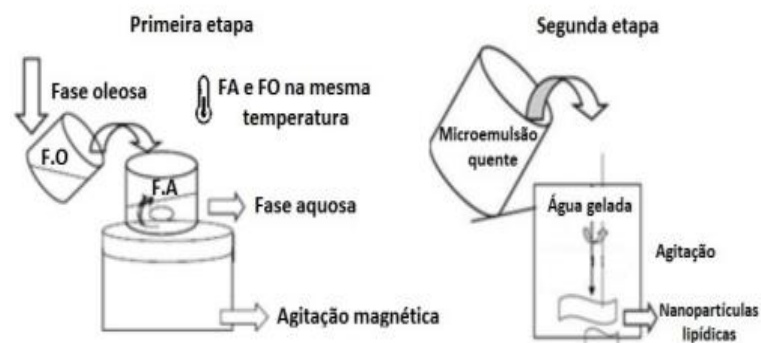
1.5.1 Método de produção dos CLN

Vários métodos são utilizados na preparação das NLS e CLN, a saber: homogeneização à alta pressão (HAP), emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, *spray-drying* e microemulsão à quente (GASCO, 1993, CARNEIRO *et al.*, 2019).

O método de microemulsão à quente foi desenvolvido por Gasco e colaboradores (1993) e modificado por diversos grupos. As microemulsões são preparadas por agitação, contendo tipicamente: 10% de lipídio fundido, 15% de surfactante, acima de 10% de co-surfactante e água. Esta microemulsão é produzida com a fusão da fase oleosa e aquecimento da fase aquosa separadamente. Em

seguida as mesmas são misturadas e a microemulsão formada, que ainda está quente é vertida sobre água resfriada (2-3°C) sob agitação a uma razão de diluição microemulsão:água previamente determinada formando então os CLN (Figura 7) (MARGULIS-GOSHEN; MAGDASSI, 2013). Esse método possui a vantagem de não necessitar do uso de solventes orgânicos.

Figura 7- Descrição esquemática do método de microemulsão.



Fonte: adaptado de (TEJA; CHOWDARY; RAJU, 2014).

O método de microemulsão é, em geral, utilizado para encapsular ativos lipofílicos, mas ativos hidrofílicos também podem ser encapsulados utilizando emulsão água em óleo em água na etapa de formação da microemulsão (HOU *et al.*, 2003). Este método de produção é preferido em relação ao HAP devido ao menor custo de produção e a possível utilização de compostos lábeis ou instáveis à pressão exercida pelo HAP (SILVA *et al.*, 2011).

1.5.2 Parâmetros Físico-químicos dos CLN

Os CLN são caracterizados segundo diversos critérios, como carga superficial (Potencial Zeta), tamanho e PDI, Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS), morfologia (Microscopia de Força Atômica (AFM), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica por Criofatura), ponto de fusão (DSC) (Calorimetria) estruturas cristalinas (Difração de Raio X), eficiência de encapsulação (EE%), capacidade de ligação ao ativo (Espectroscopia por Ultravioleta e (HPLC) cromatografia líquida de alta performance), dentre outros (TOMAZINI; DURÁN; VAUGHN, apud TOMAZINI; DURAN; VAUGHN, 2007).

Essas técnicas de caracterização proporcionam a identificação de propriedades das partículas e as características de cada sistema, se tornando fundamental na compreensão das atividades biológicas dos mesmos (CARVALHO, 2016). Pode-se constatar que existem métodos de caracterização diretos, aqueles que conseguem obter resultados de forma instantânea, como é o caso da microscopia, além de outros métodos que podem ser chamados indiretos, que aplicam algum tipo de relação / equação matemática para obter o resultado, como é o caso das técnicas de difração (WYNN, 2012). Assim, verifica-se que cada método apresenta vantagens e desvantagens, e para selecionar os mesmos deve-se levar em consideração características relacionadas com o tipo de amostra, a informação que se pretende obter, custo de cada técnica, ou tempo necessário obtenção dos resultados (CARVALHO, 2016). Os parâmetros adequados para desenvolver CLN para via oral são diâmetro hidrodinâmico entre 50 a 300 nm, visto que partículas com tamanho inferior a 250 nm são consideradas como bons sistemas de administração de fármacos, pois podem interagir com barreiras biológicas e melhorar o potencial terapêutico do fármaco (ALEXIS *et al.*, 2008); PDI abaixo de 0,3, pois são indicativos de diâmetros monodispersos e uniformes de populações de nanopartículas (LIPPACHER *et al.*, 2001; MITRI *et al.*, 2011) e potencial zeta pelo menos 25 mV (negativo ou positivo), uma vez que com esse resultado, irá ocorrer uma repulsão eletrostática que será capaz de garantir uma partícula afastada da outra, evitando a aproximação/ fusão das mesmas (THE ZETA POTENTIAL, 1999).

Existem alguns trabalhos realizados recentemente utilizando os CLN como forma de veicular a AmB, como por exemplo de Lakhani e colaboradores (2015) que buscaram otimizar CLN para administração ocular e de Ling, Roberts e Billa (2019) que revestiram os CLN com quitosana para observar propriedades antifúngicas e mucoadesivas. Entretanto, esses experimentos não utilizaram CLN constituído apenas por LL, LS, tensoativo e água para veiculação de AmB na liberação do fármaco por via oral, o que torna este trabalho diferente e inovador. Ainda assim, esses experimentos citados acima conseguiram aumentar o conhecimento sobre os CLN, fazendo com que novas pesquisas possam ser realizadas através desses dados, além de terem obtido resultados promissores na otimização da liberação do fármaco, estabilidade química e biocompatibilidade para a elaboração de novos CLN.

1.6 LIPÍDIOS UTILIZADOS E SUAS PROPRIEDADES

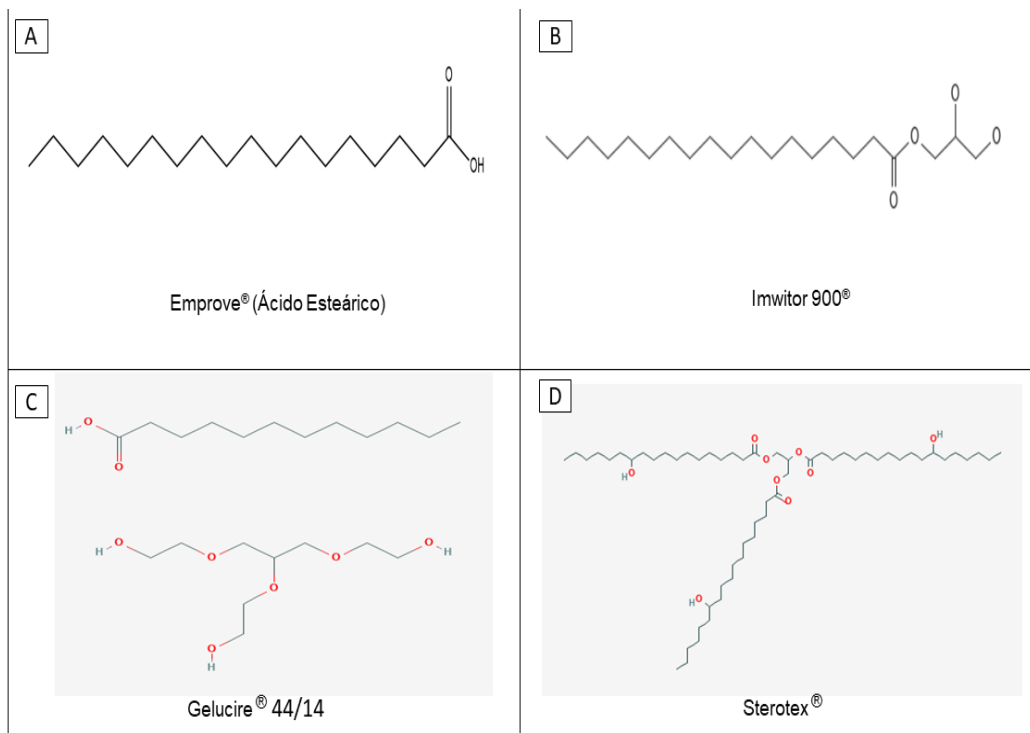
Os lipídios são moléculas orgânicas formadas a partir de ácidos graxos e álcool que desempenham importantes funções no organismo dos seres vivos. Apresentam propriedades comuns como: relativamente insolúveis na água e solúveis nos solventes não polares, tais como: o éter, o clorofórmio, os óleos, os esteróides e as ceras (Botham & Mayes, 2012). São classificados em dois grandes grupos quanto ao seu ponto de fusão:

- Gorduras: glicerídeos de ácidos saturados são "sólidas" à temperatura ambiente produzidas por animais.

- Óleos: glicerídeos de ácidos insaturados são líquidos à temperatura ambiente produzidas por plantas.

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados dois lipídios líquido (LL): Phosal[®] 50PG e Capmul MCM EP/NF; e quatro lipídios sólidos (LS): Emprove[®], Monoestearato de Glicerila, Gelucire[®] 44/14 e Sterotex[®] (Figura 8).

Figura 8- Estrutura molecular (A) Emprove[®], (B) Imwitor 900[®], (C) Gelucire[®] 44/14 e (D) Sterotex[®].



Fonte: Adaptado de Pubchem, 2021

1.6.1 Lipídios Líquidos

O Phosal® 50PG é uma mistura lipídica composta principalmente por lecitina, propilenoglicol, monodiglicerídeos de girassol e palmitato de ascorbil. É usado como dispersante, co-emulsificante, intensificador de penetração na administração transdérmica e potencializador de biodisponibilidade na administração oral de medicamentos. Possui coloração amarelo escuro e apresenta-se em estado líquido a temperatura ambiente, com viscosidade 150 - 350 mPas a 25°C e densidade 1,001 - 1,020 (PUBCHEM, 2021a).

O Capmul MCM EP/NF é usado como um transportador em sistemas de entrega de fármacos à base de lipídios para formulações líquidas ou semissólidas. É eficiente na solubilização ou dispersão de substâncias ativas e lipídios polares, um emulsificante ou co-emulsificante de escolha na preparação de microemulsões à base de lipídios estáveis e auto-emulsificantes e também é eficaz em sistemas de liberação de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) quando incorporado como um emulsificante ou co-emulsificante de água em óleo (a/o) de baixo HLB. Possui massa molar de 218,29 g/mol, e também é conhecido como Monocaprilina, 2,3-dihidroxipropil octanoato e Monoctanoína (PUBCHEM, 2021b).

1.6.2 Lipídios Sólidos

O Emprove® (ácido esteárico ou ácido octadecanóico) é um ácido graxo saturado de cadeia longa (18 carbonos). Ele é encontrado em várias gorduras animais e vegetais, e é o principal componente da manteiga de cacau e da manteiga de karité com um aspecto sólido branco com um odor suave. Sua massa molar é de 284.48 g/mol, seu ponto de fusão está entre 68° a 70°C, densidade de 0.845 g/cm³. Esse LS é ligeiramente solúvel em etanol e benzeno; e solúvel em acetona e clorofórmio (PUBCHEM, 2021c).

O Monoestearato de Glicerina (octadecanoato de 2,3-dihidroxipropil) é um éster composto principalmente de ácido palmítico, ácido esteárico e glicerol derivados de fontes vegetais. É amplamente utilizado em preparações farmacêuticas e atua como co-emulsificante, lubrificante, plastificante, adjuvante de dispersão, agente de incorporação, aglutinante ou regulador de consistência.

Possui massa molar de 358,6 g/mol, ponto de fusão de 74°C, sendo insolúvel em água e solúvel em óleos quentes e solventes orgânicos (PUBCHEM, 2021d).

O Gelucire® 44/14 é um surfactante dispersível em água não iônico recomendado para uso em formulações de base lipídica para aumentar a solubilidade aquosa e a biodisponibilidade oral de fármacos fracamente solúvel em água. Consiste em glicerídeos e ésteres de PEG de gordura de vários comprimentos de cadeia. Possui ponto de fusão de 38° a 43°C, densidade de 1,023 a 50 °C, sendo solúvel em etanol, clorofórmio e cloreto de metileno (PUBCHEM, 2021e).

Serotex® (2,3-bis (12-hidroxiocetadecanoiloxi) propil 12-hidroxiocetadecanoato) é amplamente utilizado como lubrificante na fabricação de comprimidos nas indústrias farmacêutica e de suplementos alimentares. Ele é um éster orgânico neutro (triglicerídeo) derivado de óleos vegetais renováveis que são totalmente refinados. Possui massa molar de 939,5g/mol (PUBCHEM, 2021f).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Preparar nanocarreadores lipídicos contendo anfotericina B e avaliar as propriedades físico-química dos mesmos.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Identificar quais LS, LL e tensoativo são adequados para o preparo dos CLN;
- b) Produzir e caracterizar CLN contendo AmB quanto ao tamanho e PDI;
- c) Produzir e caracterizar CLN secos contendo AmB quanto a concentração de AmB;
- d) Análise estatística dos resultados obtidos;
- e) Analisar a influência dos LL, LS e tensoativos nos parâmetros físico-químicos dos NCL.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para os experimentos realizados nesta pesquisa, foi utilizado delineamento experimental por desenho fatorial D-ótimo, que teve como objetivo facilitar a escolha dos componentes da formulação, permitindo determinar a relação entre as variáveis controláveis (independentes) e o desempenho na formulação (variável dependente), utilizando um número reduzido de experimentos, resultando em um menor gasto de reagentes e tempo. Primeiramente, os excipientes foram agrupados conforme Quadro 1. A escolha dos LL baseou-se nos resultados obtidos por Barcelos (2019), que indicou Phosal® 50 PG e Capmul MCM EP/NF como os LL que apresentaram maior solubilidade em AmB. Os LS foram divididos em 2 grupos, sendo o Grupo A (monoestearatos) e Grupo B (triacilgliceróis) (Figura 8).

Deve-se salientar que foi utilizado o LS do Grupo A (Monoestearato de Glicerila) duas vezes, ou seja, utilizou-se apenas 2 LS diferentes do Grupo A e 2 LS do Grupo B. Entretanto, sabe-se que apesar de ser o mesmo tipo de LS, a constituição e pureza do material pode ser diferente visto que são de fabricantes diferentes.

Quadro 1- Excipientes utilizados no desenho experimental como variáveis independentes para o preparo das formulações.

LIPÍDIO SÓLIDO		LIPÍDIO LÍQUIDO	TENSOATIVO
GRUPO A	GRUPO B		
Emprove® (Ácido esteárico 50 vegetal, Merck)	Gelucire® 44/14 (Mistura de glicerídeos derivados de óleo de coco e polietilenoglicol-32 Gatefossé)	Phosal® 50PG (Lecitina em propilenoglicol, mono/diglicerídeos de flor de girassol, palmitato de ascorbila, Lipoid)	Poloxamer 188 (Copolímero em bloco de polioxietileno-polioxipropileno, Merck)
Imwitor 900® (Monoestearato de glicerila)	Sterotex® (Óleo vegetal hidrogenado)	Capmul MCM EP/NF (caprilato/ caprato de glicerila, Abitec)	Tween® ₂₀ (Monolaurato de polietilenoglicol de sorbitano, Vetec).
Monoestearato de Glicerila (MEG)	-	-	-

Fonte: Próprio Autor.

Após a definição das variáveis, foram elaboradas 16 formulações (Quadro 2) e avaliados os seguintes parâmetros como resposta: diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e eficiência de encapsulação da AmB (EE%).

Quadro 2- Formulações propostas pelo desenho experimental para avaliação dos componentes do CLN contendo AmB.

Formulação	Lipídio Sólido	Lipídio Líquido	Tensoativo
01	Emprove®	Phosal® 50 PG	Poloxamer 188
02	Emprove®	Phosal® 50 PG	Tween® 20
03	Gelucire®	Phosal® 50 PG	Poloxamer 188
04	Emprove®	Capmul MCM EP/NF	Poloxamer 188
05	Gelucire®	Capmul MCM EP/NF	Tween® 20
06	MEG	Capmul MCM EP/NF	Poloxamer 188
07	Gelucire®	Phosal® 50 PG	Tween® 20
08	Sterotex®	Phosal® 50 PG	Tween® 20
09	Imwitor 900®	Capmul MCM EP/NF	Poloxamer 188
10	Gelucire®	Capmul MCM EP/NF	Poloxamer 188
11	Sterotex®	Phosal® 50 PG	Poloxamer 188
12	Imwitor 900®	Capmul MCM EP/NF	Tween® 20
13	Imwitor 900®	Phosal® 50 PG	Tween® 20
14	MEG	Phosal® 50 PG	Tween® 20
15	Sterotex®	Capmul MCM EP/NF	Poloxamer 188
16	MEG	Capmul MCM EP/NF	Tween® 20

Fonte: próprio Autor.

3.2 PREPARO DOS CLN

Para a produção dos CLN foi mantida constante a proporção dos excipientes, os quais foram pesados separadamente conforme a fase a que pertencem. A fase oleosa (FO), composta por LS e LL, corresponde a 5%_{op/p} da massa total da formulação, e a fase aquosa (FA) aos 95%_{op/p} restantes, dos quais 5%_{op/p} correspondem

ao tensoativo. Após pesagem na balança semianalítica (Shimadzu, Modelo UX4200H), as duas fases foram mantidas separadamente em banho-maria (IKA®, Modelo HB10) a aproximadamente 70 °C até total fusão da FO e FA. Em sequência, adicionou-se 5 mg de AmB à FO e levou à agitação magnética por alguns segundos (IKA Werke, Modelo RT 15 power IkaMag) e, por fim, a FA foi adicionada à FO. Posteriormente, as amostras foram levadas ao processador ultrassônico (QSonica, Modelo Q700) por um tempo de 3 minutos com amplitude de sonicação de 20% em modo contínuo. Ao final desse processo, as formulações foram mantidas sob agitação magnética sem banho de gelo até alcançarem a temperatura ambiente.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS CLN

3.3.1 Tamanho de gotícula e índice de polidispersão

O diâmetro hidrodinâmico e o PDI foram mensurados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o analisador de partículas Zetasizer (Malvern, Modelo Nano ZS90). O aparelho possui capacidade de leitura de tamanho de gotícula entre 0,3 – 5000 nm e PDI 0,01 – 1. Durante a medida, um laser com comprimento de onda de 632 nm incide na amostra, a luz espalhada é monitorada a 25 °C em ângulo de 90°, e o tamanho é determinado pela equação de Stokes-Einstein através do programa Zetasizer Nano v3.30. Para a leitura, foram retiradas alíquotas de 50 µL das amostras, e diluídas no balão de 10 mL em água, e em seguida adicionava-se na cubeta do analisador. As leituras foram feitas em triplicata no modo automático do *software*.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DA AMB NOS CLN

3.4.1 Curva analítica

Inicialmente foi preparada uma solução-mãe de AmB em diclorometano (DCM, Tedia e Merck) e dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) na proporção 8:2_{v/v}. Para tanto, transferiu-se 5 mg do fármaco para um balão volumétrico de 25 mL e adicionou-se 5 mL de DMSO. Para garantir adequada dissolução, o balão foi levado ao banho de ultrassom (Elma, S15H), a temperatura ambiente, por 1 minuto. Posteriormente, completou-se o volume do balão com DCM e esse foi levado ao banho de ultrassom

novamente por igual período. Obteve-se ao final uma solução-mãe com concentração de 200 µg/mL. Para o preparo das amostras, foram adicionadas distintas alíquotas da solução-mãe (50, 100, 150, 250, 350, 450, 480 e 500 µL) a 7 balões volumétricos de 10 mL. Posteriormente, o volume dos balões foi completado com uma mistura DCM:DMSO (8:2) e homogeneizado. Subsequentemente, realizou-se leituras no espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu, Modelo UV-1800) utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 300 a 450 nm, velocidade rápida e passo de 0,1. Em seguida, foi calculada a primeira derivada dos espectros de absorbância com o *software* do equipamento, e registrados os valores dessa transformação em 417 nm. Posteriormente, através do método dos mínimos quadrados ordinários foi obtida a equação que correlaciona esses valores com a concentração de AmB. Essa equação foi então utilizada para determinar a quantidade de AmB presente nas formulações. Este experimento foi realizado em triplicata.

3.4.2 Quantificação da AmB

Para determinar a quantidade de AmB encapsulada nas partículas foi necessário primeiramente remover o excesso de fármaco não encapsulado. Para tanto, ciclos de centrifugação (Termo Scientific, Modelo Megafuse 16) a 3.500 rpm por 10 minutos foram realizados e repetidos até não se observar formação de *pellet* de AmB (3 a 4 vezes). Posteriormente, as formulações foram congeladas a aproximadamente -20 °C, *overnight* e liofilizadas (Christ, Modelo Alpha 2-4 LDplus) a -20 °C, 1 mBar por 24 h. Desse pó liofilizado, aproximadamente 25 mg de cada amostra foram adicionados a 2 mL de DMSO e mantidos a 70 °C em banho-maria sob agitação magnética até completa solubilização. Posteriormente, adicionou-se 8 mL de DCM ao recipiente, obtendo-se assim uma proporção DMSO:DCM (2:8). Em seguida, realizou-se varreduras em espectrofotômetro UV/Vis no intervalo 300 – 450 nm e foi calculada a primeira derivada da curva. Em seguida, a absorbância no vale em 417 nm foi utilizada para calcular a concentração de AmB no pó liofilizado a partir da equação da reta obtida na curva de calibração. Com o objetivo de alcançar exatidão, precisão e confiabilidade no resultado, esse processo foi realizado em triplicata.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do desenho experimental foram analisados pelo programa Design-Expert® Versão 7, assim como as equações e avaliações estatísticas dos modelos obtidos na concentração de AmB, Tamanho e PDI, para as variáveis dependentes por análise de variância (ANOVA), que possibilitam estabelecer a relevância e a significância estatística dos efeitos dos fatores estudados, assim como avaliar os efeitos de interação entre os mesmos. Para tanto, as variáveis categóricas foram codificadas conforme a Tabela 1.

Tabela 1- Valores numéricos adotados na codificação de cada experimento utilizado no delineamento experimental.

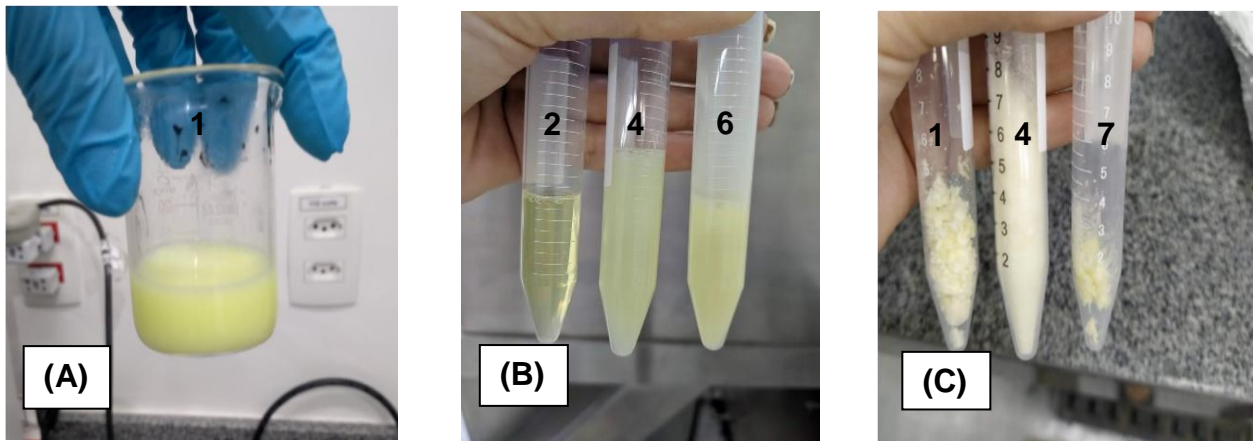
Excipiente	Nome	A[1]	A[2]	A[3]	A[4]
Lipídio Sólido (A)	MEG	1	0	0	0
	Gelucire	0	1	0	0
	Sterotex	0	0	1	0
	Emprove	0	0	0	1
	Imwitor 900	-1	-1	-1	-1
Lipídio Líquido (B)	Capmul MCM EP/NF	-1			
	Phosal 50 PG	1			
Tensoativo (C)	Tween 20	-1			
	Poloxamer 188	1			

Fonte: Próprio autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Pode-se observar na Figura 9 algumas etapas do processo e o aspecto apresentado por algumas amostras desenvolvidas.

Figura 9- Amostras após o processo de fusão das fases e sonicação (A), centrifugação de 3 amostras diferentes (B) e liofilização de 3 amostras com aspecto viscoso e seco (C).



Fonte: Próprio Autor.

Na Figura 9 (A) representa-se o aspecto pouco viscoso com coloração amarelo claro que amostras apresentavam após a etapa de sonicação. Na etapa de centrifugação as amostras 6 e 11 tiveram a necessidade de serem filtradas com papel de filtro, pois suas partículas ficaram suspensas após a centrifugação. As formulações 2, 5 e 7 depois de liofilizadas apresentaram aspecto com grumos maiores, mais viscosos e com baixo rendimento (Figura 9 C).

4.1 CURVA ANALÍTICA

A partir do experimento realizado no subitem 3.4.1 e utilizando regressão linear, com o método dos quadrados mínimos ordinários, foi possível correlacionar a variação da concentração da AmB com os valores da primeira derivada no comprimento de onda 417 nm, através da equação 1 ($R^2 = 0,9979$).

$$y = -12,5384 x + 0,0005 \quad (1)$$

4.2 RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

A Tabela 2 apresenta a concentração de AmB, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão obtidos na caracterização e quantificação das 16 formulações apresentadas anteriormente.

Tabela 2- Resultado da caracterização de tamanho e PDI e concentração de AmB nas amostras.

Amostras	Concentração de AmB (mg/g)	Tamanho (nm)	PDI
1	4,84	5086,00	0,32
2	1,09	2134,00	0,99
3	0,31	43,94	0,41
4	0,60	2680,00	0,78
5	0,32	3407,00	0,94
6	0,61	65,94	0,40
7	0,89	401,10	0,75
8	0,79	69,31	0,20
9	0,62	246,20	0,19
10	0,21	22,50	0,39
11	0,55	326,40	0,34
12	2,07	119,00	0,31
13	0,48	150,00	0,25
14	0,79	207,80	0,30
15	0,76	154,20	0,27
16	2,59	719,00	0,49

Fonte: Próprio autor

De acordo com os resultados evidenciados por cada formulação, foram elaborados modelos matemáticos (equação 2, 3 e 4), a partir do *software* Design-Expert, com o objetivo de detalhar o comportamento das respostas conforme a modificação dos níveis das variáveis estudadas, que descrevem a relação entre os

excipientes utilizados e a concentração de AmB, diâmetro hidrodinâmico, e PDI, respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Concentração de AmB (mg/g)} = & +0.66 + 0.010 \cdot A[1] - 0.23 \cdot A[2] + 0.14 \cdot A[3] \\ & + 0.21 \cdot A[4] - 1 \cdot A[1]B + 0.091 \cdot A[2]B - 0.21 \cdot A[3]B + 2.02 \cdot A[4]B - 0.97 \cdot A[1]C - 0.12 \cdot A[2]C - \\ & 0.10 \cdot A[3]C + 1.90 \cdot A[4]C \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Tamanho (nm)} = & +2.45 - 0.26 \cdot A[1] - 0.18 \cdot A[2] - 0.36 \cdot A[3] + 0.99 \cdot A[4] - 0.13 \cdot C - \\ & 0.25 \cdot A[1]C - 0.66 \cdot A[2]C + 0.39 \cdot A[3]C + 0.25 \cdot A[4]C \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{PDI} = & +0.45 - 0.09 \cdot A[1] + 0.16 \cdot A[2] - 0.17 \cdot A[3] + 0.35 \cdot A[4] - 0.07 \cdot B - 0.11 \cdot C \\ & + 0.08 \cdot A[1]C - 0.11 \cdot A[2]C + 0.13 \cdot A[3]C - 0.14 \cdot A[4]C \end{aligned} \quad (4)$$

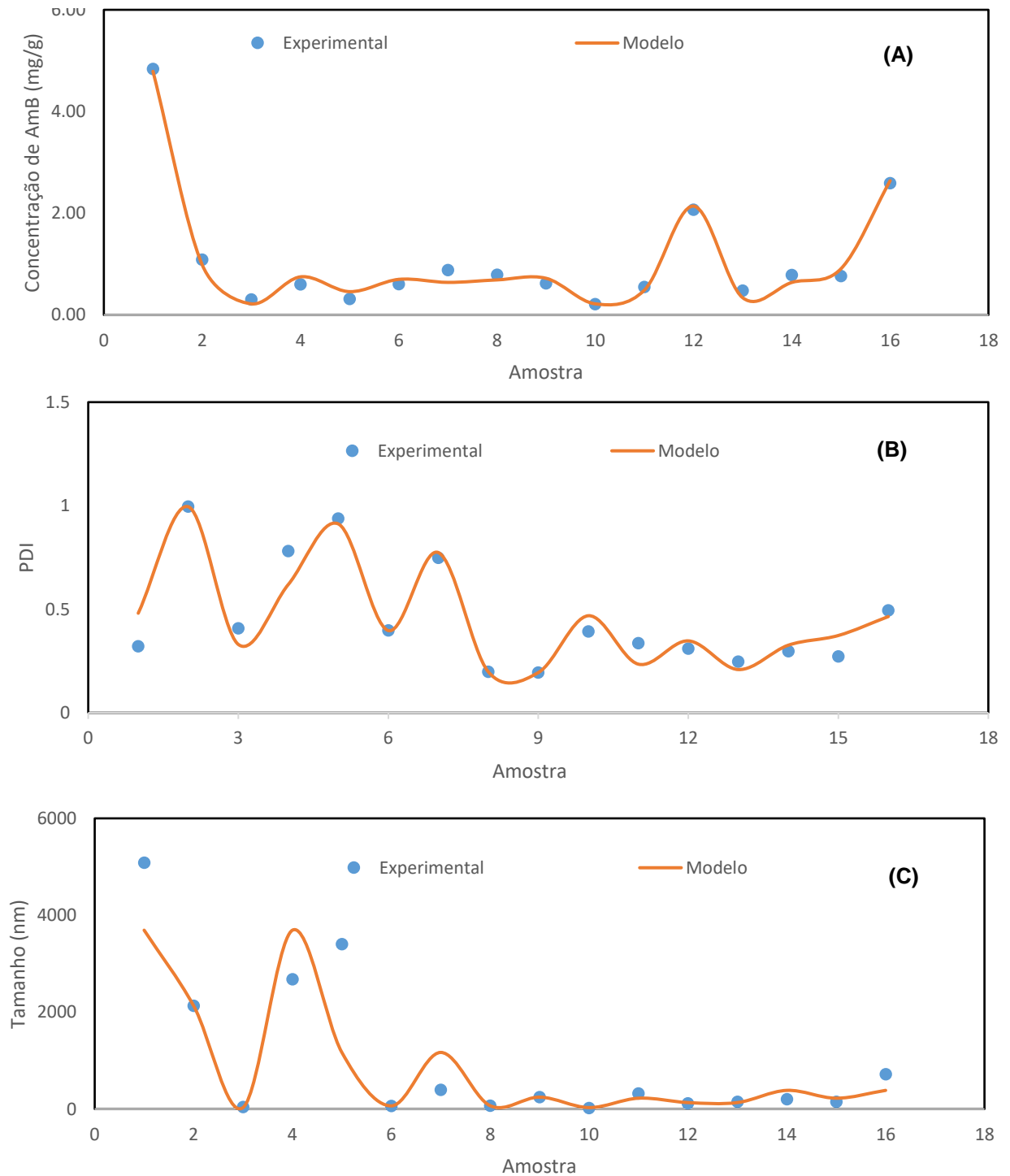
O coeficiente de determinação R^2 mede a relação presente entre a variável dependente e as variáveis independentes (SELL, 2005). Logo, a partir da análise dos valores do coeficiente de determinação (Tabela 3), bem como da análise visual (Figura 10), observa-se que os modelos de tamanho, PDI e concentração de AmB se ajustam adequadamente aos valores obtidos experimentalmente. Os valores do R^2 -ajustado indicam que os modelos foram capazes de explicar de 73% a 95% da variabilidade dos resultados experimentais utilizando unicamente a variação na composição dos excipientes (Tabela 3 e Quadro 2).

Tabela 3 - Resultado do R^2 e R^2 ajustado obtido a partir dos modelos de tamanho, PDI e eficiência de encapsulamento.

Modelo	R^2	R^2 ajustado
Tamanho	0,91	0,77
PDI	0,91	0,73
[AmB]	0,99	0,95

Fonte: Próprio autor.

Figura 10- Gráfico demonstrativo do modelo e valores reais obtido na concentração de AmB (A), PDI (B) e tamanho de partícula (C) pelo programa Design-Expert.



Fonte: Próprio autor.

O valor-p é descrito como a probabilidade de a hipótese nula ser verdadeira, ou seja, que a diferença apresentada, entre o resultado de duas ou mais amostras,

seja explicado pelo acaso, e não em razão a fatores que estão sendo estudados. De forma convencional, o valor de corte para rejeitar a hipótese nula deve ser menor ou igual a 0,05, quando considerado um nível de significância de 5%, o que significa que, quando não se encontra diferença, um valor tão extremo para o teste t é esperado em menos de 5% das vezes (FERREIRA; PATINO, 2015). Assim sendo, conforme evidenciado na Tabela 4, para um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), é possível inferir que o LS e as interações LL-LS (AB) e LS-tensoativo (AC) influenciaram na capacidade das formulações encapsular a AmB. O mesmo comportamento se repete para o tamanho quanto ao tipo de LS e a interação AC, assim como o LS e Tensoativo (C) interferem no PDI.

Tabela 4- Análise do p-valor para o modelo de concentração da AmB, tamanho e PDI.

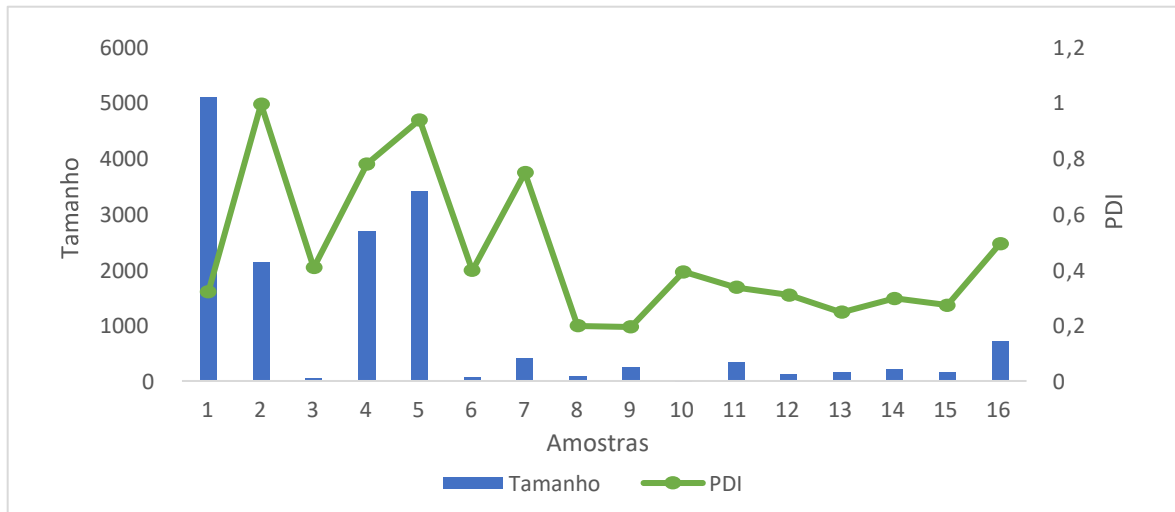
Fatores	Tamanho	PDI	[AmB]
A-Lipídio Sólido	0,0116	0,0156	0,0172
B-Lipídio Líquido	0,729	0,1341	0,3618
C-Tensoativo	0,0776	0,0183	0,5946
AC	0,0344	0,1948	0,0079
AB	-	-	0,0063

Fonte: Próprio autor.

Com relação ao tamanho, é possível inferir através da Tabela 4 que a interação LS-tensoativo desempenha um importante papel nessa propriedade do sistema (p-valor < 0,05). Observando atentamente a Quadro 1 e a Figura 11, percebe-se que as formulações 1, 2 ,4 e 5, que obtiveram os maiores valores de tamanho são constituídos pelos (Grupo A), sendo o LS Emprove® (Ácido esteárico), que corresponde a 75% destas formulações, o que indica que esse LS causa aumento no tamanho das partículas e afeta diretamente neste parâmetro dos CLN. Já as formulações 12 e 16 que obtiveram bons parâmetros também fazem parte deste

grupo, entretanto são constituídas pelo LS Monoestearato de Glicerila, sendo assim, o tamanho de partícula das mesmas não foi afetado.

Figura 11- Gráfico em barras comparando os valores de tamanho de e PDI das amostras.



Fonte: Próprio Autor.

4.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Os valores do coeficiente de determinação (R^2) evidencia o adequado ajuste do modelo matemático aos dados experimentais, uma vez que revela o percentual de variação em y (valores de primeira derivada da absorbância) que é explicado em função de X (concentração de AmB), respectivamente variável dependente e independente (LOUREIRO; GAMEIRO, 2011).

O R^2 obtido na curva de calibração foi 0,9979 indicando uma relação linear positiva entre as variáveis e quanto mais próximo de 1, melhor o modelo. Logo, a observa-se que o resultado é adequado.

4.4 INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO LS-LL NA ENCAPSULAÇÃO

Fazendo uma avaliação mais detalhada das formulações 1 (Emprove[®], Phosal[®] 50PG e Poloxamer 188), 12 (Imwitor 900[®], Capmul MCM EP/NF e Tween[®] 20) e 16 (MEG, Capmul MCM EP/NF e Tween[®] 20) (Quadro 2), compostas pelo LS Emprove[®] e MEG (purificado e o Imwitor 900[®]). Esses apresentaram maior concentração de AmB

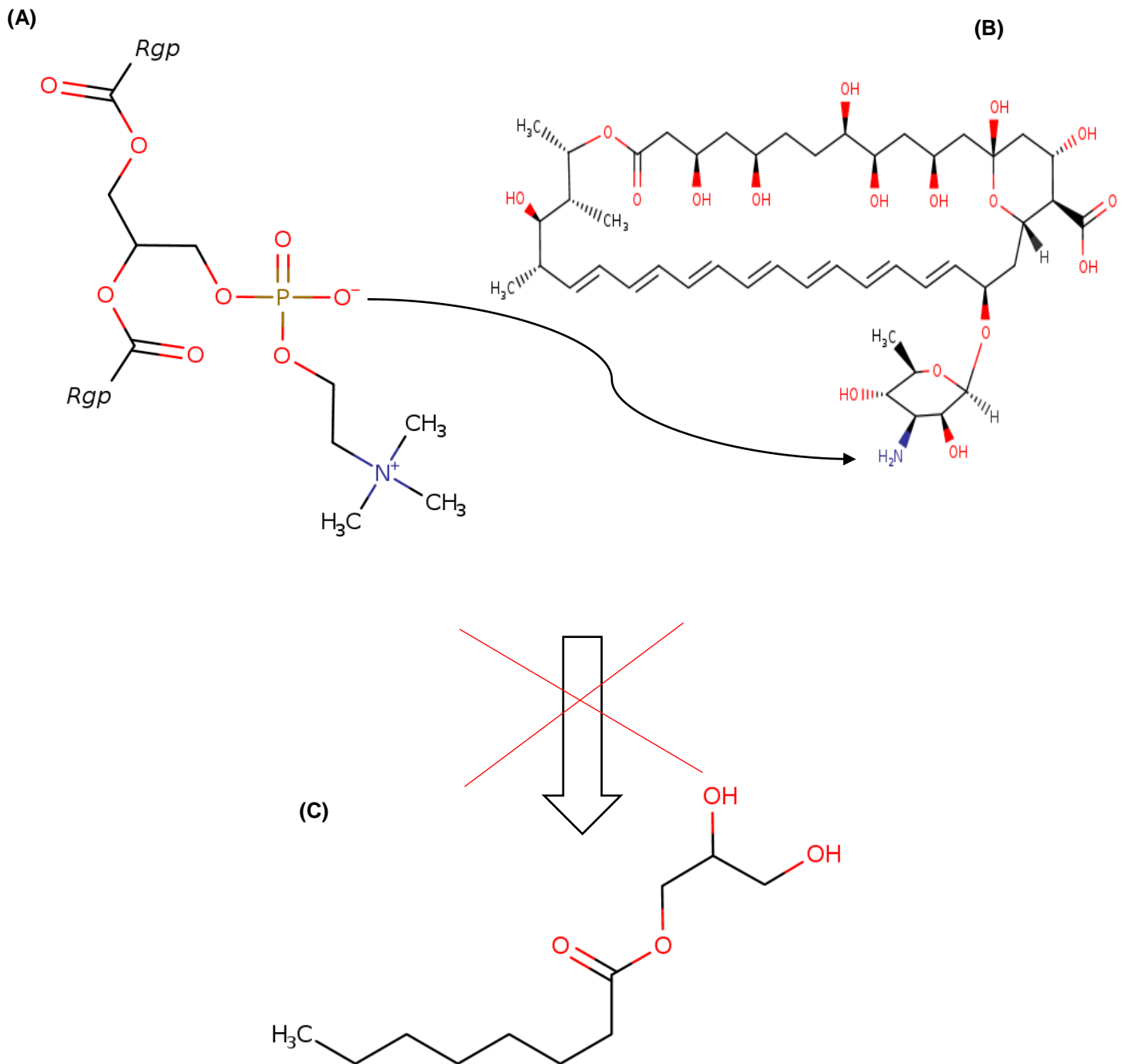
encapsulada (Tabela 1). Ressalta-se que todas as três apresentam LS da classe de estearatos (Grupo A). Sendo assim, uma possível explicação para a obtenção desse resultado é que esses LS possuem cadeias menores e menos complexas que os triacilgliceróis (Grupo B), conforme visualizado na Figura 8, e por consequência facilitaria na interação com o LL e com a AmB na formulação, visto que as estruturas moleculares dos lipídios impactam as interações intermoleculares que ocorrem entre os lipídios e o ativo encapsulado no sistema (LINGWOOD; SIMONS, 2010).

4.5 INFLUÊNCIA DO LL E LS NA ENCAPSULAÇÃO DA AMB

Como descrito no subitem 1.6, observa-se que a lecitina é o principal componente do Phosal[®] 50 PG, sendo uma molécula de ação tensoativa proveniente da estrutura molecular dos fosfolipídios compostos por ela, além de anfotérica, assim como a AmB. Por essa razão, é esperada uma interação mais eficiente entre Phosal[®] 50 PG e AmB quando comparado com o Capmul[®] MCM EP, cujo o principal componente do mesmo é o gliceril caprilato/ caprato.

As interações entre a lecitina e a AmB podem ocorrer, por exemplo, através de interações eletrostáticas entre o grupo amina (+) do fármaco e o grupamento fosfato (-) da molécula de lecitina, o qual não ocorre no Capmul[®] MCM EP (Figura 12) devido à ausência desses grupamentos. Como resultado destas interações, para a formulação contendo Phosal[®] 50 PG (formulação 1, Quadro 2), foi possível solubilizar 5,33 vezes mais AmB que a média geral das demais formulações (Tabela 1).

Figura 12- Estrutura molecular da Lecitina (Phosal 50 PG)
(A), AmB (B) e Capmul® MCM EP.



Fonte: Adaptado de Pubchem, 2021.

O ácido esteárico, pertencente ao Grupo A, apresenta fórmula C₁₈H₃₆O₂, ou seja, possui apenas uma cadeia longa de 18 átomos de carbono sem duplas

ligações e um grupamento de ácido carboxílico, apresentando a estrutura mais simples dentre os LS utilizados. Deste modo, esta característica do ácido esteárico associada à maior solubilidade da AmB em Phosal[®] 50 PG pode explicar o efeito sinérgico observado pela formulação 1 quanto a EE% (Quadro 2 e Tabela 1).

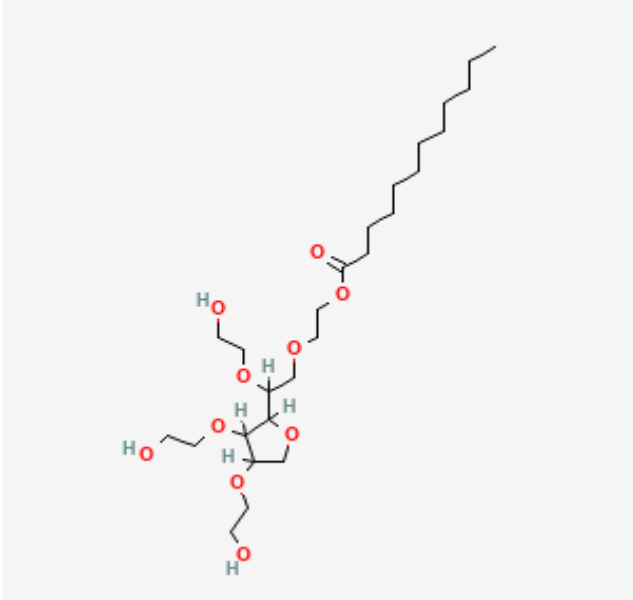
4.6 INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO LS-TENSOATIVO NA ENCAPSULAÇÃO DA AMB E TAMANHO DE PARTÍCULA

A adição de um tensoativo pode promover repulsão eletrostática ou impedimento estérico entre as partículas. Assim, uma possível justificativa para a significativa interação LS-tensoativo no aumento da solubilidade da AmB pode residir no impedimento estérico causado pelo Tween[®] 20, uma vez que os tensoativos não iônicos por não disporem de carga verdadeira, formam gotículas que não exibem dupla camada elétrica e a estabilização é alcançada pelo impedimento estérico de suas moléculas com grupos polares, geralmente, cadeias longas (SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004).

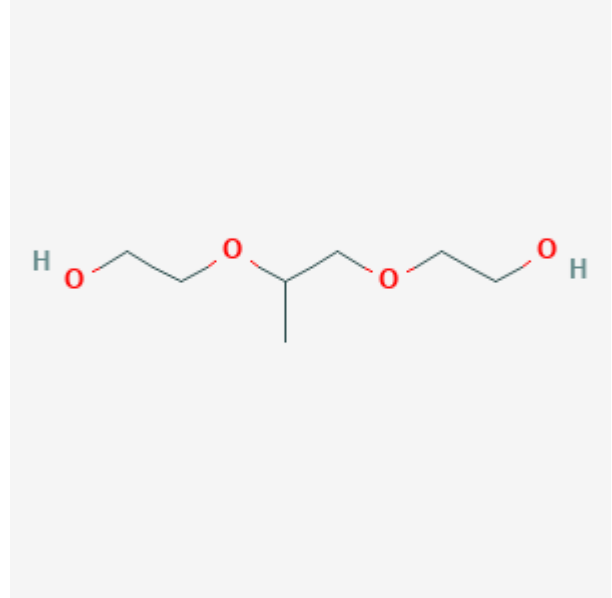
Logo, sendo o Tween[®] 20 uma molécula que possui massa molar menor que a do Poloxamer 188, respectivamente, 1.227,5 g/mol e 8.400 g/mol (FISPQ, 2012), e uma estrutura ramificada (Figura 13), é esperado um maior número de moléculas de Tween[®] 20 na interface, com conseqüente magnificação do efeito estérico nessa região, dificultando, assim, a deposição da AmB, que também é uma molécula anfifílica, na interface da partícula. Sendo assim, o Tween[®] 20 influencia negativamente no encapsulamento da AmB. E como suporte para essa conclusão, a formulação 1 foi o que obteve maior quantidade de AmB encapsulada, e em sua composição o tensoativo usado é Poloxamer 188 (Quadro 2 e Tabela 1).

Estes achados são corroborados com a literatura, a qual afirma que algumas variáveis como o tipo de LS, LL e tensoativos, assim como suas proporções determinam os parâmetros farmacotécnicos, por exemplo, quanto maior o ponto de fusão e peso molecular dos LS, maior será o tamanho de partícula composta por ele, bem como a maior quantidade de insaturações na molécula dos LL ajudará a produzir partículas de tamanho menor, da mesma maneira que tensoativos não-iônicos e a variação de concentração dos mesmos irá interferir na polidispersão dos CLN (SUBRAMANIAM; SIDDIK; NAGOOR, 2020).

Figura 13- Estrutura molecular do tensoativo Tween® 20 e Poloxamer 188.



Tween® 20



Poloxamer 188

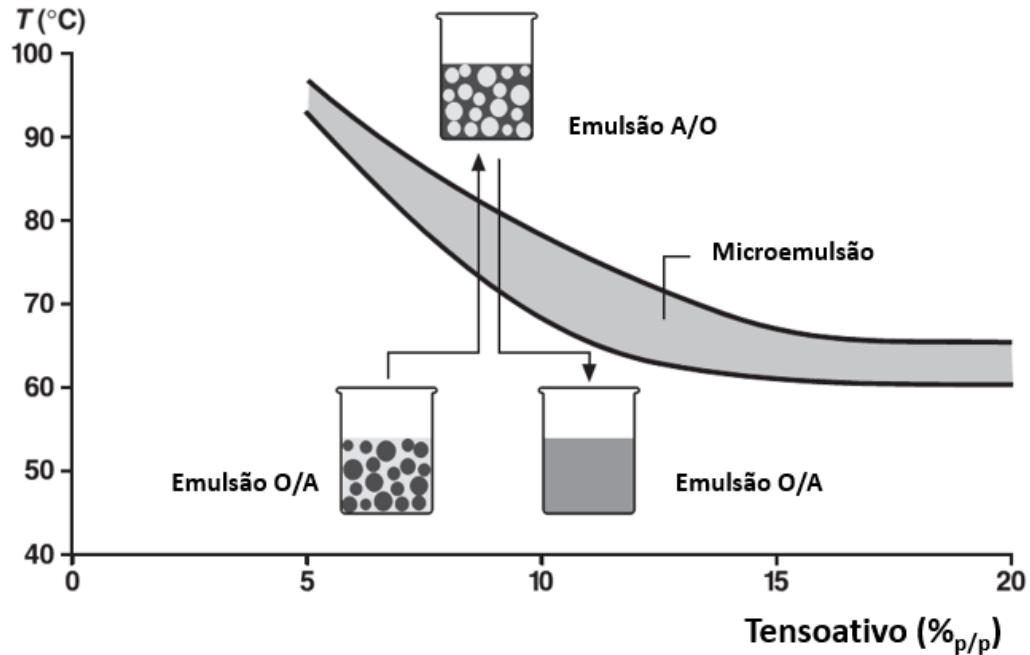
Fonte: Adaptado Pubchem, 2021.

Conforme posto anteriormente, as formulações com LS da classe dos estearatos apresentaram maior tamanho de gotícula dispersa (Figura 11). Durante a produção dessas formulações foi observada uma mudança brusca na coloração das formulações quando há o arrefecimento, passando de amarelo claro para branco perolado. Esse fenômeno pode ser indicativo de um evento catastrófico de inversão de fases (Figura 14), ou seja, ocorre devido a um aumento da fração volumétrica de fase dispersa, onde ao resfriar, a curvatura da interface muda de nula para positiva, assim, uma emulsão O/A se transforma em uma emulsão A/O ou o contrário (WOLFGANG VON RYBINSKI; MATTHIAS HLOUCHA; JOHANSSON, I. 2009).

Vale ressaltar que simultaneamente ocorre a solidificação do LS. Esse processo dinâmico pode favorecer a formação de macroagregados, o que explicaria os elevados valores no tamanho de gotícula dispersa. Como os valores de PDI refletem a distribuição dessas populações de agregados, é esperado que a

interação LS-tensoativo e o próprio LS, a qual afeta o tamanho, também desempenhe um importante papel nessa propriedade do sistema (p -valor < 0,05) (Tabela 4).

Figura 14- Esquema representativo do fenômeno de temperatura de inversão de fases.



Fonte: Modificado de Rybinski *et. al* 2009

Entretanto, a confirmação de que isto tenha ocorrido com os experimentos só poderia ser obtida através da realização de técnicas de análise de imagem como microscopia eletrônica de transmissão visto que ela obtém imagens diretas de nanopartículas, possibilitando a determinação de sua distribuição de tamanho e sua morfologia e a microscopia de força atômica, que faz a varredura sobre uma área da amostra mostrando a dispersão de tamanho das partículas (CALLISTER, 2008).

Dentre as formulações desenvolvidas, a formulação 1 foi a que obteve a maior capacidade de encapsulamento da AmB. Entretanto, para absorção oral, tem-se relatado que o tamanho médio de partícula ideal encontra-se em torno de 300 nm (UJHELYI *et al.*, 2018) e PDI variando entre 0,3 a 0,5. Segundo Alexis e colaboradores (2008), sendo que essa amostra apresentou um valor significativamente maior (5.086 nm), ressaltando assim, a necessidade de

experimentos adicionais que permitam reduzir o tamanho sem alterar o encapsulamento da AmB.

Vale ressaltar que as amostras 12 e 16 (que são formadas pelos mesmos compostos de fornecedores diferentes) também apresentaram consideráveis valores de solubilização de AmB e aceitáveis parâmetros físico-químicos, especialmente a formulação 12. Assim, espera-se variar a concentração de excipientes lipídicos em busca de um aumento da concentração de AmB, sem comprometer as características das partículas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o encapsulamento da AmB é significativamente afetado pela interação entre o LL-LS e LS-tensoativo. Além disso, foi observado que as formulações elaboradas com LS pertencentes ao grupo A (1, 12 e 16), ou seja, estearatos, apresentaram maior capacidade solubilizante para a AmB. Por serem moléculas menos complexas que os triacilgliceróis (grupo B) a interação com o LL provavelmente foi favorecida. Simultaneamente, a maior ação solubilizante do Phosal® 50 PG foi atribuída à similaridade apresentada pela lecitina nele contida e a AmB, a saber, anfifilicidade (uma parte hidrofílica e outra lipofílica) e anfotericidade (atua como ácida ou básica dependendo do meio), o que favorece a formação de interações hidrofílicas e hidrofóbicas, tais como formação de par iônico e forças de dispersão de London. Em relação à interação LS-tensoativo, atribuiu-se um menor efeito estérico causado pelo Poloxamer 188 quando comparado ao Tween 20, o qual apresenta maior complexidade estrutural, além de provavelmente possuir maior número de moléculas na interface devido ao seu baixo peso molecular quando comparado ao Poloxamer 188.

Quanto ao tamanho e PDI, os resultados demonstram que o LS e a interação LS-tensoativo foi significativa. Assim como na encapsulação, as formulações contendo estearatos como LS foram as que apresentaram maiores valores, principalmente as com ácido esteárico. Esse achado foi atribuído ao favorecimento da formação de macroagregados causada pela simultânea solidificação do LS e provável inversão de fase durante o processo de resfriamento da formulação.

Assim, conclui-se que os estearatos (Grupo A) foram a classe de LS que promoveram maior encapsulamento da AmB. Contudo, há a necessidade de experimentos adicionais com o objetivo de determinar os parâmetros de produção que permitam aumentar a eficiência de encapsulamento da AmB nos CLN e simultaneamente reduzir o tamanho e polidispersão.

REFERÊNCIAS

ADLER-MOORE J, PROFFITT RT. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **Jornal of Antimicrob Chemother**, v. 49, p. 21-30, 2002.

ALEXIS *et al.*, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5reim, n. 4, p. 105-15, 2008.
DOI: 10.1021/mp800051m

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n.1, p. 36-48, 2013.

ALMEIDA, M. A. O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227–232, 2005.

ALMEIDA et al. Nanotechnological Strategies for Treatment of Leishmaniasis—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v 13, p. 117–133, 2017.

AL-QUADEIB, B. T. et al. Stealth Amphotericin B nanoparticles for oral drug delivery: In vitro optimization. **Journal of Saudi Pharmaceutical**, v. 23, n. 3, p. 290-302, 2015.

ALVAR J, YACTAYO S, BERN C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, v. 22, n.12, p. 552–557, 2006.

AMIDON *et al.*, Uma Base Teórica para uma Classificação de Medicamentos Biofarmacêuticos: Correlação da Dissolução de Medicamentos In Vitro e Biodisponibilidade In Vivo. **Pharmaceutical Research**, v 12, n.3 , p 413-20, 1995.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, n. 30, p. 1262-81, 2000.

BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and Its New Derivatives – Mode of Action. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 5, 459–469, 2009.

BARCELOS, G. **Aplicação de planejamento experimental para o desenvolvimento de sistemas autoemulsificantes de anfotericina B.** Orientadoras Beatriz Ferreira De Carvalho Patricio e Kattya Giselle Holanda e Silva. 2019. 67 f. TCC (Graduação) – Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

BARRAL, A. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produce a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, p. 536-546, 1991.

Botham, Kathleen M., Mayes, Peter A. Lípidios de Importância Fisiológica. **Harper Bioquímica Ilustrada**, n. 29, p. 140 -151, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

BERN C, MAGUIRE JH, ALVAR J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. 313, 2008.

BERDICHEVSKI, R.H. Nefrotoxicidade da AmB associada a pacientes de baixo risco. Dissertação de Mestrado. UFRS, 2003.

BURNS N, GROVE SK. The practice of nursing research: conduct, critique, and utilization. **Philadelphia: Saunders**, v. 3, 1997.

BURT H., LETCHFORD K. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic**, v 65, p. 259-269, 2007.

BVS. Biblioteca Virtual em Saúde. Quais as opções de terapêuticas para Leishmaniose Visceral disponíveis no Sistema Único de Saúde?. 2021. Disponível em: < <https://aps.bvs.br/aps/quais-as-opcoes-terapeuticas-para-leishmaniose-visceral-disponiveis-no-sistema-unico-de-saude/>>. Acesso em: 20 setembro 2021.

BYRNE M.E., SUNDARAM P., WEBSTER D.M. Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2013.

CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução**, 2008.

CARNEIRO S. P. *et al.* Functionalized rifampicinloaded nanostructured lipid carriers enhance macrophages uptake and antimycobacterial activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p 306–313, 2019.

CARVALHO, I.P.S. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no carregamento de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga**. 2016. (Dissertação em Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

CHAPPIUS *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature review microbiology**, v. 5, p. 873, 2007.

CHAVANET, P.Y.; GARRY, I.; CHARLIER, N.; CAILLOT, D.; KISTERMAN, J.P.; D'ATHIS, M.; PORTIER, H. Trial of glucose versus fat emulsion in preparation of amphotericin for use in HIV infected patients with candidiasis. **British Medical Journal**, v. 305, p. 921-925, 1992.

- CHOPRA, R.; BLAIR, S.; STRANG, J.; CERVI, P.; PATTERSON, K.G.; GOLDSTONE, A.H. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of fungal infections in neutropenic patients. **Journal Antimicrobiol Chemotherapy**, v. 28, p. 93-104, 1991.
- DATE, A.A.; JOSHI, M.D.; PATRAVALE, V.B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v 59, p. 505–521, 2007.
- DE ALENCAR JE, NEVES J. Leishmaniose visceral (calazar). **Doencas Infecciosas e Parasitarias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, n. 8, 1982.
- DE OLIVEIRA CI, BRODSKYN CI. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. **Front Immunol**, v. 3, p. 145-153, 2012.
- DERAY G, MERCADAL L, BAGNIS C. Nephrotoxicity of amphotericin B. **Nephrologie**, v. 23, n. 3, p. 119-22, 2002.
- DUNAISKI, M. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na região do Vale do Ribeira – Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais**. 2006. (Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná Curitiba, 2006.
- ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A. G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; MCCULLOUGH, J. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, p. 1, 2013.
- FALCI, D.A; PASQUALOTTO, A.C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p. 65-82, 2015
- FANG *et al.*, Comparação do lipossoma encapsulado em ácido 5-aminolevulínico versus o etossomo para aplicação na pele para terapia fotodinâmica. **Revista Internacional de Farmacêutica**, v. 356, n. 1, p. 144- 152, 2008.
- FAUSTINO, C.; PINHEIRO, L. Lipid Systems for the Delivery of Amphotericin B in Antifungal Therapy. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 1-47, 2020.
- FERREIRA JC, PATINO CM. What does the p value really mean?. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v .41, n. 5, p. 485, 2015. doi: 10.1590/S180637132015000000215.
- FILIPPIN, F.B; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p.168-194, 2006.
- FIOCRUZ. Leishmaniose, 2021. Disponível em: < <https://portal.fiocruz.br/taxonomia-geral-7-doencas-relacionadas/leishmaniose-0>>. Acesso em 04 setembro 2021.

FISPQ. Informações Técnicas de Segurança de Produtos Químicos, 2012. Disponível em: < [https://www.hcrp.fmrp.usp.br/sitehc/fispq/Tween20%20\(Polisorbato\).pdf](https://www.hcrp.fmrp.usp.br/sitehc/fispq/Tween20%20(Polisorbato).pdf)>. Acesso em 15 agosto 2021.

FLEISHER D., LI C., ZHOU Y., PAO L., KARIM A. Interações medicamentosas, refeições e formulações que influenciam a absorção do medicamento após administração oral. Implicações clínicas. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 36, p. 233–254, 1999.

FRICKER, G., *et al.* Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 8, p. 1469-1486, 2010.

GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 37-56, 2017.

GASCO M.R. **Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution**. US Patent. US005250236A, 250-236. Concessão 11 dez. 2002

GHADI, R.; DAND, N. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. **Journal of Controlled Release**, v. 248, p. 71–95, 2017.

GHANNOUM MA, RICE LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4 p. 501-517, 1999.

GONTIJO CMF, MELO MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-49, 2004.

GOTO H, LINDOSO J.A.L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v 26, p. 293–307, 2012.

GOTO, H; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. London, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GUTIÉRREZ *et al.*, New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. **Chemical Society Reviews**, v. 45, p. 152-168, 2016.

HALDE, C., *et al.* An evaluation of amphotericin B in vitro and in vivo in mice against *Coccidioides immitis* and *Candida albicans*, and preliminary observations concerning the administration of amphotericin B to man. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 217-231, 1957.

HANDLER M.Z.; PATEL P. A; KAPILA R.; AL-QUBATI Y.; SCHWARTZ R.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, Clinical perspectives. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 73, p. 897-908, 2015.

HOSPENTHAL, D.; GRETZINGER, K.; ROGERS, A. Treatment of a murine model of systemic candidiasis with liposomal amphotericin B bearing antibody to *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 30, p. 193-197, 1989.

HOSPENTHAL, D.R.; ROGERS, A.L.; MILLS, G.L. Development of amphotericin B liposomes bearing antibody specific to *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 110, p. 37-45, 1988.

HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v. 24, n. 10, p. 1781–1785, 2003.

JAISWAL P, GIDWANI B, VYAS A. Nanostructured lipid carrier and your current application in direcionado drug delivery. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 44, n. 1, p. 27–40, 2016.

JOSE S., RAJ S., SABITHA M., SUMOD U.S. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. **Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 186- 193, 2012.

KAFETZIS DA. An overview of paediatric leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, n. 49, p. 31-38, 2003.

KIRSH, R.; GOLDSTEIN, R.; TARLOFF, J.; PARRIS, D.; HOOK, J.; HANNA, N.; BUGELSKI, P.; POSTE, G. An emulsion formulation of amphotericin B improves the therapeutic index when treating systemic murine candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 158, p. 1065-1070, 1988.

LAKHANI *et al.* Otimização, estabilização e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados de anfotericina B para entrega ocular de drogas. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, 2019.

LEMKE A, KIDERLEN AF, KAYSER O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 62-151, 2005.

LING J.T.S, ROBERTS C.J, BILLA N. Antifungal and Mucoadhesive Properties of an Orally Administered Chitosan-Coated Amphotericin B Nanostructured Lipid Carrier (NLC). **AAPS PharmSciTech**. v 20, p. 136, 2019.

LINGWOOD, D. E SIMONS, K. Lipid Rafts as a Membrane-Organizing Principle. **Science**, v. 327, p. 46-50, 2010.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, n. 1- 2, p. 9-12, 2001.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LOBIONDO-WOOD G., HABER J. Nursing Research: methods and critical appraisal for evidence-based practice. United States of America: **Mosby Elsevier**, v. 7, 2010.

LOPEZ-BERESTEIN, G.; MEHTA, R.; HOPFER, R.L.; MILLS, K.; KASI, L.; MEHTA, K.; FAINSTEIN, V.; LUNA, M.; HERSH, E.M.; JULIANO, R. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, p. 939-945, 1983.

LOUREIRO, M.L.; GAMEIRO, M.G.H. Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística. **Revista de Enfermagem**, n. 3, p. 151-162, 2011. DOI:10.12707/RIII1009

MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R. MANDELL, DOUGLAS AND BENNETT'S. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia, PA: **Elsevier Churchill Livingstone**. n. 6, p. 2428–42, 2005.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v 2, p. 01 - 37, 2009.

MANSON-BAHR PEC, APTED FIC. Leishmaniasis. In: Manson-Bahr PEC, Apted FIC, eds. **Manson's tropical diseases**. London: Bailliere Tindall, n. 18, p. 93–115, 1982.

MARGULIS-GOSHEN, K.; MAGDASSI, S. Organic nanoparticles from microemulsions: Formation and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v 17, p. 290– 296, 2012.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Quarterly Journal of Medicine**, 2013.

MEDRONHO R.A., CARVALHO D.M., BLOCH K.V., LUIZ R.R., WERNECK G. Epidemiologia. **São Paulo: Atheneu**, 2006

MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R. H. Lipid 151 nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 267 275, 2011.

MIYAZAKI, T.; KOHNO, S.; YASUOKA, A.; MAESAKI, S.; YAMADA, H.; SASAYAMA, K.; DOHTSU, Y.; YAMAGUCHI, K.; HIROTA, M. A lipid emulsion formulation of amphotericin B for the treatment of murine candidiasis and cryptococcosis. **Chemotherapy**, v. 38, p. 548-551, 1990.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C.; **The Faseb Journal**, v. 19, p. 311, 2005.

Motta, Valter T. Bioquímica Clínica para laboratório: Princípios e Interpretações. 5ªed. Porto Alegre: **Editora Médica Missau**; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2009.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1–2, p. 121–128, 2002a.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. SUPPL., p. 131–155, 2002b.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. "Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea". **Química Nova**, v. 34, n. 408, 2011.

NEVES, *et al.* Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Annals of Brazilian Dermatology**, v. 86, n. 6, p. 101-1092, 2011.

NOGUEIRA, J. L.; SILVA, M. V. M.; PASSOS, C. C.; AMBRÓSIO, C. E. A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde Pública: uma zoonose reemergente. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Garça/ SP, Ano 7, n.13, 2009.

OPAS/ OMS. Leishmaniose – Informe Epidemiológico das Américas. n. 7, mar, 2019. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?seq>>. Acesso em: 03 maio, 2021.

OSAKA, K *et al.* Amphotericin B as a Intracellular Antioxidant. Protection against 2,2'- azobis (2-4 dimethylvaleronitrile) - induced peroxidation of membrane phospholipids in rat aortic smooth muscle cells. **Biochemical Pharmacology**, v.54, p. 937-945, 1997.

PARTIDAR, A. *et al.* A review on novel lipid based nanocarriers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 2, p. 30-35, 2010.

PHAM, T.T.H. *et al.* Development of antileishmanial lipid nanocomplexes. **Biochimie**, v. 107, p. 143-153, 2014.

POLIT D.F., BECK C.T. Fundamentos de Pesquisa em Enfermagem: Avaliação de evidências para a prática da enfermagem. **Artmed**, v.3, 2011.

POUTON, C. W., C. J. H. PORTER. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v 60, p. 625-637, 2008.

PUBCHEM. National Library of Medicine. Disponível em:<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/385326069>>. Acesso em 01 setembro 2021a.

PUBCHEM. National Library of Medicine. Disponível em:<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3033877>>. Acesso em 01 setembro 2021b.

PUBCHEM. National Library of Medicine. Disponível em:<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/434131396>>. Acesso em 01 setembro 2021c.

PUBCHEM. National Library of Medicine. Disponível em:<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24699>>. Acesso em 01 setembro 2021d.

PUBCHEM. National Library of Medicine. Disponível em:<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/135305178>>. Acesso em 01 setembro 2021e.

PUBCHEM. National Library of Medicine. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9244147/>>. Acesso em 01 setembro 2021f.

ROBINSON RF, NAHATA MC. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. **Journal of Clinical Pharmacy Therapeutics**. v 24, n. 4, p. 249-257, 1999.

ROWE, R.C., SHESKEY, P.J., QUINN, M.E. Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth ed. Pharmaceutical Press, 1 Lambeth High Street, London, 2009.

SACHS-BARRABLE, K *et al.* Enhancing drug absorption using lipids: A case study presenting the development and pharmacological evaluation of a novel lipid-based oral amphotericin B formulation for the treatment of systemic fungal infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 692–701, 2008.

SAMPAIO *et al.*, Uma introdução aos delineamentos experimentais de sujeito único. **Interação em Psicologia**, v.12, n.1, p.151-164, 2008.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. drug incorporation and physicochemical characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 2, p. 205–213, 1999.

SELL, I. Utilização da regressão linear como ferramenta de decisão na gestão de custos. 9º Congresso Internacional de Custos - Florianópolis, SC, Brasil, 2005.

SERRANO, D. R.; LALATSA, A. Oral amphotericin B: The journey from bench to market. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 75-83, 2017.

SILVA, H.D et al. Nanoemulsions of b-carotene using high-energy emulsification-evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, London, v. 102, n. 2, p. 130-135, 2011.

SONNEVILLE-AUBRUN, O., SIMONNET, JT E L'ALLORET, F. Nanoemulsions: A New Vehicle for Skincare Products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108/109, p. 145-149, 2004.

SUBRAMANIAM, B., SIDDIK, ZH, & NAGOOR, NH. Otimização de carreadores lipídicos nanoestruturados: entendendo os tipos, desenhos e parâmetros no processo de formulações. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 22, n. 6, 2020.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.

TAMJIDI, F. *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, n. Supplement C, p. 29-43, 2013.

TAN, S. W.; BILLA, N.; ROBERTS, C. R.; BURLEY, J. C. Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1, p. 73-79, 2010.

TEJA, V.; CHOWDARY, V.; RAJU, Y. A glimpse on solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 1649–1657, 2014.

THAKUR, C. P.; NARAYAN, S. A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 98, n. 2, p. 129-138, 2004.

THE ZETA POTENTIAL. Colloidal dynamics: eletroacustics tutorials. 1999. Disponível em: < <http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDEITut1.pdf>> . Acesso em: 15 de agosto 2021.

TOMAZZINI, F.; DURAN, M.; VAUGHN; N. Nanopartículas lipídicas sólidas em fármacos, 2007. Disponível em:< <http://www.google.com.br/search?hl=pt-BR &as=X&ei=H2vZTaKYGerA0AGDzoz8Aw&ved=0CBcQBSgA&q=Nanopart%C3%ADculas+Lip%C3%ADdicas+S%C3%B3lidas+em+F%C3%A1rmacos+Fernanda+Tomazini,+Marcela+Duran+e+Natiara+Vaughn.+Laborat%C3%B3rio+de+Qu%C3%ADmica+BIOL%C3%B3gica.+Universidade+Estadual+de+Campinas.+Novembro+2007.&spell=1>>. Acesso em 22 maio 2021.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 525-532, 2011

UJHELYI *et al.* Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems. **Drug Discovery Today Technologies**, v. 27, 2018.
DOI:10.1016/j.ddtec.2018.06.005

URQUHART, G. M.; ARMAOUR, J.; DUNGAM, J. L.; DUNN, A. M. ; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, n. 2, p. 190- 192, 1998.

WALSH JF, MOLYNEUX DH, BIRLEY MH,. Deforestation: effects on vector-borne disease. **Parasitology**, 106 (Suppl), p. 55–75, 1993.

WALSH TJ *et al.* Safety, tolerance, and pharmacokinetics of highdose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 12, p. 3487- 96, 2001.

WERNECK GL, BATISTA MS, GOMES JR, COSTA DL, COSTA CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, n. 31, p.174-177, 2003.

WYNN, M. The Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles in Formal and Informal Settings. Project, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, **Materials Engineering Department**, p. 33 2012.

WOLFGANG VON RYBINSKI; MATTHIAS HLOUCHA; JOHANSSON, I. Microemulsions in Cosmetics and Detergents. *In*: STUBENRAUCH, C. (Ed.). **Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives**. 1st: John Wiley & Sons Ltd, cap. 8, p.230 – 254, 2009.

WHO. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/> en/>. Acesso em: 1 Maio, 2021.

ZIJLSTRA EE, EL-HASSAN AM. Visceral leishmaniasis. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, (Suppl 1), p. 27–58, 2001.