



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS CONTENDO O
FÁRMACO NISTATINA**

Edeilza Gomes Brescansin

Orientador:

**Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira
Pessine (IQ-UNICAMP)**

Campinas – SP
2006

EDEIZA GOMES BRESCANSIN

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES
LIPOSSOMAIS CONTENDO O FÁRMACO NISTATINA**

**Tese apresentada à Universidade Estadual
de Campinas, como requisito para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (orientador)

Prof^a. Dr^a. Eneida de Paula (IB-UNICAMP)

Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Noboru Hioka (DQ-UEM)

Dedico este trabalho

*A meu Deus pela proteção e paz,
A minha querida mãe Maria Eunice que esteve sempre a meu lado em todas as horas,
A meu querido marido, José Valdir pelo apoio e companheirismo,
A meus filhos Mariana e Pedro.*

***"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis".***

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Francisco Benedito Teixeira Pessine, meus sinceros agradecimentos, não apenas pela orientação, mas também pelo incentivo, confiança e amizade nestes anos de convivência.

Aos amigos que encontrei na UNICAMP pela simpatia, incentivo e auxílio nos momentos difíceis do projeto e na vida pessoal: Ana Paula, Milene, Neife, Débora Biloti, Adriana, Daniel, Angélica, Josivânia,

A minha amiga, professora Márcia Portilho da UEM pela leitura e correções do trabalho.

Aos professores da UEM, Osvaldo A. Cavalcanti, Graciette Matioli, Elza Kimura, Maria da Conceição T. Truiti, Adriana Lenita M. Albiero, Nelson Y. Uesu, Edna Regina N. Oliveira pelas palavras de incentivo nesta reta final da tese.

Ao professor Luiz Carlos Dias (IQ/UNICAMP) e seus alunos, pela amizade, companheirismo e pela colaboração na realização de nosso projeto com o empréstimo e doação de equipamentos e /ou reagentes.

A Professora Eneida de Paula (IB/UNICAMP) e funcionários do IB pelo auxílio no uso da ultracentrífuga

Aos professores Maria Helena Santana (FEQ/UNICAMP), Pedro L. O. Volpe (IQ/UNICAMP), Fernando Galenbeck (IQ/UNICAMP), Carlos F. S. Bonafé (IB/UNICAMP), Anita J. Marsaioli, Lauro Kubota (IQ/UNICAMP), Maria Isabel M. S. Bueno (FEQ/UNICAMP) e Renato Atílio Jorge (IQ/UNICAMP) pelo empréstimo de equipamentos em seus laboratórios.

Ao Dr. Carlos Ramos (BFM/LNLS) e Silvia Lucas F. da Silva (IQ/UNICAMP) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pelo empréstimo e auxílio na utilização do MicroDSC.

A professora Angélica Zaninelli Schreiber (FCM/UNICAMP) e Luzia Lyra (FCM/UNICAMP) pelo grande auxílio nas análises de atividade antifúngica do fármaco estudado.

Aos Técnicos do IQ que tanto nos auxiliaram nesta tese: Claudia Matelli, Robson, Maria do Carmo, Ana, Ricardo Pereira, Divino, Sonia (RMN), Sr. Fontana, Pimpim, Cássia,

Fabiana, Iveraldo

Aos funcionários das oficinas, vidraria, almoxarifado, marcenaria, manutenção e informática

A CAPES, pelo suporte financeiro com a concessão de bolsa de estudo pelo programa Institucional de Capacitação Docente e Técnico-Administrativo (PICDT).

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: **Edeilza Gomes Brescansin**

Tel: **(44)3026-8010** - e-mail: egbrescansin@uem.br

Endereço residencial: **Rua Joaquim Nabuco, 163, apto. 1401.
Zona 01, Maringá – PR. - CEP: 87013-340**

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Doutorado em Ciências – Físico-Química.**

Desenvolvimento e Caracterização de Formulações Lipossomais contendo o Fármaco Nistatina.

Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química - Período: 2001 – 2006.

Órgão financiador: CAPES – Programa PICDT

- **Mestrado em Química – Físico-Química.**

Determinação da Estabilidade Química e mecânica do Medicamento Reliflex e seu Princípio Ativo Nabumetona.

Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Química - Período: 1995 – 1998.

- **Especilização em Gestão da Qualidade.**

Aplicação de Métodos Estatísticos para a Melhoria da Qualidade na Produção de Comprimidos.

Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Administração

Período: setembro 1993 – dezembro 1995.

- **Graduação em Farmácia – Farmácia Industrial**

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Departamento de Farmácia. Período: 1981 – 1986

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- **Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.**

Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professor Assistente Nível D, Carga horária: 40 h - Regime: Dedicação exclusiva. Período: 1991 – Atual

LIVROS PUBLICADOS/ORGANIZADOS OU EDIÇÕES

- BRESCANSIN, E. G. VALENTINI, S. R. MEMENTO TERAPÊUTICO, SÉRIE APONTAMENTOS. Maringá: EDUEM - Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1999.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- MORIWAKI, Cristiane ; BRESCANSIN, E. G. ; HIOKA, N. ; MAIONCHI, F. ; MATIOLI, G. . ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO NABUMETONA FRENTE À LUZ . Acta Scientiarum, Maringá, v. 23, n. 3, p. 651-659, 2001.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO (ARTIGOS)

- BRESCANSIN, E. G.; MARTINS, M. H.; PESSINE, F. B. T. ENCAPSULATION OF NYSTATIN IN MULTILAMELLAR LIPOSOMES. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 39, supl. 2, 2003.
- MARTINS, M. H.; BRESCANSIN, E. G.; PESSINE, F. B. T. PHOTOSTABILITY OF ISOTRETINOIN IN METHANOL AND IN LIPOSOMES. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 39, supl. 2, 2003.
- MORIWAKI, Cristiane ; BRESCANSIN, E. G. ; MATIOLI, G. . IDENTIFICATION OF THE OBTAINED PHOTOPRODUCTS OF THE DEGRADATION THE NABUMETONE. European

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

- FERRACINI, Cristiane Nunes ; MORIWAKI, Cristiane ; BRESCANSIN, E. G. ; MORAES, Flávio Farias de ; MATIOLI, G. . STUDY OF THE FORMATION OF THE COMPLEX ALBENDAZOLE-BETA-CYCLODEXTRIN. In: Congress of Pharmaceutical Science - CIFARP, 2001, Águas de Lindóia. European Journal of Pharmaceutical Sciences. New York : Elsevier, 2001. v. 13. p. 139-140.
- MORIWAKI, Cristiane ; BRESCANSIN, E. G. ; MATIOLI, G. . IDENTIFICATION OF THE OBTAINED PHOTOPRODUCTS OF THE DEGRADATION OF THE NABUMETONE. In: Congress of Pharmaceutical Science, 2001, Águas de Lindóia. European Journal of Science Pharmaceutical Sciences. New York : Elsevier, 2001. v. 13. p. 57-57.
- MORIWAKI, Cristiane ; BRESCANSIN, E. G. ; MATIOLI, G. . ESTABILIDADE DA NABUMETONA FRENTE À LUZ: UM ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO. In: XIV Semana de Integração de farmácia, 2000, MARINGÁ. Livro de Resumos da XIV Semana de Integração de Farmácia, 2000.
- MORIWAKI, Cristiane ; MORAES, Flávio Farias de ; BRESCANSIN, E. G. ; MATIOLI, G. . ESTUDO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO ALBENDAZOL-BETA-CYCLODEXTRINA. In: IX Encontro Estadual de farmacêuticos e Bioquímicos e VII Congresso Catarinense de, 2000, Florianópolis. Caderno de Resumos do IX Encontro Estadual de farmacêuticos e Bioquímicos, 2000. v. 1. p. 19.
- LUCENA, F. A. M.; REIS, A. V. BRESCANSIN, E. G. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CINÉTICA PRELIMINAR DA NABUMETONA. Anais do IX Encontro Anual de Iniciação Científica, v. 2, p. 392 – 393, 2000.
- MORIWAKI, Cristiane ; BRESCANSIN, E. G. ; MATIOLI, G. . FOTÓLISE DO FÁRMACO NABUMETONE E IDENTIFICAÇÃO DE SEUS FOTOPRODUTOS. In: IV Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina, 2000. LONDRINA. Anais da IV Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina, v. 1. p. 8-8 2000.
- MORIWAKI, Cristiane ; BRESCANSIN, E. G. ; MATIOLI, G. . ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FOTOPRODUTOS OBTIDOS DA DEGRADAÇÃO DA NABUMETONA. In: IX ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2000, LONDRINA. Anais do IX Encontro Anual de Iniciação Científica, v. 1, p. 384-385, 2000.
- BRESCANSIN, E. G.; HIOKA, N.; SANTIN FILHO, Ourides. EVALUATION OF THE STABILITY OF NABUMETONE TO LIGHT. In: 2nd Congress of Pharmaceutical Sciences, 1999, Ribeirão Preto. Bolletino Chimico Farmaceutico. Milano : Società Editoriale Farmaceutica, v. 138. p. CLXII 1999.
- MARTINS, S. S. M. ; BRESCANSIN, E. G. ; HIOKA, N.; SANTIN FILHO, Ourides . AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESPECTROSCÓPICAS DO COMPRIMIDO RELIFLEX E SEU PRINCÍPIO ATIVO (NABUMETONA). In: V Encontro de Química da Região Sul, Porto Alegre - RS. Livro de Resumos, 1997. p. AQ18 1997.

PALESTRAS PROFERIDAS

- Lipossomas como Carreador de Fármacos, na disciplina: Pré-formulação e Tecnologia Farmacêutica do Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, 2006

Prêmios E Títulos

- Professora Homenageada pelos Formandos de Farmácia de 1999, Universidade Estadual de Maringá.
- Patronesse da Turma dos Formandos de Farmácia de 2001, Universidade Estadual de Maringá.

RESUMO

No presente trabalho, buscamos desenvolver formulação lipossomal sistêmica de nistatina (NYS) com o propósito de aplicações futuras na terapêutica de micoses sistêmicas, que tanto afligem indivíduos imunodeprimidos. Na primeira parte do projeto caracterizamos o fármaco através de análises térmicas (TGA e DSC), análises espectroscópicas (IV, UV e fluorescência), teste de solubilidade, avaliação da umidade segundo o método de Karl-Fischer e coeficiente de partição octanol/meio aquoso. Na segunda parte do trabalho procuramos desenvolver e otimizar formulações lipossomais, onde o fármaco apresentasse maior estabilidade química. Foram preparadas formulações lipossomais pelo método do filme lipídico que foram analisadas por HPLC. As preparações passaram por processo de diminuição de tamanho e separação entre fármaco livre e encapsulado. A terceira e última fase do projeto consistiu da caracterização de duas preparações, através de análises do raio hidrodinâmico, determinação da carga de superfície das partículas (potencial zeta), teor de fosfolípidios totais (teor de fosfato), eficiência e avaliação da encapsulação por análises de HPLC, anisotropia e supressão de fluorescência. Ainda na fase de caracterização investigamos a atividade biológica *in vitro*, destas formulações, pelo teste de susceptibilidade. As preparações foram desafiadas contra leveduras e dermatófitos. Pela seleção e otimização das formulações desenvolvidas concluímos que a melhor formulação foi a que apresenta uma composição de 70 % de Epikuron 200 SH; 20 % de Colesterol; 10 % de Diestearoilfosfatidilglicerol, 1,3 % de 2,6 - bis (1,1-dimetil) – 4 - metil fenol (BHT) e 7 % de NYS. Duas preparações foram caracterizadas L1 (hidratada a 55 °C) e L2 (hidratada a 60 °C). Os resultados para anisotropia e supressão de fluorescência evidenciam a encapsulação do fármaco nas preparações estudadas, tanto na bicamada lipídica quanto na superfície dos lipossomas. Verificamos também que L2 apresentou menor polidispersidade de seu raio hidrodinâmico, maior carga de superfície e maior eficiência de encapsulação, evidenciando ser L2 a preparação, físico-quimicamente, mais estável. Todavia, a preparação L1 mostrou, após sonicação, atividade biológica *in vitro* maior que L2. Estes resultados podem refletir a possível degradação do fármaco, quando aquecido a 60 °C.

Palavras-chaves: nistatina, antifúngicos, lipossomas,

ABSTRACT

This study was designed to develop liposomal formulations containing Nystatin (NYS), looking forward its future applications in systemic mycosis therapy, which often affect immunodepressed individuals. In the first part of the project, the drug was characterized by means of thermal analyses (TGA and DSC), IR, UV/V and fluorescence spectroscopies, solubility tests, humidity contents evaluation (Karl-Fischer method) and octanol-water partition coefficient. In the second part of the study, liposomal formulations were developed and optimized, in which the drug presented improved chemical stability. Liposomal formulations were prepared by the dry lipid film hydration method and were analyzed by HPLC. The vesicles were submitted to the processes of size reduction and separation of non encapsulated drug. The last part of the project consisted in the characterization of the two formulations by means of analysis of the is hydrodynamic radius; determination of the particles superficial charge (zeta-potential); total phospholipids content (phosphate); degree of NYS with encapsulation by HPLC; degree of anisotropy and fluorescence quenching of NYS. Still during the characterization phase, the *in vitro* biological activity of the formulations was investigated by means of susceptibility tests. The formulations were challenged against some yeasts and filamentous fungi. Conclusions pointed that the best formulation was the one which presented in its compositions 70% Epikuron 200 SH, 20% Cholesterol, 10 % Distearoyl-phosphatidylglycerol, 1.3 % 2,6 – bis (1,1-dimethylethyl) – 4 - methylphenol (BHT) and 7 % NYS. Two formulations were characterized: L1 (hydrates at 55 °C) and L2 (hydrated at 60 °C). Results regarding the degree of anisotropy and fluorescence quenching evidenced by NYS encapsulation at the liposomal lipid bilayers. Moreover, it was observed that L2 presented lower polydispersity in size distribution, higher superficial load and higher encapsulation effectiveness, i.e. L2 presented higher physico-chemical stability. Nevertheless the L1 preparation showed, after sonication, higher biological activity *in vitro* than L2, which might reflect possible thermal degradation of NYS when heated to 60 °C.

Key words: antifungal, nystatin, liposomes.

ÍNDICE

	ABREVIACÕES	XXI
	ÍNDICE DE TABELAS	XXIII
	ÍNDICE DE FIGURAS	XXVII
1	INTRODUÇÃO	01
2	OBJETIVOS	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	Fungos	17
3.2	Dimorfismo Fúngico	24
3.3	Infecções Fúngicas	25
3.4	Antibióticos Antifúngicos Poliênicos	29
3.5	Lipossomas	31
3.5.1	Aplicações de lipossomas em medicina	37
3.5.2	Lipossomas em doenças parasitárias e infecçõesfúngicas	40
3.5.3	Métodos de Preparação de lipossomas	41
3.5.3.1	Método pelo filme lipídico	41
3.5.3.2	Método de injeção de Etanol	43
3.6	Caracterização de preparações lipossomais	44
3.6.1	Determinação do raio hidrodinâmico de lipossomas	44

3.6.2	Determinação da carga de superfície das partículas	45
3.6.3	Análise por supressão de Fluorescência	45
3.6.4	Espectroscopia de polarização de fluorescência	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Materiais	51
4.2	Métodos	52
4.2.1	Caracterização físico-química da NYS.....	52
4.2.1.1	Avaliação da solubilidade	53
4.2.1.2	Determinação do teor de umidade	53
4.2.1.3	Análises espectroscópicas	53
4.2.1.3.1	Análise por espectroscopia de absorção na região do UV/V	53
4.2.1.3.2	Análise por espectroscopia de fluorescência	54
4.2.1.3.3	Análise por espectroscopia no Infravermelho (IV)	54
4.2.1.4	Análises por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA).....	54
4.2.1.5	Determinação do coeficiente de partição octanol/tampão	55
4.2.2	Análise da atividade antifúngica <i>in vitro</i> da NYS.....	56
4.2.3	Desenvolvimento de formulações lipossomais com NYS	57
4.2.4	Tratamentos efetuados em vesículas multilamelares para obtenção	

	de lipossomas unilamelares	59
4.2.5	Caracterização química e física de suspensões lipossomais	60
4.2.5.1	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	60
4.2.5.2	Determinação do teor (%) de fosfato	61
4.2.5.3	Determinação do raio hidrodinâmico	62
4.2.5.4	Determinação do potencial Zeta	62
4.2.5.5	Análise do grau de anisotropia de fluorescência da NYS livre e encapsulada em lipossomas	62
4.2.5.6	Estudo da supressão de emissão de fluorescência da NYS livre e em lipossomas.....	63
4.2.5.7	Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> de suspensões lipossomais	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1	Caracterização físico-química da NYS	69
5.1.1	Solubilidade	69
5.1.2	Análise do teor de Umidade	70
5.1.3	Caracterização espectroscópica da NYS na região do UV/V em Metanol	70
5.1.4	Análise fluorimétrica da NYS	74
5.1.5	Análise por espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	75

5.1.6	Análise da NYS por DSC	78
5.1.7	Análise da NYS por TGA	79
5.1.8	Determinação do coeficiente de partição octanol/tampão	80
5.2	Preparação das formulações lipossomais	81
5.3	Caracterização físico-química das suspensões lipossomais	93
5.3.1	Raio hidrodinâmico	93
5.3.2	Potencial Zeta	95
5.3.3	Teor de fosfato	95
5.3.4	Eficiência de encapsulação	96
5.3.5	Determinação do grau de anisotropia de fluorescência	98
5.3.6	Estudo da interação da NYS em lipossomas	101
5.3.7	Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> da NYS e NYS lipossomal .	110
5.3.8	Conclusões sobre as preparações lipossomais selecionadas	116
6	CONCLUSÕES GERAIS	119
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	123
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

ABREVIATÖES

- **AnfB:** Anfotericina B
- **ASD:** meio de cultura “Agar Saboraud Dextrose”
- **BHT:** 2,6 –bis (1,1-dimetil)-4-metil fenol
- **CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta eficiência
- **DMPC:** 1,2-Di-meristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
- **DMPG:** 1,2-Di-meristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol
- **DPPC:** 1,2-Di-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
- **DSC:** Calorimetria Exploratória Diferencial
- **DSPC:** 1,2-Di-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
- **DSPG:** 1,2-Di-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol
- **DTG:** Termogravimetria Diferencial
- **ELISA:** “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
- **FDA:** “Food and Drug Administration”
- **GUV:** vesículas gigantes unilamelares
- **HEPES:** N-[2-hidroxietil] piperazina-N’-[2-ácido tanosulfônico]
- **IgG:** Imunoglobulina G
- **IgM:** Imunoglobulina M
- **IV:** Infravermelho
- **LUV:** vesículas unilamelares grandes
- **MIC:** Concentração Inibitória Mínima
- **microDSC:** MicroCalorimetria Exploratória Diferencial
- **MLV:** vesículas multilamelares
- **MVV:** vesículas multivesiculares
- **NYS:** Nistatina
- **OLV:** vesículas oligolamelares
- **PCH:** fosfatidilcolina de soja hidrogenada
- **QELS:** “Espalhamento Quase-Elástico de Luz”

- **RMN:** Ressonância Magnética Nuclear
- **RPMI:** meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute”
- **SUV:** vesículas unilamelares pequenas
- **T_c:** temperatura de transição de fases
- **TGA:** Análise Termo-Gravimétrica
- **UV/Vis.:** Ultravioleta/Visível
- **v:v :** razão volume:volume
- λ_{max} : comprimento de onda máximo

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de lipossomas, baseada em parâmetros estruturais . . .	34
Tabela 2	Solubilidade da NYS em diferentes solventes. As concentrações as soluções de NYS com os solventes testados foram de 1,94 mol.L⁻¹	69
Tabela 3	Dados de regressão linear da curva de calibração ($\lambda_{\text{Máx}}$ 292 nm)	72
Tabela 4	Dados de regressão linear da curva de calibração ($\lambda_{\text{Máx}}$ 304 nm)	73
Tabela 5	Dados de regressão linear da curva de calibração ($\lambda_{\text{Máx}}$ 320 nm)	73
Tabela 6	Frequências de absorção características das vibrações de ligação da NYS Medley e Cristália	76
Tabela 7	Coeficientes de partição da NYS em n-octanol/tampão succinato (0,02 mol L⁻¹; pH 5,6) isotônico a 25 e 37 °C	81
Tabela 8	Teores % de NYS recuperada nas formulações lipossomais, contendo 10 % de NYS em relação à concentração molar de PCH, hidratadas com Hepes (0,01 mol.L⁻¹; pH 7,4) ou tampão succinato (0,02 mol.L⁻¹, pH 5,6) , isotônicos, a 55 e 65 °C	82
Tabela 9	Teores obtidos de NYS recuperada na formulação 80 % PCH e 20% de Colesterol, hidratada com os tampões Hepes (0,01 mol L⁻¹; pH 7,4) ou tampão succinato (0,02 mol.L⁻¹, pH 5,6), isotônicos, à 55 e 65 °C	84
Tabela 10	Teores de NYS recuperada nas formulações lipossomais (Etapa 2), compostas de lipídios PCH, colesterol e DSPG, contendo NYS (NYS/lipídio 7 %), hidratadas com tampão succinato (0,02 mol.L⁻¹) , isotônico, a 55 °C	87
Tabela 11	Teores obtidos de NYS recuperada nas formulações: 80 % PCH e 20 % de Colesterol e 70 % PCH e 30 % de DSPG, quando as formulações são hidratadas com tampão succinato (0,02 mol L⁻¹); pH 5,6 isotônico. As preparações foram hidratadas a 55 °C e foram variadas as concentrações de lipídios de 10 a 15 mM. A relação fármaco/lipídio de 7 para 10 %	88

Tabela 12	Teores de NYS nas formulações lipossomais compostas PCH, colesterol e DSPG, BHT e NYS em uma relação fármaco/lipídio de 7 %, hidratadas com tampão succinato (0,02 mol.L ⁻¹) isotônico, a 60 °C	89
Tabela 13	Teores de NYS recuperada na formulação lipossomal composta de PCH, colesterol, DSPG, BHT e NYS numa relação fármaco/lipídio de 6,5 %; hidratada com tampão succinato (0,02 mol L ⁻¹), isotônico, a 55 e 60 °C, modo de hidratação AU e AE	92
Tabela 14	Teores de encapsulação de NYS em preparações lipossomais L1 e L2	97
Tabela 15	Grau de anisotropia de fluorescência (r) da NYS livre e encapsulada em lipossomas em tampão succinato (0,02 mol L ⁻¹), isotônico, pH 5,6 a 25 °C	98
Tabela 16	Variação da fluorescência da NYS em concentrações e temperaturas diferentes, na ausência e presença de lipossomas, em tampão succinato (0,02 mol L ⁻¹), isotônico, pH 5,6	100
Tabela 17	Valores de 1/fa obtidos para a NYS encapsulada em lipossomas (L1 e L2), usando como os supressores iodeto de potássio e Acrilamida	110
Tabela 18	Resultados do teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> ("MIC"(μM/ml)) para as NYSs 1 e 2 em leveduras do gênero <i>Candida</i> , das espécies <i>krusei</i> , <i>albicans</i> , <i>parapsilosis</i> e do gênero <i>Cryptococcus</i> , espécie <i>neoforman</i>	111
Tabela 19	"MIC"(μM/ml) para as amostras de NYS 1 e 2 em fungos dos gêneros <i>Trichophyton</i> (espécies <i>rubrum</i> , <i>mentagrophytes</i> e espécie indefinida (spp.); <i>Fusarium</i> spp. e <i>Aspergillus fumigatus</i>	112
Tabela 20	"MIC"(μM/ml) e CFM (μM/ml) para a NYS livre, NYS 1 e NYSs L1A (hidratadas a 55 °C) e L2A (hidratadas a 60 °C), em leveduras dos gêneros <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i>	113
Tabela 21	"MIC"(μM/ml) e CFM "(μM/ml) para dois lotes de NYS livre (NT/C 645743/Medley e 04102/2004/Cristália) e preparações lipossomais L1 e L2, empregando as espécies <i>albicans</i> e <i>krusei</i>	115

Tabela 22 “MIC” e CFM para dois lotes de NYS livre (NT/C 645743/Medley e 04102/2004/Cristália) e preparações lipossomais L1 e L2, empregando os gêneros <i>Candida</i> (<i>parapsilosis</i>) e <i>Cryptococcus</i> (<i>neoformans</i>)	116
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas moleculares de NYS _s A1, A2 e A3	04
Figura 2	Direcionamento da encapsulação de fármacos em lipossoma multilamelar (MLV): moléculas hidrossolúveis, lipossolúveis e anfipáticas	07
Figura 3	Ilustrações de hifas septadas mononucleadas, multinucleadas e não septadas, presentes em de fungos filamentosos	18
Figura 4	Ilustração de hifa com esporo assexuado do tipo clamidósporo de fungos filamentosos	20
Figura 5	Ilustração de esporo assexuado do tipo artrósporo de fungo do gênero <i>Geotrichum</i>	20
Figura 6	Ilustração de esporo assexuado do tipo blastósporo	21
Figura 7	Ilustração de esporo assexuado do tipo esporangiósporo	21
Figura 8	A – Cultura, em Agar, de <i>Aspergillus fumigatus</i> (imagem à esquerda) e Conídios de <i>Aspergillus fumigatus</i> (imagem central e à direita). B – Ilustração de Conídios de <i>Aspergillus</i> agrupados em forma de cabeça, ao redor de uma vesícula	22
Figura 9	Ilustração de Conídios de <i>Penicillium</i> agrupados em forma de pincel	23
Figura 10	Fotos de <i>Candida albicans</i> crescendo na forma filamentosa (à esquerda) e na forma de levedura (no centro e à direita)	24
Figura 11	Características dos diferentes gêneros de fungos filamentosos e septados, principais causadores de dermatomicoses	27
Figura 12	Onicomicose por <i>Trichophyton rubrum</i>	27
Figura 13	Representação esquemática de poro formado pela NYS em uma membrana celular	30
Figura 14	Fórmulas estruturais moleculares dos fosfolipídios 1,2-Di-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DSPC), 1,2-Di-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), 1,2-Di-estearoil-sn-glicero-	

	3-fosfatidilglicerol (DSPG) e do lipídio Colesterol	32
Figura 15	Grupos cabeça de fosfolipídios encontrados em membranas biológicas	33
Figura 16	Secção transversal (A) de um lipossoma e (B) de uma bicamada lipídica	34
Figura 17	Transição das fases gel e líquida cristalina da bicamada lipídica de fosfolipídio (A). Diferentes configurações (trans e gauche) causadas pela rotação de ligação simples C-C das cadeias acila dos fosfolipídios (B)	36
Figura 18	Possíveis mecanismos de interação dos lipossomas com células	38
Figura 19	Esquema do método de preparo de lipossomas por filme lipídico	42
Figura 20	Representação Esquemática da hidratação e o preparo de diferentes tipos de lipossomas	43
Figura 21	Espectros de absorção, da NYS Medley, na região do UV/V em MeOH, à 25C (2,6; 3,9; 5,3; 6,6; 7,9; 9,2x10 ⁻⁶ ; 1,0x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹)	71
Figura 22	Curva de calibração para soluções de NYS Medley ($\lambda_{\text{máx}}$ 292 nm)	71
Figura 23	Curva de calibração para soluções de NYS Medley ($\lambda_{\text{máx}}$ 304nm)	72
Figura 24	Curva de calibração para soluções de NYS Medley ($\lambda_{\text{máx}}$ 320nm)	73
Figura 25	Espectros de fluorescência de NYS Medley em MeOH (1,05x10 ⁻⁵ ; 9,2; 7,9; 6,6; 5,3; 3,9; 2,6x10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) e de metanol puro	74
Figura 26	Espectros no IV das amostras de NYS Medley (azul) e Cristália (preto)	75
Figura 27	Espectros no IV da NYS dos diferentes tipos de cristalização da NYS A, B e C	77
Figura 28	Curvas de aquecimento obtidas por DSC para as amostras de NYS Medley (A); Cristália (B)	78

Figura 29	Curvas de aquecimento obtidas por TGA da NYS Lotes: NT/C 645743/Medley e 04102/2004/Cristália. Massas: 3,7mg (Medley) e 3,5mg (Cristália)	79
Figura 30	Curvas de DTG da NYS Lotes: NT/C 645743/Medley e 04102/2004/Cristália. Massas: 3,7 mg (Medley) e 3,5 mg (Cristália)	80
Figura 31	Estruturas moleculares das formas isoméricas interconvertíveis do antibiótico NYS. A - maior atividade biológica. B - menor atividade biológica	83
Figura 32	Cromatogramas das duas formulações (Etapa 1). (A) 80% de PC e 20% de colesterol e teor de $98,1 \pm 0,4\%$ de NYS e (B) 100% de PCH e teor de $90,8 \pm 0,1 \%$ de NYS	85
Figura 33	Cromatogramas das formulações com 80 % de PCH e 20 % de Colesterol (Etapa 1). (A): tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 5,6 e 55 °C; (B): tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 5,6 e 65 °C; (C): tampão Hepes ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 7,4 e 55 °C; (D): tampão Hepes ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 7,4 e 65 °C	86
Figura 34	Cromatogramas das formulações P1 (PCH 54 %, colesterol 26 % e DSPG 20 %) (A), P2 (PCH 80 %, colesterol 20 %) (B), P3 (PCH 70 %, colesterol 20 % e DSPG 10 %) (C) e P4 (PCH 70 % e DSPG 30 %) (D), respectivamente em tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 5,6 e 60 °C	91
Figura 35	Distribuição multimodal de tamanho. (A) Preparação lipossomal L1; (B) Preparação lipossomal L2	94
Figura 36	Cromatogramas da NYS presente em formulação lipossomal MLV (L2) sem ultracentrifugar (A) e ultracentrifugada (B). Suspensão em tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$); pH 5,6; isotônico. O Pico com tempo de retenção próximo a 3 min é o pico do solvente e em cerca de 10 min o da NYS	96
Figura 37	Sobreposição de espectros de emissão de fluorescência da	

	NYS ($C = 9,9 \mu\text{M}$) nos lipossomas L1 (hidratado a 55°C) e L2 (hidratado a 60°C) após a adição sucessiva dos agentes supressores iodeto de potássio (A e B) e acrilamida (C e D), a 25°C . As concentrações dos supressores variaram de 0 a $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$	103
Figura 38	Sobreposição de espectros de emissão de fluorescência da NYS livre ($C = 9,9 \mu\text{M}$) livre em tampão succinato após a adição sucessiva dos agentes supressores iodeto de potássio (A) e acrilamida (B) a 25°C . As concentrações dos supressores variaram de 0 a $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$	104
Figura 39	Gráficos de Stern-Volmer relativos ao estudo da supressão de fluorescência no estado fixo da NYS livre ($C = 9,9 \mu\text{M}$) e em lipossomas com os supressores iodeto de potássio (A) e acrilamida (B). As concentrações dos supressores variaram de 0 a $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$	105
Figura 40	Gráficos da equação de Stern-Volmer modificada (equação 5) empregada para supressão de fluorescência combinada dinâmica e estática, no estado fixo, da NYS livre ($C = 9,9 \mu\text{M}$) e em lipossomas com os supressores iodeto de potássio (A) e acrilamida (B). As concentrações dos supressores variaram de 0 a $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$	107
Figura 41	Gráficos para a equação Stern-Volmer modificada (equação 6) para as frações de acessibilidade ao supressor no estudo da supressão de fluorescência da NYS livre ($C = 9,9 \mu\text{M}$) e em lipossomas com os supressores iodeto de potássio (A) e acrilamida (B).). As concentrações dos supressores variaram de 0 a $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$	108

Figura 42	Gráficos para a equação Stern-Volmer modificada (equação 6)	
	para os estudos da supressão de fluorescência da NYS livre (C	
	$= 9,9 \mu\text{M}$) e em lipossomas, com os supressores iodeto de	
	potássio (A) e acrilamida (B). As concentrações dos	
	supressores variaram de 0 a $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$	109

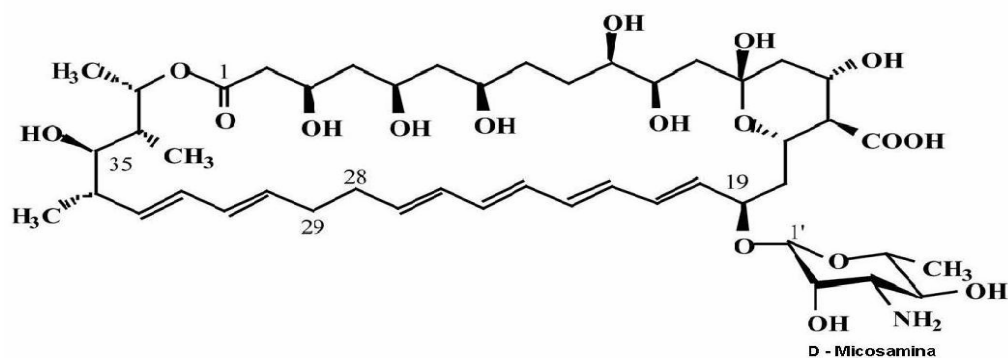
1.INTRODUÇÃO

Durante muitos anos a terapêutica de micoses especialmente de micoses profundas, encontrava dificuldades devido ao fato dos fungos serem células eucarióticas que parasitam hospedeiros com células da mesma natureza. Assim, as diferenças citológicas entre o parasito e o hospedeiro são pequenas e os fármacos que interferem no metabolismo daqueles habitualmente agem no metabolismo dos últimos (TAVARES, 1984).

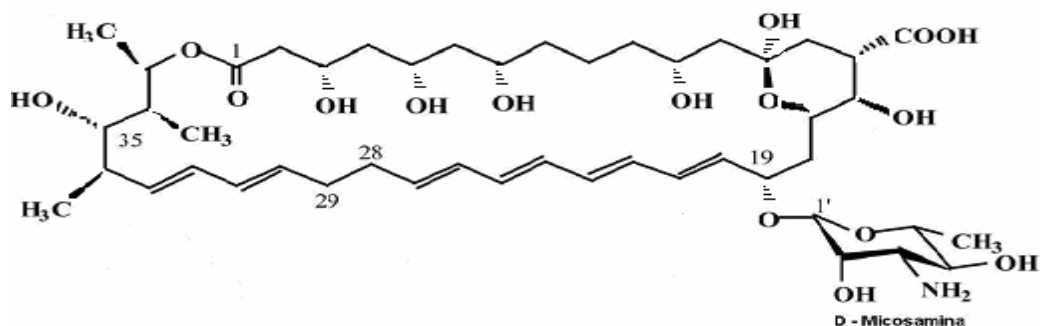
A Nistatina (NYS) ($C_{47}H_{75}NO_{17}$) ou fungicidina (massa molar 926,13 g/mol) é um antibiótico extraído principalmente de culturas de *Streptomyces Nursei*. Este composto foi isolado em 1950 por Hazen e Brown da divisão de laboratórios e pesquisa do departamento de saúde do Estado de Nova York, Estados Unidos da América (MICHEL, 1972). Apresenta em sua estrutura uma lactona macrocíclica (Figura 1), consistindo de dieno tetraeno hidroxilado ligado a um ou dois grupamentos amino açúcar. Devido à presença de grupos carboxil e amino, a NYS é anfotérica e também anfifílica, pois possui uma extremidade polar e outra apolar em sua molécula (Figura 1). A NYS é pouco solúvel na água e solventes orgânicos, mas solúvel em dimetilformamida e dimetilsulfóxido.

A NYS comercial representa uma mistura de compostos intimamente relacionados. Segundo POROWSKA e col. (1972) que caracterizaram amostras de NYS comercial, o fármaco é na verdade um complexo contendo três constituintes biologicamente ativos, designados como NYS A1, A2 e A3 (MICHEL, 1972 & POROWSKA e col., 1972). O principal componente do complexo é o componente A1, que apresenta em sua estrutura um amino açúcar, a D - micosamina ligada ao oxigênio do carbono 19 (RICKARDS & CHONG, 1970; MANWARING & RICKARDS, 1969; BOROWSKI e col., 1971). A NYS A2 (figura 1) mostra uma estrutura muito semelhante a A1. As diferenças estão na aglicona do antibiótico, nas variações na estereoquímica dos grupamentos hidroxilas que carecem de uma hidroxila no carbono 10 do macrociclo e na posição da carboxila é o carbono 15. Já o componente A3 possui mudanças na estereoquímica dos grupos hidroxilas e tem um outro radical açúcar, a L-digitoxose, ligada ao carbono 35 (ZIELINSKY e col., 1979; ZIELINSKY e col., 1987) (Figura1).

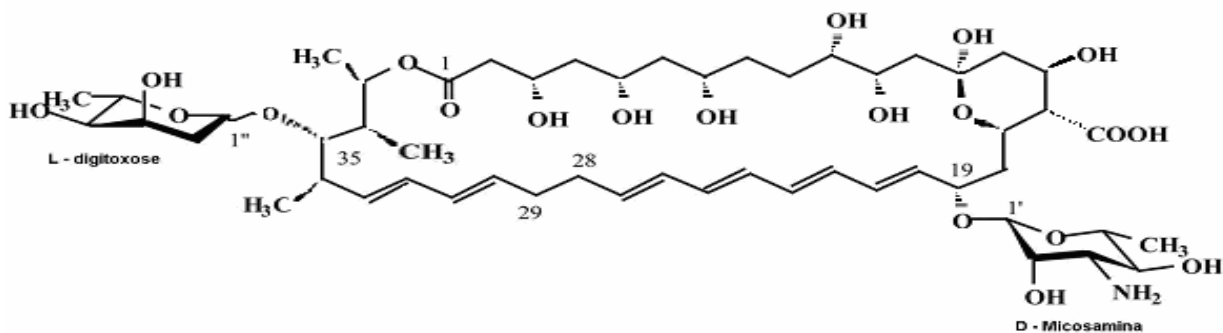
Todavia A3 tem o mesmo amino açúcar presente nos outros dois componentes. Os compostos A1 e A2 foram identificados por SHENIN e col., (1993) que analisaram amostras de NYS grau farmacêutico. Todavia, a designação da estrutura do componente A2 do complexo NYS foi realizada por PAWLAK e col., (2005). A complexidade da composição do composto NYS é devida a sua obtenção através de processo fermentativo, onde os três componentes são produzidos.



Nistatina A1



Nistatina A2



Nistatina A3

Figura 1. Estruturas moleculares de NYS_S A1, A2 e A3 (Borowski e col., 1971; Zielinsky e col., 1987; Pawlak e col., 2005).

A NYS é membro de um grupo relativamente grande de compostos estruturalmente relacionados, altamente insaturados, chamados antibióticos antifúngicos poliênicos. Entre os quimioterápicos antifúngicos, os antibióticos são muito eficazes na terapêutica de micoses profundas. Essa classe de compostos altera a permeabilidade da membrana de células sensíveis, como as células fúngicas. A NYS é ativa frente a diversas espécies de fungos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Blastomyces* y *Coccidioides*. Contudo, os poliênicos não têm ação em células de protozoários, bactérias, exceto para *Acholeplasma* crescido na presença de esterol, assim como contra algas azul-verdes (GALE e col., 1972).

Na prática clínica, a NYS é utilizada no tratamento da candidíases superficiais de pele e mucosas (esofágica, intestinal e vaginal). O antibiótico praticamente não é absorvido por via oral, entretanto devido a sua ação superficial local, é administrado oralmente em casos de candidíase bucal e intestinal (WASAN e col., 1996). Contra a candidíase vaginal é empregada sob a forma de óvulos e na cutânea e periungueal sob a forma de cremes, pomadas e loções (TAVARES, 1984). Quando administrada por via intramuscular e intravenosa é muito tóxica, sendo capaz de causar hemólise, necrose e abscessos frios nos locais de injeção. Isto se deve à imediata ligação do fármaco aos esteróis das membranas das hemácias e células tissulares, causando sua destruição (HIEMENZ & WALSH, 1996).

A NYS tem estrutura molecular similar à da Anfotericina B (AnfB) mas, em alguns casos, mostra um espectro de ação antifúngica *in vitro* mais amplo do que esta última, pois atua em fungos AnfB resistentes (GROLL e col., 1999). Entretanto, a NYS e a AnfB apresentam problemas de pouca solubilidade em água e de grande toxicidade para os pacientes, quando administradas intravenosamente, como nefrotoxicidade, tromboflebite, febre, calafrios e náuseas. Em função disso, tem-se evitado a aplicação parenteral da NYS (MORIBE & MARUYAMA, 2002; MORIBE & MARUYAMA, 2000). Desde que a NYS mostra propriedades farmacológicas diferentes daquelas da AnfB, ou seja, maior ação sobre leveduras e alguns casos tem um espectro de ação maior do que a AnfB, é desejável o desenvolvimento de formulação para a administração

intravenosa da NYS, já que se dispõe no mercado farmacêutico uma preparação lipossomal de AnfB, comercializada sob o nome AMBISOME (marca registrada da NeXstar Pharmaceuticals, Inc.) e distribuída no Brasil pela empresa United Medical.

A ciência e tecnologia envolvida na obtenção de novos fármacos, sejam os mesmos, sintéticos ou de fontes naturais, tiveram grande desenvolvimento nas décadas de 40 e 50 e continuam, de forma desacelerada, a evoluir. A partir da década de 80, moléculas com efeitos terapêuticos, têm sido enriquecidas por produtos obtidos pela aplicação de processos biotecnológicos, que utilizam princípios da engenharia genética, tais como fermentações com microrganismos geneticamente modificados e cultura de células de mamíferos (GOMES & REIS, 2001). Mais recentemente no cenário mundial, têm-se observado que companhias farmacêuticas pioneiras têm deixado de comercializar novos fármacos sintéticos para produzir produtos genéricos, conforme tem expirado suas patentes (<http://www.s bqrio.s bq.org.br/download/set1801.pdf>). Este cenário cria a necessidade de apresentar fármacos clássicos sob novas formas, que podem ser novos sistemas de entrega (TYLE, 1988). Outra questão, é que o desenvolvimento de novos fármacos está relacionado aos altos custos, principalmente em rotas sintéticas e ainda se observa que pouca inovação ocorreu em relação ao surgimento de novas formas farmacêuticas mais eficientes na entrega do fármaco aos sítios de ação, registrando-se efeitos colaterais indesejáveis e danos ao organismo do paciente. Vários fármacos empregados na terapêutica, devido ao alto grau de toxicidade, exigem que a quantidade a ser administrada seja a menor possível, para não causar danos aos tecidos saudáveis e, ao mesmo tempo, seja suficiente para atingir as células alvo, após ser absorvido e distribuído no organismo.

Teoricamente, um dos objetivos básicos da química terapêutica é entregar a substância medicinal específica e eficientemente ao local da doença ou distúrbio. Em geral isto pode ser conseguido pela administração do fármaco por via oral (em forma de cápsulas, comprimidos, suspensões, soluções, entre outras.), nasal, transdérmica (tópica), intramuscular, endovenosa, subcutânea, entre outras. Em muitos casos, entretanto, a eficácia do fármaco pode ser melhorada, e os efeitos colaterais reduzidos,

encapsulando-o em algum tipo de transportador. Idealmente, este deverá vetorizar o fármaco em concentração adequada e apenas no local onde o mesmo é necessário, evitando a sua perda, degradação e a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis (PRISTA e col., 1996).

Os lipossomas são vesículas lipídicas, onde uma fase aquosa é totalmente cercada por uma ou mais lamelas (bicamadas de fosfolipídios), constituindo, ao lado de aerossóis, hidrogéis, micro/nanopartículas poliméricas, "patches" um dos sistemas mais importantes para encapsulação e liberação sustentada de fármacos *in vivo*. Eles podem encapsular ingredientes hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfifílicos. Drogas hidrofílicas têm tendência a permanecer no compartimento central aquoso e drogas hidrofóbicas/anfifílicas encontram-se inseridas na bicamada lipídica (Figura 2). As drogas lipofílicas permanecem mais tempo encapsuladas devido ao alto particionamento na fase membranar (SHARATA, 1996).

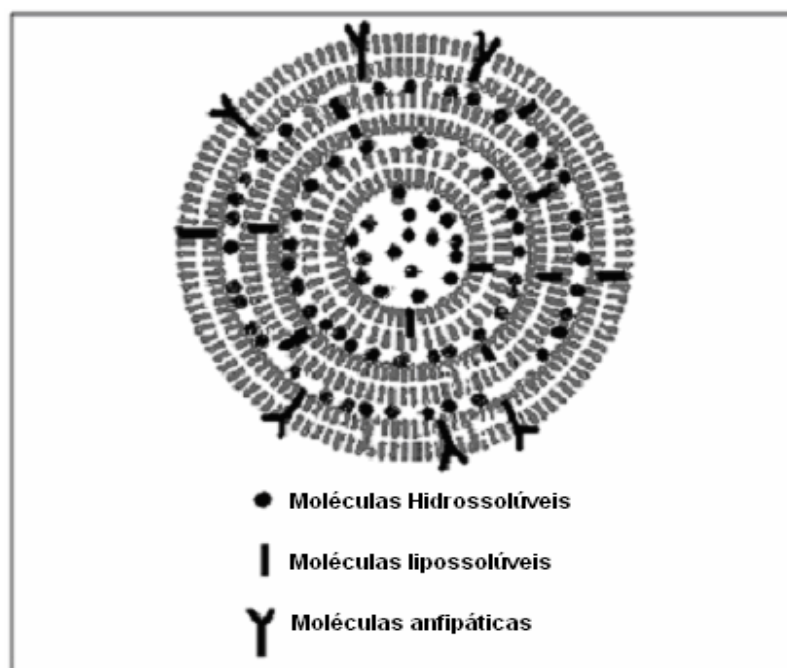


Figura 2. Direcionamento da encapsulação de fármacos em lipossoma multilamelar (MLV): moléculas hidrossolúveis, lipossolúveis e anfipáticas. (Araújo e col, 2003).

Os sistemas lipossomais têm sido testados com sucesso como transportadores

de diversos fármacos, material genético e enzimas para o interior de células. São atóxicos, pouco imunogênicos, biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que quando alcançam os tecidos que necessitam de tratamento podem liberar doses concentradas de fármaco aumentando sua ação terapêutica. Entretanto, ao circularem na corrente sanguínea, os lipossomas funcionam como corpos estranhos, sendo rapidamente atacados pelos macrófagos que, assim, passam a transportar os fármacos veiculados nos lipossomas. Compostos antimicrobianos lipossomados podem penetrar em células do sistema mononuclear fagocitário onde microrganismos patogênicos residem, causando a morte do agente microbiano (PRISTA e Col., 1996 & LASIC, 1993). O tamanho dos lipossomas determina o grau de reconhecimento pelo Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) e determina a velocidade de retirada dos mesmos da circulação sanguínea.

Para uso humano, os sistemas lipossomais têm sido empregados para reduzir a toxicidade clínica sistêmica de fármacos aumentando, assim, a eficácia terapêutica de agentes antimicrobianos, antineoplásicos e outros (TORCHILIN, 2005). OFFNER e col., (2004) avaliaram a atividade e segurança da nistatina lipossomal, numa dose de 4 mg/kg, em pacientes com aspergilose invasiva refratária ou intolerante a AnfB, estes pesquisadores verificaram que a NYS lipossomal foi efetiva contra a aspergilose invasiva, todavia alguns efeitos adversos observados para a AnfB, também foram para a NYS lipossomal, como: tremores calafrios, febre, hipo ou hipertensão e taquicardia . Outros autores, também comprovaram que a NYS incorporada em lipossomas, nas doses de 2 a 6 mg/kg, demonstrou significativa redução da toxicidade enquanto que a atividade antifúngica foi preservada (CARRILLO-MUNOZ e col., 1999; GROLL e col., 1999; JOHNSON e col., 1998; MEHTA e col., 1987; OAKLEY e col., 1999). A utilidade de formulações lipossomais em clínica médica é comprovada pela aprovação da agência controladora norte-americana, "Food and Drug Administration" (FDA), de formulações lipossomais para entrega de algumas substâncias com atividade antineoplásica (DOXIL[®] com doxorubicina e DAUNOSOME[®] com daunorrubicina) e antifúngica (AMBISOME[®] com Anfotericina B), já comercializadas em várias partes do mundo.

Uma formulação lipossomal de NYS (NYOTRAN[®]) foi preparada pela Aronex Pharmaceuticals, com boa atividade em ratos. A referida formulação já se encontra em aplicação clínica e para obtenção da nistatina lipossomal os autores utilizaram os lipídios Dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC") e Dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG") em uma razão mássica de 7:3. A formulação apresenta tamanho de partículas que variam de 0,1 a 3 μ M porém as propriedades físicas da formulação ainda não estão bem compreendidas (MEHTA e col., 1987, TORCHILIN, 2005). Sendo assim, é plenamente justificado um trabalho no sentido de preparar e caracterizar formulações lipossomais contendo NYS.

Os sistemas lipossomais podem ser estudados em relação a fatores como eficiência de encapsulação, tamanho, teor de fosfolipídios na formulação, entre outros. Na caracterização desses sistemas podem ser utilizadas várias técnicas analíticas como espectroscopia (de absorção UV/Vis, de emissão, IV e RMN), espalhamento de luz, calorimetria diferencial de varredura (DSC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). É preciso, também, avaliar a atividade dos lipossomas em sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*.

2.OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) desenvolver e otimizar formulações lipossomais contendo o fármaco NYS;
- 2) selecionar formulações em que o fármaco apresentasse maior estabilidade química;
- 3) caracterizar as formulações lipossomais de NYS físico-quimicamente;
- 4) testar a atividade *in vitro* das formulações lipossomais contendo NYS.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.Fungos

Fungos (do latim *fungus* = cogumelo) são seres eucarióticos, com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como os fungos filamentosos ou bolores. As células de fungos podem apresentar uma membrana citoplasmática, que mais externamente, apresentam uma parede celular que reveste o citoplasma e organelas dispersas. São também revestidas por membranas semelhantes o retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, ribossomos, mitocôndrias, vacúolos, núcleo e nucléolo. As membranas celulares fúngicas contêm esteróis, assemelhando-se às membranas de organismos superiores, como as dos mamíferos. As células fúngicas possuem vida independente e não se organizam em tecidos e os componentes principais da parede celular são hexoses e hexosaminas. Alguns fungos apresentam parede rica em quitina (N-acetil glicosamina). Outros possuem complexos de polissacarídeos e proteínas, com predominância de cisteína. Fungos do gênero *Cryptococcus*, como o *Cryptococcus neoformans*, apresentam cápsula de natureza polissacarídica que envolve a parede celular (TORTORA e col., 1993).

Os fungos constituem um grupo de organismos que não possuem clorofila e são ditos heterótrofos por absorção, pois suas hifas, no caso de fungos filamentosos (filamentos tubulares), crescem penetrando os substratos orgânicos e neles lançando suas enzimas digestivas. Os produtos finais solúveis, resultantes da digestão, são lenta e continuamente absorvidos. A água é utilizada na solubilização das enzimas e é indispensável na ação das mesmas. Desta forma, justifica-se o bom desenvolvimento dos fungos em ambientes úmidos (PELCZAR e col., 1996). Para seu desenvolvimento, esses organismos exigem sempre uma fonte de carbono, que será utilizada como material energético. Necessitam ainda de fontes de nitrogênio, que podem ser inorgânica (NO_3^- e NH_4^+) ou orgânica (aminoácidos, polipeptídeos e proteínas). Às vezes, certas substâncias como aminoácidos, podem funcionar como fontes de carbono e nitrogênio. Os fungos podem ser saprobióticos (ou saprófitas) e parasitas (facultativos ou obrigatórios), conforme vivam de fontes de alimentos existentes livres ou em hospedeiros (PELCZAR e col., 1980).

Dependendo da forma como os fungos se desenvolvem em meios de cultura, pode-se classificá-los em leveduriforme e filamentosos. As colônias leveduriformes são pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares ovais ou esféricos, geralmente com largura de 1 a 5 μm e comprimento de 5 a 30 μm , chamados leveduras. Esses microrganismos cumprem funções vegetativas (de crescimento) e reprodutivas. As colônias filamentosas podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas; são constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares em forma de tubo, as hifas (do grego *hyphe*= teia). Essas estruturas são filamentos tubulares ramificados com cerca de 2 a 10 μm de largura, podendo ser contínuas ou septadas. As não-septadas, também denominadas cenocíticas, são multinucleadas. Já as septadas podem ser: mono e multinucleadas (Fig. 3). As hifas septadas têm um septo que divide os filamentos em células distintas. Entre essas células ocorre migração do citoplasma e núcleos por poros existentes em cada septo (TORTORA e col., 1993, PELCZAR e col, 1980).

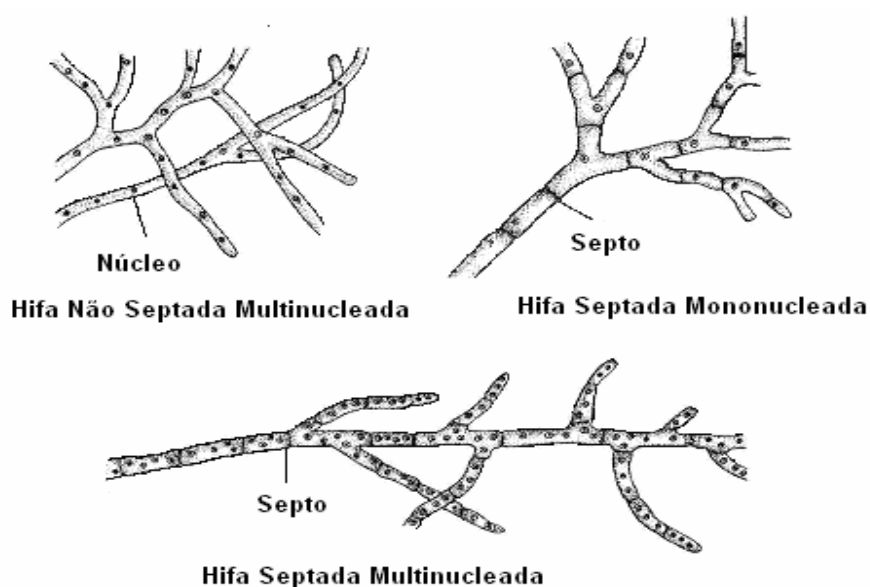


Figura 3. Ilustrações de hifas septadas mononucleadas, multinucleadas e não septadas multinucleadas, presentes em de fungos filamentosos (Pelczar e col., 1980).

As hifas crescem pelo alongamento de suas pontas (crescimento apical) e pela

produção de ramificações laterais. Em geral, as hifas formam um conjunto de estruturas tubulares microscópicas, junto ao substrato (fonte de alimento), chamada de micélio vegetativo (ALEXOPOULOS e col., 1996). Já outras hifas, relacionadas à reprodução, correspondem ao micélio reprodutivo ou aéreo. O micélio aéreo se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultura. Quando o micélio aéreo se diferencia por apresentar células reprodutivas ou esporos (propágulos), constitui o micélio reprodutivo. Este cresce em contato com o ar e dissemina os esporos produzidos. Outras hifas podem organizar-se em estruturas grandes para formar fungos corpulentos, como cogumelos, por exemplo: bufa-de-lobo e orelha-de-pau (TORTORA e col., 1993; PELCZAR e col., 1996).

A reprodução ocorre por formação de esporos. Os esporos são classificados, segundo sua origem, em sexuados e assexuados. Embora o micélio vegetativo não tenha especificamente funções de reprodução, alguns fragmentos de hifa podem se desprender do micélio vegetativo e cumprir funções de propagação, uma vez que as células fúngicas são autônomas. Os esporos assexuais são produzidos por um fungo individual através de mitose e consecutiva divisão celular. Entre os esporos assexuados podem ser citados os clamidósporos, artrósporos, blastósporos, esporangiósporos e conidiósporos (PELCZAR e col., 1980).

Os clamidósporos (Fig. 4) têm função de resistência, semelhante à dos esporos bacterianos. São células, geralmente arredondadas, de volume aumentado, com paredes duplas e espessas que limitam o citoplasma. Sua localização no micélio pode ser apical (terminal) ou intercalar. Esses esporos se formam em condições ambientais adversas, como escassez de nutrientes, de água e temperaturas não favoráveis ao desenvolvimento fúngico. Um fungo que produz clamidósporo é a *Candida albicans* (TORTORA e col., 1993).

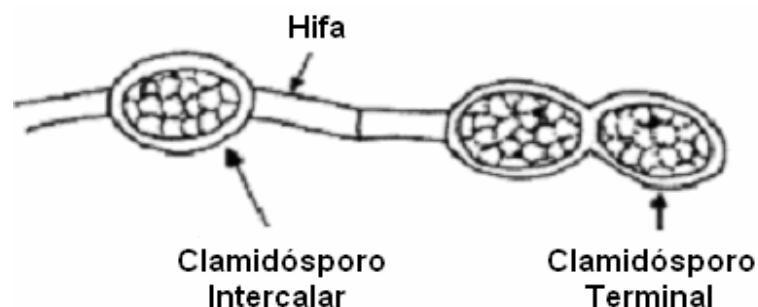


Figura 4. Ilustração de hifa com esporo assexuado do tipo clamidósporo de fungos filamentosos (Pelczar e col., 1980).

Os artrósporos (Fig. 5) são formados por fragmentação das hifas septadas em segmentos retangulares. São encontrados nos fungos do gênero *Geotrichum*, *Coccidioides immitis* e em dermatófitos (TORTORA e col., 1993).

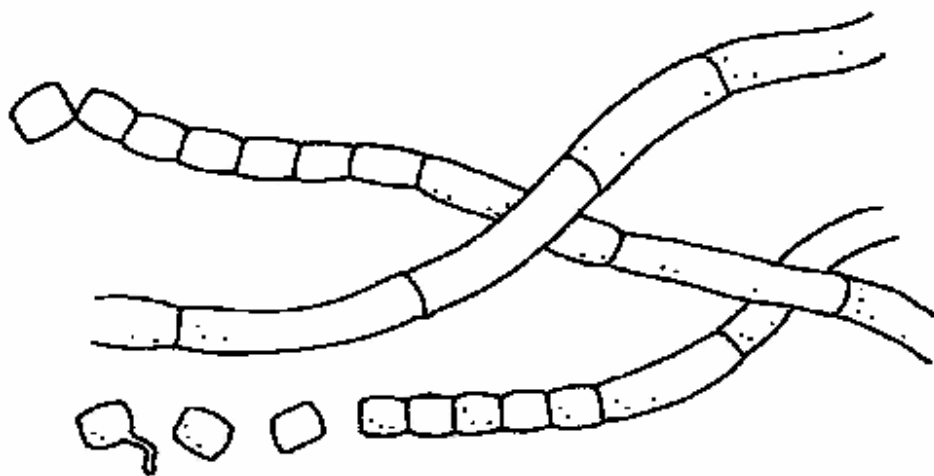


Figura 5. Ilustração de esporo assexuado do tipo artrósporo de fungo do gênero ***Geotrichum*** (Swatek, 1967).

Os blastósporos, também denominados gêmulas, são comuns nas leveduras e se derivam por brotamento da célula-mãe. Em alguns casos, os blastósporos permanecem ligados à célula-mãe, formando cadeias, as pseudo-hifas, cujo conjunto é o pseudomicélio, como se pode visualizar na Fig. 6 (TORTORA e col., 1993).

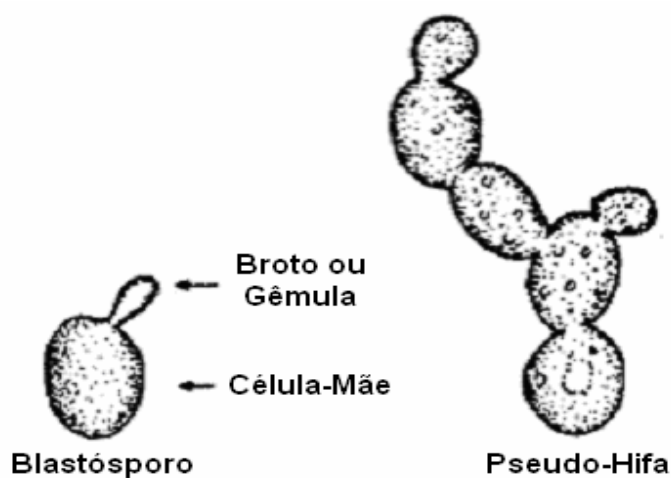


Figura 6. Ilustração de espora assexuada do tipo blastósporo (Alexopoulos e col., 1996).

Os esporangiósporos (Fig. 7) são formados no interior de uma espécie de saco (esporângio), situado ao final de hifas aéreas denominadas esporangióforo. A liberação dos esporos se realiza pela clivagem do citoplasma dos esporângios. Esse tipo de espora é produzido pelo gênero *Rhizopus* (TORTORA e col., 1993).

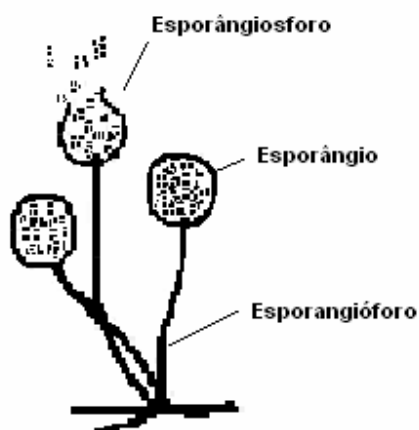


Figura 7. Ilustração de espora assexuada do tipo esporangiósporo (Pelczar e col., 1980).

Um quinto tipo de espora assexual é o conidiósporo ou conídios. Os conidiósporos se formam em cadeias ao final dos conidióforos, que nada mais são do

que ramificações das hifas. Dependendo de suas características morfológicas, podem ser classificados em micro e macroconídios (PELCZAR e col., 1980). Na Fig. 8A visualizamos-se os conídios agrupados do gênero *Aspergillus* e na 8B os conídios de *Aspergillus fumigatus*

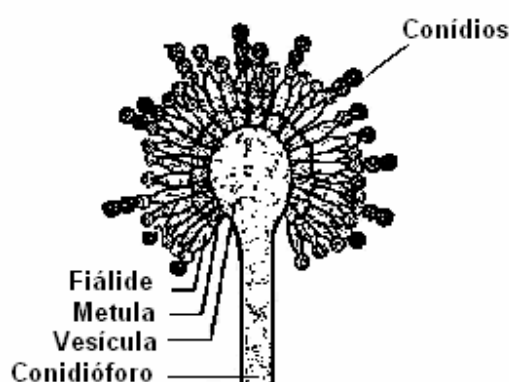
**A****B**

Figura 8: Cultura, em ágar, de *Aspergillus fumigatus* (imagem à esquerda) e Conídios de *Aspergillus fumigatus* (imagem central e à direita) (A). Ilustração de Conídios de *Aspergillus* agrupados em forma de cabeça, ao redor de uma vesícula (B) (http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_micro_org/fungos.htm e Alexopoulos e col., 1996).

No aparelho de conidiação ou produtor de conídios (esporos) do gênero *Aspergillus*, os conídios formam cadeias sobre fiálides, estruturas no formato de garrafa, em torno de uma vesícula que é uma dilatação na extremidade do conidióforo

(Fig. 8).

Outros gêneros, como o *Penicillium*, apresentam um aparelho de conidiação onde os conidióforos se ramificam e não se verifica a presença de vesícula. Como no caso do gênero *Aspergillus*, os conídios formam cadeias que se distribuem sobre as fiálides (Fig. 9).

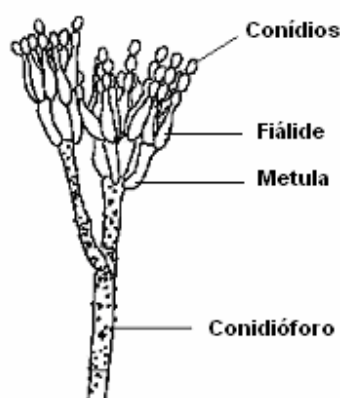


Figura 9. Ilustração de Conídios de *Penicillium* agrupados em forma de pincel (Alexopoulos e col., 1996)

Os esporos sexuais fúngicos são os resultados do processo de reprodução sexual meiótico, que compreende as fases: 1) um núcleo haplóide (metade dos cromossomos da espécie) de uma célula doadora (macho) penetra no citoplasma de uma célula receptora (fêmea); 2) os núcleos macho e fêmea se fundem para formar um núcleo diplóide; 3) através de meiose, o núcleo diplóide dá surgimento a quatro núcleos haplóides (PELCZAR e col., 1980). ALEXOPOULOS e col., (1996) postularam que a reprodução sexual em muitos fungos envolve a formação de esporos especializados. Os quatro tipos que têm sido observados são oósporos, zigósporo, ascósporo e basidiósporo.

Os fungos produzem esporos sexuais com menos frequência que os assexuais e só se reproduzem por processo sexual em determinadas condições, como em casos de variações de umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes (PELCZAR e col.,

1980).

3.2.Dimorfismo fúngico

Alguns fungos e especialmente alguns patogênicos apresentam dimorfismo, ou seja, duas formas de crescimento: filamentosa e leveduriforme, como ilustrado na Fig. 10 (PELCZAR e col., 1996).

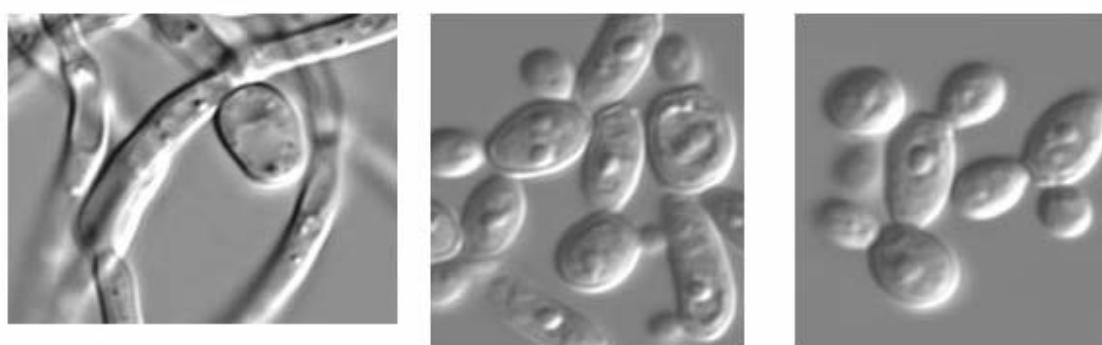


Figura 10. Fotos de *Candida albicans* crescendo na forma filamentosa (à esquerda) e na forma de levedura (no centro e à direita) (Pelczar e col., 1996).

Os fungos dimórficos podem ter morfologia diferente, conforme as condições nutricionais e a temperatura de seu meio de desenvolvimento. Esse fenômeno de variação morfológica, muito importante em micologia médica se expressa por um crescimento micelial entre 22 °C e 28 °C e leveduriforme entre 35 °C e 37 °C. Em geral, as formas são reversíveis. A fase micelial ou saprofítica é a forma infectante e está presente no solo e nas plantas. A fase leveduriforme ou parasitária é encontrada nos tecidos. O fenômeno de dimorfismo fúngico se observa entre os fungos de importância médica, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*. Na *Candida albicans*, a forma saprofítica infectante é a leveduriforme e a forma parasitária, isolada dos tecidos, é a micelial. Em laboratório, é possível reproduzir o dimorfismo mediante variações de temperatura de incubação, de tensão de O₂ e de meios de cultura específicos (PELCZAR e col., 1980)

Ainda que o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos esteja entre 4 e 7, a maioria dos fungos tolera amplas variações de pH (ALEXOPOULOS e col., 1996).

Os fungos filamentosos podem crescer em meio cujo pH está entre 1,5 e 11, mas as leveduras toleram pouco o meio alcalino e se desenvolvem bem em meios com pH ajustados 3,5 e 3,8. Em geral os limites de tolerância de pH para leveduras é de 2,2 e 8,0, de acordo com as diversas espécies (PELCZAR e col., 1980).

O crescimento de fungos é mais lento que o das bactérias e suas culturas precisam, em média, de 7 a 15 dias, ou mais, de incubação. Com a finalidade de evitar o desenvolvimento bacteriano que pode inibir ou se sobrepor ao do fungo, é necessário incorporar, aos meios de cultura, agentes antibacterianos de largo espectro, como o cloranfenicol. Também se pode acrescentar cicloheximida, para diminuir o crescimento de fungos saprófitas contaminantes de culturas de fungos patogênicos (ZAITZ C. e col., 1998).

Muitas espécies fúngicas exigem luz para seu desenvolvimento, outras são por ela inibidos e outras ainda mostram-se indiferentes a esse agente. Em geral, a luz solar direta, devido à radiação ultravioleta, é elemento fungicida (ALEXOPOULOS e col., 1996).

Por diferentes processos, os fungos podem elaborar vários metabólitos, como antibióticos, como a penicilina (*Penicillium chrysogenum*) e as cefalosporinas (*Cephalosporium acremonium*); agentes imunossupressores como a ciclosporina (*Cylindrocarpon lucidum* e *Tolypocladium inflatum*); álcoois (etanol – *saccharomyces cerevisiae*); ácidos orgânicos (ácido cítrico (*Aspergillus niger*)), enzimas (amilase, celulase, lipase e pectinase (*Aspergillus niger*)) e micotoxinas, como aflatoxinas (*Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*) que confere aos fungos, um importante papel nas áreas: farmacêutica, agrícola e alimentícia (ALEXOPOULOS e col., 1996, PELCZAR e col., 1980).

3.3. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas são denominadas micoses e são classificadas,

geralmente, como micoses superficiais e sistêmicas. As micoses superficiais localizam-se nas camadas superficiais da pele e seus anexos, bem como nas mucosas e zonas cutâneo-mucosas. As micoses superficiais podem ser subdivididas em cutâneas e subcutâneas. Já as infecções sistêmicas ou profundas afetam os tecidos e órgãos de indivíduos imunodeprimidos (RANG e col., 2004; LACAZ e col., 2002).

Existem condições ambientais, hábitos e condições de saúde humanas que favorecem o desenvolvimento de micoses superficiais e sistêmicas. Com relação às micoses superficiais, os fatores que favorecem seu desenvolvimento são calor e umidade ambiente, uso de roupas e sapatos impermeáveis (botas de borracha, tênis, roupas de nylon), deficiências nutricionais (avitaminoses, anemia, desnutrição), transpiração abundante e presença de feridas e machucados na pele. No caso das micoses sistêmicas, como o principal mecanismo de proteção do hospedeiro ao fungo é a resposta imunológica celular, as doenças imunossupressivas que diminuem a ação dos linfócitos T predis põem o hospedeiro a infecções fúngicas oportunistas; portanto, são considerados suscetíveis a infecções oportunistas indivíduos infectados pelo vírus HIV, pós-transplantados, neutropênicos, com neoplasias, além daqueles imunodeprimidos por drogas ou outras patologias (LAZZARINI e col., 1999).

As micoses são produzidas por diversos tipos de fungos, de diferentes gêneros e espécies. Alguns afetam tecidos queratinizados como cabelos, unhas, pêlos e o extrato córneo da epiderme, produzindo as dermatomicoses (micoses superficiais), também chamadas “Tinhas”. Os agentes etiológicos responsáveis pelas dermatomicoses são principalmente os gêneros de fungos filamentosos *Tricoppytum*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, que apresentam diferenças morfológicas relativas ao número de macro e microconídios, as estruturas responsáveis pela reprodução assexuada dos fungos (Fig. 11) (MAZÓN e col., 1997; RUBIO e col., 1999).

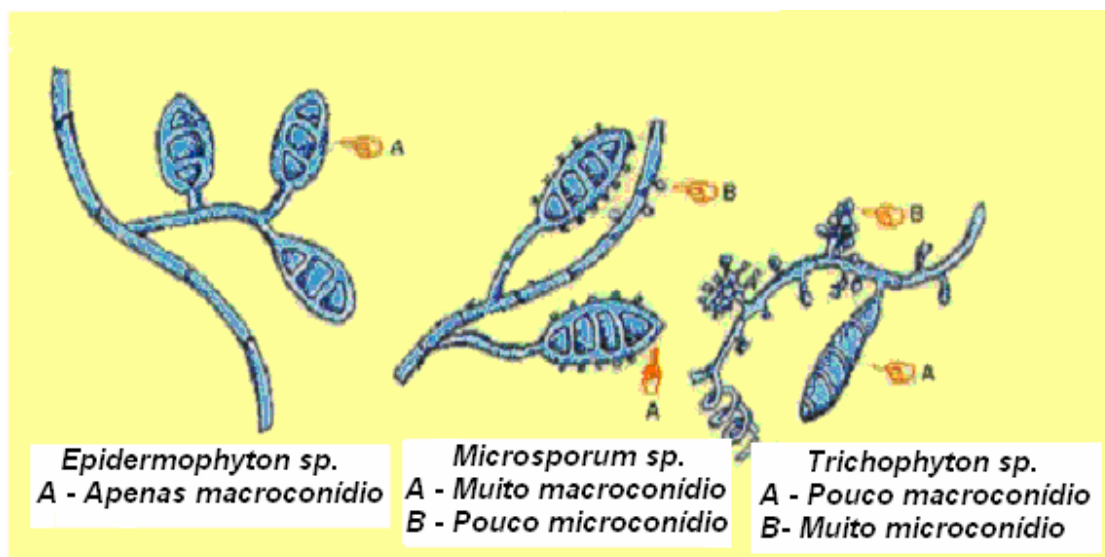


Figura 11. Características dos diferentes gêneros de fungos filamentosos e septados, principais causadores de dermatomicoses (<http://ib.ufpel.edu.br/dermatomicose.pdf>).

As dermatomicoses promovem descamações e ulcerações da pele, placas de calvície, infecções da bainha de pêlos e unhas. Na Fig. 12, visualiza-se a onicomicose provocada pelo dermatófito *Trichophyton rubrum*.

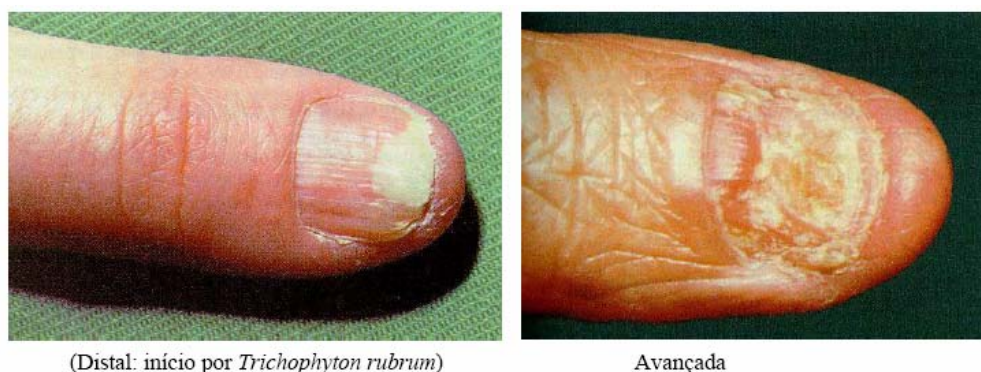


Figura 12. Onicomicose por *Trichophyton rubrum* (<http://ib.ufpel.edu.br/dermatomicose.pdf>).

As micoses sistêmicas são produzidas por fungos patogênicos capazes de invadir órgãos e tecidos saudáveis, se multiplicar e provocar dano tecidual. Os fungos ditos patogênicos pertencem às espécies *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomycetes dermatitides* e *Esporotrix schenckii*. Todavia, fungos oportunistas, que normalmente são inócuos para indivíduos imunocompetentes,

podem promover micoses severas. Entre eles citam-se: *Candida albicans* e espécies não *albicans* tão ou mais freqüentes, especialmente a *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Cândida glabrata* e *Candida krusei*; e outras espécies; *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium sp.* (ZAITZ e col., 1998).

Há tempos, infecções superficiais graves por fungos eram relativamente raras e as sistêmicas ainda mais. Nos últimos 35 anos, houve um aumento uniforme na incidência de infecções fúngicas sistêmicas secundárias graves. Os fatores envolvidos nesse aumento tem sido o uso disseminado de antibióticos de amplo espectro, a presença de indivíduos com redução da resposta imune devido à AIDS (Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida) ou à ação de agentes imunossupressores ou fármacos utilizados na quimioterapia do câncer. Estes fatores levaram a um aumento na prevalência de infecções oportunistas (http://www.cumc.columbia.edu/research/Faculty_Profiles/profiles/mitchell_ap.htm). No Brasil, as doenças sistêmicas mais comuns são: candidíase sistêmica, criptococose e histoplasmose, sendo o *Cryptococcus neoformans* o agente que infecta 10% dos pacientes com AIDS, causando meningite. A infecção pela referida espécie fúngica ainda não tem tratamento eficaz; logo, apresenta altos índices de mortalidade (<http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeOcho/Articulos/Micologia/ArchivosPDF/Micologia.PDF>; http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_bolso_5ed2.pdf).

No panorama internacional, verifica-se que a sepse fúngica vem se tornando freqüente nas unidades de terapia intensiva pediátrica e neonatal. Entre os agentes etiológicos identificados encontram-se a *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* e *Fusarium spp.* A taxa de mortalidade é elevada e varia de 15% a 50% (LEIBOVITZ, 2002). Novos antifúngicos estão sendo empregados, como novos compostos triazólicos, o voriconazol e o acetato de caspofungina (equinocandina). A caspofungina é um antifúngico lipopeptídico que inibe a enzima β -1-3-D-glucano sintetase, envolvida na síntese de polissacarídeo vital para a formação da parede celular de fungos filamentosos e leveduras e não presente em células de mamíferos (ARKADER e CARVALHO, 2006). No entanto, o emprego de antifúngicos mais antigos em carreadores de fármacos como

os lipossomas devem ser mais uma opção no combate às micoses sistêmicas.

3.4. Antibióticos antifúngicos poliênicos

Os antibióticos poliênicos constituem um grupo de substâncias ativas contra os fungos. Apresentam ação fungistática e fungicida sobre organismos sensíveis. Contudo, são substâncias tóxicas para o homem e outros mamíferos, por provocarem lesões celulares. O mecanismo de ação destes poliênicos envolve a interação do fármaco com esteróis existentes na membrana do microrganismo (TAVARES, 1984). Os antibióticos antifúngicos são compostos amplamente usados no tratamento de infecções fúngicas tópicas e invasivas em humanos (ZOTCHEV, 2003). A principal vantagem dos poliênicos sobre outros fármacos antifúngicos, como azóis e flucitozinas, é a ação fungicida e a baixa incidência de patógenos resistentes. As ações fungicidas dos antibióticos macrolídeos dependem estritamente da presença de esteróis na membrana das células sensíveis (BOLARD, 1986).

Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da NYS e de outros antibióticos poliênicos caracteriza-se pela sua ligação ao ergosterol presente na membrana citoplasmática de fungos sensíveis, resultando em alterações na permeabilidade da membrana pela formação de poros intramembranares, ocasionando perda dos componentes vitais intracelulares, tais como íons e pequenas moléculas, resultando na morte celular (Fig. 13) (LEIBOVITZ, 2002). Em geral, os antibióticos poliênicos têm maior afinidade pelo esterol fúngico, o ergosterol, do que o das células de mamíferos, o colesterol, pois o ergosterol possui uma estrutura mais rígida que o colesterol (FRANZINI, 2006). Sendo assim, os antibióticos poliênicos são menos tóxicos para as células de mamíferos (MICHEL, 1972; NG e WASAN, 2003).

A estrutura dos poros formados pela nistatina em membranas ricas em ergosterol não está clara. (HELRICH e col., 2006). Contudo, COUTINHO A. e col., (2004)

declaram que a partir de estudos espectroscopia de fluorescência, realizadas em lipossomas, LUV (Vesículas Unilamelar grande), contendo ergosterol e POPC (1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) e a nistatina, o fármaco pode apresentar duas fases distintas em seu modo de ação. Na primeira fase, moléculas do antibiótico se ligam à superfície da bicamada lipídica (Nistatina monomérica) e numa fase posterior quando o número médio de moléculas atinge um valor crítico de 100 moléculas/lipossoma ocorre a formação de agregados moleculares (oligômeros) que passam ao modelo clássico de nistatina transmembrana, ocorrendo a formação dos poros.

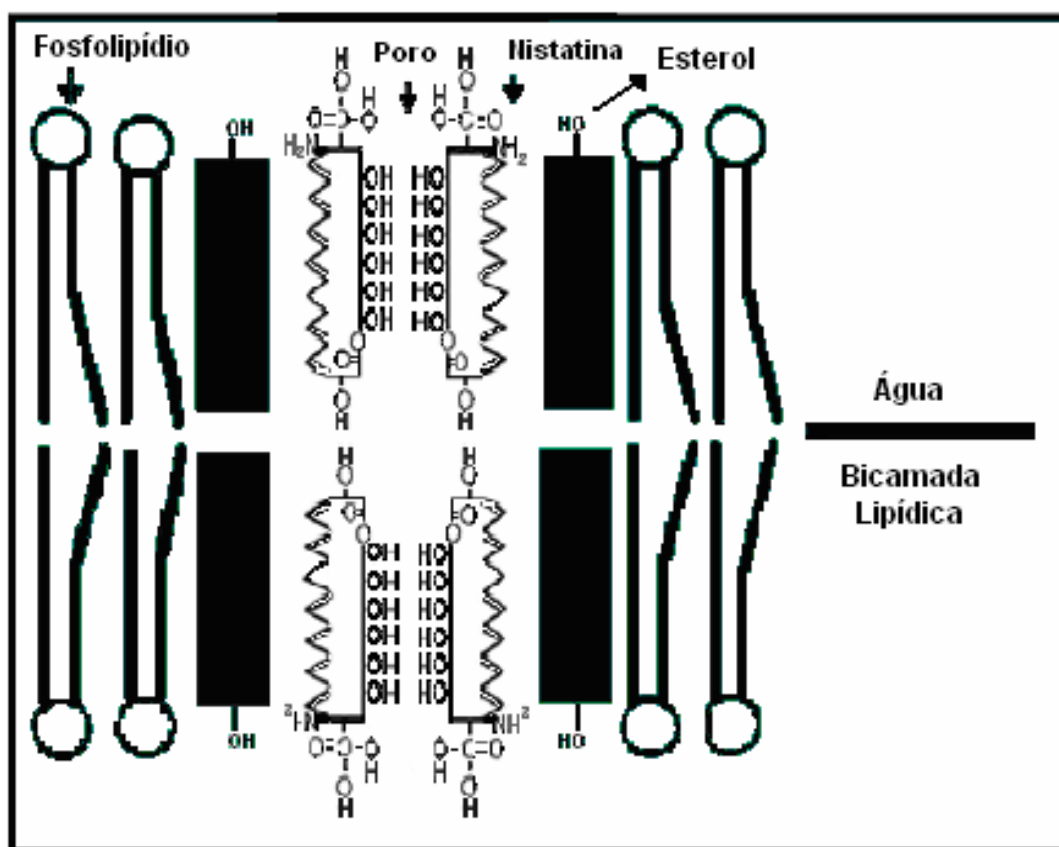


Figura 13. Representação esquemática de poro formado pela NYS em uma membrana celular (Adaptado de Lasic, 1993).

A ausência de ergosterol nas membranas de bactérias pode explicar porque esse antibiótico não é capaz de afetar o crescimento daqueles microrganismos.

3.5.Lipossomas

Os lipossomas são estruturas lamelares constituídas por sistemas lipídio:água e foram descritas em meados dos anos 60 do século XX, por BANGHAM e col que estudaram a hidratação de filmes lipídicos depositados nas paredes de frascos de vidro. Os referidos pesquisadores observaram que as moléculas do lipídio se organizavam em bicamadas formando estruturas vesiculares microscópicas, que posteriormente, foram denominadas genericamente lipossomas por SESSA e WEISSMANN, que mostraram que estas vesículas, em seu interior encerravam um compartimento aquoso (SANTOS e CASTANHO, 2002). Na realidade, essas estruturas se formam espontaneamente quando os lipídios (especialmente fosfolipídios) são dispersos em meio aquoso, originando uma população de vesículas esféricas com dimensões coloidais (cujo diâmetro pode variar de 0,02µm a 100µm) limitadas por duas ou mais camadas lipídicas, cuja espessura é, aproximadamente, de 4nm. Os lipossomas ganharam bastante popularidade como modelos para estudos sobre propriedades de membranas celulares (SANTOS & CASTANHO, 2002; PAPAHAADJOPOULOS & WATKINS, 1967) e, mais recentemente como carreadores de fármaco (TORCHILIN, 2005).

Os lipídios empregados no preparo dos lipossomas são substâncias anfifílicas, caracterizadas por apresentarem grupamentos hidrofílico e hidrofóbico na mesma molécula. Os referidos lipídios são compostos por duas cadeias hidrocarbônicas, também denominadas caudas hidrofóbicas, ligadas a um grupo hidrofílico, comumente, denominado como cabeça polar. Os lipídios que contenham grupo fosfato na cabeça polar são chamados fosfolipídios e constituem a principal classe de lipídios das membranas biológicas. Na Fig. 14, são apresentadas as fórmulas estruturais moleculares de três fosfolipídios utilizados no presente trabalho, além do colesterol.

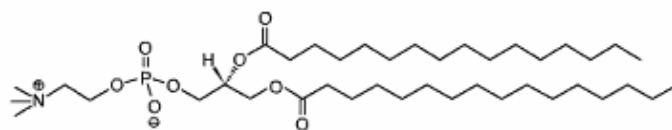
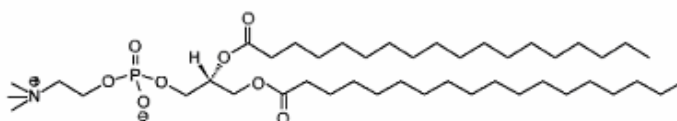
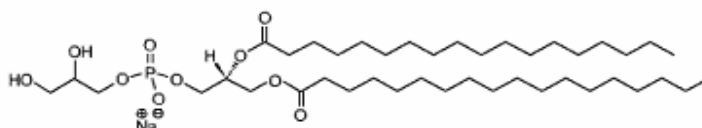
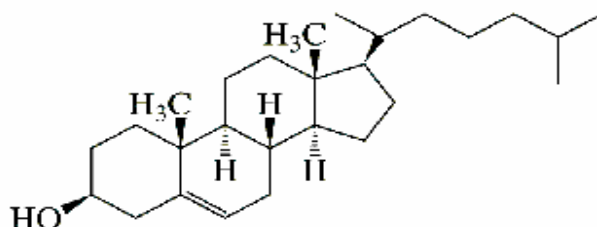
**DPPC****DSPC****DSPG****Colesterol**

Figura 14. Fórmulas estruturais moleculares dos fosfolipídios 1,2-Di-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DSPC), 1,2-Di-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), 1,2-Di-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DSPG) e do colesterol (www.avantilipids.com).

Além do grupo fosfato, a fração polar do fosfolipídio, pode conter os grupos cabeça: etanolamina, colina, glicerol e inositol, encontrados em fosfolipídios de membranas biológicas, como mostra a Figura 15. As cabeças polares podem ser carregadas (positiva ou negativamente) e zwitteriônicas (carga líquida nula), dependendo das cargas dos grupos cabeça e fosfato.

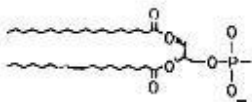
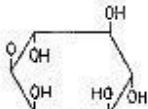
Grupo Fosfatidil	Grupo Cabeça	Nome e Abreviação Comum		Carga
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{Me})_2$	Colina	PC	zwiteriônica
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Etanolamina	PE	zwiteriônica
	$\text{O}-\text{CH}(\text{NH}_3^+)(\text{COO}^-)$	Serina	PS	Negativa
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$	Glicerol	PG	Negativa
	$\text{O}-\text{H}$	Ácido	PA	Negativa
		Inositol	PI	Negativa

Figura 15 – Grupos cabeça de fosfolipídios encontrados em membranas biológicas (Adaptado de New, 1990)

Em geral, as moléculas de fosfolipídios são insolúveis em água e nesse meio formam estruturas agregadas decorrentes da organização das moléculas. A parte hidrofílica do fosfolipídio será seletivamente hidratada e as cadeias hidrocarbônicas hidrofóbicas preferem ficarem escondidas no interior da estrutura formada, ou seja, minimiza-se contato com meio aquoso. As moléculas de fosfolipídios se mantêm juntas, lado a lado formando “folhetos” separados por compartimentos aquosos. Dependendo da concentração, da estrutura molecular dos lipídios, da temperatura, do teor de água no meio, pH e força iônica, pode se ter diferentes estruturas agregadas, como as bicamadas lipídicas (lamelas) que se unem para formar um folheto bidimensional ou folheto que se dobra entre si formando uma esfera, denominada lipossoma (LASIC, 1993). Esquemas da secção transversal de um lipossoma e de uma bicamada lipídica podem ser observados na Fig. 16.

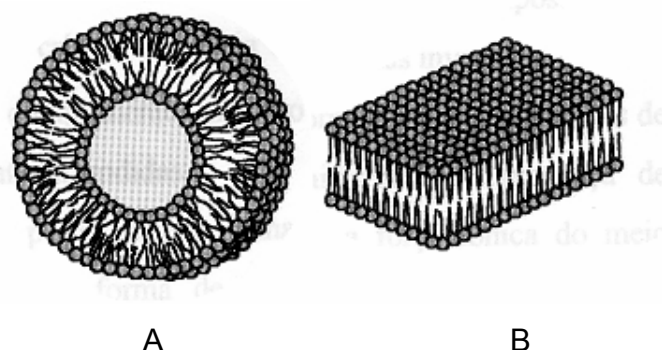


Figura 16. Secção transversal (A) de um lipossoma e (B) de uma bicamada lipídica.

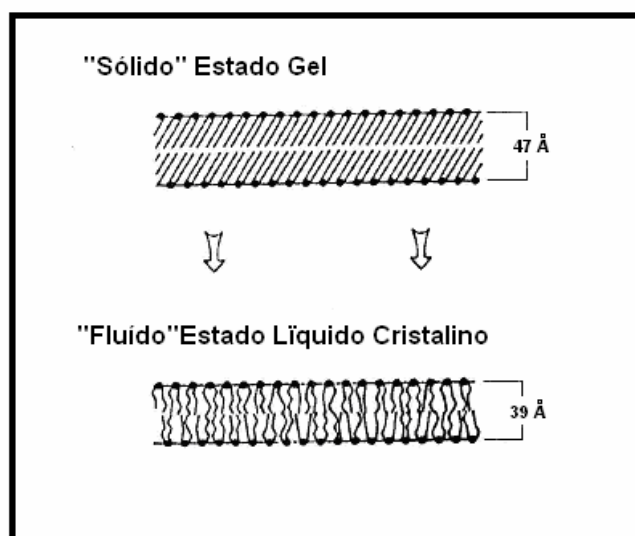
Dependendo do número de lamelas contidas nos lipossomas, estes podem ser classificados em multilamelares, MLV (várias lamelas separadas por compartimentos aquosos) ou unilamelares com uma única lamela. Os lipossomas unilamelares podem ser classificados pelo tamanho; grandes e pequenos (LUV) e (SUV), respectivamente. Na Tabela 1, tem-se a classificação de lipossomas de acordo com seus parâmetros estruturais (tamanho e número de lamelas) (BERENHOLZ e CROMMELIN, 1994).

Tabela 1 Classificação de lipossomas, baseada em parâmetros estruturais.

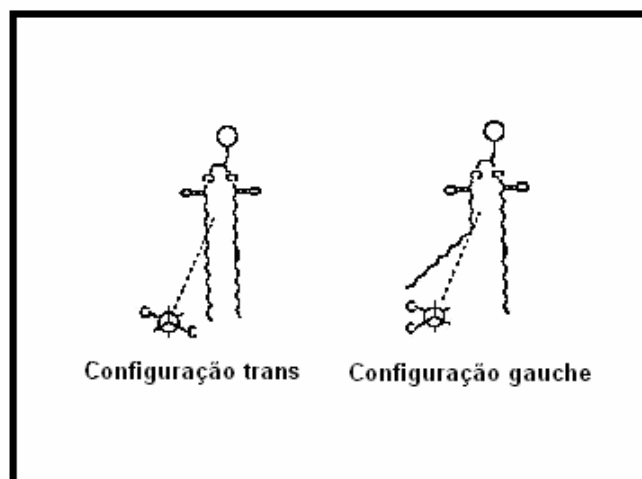
Classificação do Lipossoma	Tamannho
MLV – Vesículas Multilamelares	> 0,5µm
OLV – Vesículas Oligolamelares	0,1-1µm
UV- Vesículas Unilamelares	todos os tamanhos
SUV – Vesículas Unilamelares pequenas	20-100nm
LUV – Vesículas Unilamelar grande	> 100nm
GUV – Vesículas Unilamelares gigantes	> 1µm
MVV – Vesículas Multivesicular	> 1µm

Quando são seleccionados os lipídios que vão compor uma formulação lipossomal, tem-se que considerar questões como temperatura de transição de fases (T_c), estabilidade química, carga, fonte de lipídios, presença de colesterol na composição. Em sistemas compostos de um tipo de lipídio, agregado em bicamadas, a

temperatura de transição de fase principal corresponde à temperatura requerida para induzir uma mudança no estado físico do lipídio agregado de uma fase gel, mais ordenada, quando as cadeias hidrocarbônicas encontram-se totalmente estendidas e apresentando uma estrutura inclinada, em configuração toda-*trans* e empacotadas, para uma fase líquida cristalina desordenada, na qual as cadeias hidrocarbônicas dos lipídios estão menos orientadas e fluidas, em configuração *trans-gauche* (Fig. 17) (SMALL, 1986 e NEW, 1990). Na escolha de lipídios para uma formulação lipossomal deve-se selecionar aqueles que apresentem altas temperaturas de transição de fase (fosfolipídios com cadeias hidrocarbônicas longas), grande estabilidade química, ou resistência a oxidação (cadeias acilas saturadas) e presença de colesterol na composição lipídica (LASIC, 1993). A presença de núcleos rígidos planares de colesterol na bicamada lipídica tem o efeito de mudar a fluidez da bicamada lipídica na fase gel, tornando-a mais fluida na referida fase. A mudança na fluidez é seguida por mudanças na permeabilidade da membrana, diminuída em temperatura maior do que T_c , mas aumentada em temperaturas menores que T_c , assim, impedindo o escape dos compostos encapsulados (NEW, 1990). A utilização da combinação fosfolipídios neutros e com carga negativa pode favorecer a repulsão entre as partículas lipossomais, devido à carga e formação de partículas com menores tamanhos.



A



B

Figura 17. Transição das fases gel e líquida cristalina da bicamada lipídica de fosfolípido (A). Diferentes configurações (trans e gauche) causadas pela rotação de ligação simples C-C das cadeias acila dos fosfolípidos (B) (Adaptado de New, 1990).

As bicamadas dos lipossomas são química e biologicamente compatíveis com as membranas celulares, o que facilita a entrega de fármacos, aumentando a eficiência terapêutica. Os lipossomas podem, ainda, ser modificados quimicamente pela inserção de polímeros como o polietileno glicol 2000 na bicamada, para escapar do patrulhamento exercido pelas células do sistema imunológico e aumentar sua interação

com tecidos doentes, reduzindo seu acúmulo nos tecidos saudáveis.

Neste trabalho, foram produzidos lipossomas convencionais, definidos como aqueles tipicamente compostos de fosfolípidios (neutros e negativamente carregados) e colesterol. Os lipossomas convencionais são caracterizados também por um tempo relativamente curto de circulação no sangue, quando administrados *in vivo* por via parenteral, geralmente intravenosa (STORM e CROMMELIN, 1998). A literatura contém muitos exemplos de aplicações com sucesso de lipossomas convencionais, tendo como alvo macrófagos infectados, como na vetorização de agentes antimicrobianos (BAKKER-WOUDENBERG, 1995; RASTOGI e col., 2006) e de imunomoduladores que vão aumentar a capacidade dos macrófagos em destruir células neoplásicas e aumentar a resistência contra microrganismos infecciosos (DAEMEN, 1992; VASIR e col., 2005). Lipossomas convencionais também são usados para entrega de antígenos. Os lipossomas empregados como vacinas têm sido efetivos em modelos experimentais contra vírus, bactérias e parasitas (GREGORIADIS, 1994; ALVING, 1995; TORCHILIN, 2005).

3.5.1. Aplicações de lipossomas em medicina

As aplicações de lipossomas em medicina podem ser divididas em aplicações terapêuticas e diagnósticas. Os lipossomas podem veicular fármacos e agentes de contraste (marcadores) importantes no diagnóstico de várias patologias. Podem, também, ser empregados como modelo, ferramenta ou reagente em estudos básicos sobre interações celulares, processos de reconhecimento e modo de ação de certas substâncias (LASIC, 1993).

Devido a sua estrutura de bicamadas, semelhante à das membranas celulares, os lipossomas são capazes de interagir profundamente com as células do organismo. Os benefícios e limitações de lipossomas utilizados como carreadores de fármacos dependem da interação dos mesmos com células e seu destino *in vivo* após a administração. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a interação predominante de

lipossomas com células é por adsorção simples e subsequente endocitose. A fusão com membranas celulares é muito mais rara. Outra possível interação é a troca de constituintes com os da bicamada, como lipídios, colesterol e moléculas ligadas a componentes da membrana (Fig. 18) (CHORILLI e col., 2004).

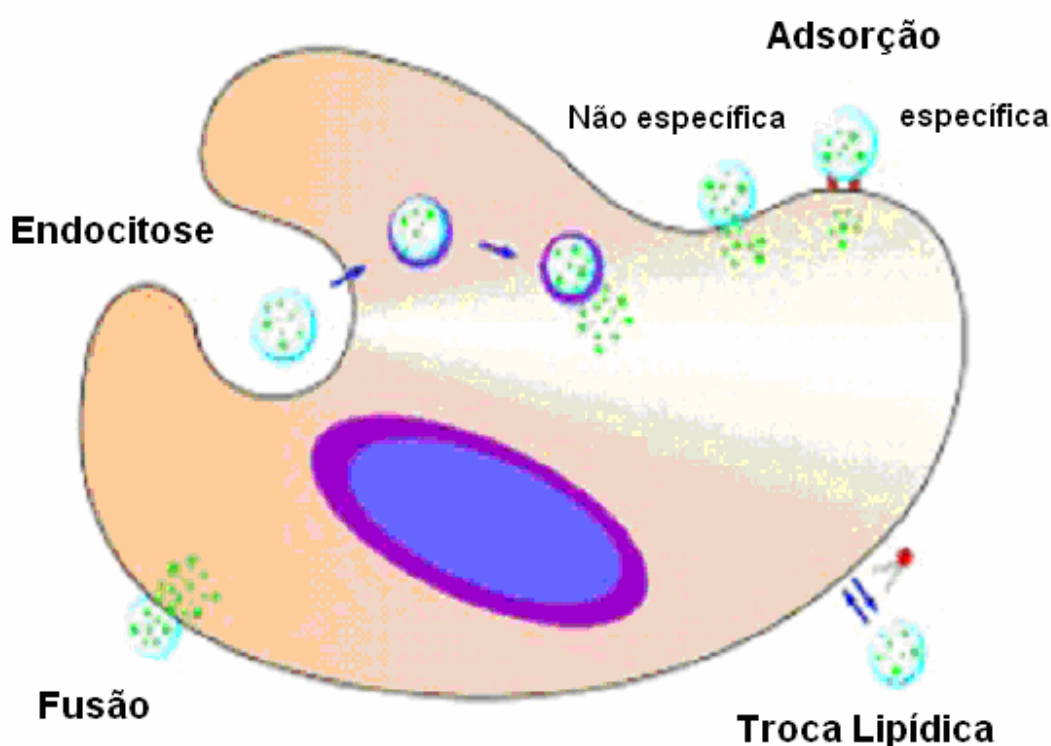


Figura 18. Possíveis mecanismos de interação de lipossomas com células (Adaptado de Chorilli e col., 2004).

O sistema imunológico humano apresenta um complexo sistema de defesa, visando à proteção contra agentes potencialmente perigosos que podem trazer riscos à saúde do organismo. Após a administração intravenosa de lipossomas convencionais, as proteínas do plasma conhecidas como opsoninas (imunoglobulinas IgM e IgG, relacionadas à resposta imune inata do organismo) são rapidamente adsorvidas na superfície das partículas. Esta adsorção leva ao rápido reconhecimento pelas células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos, principalmente do baço e células de Kupffer, do fígado) e conseqüente fagocitose das partículas, especialmente no fígado

(60 %-90 %), baço (2 %-20 %), medula óssea (0,1 %-1 %) e quantidades variadas nos pulmões (GULYAAEV e col., 1998). Em função disso, foram feitos estudos para reduzir a captura das partículas coloidais pelo sistema monuclear fagocitário, aumentar a concentração desses veículos no sangue e, conseqüentemente, no tecido ou órgão alvo desejado (GUO e THOMAS, 2001; ELLEY, 2001). A resposta do sistema imune tem desencadeado esforços no desenvolvimento de superfícies biocompatíveis e não reconhecíveis pelo sistema de defesa humano. Desta forma, tem-se estreitado o espectro de aplicações de micro e nanopartículas empregadas como carreadores de fármacos e, em alguns casos, almejando ter como alvo as referidas células do sistema imunológico.

Os lipossomas como sistemas carreadores de fármacos, podem oferecer várias vantagens sobre as formas farmacêuticas convencionais, especialmente em relação à parenteral (injeção local, sistêmica ou infusão), tópica e pulmonar. Entre elas, pode-se citar (LASIC, 1993):

- melhora na solubilidade de fármacos lipo e anfifílicos e aumento da solubilidade de compostos hidrofílicos;
- direcionamento passivo de compostos para células do sistema imune, especialmente para as do sistema mononuclear fagocitário;
- liberação sustentada de fármacos veiculados em lipossomas, administrados local ou sistemicamente;
- mecanismo de fuga de sítios: os lipossomas geralmente não se dirigem a órgãos, como coração, rins, cérebro e sistema nervoso, reduzindo a toxicidade de certos fármacos quando incorporados nessas vesículas dirigidas aos referidos sítios;
- sítios-alvo específicos: em certos casos, lipossomas com superfície ligada a certos compostos (como anticorpos) podem ligassem a células-alvo ou podem ser

direcionados aos tecidos-alvo devido às condições anatômicas locais, como vasos sanguíneos malformados e capilares;

- aumento da inserção em tecidos, de fármacos lipossolúveis, especialmente no caso de formas farmacêuticas de aplicação dérmicas.

Os sistemas lipossomais exibem biodistribuição e farmacocinética diferentes daquelas das moléculas do fármaco livre. GROLL e col., (1999) verificaram que a formulação lipossomal de NYS aumentou o tempo de vida do fármaco, promoveu a remoção efetiva do microorganismo dos pulmões de coelhos neutropênicos com aspergilose experimental e ainda houve diminuição dos efeitos colaterais do antifúngico.

3.5.2.Lipossomas em doenças parasitárias e infecções fúngicas

Lipossomas convencionais são digeridos por células fagocíticas depois de administrados por via intravenosa sendo, portanto, veículos apropriados para direcionar moléculas de fármaco ao interior dos macrófagos. Como exemplos podem ser citados várias doenças parasitárias e infecções causadas por patógenos residentes nas células do sistema mononuclear fagocitário, como as leishmanioses e as infecções fúngicas. Os lipossomas acumulam-se nas células que estão infectadas e, portanto, servem como veículos para a entrega de fármacos em organismos acometidos por essas doenças (ZAITZ e col., 1998).

Os melhores resultados do emprego de lipossomas como carreadores de fármacos são na terapia de infecções fúngicas. Os fármacos antifúngicos, como a AnfB e NYS, são empregados no tratamento de infecções fúngicas disseminadas que geralmente acometem pacientes imunocomprometidos, como aqueles que passam por quimioterapia e os HIV positivos. OFFNER e col., (2004) avaliaram a atividade da NYS encapsulada em lipossomas no tratamento de pacientes refratários ou intolerantes a AnfB com aspergilose invasiva e concluíram que o fármaco em sistemas lipossomais foi

efetivo. Infelizmente antifúngicos poliênicos são tóxicos e seu uso é limitado, devido principalmente a nefrotoxicidade. Esta é comumente associada ao tamanho das moléculas dos fármacos dessa classe de compostos. A encapsulação dos fármacos em lipossomas previne a acumulação nos rins e reduz drasticamente a nefrotoxicidade (LASIC, 1993). Geralmente os fungos residem nas células do sistema mononuclear fagocitário e a encapsulação resulta em toxicidade reduzida e entrega passiva. MINOPIER e col., (2003) comparam a ação de AnfB em lipossomas ([®]AMBISOME) e em outra formulação lipídica ([®]AMPHOCIL) para o tratamento de *leishmania visceral* em pacientes imunodeprimidos e observaram que a formulação lipossomal apontou maior redução na nefrotoxicidade, que é o principal efeito adverso da AnfB e da NYS.

3. 5.3.Métodos de preparação de lipossomas

3.5.3.1.Método pelo filme lipídico

O método de hidratação de filme lipídico (Fig. 19) envolve três estágios básicos: a) dissolução dos lipídios constituintes da formulação em solvente ou mistura de solventes orgânicos; b) eliminação do (s) solvente (s), à pressão reduzida, obtendo uma película de lipídios na parede de balão; c) dispersão do filme lipídico em meio aquoso (em geral tamponado), em temperatura superior à de transição de fase dos lipídios (NG e WASAN, 2003). Em água, em um primeiro momento, ocorre formação de bicamadas lipídicas e depois se atinge o equilíbrio entre as forças que procuram conseguir uma estrutura estável (camada fosfolipídica hidratada). As forças intrabicaamada consistem de forças hidrofóbicas, de hidratação, eletrostáticas e as de Van der Waals que tendem a criar interações nas cadeias hidrocarbônicas (Lasic, 1993). Por agitação, as bicamadas lipídicas fecham-se e produzem vesículas ovaladas que, mais tarde e progressivamente, adquirem a forma específica (menor energia de curvatura). Os lipossomas assim obtidos são do tipo MLV. A Fig. 18 apresenta esquematicamente os passos da preparação destes lipossomas.

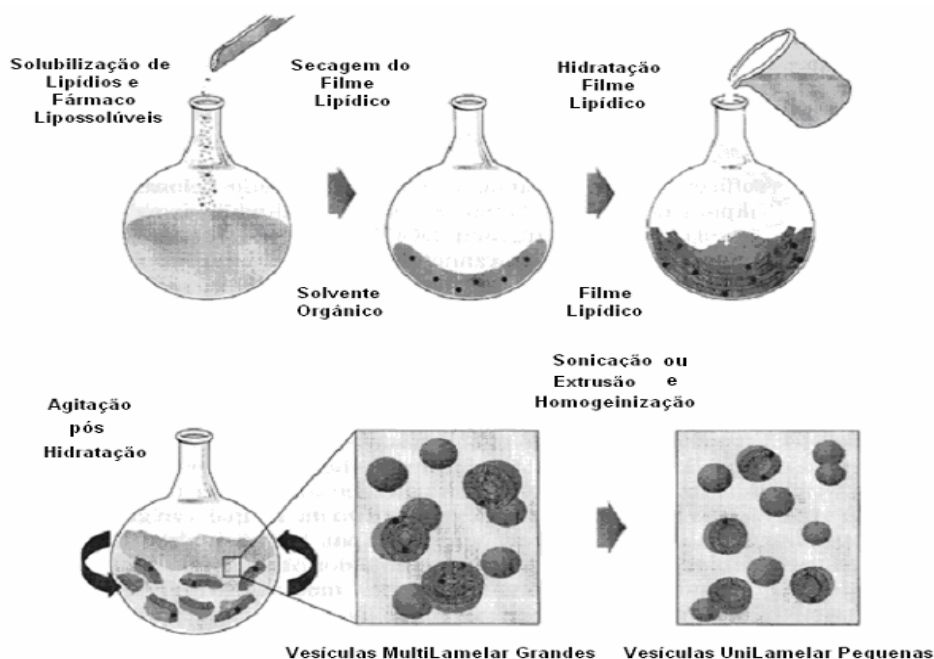


Fig. 19 Esquema do método de preparo de lipossomas por filme lipídico (www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html).

A inclusão dos fármacos nos lipossomas é efetuada em momentos diferentes, de acordo com sua solubilidade. Assim, compostos lipofílicos são adicionados junto com os fosfolipídios, colesterol (quando utilizado) e antioxidantes, enquanto que os hidrofílicos são dissolvidos na fase aquosa, ou seja, no momento da hidratação.

A partir dos lipossomas multilamelares ou multivesiculares pode-se obter lipossomas de menores dimensões, menor número de lamelas e unilamelares. Para isso utilizam-se processos que consistem no emprego de ultra-som (sonicação) ou de homogenizadores de alta pressão (extrusão). Tais homogenizadores exercem pressão sobre as vesículas, à custa de gases inertes, obrigando as vesículas a passarem por filtros com poros de tamanho definido, o que permite a obtenção de uma população de vesículas com tamanho mais homogêneo (Fig. 19). Na Fig. 20 observa-se o esquema da hidratação das bicamadas lipídicas e obtenção dos diferentes tipos de lipossomas.

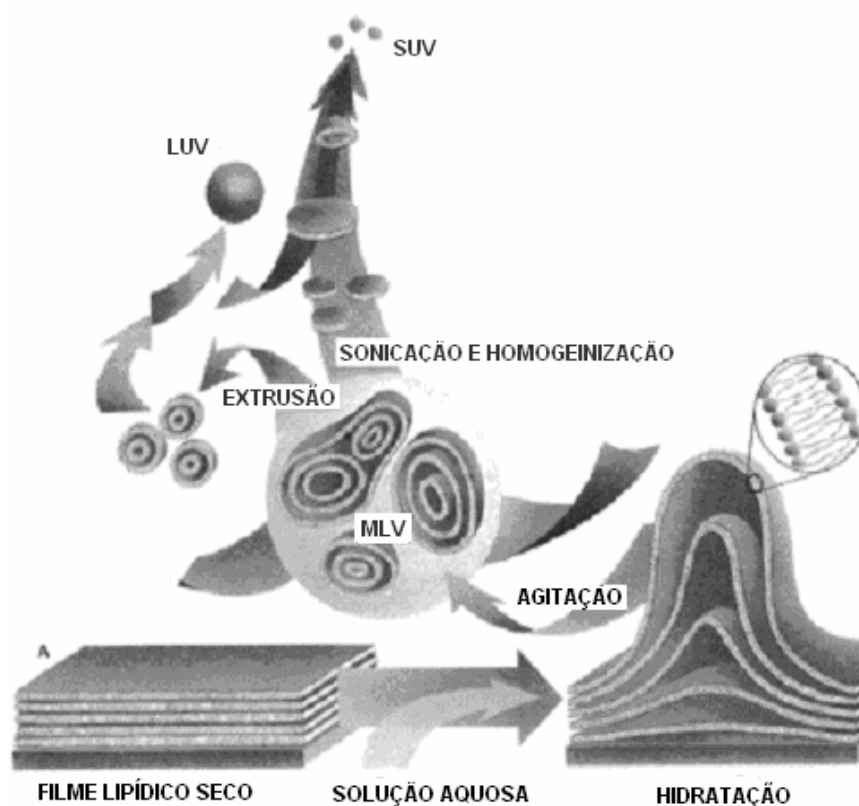


Fig. 20 Representação Esquemática da hidratação e o preparo de diferentes tipos de lipossomas. (Adaptado de www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html).

Com a obtenção dos lipossomas, devem ser realizadas operações complementares que promoverão, principalmente, a separação do fármaco livre do encapsulado, para posterior caracterização da formulação lipossomal. As operações são a ultracentrifugação, diálise e filtração em gel.

3.5.3.2. Método de injeção de etanol

Esse método corresponde ao preparo de uma solução etanólica com os lipídios constituintes da formulação. A solução então é injetada, rapidamente, com auxílio de seringa e agulha hipodérmica, em uma solução aquosa tamponada sob constante agitação e em temperatura acima da T_c dos lipídios. Do mesmo modo que no método de hidratação do filme lipídico, os fármacos lipossolúveis, serão dissolvidos junto com os lipídios e os compostos hidrossolúveis na fase aquosa.

A força da injeção é suficiente para permitir a dissolução do etanol na fase aquosa e as moléculas dos lipídios são dispersas no meio. Este procedimento, em geral, produz grandes proporções de vesículas SUV, embora possam ocorrer agregações e formação de vesículas maiores. As limitações deste método são as solubilizações dos lipídios em etanol, que depende da concentração; a introdução de no máximo 7,5 % (v/v) de etanol em relação ao volume de solução aquosa e a dificuldade da remoção do etanol residual da formulação (NEW, 1990).

Este método é apropriado para a encapsulação de compostos lipossolúveis, sendo pequena a porcentagem de encapsulação dos hidrossolúveis.

3.6.Caracterização de preparações lipossomais

3.6.1.Determinação do raio hidrodinâmico de lipossomas

O tamanho médio dos lipossomas pode ser determinado por espalhamento quase elástico da luz (Quasi-Elastic Light Scattering - QELS) que utiliza o princípio da Espectroscopia de Correlação de Fótons (ECF). A ECF é a análise da dependência do tempo com a intensidade de flutuação no espalhamento da luz laser, devido aos movimentos Brownianos das partículas em suspensão. Os diâmetros das partículas são determinados através da medição da dispersão de uma radiação laser incidente na amostra, provocada por vesículas em suspensão. Uma vez que as vesículas não são estáticas, a variação temporal do espalhamento depende do coeficiente de difusão (D) das mesmas. Assim, as variações da intensidade da difração da luz são tanto mais rápidas quanto menores forem às vesículas em suspensão. O coeficiente de difusão (D) pode ser determinado analisando dados em diferentes tempos de amostragem. A partir desses dados e, juntamente com a temperatura absoluta (T) e a viscosidade do meio (η), é possível determinar o raio hidrodinâmico (R) das vesículas através da equação de Stokes-Einstein (1)(NEW, 1990):

$$(1) \quad D = \kappa T / (6 \pi \eta R)$$

onde κ é a constante de Boltzmann.

Como os lipossomas MLV obtidos por hidratação do filme lipídico tem tamanho bastante heterogêneo, que pode variar desde alguns nanômetros a vários micrômetros, constituídos em sua maioria por várias camadas concêntricas de fosfolípidos e aglomerados de vesículas, havendo também fosfolípidos não incluídos nas membranas (GROLL e col., 1999), o seu diâmetro é difícil de medir por espectroscopia de correlação fotônica. Os LUV são o tipo de amostra que proporciona bons resultados com esta técnica, devido à sua maior homogeneidade em relação ao tamanho e à esfericidade das vesículas (SANTOS & CASTANHO, 2002).

3.6.2.Determinação da carga de superfície das partículas

Nas dispersões coloidais, as forças de atração e repulsão na superfície do colóide determinam sua estabilidade. Um dos maiores efeitos da superfície são os fenômenos eletrocinéticos. Os colóides apresentam cargas elétricas superficiais, que podem aparecer devido à dissociação de grupos ionizáveis e adsorção diferencial de íons da solução (dispersante). A carga líquida na superfície de cada partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra íons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica (uma interna com íons fortemente ligados, a camada de Stern, e outra externa com uma distribuição de íons determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e o movimento térmico) (NEW, 1990). O potencial entre as duas camadas é denominado potencial zeta. Essas cargas produzem forças de repulsão eletrostáticas entre colóides vizinhos e se a carga for suficientemente grande, os colóides permanecem estáveis e dispersos em suspensão.

3.6 3.Análise por supressão de fluorescência

A fluorescência é a luminescência que determinadas substâncias apresentam e

ocorre a partir de estados eletrônicos excitados singlete, onde o elétron no estado excitado, emparelhado a um segundo elétron, retorna ao estado fundamental (LAKOWICZ, 1999).

A supressão de fluorescência refere-se a um processo que diminui a intensidade ou rendimento quântico da emissão fluorescente. Várias interações podem provocar essa supressão, entre as quais as reações no estado excitado, rearranjos moleculares, formação de complexos no estado fundamental e colisões entre uma molécula fluorescente e a de um supressor (LAKOWICZ, 1999). As supressões mais comuns são a estática e a dinâmica. A primeira se refere às interações com formação de complexos não fluorescentes entre o fluoróforo e o supressor. Quando o complexo absorve luz, ele retorna ao estado fundamental sem emissão de um fóton. Já a supressão dinâmica ocorre por causa das colisões entre as moléculas do fluoróforo e do supressor, desativando o fluoróforo no estado excitado.

A presença de duplas conjugadas e a rigidez da estrutura molecular de fármacos possibilitam a utilização de métodos físico-químicos óticos para análise e localização dos referidos compostos em lipossomas. A fluorescência, por ser um método que apresenta alta sensibilidade pode fornecer informações importantes sobre o microambiente onde se localizam as moléculas do fármaco.

3.6.4. Espectroscopia de polarização de fluorescência

A determinação do grau de anisotropia de fluorescência envolve a incidência de luz polarizada na amostra, que excita as moléculas que têm momento de transição paralelo ao vetor campo elétrico do plano de polarização do feixe de luz. Se o fluoróforo, no estado excitado, permanecer imóvel, a luz emitida como fluorescência também será polarizada na mesma direção da radiação incidente. Porém, se, durante o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado, ocorrer rotação, a radiação emitida será menos polarizada (LAKOWICZ, 1999; NEW, 1990).

O grau de anisotropia (r) é dado pela equação (2)

(2)

$$(r) = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}}$$

em que I_{VV} é a intensidade de emissão de fluorescência detectada paralelamente à direção da luz polarizada de excitação (luz polarizada de excitação usada verticalmente e de emissão verticalmente) e I_{VH} é a intensidade de emissão detectada perpendicularmente (luz polarizada de excitação usada verticalmente e de emissão horizontalmente). O fator G é um parâmetro de correção instrumental, devido aos diferentes componentes óticos presentes no espectrofluorímetro apresentarem uma transmitância que depende da direção da polarização da luz. Assim, há a necessidade do referido parâmetro para a comparação das intensidades de emissão polarizadas da amostra. O fator G pode ser medido usando a luz polarizada de excitação horizontalmente e a de emissão ora polarizada verticalmente ora horizontalmente, respectivamente (I_{HV} e I_{HH}), calculando-se o seu valor pela equação (3) (PIOVESAM, 2006).

(3)

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

A determinação do grau de anisotropia fornece informações sobre a rigidez de ambientes moleculares, incluindo a bicamada lipídica existente em lipossomas e sobre a fluidez de membranas. As bicamadas lipídicas podem conferir anisotropia x , y e z componentes nela inseridos.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Neste trabalho, foram empregados:

• NYS:

- lote NT/C 645655, título 6509 UI/mg e lote NT/C 645743, título 6636 UI/mg, fornecidos por Medley S/A Indústria Farmacêutica;
- lote 04102/2004, título: 6372,0 UI/mg, fornecido pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos.

• Lipídios:

- fosfatidilcolina de soja hidrogenada (PCH) (Epikuron 200SH # 169705 - Lucas Meyer)
(99 % de pureza);
- colesterol (Genzyme, 99 % de pureza);
- 1,2-diestearoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilglicerol (DSPG), Genzyme, 99 % de pureza.

OBS: Todos os lipídios foram armazenados em dessecador a vácuo e em geladeira.

• Solventes e reagentes:

Etanol (planta piloto IQ); água destilada e deionizada em equipamento MilliQ-plus; clorofórmio PA (Nuclear); metanol p.a. (Chemco, Synth); metanol grau HPLC (Tedia); n-octanol PA (Merck); HEPES (Sigma-Aldrich, com 99% de pureza); ácido Succínico PA (Ecibra); acetato de sódio PA (Vetec); ácido acético glacial PA (ACS LabSynth); hidróxido de sódio PA (Chemco); cloreto de sódio PA (Chemco); cloreto de potássio PA (Quimis); ácido sulfúrico PA (Vetec); água oxigenada 30 vol. (Merck); molibdato de amônio PA (LabSynth); ácido ascórbico PA (Vetec); iodeto de potássio PA (Vetec); tiosulfato de sódio PA (Ecibra); acrilamida (Sigma); BHT (CFO) alimentício (Quiminest); DMSO (Vetec, Sigma-Aldrich) PA; solução salina 0,9% (m/v); meio de cultura RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato (Sigma-Aldrich) tampão MOPS

0,165 mol L⁻¹ (3-N-morfilino)-ácido propanosulfônico (Sigma-Aldrich); pH 7,0; meio ASD, Agar Sabouraud Dextrose (Difco e oxoid).

•Equipamentos:

Banho-maria (Nova Ética); espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos (Hewlett-Packard, mod. 8452A); espectrofluorímetro (Perkin Elmer, mod. LS-55, tendo como fonte de excitação uma lâmpada de Xe de 250W); espectrofotômetro de infravermelho (Bomem – Hartmann, mod. MB 100); TGA (TA Instruments, mod. 2050); rotaevaporador (Buchi, mod. 461); balança analítica (Mettler, mod. AB204 S); pHmetro (Micronal, mod. B474); ultracentífuga (Beckman, mod. L8-80, rotor TI 80); microcentrífuga (Revan Intrumentos Científicos modelo: 14000 D); centrífuga (FANEM, modelo Excelsa II, 206-BL); cromatógrafo líquido (Waters, mod. 600E) acoplado ao detector (Waters, mod. 484) e coluna Microsorb MV (Varian) C18 com 25cm x 4,6mm com tamanho de partícula de 5µm; extrusora (Avestin, mod. LiposoFast™ 100); membranas de policarbonato (Osmonics, linha Poretics®, diâmetro 47 mm, com poros de diâmetro 100 nm, 200 nm e 400 nm); disco de drenagem de poliéster (Osmonics, linha Poretics®, 47mm de diâmetro); membranas com poros de 0,22 µm (Millipore); sonificador de ponte (Sonifier B-12 cell disruptor, Branson Sonic Power Co.); placas de microdiluição estéreis e descartáveis (Placa de ELISA); câmaras de Neubauer; equipamento para medir espalhamento dinâmico da luz (QELS) (Brookhaven Instruments., mod. BI-MAS); micro-calorímetro diferencial de varredura (Microcal, Northampton, MA); espectropolarímetro (Jasco, mod. J-720); banho de ultra-som (Thornton, mod. T7).

4.2.Métodos

4.2.1.Caracterização físico-química da NYS

Foram realizadas análises físico-químicas em amostras de NYS doadas pelas empresas Medley, lote NT/C 645743 (denominada NYS Medley) e pela Cristália, lote 04102/2004 (denominada NYS Cristália), para identificar o principal constituinte e o tipo

de cristal que prevalece nas NYSs comerciais utilizadas neste trabalho.

4.2.1.1.Avaliação da solubilidade

Os testes de solubilidade foram realizados a 25 °C, em diferentes solventes. Foi utilizado 1,8 mg de fármaco em 10 mL dos solventes: água; tampão HEPES (0,01 mol. L⁻¹; pH 7), tampão succinato (0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6), etanol, metanol, clorofórmio, dimetilformamida, dimetilsulfóxido e misturas de clorofórmio: metanol (1:1 e 2:1; v:v). Para solubilizar algumas amostras de NYS em alguns solventes foi necessário o emprego de banho de ultra-som por, pelo menos, 2 min. Todas as análises foram conduzidas em ambiente somente com luz natural e todos os solventes utilizados foram borbulhados com nitrogênio por, pelo menos, 10 min.

4.2.1.2.Determinação do teor de umidade

O teor de umidade nas amostras de NYS foi obtido pelo método de Karl-Fischer. Foram utilizadas as massas médias para NYS Medley de 36,2 mg e 30,9 mg para NYS Cristália. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.1.3.Análises espectroscópicas

4.2.1.3.1.Análise por espectroscopia de absorção na região do UV/V

Para obtenção dos espectros de absorção e posterior determinação das absorvidades molares (ϵ) nos $\lambda_{\text{máx}}$ da NYS em metanol foi preparada solução estoque de NYS em metanol ($1,3 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹), a partir da qual foram preparadas soluções ($1,0 \times 10^{-5}$ a $2,6 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹).

Todos os espectros de absorção na região do UV/V foram obtidos entre 250 nm e 380 nm, em cuvetas de quartzo (caminho ótico:1,00 cm), com tampa de teflon.

4.2.1.3.2. Análise por espectroscopia de fluorescência

- Obtenção dos espectros de fluorescência

Foram obtidos os espectros de fluorescência das amostras empregadas no preparo da curva de calibração na região do UV/V ($1,0 \times 10^{-5}$ a $2,6 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹).

Foram utilizadas duas condições para a obtenção dos espectros:

Condição 1: Tamanhos de fenda de excitação e emissão: 4 nm; λ_{exc} : 304 nm; intervalo de varredura: 320 nm–550 nm.

Condição 2: Tamanhos de fenda de excitação e emissão: 6nm; λ_{exc} : 320 nm; intervalo de varredura: 340nm–620 nm.

As análises foram realizadas a 25 °C e toda a vidraria e cuvetas foram previamente lavadas com mistura sulfonítrica.

4.2.1.3.3. Análise por Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção das NYSS foram obtidos entre 400 cm⁻¹ e 4000 cm⁻¹, com suspensão dos fármacos em óleo mineral (Nujol).

4.2.1.4. Análises por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA)

A Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica que mede a diferença de energia liberada ou fornecida à amostra e um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a amostra e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura (DANTAS, 2006).

A análise termogravimétrica (TGA) mede alterações de massa da amostra em função do tempo (isotérmica) ou da temperatura, quanto a substância é submetida a

uma programação de temperatura a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (LACKMAN e col., 2001). Nem todos os eventos térmicos acontecem com perda de massa, como por exemplo, fusão, cristalização e transição vítrea, mas há outros eventos importantes como a desorção, absorção, sublimação, vaporização, oxidação, redução e decomposição, que podem ser detectados por este método. A TGA tem sido empregada para caracterizar a decomposição e a estabilidade térmica de materiais (HATAKEYAMA e QUINN, 1999).

Nas análises por DSC e TGA das amostras de NYS, foram utilizadas 3,5 mg para o lote de NYS Medley e 3,7 mg para a NYS Cristália. As amostras foram mantidas em dessecador e na geladeira até o momento da análise. Os experimentos foram realizados nas condições: fluxo de argônio: 80 mL/min; taxa de aquecimento: 15 °C/min; temperatura máxima de aquecimento: 250 °C.

4.2.1.5.Determinação do coeficiente de partição em octanol/tampão

Foram adicionadas diferentes massas de NYS Medley a um tubo de centrífuga, tipo “falcon” graduado, com tampa rosqueável, 10 mL, contendo 2 mL de n-octanol saturado com tampão succinato 0,02 mol L⁻¹, pH 5,6 e 2 mL de tampão succinato 0,02 mol L⁻¹, pH 5,6 saturado com n-octanol. Soluções de NYS na mistura n-octanol/tampão succinato 0,02 mol.L⁻¹ pH 5,6 foram obtidas. As concentrações das soluções foram: 0,25; 0,5; 1, 2, 3, 4; 5 mmol L⁻¹. Os tubos foram agitados vigorosamente 30 vezes, invertendo-os e deixando em repouso por 1h. As soluções foram centrifugadas a 613,6 x g/3 min. As fases aquosas e orgânicas foram recolhidas e medidas as respectivas absorbâncias a 306 nm (λ_{max} da NYS nos meios). Foram calculados a concentração e o coeficiente de partição do fármaco em cada fase, empregando o coeficiente de extinção molar da NYS em cada meio. Os ensaios foram realizados a 25 °C e 37 °C.

4.2.2. Análise da atividade antifúngica *in vitro* da NYS

A análise da atividade antifúngica *in vitro*, também chamada “teste de susceptibilidade”, foi realizada com base nos procedimentos do NCCLS M27 - A (“National Committee for Clinical Laboratory Standards – Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts”). Foram testadas duas amostras de NYS Medley pura (Lote NT/C 645655, amostra antiga não usada em outros testes, título 6509 UI/mg e Lote NT/C 645743, título 6636 UI/mg). A NYS foi dissolvida em DMSO (1,3 mg/mL) e posteriormente submetida a microdiluições empregando-se como diluente solução salina e obtendo-se as concentrações: 640; 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$. Foram tomadas alíquotas de 20 μL de cada microdiluição e transferidas para a placa de ELISA. Em cada poço da placa foram adicionados 160 μL de meio de cultura RPMI 1640 (com L-glutamina e sem bicarbonato) e tampão MOPS 0,165 mol L⁻¹, tamponado a pH 7,0 $\pm$ 0,1 e suplementado com 2% de glicose e 20 μL de inóculo (densidade de células 1×10^4), calibrado em câmaras de Neubauer. Os microrganismos empregados foram leveduras e fungos filamentosos. As cepas de leveduras testadas pertencem aos gêneros: *Candida* e *Cryptococcus*. Do gênero *Candida* foram *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 76615; *C. krusei* ATCC 6258; *C. parapsilosis* ATCC 22019. As do gênero *Cryptococcus* foram: *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. neoformans* LIF 217. Os fungos filamentosos empregados foram: *Trichophyton sp.* (raspado de pele e unhas), *Trichophyton rubrum* (raspado de pele), *Trichophyton mentagrophytes* (raspado de unhas) e *Fusarium* e *Aspergillus* isolados de córnea e lavado brônquico respectivamente. Os fungos filamentosos foram isolados de materiais retirados de pacientes do Hospital de Clínicas/UNICAMP. As leituras das placas de ELISA para análise da CIM (Concentração Inibitória Mínima, ou MIC) para as leveduras foram realizadas após 24/48 h (gêneros *Candida*) e 48/72 h para os *Cryptococcus* por leitura visual do crescimento do microrganismo testado (presença de turvação) após incubação a 35 °C. Para os fungos filamentosos, foram realizadas somente análises do CIM (Concentração Inibitória Mínima - MIC), após 1 semana de incubação a 25 °C, no escuro.

4.2.3.Desenvolvimento de formulações lipossomais com NYS

No desenvolvimento de uma formulação lipossomal multilamelar, diversos parâmetros influenciam a otimização da formulação e a estabilização da substância a ser encapsulada. Entre eles os lipídios empregados, suas concentrações e proporções, o meio, tempo, temperatura de hidratação e concentração da substância a ser encapsulada. Existem, também, fatores mecânicos relativos aos instrumentos usados para o preparo das suspensões: a velocidade de agitação, o tamanho dos recipientes, temperatura do banho-maria, eficiência das bombas de vácuo na retirada de resíduos de solventes orgânicos, entre outros.

Na escolha dos fosfolipídios a serem empregados, foi selecionado inicialmente o lipídio, quimicamente estável, o Epikuron 200SH contendo 85 % de DSPC e 15 % de DPPC, citado neste trabalho como PCH, cuja temperatura de transição de fases (T_c) foi igual a 53 °C, determinada por microDSC. O referido lipídio apresenta T_c acima da temperatura corpórea normal, o que favorece a manutenção do fármaco encapsulado no organismo. Outro fosfolipídio empregado foi o diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), cuja T_c é 55 °C, sendo um lipídio dotado de carga negativa, que desfavorece a agregação das vesículas devido à repulsão eletrostática. O colesterol utilizado é de suma importância, pois estabiliza a bicamada lipídica formada (NEW, 1990) e se associa a NYS, podendo conduzir ao ancoramento do fármaco nessa bicamada. A concentração total dos lipídios variou de 11 a 15 mmol.L⁻¹ e a relação entre as concentrações de fármaco e lipídios foi 6,5 a 10 % (em concentração molar). Os filmes lipídicos, secos, foram hidratados a 55, 60 e 65 °C.

A metodologia usada para a preparação de lipossomas foi a hidratação do filme seco (LASIC, 1993; NEW, 1990). A NYS e os lipídios empregados foram dissolvidos em clorofórmio:metanol (1:1; v:v). Os solventes foram evaporados em rotaevaporador à pressão reduzida, em temperatura igual ou superior à T_c do fosfolipídio com maior T_c que compõe a formulação. O filme seco obtido foi mantido por pelo menos 1h sob vácuo, para eliminação de resíduos de solvente orgânico. O filme foi hidratado nas temperaturas citadas, nas quais foram empregados os tampões HEPES (0,01 mol.L⁻¹,

pH = 7,4) e Succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 5,6). As formulações foram agitadas por 1h sendo utilizados dois modos de hidratação: adição única com agitação máxima de 280 rpm (AU) e a adição em três etapas (AE) com agitação em velocidades, designada: lenta (20 rpm), média (160 rpm) e rápida (280 rpm), cada uma com duração de 20 min.

Foram preparadas 23 preparações lipossomais multilamelares contendo NYS, sendo que duas delas foram testadas por ensaio microbiológico, o qual se avaliou a atividade antifúngica *in vitro*. A amostra de NYS utilizada em toda a fase de desenvolvimento e seleção e caracterização das preparações MLV, LUV e SUV foi NYS Medley lote NT/C 645743.

Na fase de seleção das melhores formulações foi variada a composição lipídica, temperatura de hidratação e teores de fármaco. Foram alteradas também as concentrações de lipídios, meio e modo de hidratação. A determinação dos teores (%) e a estabilidade química do fármaco foram os itens de seleção das melhores preparações, sendo utilizada CLAE e amostras em duplicata neste estudo.

Etapas 1 - Variações da composição e concentração de lipídios, meios e temperaturas de hidratação.

Foram utilizados PCH 100 %; PCH:colesterol 80:20 % (razão molar), temperaturas de 55 °C e 65 °C e os meios de hidratação (tampões succinato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 5,6 e HEPES $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 7,4), fixando o modo de hidratação em AU (adição única) e a porcentagem molar de fármaco em relação aos lipídios de 10 %.

Etapas 2 - Variações na composição, concentração de lipídios e modo de hidratação.

Foram utilizados PCH:colesterol (80:20 %, molar) e PCH:DSPG (66:34 %, molar), modos de hidratação AU (adição única) e AE (adição em Etapas) com tampão succinato, temperatura de hidratação 55 °C e porcentagem molar de fármaco em

relação aos lipídios de 7 %.

Etapa 3 - Variações nas relações fármaco/lipídio, concentração e composição de lipídios.

As relações NYS:lipídio utilizadas foram 7 % e 10 %, as mesmas relações fármaco:lipídios utilizadas em formulações lipossomais comerciais que contêm a NYS e Anfotericina (Nyotran[®] e Ambisome[®]). O meio, a concentração e composição de lipídios e ainda a temperatura de hidratação foram os mencionados na Etapa 2. AE foi o modo de hidratação.

Etapa 4 - Variações na composição lipídica e temperatura de hidratação.

Os lipídios PCH, colesterol e DSPG foram combinados nas proporções: PCH:colesterol:DSPG (54:26:20 %), PCH:colesterol (80:20 %), PCH:colesterol:DSPG (70:20:10 %) e PCH:DSPG (70:30 %). Foram mantidas fixas: concentração total de lipídio 15 mmol L⁻¹; relação fármaco:lipídio 7,0 %; modo de hidratação AE; adição de BHT a 1,3 % (em relação à massa de NYS); solução de hidratação foi o tampão succinato (0,02 mol L⁻¹; pH 5,6); temperatura de hidratação 60 °C.

Etapa 5 - Variações da temperatura e modo de hidratação.

As Temperaturas e modos de hidratação que foram utilizados foram 55 °C e 60 °C e AU e AE, respectivamente. A composição da formulação utilizada foi: PCH:colesterol:DSPG (70:20:10 %) e BHT a 1,3 %.

4.2.4.Tratamentos efetuados em vesículas multilamelares para obtenção de lipossomas unilamelares

Formulações lipossomais multilamelares (PCH:colesterol:DSPG; 70:20:10 %) e BHT (1,3 %) hidratadas com tampão succinato foram preparadas pela metodologia

descrita no item 4.2.3. As suspensões lipossomais foram extrudadas 10 vezes em membranas de polycarbonato (diâmetro de poros: 400 nm, 200 nm e 100 nm), mas este procedimento foi abandonado e passou-se a realizar a ultracentrifugação e sonicação para diminuir o tamanho das vesículas. As amostras foram ultracentrifugadas a 112.021,06 x g (quando usados 2 mL) ou a 112.240,71 x g (quando usados 5 mL) a 20 °C/2 h. A sonicação foi feita em sonicador de ponte (Sonifier B-12) durante 10 min (3, 3 e 4 min com pausas de 1 min), mantendo as amostras em banho de gelo. A potência foi de 40 W. As soluções coloidais sonicadas foram centrifugadas em microcentrífuga (Revan Intrumentos Científicos modelo: 14000 D) a 9438,65 x g/10min/10°C para retirada das partículas de titânio e fármaco livre. O sobrenadante, contendo suspensão de lipossomas de diâmetro pequeno e com fármaco encapsulado, foi recolhido e passou por recozimento 60 °C/20 min. Em seguida a suspensão lipossomal foi analisada e o teor de NYS encapsulada foi obtido por CLAE.

4.2.5.Caracterização química e física de suspensões lipossomais

As suspensões lipossomais obtidas (PCH:colesterol:DSPG (70:20:10 %)) e BHT 1,3 % hidratadas a 55 °C e 65 °C foram caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação (análise por CLAE), determinação do teor (%) de fosfato, raio hidrodinâmico, potencial zeta das partículas, grau de anisotropia e análise de supressão da fluorescência intrínseca da NYS. Na caracterização biológica foi utilizado o teste de susceptibilidade a fungos e leveduras para NYS livre e lipossomal.

4.2.5.1.Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Durante a análise preliminar, foi empregada CLAE para avaliar os sistemas lipossomais quanto aos teores de fármaco presentes após a preparação dos lipossomas e existência de possível degradação química do composto encapsulado. Estas análises foram úteis também para realizar a caracterização dos lotes de NYS utilizados e para determinar a eficiência de encapsulação do antibiótico nos lipossomas.

Soluções metanólicas de NYS (10 $\mu\text{g/mL}$) foram analisadas em sistemas cromatográficos semelhantes aos descritos por Coutinho e Prieto, (1995), nos quais foram utilizados como fase móvel metanol:tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹; pH 5,6 (70:30; v:v; fluxo: 1 mL/min); coluna Microsorb–mv100–5–C18 250x4,6 mmx1/4”, termostatizada a 35 °C, equipada com forno Shimadzu, CTO-250x4,6; detector de UV/V em 304 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Foram obtidas curvas de calibração para avaliar a correlação linear das áreas em relação ao intervalo de concentração empregado.

4.2.5.2.Determinação do teor (%) de fosfato

A determinação do teor (%) de fosfato presente em formulações lipossomais quantifica os fosfolipídios constituintes através da determinação do fósforo inorgânico. O método, segundo Bartlett (NEW, 1990), consiste na oxidação dos compostos de carbono com Ácido Sulfúrico a carbono elementar, que é novamente oxidado a dióxido de carbono com água oxigenada. O fósforo é convertido a ortofosfato, que reage com molibdato de amônio e é reduzido com ácido ascórbico, produzindo um complexo de cor azul. A intensidade da cor é proporcional à concentração de fosfolipídio presente na amostra. A quantificação é realizada com o auxílio de curva de calibração, obtida no gráfico de absorbância *versus* concentração.

A curva de calibração foi preparada a partir de solução estoque de fosfato ácido de sódio heptahidratado (3,06 mmol.L⁻¹). Foram tomadas alíquotas dessa solução, diluídas, sendo obtidas novas soluções com concentrações de 0,25 a 1,51 mmol.L⁻¹. Amostras de suspensões lipossomais foram diluídas à concentração 1,00 mmol.L⁻¹. Tomou-se 100 μL de solução (soluções da curva, amostras de suspensão lipossomal e branco) para tubos de ensaio e adicionou-se 500 μL de H₂SO₄ 10 N. Os tubos foram aquecidos em placa de aquecimento (na capela) a 230 °C/30 min. Após resfriar as soluções a 25°C, 165 μL de H₂O₂ foram adicionados a cada tubo e aqueceu-se por mais 30 min/230 °C. Em seguida, resfriou-se a 25 °C e acrescentou-se 4 mL de água deionizada e 500 μL de solução de molibdato de amônio 2,5 % (m/v) e o mesmo

volume de solução de ácido ascórbico a 10 % (m/v). As soluções foram homogeneizadas em agitador tipo vortex e aquecidas em banho-maria a 100°C/7min, aparecendo uma cor azul. Após resfriamento, a absorbância foi medida em 820 nm.

Todas as soluções foram preparadas em tampão succinato 0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6 em duplicata e todo os materiais e reagentes estavam livres de fosfato.

4.2.5.3.Determinação do raio hidrodinâmico

Foi empregado o método por espalhamento quase elástico da luz. As amostras foram diluídas em água deionizada até obtenção de uma taxa média de contagem de 200 a 400 Kcps. As leituras foram realizadas a 25 °C; com 5 aquisições (1 min cada); λ : 675,0 nm e ângulo de análise 90°. As Análises foram realizadas com o programa “ZetaPlus Particle Sizing”, versão 2.2.1.

4.2.5.4.Determinação do potencial zeta

Na determinação do potencial zeta, as amostras de lipossomas foram diluídas, com solução de KCl 1x10⁻⁴ mol.L⁻¹, à concentração de 1 mg/mL. As amostras foram colocadas em cuvetas de acrílico de 1,0 cm de caminho ótico, sendo obtidos os raios hidrodinâmicos e, depois, o potencial zeta. As Análises foram realizadas com o programa “Zeta Potencial Analyzer”, versão 2.1.8.

4.2.5.5.Análise do grau de anisotropia de fluorescência da NYS livre e encapsulada em lipossomas

Solução estoque de NYS em metanol (previamente borbulhado com nitrogênio) (0,51 m mol.L⁻¹) e suspensões lipossomais foram diluídas com tampão succinato para obter soluções de concentrações 1,0 e 9,9 μ mol.L⁻¹. As soluções foram acondicionadas em cuvetas de quartzo com 1,00 cm de caminho ótico. As medidas do grau de

anisotropia de fluorescência em estado fixo foram determinadas em espectrofluorímetro Perkin Elmer, mod. LS-55. A fonte de excitação foi uma lâmpada de Xe (250 W) e foram utilizadas fendas de excitação e emissão iguais a 4,0 nm, λ de excitação de 304 nm e de emissão iguais de 416 nm. O intervalo de comprimento de onda de varredura foi de 350 nm a 500 nm, em uma velocidade de 600 nm/min.

4.2.5.6. Estudo da supressão de fluorescência da NYS livre e em lipossomas

As medidas de fluorescência da NYS a 25 °C foram feitas em espectrofluorímetro Perkin Elmer, citado no item anterior. O comprimento de onda de excitação foi 304 nm e a emissão monitorada em 416 nm. As fendas de excitação e emissão foram, respectivamente, 4,0 nm e 10,0 nm e a velocidade de varredura foi 600 nm/min.

Foram preparadas soluções de NYS livre e em lipossomas em concentração 9,9 μ mol.L⁻¹ (tampão succinato 0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6). Foram utilizados como agentes supressores em ambiente hidrofílico a solução de KI 0,5 mol.L⁻¹ com tiosulfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ e, em ambiente hidrofóbico, a solução de acrilamida a 0,5 mol.L⁻¹. As soluções de agentes supressores foram diluídas com o auxílio de tampão succinato 0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6. As concentrações dos supressores variaram de 0 a 0,29 mol.L⁻¹.

As intensidades de fluorescência foram tratadas, em princípio, pela equação de Stern-Volmer (equação 4) (LAKOWICZ, 1990):

$$(4) \quad F_0/F = 1 + K [Q]$$

em que F_0 e F são as intensidades de fluorescência da NYS na ausência e presença do supressor, K é a constante de supressão e $[Q]$ a concentração do supressor. A linearidade do gráfico correspondente a essa equação indica a existência de uma única classe de fluoróforos, todos igualmente acessíveis ao supressor.

Podem ser observados desvios dessa equação e, nesta Etapa, os dados podem ser analisados pelas equações de Stern-Volmer modificadas. Podem-se descrever as supressões estática e dinâmica combinadas, através de uma equação de Stern-Volmer modificada. Nesta Etapa, a fluorescência será suprimida por colisões e por formação de complexos não fluorescentes com o supressor.

Os ajustes lineares da constante de supressão aparente (K_{ap}) e a concentração do supressor ($[Q]$) demonstram a ocorrência das supressões combinadas. A equação (5) descreve a supressão dinâmica e estática de algumas populações de supressores.

$$(5) \quad K_{ap} = (F_0/F - 1) 1/[Q] = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q]$$

em que K_D e K_S são as constantes de supressão dinâmica e estática, respectivamente.

Outra equação de Stern-Volmer modificada (equação 6) descreve a supressão de duas diferentes populações de fluoróforos que apresentam diferentes acessibilidades ao supressor, sendo usada a equação 6 na qual ΔF representa a intensidade de fluorescência que foi suprimida ($F_0 - F$), " f_a " é a fração de fluorescência inicial que é acessível ao supressor (LAKOWICZ, 1990).

$$(6) \quad F_0/\Delta F = [1/(f_a K [Q])] + (1/f_a)$$

4.2.5.7. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de suspensões lipossomais

Foram testadas NYS puras (lotes: NT/C 645743 (Medley) e 04102:2004 (Cristália), título: 6372,0 UI/mg), amostras de lipossomas hidratados a 55 °C e a 60 °C e lipossomas vazios para cada temperatura de hidratação. As suspensões lipossomais multilamelares, as amostras lipossomais que sofreram sonicação e as amostras de NYS foram analisadas por CLAE para determinar o teor de NYS recuperado e realização de correções nas concentrações usadas nas análises microbiológicas. Posteriormente,

foram usados os procedimentos preconizados pelo NCCLS M 27-A. As amostras lipossomais sonicadas foram previamente esterilizadas em membranas com poros de 0,22 μm . A NYS pura, lote NT/C 645743 (Medley), foi dissolvida e diluída como descrito no item 4.2.2, obtendo-se as concentrações de 65,0; 32,5; 16,250; 8,125; 4,06; 2,03; 1,01; 0,508; 0,25 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas das suspensões lipossomais (multilamelares) L1A (hidratada a 55 °C) e L2A (hidratada a 60 °C) foram tomadas e diluídas, nas mesmas condições da NYS pura, nas concentrações: L1A (75,0; 37,5; 18,75; 9,37; 4,68; 2,34; 1,17; 0,58; 0,29 e 0,146 $\mu\text{g/mL}$) e L2A (61,0; 30,5; 15,25; 7,62; 3,81; 1,90; 0,95; 0,47; 0,23 e 0,119 $\mu\text{g/mL}$). Já as amostras de NYS, lotes NT/C 645743 (Medley) e 04102:2004 (Cristália), que foram analisadas junto com as suspensões lipossomais sonicadas, foram dissolvidas e diluídas igual ao descrito no item 4.2.2 nas concentrações: 64,0; 32,0; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 $\mu\text{g/mL}$. As suspensões lipossomais sonicadas foram diluídas nas concentrações: L1 (amostra hidratada a 55 °C) 270,0; 135,0; 67,5; 33,75; 16,88; 8,44; 4,22; 2,11; 1,05 e 0,53 $\mu\text{g/mL}$ e L2 (amostra hidratada a 60°C) 360,0; 180,0; 90,0; 45,0; 22,5; 11,25; 5,62; 2,81; 1,41 e 0,70 $\mu\text{g/mL}$. Na última diluição, as leveduras testadas, condições de incubação e leituras para as análises do “MIC” foram semelhantes as empregadas para os testes realizados com NYS pura, conforme descrito no item 4.2.2. A determinação da CFM (Concentração Fungicida Mínima) para as leveduras foi feita da seguinte forma: após a determinação da MIC, foi retirada uma alíquota de 100 μl da diluição que apresentou o resultado do MIC (a menor concentração que não apresentou crescimento visível) e a mesma foi plaqueada em ASD (Agar Sabouraud Dextrose), por 48 h a 35 °C. A CFM foi tida como a concentração que não mostrou UFC (Unidade Formadora de Colônia) crescida na placa.

5.RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1.Caracterização físico-química da NYS

O antibiótico NYS, lote NT/C 645743, fornecido pela Medley e o lote 04102/2004, fornecido pela Cristália, são amostras micronizadas, ambas fabricadas pela empresa DSM Cápuia S.p.A., Itália.

5.1.1.Solubilidade

A solubilidade da NYS Medley foi testada a 25 °C nos solventes empregados no preparo de lipossomas (Tabela 2).

Tabela 2. Solubilidade da NYS em diferentes solventes. A concentração das soluções de NYS com os solventes testados foi de $1,94 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Solvente	Solubilidade
Água destilada e desionizada	Insolúvel
Tampão HEPES 0,01mol L ⁻¹ ; pH 7	Insolúvel
Tampão succinato 0,02mol L ⁻¹ pH 5,6	Insolúvel
Etanol	Pouco solúvel
Metanol	Pouco solúvel
Clorofórmio	Insolúvel
Clorofórmio:Metanol (1:1)	Pouco solúvel
Clorofórmio:Metanol (2:1)	Pouco solúvel
Dimetilformamida (DMF)	Solúvel
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Solúvel

As amostras foram classificadas como:

Insolúvel: utilização de 1 h de banho em ultra-som sem ocorrer à solubilização.

Muito pouco solúvel: utilização de 30 min de banho em ultra-som, para ocorrer

solubilização.

Pouco solúvel: solubilização após 2 min de banho em ultra-som.

Solúvel: solubilização imediata.

5.1.2. Análise do teor de Umidade

As análises do teor de umidade, pelo método de Karl Fischer, revelaram para a NYS Medley teor de 9,2 % e para a NYS Cristália, teor de 8,8 %. O objetivo foi à correção das massas de fármaco empregadas nos diferentes ensaios.

5.1.3. Caracterização espectroscópica da NYS na região do UV/V em metanol

A NYS Medley é pouco solúvel em metanol, mas mesmo assim esse solvente foi empregado na solubilização do fármaco para obtenção das formulações lipossomais, de modo que avaliamos o comportamento espectroscópico da NYS em metanol.

Os espectros de absorção na região do UV/V das soluções de NYS em metanol ($2,6 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram registrados e sobrepostos (Fig. 21), para observar mudanças de posição, intensidade e perfil das bandas de absorção em função da interação da NYS com o solvente e possível formação de agregados.

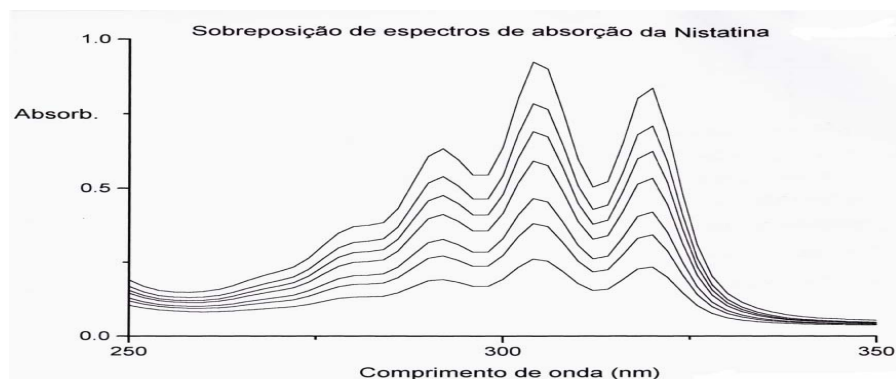


Figura 21. Espectros de absorção, da NYS Medley, na região do UV/V de NYS Medley em MeOH, à 25 °C (2,6; 3,9; 5,3; 6,6; 7,9; 9,2x10⁻⁶; 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹) a 25 °C.

Observa-se um espectro com estrutura vibrônica com três $\lambda_{\text{máx}}$: em 292 nm, 304 nm e 320 nm. Para verificar a correlação entre as concentrações e leituras em absorbância dos três $\lambda_{\text{máx}}$, foram preparadas curvas de calibração para os $\lambda_{\text{máx}}$ e calculados os valores das absorvidades molares (ϵ) com o programa Origin, v.5. (Fig. 22, 23 e 24)

Na Fig. 22, tem-se a curva de calibração para as soluções de NYS Medley em $\lambda_{\text{máx}}$ 292 nm.

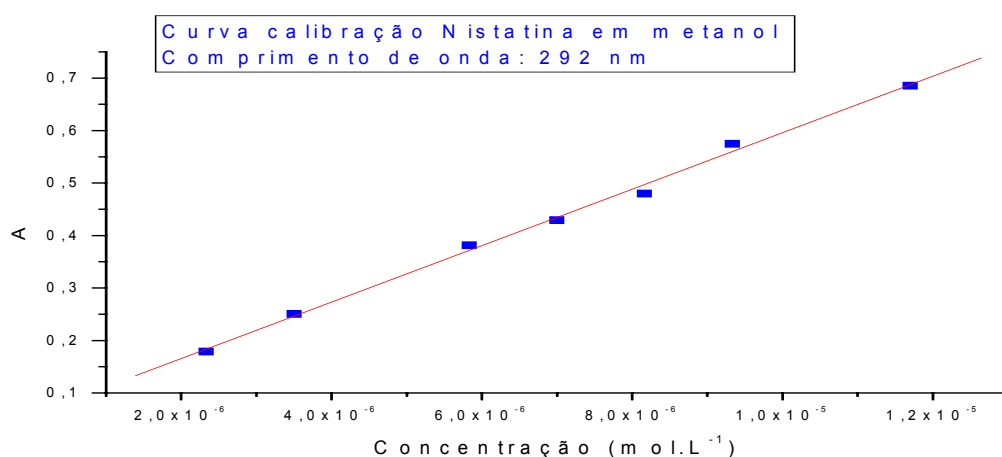


Fig. 22 Curva de calibração para soluções de NYS Medley ($\lambda_{\text{máx}}$ 292nm).

Na Tabela 3, foram observados os dados de regressão linear para tipo $Y = A + B \cdot X$ (Tabela 3), com coeficiente de correlação 0,9982 e o valor de absorvidade molar (ε) de $53814 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabela 3. Dados de regressão linear da curva de calibração ($\lambda_{\text{Máx}}$ 292 nm).

Parâmetros	Valores	Coef. Cor.
A	$0,0578 \pm 0,0109$	0,9982
B	$53814,2373 \pm 1455,4081$	

A Fig. 23 mostra a curva de calibração da NYS para $\lambda_{\text{máx}}$ 304 nm.

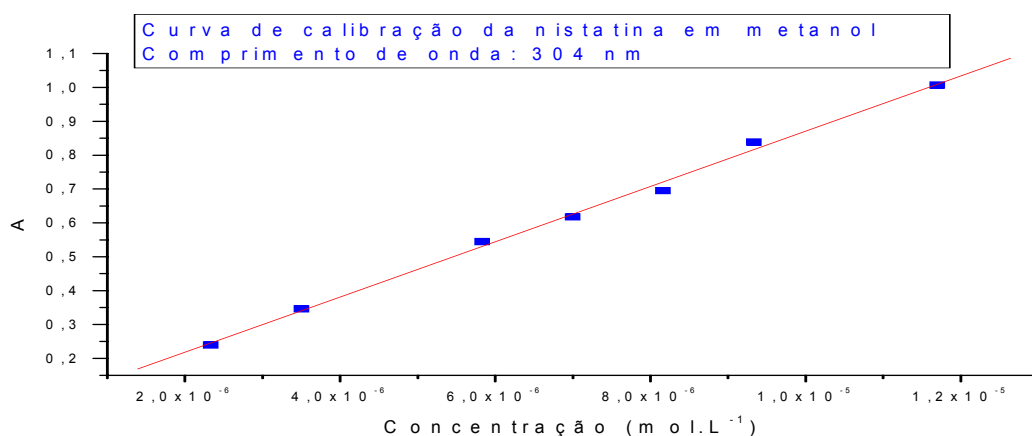


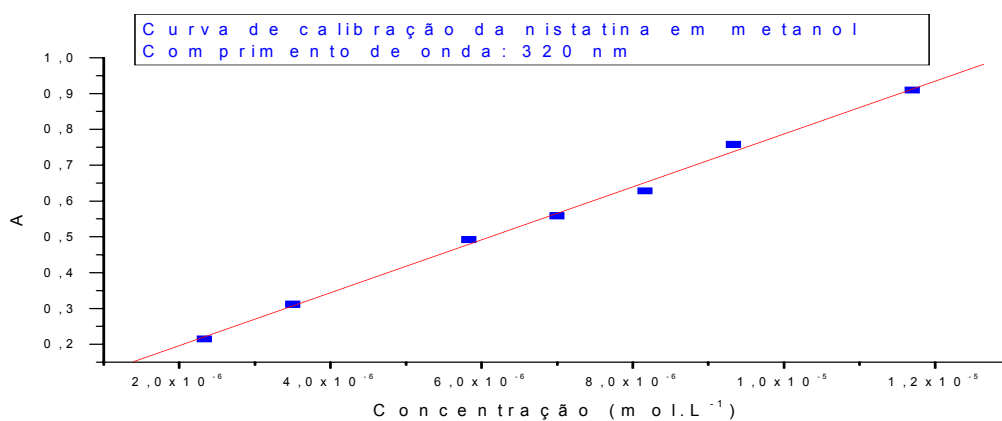
Figura 23. Curva de calibração para soluções de NYS Medley ($\lambda_{\text{máx}}$ 304nm).

A seguir, têm-se os dados de regressão linear (Tabela 4) para a curva de calibração das soluções de NYS Medley a 304 nm. O coeficiente de correlação é 0,9982 e o valor de ε é $81597 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabela 4. Dados de regressão linear da curva de calibração ($\lambda_{M\acute{a}x}$ 304nm).

Parâmetros	Valores	Coef. Correl.
A	0,0548 $\pm$ 0,01629	0,99822
B	81596,8984 $\pm$ 2178,6079	-----

Para $\lambda_{m\acute{a}x}$ 320 nm, preparou-se a curva de calibração apresentada na Fig. 24.

**Figura 24.** Curva de calibração para soluções de NYS Medley ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 320nm).

Os dados de regressão linear para essa curva estão na Tabela 5. O coeficiente de correlação é 0,9983 e ϵ é de 73889 L mol⁻¹ cm⁻¹.

Tabela 5. Dados de regressão linear da curva de calibração ($\lambda_{M\acute{a}x}$ 320 nm).

Parâmetros	Valores	Coef. Correl.
A	0,0483 $\pm$ 0,0146	0,99825
B	73888,8001 $\pm$ 1955,5780	-----

Todos os dados de regressão linear foram calculados empregando-se as

concentrações em mol L⁻¹.

O espectro de absorção de NYS entre 230 nm e 800 nm (dados não mostrados) só apresenta bandas na região mostrada na Fig. 21. Segundo Thomas e col., (1981), quando amostras do antibiótico (compostos tetraênicos) absorvem em 382 nm, estas se encontram contaminadas por compostos heptaênicos, o que não é o caso presente. Ainda na análise dos espectros de absorção da NYS nas concentrações e solvente estudado, tem-se o fármaco do estado monomérico, segundo Coutinho e col., (1995). Assim, não se observa modificação nos espectros de absorção. Todavia, no trabalho de Castanho e col., (1992), a NYS também não mostra alteração em seu espectro de absorção em concentrações nas quais ela se apresenta no estado monomérico e no agregado em meio aquoso. O mesmo não ocorre com a Filipina, outro antibiótico poliênico.

5.1.4. Análise fluorimétrica da NYS

Na Fig. 25, verifica-se que o espectro de emissão não é estruturado como os de absorção (Fig. 20) ou seja, não se observa a obediência à regra da imagem espelho.

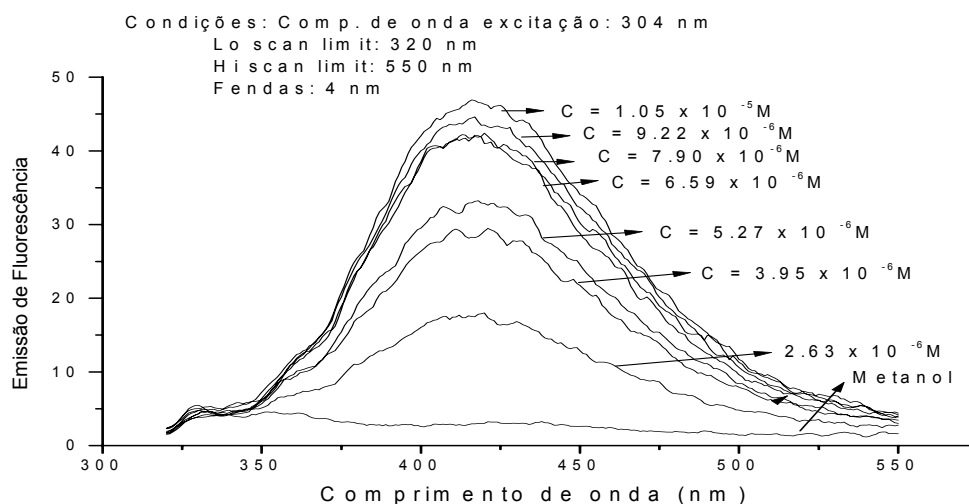


Figura 25. Espectros de fluorescência de NYS Medley em MeOH ($1,05 \times 10^{-5}$; 9,2; 7,9; 6,6; 5,3; 3,9; $2,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e de metanol puro.

Uma análise dos espectros de absorção e emissão dos compostos poliênicos revela que a fluorescência se origina de um estado de simetria diferente daquele associado ao espectro de absorção, pois a transição de menor energia $S_0 \rightarrow S_1$ não é permitida. Assim, o espectro de absorção reflete a excitação a um nível mais alto, embora a emissão ainda ocorra como uma transição $S_1 \rightarrow S_0$. (LAKOWICZ, 1999).

5.1.5. Análise por espectroscopia na região do infravermelho

Foram obtidos espectros no IV (Fig. 26) das amostras de NYS Medley e Cristália. O “Analytical Profiles of Drug Substances” (MICHEL, 1972) apresenta três espectros de infravermelho para os diferentes tipos de cristal da NYS que são classificados como tipo A, B e C (Fig. 27). As duas amostras apresentam espectros semelhantes entre si, análogos ao do tipo A, mas não se descarta a hipótese de contaminação com os outros tipos.

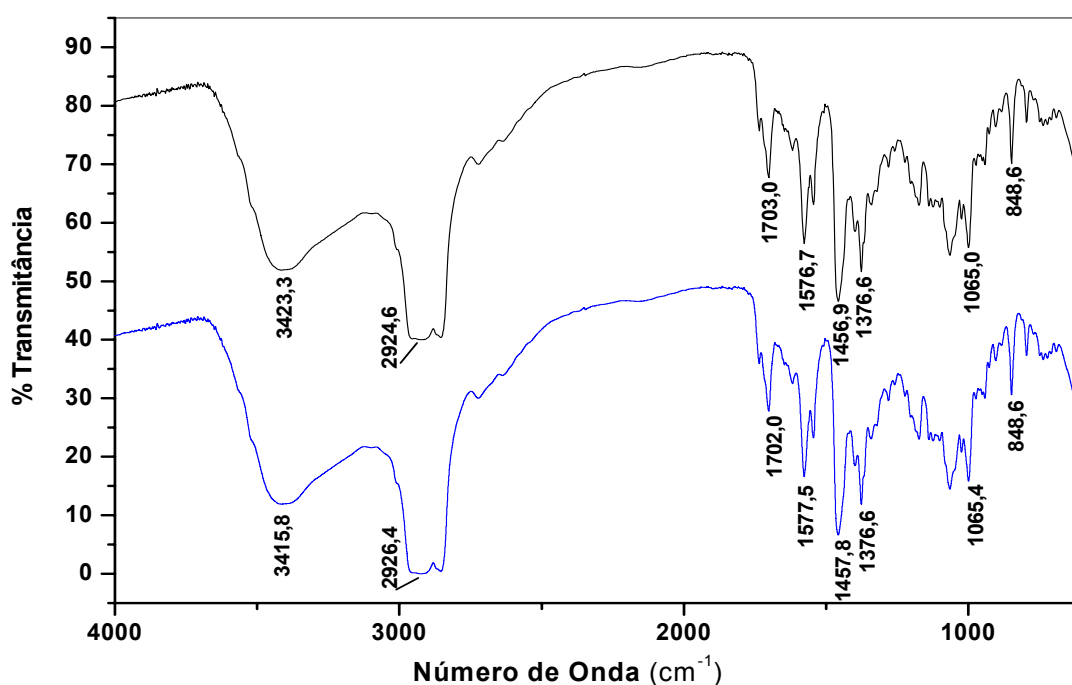
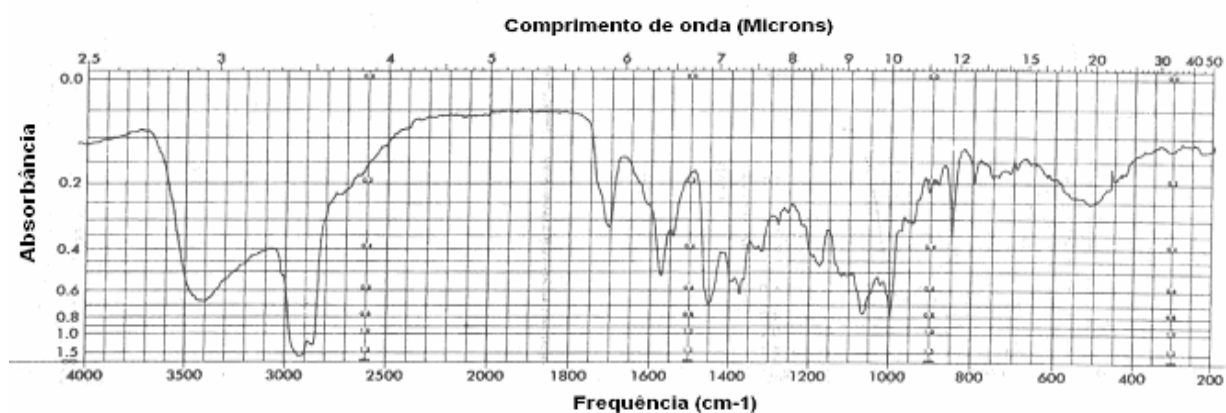


Figura 26. Espectros no IV das amostras de NYS Medley (azul) e Cristália (preto).

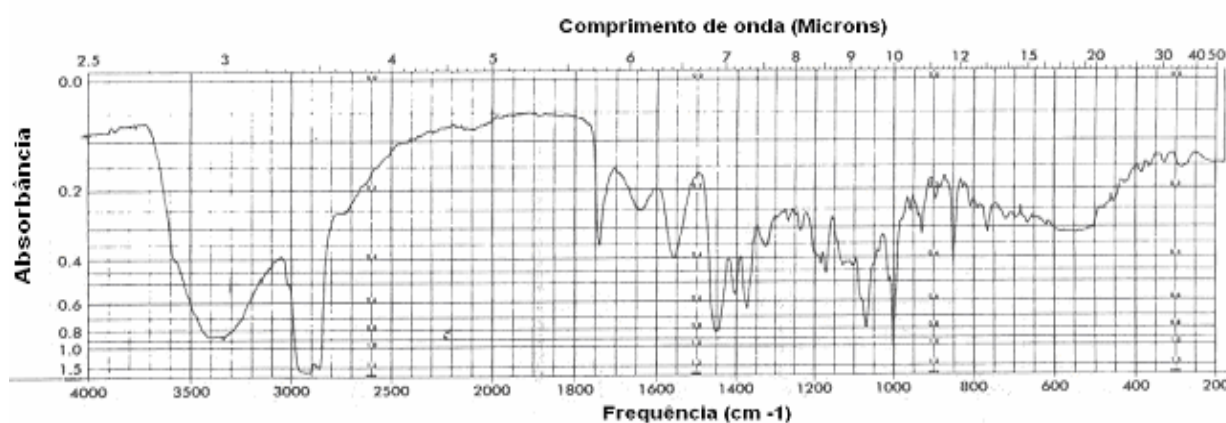
Na Tabela 6, estão indicadas as frequências de vibração mais características dessa molécula.

Tabela 6. *Frequências de absorção características das vibrações de ligação da NYS Medley e Cristália*

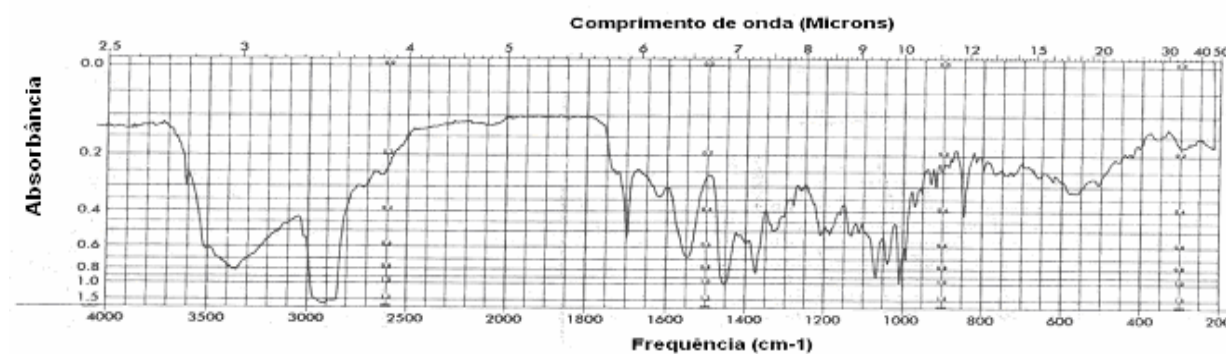
. Frequência (cm⁻¹)	Modo vibracional
1065	Estiramento simétrico de CH ₃
1376	Deformação simétrica de CH ₃
1577 e 1576	Íon Carboxilato
1702	Lactona
3300 - 3500	Estiramento NH, OH



Espectro de IV de Nistatina tipo A



Espectro de IV da Nistatina tipo B



Espectro de Infravermelho de Nistatina tipo C

Fig. 27 Espectros da NYS no IV dos diferentes tipos de cristalização da NYS A, B e C.

5.1.6. Análise da NYS por DSC

As análises foram realizadas entre 50 °C e 250 °C. Na Fig. 28, têm-se curvas de aquecimento por DSC de amostras NYS Medley (a) e Cristália (b), ambas apresentando um pico endotérmico, largo, único. O fato do pico ser largo pode indicar que as amostras não são puras, ou seja, que elas são constituídas de uma mistura das NYS A1, A2 e A3. Também contribui para o alargamento do pico a decomposição gradual que ocorreu acima de 160 °C sem fundir (MICHEL, 1972). Contudo, a presença de um pico único indica a prevalência de composto provavelmente é A1, que é o mais abundante na mistura, em ambas as amostras.

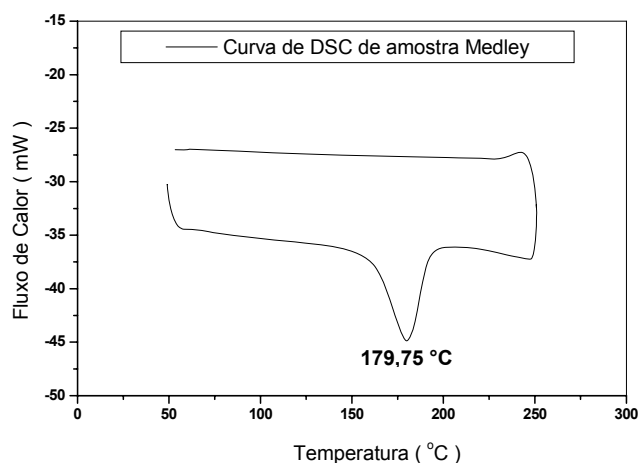
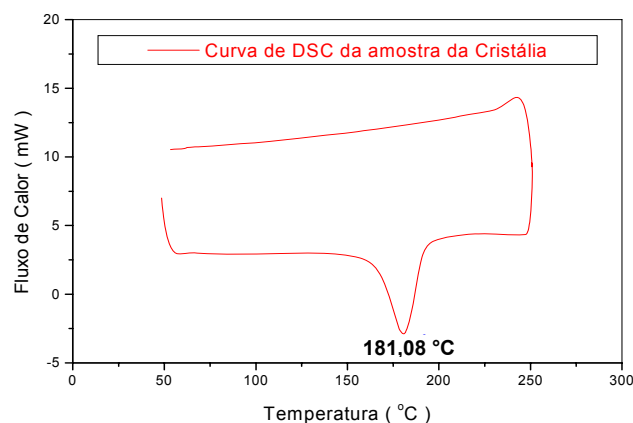
**A****B**

Fig. 28 Curvas de aquecimento obtidas por DSC para as amostras de NYS Medley (A); Cristália (B).

A determinação das áreas dos picos fornece as entalpias de fusão para as amostras. Para a NYS Medley a entalpia foi 295,8 J/g e para a Cristália 245,8 J/g, indicando que esta última é mais pura. É preciso mencionar também que o fato das duas curvas de aquecimento por DSC apresentarem um único pico endotérmico mostra que não há polimorfismo, ou seja, existe apenas uma estrutura cristalina para ambas as amostras.

5.1.7. Análise da NYS por TGA

Os termogramas das amostras NYS Medley e Cristália demonstram que ambas são muito semelhantes, com um mesmo perfil de perda de massa (Fig. 29).

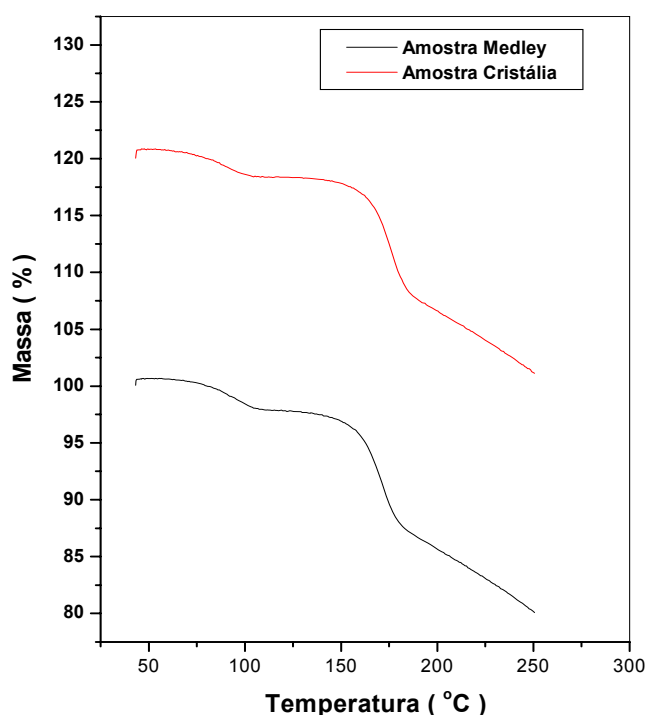


Figura 29. Curvas de aquecimento obtidas por TGA da NYS Lotes: NT/C 645743/Medley e 04102/2004/Cristália. Massas: 3,7mg (Medley); 3,5mg (Cristália).

Os DTGs das amostras indicam que as NYSs sofrem decomposição em três fases no intervalo de temperatura estudado (Fig. 30). As temperaturas correspondentes

para NYS Medley são 90,1 °C; 171,0 °C e 260,3 °C e para a Cristália 88,4 °C; 173,6 °C e 258,8 °C.

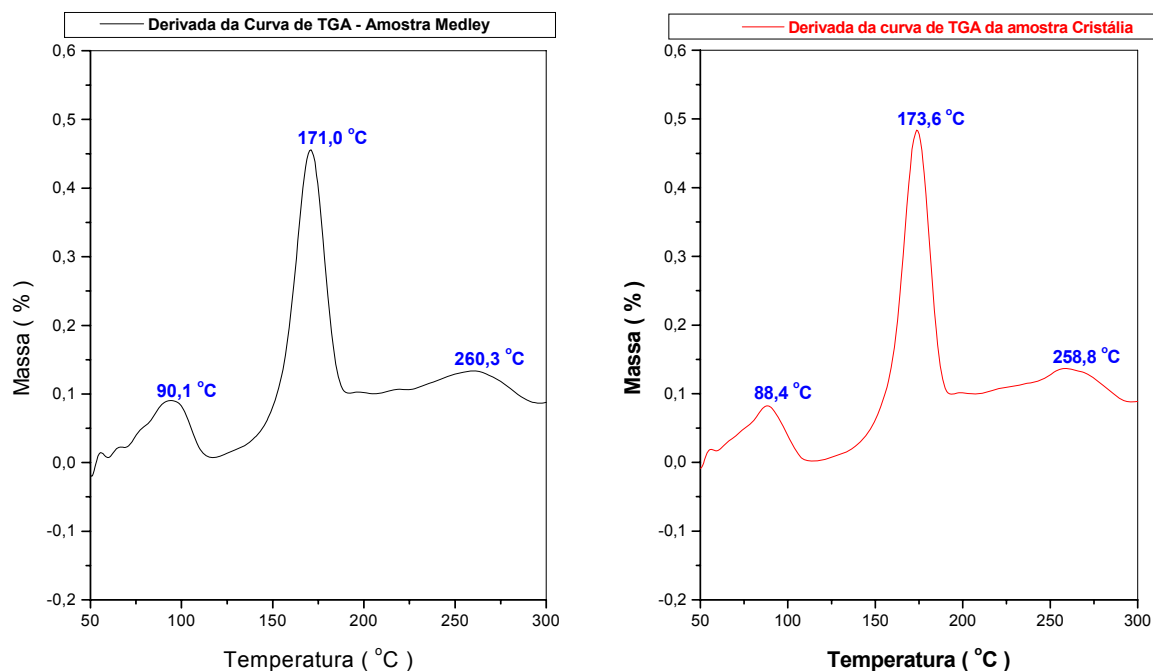


Figura 30. Curvas de DTG da NYS Lotes: NT/C 645743/Medley e 04102/2004/Cristália. Massas: 3,7mg (Medley) e 3,5mg (Cristália).

5.1.8.Determinação do coeficiente de partição octanol/tampão

Para estimar o grau de lipofilicidade da NYS Medley, determinou-se o coeficiente de partição octanol/tampão succinato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,6) isotônico do fármaco a 25 °C e 37 °C pela razão entre as concentrações do composto nas fases orgânica e aquosa (Tabela 7). Esse coeficiente é uma medida da distribuição da substância em um sistema bifásico e é comumente usado como parâmetro relacionado a capacidade de penetrar em membranas biológicas, mimetizadas por lipossomas.

Tabela 7. Coeficientes de partição da NYS em *n*-octanol/tampão succinato (0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6) isotônico a 25 e 37 °C.

Concentração (mM)	Coeficiente 25°C	Coeficiente 37°C
0,25	1,3	1,2
0,48	1,2	1,4
1,00	1,4	ND
2,00	1,6	1,3
3,00	1,1	1,0
4,00	1,0	0,7
5,00	0,9	0,5

ND = Não Determinado

Verificou-se uma partição maior da NYS Medley na fase apolar até uma concentração de 2 mM de fármaco na temperatura ambiente. Quando a concentração aumentou, observou-se que a NYS migra para a fase aquosa, que é mais evidente na temperatura de 37°C.

5.2.Preparação das formulações lipossomais

Com o intuito de desenvolver sistemas lipossomais, nos quais o fármaco NYS apresentasse estabilidade química e teor elevado de recuperação, foram obtidas várias preparações combinando lipídios selecionados. Modificou-se a concentração de fármaco em relação à dos lipídios, às temperaturas e ao modo de hidratação. Inicialmente, foram preparadas vesículas multilamelares que foram sonicadas para terem tamanho mais reduzido.

Na Tabela 8, são mostrados os teores e as condições experimentais de quatro formulações multilamelares, nas quais partiu-se de uma composição lipídica e relação fármaco/lipídio pré-estabelecida. Foram variados inicialmente os meios e a temperatura

de hidratação (Etapa 1).

Tabela 8. Teores % de NYS recuperada nas formulações lipossomais, contendo 10 % de NYS em relação à concentração molar de PCH, hidratadas com Hepes ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 7,4) ou Tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,6), isotônicos, a 55°C e 65°C .

Teor (%)	C _{total} lipídios (mM)	Meios hidrat	Temp. hidrat ($^\circ\text{C}$)	Modo hidrat	Relação NYS:lip (%)	Teor (%) fármaco
PCH = 100	10,6	HEPES	65	AU	10	$89,3 \pm 0,7$
PCH = 100	10,6	HEPES	55	AU	10	$84,0 \pm 0,6$
PCH = 100	10,6	Succinato	65	AU	10	$74,5 \pm 0,4$
PCH = 100	10,6	Succinato	55	AU	10	$90,8 \pm 0,1$

AU = modo de hidratação com adição do meio hidratante de uma única vez.

Os testes preliminares apontam que a melhor condição experimental para a hidratação dos lipossomas é meio tampão succinato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6 e temperatura de hidratação 55°C . O sucesso da estabilização química do fármaco, com o tampão succinato (pH 5,6) já era esperado. As pesquisas de Zeichner e col., (2001) determinaram atividade antifúngica de dois confôrmers interconvertíveis da NYS, isoladas por HPLC preparativa e as fórmulas estruturais moleculares determinadas por análises com RMN (Fig. 31) contra cepas de *Candidas* spp. em RPMI (pH 7,5). O confôrmere que apresentou maior atividade biológica existiu, preferencialmente, em pH 6,0 (CASTANHO e col., 1992).

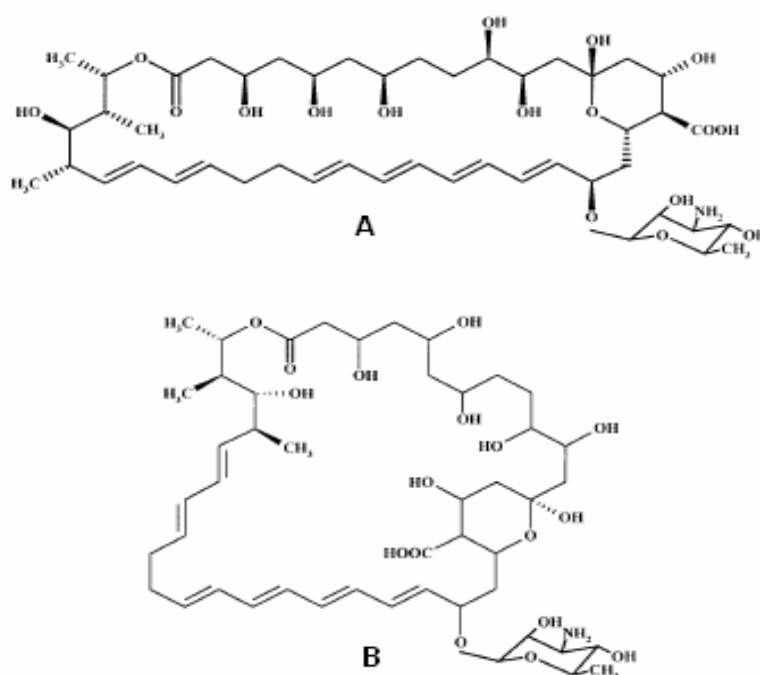


Figura 31. Estruturas moleculares das formas isoméricas interconvertíveis do antibiótico NYS. A – maior atividade biológica; B - menor atividade biológica.

Para confirmar esses resultados, uma nova formulação foi preparada e testada nas mesmas condições experimentais já avaliadas. Na Tabela 9, tem-se os teores de NYS obtidos para a nova formulação (80 % PC e 20 % de colesterol).

Tabela 9. Teores obtidos de NYS recuperada na formulação 80 % PCH e 20 % de Colesterol, hidratada com os tampões HEPES ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 7,4) ou tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 5,6), isotônicos, a 55 °C e 65 °C.

Composição/conc./ teor(%)	C _{total} lipídios (mM)	Meios hidrat	Modo hidrat	Temp. hidrat (°C)	Rel. NYS:lip (%)	Teor (%) fármaco
PCH= 80% (8,5 mM) Colesterol=20% (2,1 mM)	10,6	HEPES	AU	65	10	62,6 ± 0,5
PCH=80% (8,5 mM) Colesterol=20% (2,1 mM)	10,6	HEPES	AU	55	10	82,7 ± 0,6
PCH=80% (8,5 mM) Colesterol=20% (2,1 mM)	10,6	Succinato	AU	65	10	80,7 ± 0,1
PCH=80% (8,5 mM) Colesterol=20% (2,1 mM)	10,6	Succinato	AU	55	10	98,1 ± 0,4

AU = modo de hidratação com adição do meio hidratante de uma única vez.

Mesmo introduzindo colesterol e diminuindo o teor de PCH, a melhor condição experimental quanto ao meio e temperatura de hidratação foi confirmada (tampão succinato, 55 °C), sendo que o colesterol parece melhorar o teor de recuperação do fármaco presente.

A Fig. 32 mostra os cromatogramas das duas formulações para as quais foram obtidos os maiores teores (90,8 % (Tabela 8) e 98,1 % (Tabela 9)) de NYS recuperada. Os teores obtidos para as formulações das Tabelas 8 e 9 e ainda a análise dos cromatogramas (presença de mais compostos de degradação para formulação B) de duas formulações (formulação A, composta de PCH e colesterol e formulação B, composta somente por PCH) indicam que as compostas somente por PCH apresentam menor estabilidade química do que as constituídas de PCH e colesterol.

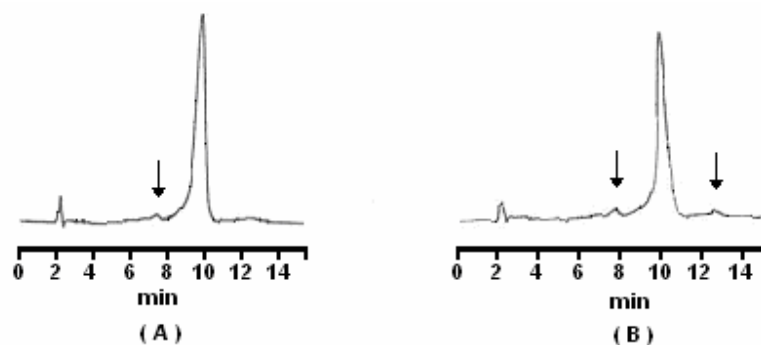


Figura 32. Cromatogramas das duas formulações (Etapa 1). (A) 80 % de PC e 20 % de colesterol e teor de $98,1 \pm 0,4$ % de NYS e (B) 100% de PCH e teor de $90,8 \pm 0,1$ % de NYS. O pico em 2 min corresponde a fase móvel.

A Fig. 33 apresenta os cromatogramas da formulação preparada na Etapa 1, que possui em sua composição 80 % de PCH e 20 % de colesterol. Verificou-se a presença de menos compostos de degradação quando na hidratação dos lipossomas, utilizou-se o tampão succinato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6 como solução hidratante a 55°C (cromatograma A). Todavia, a degradação aumenta se a temperatura for aumentada para 65°C (cromatograma B) e a solução hidratante modificada para tampão HEPES $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 (cromatogramas C e D).

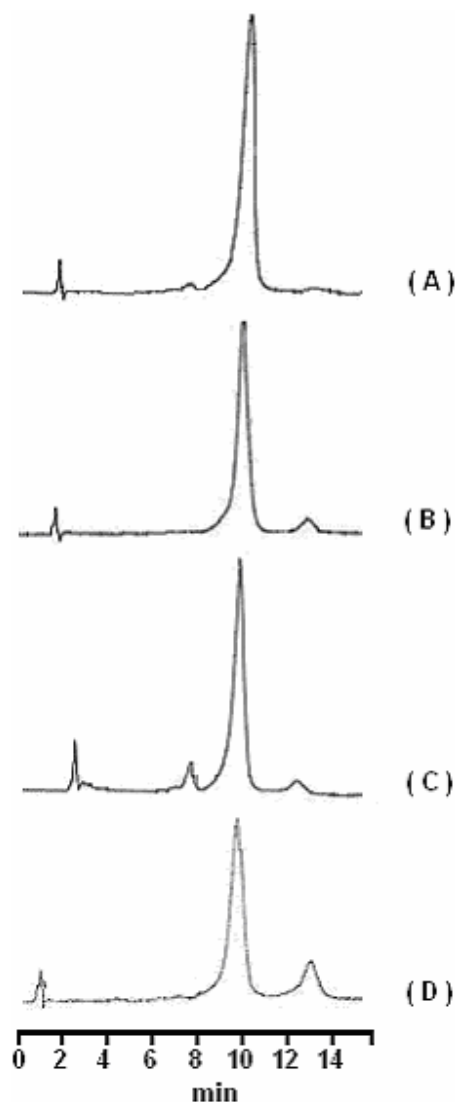


Figura 33. Cromatogramas das formulações com 80% de PCH e 20% de Colesterol (Etapa1). (A): tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 5,6 e 55°C ; (B): tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 5,6 e 65°C ; (C): tampão HEPES ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 7,4 e 55°C ; (D): tampão HEPES ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 7,4 e 65°C . Todos os meios de hidratação foram isotonicados.

Na sequência (Etapa 2), foi utilizada a formulação com maior teor (98,1 %) até então preparada (80 % PCH e 20 % Col.) e adicionou-se outra formulação sem colesterol, mas com DSPG. Modificou-se a concentração de lipídios (11 e 15 mM) e o modo de hidratação (AU e AE) e foi diminuída a relação NYS/lipídio de 10 % para 7 % (Tabela 10).

Tabela 10. Teores de NYS recuperada nas formulações lipossomais (Etapa 2), compostas de lipídios PCH, colesterol e DSPG, contendo NYS (NYS/lipídio 7 %), hidratadas com tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$), isotônico, a 55°C .

Composição/Conc./Teor (%)	C _{total} lipídios (mM)	Meio hidrat	Temp hidrat (°C)	Relação NYS:lip (%)	Modo hidrat	Teor (%) fármaco
PCH = 80 % (8,5 mM) colesterol = 20% (2,2 mM)	10,7	Succinato	55	7,0	AU	$79,5 \pm 0,9$
PCH = 80 % (8,5 mM) colesterol = 20% (2,2 mM)	10,7	Succinato	55	7,0	AE	$93,3 \pm 0,7$
PCH = 66 % (10,0 mM) DSPG = 34% (5,1 mM)	15,1	Succinato	55	7,0	AU	$77,6 \pm 0,5$

AU = modo de hidratação com adição do meio hidratante de uma única vez.

AE = modo de hidratação com adição do meio hidratante em 3 etapas.

Com esses resultados, pode-se sugerir que o modo de hidratação AE favorece a encapsulação do fármaco, estando o composto menos vulnerável à degradação térmica.

A Tabela 11 mostra os teores % e as condições experimentais das formulações lipossomais estudadas no Etapa 3, a seguir.

Tabela 11. Teores % obtidos de NYS recuperada nas formulações: 80 % PCH e 20 % de Colesterol e 70 % PCH e 30 % de DSPG, quando as formulações são hidratadas com tampão succinato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,6, isotônico. As formulações foram hidratadas a 55°C e foram variadas as concentrações de lipídios de 10 para 15 mM. A relação fármaco/lipídio de 7 % para 10 %.

Composição/ conc./ Teor (%)	C _{total} lipídios (mM)	Meio hidrat	T hidrat (°C)	Relação NYS: lip (%)	Modo hidrat	Teor (%) fármaco
PCH = 80 % (8,5 mM) colesterol = 20% (2,2mM)	10,7	Succinato	55	10,0	AE	94,8 ± 0,3
PCH = 80 % (12,0 mM) colesterol = 20% (2,2mM)	15,2	Succinato	55	7,0	AE	98,4 ± 0,5
PCH = 68,5 % (7,4 mM) DSPG = 31,5 % (3,4 mM)	10,8	Succinato	55	10,0	AE	75,2 ± 0,7
PCH = 70 % (10,7 mM) DSPG = 30 % (4,6 mM)	15,3	Succinato	55	7,0	AE	76,7 ± 0,7

AE = modo de hidratação com adição do meio hidratante em 3 etapas.

Considerando os resultados obtidos para as formulações testadas neste Etapa 3, no qual foram preparados dois tipos de formulações (PCH 80 %:Colesterol 20 % e PCH 70 %:DSPG 30 %), verificou-se que os teores entre as mesmas formulações praticamente não variaram. Entretanto, houve uma sensível superioridade quanto aos teores (%) de NYS recuperadas na formulação PCH 80 %:colesterol 20 % em relação à PCH 70%:DSPG 30 %.

A Tabela 12 mostra condições experimentais e teores de NYS nas formulações da Etapa 4.

Tabela 12. Teores de NYS nas formulações lipossomais compostas de PCH, colesterol e DSP, BHT e NYS em uma relação fármaco/lipídio de 7 %, hidratadas com tampão succinato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$), isotônico, a 60°C .

Composição/Conc./Teor (%)	C _{total} lipídio (mM)	Meio hidrat	Temp. hidrat ($^\circ\text{C}$)	Relação NYS: lip (%)	Modo hidrat	Teor (%) fármaco
PCH = 54 % (8,0 mM) colesterol = 26 % (3,9 mM) DSPG = 20 % (2,9 mM) BHT = 1,3 %	14,8	Succinato	60	7,0	AE	92,3 ± 0,9
PCH = 80,0 % (11,8 mM) colesterol = 20,0 % (2,9 mM) BHT = 1,3 %	14,7	Succinato	60	7,0	AE	82,2 ± 0,3
PCH = 69 % (10,9 mM) colesterol = 21 % (3,1 mM) DSPG = 10 % (1,5 mM) BHT = 1,3 %	15,0	Succinato	60	7,0	AE	95,3 ± 0,4
PCH = 70 % (10,5 mM) DSPG = 30 % (4,5 mM) BHT = 1,3 %	15,0	Succinato	60	7,0	AE	64,9 ± 0,5

AE = modo de hidratação com adição do meio hidratante em 3 etapas.

Variou-se a composição lipídica e a temperatura de hidratação que foi intermediária às utilizadas, 60 °C. Devido à sensibilidade da NYS ao oxigênio no estado sólido ou em solução, introduziu-se o antioxidante BHT que deve ser usado em uma concentração de 1 % a 1,5 % em relação à massa de fármaco empregado (MICHEL, 1972). Conforme Lasic, (1993), lipossomas empregados em terapia antimicrobiana em geral apresentam conteúdo de colesterol de 10 – 30 mol % de colesterol e fosfolípidios com carga, com cabeça polar de PS ou PG a uma concentração de 5 a 30 mol%. Na literatura (VARGAS e col.,2000 & DEF, 2000), verifica-se que as duas formulações liofilizadas contendo os antibióticos antifúngicos poliênicos NYS (NYOTRAN[®]) e AnfB (AMBISOME[®]) têm a seguinte composição (% molar) e meio de reconstituição: NYOTRAN[®] (DMPC 70,5 % e DMPG 29,4 %, antioxidante não citado, salina) e o AMBISOME[®] (Epikuron 53,6 %; Colesterol 26,3 % e DSPG 20,4 %; α -tocoferol 1,3 % (antioxidante); sacarose (crioprotetor); succinato de sódio e água). Assim, foram preparadas formulações lipossomais contendo NYS, em que foram empregados Epikuron 200 SH (PCH), colesterol, DSPG e BHT.

A formulação que apresentou maior teor de NYS recuperada foi a com PCH 70 %, colesterol 20 % e DSPG 10 % (P3). Contudo, nas duas outras formulações, denominadas P1 (PCH 54 %, colesterol 26 % e DSPG 20 %) e P2 (PCH 80 % e colesterol 20%), houve pouca degradação do fármaco. A afirmativa anterior é demonstrada nos cromatogramas da Figura 33, na qual se tem o cromatogramas A (P1), B (P2) e C (P3). A formulação com PCH 70 % e DSPG 30 % (P4) apresentou maior degradação da NYS (Fig. 34). Esses resultados parecem evidenciar a importância do colesterol na formulação, para a estabilização do fármaco.

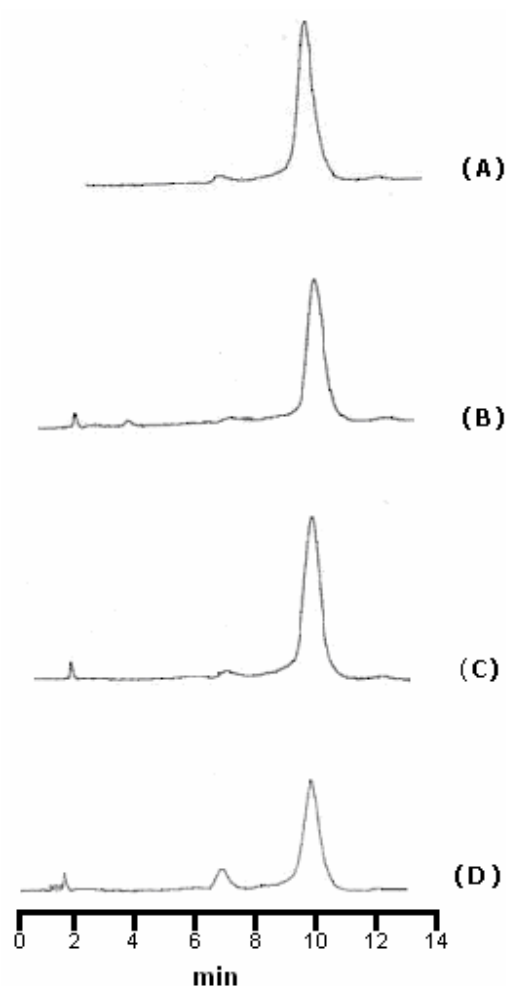


Figura 34. Cromatogramas das formulações P1 (PCH 54 %, colesterol 26 % e DSPG 20 %) (A), P2 (PCH 80 % e colesterol 20%) (B), P3 (PCH 70 %, colesterol 20 % e DSPG 10 %) (C) e P4 (PCH 70 % e DSPG 30 %) (D), respectivamente, em tampão succinato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,6 e 60°C .

Após a seleção da melhor formulação encontrada na Etapa 4, teve-se ainda que otimizar as condições de formulação da suspensão lipossomal. Assim, na 5ª etapa de preparação, foram variadas as temperaturas de hidratação a 55°C e 60°C e o modo de hidratação em AU (adição do meio hidratante de uma única vez) e AE (adição do meio hidratante em 3 etapas). As formulações lipossomais e condições experimentais estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13. Teores de NYS recuperada na formulação lipossomal composta de PCH, colesterol, DSPG, BHT e NYS em uma relação fármaco/lipídio de 6,5 %, hidratada com tampão succinato ($0,02\text{mol L}^{-1}$), isotônico, a 55 °C e 60 °C, modo de hidratação AU e AE.

Composição/Conc./Teor (%)	C _{total} lipídios (mM)	Meios hidrat	Temp. hidrat (°C)	Relação NYS: lip (%)	Modo hidrat	Teor (%) fármaco
PCH = 69,9% (10,3 mM) colesterol = 20,3 % (2,99 mM) DSPG = 9,8 % (1,45 mM) BHT = 1,3 %	14,7	Succinato	55	6,5	AE	80,6 ± 0,6
PCH = 69,9 % (10,3 mM) colesterol = 20,3 % (2,99 mM) DSPG = 9,8% (1,45 mM) BHT = 1,3 %	14,7	Succinato	55	6,5	AU	92,2 ± 0,2
PCH = 69,9% (10,3 mM) colesterol = 20,3 % (2,99 mM) DSPG = 9,8% (1,45 mM) BHT = 1,3 %	14,7	Succinato	60	6,5	AE	97,3± 0,1
PCH = 69,9% (10,3 mM) colesterol = 20,3 % (2,99 mM) DSPG = 9,8% (1,45 mM) BHT = 1,3 %	14,7	Succinato	60	6,5	AU	95,2 ± 0,2

AU = modo de hidratação com adição do meio hidratante de uma única vez.

AE = modo de hidratação com adição do meio hidratante em 3 etapas.

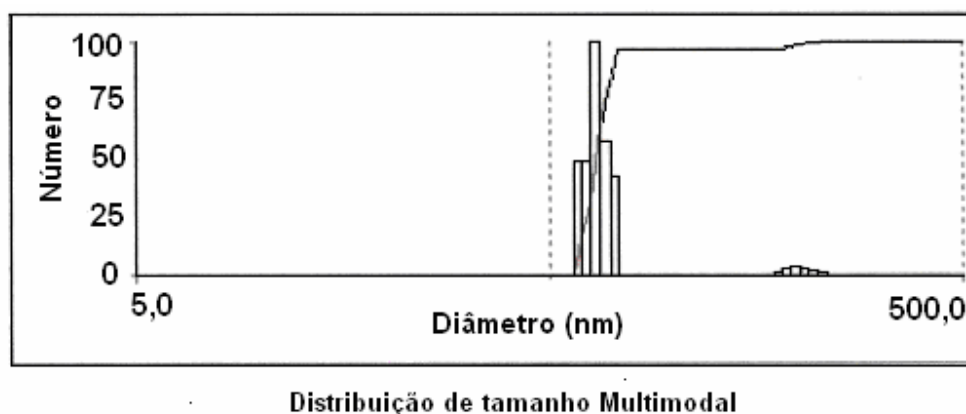
Os teores obtidos mostram que após a seleção adequada da formulação, o modo de hidratação influencia pouco na estabilização química de fármaco, mas a temperatura contribui muito para sua degradação. Embora o teor de fármaco seja maior a 60 °C, picos de compostos de degradação são verificados nos cromatogramas (dados não mostrados).

5.3.Caracterização físico-química das suspensões lipossomais

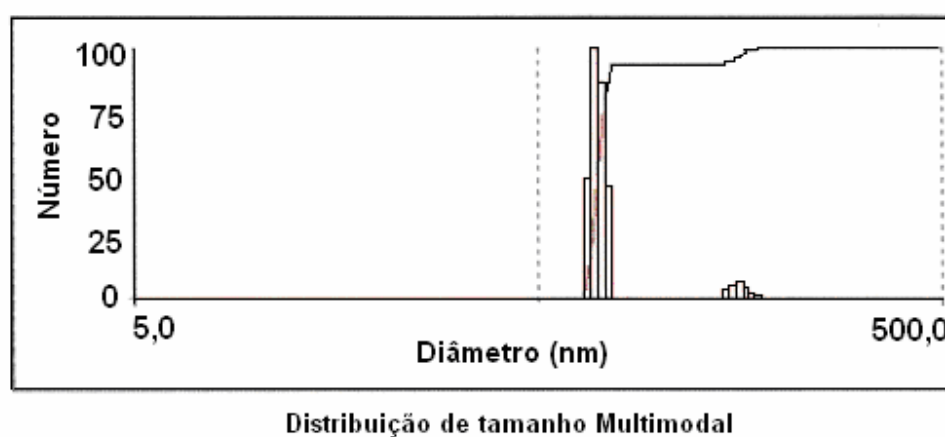
A formulação composta de PCH (70 %), colesterol (20 %), DSPG (10 %), 1,05 mM de NYS e 1,3 % de BHT foi aquela em que o fármaco apresentou maior estabilidade química. A caracterização físico-química foi realizada após a diminuição de tamanho e separação do fármaco livre do encapsulado. O primeiro método empregado para diminuição do tamanho das vesículas foi extrusão, mas o entupimento dos poros das membranas empregadas e a formação de compostos de degradação do fármaco levaram ao abandono dessa técnica. O entupimento pode ter ocorrido devido à presença de fármaco livre no estado agregado. Outra metodologia usada foi a ultracentrifugação/sonicação. Após esse procedimento, o fármaco livre foi separado do encapsulado via centrifugação. As amostras caracterizadas foram as duas formulações hidratadas a 55 °C (L1) e 60 °C (L2) com tampão succinato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,6).

5.3.1.Raio hidrodinâmico

A distribuição de tamanho das formulações L1 e L2 foram determinadas 13 dias após o preparo das mesmas (Fig. 35) obtendo os valores de 52,5 nm a 263,4 nm (polidispersidade 0,087) para L1 e 56,0 nm a 196,3 nm (polidispersidade 0,079) para L2. Para as classes com maior frequência, o diâmetro médio foi 64,3 nm para L1 e 68,1 nm para L2.



(A)



(B)

Figura 35. Distribuição Multimodal de tamanho. (A) Formulção L1; (B) Formulção L2

Considerando que as formulações foram desenvolvidas para uso parenteral, é característica fundamental que formulações injetáveis sejam estéreis e livres de pirogênios (substâncias contaminantes que causam febre, quando administradas, intravenosamente, no organismo humano e de certos animais (PINTO e col., 2003)). A esterilização de injetáveis pode ser feita por filtração em membranas com poros de 0,22 ou 0,45 μm , de modo que as formulações obtidas são esterilizáveis (DEF, 2000, USP24-NF19, PINTO e col., 2003).

5.3.2.Potencial zeta

Reflete o potencial de superfície das partículas, sendo influenciado pelo meio dispersante, devido à dissociação de espécies iônicas presentes e constituintes das partículas.

As formulações L1 e L2 tiveram os seguintes potenciais zeta médios: $35,31 \pm 1,54$ mV e $42,50 \pm 0,8$ mV, respectivamente, sugerindo que L2 teria maior estabilidade físico-química, pois mostra potencial zeta maior, existindo maiores forças repulsivas entre as partículas e que evitam sua agregação. Os valores de potencial zeta também justificam a polidispersidade menor para L2.

5.3.3.Teor de fosfato

A concentração de fosfolipídios é determinada quantificando-se os íons fosfatos em solução por espectrofotometria na região do Visível. Os fosfolipídios utilizados possuem apenas um átomo de fósforo por molécula, de modo que a concentração de fósforo determinada corresponde à de fosfolipídios.

O rendimento médio da formulação lipossomal, multilamelar vazia hidratada a 60°C foi 88 %. Contudo, quando a mesma formulação (L2) foi ultracentrifugada, sonicada e centrifugada novamente, o teor de fosfato passou a $57,7 \pm 0,1$ %. A formulação hidratada a 55 °C (L1), que sofreu o mesmo tratamento que L2, apresentou teor de $63,3 \pm 0,1$ %. Os teores encontrados para as duas formulações fornecem massas de lipídios totais (massas de PC e DSPG) de 9,5 mM e 8,7 mM para L1 e L2, respectivamente. Desta forma, os teores lipídios são muito semelhantes, embora L1 apresente um teor de fosfolipídeos sutilmente maior.

5.3.4. Eficiência de encapsulação

O teor de fármaco encapsulado foi determinado em análise por CLAE das formulações L1 e L2 que foram ultracentrifugadas, sonicadas e centrifugadas para separar a NYS livre da encapsulada.

A ultracentrifugação foi necessária porque os picos cromatográficos de possíveis compostos de degradação eram eliminados ou diminuía de tamanho quando esse procedimento era feito (Fig. 36).

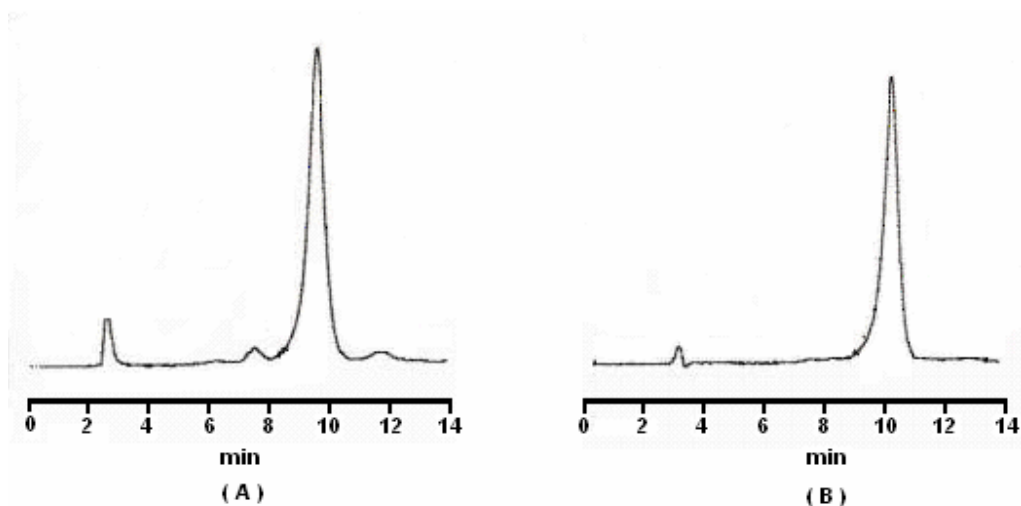


Figura 36. Cromatogramas da NYS presente em formulação lipossomal MLV (L2) sem ultracentrifugar (A) e ultracentrifugada (B). Suspensão em tampão succinato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$); pH 5,6; isotônico. O Pico com tempo de retenção próximo a 3 min é o pico do solvente e em cerca de 10 min o da NYS.

A eliminação/diminuição da degradação das formulações lipossomais após a ultracentrifugação pode ser devida à maior solubilidade dos produtos de degradação no meio aquoso quando comparado a NYS. Na ultracentrifugação, o sobrenadante é eliminado retirando-se os compostos de degradação do meio e o “pellet” é ressuspendido ao mesmo volume anterior a ultracentrifugação.

Duas técnicas de separação do fármaco livre foram empregadas: diálise e centrifugação (NEW, 1990). A cromatografia de exclusão em gel não pode ser empregada devido aos problemas enfrentados na extrusão (item 4.2.4) da formulação MLV com NYS. Contudo, com cada uma dessas técnicas houve dificuldades para separar o fármaco livre do encapsulado por causa da difícil solubilização e agregação imediata em meio aquoso da NYS, causada pelo uso de uma concentração acima de 3 μ M (CMC da NYS em meio aquoso, corroborando Castanho, e col., 1992) no preparo das formulações lipossomais. Análises realizadas nas suspensões dialisadas mostraram que a NYS não foi dialisável, ou seja, permaneceu junto a NYS encapsulada no saco de diálise (marca: Sigma, tamanho 23 x 15 mm, retém 99,9 % de citocromo C, (MW 12.400)). Com relação à centrifugação, por causa da agregação do fármaco em meio aquoso, quando centrifugada a suspensão com o fármaco livre, o mesmo sedimentava junto às vesículas. Por isso, foi necessário diminuir o tamanho das vesículas para que ficassem suspensas no sobrenadante e o fármaco livre sedimentasse no tubo de centrifuga, ocorrendo à separação. A centrifugação também removeu as partículas de titânio desprendidas do sonicator. A Tabela 14 apresenta os teores determinados por análises por CLAE das suspensões L1 e L2.

Tabela 14. Teores de encapsulação de NYS em preparações lipossomais L1 e L2.

Suspensões Lipossomais	Eficiência de encapsulação EE (%)
L1	28,9 $\pm$ 1,0 %
L2	37, 3 $\pm$ 1,7 %

EE (%) = Massa de NYS encapsulada/massa de NYS total adicionada X 100

Observou-se pequeno teor de encapsulação para ambas as formulações. Isto pode ser decorrente de ter-se medido o teor de encapsulação somente das vesículas pequenas em suspensão. Vesículas maiores que sedimentaram junto com as partículas de titânio podem apresentar maiores teores de encapsulação. A partir dos teores de

lipídios totais obtidos na análise do teor de fosfato (item 5.3.3) e teores de fármaco encapsulado, pode-se relacionar as concentrações molares efetivas de fármaco e lipídios. Pelos dados encontrados, para cada $9,5 \text{ m mol.L}^{-1}$ de lipídios, foi encapsulado $0,3 \text{ m mol.L}^{-1}$ de NYS (1 m mol.L^{-1} lipídio/ $0,03 \text{ m mol.L}^{-1}$ NYS) para L1 e em $8,7 \text{ m mol.L}^{-1}$ de lipídio, foi encapsulados $0,4 \text{ m mol.L}^{-1}$ de NYS (1 m mol.L^{-1} lipídio/ $0,04 \text{ m mol.L}^{-1}$ NYS) para L2.

5.3.5.Determinação do grau de anisotropia de fluorescência

Esse parâmetro fornece informações sobre as propriedades intrínsecas (rotação molecular) da molécula, bem como sobre o ambiente no qual ela se encontra.

Castanho e col., (1992) afirmam que NYS na concentração de até $3 \mu \text{ mol.L}^{-1}$ em meio aquoso está na forma monomérica e, acima, agregada. Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram os graus de anisotropia obtidos à temperatura ambiente, para NYS em tampão pH 5,6, acima e abaixo da CMC e na presença das preparações L1 e L2.

Tabela 15. Grau de anisotropia de fluorescência (r) da NYS livre e encapsulada em lipossomas em tampão succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$), isotônico, pH 5,6 a 25°C .

Amostra	r
NYS em tampão ($1,0 \mu \text{M}$)	0,07
NYS em tampão ($9,9 \mu \text{M}$)	0,24
NYS em lipossoma L1 ($1,0 \mu \text{M}$)	0,40
NYS em lipossoma L1 ($9,9 \mu \text{M}$)	0,39
NYS em lipossoma L2 ($1,0 \mu \text{M}$)	0,30
NYS em lipossoma L2 ($9,9 \mu \text{M}$)	0,26

Verifica-se um aumento do valor da anisotropia quando o composto passa do

estado monomérico ($r = 0,07$) para o estado agregado ($r = 0,24$), indicando maior impedimento estérico do estado agregado e, assim, menor liberdade rotacional da molécula do fármaco. Valores ainda maiores do grau de anisotropia foram observados quando a NYS foi incorporada nas formulações lipossomais L1 e L2 nas concentrações 1,0 (monomérica) e 9,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (agregada). Estes resultados indicam que o fato das moléculas estarem na forma monomérica ou agregada não interfere nos graus de anisotropia do fármaco em lipossomas. Entretanto, maiores valores do grau de anisotropia da NYS nas formulações lipossomais indicam restrições aos movimentos rotacionais das moléculas, causadas pela sua incorporação na bicamada lipídica.

Informações do estado monomérico e agregado da NYS em tampão succinato 0,02 mol L^{-1} , pH 5,6 (forma livre) e em lipossomas (forma encapsulada) foram obtidas pela análise dos espectros de fluorescência da NYS nas concentrações de 1,0 (monomérica) e 9,9 μM (agregada) a 25 °C e 60 °C. Na Tabela 16, observa-se aumento da intensidade de fluorescência, pela área registrada sob a curva dos espectros de fluorescência, que compara a NYS em tampão (forma livre) versus na formulação lipossomal (forma encapsulada): NYS na forma livre, versus NYS agregada e a 25 °C versus 60 °C.

A maior polarização de fluorescência em meio aquoso provavelmente resulta da formação de agregados de NYS (ZEICHNER e col., 2001).

Na formulação lipossomal, os lipídios presentes na formulação estão: na fase gel a 25 °C e na fase líquida cristalina a 65 °C.

Tabela 16. *Variação da fluorescência da NYS em concentrações e temperaturas diferentes, na ausência e presença de lipossomas, em tampão succinato (0,02mol.L⁻¹), isotônico, pH 5,6.*

Antibiótico	Concentração (μM)	Temperatura (°C)	Áreas sob os espectros de fluorescência
NYS em tampão	1	25	702,1
NYS em lipossomas (L1)	1	25	2416,6
NYS em lipossomas (L2)	1	25	2939,7
NYS em tampão	1	60	202,8
NYS em lipossomas (L1)	1	60	1001,54
NYS em lipossomas (L2)	1	60	1104,3
NYS em tampão	9,9	25	2712,4
NYS em lipossomas (L1)	9,9	25	15749,5
NYS em lipossomas (L2)	9,9	25	17725,3
NYS em tampão	9,9	60	1264,9
NYS em lipossomas (L1)	9,9	60	4553,2
NYS em lipossomas (L2)	9,9	60	5507,7

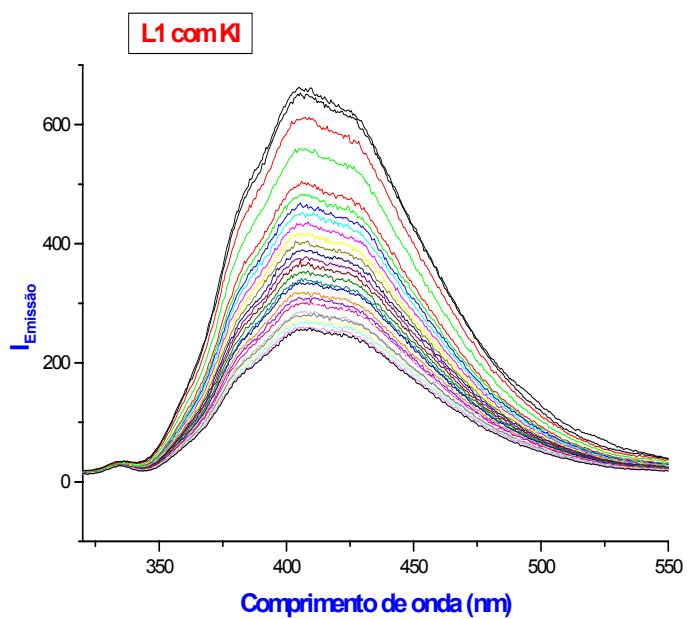
Coutinho e col., (2003), asseveram que as análises fluorimétricas da interação de NYS com membranas lipídicas de DPPC mostraram aumento da intensidade fluorescência das suspensões analisadas, sendo esse fenômeno atribuído à auto-associação do antibiótico, fortemente fluorescente, presente nas membranas lipídicas, na fase gel. Os resultados obtidos (Tabela 16) indicam que o fármaco parece se agregar tanto quando em solução quanto na presença de lipossomas à temperatura ambiente. Contudo, verifica-se que as áreas obtidas quando o fármaco está em

lipossomas são ainda maiores, pois nos lipossomas há a presença de colesterol, que pode associar-se ao fármaco (mecanismo de ação de antibióticos poliênicos) e formar complexos fluorescentes (COUTINHO e col., 2004, 2006). Ainda observa-se que maiores áreas são obtidas para a formulação L2, que apresenta maior teor de fármaco encapsulado, conforme relatado na seção 5.3.4.

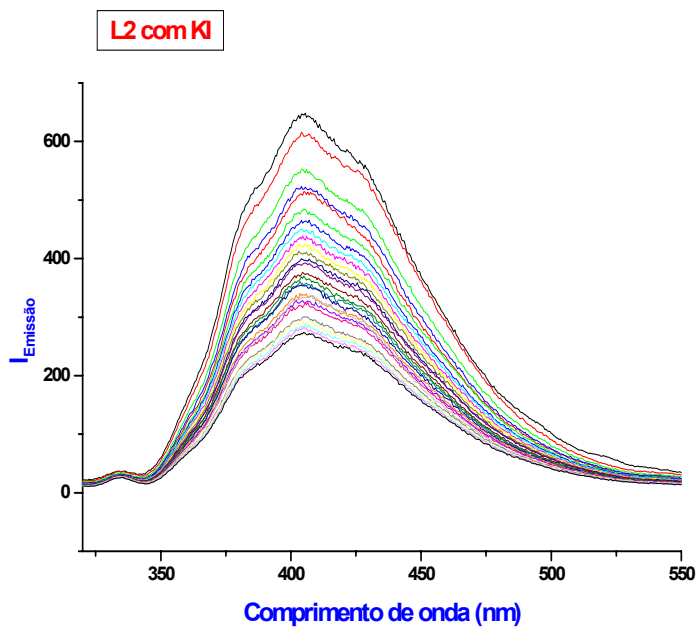
5.3.6. Estudo da interação da NYS em lipossomas

Análises da supressão de fluorescência da NYS em lipossomas permitiram avaliar a localização do composto na bicamada lipídica. Na estimativa da localização do antibiótico nas vesículas lipídicas, foram utilizados supressores de ambientes hidrofílico (iodeto de potássio (KI)) e hidrofóbico (acrilamida).

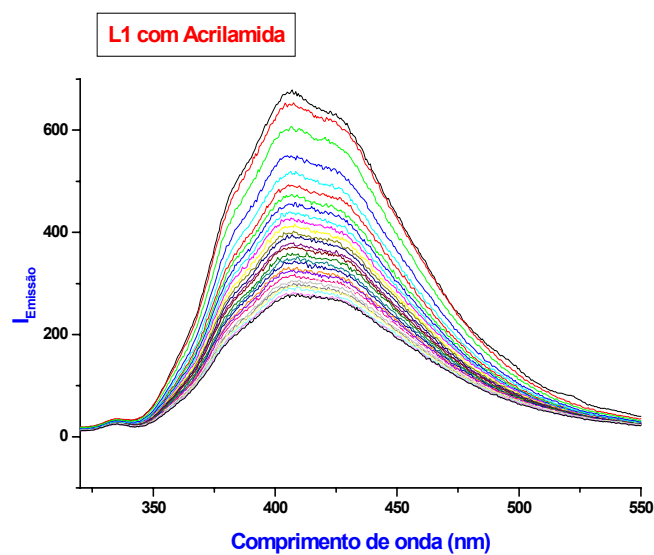
A Fig. 37 ilustra a diminuição da intensidade de emissão de fluorescência à medida que se aumentou a concentração dos agentes supressores na presença de lipossomas contendo NYS. Pelas supressões obtidas, pode-se constatar que há NYS em ambiente hidrofílico e lipofílico. Nas análises da supressão de fluorescência da NYS em lipossomas, utilizando como sondas de ambiente lipídico os ácidos 5-doxil esteárico (ambiente interfacial lipídio/água) e 16 doxil esteárico (ambiente lipídico), realizadas por Coutinho e col., (2003), estes verificaram que a NYS monomérica está preferencialmente ancorada na interface fosfolipídio/água e que forma oligômeros (agregados moleculares) que se inserem no interior da membrana lipídica.



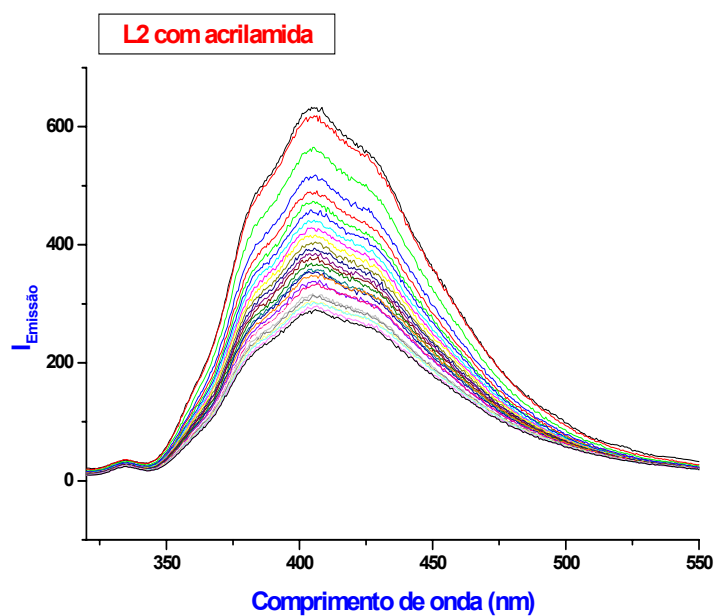
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 37. Sobreposição de espectros de emissão de fluorescência da NYS ($C = 9,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$) nos lipossomos L1 (hidratado a 55°C) e L2 (hidratado a 60°C) após a adição sucessiva dos agentes supressores iodeto de potássio (A e B) e acrilamida (C e D), a 25°C. As concentrações dos supressores variaram de 0 a 0,29 mol.L⁻¹.

Quando foram adicionados KI e NYS livre, verificou-se uma supressão de fluorescência importante, pois a supressão por halogenetos grandes como o iodeto pode ser resultado de cruzamento entre sistemas para um estado triplete excitado, promovido pelo acoplamento spin-orbital do fluoróforo (singleto) excitado e o halogeneto. Desde que a emissão do estado triplete é lenta, a emissão triplete é altamente suprimida (LAKOWICZ, 1999).

Todavia, o mesmo não ocorreu ao se adicionar acrilamida, o que era esperado, porque a NYS encontra-se livre em solução aquosa (tampão succinato) e a acrilamida, por ser um supressor de ambiente apolar, suas moléculas se encontram organizadas em solução (Fig. 38).

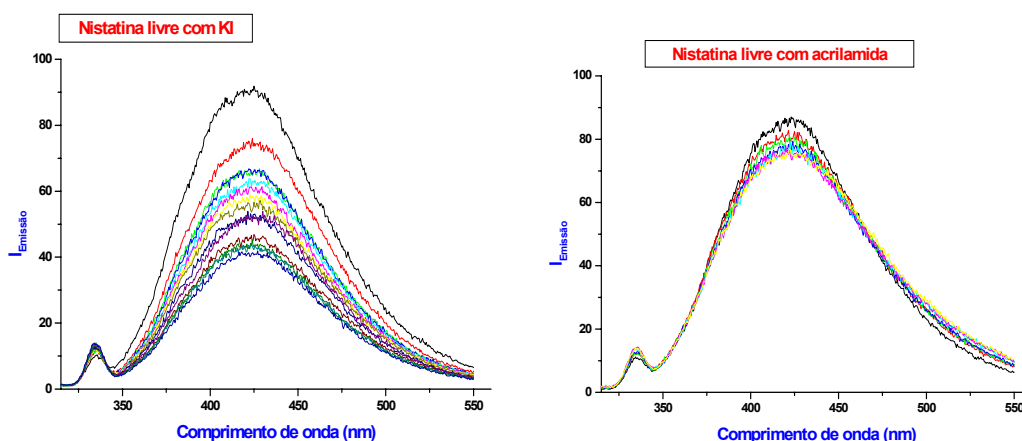
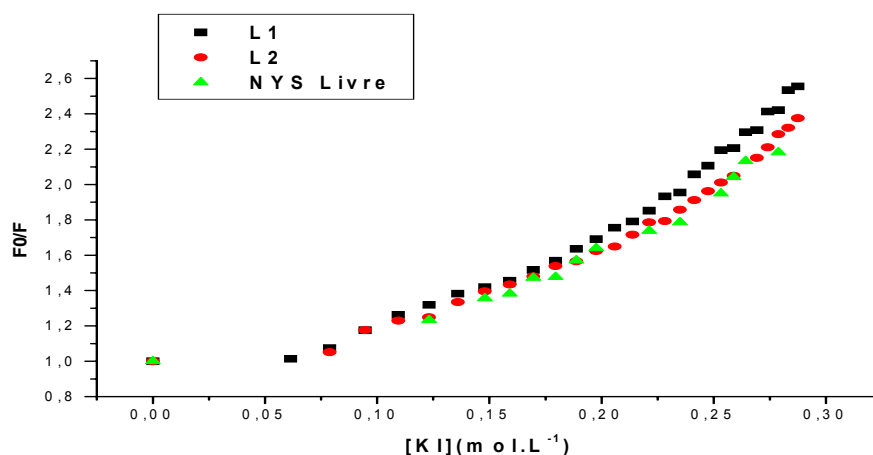
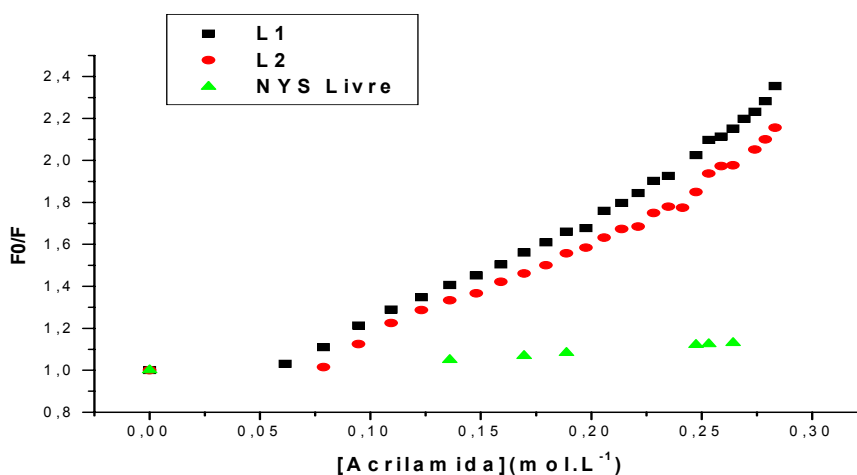


Figura 38. Sobreposição de espectros de emissão de fluorescência da NYS ($C = 9,9 \mu \text{mol.L}^{-1}$) livre em tampão succinato após a adição sucessiva dos agentes supressores iodeto de potássio (A) e acrilamida (B) a 25°C . As concentrações dos supressores variaram de 0 a $0,29 \text{mol.L}^{-1}$.

Na análise da supressão da fluorescência, correlacionaram-se as intensidades de emissão de fluorescência, obtidas a 416 nm, na ausência e presença dos supressores (KI e acrilamida) com a concentração dos mesmos e para obtenção dos gráficos de Stern-Volmer para as NYS lipossomais (L1 e L2) e livre (Fig. 39).



(A)



(B)

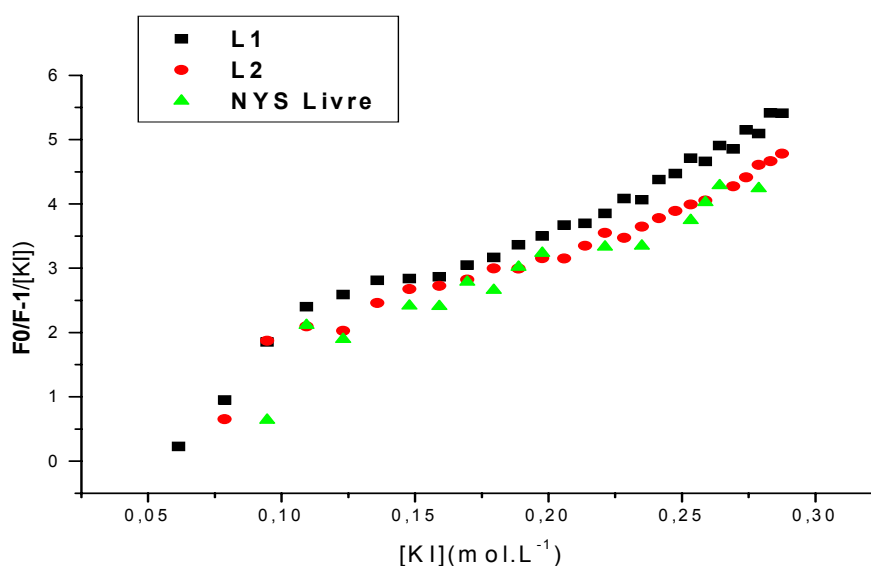
Figura 39. Gráficos de Stern-Volmer relativos ao estudo da supressão de fluorescência, no estado fixo da NYS ($C = 9,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$) livre e em lipossomas com os supressores iodeto de potássio (A) e acrilamida (B). As concentrações dos supressores variaram de 0 a $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$.

Os gráficos de Stern-Volmer (equação 4) indicam que ocorreu um desvio positivo da linearidade, para os dados relacionados as NYSs lipossomais (L1 e L2) quando empregamos os dois supressores. No entanto, em relação a NYS livre somente verifica-se supressão e o mesmo perfil de desvio da Stern-Volmer quando utilizada o KI.

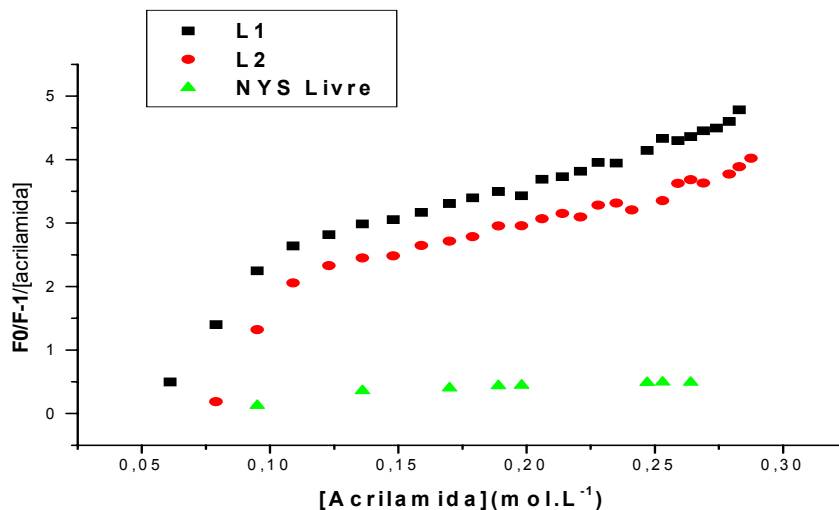
Realizando uma análise inicial, os desvios podem estar indicando a ocorrência

de supressão estática e dinâmica da fluorescência da NYS em lipossomas e em tampão succinato.

Para elucidar os desvios positivos nos dados de supressão da equação 4 foram empregadas as equações modificadas de Stern-Volmer (equações 5 e 6). A primeira a ser testada foi a que descreve as supressões combinadas estática e dinâmica (equação 5). A Fig. 40 apresenta os resultados dos dados de supressão para as NYS_s lipossomais e livre, de acordo com a equação 5.



(A)



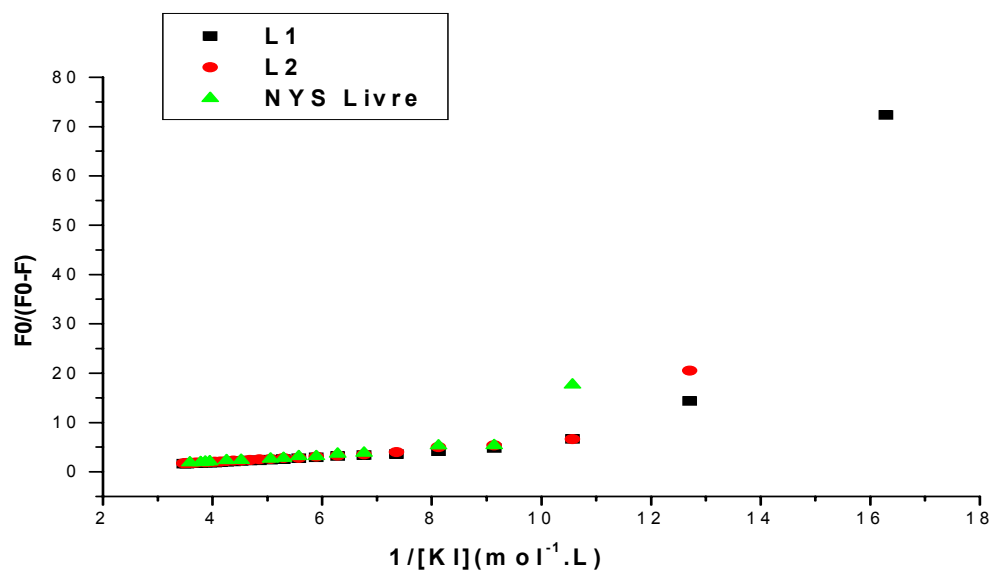
(B)

Figura 40. Gráficos da equação de Stern-Volmer modificada (equação 5) empregada para supressão de fluorescência combinada dinâmica e estática, no estado fixo, da NYS livre ($C = 9,9 \mu \text{mol.L}^{-1}$) e em lipossomas com os supressores iodeto de potássio (A) e acrilamida (B). As concentrações dos supressores variaram de 0 a $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$.

Na Fig. 41, verifica-se que em toda faixa de concentração de supressores utilizados não houve um ajuste linear dos dados de supressão quando empregada a equação de supressão combinada. Se forem utilizados intervalos de concentração de supressores, há duas regiões com ajuste linear; todavia, as constantes de supressão dinâmica e estática não puderam ser calculadas. Os valores numéricos das constantes não apresentaram significado físico.

Como não foi alcançado um ajuste adequado na equação de Stern-Volmer modificada para supressão estática e dinâmica, foram testados os dados de supressão para uma equação de Stern-Volmer modificada (equação 6), o que denota a fração de acessibilidade de duas diferentes populações de fluoróforos ao supressor. Pesquisas de Coutinho e col., (2003) descrevem a presença de duas diferentes populações de NYS

lipossomal: uma no estado monomérico e outra no estado oligomérico.



Na Fig. 41, observa-se que os dados de supressão de NYS livre e lipossomal também não se ajustam em todo o intervalo de concentração dos supressores utilizados. Não obstante, se não forem utilizadas as concentrações iniciais dos supressores iodeto de potássio e acrilamida, ou seja, empregadas as concentrações acima de $0,1591 \text{ mol. L}^{-1}$, têm-se ajustes lineares, visualizados na Fig. 42.

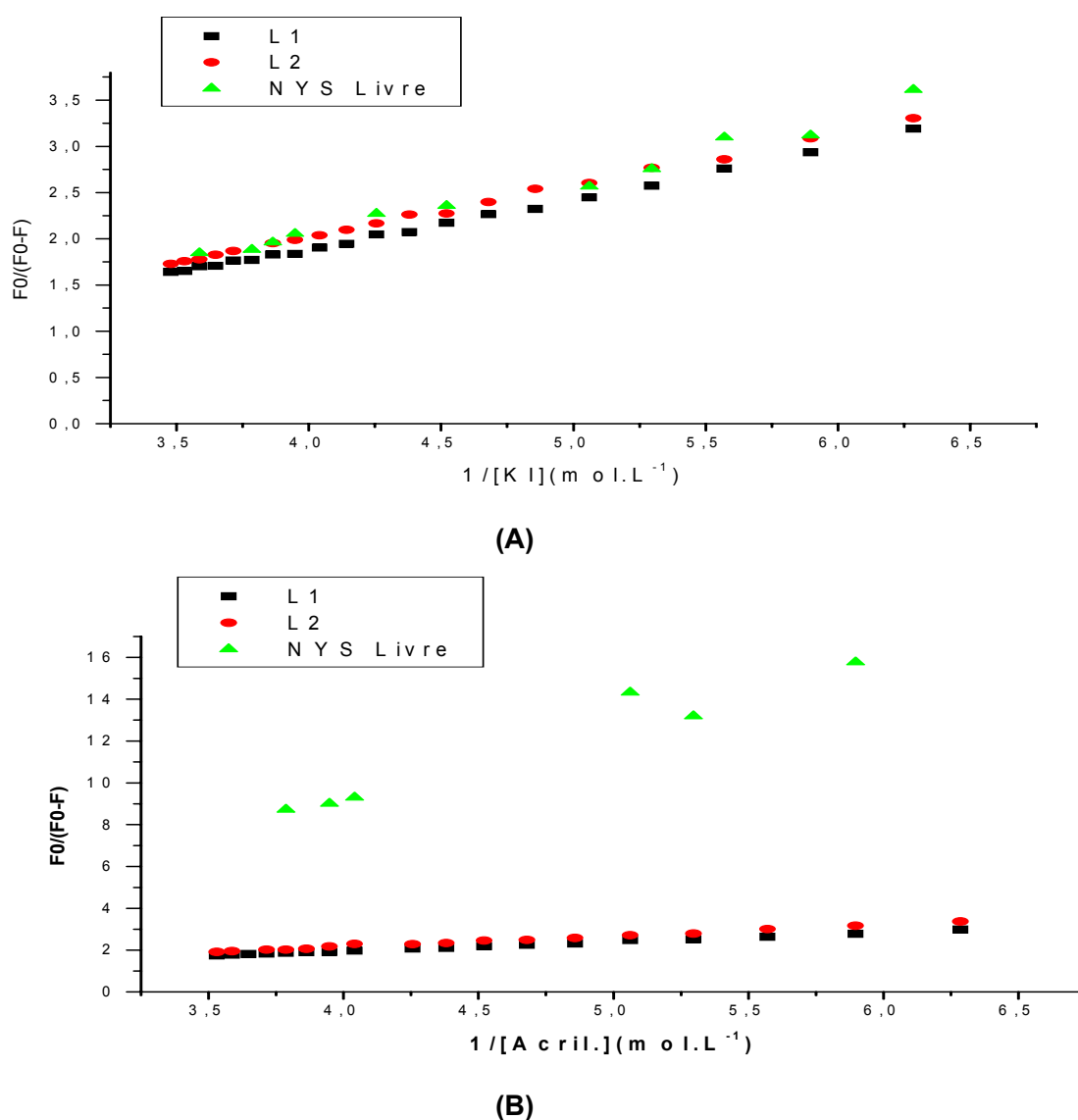


Figura 42. Gráficos para a equação Stern-Volmer modificada (equação 6) para os estudos da supressão de fluorescência da NYS livre ($C = 9,9 \mu\text{M}$) e em lipossomas, com os supressores KI (A) e acrilamida (B). As concentrações dos supressores variaram de $0,16$ a $0,29 \text{ mol. L}^{-1}$.

A inclinação da correlação $F_0/(\Delta F)$ versus $1/[Q]$ é igual a $(f_a \cdot K_a)^{-1}$, sendo “ f_a ” a fração de fluorescência inicial acessível ao supressor [69]. No entanto, os valores de f_a^{-1} encontrados apresentaram valores numéricos negativos que não têm significados físicos (Tabela 17).

Tabela 17. Valores de $1/f_a$ obtidos para a NYS encapsulada em lipossomas (L1 e L2), usando supressores como iodeto de potássio e Acrilamida.

NYS lipossomal	Supressor	$1/f_a$
NYS Livre	Acrilamida	$-4,5135 \pm 1,8097$
L1	Acrilamida	$0,1836 \pm 0,0229$
L2	Acrilamida	$0,0569 \pm 0,0369$
NYS Livre	KI	$-0,4228 \pm 0,1511$
L1	KI	$-0,2813 \pm 0,0317$
L2	KI	$-0,2159 \pm 0,0252$

Considerando que L1 e L2 com acrilamida apresentaram valores de $1/f_a$ positivos, podemos calcular os valores das constantes de supressão para L1 e L2. O valor de “ K_a ” (constante de Stern-Volmer da fração acessível aos supressores) para L1 foi de $0,4144 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$. para L2 de $0,1083 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ indicando uma melhor interação da nistatina com o agente supressor acrilamida em L1, provavelmente devido a maior imobilização do fármaco em L1, segundo resultados obtidos pelas análises do grau de anisotropia.

5.3.7. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da NYS e NYS lipossomal

Os testes de susceptibilidade *in vitro* avaliam a concentração mínima do fármaco que inibe o crescimento de determinado microrganismo. A NYS pura dos lotes NT: C645743 (NYS 1) e NT: C645655 (NYS 2) tiveram Concentrações Inibitórias Mínimas (“MIC” ou CIM), determinadas para várias espécies dos gêneros *Candida* e

Cryptococcus (Tabela 18). Para os microrganismos do gênero *Candida* foram utilizadas cepas padrão. Entretanto para os do gênero *Cryptococcus* utilizou-se cepa padrão e microrganismo isolado de licor de paciente do HU/UNICAMP.

Tabela 18. Resultados do teste de susceptibilidade *in vitro* ("MIC" ($\mu\text{g/mL}$)) para as NYSs 1 e 2 em leveduras do gênero *Candida*, das espécies *krusei*, *albicans*, *parapsilosis* e do gênero *Cryptococcus*, espécie *neoformans*.

Microrganismo	"MIC" NYS 1	"MIC" NYS 2
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2 - 8	2 - 8
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	2 - 8	2 - 8
<i>C. albicans</i> ATCC 76615	2 - 8	1 - 8
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	4 - 8	4 - 8
<i>C. neoformans</i> ATCC 90012	1 - 4	1 - 8

Análises de "MIC" também foram realizadas para as NYSs 1 e 2 com fungos filamentosos isolados de pacientes do HC/UNICAMP. Os resultados com esses fungos dos gêneros *Trichophyton* (dermatófito) foram isolados de raspados de pele (amostras 9, 10, 11, 12, 47, 142, 178, 233, 367, 393 e 434) e unha (amostras 45, 136, 208, 249, 280, 424, 437 e 438). Para o gênero *Fusarium* o microrganismo foi isolado de córnea e para o *Aspergillus* de lavado brônquico (Tabela 19)

Tabela 19. “MIC” ($\mu\text{g/mL}$) para as amostras de NYS 1 e 2 em fungos dos gêneros *Trichophyton* (espécies *rubrum*, *mentagrophytes* e espécie indefinida (spp.)); *Fusarium* spp. e *Aspergillus fumigatus*.

Microrganismos	“MIC” NYS 1	“MIC” NYS 2
<i>T. mentagrophytes</i> (amostra 9 e 11, 208)	1	1
<i>T. mentagrophytes</i> (amostra 10 e 47)	2	2
<i>T. mentagrophytes</i> (amostra 178, 393)	1	2
<i>T.spp.</i> (amostra 12, 136, 142, 249, 280, 367, 424, 437)	1	1
<i>T. spp.</i> (amostra 438)	1	2
<i>T. rubrum</i> (amostra 45, 233, 434)	1	1
<i>Fusarium. spp.</i> (amostra 829)	8	8
<i>Aspergillus fumigatus</i> (amostra 1000)	4	4

Os resultados de “MIC” das Tabelas 18 e 19 mostram que as duas amostras de NYS são mais efetivas na inibição dos crescimentos dos fungos filamentosos do que não filamentosos.

Análises preliminares foram realizadas para avaliação comparativa do “MIC” e do CFM (Concentração Fungicida Mínima) de NYS lipossomal MLV e de NYS livre com NYS 1. As amostras de NYS lipossomal foram hidratadas a 55 °C (L1A) e 60 °C (L2A), ultracentrifugadas, mas não houve separação do fármaco livre do encapsulado. Na Tabela 20, estão os valores dos “MICs” e CFMs para as referidas amostras, empregando as leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Foi testada a levedura *C. glabrata*, denominada LIF 4681, que foi isolada de material biológico (secreção vaginal) de paciente do HC/UNICAMP. A referida levedura foi resistente a fluconazol, cetoconazol e itraconazol.

Tabela 20. “MIC” ($\mu\text{g/mL}$) e CFM ($\mu\text{g/mL}$) para a NYS livre, NYS 1 e NYSs L1A (hidratadas a 55 °C) e L2A (hidratadas a 60 °C), em leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

Microrganismos	“MIC” NYS livre	CFM NYS livre	“MIC” L1A	CFM L1A	“MIC” L2A	CFM L2A
<i>C. albicans</i> ATCC 76615	1,01 - 4,06	1,01 - 4,06	1,17 – 2,34	2,34	0,95 – 1,90	1,90
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	1,01 – 2,03	1,01 – 4,06	1,17 – 2,34	2,34 – 4,68	0,95 – 1,90	1,90 – 3,81
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	2,03 – 4,06	2,03 – 4,06	1,17 – 2,34	2,34	0,95 – 1,90	1,90
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2,03 – 4,06	2,03 – 4,06	2,34	2,34 – 4,68	1,90	1,90 – 3,80
<i>C. glabrata</i> LIF 4681	2,03	2,03	1,17 – 2,34	2,34 – 4,68	0,95 – 1,90	3,81
<i>C. neoformans</i> ATCC 90012	1,01 – 4,06	1,01 – 2,03	0,58 – 1,17	0,58 – 1,17	0,47 – 1,90	0,47 – 0,95

OBS : Foram realizadas análises em quadriplicata.

As amostras utilizadas para determinação da “MIC” e CFM, mostradas na Tabela 20, não foram esterilizadas. Desta forma, houve um crescimento bacteriano muito intenso, prejudicando a avaliação da CFM. A avaliação da CFM mais prejudicada foi para o gênero *Cryptococcus*, em todas as amostras. Amostras de lipossomas vazios de L1A e L2A foram analisadas comparativamente e não interferiram nestes resultados.

Os resultados registrados na Tabela 20 indicam que a formulação L2A é mais fungistática e fungicida do que a NYS livre para quase todas as espécies do gênero *Candida*, exceto a *C. glabrata*, para a qual L2A é fungistático. Todavia, os menores “MIC” e CFM foram encontrados para o gênero *Cryptococcus*.

Outras formulações de NYS lipossomal hidratadas a 55 °C e 60 °C, respectivamente L1 e L2, sofreram tratamentos para diminuição de tamanho e separação do fármaco livre do encapsulado, conforme item 4.2.4. As amostras L1 e L2, assim como dois lotes de NYS pura, passaram pelo teste de susceptibilidade *in vitro*. Os lotes analisados foram: NT/C 645743/Medley, NYS 1 e 04102/2004/Cristália, NYS 3. As NYSs lipossomais foram preparadas com NYS 1.

Nas Tabelas 21 e 22, há os resultados de “MIC” e CFM, sendo os resultados obtidos após um mês de preparo das formulações (L1 e L2). Foram testadas leveduras padrão dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Ainda testamos levedura isolada de licor de paciente do HC/UNICAMP, que foi identificada como LIF 217. A mesma pertence ao gênero *Cryptococcus* e foi resistente a AnfB (Tabela 22).

Tabela 21. “MIC” ($\mu\text{g/mL}$) e CFM ($\mu\text{g/mL}$) para dois lotes de NYS livre (NT/C 645743/Medley e 04102/2004/Cristália) e preparações lipossomais L1 e L2, empregando as espécies *albicans* e *krusei*.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	
	ATCC 90028		ATCC 76615		ATCC 6258	
	“MIC”	CFM	“MIC”	CFM	“MIC”	CFM
NYS 1 livre	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0-8,0	4,0 - 16
NYS 3 livre	2,0	2,0	1,0–2,0	1,0–2,0	4,0	4,0
Lipossomal L1(55°C)	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69
Lipossomal L2 (60°C)	1,13-2,25	1,13-2,25	1,13	1,13	4,5	4,5

Tabela 22. “MIC” ($\mu\text{g/mL}$) e CFM ($\mu\text{g/mL}$) para dois lotes de Nys livre (NT/C 645743/Medley e 04102/2004/Cristália) e preparações lipossomais L1 e L2, empregando os gêneros *Candida* (*parapsilosis*) e *Cryptococcus* (*neoformans*).

	<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. neoformans</i>		<i>C. neoformans</i>	
	ATCC 22019		ATCC 90112		LIF217	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Nys 1 livre	4,0–8,0	4,0–8,0	2,0	2,0	2,0	4,0
NYS 3 livre	4,0	4,0	2,0	2,0	4,0	4,0
Lipossomal L1(55°C)	1,69	1,69	0,84	0,84	1,69	3,38
Lipossomal L2 (60°C)	4,5	4,5	1,13	1,13	2,25	4,5

Os resultados indicam que a atividade biológica das formulações lipossomais é superior à das formulações com NYS livre. No entanto, a formulação L1 apresentou maior atividade biológica do que L2. Os resultados de “MIC” e CFM para L1 indicam que a referida formulação é mais fungistática e fungicida do que L2 para os microrganismos padrões testados e *C. neoformans* LIF217. Esses resultados são bastante satisfatórios e evidenciam o sucesso da NYS lipossomal frente ao fármaco livre para a ação antifúngica *in vitro*. Verifica-se também uma estabilidade das formulações lipossomais obtidas, pois mesmo após um mês de preparo elas ainda mostram atividade biológica *in vitro* maior do que a NYS livre.

5.3.8. Conclusões sobre as formulações lipossomais selecionadas

Através dos resultados obtidos nas formulações lipossomais selecionadas pode-se concluir:

- Selecionou-se a formulação: 70 % PC; 20 % Colesterol; 10 % DSPG e 1,3 % BHT e 7 % de NYS;
- Caracterizaram-se as preparações da formulação selecionada, hidratadas a 55 °C (L1) e 60 °C (L2);
- L2 apresentou menor polidispersidade de seu raio hidrodinâmico, maior carga de superfície e maior eficiência de encapsulação. Assim, pode-se considerar que L2 é um sistema físico-quimicamente melhor, que L1, isto é, mais estável;
- O teor de lipídios foi sutilmente maior para L1 do que para L2;
- Pelos resultados do grau de anisotropia de fluorescência, confirmou-se a encapsulação do fármaco em lipossomas. Todavia, observamos que o fármaco está mais imobilizado em L1, provavelmente devido menor teor de fármaco naquela formulação.
- Os resultados de supressão de fluorescência para L1 e L2 demonstram que o fármaco provavelmente encontra-se ligado à superfície do lipossoma (interface lipídio/cabeças polares (susceptível a KI)). Ainda o fármaco encontra-se inserido na bicamada, pois a fluorescência emitida por NYS também foi suprimida pela acrilamida;
- A formulação L1 mostrou, após sonicação, atividade biológica *in vitro* maior que L2, talvez pela possível degradação do fármaco a 60 °C (L2).

6.CONCLUSÕES GERAIS

Caracterizamos físico-quimicamente o fármaco NYS, verificando que nas amostras utilizadas prevalece o cristal de NYS do tipo A. Análises de DSC indicaram que as amostras são caracterizadas por uma mistura de compostos, NYS A1, A2 e A3. Esse fato já era esperado, devido às características próprias do composto, visto que ele é produzido por fermentação. O antibiótico mostrou-se sensível à luz, de modo que sua manipulação foi feita com luz ambiente. O fármaco também é termosensível, quando em solução.

No desenvolvimento das formulações lipossomais, empregaram-se os lipídios Epikuron 200 SH (PCH), colesterol e DSPG, soluções tampões hidratantes (HEPES 0,01 mol.L⁻¹, pH 7,4 e Succinato 0,02 mol.L⁻¹, pH 5,6), temperaturas de hidratação 55, 60 e 65 °C; diferentes relações fármaco/lipídiode 7 e 10 % e modos de hidratação AU (única adição de solução hidratante) e AE (adição em etapas de solução hidratante). Depois de várias combinações desses parâmetros, observou-se que a melhor formulação, ou seja, na qual foi obtida a maior recuperação de fármaco, era composta de 70 % de PC, 20 % de colesterol, 10 % de DSPG e 1 mmol.L⁻¹ de NYS. A formulação selecionada passou por tratamentos físicos (sonicação e centrifugação), o que permitiu diminuição do tamanho das vesículas e separação entre o fármaco livre e encapsulado.

Na caracterização físico-química da formulação selecionada, foram testadas duas preparações (hidratada a 55 °C (L1) e 60 °C (L2)). Os resultados obtidos indicaram que as preparações continham vesículas com pequenos diâmetros (~ 60 nm) e carga negativa na superfície (-35 (L1) e 40 mV (L2)). Medidas do grau de anisotropia de fluorescência sugerem que o fármaco se encontra agregado com restrições dos movimentos rotacionais causadas por sua encapsulação na bicamada lipídica. Análises da eficiência de encapsulação mostraram um teor de 28 % para L1 e 37 % para L2.

A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* das formulações lipossomais indicou maiores atividades antifúngicas para as formulações lipossomais do que para o fármaco livre. Esses resultados apontam o grande potencial da NYS encapsulada em lipossomas no tratamento de doenças infecciosas, como micoses sistêmicas.

7.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Adição de crioprotetores as formulações, tais como trealose ou sacarose e avaliação do comportamento físico e químico das mesmas;
- Liofilização, reconstituição e caracterização as formulações lipossomais
- Avaliação da atividade biológica *in vitro* das formulações lipossomais reconstituídas
- Estudo da estabilidade de prateleira das formulações lipossomais reconstituídas.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 4ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
2. ALVING, C.R. *Liposomal vaccines: clinical status and immunological presentation for humoral and cellular immunity*, **Ann. New York Acad. Sci.** 754, p. 143-152, 1995.
3. ARAUJO, D. R.; PINTO, L.M.A.; BRAGA, A. F. A.; DE PAULA, E. *Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas*. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 53, 663-671, 2003.
4. ARKADER, R., CARVALHO, W.B. *Novos agentes para infecções fúngicas invasivas em pediatria*, **Rev. Assoc. Méd. Bras.** 52, p. 3-4, 2006.
5. AVANTI POLAR LIPIDS, Inc. *Preparations of liposomes*. Disponível em: www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html. Acesso em 16Set06.
6. AVANTI POLAR LIPIDS, INC. *The Phospholipid and Sphingolipid People*. Disponível em www.avantilipids.com. Acesso em 30Ago06.
7. BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. *Delivery of antimicrobials to infected tissue macrophages*, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 17, p. 5-20, 1995.
8. BERENHOLZ, Y.; CROMMELIN, D.J.A. *In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, New York: Marcel Dekker, p. 1-39, 1994.
9. BITTMAN, R.; FISCHKOFF, S.A. *Fluorescence studies of the binding of the polyene antibiotics Filipin III, Amphotericin B, Nystatin, and Lagosin to cholesterol*, **Proc. Natl. Acad. Sci.** 69, p. 3795-3799, 1972.
10. BOLARD, J. *How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?*, **Biochim. Biophys. Acta.** 864, p. 257-304, 1986
11. BOROWSKI, E.; ZIELINSKY, J.; FALKOWSKI, L.; ZIMINSKI, T.; GOLIK, J.; KOŁODZIEJCZYK, P.; JERECZEK, E.; GDULEWICZ, M. *The complete structure of the polyene macrolide antibiotic Nystatin A1*, **Tetrahedron Lett.** 8, p. 685 - 690, 1971.
12. CARRILLO-MUNOZ, A.J.; QUINDOS, G.; TUR, C.; RUESGA, M.T.; MIRANDA, Y.; DEL VALLE, O.; COSSUM, P.A.; WALLACE, T.L. *In vitro antifungal activity of liposomal Nystatin in comparison with Nystatin, Amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal Amphotericin B, Amphotericin B lipid complex, Amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole* **J. Antimicrob. Chemother.** 44, p. 397-401, 1999.
13. CASTANHO, M.A.R.B.; COUTINHO, A.; PRIETO, M. *Absorption and fluorescence spectra of polyene antibiotics in the presence of cholesterol*, **J. Biol.**

- Chem.** 267, p. 204 - 207, 1992.
14. CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. *Lipossomas em formulações dermatológicas*. **Infarma** 16, p. 75-79, 2004.
15. COUTINHO, A.; PRIETO, M. *Self-association of the polyene antibiotic Nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study*, **Biophys. J.** 69, p. 2541-2557, 1995.
16. COUTINHO, A.; PRIETO, M. *Cooperative partition model of Nystatin interaction with phospholipid vesicles*, **Biophys. J.** 84, p. 3061-3078, 2003.
17. COUTINHO, A.; SILVA, L.; FEDOROV, A.; PRIETO, M. *Cholesterol and ergosterol influence Nystatin surface aggregation relation to pore formation*, **Biophys. J.** 87, p. 3264-3276, 2004.
18. COUTINHO, A.; SILVA, L.; FEDOROV, A.; PRIETO, M. *Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic Nystatin. A fluorescence study*, **Biophys. J.** 90, p. 3625-3631, 2006.
19. DANTAS, H. J. **Estudo Termoanalítico, Cinético e Reológico de Biodiesel Derivado do óleo de algodão (*Gossypium hisutum*)**, João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 2006.
20. DAEMEN, T. *Activation of Kupffer cell tumoricidal activity by immunomodulators encapsulated in liposomes*, **Res. Immunol.** 143, p. 211-214, 1992
21. DEACON, J., *The microbial world: thermophilic microorganisms*. Disponível em <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/thermo.htm#Top>. Acesso em 29Jul06.
22. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF)**, 28 ed., Rio de Janeiro: Publicações Científicas/J. Bras. Med. 99, 2000.
23. ELLEY, J.G. *Controlled release suppositories comprising drug-laden polymeric microscopic particles within a suppository base*, **Pat. US6200590-B1**, 2001.
24. FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-químicos em Farmácia**, Tradução da 3ed. inglesa, São Paulo: EDUSP, 2003.
25. FRANZINE, C. M. **Estudos de Microemulsões e subemulsões Contendo Anfotericina B para a Administração Oral**, Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, Dissertação de Mestrado, 2006.
26. GALE, E.F.; CUNDLIFFE, E.; REYNOLDS, P.E.; RICHMOND, M.H.; WARING,

- M.J. **Molecular basis of antibiotic action**, 2 ed. Cambridge: Ed. John Wiley & Sons, 1972.
27. GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. *Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*, **Clin. Microbiol. Rev.** 12, p. 501-517, 1999.
28. GOMES, M. J. V. M.; REIS, A. M. M. **Ciências farmacêuticas uma abordagem em farmácia hospitalar**, 1 ed., São Paulo: Atheneu, 2001
29. GREGORIADIS, G. *Liposomes as immunoadjuvants and vaccine carriers: antigen entrapment*, **Immunomethods** 4, p. 210-216, 1994.
30. GROLL, A.H.; GONZALEZ, C.E.; GIRI, N.; KLIGYS, K.; LOVE, W.; PETER, J.; FEUERSTEIN, E.; BACHER, J.; PISCITELLI, S.C., WALSH, T.J. *Liposomal Nystatin against experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: efficacy, safety and non-compartmental pharmacokinetics*. **J. Antimicrob. Chemother.** 43, p. 95-103, 1999.
31. GROLL, A.H.; MICKIENE, D.; WERNER, K.; PISCITELLI, S.C.; WALSH, T.J. *High-performance liquid chromatographic determination of liposomal Nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies*, **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.** 735, p. 51-62, 1999.
32. GULYAAEV, A.E.; ERMEKBAEVA, B.A.; KIVMAN, G.YA.; RADCHENKO, T.G.; SHERSTOV, A.Y.; SHIRINSKII, V.G. *Nanoparticles as a vector for the direct delivery of antibiotics*, **Pharm. Chem. J.** 32, p. 115-119, 1998.
33. GUO, C.; THOMAS, R.N. *Polymer-coated nanospheres containing ionic salts, useful for labeling antibodies for use in immunoassays*, **Pat. US6177088-B1**, 2001.
34. HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. **Thermal Analysis and Applications to Polymer Science**. 2 ed. Chichester: Wiley, 1999.
35. HELRICH, C. S.; SCHMUCKER, J. A.; WOODBURY, D. J. *Evidence that nystatin channels form at the boundaries, not the interiors of lipid domains*. **Biophys J.** 91, p. 1116-1127, 2006.
36. HIEMENZ, J.W.; WALSH, T.J. *Lipid formulations of Amphotericin B: recent progress and future directions*, **Clin. Infect. Dis.** 22(Suppl 2), p S133–S144, 1996.
37. JAKUBOWSKI, H. *Byochemistry on line: Na approach base don chemical logic, Chapter 1 – Lipid Structure*. Disponível em <http://employees.csbsju.edu/.../olddynamicyes.html>. Acesso em 19jul07.
38. JOHNSON, E.M.; OJWANG, J.O.; SZEKELY, A.; WALLACE, T.L.; WARNOCK,

- D.W. *Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystati, with those of four Amphotericin B formulations.* **Antimicrob. Agents Chemother.** 42, p. 1412-1416, 1998.
39. LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
40. LACKMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.
41. LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 2ed. New York: Kluwer Academic, 1999.
42. LASIC, DD. **Liposomes: from physics to applications**, 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1993.
43. LAZZARINI DE OLIVEIRA, L.C.; ARANTES, A.A.; CAIUBY, M.J. *Utilidade da investigação rotineira de infecção fúngica pela broncoscopia em pacientes infectados ou não pelo HIV em um hospital geral, referência para SIDA*, **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical** 32, p. 255-261, 1999.
44. LEIBOVITZ, E. *Neonatal candidosis: clinical picture, management, controversies, consensus, and new therapeutic options*, **J. Antimicrob. Chemother.** 49, p. 69-73, 2002.
45. MANWARING, D.G.; RICKARDS, R.W. *The structure of the aglycone of the macrolide antibiotic Nystatin*, **Tetrahedron Lett.** 60, p. 5319-5322, 1969.
46. MAZÓN, A.; SALVO, S.; VIVES, R.; VALCAYO, A.; SABALZA, M.A. *Estudio etiológico y epidemiológico de las dermatofitosis en Navarra (España)*, **Rev. Iberoam. Micol.** 14, p. 65 - 68, 1997.
47. MEHTA, R.T.; HOPFER, R.L.; GUNNER, L.A.; JULIANO, R.L.; LOPEZ-BERESTEIN, G. *Formulation, toxicity, and antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated Nystatin as therapeutic agent for systemic candidiasis*, **Antimicrob. Agents Chemother.** 31, p. 1897-1900, 1987.
48. MEHTA, R.T.; HOPFER, R.L.; MCQUEEN, T.; JULIANO, R.L.; LOPEZ-BERESTEIN, G. *Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated Nystatin for systemic fungal infections*, **Antimicrob. Agents Chemother.** 31, p. 1901-1903, 1987.
49. MICHEL, G.W. **Analytical profiles of drug substances**, 1ed. New Jersey: Academic Press, 6, 1972.
50. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - Guia de Bolso 5ªed.

- Ampliada. Doenças Infecciosas e Parasitárias Série B. Textos Básicos de Saúde, Brasília, 2005. disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_bolso_5ed2.pdf. Acesso em 16Set06.
51. MINODIER, P.; RETORNAZ, K.; HORELT, A.; GARNIER, J. M. *Liposomal Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients*, **Fundam. Clin. Pharmacol.** 17, p. 183-188, 2003.
52. MITCHELL, A.P. *Molecular genetics of meiosis and its regulation in yeast*. Disponível em: <http://www.cumc.columbia.edu/research/Faculty_Profiles/profiles/mitchell_ap.htm> Acesso em 03Set06.
53. MORIBE, K.; MARUYAMA, K. *Pharmaceutical design of the liposomal antimicrobial agents for infectious disease*, **Cur. Pharm. Design** 8, p. 441-454, 2002.
54. MORIBE, K.; MARUYAMA, K.; IWATSURU, M. Spectroscopic investigation of the molecular state of Nystatin encapsulated in liposomes, **Int. J. Pharm.** 201, p. 37-49, 2000. NASCIMENTO, J.S. Dermatomicose. Disponível em <http://ib.ufpel.edu.br/dermatomicose.pdf>. Acesso em 16Jul06.
55. NCCLS. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; NCCLS document M27-A (ISBN 1-56238-328-0), The National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania, 1997.
56. NEGRONI, R., *Micosis asociadas al SIDA*. Disponível em <http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeOcho/Articulos/Micologia/ArchivosPDF/Micologia.PDF>. Acesso em 28Ago06.
57. NEW, R.R.C. **Liposomes - A Practical Approach**, 1ed. New York: Oxford Univ. Press, 1990.
58. NG, A.W.K.; WASAN, K.M. *Develpoment in liposomal polyene antibiotics: an historical perspective* **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 6, p. 67-83, 2003.
59. OAKLEY, K.L.; MOORE, C.B.; DENNING, D.W. *Comparison of in vitro activity of liposomal Nystatin against Aspergillus species with those of Nystatin , Amphotericin B (AB) deoxycholate, AB colloidal dispersion, liposomal AB, AB lipid complex, and itraconazole*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43. p.1264-1266, 1999.
60. OFFNER, F.; KRCMERY, V.; BOOGAERTS, M.; DOYEN, C.; ENGELHARD, D.; RIBAUD, P.; CORDONNIER, C.; PAUW, B.; DURRANT, S.; MARIE, J.-P.; MOREAU, P.; GUIOT, H.; SAMONIS, G.; SYLVESTER, R.; HERBRECHT, R. The EORTC invasive fungal infections group; *Liposomal Nystatin in patients with invasive Aspergillosis refractory to or intolerant of Amphotericin B*, **Antimicrob.**

Agents Chemother. 48, p. 4808-4812, 2004.

61. PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K.; *Cadeia Farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas.* Disponível em: <http://www.sbgrio.sbg.org.br/download/set1801.pdf> . Acesso em : 21Mai06.
62. PAPAHA DJOPOULOS, D.; WATKINS J.C. *Phospholipid model membranes. II- Permeability properties of hydrated liquid crystals*, **Biochim. Biophys. Acta** 135, p. 639-652, 1967.
63. PAWLAK, J.; TABIN, P.; SOWINSKI, P.A.; BOROWSKI, E. *The structure of Nystatin A2*, **Polish J. Chem.** 79, p. 1673-1679, 2005.
64. PELCZAR, M., KRIEG, N.R., CHAN, E.C.S. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996.
65. PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. **Microbiologia**, 1 ed. São Paulo: McGraw-Hill, v. 1, 1980.
66. PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.,T. **Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**, 2ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
67. PIOVERSAN, E., HIDALGO, A.A., MARLETTA, a., VEGA, M. L. *Influência da espessura nas propriedades de absorção e emissão e na morfologia de filmes automontados de poli (p-fenileno vinileno)*, **Quím. Nova** 29 (5), p. 916-921, 2006.
68. POROWSKA, N.; HALSKI, L.; PLOCIENNIK, Z.; KOTIUSZKO, D.; MORAWSKA, H.; KOWSZYK-CINDIFER, Z.; BOJARSKA-DAHLIG, H. *Composition of Polifungin, a new antifungal agent*, **Rec. Trav. Chim.** 91, p.780-784, 1972.
69. PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO R. **Tecnologia Farmacêutica**, 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v 3, 1996.
70. PUEYO, J.M., SAN MIGUEL, J.G., MARTINEZ, J.A. *Micosis oportunistas.* Disponível em <http://www.sepeap.es/libros/farreras13/SECCION/SEC17.PDF>. Acesso em 19Ago06.
71. QUILITZ, R., MOFFITT H. L. *THE USE OF LIPID FORMULATIONS OF AMPHOTERICIN B IN CANCER PATIENTS.* Disponível em: <https://pubs.cci/v5n5/departament3.html>. Acesso em: 8Set06.
72. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**, tradução da 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
73. RASTOGI, R.; SULTANA, Y.; ALI, A.; AGIL, M. *Particulate and vesicular drug*

- carriers in the management of tuberculosis*, **Cur. Drug Deliv.** 3, p. 121-128 , 2006.
74. RICKARDS, R.W.; CHONG, C.N. *Macrolide antibiotic studies. The structure of Nystatin* , **Tetrahedron Lett.** 59, p. 5145-5148, 1970.
75. RUBIO, M.C.; REZUSTA, A.; TOMÁS, J.G.; RUESCA, R.B. *Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano*, Rev. **Iberoam. Micol.** 16, p. 16-22 , 1999.
76. SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. *Lipossomas: a bala mágica acertou?*, **Quím. Nova** 25 (6B), p. 1181-1185, 2002.
77. SHARATA, H.H.; KATZ, K.H. *Liposomes*, Int. J. Dermatol. 35, p. 761-769, 1996.
78. SHENIN, Y.D.; BELAKHOV, V.V.; ARAVIISKII, R.A. *Nystatin: methods of preparation, search for derivatives, and prospects for medicinal use*, **Pharm. Chem. J.** 27, p. 84-92, 1993.
79. SMALL, D.M. **Handbook of Lipid Research: The Physical Chemistry of Lipids, from alkanes to phospholipids**, v. IV, New York: Plenum Press, 1986.
80. STORM, G., CROMMELIN, J.A. *Liposomes: quo vadis?*, **Pharm. Sci. Technol. Today** 1, p. 19-31, 1998.
81. SWATEK, F. E. **Textbook of Microbiology**, Saint Louis: The C. V. Mosby Cpmpany, 1967.
82. TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1984.
83. THOMAS, A.H., PHARM. B., NEWLAND, P., QUINLAN, G.J. **J. Chromatogr.** 216, p. 367-373, 1981.
84. TORCHILIN, V. P. *Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers*, **Nat. Rev. Drug Discov.** 4, p. 145-160, 2005.
85. TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Introducción a la Microbiología**, 3ed. Zaragoza: Acribia, 1993.
86. TYLE, P. **Drug Delivery Device: Fundamentals and Applications**, New York: Marcel Dekker, 1988.
87. **United States Pharmacopeia National Formulary, Supplement 2, (USP24-NF19)**, Microbiological test, <71> sterility test 1999.
88. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Disponível em

- <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/micose.pdf>. Acesso em 03Jul06.
89. UNIVERSIDADE FEDERAL de SANTA CATARINA, Engenharia Química. Disponível em http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_micr_oorg/fungos.htm. Acesso em 16Jul06.
90. VARGAS, R.A.; ALVAREZ, L.G.; RUESGA, M.T.; MUNÓZ, A.J.C.; MAZUELOS, E.M.; WALLACE, T.L.; COSSUM, P.A.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. *In vitro* activity of a liposomal Nystatin formulation (Nyotran) against *Cryptococcus neoformans*, **Rev. Iberoam. Micol.** 17, p. 90-92, 2000.
91. VASIR, J.K., REDDY, M.K., LABHASETWAR, V.D. *Nanosystems in drug targeting opportunities and challenges*, **Cur. Nanoscience** 1, p. 47-64, 2005.
92. WASAN, K.M.; RAMASWAMI, M.; CASSIDY, S.M.; KAZEMI, M.; STROBEL, F.W.; THIES, S.L. *Physical characteristics and lipoprotein distribution of liposomal Nystatin in human plasma*, **Antimicrob. Agents Chemother.** 41, p.1871-1875, 1997.
93. ZAITZ, C., CAMPBELL, I., MARQUES, S. A., RUIZ, L.R.B., SOUZA, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**, 1 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998.
94. ZEICHNER, L.O.; BAZEMORE, S.; PAETZNICK, V.L.; RODRIGUEZ, J.R.; CHEN, E.; WALLACE, T.; COSSUM, P.; REX, J.H. *Differential antifungal activity of isomeric forms of Nystatin*, **Antimicrob. Agents Chemother.** 45, p. 2781-2786, 2001.
95. ZIELINSKY, J.; GOLIK, J.; PAWLAK, J.; BOROWSKI, E. *The structure of Nystatin A3, a component of Nystatin complex*, **J. Antibiotics** XLI, p. 1289-1291, 1987.
96. ZIELINSKY, J.; JERECZEK, E.; SOWINSKI, P.; FALKOWSKI, L.; RUDOWSKI, A.; BOROWSKI, E. *The structure of a novel sugar component of polyene macrolide antibiotics: 2,6-dideoxy-L-ribohexopyrane*, **J. Antibiotics**. 32, p. 565-568, 1979.
97. ZOTCHEV, S.B. *Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy*, **Curr. Med. Chem.** 10, p. 211-223, 2003