

LUCIANO DA RESSURREIÇÃO SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E
PULMONARES DE ANFOTERICINA B (AMB) ESTRUTURADA EM
POLÍMERO BIODEGRADÁVEL DE ÁCIDO POLILÁTICO-
POLIGLICÓLICO (PLGA) REVESTIDO COM ÁCIDO
DIMERCAPTOSSUCCÍNICO (DMSA)**

BRASÍLIA, 2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCIANO DA RESSURREIÇÃO SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E
PULMONARES DA ANFOTERICINA B (AMB) ESTRUTURADA EM
POLÍMERO BIODEGRADÁVEL DE ÁCIDO POLILÁCTICO-
POLIGLICÓLICO (PLGA) REVESTIDO COM ÁCIDO
DIMERCAPTOSSUCCÍNICO (DMSA)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade de Brasília.

Orientador: Professor Dr. Ricardo Titze de Almeida

Co-orientadora: Professora Dra. Maria de Fátima Borin

BRASÍLIA

2010

LUCIANO DA RESSURREIÇÃO SANTOS

INVESTIGAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E PULMONARES DA ANFOTERICINA B (AMB) ESTRUTURADA EM POLÍMERO BIODEGRADÁVEL DE ÁCIDO POLILÁTICO-POLIGLICÓLICO (PLGA) REVESTIDO COM ÁCIDO DIMERCAPTOSSUCCÍNICO (DMSA)

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 09 de Abril de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, FAV/UnB

Profa. Dra. Andrea Barreto Motoyama

Faculdade de Ciências da Saúde, FS/UnB

Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Faculdade de Ciências da Saúde, FS/UnB

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

Faculdade de Ciências da Saúde, FS/UnB

Dedico este trabalho aos pacientes hospitalizados ou não de todo o Brasil.

Dedico este trabalho a José e Alzira (meus pais), aos meus irmãos, à minha avó, aos meus alunos e ex-alunos e aos professores dos Cursos de Ciências da Saúde/UnB que diretamente ou indiretamente inspiraram-me na execução deste projeto de pesquisa. Dedico também aos pacientes que, são, neste contexto, a maior justificativa para a investigação pré-clínica de um fármaco em uma formulação nanoestruturada que possa trazer benefício terapêutico com menor risco de reações adversas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ricardo Titze de Almeida, pela educação, paciência, oportunidade que se fez multiplicar em várias outras oportunidades, pela compreensão em tantos momentos difíceis, pela riqueza de conhecimentos, pelas habilidades científicas desenvolvidas e aprendidas durante o curso e, principalmente pela aula do dia 22/03/1996 no auditório 1 (um) do ICB/UFG, às 14h00, sobre Farmacocinética, que foi, a primeira de todas as aulas dele que assisti. Aula da Saudade, que ficou marcada e que me trouxe a este curso de mestrado. Lembro e registro aqui, sua disciplina ofertada no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Biotecnologia Aplicada à Farmacologia, que representou um avanço em meus conhecimentos voltados para a prática experimental científica.

À profa. Dra. Maria de Fátima Borin e ao prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni pela co-orientação. À profa. Dra. Maria de Fátima Borin pela educação, simpatia, suavidade e serenidade no trato com os alunos e pelos bons conselhos durante os meus momentos difíceis. Ao prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni por abrir “estradas” na trajetória inicial dos experimentos de identificação de anfotericina B.

Ao Lucio da Ressurreição Santos (farmacêutico da Indústria Farmacêutica do Estado de Goiás/IQUEGO) que ensinou-me muito sobre o manejo do cromatógrafo para CLAE, dedicando vários dos seus finais de semana e feriados a viajar para Brasília na intenção de monitorar-me. Meu honroso muito obrigado a ele, que, além de dedicado farmacêutico, é um dos meus quatro irmãos que tiveram paciência em ouvir minhas angústias e minhas vitórias no decorrer desta pesquisa (Lucilene, Lucio, Luciana, Luzio).

Aos meus pais, José da Ressurreição e Alzira da Ressurreição Santos, que me apoiaram sempre, em todos os sentidos, da maneira mais verdadeira e gratificante que um ser humano pode fazer, cuidando com amor e reparos. Também agradeço à minha única avó, Jobelina Izaura dos Santos que, nunca rezou tanto quanto durante o mestrado, para que eu pudesse almejar a vitória e disseminar o sentimento de alegria a tantos que dela necessitam. Agradeço à minha tia, que desde a minha infância se fez presente, Maria Marta Izaura dos Santos Araújo.

À professora Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca que sempre nos atendeu prontamente na solução de dúvidas, aconselhando e sugerindo contribuições. Agradeço também pelo inestimável apreço e ainda por nos ter cedido espaço no Laboratório de Imunopatologia/FS/UnB.

Ao prof. Dr. Antônio Carlos Tedesco, pela valorosa contribuição científica na formulação das nanocápsulas contendo anfotericina B.

À profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe, por creditar em nós, vários votos de confiança e por seus ensinamentos quanto ao preparo de pesquisadores frente aos desafios no mundo científico. Para ela, meu fraterno e eterno apreço – sua frase dita no primeiro dia que a conheci (em uma reunião com os pesquisadores e docentes da Rede de Nanotecnologia, no ICC/UnB) ficará comigo sempre: - “... nós (eles) começamos do nada, não tínhamos quase nada de concreto quando idealizamos desenvolver uma nova preparação com anfotericina B, por isso, vocês estão recebendo um ouro para trabalharem, se dediquem e gerem dados...” Espero professora, ter respondido à altura, pois, todas as minhas tentativas se pautaram naquela frase dita em 2006...!

Ao professor Dr. João Estevam Giunti Ribeiro, à professora Dra. Andréa Barreto Motoyama, ao professor Dr. Radif Domingos, à professora Dra. Damaris Silveira, por acreditarem no meu potencial e responsabilidade em assumir a docência universitária, meu grande ganho.

Às professoras Msc. Luiza Cristina Lacerda Jacomini, Msc. Tânia Maria da Silva Ferreira e Dra. Renata Mazzaro Costa (DCIF/ICB/UFG) por guiarem meu maior objetivo, por mostrarem o caminho da perseverança, por terem segurados em minhas mãos e por estarem indicando sempre, a luz no final do túnel. São, para sempre, minhas educadoras, meu norte e, também, razões importantes da minha felicidade.

Ao professor Dr. Edgar Merchan-Hamann, da disciplina de Epidemiologia Clínica, pela atenção, sabedoria e por ensinar-me a resolver as dificuldades da vida com mais otimismo; aos professores Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz e Dra. Marília Barros, da disciplina de Neurobiologia da Memória, pela habilidade de ensinar de forma encantadora o fortalecimento das sinapses por meio da manipulação farmacológica dos neurônios glutamatérgicos e do sistema endocanabinóide. Estendo o meu agradecimento aos professores das disciplinas de Bioética (professor Dr. Volnei Garrafa), Farmacologia de Produtos Naturais (professora Dra. Vânia), Farmacologia Molecular (professores Dr. Francisco de Assis Rocha Neves, Luís Alberto Simeoni, Dra. Marie Togashi), Epidemiologia Clínica (professor Dr. Edgar Merchan-Hamann) e Problemas Clínico-patológicos da Visão em Diabetes (professor Dr. Procópio) que foram ofertadas nos 1º e 2º. Semestres do ano letivo de 2008 pela pós-graduação em Ciências da Saúde/UnB.

Aos funcionários e técnicos dos Laboratórios de Farmacologia Molecular - Farmol/UnB - Rilva, Elaine, Anderson, Microbiologia e Biotecnologia Molecular - MMB/UnB - e do Laboratório de Biologia Molecular - Biomol/UnB.

Ao Dr. Rafael Rocha de Andrade, médico-veterinário do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, por todo apoio, sensibilidade, dedicação e atenção a mim conferido em todos os momentos deste trabalho que envolveu o manejo cirúrgico dos animais de laboratório (camundongos Balb/c).

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunopatologia (Ana Camila, Cecília, Janaína, Alice, Hugo, Isaque), do Laboratório de Farmacologia Molecular (Sócrates, Silas, Cíntia, Paloma, Angélica), do Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia (Ana Paula Paiva de Faria, Linus de Queiroz Pereira, Diego Batista Xavier, Mariana de Fátima Gois Cesar), do Laboratório de Biologia Molecular (André Corrêa Amaral), do Laboratório de Genética (Danielle Guedes), do Laboratório de Virologia Molecular (Fabrício), do Laboratório de Morfologia e Morfogênese (Patrícia Cunha), pela amizade e incentivo no decorrer do Curso. Ao Dario Righi, que sempre dizia, termina logo essa dissertação, Luciano! Terminei, Dario. Obrigado pelo apoio.

Um agradecimento fraterno e honroso à Angélica Amorim Amato que sempre esclareceu minhas dúvidas quanto à Farmacologia das Doenças Endócrinas, além dos belíssimos e sábios conselhos, e, é claro, da companhia no Laboratório durante os inúmeros feriados e finais de semana. Como sempre disse, seu nome é “Anja”!

Aos professores que atuam no Hospital Universitário de Brasília, Dr. Hervaldo Carvalho Sampaio (professor de Cardiologia), Dra. Érica Negrini Lia (professora de Farmacologia), Dra. Janeth de Oliveira Silva Naves (professora de Assistência Farmacêutica), Dr. Rogério (professor de Pneumologia) que foram inspiração e incentivo decisivos para o meu empenho na docência e na pesquisa. Um agradecimento especial às professoras Janeth e Érica por acreditarem piamente na minha competência como professor universitário.

Aos colegas de trabalho, professora Nádia Cristina (UNIP-Campus Brasília) e professora Ellen Tanus Rangel (UCB).

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, se fizeram importantes durante a execução desta pesquisa.

“O ser humano apresenta dois tipos de vaidade. Uma que é a vaidade fisiológica e necessária para o desenvolvimento da humanidade. Porém existe em algumas pessoas a vaidade patológica, que expressa a seguinte idéia: se não fui eu quem fez, provavelmente não presta”.

(Professor Décourt)

RESUMO

O presente trabalho avaliou a utilização e validou um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar o antifúngico anfotericina B (AMB) em amostras de plasma e pulmão de camundongos. Este método foi utilizado para quantificar os níveis de AMB em amostras teciduais obtidas de animais tratados com um possível sistema de liberação sustentada de AMB, Nano-D-AMB (NanoAnf), baseado em misturas de polímeros de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e ácido dimercaptossuccínico (DMSA). O protocolo experimental incluiu a extração em fase sólida da AMB, seguido por uma análise por CLAE com detecção UV a 382 nm. Para a separação cromatográfica, utilizou-se uma coluna C18 de fase reversa e uma fase móvel composta por acetonitrila:EDTA 10 mM (40:60, v/v) em pH 4,65. Foi observada resposta linear no intervalo de concentração de 2,25-180 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, com limite de quantificação de 0,68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os desvios padrões relativos dos ensaios intra-dia e inter-dia foram inferiores a 6% ($n = 15$). As taxas de recuperação das extrações variaram de acordo com os tecidos avaliados e com as concentrações utilizadas na fortificação dos mesmos (0,5-5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), obtendo-se valores médios de 74,6% e 61,3% para plasma e pulmões, respectivamente. Os testes de concentração plasmática e pulmonar de AMB foram realizados em camundongos, divididos em 6 grupos de 5 animais, como segue: grupo I (tratado com Nano-D-AMB (NanoAnf), 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia em 24 h); grupo II (tratado com Nano-D-AMB (NanoAnf), 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia em 48 h); grupo III (tratado com Nano-D-AMB (NanoAnf), 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia em 72 h); grupo IV (tratado com Anforicin B[®], 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia em 24 h); grupo V (tratado com Anforicin B[®], 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia em 48 h); grupo VI (tratado com Anforicin B[®], 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia em 72 h). As concentrações plasmáticas de AMB nos tempos 24 h, 48 h, e 72 h foram superiores nos grupos tratados com Nano-D-AMB (NanoAnf) ($2,04 \pm 0,51$; $2,31 \pm 0,57$; $1,85 \pm 0,46$, respectivamente) em relação àqueles tratados com Anforicin B[®] ($1,16 \pm 0,19$; $1,41 \pm$

0,56; $1,32 \pm 0,41$, respectivamente) ($p < 0,05$, Mann-Whitney test). Quanto aos níveis pulmonares, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos. Para ambas as preparações, verificou-se um pico de concentração tecidual de AMB após 48 h de tratamento, apesar da diferença não apresentar significância estatística. Concluindo, o presente estudo avaliou um protocolo de CLAE exato e preciso para determinação de AMB no plasma e pulmões de camundongos. A preparação nanoestruturada de AMB, Nano-D-AMB (NanoAnf), apresentou níveis plasmáticos superiores ao longo do tempo, o que pode sugerir um fenômeno de liberação sustentada do fármaco a partir das estruturas poliméricas de PLGA e DMSA.

ABSTRACT

The present work was aimed to validate a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for measuring amphotericin B (AMB) concentrations in murine plasma and lung samples. This method was used to quantify the levels of AMB in tissue samples obtained from animals treated with a desoxycholate amphotericin sustained delivery system based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) polymeric blends (Nano-D-AMB). The experimental protocol includes the solid-phase extraction of AMB followed by HPLC analysis with UV detection at 382 nm. For chromatographic separation, we used a C18 reversed-phase column and a mobile phase composed by acetonitrile:EDTA 10 mM (40:60, v/v) at pH 4.65. A linear response was observed in the concentration range of 2.25-180 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, with a limit of quantification of 0.68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The intra-day and inter-day relative standard deviations (R.S.D.) were less than 6% ($n=15$). The extraction recovery rates varied according to the tissue and the spiked concentrations used (0.5-5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); the recovery rates were 74.6% and 61.3% for plasma and lungs, respectively. For testing the AMB levels in lungs and plasma of treated mice, the animals were randomly divided into six groups of 5 animals as follows: group I (treated with Nano-D-AMB 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., euthanized at 24 h); group II (treated with Nano-D-AMB, 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., euthanized at 48 h); group III (treated with Nano-D-AMB, 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., euthanized at 72 h); group IV (treated with Anforicin B[®], 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., euthanized at 24 h); group V (treated with Anforicin B[®], 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., euthanized at 48 h); group VI (treated with Anforicin B[®], 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., euthanized at 72 h). Nano-D-AMB provided higher AMB concentrations in plasma at 24 h, 48 h, and 72 h (2.04 ± 0.51 ; 2.31 ± 0.57 ; 1.85 ± 0.46 , respectively) than Anforicin B[®] (1.16 ± 0.19 ; 1.41 ± 0.56 ; 1.32 ± 0.41) ($p < 0.05$, Mann-Whitney test). However, no significant differences were found in the pulmonary levels for all period of time tested. Although the level of AMB has showed a peak at 48 h after treatment, no significant differences were found along of the time intervals for both tested preparations. In conclusion, this study evaluated a HPLC protocol that provided an accurate and precise method to measure AMB concentrations in murine plasma and lung samples. The nanostructured preparation of AMB named Nano-D-AMB showed a marked increase in plasma concentration over the time, which could reflect a sustained drug releasing behavior from the PLGA and DMSA polymeric blends.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	anfotericina B (enquanto fármaco de qualquer formulação)
AMB/Sigma-Aldrich	desoxicolato de anfotericina B 45%, padrão, Sigma-Aldrich
Anforicin B	medicamento de referência, do Laboratório Cristália
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DMSA	ácido dimercaptossuccínico
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
I.P.	injeção por via intraperitoneal
Nano-D-AMB (NanoAnf)	anfotericina B nanoestruturada em PLGA/DMSA
PLGA	polímero biodegradável de ácido poli-(lático-co-glicólico)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 NANOESTRUTURAÇÃO DE FÁRMACOS	01
1.1.1 Inovação Tecnológica na Indústria Farmacêutica	01
1.1.2 Características das Nanoestruturas Compostas de Polímeros Biodegradáveis de PLGA	04
1.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	06
1.2.1 Objetivos da Validação de Metodologia Analítica	06
1.2.2 Critérios de Validação e Requisitos da Metodologia Validada	07
1.2.2.1 Especificidade e Seletividade	07
1.2.2.2 Linearidade	08
1.2.2.3 Faixa de Linearidade	08
1.2.2.4 Precisão	09
1.2.2.5 Limite de Detecção	10
1.2.2.6 Limite de Quantificação	11
1.2.2.7 Exatidão	11
1.2.2.8 Robustez	12
1.3 IMPORTÂNCIA DA ANFOTERICINA B (AMB) NO TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS	13
1.3.1 Características Gerais e Mecanismo de Ação da Anfotericina B	13
1.3.2 Uso da Anfotericina B no Tratamento das Doenças Fúngicas	14
1.3.3 Efeitos Adversos e Toxicidade da Anfotericina B	15

1.3.4 Formulações Contendo Anfotericina B e Aspectos Farmacocinéticos (Sistemas de Entrega de Fármacos)	16
1.3.5 Formulações Nanoestruturadas de Anfotericina B	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 FÁRMACOS E REAGENTES	20
3.2 EQUIPAMENTOS E OUTROS MATERIAIS	20
3.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	20
3.3.1 Espectro de Absorbância por Varredura da Anfotericina B e do Piroxicam em Metanol	21
3.3.2 Determinação Quantitativa de Anfotericina B e de Piroxicam por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	21
3.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	22
3.4.1 Preparo das Soluções Padrão	22
3.4.2 Linearidade	23
3.4.2.1 Curva de Calibração	23
3.4.3 Avaliação da Precisão dos Ensaios	24
3.4.3.1 Precisão Intra-Ensaio – Repetibilidade	24
3.4.3.2 Precisão Inter-Ensaio – Precisão Intermediária	25
3.4.4 Limites de Quantificação e de Detecção	25
3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS	26
3.5.1 Tratamento e Análise Cromatográfica dos Tecidos	27

3.6 AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO – EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO	29
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4 RESULTADOS	31
4.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISES DA ANFOTERICINA B E DO PIROXICAM	31
4.1.1 Linearidade	31
4.1.2 Especificidade	33
4.1.3 Limites de Detecção e Quantificação	34
4.1.4 Exatidão e Precisão	35
4.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO - EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO	38
4.3 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E PULMONARES DE ANFOTERICINA B APÓS TRATAMENTO COM NANO-D-AMB (NANOANF) (6 mg · kg ⁻¹ , i.p.) E COM ANFORICIN B [®] (6 mg · kg ⁻¹ , i.p.)	40
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	53
7 PERSPECTIVAS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ANEXOS:

DECLARAÇÃO DE AVALIAÇÃO E APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ
DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA), DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(IB) DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB).

1 INTRODUÇÃO

1.1 NANOESTRUTURAÇÃO DE FÁRMACOS

1.1.1 Inovação Tecnológica na Indústria Farmacêutica

Já é vasto o conhecimento na área biofarmacêutica, de inovações farmacotécnicas com o intuito de melhorar as características farmacocinéticas de medicamentos utilizados no tratamento de enfermidades diversas. Recentemente, o fármaco venlafaxina, um inibidor da recaptção neuronal de serotonina e noradrenalina nos núcleos da rafe e do lócus ceruleus, foi formulado sob duas formas farmacêuticas, o comprimido e a cápsula gelatinosa de liberação controlada. O uso desta cápsula levou a uma otimização do tratamento dos transtornos do humor, tais como depressão maior, uma vez que a cápsula garante uma liberação sustentada do fármaco ao longo de 24 horas. Além disso, minimiza reações adversas que são freqüentes com o comprimido de venlafaxina (náuseas, vômitos, mal-estar gástrico). Outro exemplo, ainda, pode ser o uso do fármaco ácido acetilsalicílico em um comprimido de liberação entérica, a fim de minimizar reações adversas por contato direto do fármaco com a mucosa gástrica. Neste caso, não é uma solução, mas uma das formas de reduzir, parcialmente, danos à mucosa gástrica (1).

A tecnologia farmacêutica também tem se valido das descobertas ocorridas no campo da nanotecnologia. O desenvolvimento de moléculas estruturadas em nanopartículas é um campo do conhecimento em franca expansão e altamente promissor do ponto de vista de inovação tecnológica (2). Mediante a vinculação de fármacos a nanopartículas, podem-se obter novas formas de liberação no organismo, os denominados sistemas de liberação modificada de fármacos (*drug delivery systems*). Assim, dosagem e reações adversas destes

medicamentos nanoestruturados poderiam ser reduzidas. Além disso, outras vantagens farmacocinéticas poderiam ser alcançadas, como a melhor biodisponibilidade, através da formulação das moléculas em nanossuspensões cristalinas ou em nanopartículas orgânicas ou lipídicas que poderiam, também, permanecer na circulação por maiores períodos de tempo (3).

Uma das contribuições da nanobiotecnologia para novas formulações de medicamentos é a possibilidade de serem gerados sistemas funcionais de liberação de fármacos na escala nanométrica, tais como a nanoestruturação do fármaco voriconazol (4, 5, 6). Quando um fármaco é nanoestruturado, as suas características farmacocinéticas podem ser modificadas de modo a melhorar a sua resposta farmacológica (7, 8). Estes sistemas podem ser desenvolvidos de modo a agregar um fármaco para otimizar a farmacoterapia, permitindo inclusive, diminuir o esquema posológico, ou seja, reduzir o número de administrações diárias do medicamento. Uma vez administrados em organismos vivos, liberam o fármaco de maneira gradual e lenta, caracterizando, assim, um sistema de liberação sustentada de fármacos (9, 10, 11). Esta forma de liberação permite que o fármaco permaneça por um maior período de tempo no organismo sem ser biotransformado, havendo um aumento da biodisponibilidade do fármaco, diferente do que aconteceria com as formulações convencionais (12, 13).

A utilização destes sistemas de liberação de fármacos tem apresentado resultados importantes no sentido de reduzir as reações adversas de diversos medicamentos. Estudos mostraram que a aplicação do antineoplásico paclitaxel, por exemplo, em sistemas de liberação sustentada e em doses superiores à tolerável, não apresentou toxicidade nem aumento de outros eventos adversos quando testado em modelo animal para o tratamento de câncer de ovário (14).

Quanto à terapêutica das doenças infecciosas, particularmente as micoses sistêmicas, há também grande interesse tecnológico em novas formulações medicamentosas. Dentre estas doenças fúngicas sistêmicas, destacam-se as seguintes: aspergilose, candidíase, histoplasmose, criptococose que apresentam urgência no desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos com formulações farmacêuticas inovadoras, pois são preocupantes os casos de resistência aos antifúngicos nas diversas regiões geográficas do mundo.

Na América Latina, a paracoccidiodomicose é considerada doença fúngica sistêmica relevante, inclusive porque os pacientes infectados encontram-se na fase mais produtiva da vida, sendo que a doença leva a impacto social e econômico. A frequência destas infecções aumentou significativamente nas últimas décadas e as principais causas deste aumento são a imunodepressão causada em pacientes submetidos a transplantes, ao uso de antineoplásicos e acometidos pela AIDS e são consideradas com a causa principal da morte destes pacientes. A incidência de paracoccidiodomicose em zonas endêmicas varia de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes ao ano. Dados do Ministério da Saúde atestam que 3.181 casos de óbito por paracoccidiodomicose foram registrados no Brasil entre 1980 a 1995, resultando numa taxa de mortalidade por paracoccidiodomicose de 1,45 casos por milhão de habitantes (15).

Neste sentido, várias estratégias estão sendo pesquisadas e desenvolvidas para a obtenção de novos e eficientes tratamentos farmacológicos; dentre as quais pode ser citada a aplicação da nanobiotecnologia na preparação de formulações inovadoras (12, 16).

A nanoestruturação de antifúngicos tem se mostrado uma alternativa muito promissora no desenvolvimento de novas formulações medicamentosas. A AMB (anfotericina B) é um exemplo bem sucedido dos benefícios obtidos com formulações nanoestruturadas, sendo que a redução das graves reações adversas causadas com o uso deste fármaco é o principal deles (17, 18, 19, 20). Formulações em lipossomas (nome comercial Ambisome[®]), preparações em

complexos lipídicos (Abeltec[®]) ou ainda as dispersões coloidais (Amphotec[®] ou Amphocil[®]) já estão em fase de estudos pré-clínicos, sendo que, algumas delas, como Ambisome[®], encontram-se disponíveis para o uso clínico (21). Apesar dos benefícios alcançados com estas nanoestruturas, o custo do medicamento nanoestruturado ainda é elevado se comparado com a formulação convencional para este fármaco (desoxicolato de AMB, especialidades farmacêuticas Fungizone[®] e Anforicin B[®]). Entretanto, ainda que seja elevado o custo destes novos medicamentos, é preciso ressaltar que têm sido notada uma redução das reações adversas e do tempo de internação dos pacientes, o que acaba por reduzir os custos indiretos decorrentes de internações hospitalares (46). Também já foram desenvolvidos outros antifúngicos, a exemplo da própria anfotericina B, como o fluconazol e o voriconazol, estruturados em nanopartículas poliméricas compostas por PLGA (polímero biodegradável de ácido polilático-co-glicólico) que demonstraram eficácia em terapêutica experimental pois as formulações demonstraram propriedades de sistemas carreadores dos fármacos citados anteriormente (17, 19, 22, 23, 24, 25). Nanopartículas baseadas em PLGA apresentam várias vantagens tecnológicas, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, liberação sustentada e segurança, conforme será abordado posteriormente (17, 26).

1.1.2 Características das Nanoestruturas Compostas de Polímeros Biodegradáveis de PLGA

Diversos compostos têm sido empregados para o preparo de sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos, tais como quitosana, alginato e PLGA (17, 19, 27).

Os sistemas poliméricos para a liberação controlada de fármacos constituem-se em moléculas orgânicas de alta massa molecular formados, em geral, por mais de 50 monômeros.

Ao se agregarem em um padrão regular, formam uma matriz ou reservatório onde o fármaco estará inserido (28). A liberação do fármaco é facilitada pela dissolução gradual da matriz e é controlada pela solubilidade e porosidade da mesma (13).

Dentre os polímeros biodegradáveis, a combinação do ácido poli-(lático-co-glicólico) (PLGA) é uma das mais utilizadas para a preparação de sistemas de liberação sustentada de fármacos, sendo de uso liberado para a administração em humanos (9, 17, 29).

O ácido poli-(lático-co-glicólico) (PLGA) é formado por dois polímeros derivados do ácido lático (PLA) e do ácido glicólico (PGA). São estabelecidas ligações do tipo éster, resultando em um poliéster de cadeia alifática. Durante a síntese do PLGA, podem ser definidos o tempo de degradação e a liberação do fármaco incorporado, através da massa molecular, do grau de cristalinidade e da relação entre a quantidade de PLA e PGA usados para a síntese do PLGA (5, 22, 30).

Nanopartículas de PLGA são estruturas poliméricas coloidais carreadoras de fármacos, muito estudadas devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (31). A biodegradação é um termo utilizado para descrever o desgaste dos sistemas poliméricos quando ocorrido *in vivo*. Embora os mecanismos de biodegradação ainda não estejam muito bem descritos, sabe-se que a clivagem da cadeia polimérica ocorre pela hidrólise das ligações ésteres (5, 32, 33). A biodegradação ocorre a partir da matriz polimérica, sendo que a mesma está sujeita às reações de hidrólise. A biodegradação do polímero pode estar limitada à superfície da nanopartícula exposta ao meio e tem início a partir das camadas mais superficiais até atingir o núcleo da nanopartícula (13, 34).

Os produtos resultantes da biodegradação dos copolímeros de PLGA, os quais incluem os ácidos lático e glicólico, são os componentes normais do ciclo de Krebs e são posteriormente biotransformados e excretados como dióxido de carbono e água sem afetar as

funções fisiológicas (28). A degradação dos polímeros ocorre em duas grandes etapas, de modo sintetizado:

1. clivagem da cadeia polimérica por hidrólise (13, 34);
2. perda da integridade da massa resulta no início da fagocitose dos fragmentos do polímero e a hidrólise produz o ácido lático e o ácido glicólico (13, 34).

1.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

1.2.1. Objetivos da Validação de Metodologia Analítica

A técnica analítica utilizada neste trabalho para a detecção e para a quantificação dos fármacos em estudo (analito: anfotericina B; padrão interno: piroxicam) foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), uma vez que permite a realização de bioensaios com maior rapidez, melhor acurácia (especificidade, seletividade) e precisão (representada por ensaios de repetibilidade) (29).

Para utilizar a CLAE na investigação das concentrações plasmáticas e pulmonares de AMB, foi necessário antes, demonstrar que o método de análise era apropriado para o uso e, portanto, validado. Para que um método seja validado, ele deve ser submetido a uma série de averiguações a fim de que possa ser qualificado para o uso em processos analíticos.

A validação analítica tem assumido vasta importância em laboratórios de Controle de Qualidade em todo o mundo. A intenção da validação do método CLAE, utilizado no presente estudo, é demonstrar que ele é adequado para o objetivo, isto é, a determinação quantitativa do fármaco anfotericina B, bem como do fármaco usado como padrão interno neste estudo, piroxicam. O padrão interno piroxicam é um fármaco que foi adicionado aos padrões de

calibração com amostras em concentrações conhecidas e constantes, para controle da determinação da anfotericina B (35, 36, 37).

1.2.2 Critérios de Validação e Requisitos da Metodologia Validada

A validação de um método analítico deve mostrar as características do método e provar que ele é adequado ao seu fim, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos. Portanto, é preciso fornecer evidência objetiva de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.

Durante o processo de validação de um método analítico, devem ser estabelecidas suas características de desempenho, que são: especificidade, seletividade, linearidade, faixa de linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão, precisão e robustez (35,38). Tais parâmetros de validação serão, a seguir, abordados de forma resumida e direcionada à CLAE para a detecção e para a quantificação dos fármacos anfotericina B e piroxicam, utilizados neste estudo.

1.2.2.1 Especificidade e Seletividade

Os termos especificidade e seletividade relacionam-se ao evento de detecção e à confirmação na identificação de fármacos e outros compostos. Estes dois parâmetros demonstram a habilidade que o método possui em responder somente ao analito de interesse (neste caso, anfotericina B), mesmo na presença de outros componentes da amostra, tais como impurezas, produtos de degradação ou metabólitos (35).

A especificidade está relacionada à determinação de somente um composto, tal como anfotericina B, e a seletividade é a capacidade do método em responder e distinguir várias substâncias presentes na amostra.

1.2.2.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade que o método possui de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração dos fármacos na amostra (35). Esta habilidade pode ser representada pela equação de reta $y = ax + b$, sendo y a resposta medida (área sob a curva), x a concentração do fármaco e a inclinação da reta é dada por a , sendo b a sua intersecção. A linearidade é determinada pela análise de, no mínimo, seis concentrações diferentes, em ensaio com triplicatas (35, 36).

O coeficiente de correlação linear r pode ser usado como indicativo da linearidade do método; deve-se construir um gráfico (curva de calibração) mostrando a relação entre a concentração do fármaco e a resposta (área sob a curva). A razão área/concentração deve permanecer constante com a variação da concentração.

A curva de calibração representa a relação entre a resposta do cromatógrafo (área sob a curva) e a concentração conhecida do fármaco. De acordo com as normas recomendadas pela ANVISA, deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco, a qual será utilizada para calcular, através da equação da reta, a concentração dos fármacos nas amostras. Para construir a curva de calibração, são necessárias as cromatografias de, pelo menos, seis concentrações diferentes (35, 38).

1.2.2.3 Faixa de Linearidade

Faixa de linearidade é o conjunto de valores de uma amostragem para os quais se espera que o erro do instrumento de medida (cromatógrafo) esteja dentro dos limites especificados. Na prática, é definida como a faixa de concentração do fármaco na qual o método pode ser aplicado, cujo limite inferior é o próprio limite de quantificação do método e o limite superior depende do cromatógrafo utilizado (38).

Inserida na faixa de trabalho do método, pode haver uma faixa na qual a relação entre a concentração do fármaco (qualquer que seja ele) e a área sob a curva medida é linear e a sensibilidade é praticamente constante. A faixa de linearidade é obtida a partir da construção do gráfico de concentração por resposta (curva de calibração), com pelo menos, seis níveis de concentração, dentro da faixa linear identificada, com verificação da relação da resposta do aparelho com a concentração do analito, isto é, relação área sob a curva versus concentração.

1.2.2.4 Precisão

A precisão é uma medida da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes em condições cromatográficas definidas. É a avaliação da proximidade dos resultados gerados em uma série de medidas obtidas de vários ensaios distintos, mas com condições de cromatografia idênticas de uma mesma amostra (36).

Se expressa a precisão através do desvio padrão ou desvio padrão relativo dos resultados obtidos e, como é dependente da concentração do fármaco, deve ser medida em diferentes níveis de concentração.

Para demonstrar a precisão do método, é necessário realizar e definir as seguintes precisões: intra-ensaio, inter-ensaio e inter-laboratorial (35).

Quando os resultados analíticos são obtidos utilizando-se as mesmas condições de análises e efetuadas por um mesmo analista em um mesmo laboratório, com o mesmo

equipamento dentro de um curto período de tempo, o desvio padrão obtido entre estes resultados é chamado de desvio padrão da repetibilidade e esta situação é conhecida como precisão intra-ensaio ou condições de repetibilidade (precisão *intra-day*). A repetibilidade do método é feita por, no mínimo nove determinações, sendo três concentrações diferentes analisadas em triplicata.

A precisão inter-ensaio, também chamada de precisão intermediária, representa a compatibilidade entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, pelo mesmo analista e mesmo equipamento (cromatógrafo, neste caso) (38). A ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes para a realização dos ensaios analíticos. A precisão inter-ensaio é a melhor indicação da variabilidade de resultados dentro do laboratório, pois requer o desligamento, isto é, a interrupção do funcionamento do cromatógrafo, entre cada um dos ensaios realizados em dias diferentes.

Deste modo, a precisão dos métodos analíticos será expressa como o desvio padrão, desvio padrão relativo – DPR (%) – ou coeficiente de variação – CV (%) – de uma série de medidas (36). A precisão é um parâmetro de validação importante, pois indica a menor diferença possível entre os resultados, bem como, também, a maior diferença que pode ser obtida pelo método utilizado (35).

1.2.2.5 Limite de Detecção

Segundo os critérios estabelecidos pela ANVISA, o limite de detecção é o menor valor de concentração do fármaco presente nas amostras que pode, com alguma certeza estatística, ser detectado, mas não necessariamente quantificado pelo método. Este parâmetro é essencial para medidas obtidas em níveis muito baixos, uma vez que permite a diferenciação entre a

menor concentração do fármaco e o ruído de fundo (também chamado ruído da linha de base) do método.

Recomenda-se que o limite de detecção seja duas a três vezes maior que o ruído da linha de base de um equipamento de cromatografia (35).

1.2.2.6 Limite de Quantificação

Os conceitos de limite de detecção e quantificação são praticamente idênticos, mudando somente as ordens de grandeza das incertezas associadas aos resultados obtidos nestes níveis de concentração, isto é, enquanto o limite de detecção aponta para a menor concentração que pode ser registrada, porém, não necessariamente quantificada com precisão, o limite de quantificação indica a menor concentração do fármaco que pode ser estabelecida com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições cromatográficas experimentalmente estabelecidas (35, 36). O limite de quantificação é obtido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (35).

1.2.2.7 Exatidão

Exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. “É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente; é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro” (35).

A exatidão pode ser realizada através de análises de concentrações do fármaco (AMB ou piroxicam) em comparação às análises de concentrações de material de referência. Os

materiais de referências são comumente denominados padrões de referência ou padrões analíticos (como exemplo, cita-se AMB/Sigma-Aldrich).

De acordo com os critérios de aceitabilidade da ANVISA, a exatidão deve ser determinada em um mesmo ensaio e em ensaios diferentes, sendo que o desvio padrão relativo – DPR (%) – não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admitem desvios menores ou iguais a 20% (35, 36).

1.2.2.8 Robustez

Robustez “é a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos” (35), não alterando resultados frente a estas pequenas alterações.

Caso haja variações que possam eventualmente interferir na produção dos resultados, as mesmas deverão ser controladas e precauções deverão ser incluídas no procedimento, mesmo porque, durante a utilização de um método na rotina de um laboratório de análises, a sua execução não mantém exatamente o mesmo rigor que o utilizado durante o desenvolvimento e a validação.

Os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico, quando se utiliza CLAE, são: variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas cromatográficas, temperatura e fluxo da fase móvel (35, 37, 38).

1.3 IMPORTÂNCIA DA ANFOTERICINA B (AMB) NO TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS

1.3.1 Características Gerais e Mecanismo de Ação da Anfotericina B

AMB é um antifúngico pertencente à classe dos antibióticos poliênicos e é produzida por culturas fermentativas de *Streptomyces nodosus*. As propriedades antifúngicas desta molécula foram identificadas em 1956 e desde então, AMB tem sido o fármaco de eleição para o tratamento da maioria das micoses sistêmicas. Algumas características apresentadas por esta molécula, tais como uma atividade fungicida e raros episódios de resistência, contribuem para o sucesso clínico deste fármaco (39, 40, 41, 42).

Diversos estudos indicam que a membrana plasmática dos fungos representa o sítio-alvo de ação da AMB. Devido à sua natureza anfifílica, a AMB interage com os esteróis formando canais transmembrânicos. Esses canais promovem o efluxo de íons causando a morte da célula (1, 39, 43, 44). Os esteróis são componentes essenciais das membranas biológicas e são responsáveis, dentre outras importantes funções, pela manutenção da estrutura celular. Nos mamíferos, o colesterol é o tipo de esterol mais abundante, enquanto em fungos é o ergosterol. A estrutura química da AMB favorece uma ligação preferencial pelo ergosterol em relação ao colesterol (1, 45). Ensaio de modelagem molecular *in silico* demonstraram o surgimento de canais formados pela interação por ligações de hidrogênio de oito moléculas de AMB com oito moléculas de ergosterol, através de seus grupos amino e carboxílicos (45).

1.3.2 Uso da Anfotericina B no Tratamento das Doenças Fúngicas

As infecções fúngicas, notadamente as sistêmicas, como a candidíase, aspergilose e paracoccidioidomicose, podem resultar em quadros clínicos acompanhados de importantes reações adversas aos tratamentos farmacológicos convencionais. A incidência destas doenças tem aumentado na população, principalmente nos grupos de pacientes imunodeprimidos – síndrome da imunodeficiência adquirida, transplantados e tratados com glicocorticóides (39, 46).

Estas infecções sistêmicas, caracterizadas pelo envolvimento de múltiplos órgãos, são as que contribuem de modo mais relevante para o aumento do número de mortes em decorrência destas doenças. Os principais fungos causadores das micoses sistêmicas são *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Na América Latina, a paracoccidioidomicose representa uma doença fúngica sistêmica de importância clínica, devido a seu alto potencial incapacitante e à quantidade de mortes prematuras que provoca, principalmente para segmentos sociais específicos, como os trabalhadores rurais, cujas atividades relacionam-se ao manejo do solo contaminado com o fungo, como por exemplo, atividades agrícolas, terraplenagem, preparo do solo, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, entre outros (46, 47).

As atuais abordagens de tratamento disponíveis para estas micoses sistêmicas são limitadas devido aos problemas de desenvolvimento de resistência e baixa efetividade terapêutica, além das reações adversas causadas pelos fármacos convencionais, principalmente a AMB, nestes pacientes (1, 39, 46).

Dos fármacos atualmente disponíveis para os tratamentos, os mais utilizados são os azóis (itraconazol, fluconazol, cetoconazol), os polienos (AMB) e as equinocandinas (caspofungina) (43, 44, 46). O desenvolvimento de novos azóis (voriconazol) destacou-se

devido ao amplo espectro de ação e à menor toxicidade aos pacientes, porém têm sido relatados episódios de resistência (48). Os polienos podem causar reações adversas, além de toxicidade em alguns tecidos. Nesta classe de antifúngicos destaca-se a AMB, que é o fármaco de escolha para os casos mais graves das infecções fúngicas, considerando-se também a baixa resistência fúngica ao mesmo (1, 39, 46, 47, 49).

1.3.3 Efeitos Adversos e Toxicidade da Anfotericina B

Apesar da efetividade clínica, amplo espectro de ação e baixas taxas de resistência, o uso de AMB é limitado pelas reações adversas e pela toxicidade, particularmente aquela que compromete a função renal (50, 51, 52).

As reações adversas de AMB podem ser classificadas em agudas (febre, êmese, cefaléia) ou subagudas (insuficiência renal) (1, 22, 44, 49, 53).

Já a nefrotoxicidade é resultante da interação da AMB com o colesterol dos túbulos renais e da indução de uma vasoconstrição arteriolar renal, reduzindo o fluxo sanguíneo para os rins e ocasionando uma redução da filtração glomerular (40, 47, 54). Devido ao grande número de membranas plasmáticas presentes nos túbulos renais, há um acúmulo de esteróis nos rins, ocorrendo finalmente necrose tubular renal, notadamente em túbulos distais e ramo ascendente da alça de Henle (29, 55, 56, 57). Os níveis séricos elevados do fármaco contribuem para aumentar esses efeitos adversos, pois quanto maior a quantidade do fármaco livre circulante, mais eventos deletérios ocorrerão nos rins. Além disso, pode-se observar a ocorrência de acidose tubular renal e perda renal de K^{+1} e Mg^{+2} durante a terapia e em várias semanas depois (57, 58).

Ainda, a administração de AMB em pacientes por via intravenosa requer o uso de analgésicos (paracetamol ou dipirona) e antiinflamatórios (hidrocortisona) uma vez que, por

esta via, observam-se desenvolvimento de febre, dor e inflamação após a injeção de AMB (1, 42, 46, 57).

1.3.4 Formulações Contendo Anfotericina B e Aspectos Farmacocinéticos (Sistemas de Entrega de Fármacos)

AMB é insolúvel em água, mas foi formulada para infusão intravenosa através da formação de um complexo com o sal biliar desoxicolato. O complexo é comercializado em forma de pó liofilizado, que contém 50 mg de AMB, 41 mg de desoxicolato e uma pequena quantidade de tampão de fosfato de sódio (1). A absorção das formulações convencionais de AMB pelo trato gastrointestinal é insignificante. As infusões intravenosas diárias repetidas de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de desoxicolato de AMB (Fungizon[®], Anforicin B[®]) a adultos resultam em concentrações plasmáticas de cerca de $1,0$ a $1,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ no final da infusão, que declinam para cerca de $0,5$ a $1,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dentro das 24 horas (1, 39). O fármaco é liberado de seu complexo com desoxicolato na corrente sanguínea, e mais de 90% da AMB ligam-se às proteínas plasmáticas, especialmente à β -lipoproteína. Cerca de 2-5% de cada dose aparecem na urina quando os pacientes são submetidos à terapia diária. A eliminação do fármaco não parece ser alterada em pacientes anéfricos e naqueles submetidos à hemodiálise. A hepatopatia ou a doença biliar não tem efeito conhecido sobre o metabolismo do fármaco nos seres humanos. Pelo menos 33% de uma dose injetada pode ser recuperada de modo inalterado por extração do tecido com metanol na necropsia; as concentrações mais elevadas são encontradas no fígado e no baço, com quantidades menores nos rins e nos pulmões (39). As concentrações de AMB nos líquidos da pleura, no peritônio, na sinóvia e no humor aquoso inflamados correspondem a cerca de 66% das concentrações mínimas no plasma. Uma pequena quantidade de AMB penetra no líquido cefalorraquidiano, no humor vítreo ou no

líquido amniótico normal (39). Devido à extensa ligação com os tecidos, verifica-se uma fase terminal de eliminação com meia-vida de 15 dias (1).

1.3.5 Formulações Nanoestruturadas de Anfotericina B

Vários são os esforços no sentido de melhorar o perfil de segurança terapêutica da AMB, de tal forma que os efeitos deletérios do fármaco sejam minimizados durante os esquemas posológicos adotados clinicamente (49, 59, 60, 61). Algumas propostas fundamentam-se em técnicas de *rejuvenescimento* (ou *re-patenteamento*) de fármacos, incorporando tecnologias para a obtenção de novas formulações de AMB, como lipossomas ou cápsulas nanoestruturadas (19, 23, 40, 55, 62, 63).

As principais preparações estão baseadas em lipídeos, destacando-se as seguintes especialidades farmacêuticas: Ambisome[®] (AMB lipossomal), Amphocil[®] ou Amphotec[®] (AMB em dispersão coloidal), Abelcet[®] (AMB em complexo lipídico) (8, 21). Tais preparações podem ser administradas em doses maiores que aquelas do Fungizon[®] ou Anforicin B[®], que são as especialidades farmacêuticas convencionais de AMB (19, 23, 40, 49, 59, 62, 64, 65).

Das quatro formulações, o Ambisome é o único verdadeiramente lipossomal, enquanto que as outras três não são lipossomas convencionais, ou seja, se apresentam na forma de dispersão coloidal e de complexo lipídico. Os estudos têm demonstrado que o Ambisome apresenta uma menor incidência de reações adversas quando comparado com Amphotec (20, 61, 66).

As grandes vantagens da administração de fármacos nanoestruturados são a liberação controlada do fármaco, a menor toxicidade, o menor número de doses (conveniência na posologia), a diminuição dos picos plasmáticos, a proteção (segurança) e a economia do

medicamento (67, 68, 69). De fato, além da eficácia terapêutica da AMB nanoestruturada, ela é conveniente ao paciente, seja do ponto de vista de seu conforto e adesão ao tratamento, seja do menor custo em hospitais, com menor necessidade de internações (68, 69).

Neste contexto, a aplicação da nanotecnologia na Área de Ciências da Saúde desperta grande interesse uma vez que a nanoestruturação de fármacos potencialmente tóxicos, além de reduzir reações adversas e toxicidades em órgãos (como ocorre com AMB), pode aumentar a vetorização dos fármacos em sítios alvo (42, 55, 65, 70, 71).

De todo modo, essas e outras novas formulações de AMB têm aumentado o índice terapêutico da AMB se comparadas com as formulações convencionais (63, 72). Formulações alternativas podem ser usadas em carreadores de fármacos na forma de nanocápsulas de polímeros biodegradáveis; estes sistemas também são mais estáveis em fluidos biológicos. Neste sentido, cada processo de estruturação requer uma análise dos resultados farmacológicos obtidos, que se refletem em alterações de biodisponibilidade, eficácia e toxicidade (68, 69, 73, 74).

Através de estudos de farmacocinética, vários trabalhos têm apontado resultados nas taxas de concentrações plasmáticas e teciduais mais promissoras para a terapêutica, quando comparados com as formulações convencionais de AMB (42, 50, 62, 74, 75, 76, 77, 78).

Em síntese, é citada em vários trabalhos com farmacocinética de formulações contendo AMB, a descrição do uso da técnica CLAE para a detecção e quantificação do fármaco (29, 50, 60, 62, 74, 76, 79). Estes estudos têm utilizado em sua fase móvel acetonitrílica e EDTA, com condições cromatográficas baseadas nos trabalhos iniciais de Granich et al. (1986) (29), com algumas adaptações (42, 80, 81, 82). Resultados recentes de toxicidade e de farmacocinética, comparando-se formulações de AMB convencionais e aquelas nanoestruturadas, mostram que as novas formulações podem reduzir a toxicidade

renal e melhorar o perfil de biodisponibilidade do fármaco nos tecidos, aspectos de grande interesse na terapêutica de infecções fúngicas sistêmicas (40, 50, 74, 79).

Recentemente, foi desenvolvido um projeto cooperativo (Rede Nacional de Nanobiotecnologia do CNPq) entre Universidade de Brasília e Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto, visando à preparação de anfotericina B nanoestruturada em mistura polimérica de PLGA funcionalizada com DMSA (ácido dimercaptossuccínico), denominada Nano-D-AMB (NanoAnf) (22, 30, 34, 83, 84, 85). Esta nanopreparação apresentou eficácia terapêutica superior à formulação convencional para este fármaco, de forma que foi depositado um pedido de patente e publicado um artigo científico (22). Esta nanoestrutura foi o objeto de estudo da presente dissertação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as concentrações plasmáticas e pulmonares do fármaco Anfotericina B em camundongos Balb/C tratados com o medicamento convencional (Anforicin B[®]) ou com a formulação polimérica biodegradável de PLGA-DMSA (Nano-D-AMB) carreadora do mesmo fármaco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a metodologia analítica para a quantificação de anfotericina B em Cromatografia Líquida da Alta Eficiência (CLAE);

- Verificar a adequação do método para a quantificação de anfotericina B extraída de amostras biológicas;

- Quantificar os níveis plasmáticos e pulmonares de anfotericina B em animais tratados com anfotericina B convencional e estruturada em polímero biodegradável de ácido poli (lático-co-glicólico) – PLGA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FÁRMACOS E REAGENTES

O atual estudo utilizou os seguintes materiais: metanol grau CLAE (J Parker); desoxicolato de AMB 45% e piroxicam (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); nanopartículas contendo desoxicolato de AMB 45% e dispersas em emulsão polimérica de PLGA com DMSA [Nano-D-AMB (NanoAnf)]; dimetilsulfóxido (DMSO) e EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), água deionizada, obtida via sistema de purificação Millipore Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA).

3.2 EQUIPAMENTOS E OUTROS MATERIAIS

Cromatógrafo para CLAE com espectrofotômetro de luz ultravioleta (Shimadzu CLASS VP, Shimadzu Co., Kyoto, Japan), coluna de extração de fase sólida Bond Elut C18, com 500 mg de fase estacionária e 3,0 mL de volume (Varian, Harbor, CA, USA).

3.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

3.3.1 Espectro de Absorbância por Varredura da Anfotericina B e do Piroxicam em Metanol

A droga AMB/Sigma-Aldrich foi diluída em metanol na concentração de $315 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e, a partir desta, foram obtidas as soluções nas seguintes concentrações: $180 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $45 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $22,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $11,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Uma leitura de absorbância por varredura foi feita com cada uma das soluções para avaliação do comprimento de onda específico para o fármaco Anfotericina B. Esse comprimento de onda foi utilizado posteriormente nas determinações por CLAE.

De forma semelhante, o fármaco Piroxicam (Sigma-Aldrich) também foi diluído em metanol na concentração de $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e, a partir desta, foram obtidas as soluções nas seguintes concentrações: $2000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Uma leitura de absorbância por varredura foi feita também com cada uma das soluções para avaliação do comprimento de onda específico para o fármaco Piroxicam. Esse comprimento de onda foi utilizado posteriormente nas determinações por CLAE.

3.3.2 Determinação Quantitativa de Anfotericina B e de Piroxicam por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os fármacos em estudo, Anfotericina B (analito) e Piroxicam (padrão interno), foram analisados em sistema de CLAE, utilizando-se uma coluna cromatográfica de fase reversa ODS C18 (octadecilsílica, Shimadzu Shim-pack CLC), com dimensões de 15 cm x 6 mm, com eluição isocrática com fluxo de $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A fase móvel foi constituída por acetonitrila:EDTA dissódico 10mM pH 4,65 (40:60). A eluição foi acompanhada por

detecção da absorvância em espectrofotômetro a 382 nm. O volume de solução injetado no cromatógrafo foi de 50 μL .

3.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A metodologia de CLAE foi validada com base em publicações da literatura científica e em regulamentações atualmente determinadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (86, 87, 88).

3.4.1 Preparo das Soluções Padrão

Preparou-se em balão volumétrico soluções de AMB/Sigma-Aldrich $315 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e de Piroxicam $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, ambas em triplicata e diluídas em metanol.

Cada uma das três soluções de AMB/Sigma-Aldrich foram isoladamente diluídas para a obtenção, também em triplicata, das soluções nas seguintes concentrações: $180 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $45 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $22,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $11,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Foram feitas análises cromatográficas das soluções acima descritas. Desta forma, para cada concentração, foram obtidos 15 cromatogramas.

Cada uma das três soluções de Piroxicam também foram diluídas, em triplicata, obtendo-se soluções de Piroxicam nas seguintes concentrações: $2000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A seguir, foram feitas as análises cromatográficas das soluções de forma idêntica àquelas de AMB/Sigma-Aldrich, em que foram obtidos, também, 15 cromatogramas para cada concentração analisada.

Para cada solução (seja de AMB/Sigma-Aldrich ou de piroxicam), foi calculada a média aritmética dos valores de leituras das quinze cromatografias realizadas, bem como o desvio padrão e o desvio padrão relativo. Nesta etapa, foram avaliadas e selecionadas as concentrações que apresentaram desvio padrão relativo menor ou igual a 15% ($DPR \leq 15\%$) (35).

3.4.2 Linearidade

Foram calculadas as faixas de linearidade das concentrações, tanto de piroxicam quanto de anfotericina B, sendo que foram aceitos pontos com desvio de linearidade de no máximo 5%. A curva foi linearizada usando-se função logarítmica e as concentrações que se dispersaram para além da faixa de linearidade foram excluídas (35).

As concentrações lineares de desoxicolato de AMB e de piroxicam foram selecionadas para precisão intra-ensaio e para a precisão inter-ensaio.

3.4.2.1 Curva de Calibração

A partir dos dados obtidos nos ensaios de linearidade, foram escolhidas 6 concentrações de Anfotericina B (AMB/Sigma-Aldrich) para a construção da curva de calibração: $2,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $11,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $22,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $45 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $180 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Da mesma forma, foram escolhidas as seguintes concentrações para a construção da curva de calibração do piroxicam: $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os dados de concentração versus área sob a curva foram plotados em gráfico e a curva de calibração foi calculada pelo método dos mínimos

quadrados. Assim, a equação da reta e o coeficiente de correlação linear foram determinados para cada um dos fármacos.

3.4.3 Avaliação da Precisão dos Ensaios

3.4.3.1 Precisão Intra-Ensaio – Repetibilidade

Para a avaliação da precisão intra-ensaio, foram preparadas soluções estoque em metanol na concentração de $225 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AMB/Sigma-Aldrich, em triplicata. A partir das soluções estoques, foram preparadas as soluções de AMB/Sigma-Aldrich nas concentrações de $22,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Foram realizadas, em um único dia, as análises cromatográficas em quintuplicata para cada amostra. Desta forma, para cada concentração foram obtidos 15 cromatogramas.

Foram calculados as médias, desvios padrões e desvios padrões relativos, considerando-se precisas as análises com $\text{DPR} \leq 5\%$ (29, 35, 50, 74).

De forma semelhante, também foram preparadas soluções estoque em metanol na concentração de $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Piroxicam, em triplicata. A partir das soluções estoques, foram preparadas as soluções de Piroxicam nas concentrações de $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. As análises cromatográficas das soluções de Piroxicam também foram realizadas, em um mesmo dia, em quintuplicata para cada amostra.

3.4.3.2 Precisão Inter-Ensaio – Precisão Intermediária

Foram realizados experimentos para avaliar a precisão inter-ensaio, para os quais foram preparadas novas soluções estoques de $225 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AMB/Sigma-Aldrich, em triplicatas, dissolvidas em metanol.

A partir das soluções estoques, foram preparadas soluções, da mesma forma que foram preparadas para os experimentos de avaliação da precisão intra-ensaio. Este ensaio foi realizado em três dias consecutivos, sendo um ensaio por dia, nas concentrações de AMB/Sigma-Aldrich $22,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Foram realizadas análises cromatográficas em quintuplicata de cada uma das três soluções, durante três dias, totalizando-se 45 cromatografias para cada concentração.

Foram calculados as médias, desvios padrões e desvios padrões relativos, considerando-se precisas as análises com $\text{DPR} \leq 5\%$ (29, 35, 50, 74).

O mesmo experimento foi realizado para o piroxicam, sendo que, a partir das novas soluções estoques de $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, em triplicatas e dissolvidas em metanol, foram obtidas as soluções de piroxicam nas concentrações de $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3.4.4 Limites de Quantificação e de Detecção

Os ensaios para definir o limite de quantificação foram iniciados nos valores das menores concentrações lineares e validados nos ensaios intra-corrída e inter-corrída das soluções de AMB/Sigma-Aldrich e de Piroxicam.

Assim, foram preparadas diluições sucessivas, em metanol, todas em triplicatas, de AMB/Sigma-Aldrich nas concentrações de $11,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5,63 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2,81 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

1,41 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0,68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0,34 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0,17 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, e 0,08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. O mesmo foi feito com piroxicam, preparando-se diluições sucessivas, em metanol, todas em triplicatas, cujas concentrações foram 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 1,25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0,625 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 0,3125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Foram realizadas, em um único dia, as análises cromatográficas em quintuplicata para cada amostra. Desta forma, para cada concentração foram obtidos 15 cromatogramas.

As médias das leituras foram calculadas, assim como os desvios padrões e os desvios padrões relativos de cada solução, não se admitindo $\text{DPR} \geq 5\%$ (29, 35, 50, 74).

Foram realizados, por fim, cromatografias para definir o limite de detecção. Para tanto, foram coletadas cinco amostras de fase móvel (acetonitrila/EDTA 10 mM, 40/60 v/v), que foram submetidas à análise cromatográfica, no mesmo dia e nas mesmas condições de cromatografia das soluções de AMB/Sigma-Aldrich e de piroxicam. Ao maior ruído da linha de base (área), foi multiplicado, conforme recomendação da Legislação em vigor (ANVISA/MS), o fator 3 (três). O valor do limite de detecção é feito em uma única etapa, sendo válido tanto para AMB/Sigma-Aldrich quanto para Piroxicam, pois é feita cromatografia em quintuplicata de uma solução estoque de fase móvel (35).

3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS

Os animais foram organizados randomicamente em grupos de cinco indivíduos, que foram submetidos aos seguintes tratamentos experimentais: grupo I (Nano-D-AMB), 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia após 24 h de tratamento); grupo II (Nano-D-AMB), 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia após 48 h de tratamento); grupo III (Nano-D-AMB), 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia após 72 h de tratamento); grupo IV (Anforicin B[®], 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia após 24 h de tratamento); grupo V (Anforicin B[®], 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p., eutanásia após 48 h de tratamento); grupo

VI (Anforicin B[®], 6 mg · kg⁻¹ i.p., eutanásia após 72 h de tratamento). Todos os animais receberam uma única dose do respectivo medicamento (Anforicin B[®] ou Nano-D-AMB). Para coleta das amostras de sangue e pulmão, foi realizada anestesia seguida de eutanásia. As amostras foram conservadas a -20°C.

3.5.1 Tratamento e Análise Cromatográfica dos Tecidos

Animais sadios e não infectados, da linhagem Balb/c, machos, com idade entre 4 a 5 semanas, pesando de 20 a 22 gramas, comprados da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, foram usados neste estudo.

Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições controladas de luminosidade, com livre acesso à água e a uma dieta padrão do alojamento de animais do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – CIEX/FM/UnB. Os mesmos foram organizados em 6 grupos experimentais, conforme descrito anteriormente. Realizou-se a administração dos medicamentos Nano-D-AMB (NanoAnf) e Anforicin B[®], na dose de 6 mg · kg⁻¹, por via intraperitoneal, nos respectivos animais.

Para a coleta das amostras teciduais, os animais foram, após os tempos de 24 horas, 48 horas ou 72 horas, devidamente anestesiados com uma associação de cetamina 10% (100 mg · kg⁻¹) e xilazina 2% (10 mg · kg⁻¹), (50:50; v/v) e eutanasiados.

Os procedimentos de coleta de sangue e maceração de tecidos foram realizados com base em publicações anteriores (29, 50, 74, 76, 79). O sangue foi coletado por via intravenosa (veia cava caudal), transferido para um frasco contendo 5 µL de EDTA (anticoagulante) e centrifugado a 2000 G a 25°C durante 10 minutos. No plasma coletado, foram adicionados

200 μL de solução de piroxicam a $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, como padrão interno. As amostras foram estocadas a -20°C .

Os pulmões coletados foram macerados com 500 μL de água deionizada e 200 μL de solução de piroxicam $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ preparada em metanol. As amostras maceradas foram estocadas a -20°C .

As extrações teciduais dos fármacos anfotericina B e piroxicam foram realizadas de acordo com publicações anteriores (29, 50, 74, 76, 78, 79, 89, 90). Em todas as amostras de plasma e pulmão que estavam estocadas a -20°C , foram adicionados 500 μL de DMSO (para romper o polímero PLGA e para solubilizar o desoxicolato de AMB) e 1 mL de metanol grau CLAE, para a precipitação de proteínas. As amostras foram deixadas em repouso durante 30 segundos a 1 minuto e homogeneizadas durante 3 minutos para serem, em seguida, centrifugadas a 2000 G, durante 15 minutos, a 20°C . Após, os respectivos sobrenadantes (2 mL) foram transferidos para novos frascos, os quais receberam 1 mL de uma solução de metanol 45% preparado em água deionizada. A mistura foi devidamente homogeneizada e, em seguida, transferida para a coluna SPE Bond Ellut, que foi deixada em repouso por 1 minuto para que houvesse eluição lenta (por gravidade). Após este tempo, a coluna SPE Bond Ellut foi centrifugada a 250 G, durante 2 minutos, a 25°C . O eluído foi desprezado.

Por fim, os fármacos piroxicam e AMB que ficaram retidos na fase estacionária da coluna SPE Bond Ellut, foram eluídos com 1 mL de fase móvel em cada eluição, sendo realizadas duas eluições por amostra, a 250 G, durante 2 minutos, a 25°C .

Os novos eluídos receberam, nos ensaios de investigação das concentrações plasmáticas e pulmonares de AMB, 100 μL de solução fortificadora de AMB/Sigma-Aldrich $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e foram devidamente filtrados e, em seguida, cromatografados por CLAE.

3.6 AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO – EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

Os ensaios realizados para mensurar a taxa de recuperação de AMB a partir do plasma e do pulmão são semelhantes aos ensaios de investigação das concentrações plasmáticas e pulmonares de AMB, diferindo, principalmente, no modo de administração dos medicamentos (*spiking*).

Camundongos da linhagem Balb/c, machos, sadios e não infectados, foram organizados em quatro grupos, de acordo com as concentrações das soluções de AMB/Sigma-Aldrich e de piroxicam, sendo todas as soluções preparadas em metanol grau CLAE, que foram adicionadas diretamente nos plasmas (obtidos a partir da centrifugação de sangue) e nos pulmões coletados após eutanásia.

As soluções de AMB/Sigma-Aldrich e de piroxicam foram preparadas nas seguintes concentrações: $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Deste modo, os tecidos foram distribuídos em quatro grupos ($n = 3$), de acordo com a concentração da solução preparada.

Em cada amostra de plasma e de pulmão, foram adicionados 100 μL de cada uma das soluções, ou seja, 100 μL de piroxicam e 100 μL de AMB/Sigma-Aldrich.

Para tanto, após a coleta dos pulmões, estes foram macerados com 500 μL de água deionizada; o volume de macerado foi transferido para um frasco.

O sangue foi coletado na veia cava caudal (injeção intra-venosa) e transferido para um frasco contendo 5 μL de EDTA (anticoagulante), que foi homogeneizado imediatamente e centrifugado, para a obtenção do plasma.

Após, adicionou-se 100 μL de cada uma das soluções de AMB/Sigma-Aldrich ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ou 100 μL de cada uma das soluções de

piroxicam ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 1000 μL de metanol grau CLAE e 500 μL de DMSO.

As misturas foram homogeneizadas durante 3 minutos e centrifugadas a 2000 G, durante 15 minutos, a 25°C.

Em seguida, realizou-se a coleta dos sobrenadantes (1 mL) que foram transferidos para um novo frasco; os precipitados foram desprezados. Foi adicionado 1 mL de metanol 45% em cada uma das amostras e as misturas foram homogeneizadas por 30 segundos a 1 minuto sendo que, logo após, o conteúdo de cada amostra foi transferido para as respectivas colunas de extração de fase sólida (SPE Bond Ellut) para a centrifugação a 250 G, 2 minutos, 25°C.

Então, os eluídos foram desprezados e os fármacos (AMB e piroxicam) que ficaram retidos na fase estacionária da coluna SPE Bond Ellut foram eluídos, duas vezes, com 1 mL de fase móvel em cada eluição.

As soluções eluídas receberam 100 μL de solução fortificadora de AMB/Sigma-Aldrich, numa concentração de $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Por fim, as amostras foram separadamente filtradas e analisadas por CLAE, de acordo com publicações anteriores (91, 92, 93, 94).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do presente estudo foram submetidos a análise estatística utilizando-se o programa *PASW[®] Statistics* versão 17.0. Os resultados de concentração de anfotericina B foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Utilizou-se análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido do teste de Tukey para comparações entre os valores de concentração tecidual obtidos nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h para cada um dos tratamentos. Comparações entre pares de grupos, a exemplo do nível plasmático de anfotericina B após tratamentos com Nano-D-AMB (NanoAnf) e Anforicin B[®], foram analisadas pelo teste não-paramétrico de

Mann-Whitney. Os níveis de significância estatística adotados no presente estudo foram 0,01 e 0,05, de acordo com o teste realizado.

4 RESULTADOS

4.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISES DA ANFOTERICINA B E DO PIROXICAM

4.1.1 Linearidade

As concentrações de AMB/Sigma-Aldrich que se apresentaram lineares foram: $180 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $45 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $22,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. As concentrações de Piroxicam que se apresentaram lineares foram as seguintes: $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Nas análises cromatográficas, as áreas dos picos de anfotericina B foram proporcionais às concentrações da droga injetada na coluna no intervalo de 2,25 a $180 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 1). A análise de regressão linear pelo método dos múltiplos quadrados resultou na equação da reta $y = 115382x - 9179,5$; o coeficiente de regressão (r^2) da curva de calibração foi de 0,9999.

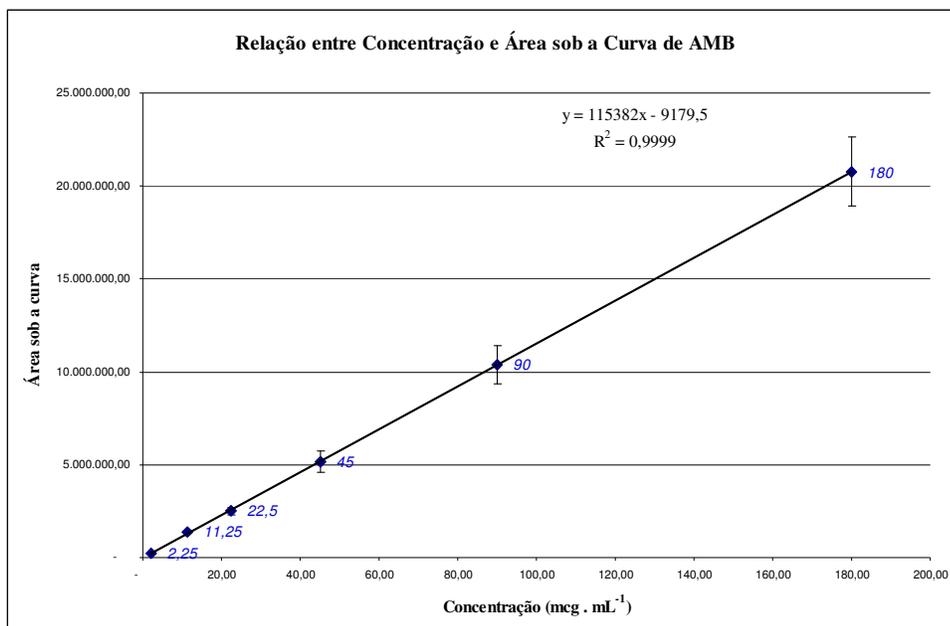


Figura 1- Relação entre concentrações teóricas e áreas de leitura de AMB. Soluções de AMB/Sigma-Aldrich (desoxicolato de anfotericina B 45%) foram preparadas em metanol e suas concentrações foram determinadas por CLAE. A curva de calibração acima representada é o resultado das análises cromatográficas de soluções de AMB/Sigma-Aldrich que variaram de 2,25 a 180 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Nas análises cromatográficas, as áreas dos picos de piroxicam foram proporcionais às concentrações da droga injetada na coluna no intervalo de 5 a 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 2). A análise de regressão linear pelo método dos múltiplos quadrados resultou na equação da reta $y = 68462x + 2124,3$; o coeficiente de regressão (r^2) da curva de calibração foi de 0,9999.

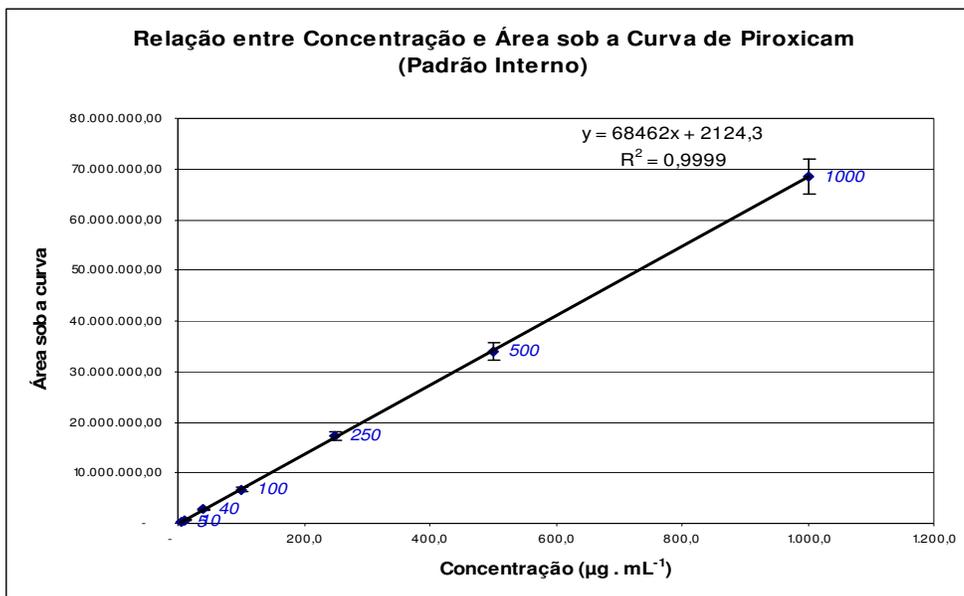


Figura 2- Relação entre concentrações teóricas e áreas de leitura de Piroxicam. Soluções de piroxicam (padrão interno, Sigma-Aldrich) foram preparadas em metanol e suas concentrações foram determinadas por CLAE. A curva de calibração representa o resultado das análises cromatográficas de soluções de piroxicam (Sigma-Aldrich) de concentrações que variaram de 5,0 a 1000 µg · mL⁻¹.

4.1.2 Especificidade

Os cromatogramas das soluções de trabalho, bem como das amostras de plasma e pulmões fortificadas, apresentaram um pico de AMB claramente distinguível a 10 minutos e a 13 minutos, respectivamente (Figura 3). A área sob a curva do piroxicam mostrou-se distinguível a 5 minutos. Nenhuma substância interferiu com o sinal ou tempo de retenção de AMB.

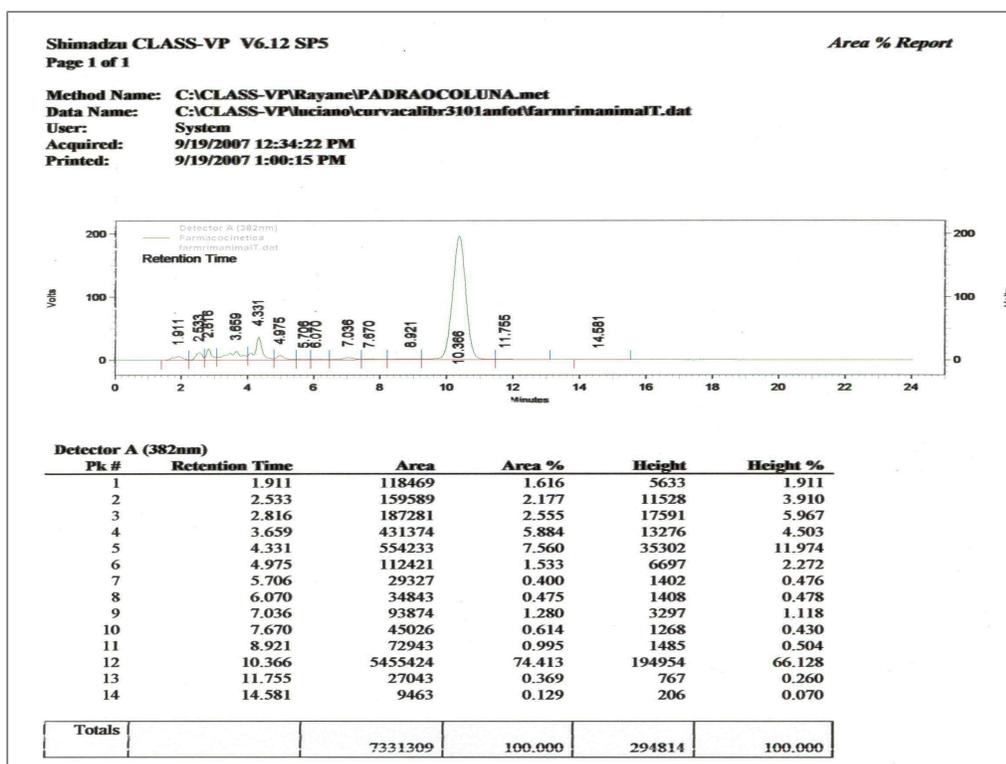


Figura 3 – Cromatograma representativo de AMB. O tempo de retenção de AMB foi distinguível em 10 minutos, quando dissolvido em metanol e, em 13 minutos, quando extraída dos tecidos biológicos.

4.1.3 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção e o limite inferior de quantificação de anfotericina B encontrados em nosso estudo foram de $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente.

O limite de detecção e o limite inferior de quantificação de piroxicam encontrados em nosso estudo foram de $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente.

4.1.4 Exatidão e Precisão

Os resultados obtidos com a validação deste método situaram-se dentro dos limites aceitáveis. A exatidão variou de 96,5% a 108,8%, com média de 100,2%, conforme demonstrado na Tabela 1. A média de precisão intra-dia foi de 1,7%, variando de 1,2% a 2,1% (Tabela 2). Quanto à precisão inter-ensaio (n=15 leituras/dia), os desvios padrões relativos variaram de 2,9% a 6,0%. A precisão geral do conjunto de leituras realizadas nos três dias (n=45 leituras) foi 4,7% (Tabela 3).

Tabela 1 - Valores observados de leitura das curvas padrões, desvio padrão relativo (D.P.R.) e exatidão das seis concentrações de anfotericina B avaliadas.

Concentração teórica ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Concentração observada ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (média, n=15)	Exatidão (%)	Precisão D.P.R. (%)
2,25	2,2	96,5	2,6
11,25	12,2	108,8	2,0
22,5	21,8	96,8	2,8
45,00	44,7	99,3	5,5
90,00	90,0	100,0	4,0
180,00	180,1	100,1	3,5

Tabela 2 - Precisão intra-dia do método de CLAE para análise de AMB.

Concentração teórica ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Concentração observada ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (média \pm DP, $n=15$)	Exatidão (%)	Precisão D.P.R. (%)
0,36	0,41 \pm 0,01	113,4	2,1
2,25	2,23 \pm 0,04	99,2	1,8
22,50	24,93 \pm 0,30	110,8	1,2
Média, $n=15$		108,0	1,7

Tabela 3 - Precisão inter-dia do método de CLAE para análise de AMB.

Concentração teórica ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Concentração observada ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (média \pm DP, $n=15$, cada dia)			Exatidão (%)	Precisão D.P.R. (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
0,36	0,37 \pm 0,02	0,375 \pm 0,02	0,378 \pm 0,03	104,1	6,0
2,25	2,23 \pm 0,04	2,358 \pm 0,06	2,254 \pm 0,01	101,1	2,9
22,50	24,77 \pm 0,23	24,016 \pm 1,15	22,665 \pm 0,89	106,0	5,0
Média, $n=45$				103,7	4,7

Os resultados obtidos com a validação deste método também situaram-se dentro dos limites aceitáveis para o fármaco piroxicam (padrão-interno). A exatidão variou de 98,3% a 103,8%, com média de 100,71%, conforme demonstrado na Tabela 4. A média de precisão intra-dia foi de 3,55%, variando de 0,13% a 4,97% (Tabela 5). Quanto aos ensaios inter-dia ($n=15$ leituras/dia), a precisão variou de 0,9% a 5,28%. A precisão geral do conjunto de leituras realizadas nos três dias ($n=45$ leituras) foi 3,15% (Tabela 6).

Tabela 4. Valores observados de leitura das curvas padrões, desvio padrão relativo (D.P.R.) e precisão das seis concentrações de piroxicam avaliadas.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração observada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (média, $n=15$)	Exatidão (%)	Precisão D.P.R. (%)
5,00	5,19	103,80	6,3
10,00	10,12	101,20	6,7
40,00	40,38	100,95	5,6
100,00	98,30	98,30	2,1
250,00	253,25	101,30	5,4
500,00	496,90	99,38	5,1
1000,00	1000,90	100,09	3,1

Tabela 5. Precisão intra-dia do método de CLAE para análise de Piroxicam.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração observada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (média \pm DP, $n=15$)	Exatidão (%)	Precisão D.P.R. (%)
5,00	4,87 \pm 0,18	97,40	3,86
10,00	8,52 \pm 0,37	85,20	4,43
250,00	248,90 \pm 10,85	99,56	4,36
500,00	526,58 \pm 0,02	118,69	0,01
1000,00	1009,70 \pm 1,33	100,97	0,13
Média, $n=15$		100,37	2,56

Tabela 6. Precisão inter-dia do método de CLAE para análise de Piroxicam.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração observada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (média \pm DP, $n=15$, cada dia)			Exatidão (%)	Precisão D.P.R. (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
	5,00	4,80 \pm 0,10	5,20 \pm 0,25		
10,00	9,22 \pm 0,12	10,03 \pm 0,49	10,30 \pm 0,51	98,50	6,32
250,00	260,25 \pm 0,99	261,83 \pm 0,54	261,25 \pm 5,06	104,44	1,15
500,00	497,13 \pm 4,85	497,43 \pm 4,92	497,06 \pm 4,76	99,44	0,94
1000,00	1033,53 \pm 1,74	1038,24 \pm 0,94	1017,08 \pm 2,57	102,96	0,90
Média, $n=45$				101,22	2,92

4.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO - EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO

A eficiência de extração para a anfotericina B usando o protocolo proposto no presente estudo variou de acordo com a concentração de analito utilizada no plasma e pulmões (Tabelas 7 e 8). A eficiência de recuperação diminuiu progressivamente com o aumento da concentração de anfotericina B no plasma e pulmões. Os valores médios da taxa de recuperação a partir do plasma e pulmões foram 74,6% e 61,3%, respectivamente. Estes valores têm sido suficientemente adequados para a avaliação da taxa de recuperação de AMB a partir de plasma e de pulmões de camundongos Balb/C. Em outros estudos publicados anteriormente, têm sido reportados que os valores da taxa de recuperação têm variado de 60% a 80%, aproximadamente (19, 29, 41, 42, 50, 58, 74, 78).

Tabela 7 - Eficiência de extração e DPR em amostras de plasma fortificadas com AMB.

Concentração teórica ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Eficiência de extração (%)	D.P.R. (%)
0,50	103,7	12,8
1,00	70,1	0,2
5,00	50,0	8,8
Média, $n=15$	74,6	

Tabela 8 - Eficiência de extração e DPR em amostras de pulmão fortificadas com AMB.

Concentração teórica ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Eficiência de extração (%)	D.P.R. (%)
0,50	69,6	17,28
1,00	67,5	0,45
5,00	46,8	1,74
Média, $n=9$	61,3	

4.3 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E PULMONARES DE ANFOTERICINA B APÓS TRATAMENTO COM NANO-D-AMB (NANOANF) ($6 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, I.P.) E COM ANFORICIN B[®] ($6 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, I.P.)

O presente estudo mostrou que o tratamento com Nano-D-AMB (NanoAnf) resultou em concentrações plasmáticas superiores de AMB nos tempos 24 h, 48 h e 72 h, quando comparado com o tratamento com Anforicin B[®] ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney) (Figura 4). Os níveis pulmonares de AMB, entretanto, não foram diferentes nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h para os tratamentos com Nano-D-AMB (NanoAnf) ou Anforicin B[®] (Tabela 9, Figura 5). Foi observada diferença significativa entre as concentrações plasmáticas e pulmonares após tratamento com Nano-D-AMB (NanoAnf) apenas no tempo 24 h (Tabela 9, Figura 6), onde as concentrações de AMB nos pulmões foram superiores àquelas obtidas a partir dos plasmas.

Quanto ao grupo tratado com Anforicin B[®], foi observada diferença significativa entre as concentrações plasmáticas e pulmonares do fármaco nos tempos 24 h e 48 h (Tabela 9, Figura 7). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de AMB no plasma ou nos pulmões entre os tempos 24 h, 48 h e 72 h, seja para o tratamento com Nano-D-AMB (NanoAnf) ou Anforicin B[®] (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentrações plasmáticas e pulmonares de anfotericina B após tratamento com Nano-D-AMB (NanoAnf) ou Anforicin B[®].

Tecido	Concentrações (média ± D.P.) de anfotericina B em amostras de plasma (µg · mL ⁻¹) ou de pulmão (µg · g ⁻¹), após tratamento com:					
	Nano-D-AMB (NanoAnf)			Anforicin B [®]		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Plasma	2,04 ± 0,51 ^{a,c}	2,31 ± 0,57 ^b	1,85 ± 0,46 ^b	1,16 ± 0,19 ^d	1,41 ± 0,56 ^d	1,32 ± 0,41
Pulmão	3,03 ± 0,78	2,79 ± 1,23	2,21 ± 0,68	3,14 ± 2,00	2,48 ± 1,28	2,18 ± 1,16

^ap<0,01 para Nano-D-AMB (NanoAnf) *versus* Anforicin no plasma, no tempo 24 h (teste de Mann-Whitney).

^bp<0,05 para Nano-D-AMB (NanoAnf) *versus* Anforicin no plasma, nos tempos 48 h e 72 h (teste de Mann-Whitney).

^cp<0,05 para Nano-D-AMB (NanoAnf) no plasma *versus* Nano-D-AMB (NanoAnf) no pulmão (teste de Mann-Whitney).

^dp<0,05 para Anforicin B[®] no plasma *versus* Anforicin B[®] no pulmão, nos tempos 24 h e 48 h (teste de Mann-Whitney).

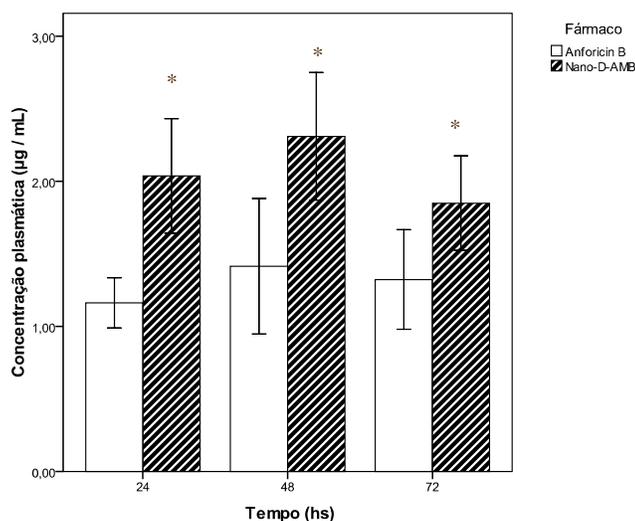


Figura 4 – Concentrações Plasmáticas de AMB [Anforicin B x Nano-D-AMB (NanoAnf)]. Camundongos da linhagem Balb/c foram alocados em 3 grupos (n=5) e foram tratados com Nano-D-AMB (NanoAnf), enquanto que outros três grupos (n=5) foram tratados com Anforicin B[®]. Todos os camundongos receberam uma dose única de $6\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de medicamento, administrada por via intraperitoneal. Após 24h, 48h e 72h foi realizada a colheita das amostras de plasma e submetidas ao método de extração e analisadas em CLAE. Os níveis plasmáticos de anfotericina B foram superiores nos grupos tratados com Nano-D-AMB (NanoAnf).

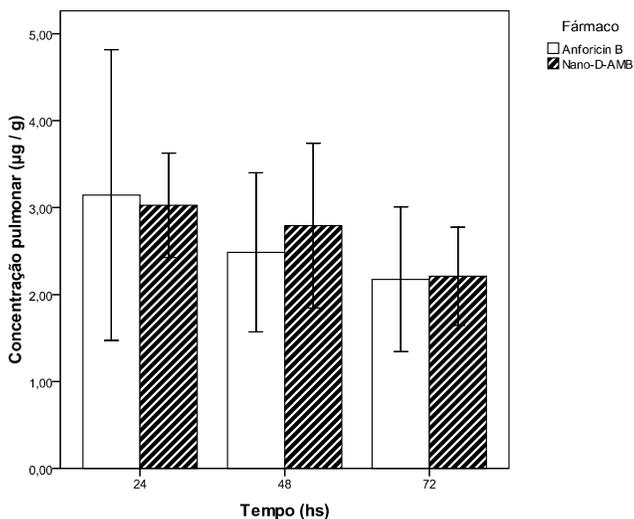


Figura 5 – Concentrações Pulmonares de AMB [Anforicin B x Nano-D-AMB (NanoAnf)]. Camundongos Balb/c (n=30) foram tratados com Anforicin B[®] ou Nano-D-AMB (NanoAnf), $6\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, dose única, pela via intraperitoneal e, após 24h, 48h e 72h, os pulmões foram coletados e submetidos à extração e análise por CLAE. Não se observaram diferenças entre os níveis pulmonares de AMB nos grupos.

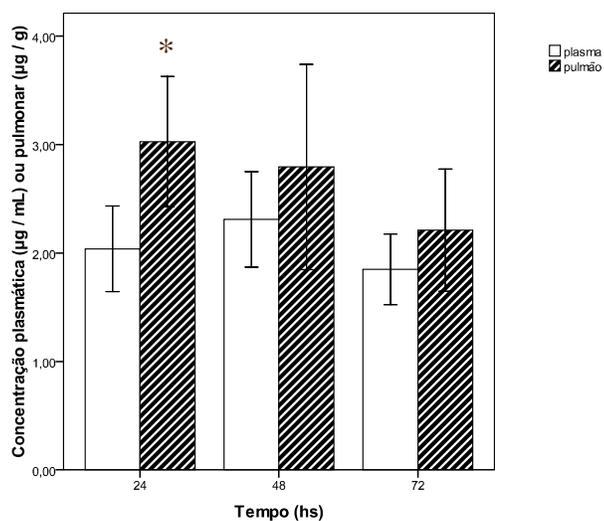


Figura 6 – Concentrações Plasmática/Pulmonar de AMB [Nano-D-AMB (NanoAnf)]. Camundongos da linhagem Balb/c foram tratados com Nano-D-AMB (NanoAnf), $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ em regime de dose única, administrado pela via intra-peritoneal. As concentrações de AMB no tecido pulmonar foram superiores àquelas obtidas a partir dos plasmas somente no tempo 24h.

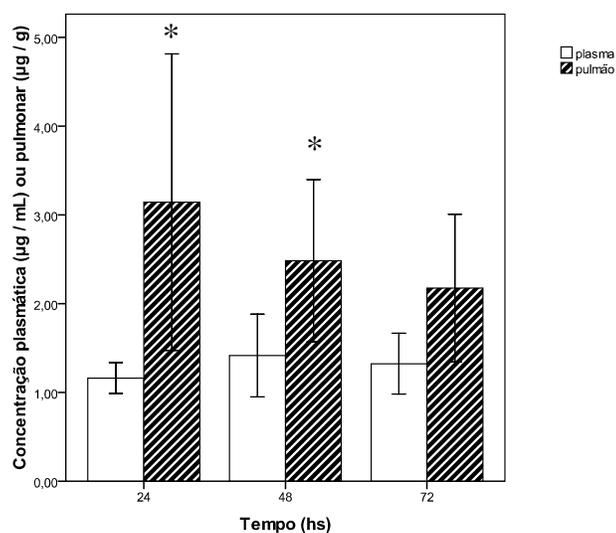


Figura 7 – Concentrações Plasmática/Pulmonar de AMB (Anforicin B). Os níveis plasmáticos de AMB foram analisados por CLAE e comparados com os níveis pulmonares de AMB de camundongos, que receberam a dose única de $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ por via intra-peritoneal de Anforicin B[®]. As concentrações de AMB no tecido pulmonar foram superiores àquelas obtidas a partir dos plasmas nos tempos 24h e 48h.

5 DISCUSSÃO

O antifúngico anfotericina B permanece como um medicamento útil no tratamento das infecções fúngicas, devido à sua eficácia e amplo espectro de atividade. Várias preparações com base em lipídios ou polímeros biodegradáveis têm sido desenvolvidas a fim de reduzir a toxicidade da AMB e promover uma liberação sustentada do fármaco (21, 22, 95, 96, 97, 98). As diferenças na farmacocinética das novas formulações podem ser avaliadas por métodos analíticos, especialmente CLAE (23, 29, 50, 74, 91, 93, 97, 99, 100, 101). Os modelos animais de infecções fúngicas freqüentemente utilizam ratos ou camundongos, o que requer um método preciso (demonstrado com testes intra-ensaio e inter-ensaios) e sensível para quantificar AMB a partir de amostras de tecido de pequeno volume (50, 58, 74). O presente estudo estabeleceu uma metodologia baseada na extração em fase sólida seguida por CLAE capaz de quantificar as concentrações de AMB de amostras de plasma e pulmões colhidas de camundongos (24, 41, 78).

As metodologias utilizadas para quantificação da anfotericina B em amostras biológicas, objeto do atual estudo, utilizaram métodos cromatográficos que necessitaram de uma fase inicial dedicada à sua validação. Para tanto, foram consideradas recomendações publicadas anteriormente na literatura científica e, também, aquelas definidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA, RE n. 899) (29, 35, 86, 87, 88).

O método proposto no atual estudo mostrou resolução cromatográfica satisfatória, utilizando como fase móvel acetonitrila:EDTA 10 mM (40:60, v/v), conforme descrito anteriormente (29). Em outro estudo, a molaridade do EDTA que constitui a fase móvel, juntamente com a acetonitrila, precisou ser aumentada para 20 mM para obtenção de resolução cromatográfica satisfatória (91). Os autores também elevaram o pH para 5,0. No atual estudo, o valor do pH foi ligeiramente elevado para 4,65, em relação ao valor 4,2

descrito anteriormente, para melhorar a resolução do pico, procedimento já relatado em alguns estudos (29, 41). O tempo de retenção de AMB encontrado no atual estudo foi de aproximadamente 13 minutos, valor superior ao de estudos anteriores que encontraram 4,9 a 6-7 minutos (29, 90, 91). No entanto, alguns autores encontraram, aproximadamente, o mesmo tempo de retenção do presente estudo, 12 minutos (92, 93).

Os valores dos comprimentos de onda UV frequentemente utilizados para detectar AMB estão próximos ou iguais a 382 nm, valor semelhante ao utilizado no presente estudo (79, 99). No entanto, outros trabalhos têm detectado AMB em valores mais elevados, como comprimento de onda de 407 nm (91, 92, 93).

Os resultados dos diferentes protocolos para CLAE têm mostrado diferenças na menor concentração do fármaco que pode ser medido com exatidão e precisão aceitáveis. Publicações anteriores relataram limites de quantificação que variaram de $0,01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ até $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (58, 91, 102).

Limites de quantificação próximos da faixa de concentração plasmática e tecidual podem comprometer a quantificação de AMB. Esta limitação ocorreu em estudo anterior, com algumas amostras pulmonares de animais tratados com as formulações de Ambisome[®] e Abelcet[®] ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), que resultou em valores não detectáveis (58). O limite de quantificação obtido no presente estudo foi de $0,68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, o que poderia afetar a medida de concentrações baixas do fármaco. Para evitar este problema, as amostras foram fortificadas com 100 μL de solução de AMB/Sigma-Aldrich ($45 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Este procedimento é particularmente útil para mensuração de níveis de anfotericina B em amostras teciduais de animais tratados com sistemas de liberação sustentada do fármaco, pois as concentrações teciduais do fármaco anfotericina B estão abaixo do limite de detecção do método cromatográfico em estudo.

A extração em fase sólida utilizada em nosso estudo foi baseada em publicação anterior (78). Os autores propuseram eluir a anfotericina B da coluna de extração utilizando acetonitrila 60%. Este método produziu uma taxa de recuperação muito baixa no presente estudo. Para melhorar a eficiência da recuperação, optou-se por eluir a AMB da coluna de SPE utilizando a mesma solução da fase móvel, ou seja, acetonitrila:EDTA 10 mM, 40:60, v/v, em pH 4,65. A taxa de recuperação variou de acordo com a amostra de tecido em questão, e foi maior para o plasma (74,6%) em comparação com os pulmões (61,3%). Apesar de outros trabalhos relatarem uma maior eficiência de recuperação da AMB, o nível alcançado em nosso estudo foi suficiente para produzir resultados consistentes (91, 92, 93).

Finalmente, a metodologia de CLAE foi validada com sucesso, respeitando-se as recomendações gerais anteriormente descritas, em termos de exatidão e precisão (86, 88, 103). Embora considera-se o valor 15% como aceitável para o desvio padrão relativo, optou-se por buscar valores de até 5% para os testes de precisão (intra-ensaio e inter-ensaio) (104). A média do desvio padrão relativo obtida no atual estudo foi de 1,7% e 4,7% para os ensaios de precisão intra-ensaio e inter-ensaio, respectivamente. Em síntese, os procedimentos de validação analítica indicaram que o método proposto neste estudo apresenta boa repetibilidade (precisão intra-ensaio) e boa precisão intermediária (precisão inter-ensaio).

Os avanços na área de desenvolvimento de fármacos estão fazendo surgir novas opções terapêuticas capazes de prevenir ou curar algumas doenças de relevância mundial. Dentre elas, doenças fúngicas, como a paracoccidiodomicose, que é causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, apresenta urgência no desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos, pois, frequentemente, a terapia farmacológica atualmente disponível torna-se pouco eficaz em função dos casos de resistência fúngica. A paracoccidiodomicose é uma micose endêmica de grande interesse para os países da América Latina, até porque tem alto potencial incapacitante e tem levado à morte prematura. Os

pacientes com paracoccidiodomicose usualmente encontram-se na fase mais produtiva da vida, portanto, esta infecção é uma doença com um importante impacto social e econômico (46).

Diferente de outros fungos patogênicos, *Paracoccidioides brasiliensis* é sensível à maioria dos fármacos antifúngicos, como os antibacterianos sulfonamidas (sulfadiazina, sulfametoxazol associado ao trimetoprim), os antifúngicos azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol) e à anfotericina B, dentre outros. No entanto, há relatos de resistência com fármacos sulfamídicos e azólicos. Além disso, os azólicos são potencialmente hepatotóxicos e a sua maioria faz inibição das enzimas microssomais hepáticas, o que aumenta os riscos de interações com outros medicamentos (1, 43, 44, 46).

Em pacientes com paracoccidiodomicose e insuficiência renal, os azólicos podem ser usados, não havendo necessidade de redução de dose. As sulfas devem ser evitadas, assim como AMB, pela nefrotoxicidade. Em pacientes com disfunções hepáticas, os azólicos devem ser evitados; já as sulfas, devem ser utilizadas com cautela, pois, raramente, podem causar hepatotoxicidade. Desoxicolato de AMB pode ser indicada com menos restrições em hepatopatas, mas as preparações lipídicas têm revelado certo grau de hepatotoxicidade (46, 105).

Algumas estratégias de nanoestruturação de AMB já foram desenvolvidas; estes processos têm sido denominados de rejuvenescimento (ou re-patenteamento), nos quais, fármacos mais antigos têm sido reformulados em micro ou nanoesferas. A utilização de carreadores de natureza lipídica para AMB tem apresentado resultados otimistas quanto à redução de eventos adversos (22, 105).

Quatro formulações lipídicas nanoestruturadas de AMB estão disponíveis para o uso clínico: AMB complexo lipídico/ABLC (Abelcet[®]), AMB complexada com dispersão

coloidal/ABCD (Amphotec[®]) e Amphocil[®], além de AMB lipossomal/L-AMB (Ambisome[®]). Nenhuma das formulações foram preparadas em blendas poliméricas. Destas, apenas L-AMB é verdadeiramente lipossomal, sendo que, as outras formulações se apresentam na forma de dispersão coloidal. O medicamento Nano-D-AMB (NanoAnf) foi preparado em blenda polimérica de PLGA revestido com DMSA. Este polímero permite uma liberação sustentada do fármaco, além de representar uma formulação terapêutica mais estável, do ponto de vista de biodegradação (22, 40, 55, 58, 74, 103).

Embora estas novas preparações para a AMB possam ser utilizadas nas terapias em substituição à formulação convencional (desoxicolato de AMB – Fungizone[®] ou Anforicin B[®]), o seu uso ainda é restrito devido ao alto custo. Porém, é necessário observar que o uso das especialidades farmacêuticas convencionais contendo AMB requer a internação do paciente a fim de que possam ser monitorados quanto às reações adversas. Além disso, as formulações nanoestruturadas lipossomais foram desenvolvidas por laboratórios do exterior e são amparadas por suas respectivas patentes. Neste contexto, aponta-se para a necessidade do desenvolvimento de novas formulações nanoestruturadas alternativas no Brasil, tais como, Nano-D-AMB (NanoAnf) (22).

É com esse intento de apontar possíveis estratégias para racionalizar o tratamento dos doentes que necessitam do uso dos antifúngicos citados, reduzindo reações adversas e aumentando a eficácia e efetividade clínicas dos medicamentos, que foi desenvolvido um projeto cooperativo entre Universidade de Brasília (UnB) e Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (USP), visando preparação de AMB nanoestruturada em mistura polimérica de PLGA funcionalizada com DMSA, denominada Nano-D-AMB (NanoAnf) (22).

Em modelos experimentais, esta preparação tem apresentado eficácia terapêutica superior à formulação convencional de AMB (Fungizone[®]). A nanoestrutura é constituída de 120 µg de desoxicolato de AMB dispersas em 100 µL de uma suspensão coloidal em PLGA e DMSA. PLGA é um polímero biodegradável que tem sido utilizado em sistemas para liberação controlada de fármacos; estes sistemas poliméricos são moléculas orgânicas de alta massa molecular constituídos, em geral, por mais de 50 monômeros (9, 106). Ao se agregarem em um padrão regular, formam uma matriz onde o fármaco encontra-se inserido (19). Outros estudos demonstram que a liberação do fármaco decorre da dissolução gradual da matriz e é constituída pela solubilidade e porosidade da mesma (13).

A estes sistemas poliméricos, podem ser inseridos fármacos em quantidades suficientes para uma única dose ou para mais de uma dose (5, 107).

No presente estudo, foram determinadas as concentrações plasmáticas e pulmonares de AMB em animais tratados com Nano-D-AMB (NanoAnf), utilizando-se da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram administradas, em regime de dose única e por via intra-peritoneal, Anforicin B[®] e Nano-D-AMB (NanoAnf) (108). As doses administradas foram iguais para ambos os grupos de animais, ou seja, 6 mg · kg⁻¹.

As nanopartículas de AMB em teste no atual estudo mostraram níveis plasmáticos superiores em relação àqueles obtidos dos tratamentos com Anforicin B[®] após 24 h, 48 h e 72 h seguidas da administração intra-peritoneal nas doses de 6 mg · kg⁻¹. Isso pode sinalizar a possibilidade da formulação atual ser preparada com quantidade de AMB inferior a 120 µg em cada 100 µL de formulação, implicando seguramente, em redução de eventos adversos, tais como a nefrotoxicidade e, com a eficácia antifúngica igual ou até mesmo superior à atual AMB nanoestruturada. Deste modo, a formulação Nano-D-AMB (NanoAnf), que é preparada com 120 µg de AMB em 100 µL de formulação, talvez possa ser preparada utilizando-se uma quantidade inferior a 120 µg de AMB.

Estudos anteriores, como os realizados por Kim et al. 1984, sobre a farmacocinética da anfotericina B em animais têm revelado diferenças quanto às concentrações plasmáticas e pulmonares em termos de concentração e de meia-vida ($t_{1/2}$). Inicialmente, a $t_{1/2\beta}$ do fármaco pode variar entre as diferentes espécies animais, sendo superior no cão (46,8h), seguida do macaco *Cynomolgus* (35,3 h), camundongo - espécie utilizada no presente estudo (27,5h), e rato (16h), isto considerando-se uma administração de $0,6\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ por via endovenosa. Em outro estudo, no qual o fármaco foi administrado pela via intraperitoneal ($1\text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$), a meia-vida plasmática em camundongos foi semelhante, 28,3h, havendo decaimento relativamente proporcional da concentração plasmática, nos tempos 24, 48 e 72 h. Neste mesmo estudo, apesar da meia-vida pulmonar ser de 15,5h, não ocorreu redução da concentração do fármaco entre os tempos 48h e 72h de forma proporcional a esta meia-vida (80). Takemoto e cols. também verificaram que não houve congruência entre a redução nas concentrações plasmáticas nos tempos 24 h e 48 h e aquelas observadas nos pulmões para os mesmos tempos, após administração de anfotericina B $1\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ em camundongos pela via endovenosa (72). As dosagens e o esquema posológico também influenciam as concentrações do fármaco nos pulmões, porém, novamente, não há proporcionalidade entre estas variáveis, conforme demonstrado em estudo anterior com camundongos tratados por via endovenosa com diferentes dosagens do fármaco (1, 4, 8, e $12\text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$), dose única ou quatro doses consecutivas a cada 24h, testando-se formulações convencionais e lipídicas (58). Os resultados acima apresentados mostram a complexidade da cinética da anfotericina B, que pode ser influenciada pela fisiologia do organismo animal, via de administração, doses, intervalos posológicos e formulações.

Em um estudo recentemente publicado, foram determinadas as concentrações teciduais de anfotericina B utilizando CLAE após purificação por extração em fase sólida, após autópsia de pacientes que receberam, por via intravenosa, $3,48 \pm 0,81\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de anfotericina

B lipossomal (Ambisome[®]) ou $4,60 \pm 0,83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil[®]), 72 horas antes de morrerem por falência múltipla de órgãos (os pacientes que morreram apresentavam infecções fúngicas invasivas). Foram avaliados 20 pacientes, sendo que sete foram tratados com Ambisome[®] e 13 foram tratados com Amphocil[®]. O medicamento convencional (Fungizone[®]) não foi administrado no intuito de preservar a função renal (78). As concentrações pulmonares de anfotericina B ($32,62 \pm 22,52 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) dos pacientes que receberam o tratamento com Amphocil[®] foram superiores às decorrentes do tratamento com Ambisome[®] ($11,63 \pm 7,7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); entretanto, as concentrações plasmáticas de anfotericina B nos pacientes que foram tratados com Ambisome[®] foram superiores em relação aos pacientes que receberam Amphocil[®].

Em outro estudo, foram determinadas as concentrações teciduais de AMB em ratos que receberam administração oral de uma formulação lipídica (Peceol/DSPE-PEG₂₀₀₀) ($4,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) contendo AMB, assim como, foram determinadas as concentrações teciduais do mesmo fármaco em ratos que receberam Abelcet[®] ($5,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, via i.v. em bolus), Fungizone[®] ($0,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, via i.v. em bolus) ou Ambisome[®] ($5,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, via i.v. em bolus). A biodisponibilidade de anfotericina B foi superior nos grupos que receberam Ambisome[®] ($5,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, via i.v. em bolus) após 24, 48 e 72 horas do tratamento. O tratamento com Abelcet[®] resultou em biodisponibilidade de anfotericina B inferior às obtidas com Ambisome[®] e com Fungizone[®], após os tempos de 24, 48 e 72 horas (100).

Neste sentido, apesar da preparação Nano-D-AMB (NanoAnf) mostrar níveis plasmáticos superiores, a concentração pulmonar foi semelhante à Anfotericina B[®], em todos os tempos testados. Nos animais que foram tratados com Nano-D-AMB (NanoAnf), as concentrações pulmonares de AMB variaram de $3,03$ a $2,21 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, enquanto que, nos grupos tratados com Anfotericina B[®], as concentrações variaram de $3,14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ a $1,16 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Estes resultados podem sugerir que a formulação estruturada Nano-D-AMB (NanoAnf), obtida pela inserção de 120 µg de desoxicolato de AMB em 100 µL de preparação polimérica com PLGA e DMSA, seja capaz de carrear AMB, permitindo, após a sua administração, uma liberação do fármaco a partir da erosão das misturas poliméricas de PLGA e DMSA, ao longo de, aproximadamente, 72 horas (109).

Os dados obtidos neste estudo apontam que, Nano-D-AMB (NanoAnf) pode ser considerado um novo sistema de liberação de fármaco. A administração de Nano-D-AMB (NanoAnf) por via intra-peritoneal em camundongos Balb/c produziu concentrações plasmáticas superiores às obtidas do tratamento com Anforicin B[®], indicando uma biodistribuição para os pulmões de forma mais sustentada. (24, 107, 110, 111).

Os dados encontrados neste estudo não indicaram que Nano-D-AMB (NanoAnf) aumentou os níveis pulmonares de AMB de modo significativo, quando comparados com Anforicin B[®]. A esse respeito, os dados demonstram, ainda, que os níveis plasmáticos de AMB nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h são inferiores aos níveis pulmonares em todos os grupos tratados, seja com Nano-D-AMB (NanoAnf) ou Anforicin B[®]. Deste modo, a inserção de DMSA na formulação estruturada em blenda polimérica de PLGA não induziu vetorização do fármaco para o tecido pulmonar, mesmo porque, os dados gerados demonstram que as concentrações pulmonares de AMB não apresentam diferenças significativas entre os grupos tratados com Nano-D-AMB (NanoAnf) e Anforicin B[®].

6 CONCLUSÃO

A formulação da AMB estruturada em blenda polimérica de PLGA e DMSA – NANO-D-AMB (NanoAnf) – apresentou diferença na distribuição do fármaco no organismo animal, quando comparado com o medicamento Anforicin B[®]. Assim, a preparação NANO-D-AMB (NanoAnf) mostrou níveis plasmáticos superiores ao do medicamento convencional durante todo o intervalo de 24 h a 72 h, mantendo concentrações pulmonares equivalentes à de uma dose única de $6 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de Anforicin B[®].

O presente estudo não é suficiente para afirmar que a preparação NANO-D-AMB atende às características farmacotécnicas e farmacocinéticas de um sistema de liberação sustentada de fármacos. Entretanto, é um sistema inovador de entrega do fármaco AMB capaz de manter níveis pulmonares equivalentes aos de uma dose única de $6 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ durante 72 h, o que poderá resultar em um regime posológico mais satisfatório para o paciente.

7 PERSPECTIVAS

O “rejuvenescimento” de AMB em estrutura de PLGA e DMSA (NANO-D-AMB) representa um produto biotecnológico promissor, ou seja, com forte potencial de ser absorvido pela indústria farmacêutica. Este produto inovador permitirá reduzir a frequência da administração de doses de AMB de uma dose diária para uma dose a cada três dias, mantendo-se a eficácia antifúngica e reduzindo-se as lesões teciduais e inflamação no local da administração parenteral (22).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 Goodman e Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11^a. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003. cap. 48, p. 1103-1118.
- 02 Couvreur P, Christine Vauthier C. (2006). **Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease**. *Pharmaceutical Research*, **23(7)**: 1417-1449.
- 03 Kayser O, Lemke A e Hernández-Trejo N. (2005). **The impact of Nanotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems**. *Curr Pharm Biotechnol*. **6(1)**:3-5.
- 04 Miura M, Ohkubo T, Sugawara K, Okuyama N, Otani K. (2002). **Determination of Estazolam in Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Solid-Phase Extraction**. *Analytical Sciences*, **18**: 525-528.
- 05 Saltzman WM. (2001). **Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy**. *Oxford University Press, EUA*.
- 06 Vieira DB, Ribeiro AMC. (2008). **Cationic Nanoparticles for Delivery of Amphotericin B: Preparation, Characterization and Activity In Vitro**. *Journal of Nanobiotechnology*, **6(6)**: 1-13.
- 07 Chellat F, Merhi Y, Moreau A, Yalia L (2005). **Therapeutic Potential of Nanoparticulate Systems for Macrophage Targeting**. *Biomaterials*, **26(35)**: 7260-75.
- 08 Langer R. (1998). **Drug Delivery and Targeting**. *Nature*, **392(6679 Suppl)**: 5-10.
- 09 Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. (2005). **Biodegradable Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles for Injectable Delivery of Vaccine Antigens**. *Adv Drug Deliv Rev*, **57(3)**: 475-482.

- 10 Nahar, M., T. Dutta, S. Murugesan, A. Asthana, D. Mishra, V. Rajkumar, M. Tare, S. Saraf and N.K. Jain. (2006). **Functional Polymeric Nanoparticles: an Efficient and Promising Tool for Active Delivery of Bioactives.** *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Sys*, **23(4)**:259-318.
- 11 Yang LZ, Li RX, Yang KW, Liu Yan. (2007). **Amphotericin B-Loaded Poly (Ethylene Glycol)-Poly (Lactide) Micelles: Preparation, Freeze-Drying, and *In Vitro* Release.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, doi: 10.102/jbm.a.31504: 539-546.
- 12 Heinemann V, Kahny B, Jehn U, Muhlhaber D, Debus A, Wachholz K, Bosse D, Kolb HJ, Wilmanns W. (1997). **Serum Pharmacology of Amphotericin B Applied in Lipid Emulsions.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 728-732.
- 13 Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrick J. (2001). **Drug Delivery and Targeting: for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists.** Ed. Taylor e Francis, Londres.
- 14 Vassileva V, Grant J, De Souza R, Allen C, Piquette-Miller M. (2007). **Novel Biocompatible Intraperitoneal Dug Delivery System Increases Tolerability and Therapeutic Efficacy of Paclitaxel in a Human Ovarian Cancer Xenograft Model.** *Cancer Chemother Pharmacol*, (Epub ahead of print).
- 15 Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. (2006). **Antifungal Agents: Mode of Action in Yeast Cells.** *Revista Espanhola Quimioterapia*, **19(2)**: 130-139.
- 16 Wills EA, Redinbo MR, Perfect JR, Del Poeta M. (2000). **The Potential Targets for Antifungal Development.** *Emerging Therapeutic Targets*, **4(3)**:1-32.
- 17 Borschiver S, Guimarães MJOC, Santos TN, Silva FC, Brum PRC. (2005). **Patenteamento em Nanotecnologia: Estudo do Setor de Materiais Poliméricos Nanoestruturados.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **15(4)**: 245-248.
- 18 Boswell GW, Buell D, Bekersky I. (1998). **AmBisome (Liposomal Amphotericin B): A Comparative Review.** *Journal of Clinical Pharmacology*, **38**: 583-592.

- 19 Brime B, Frutos P, Bringas P, Nieto A, Ballesteros MP, Frutos G. (2003). **Comparative Pharmacokinetics and Safety of a Novel Lyophilized Amphotericin B Lecithin-Based Oil–Water Microemulsion and Amphotericin B Deoxycholate in Animal Models.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**: 103-109.
- 20 Kleinberg, M. (2006). **What is the Current and Future Status of Conventional Amphotericin B?** *Int. J. Antimicrob. Agents*, **27 Suppl 1**:12-6.
- 21 Tiphine M., V. Letscher-Bru and R. Herbrecht. (1999). **Amphotericin B and Its New Formulations: Pharmacologic Characteristics, Clinical Efficacy and Tolerability.** *Transpl. Infect. Dis.*, **1(4)**: 273-83.
- 22 Amaral A C, Bocca A L, Ribeiro A M, Nunes J, Peixoto D L G, Simioni A R, Primo F L, Lacava Z G M, Bentes R, Titze-de-Almeida R, Tedesco A C, Morais P C, Felipe M S S. (2009). **Amphotericin B in Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) (PLGA) and Dimercaptosuccinic Acid (DMSA) Nanoparticles Against Paracoccidioidomycosis.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **63**: 526-533. doi: 10.1093/jac/dkn539.
- 23 Espuelas MS, Legrand P, Campanero MA, Appel M, Chéron M, Gamazo C, Barratt G, Irache JM. (2003). **Polymeric Carriers for Amphotericin B: In Vitro Activity, Toxicity and Therapeutic Efficacy Against Systemic Candidiasis in Neutropenic Mice.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 419-427.
- 24 Peng H. S., Liu X, Lva G, Sun B, Kong Q, Zhai D, Wanga Q, Zhaoa W, Wang G, Wang D, Li H, Jin L, Kostulas N. (2008). **Voriconazole Into PLGA Nanoparticles: Improving Agglomeration and Antifungal Efficacy.** *International Journal of Pharmaceutics*, doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.10.009, **54**: 167-175.
- 25 Rivera PA, Martinez-Oharriz MC, Rubio M et al. (2004). **Fluconazol Encapsulation in PLGA Microspheres by Spray-Drying.** *J Microencapsul*, **21(2)**:203-211.

- 26 Dhiman N, Dutta M, Khuller GK. (2000). **Poly (DL-Lactide-co-Glycolide) Based Delivery Systems for Vaccines and Drugs.** *Indian J Exp Biol*, **38**:746-52.
- 27 Dandagi PM, Mastiholimath VS, Patil MB, Gupta MK. (2006). **Biodegradable Microparticulate System of Captopril.** *Int J Pharm*, **307**(1):83-8.
- 28 Commandeur S, van Beusekom HM, van der Giessen WJ. (2006). **Polymers, Drug Release, and Drug-Eluting Stents.** *Journal Interv Cardiol*, **19**(6): 500-6.
- 29 Granich GG, Kobayashi GS, Krogstad DJ. (1986). **Sensitive High-Pressure Liquid Chromatographic Assay for Amphotericin B Which Incorporates an Internal Standard.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29**: 584-588.
- 30 Oliveira R. B, Lima E. M. (2006). **Polímeros na Obtenção de Sistemas de Liberação de Fármacos.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, **3**: 29-35.
- 31 Santos-Magalhães NS, Pontes A, Pereira VMW, Caetano MNP. (2000). **Colloidal Carriers for Benzathine Penicilin G: Nanoemulsions and Nanocapsules.** *Int J Pharm*, **208**(1)-2):71-80.
- 32 Italia JL, Bhatt DK, Bhardwaj V, Tikoo K, Kumar MN. (2007). **PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Cyclosporine: Nephrotoxicity and Pharmacokinetic Studies in Comparison to Sandimmune Neoral.** *J Control Release*, **119**(2): 197-206.
- 33 Rezende CA, Duek EAR. (2003). **Blendas de Poli (Ácido Lático-co-ácido Glicólico)/Poli (Ácido Lático): Degradação *in Vitro*.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **13**: 36-44.
- 34 Soares AQ, Oliveira LF, Rabelo D, Souza AR. (2005). **Polímeros Biodegradáveis: Novas Perspectivas para as Ciências Farmacêuticas.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, **2**: 202-205.
- 35 Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Resolução RE no. 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil).

- 36 Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. (1997). **Validation of Bioanalytical Chromatographic Methods.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **17**: 193-218.
- 37 Ciola R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho - HPLC.** 1a. ed. Editora Edgar Blücher LTDA, 1998.
- 38 Collins CH, Braga GL, Bonato PS. **Introdução a Métodos Cromatográficos.** 6ª. ed. São Paulo: Editora da UNICAMP, 1995. cap. I, p. 11-28, cap. IX, p. 183-238.
- 39 Fuchs FD, Wannmacher L. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional.** 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 1-9, p. 1-60; cap. 33, p. 281-293; cap 64, p. 616-623.
- 40 Fukui H, Koike T, Nakagawa T, Saheki A, Sonoke S, Tomii Y, Seki J. (2003). **Comparison of LNS-AmB, a Novel Low-Dose Formulation of Amphotericin B with Lipid Nano-Sphere (LNS®), with Commercial Lipid-Based Formulations.** *International Journal of Pharmaceutics*, **267**: 101–112.
- 41 Gondal JA, Swartz RP, Rahman A. (1989). **Therapeutic Evaluation of Free and Liposome-Encapsulated Amphotericin B in the Treatment of Systemic Candidiasis in Mice.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **33**: 1544-1548.
- 42 Otsubo T, Maesaki S, Hossain MA, Yamamoto Y, Tomono K, Tashiro T, Seki J, Tomii Y, Sonoke S, Kohno S. (1999). **In Vitro and In Vivo Activities of NS-718, a New Lipid Nanosphere Incorporating Amphotericin B, Against *Aspergillus fumigatus*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 471-475.
- 43 Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. **Farmacologia.** 6ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap. 48, p. 1103-1118.
- 44 Silva P. **Farmacologia.** 6ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 5-14, p. 25-72; cap. 22-25, p.146-183; cap. 99-100, p. 992-1011; cap. 113, p. 1118-1127.

- 45 Yilma S, Liu N, Samoylov A, Lo T, Brinker CJ, Vodyanoy V. (2007). **Amphotericin B Channels in Phospholipid Membranes-Coated Nanoporous Silicon Surfaces: Implications for Photovoltaic Driving of Ions Across Membranes.** *Biosens Bioelectron*, **22(8)**: 1605-1611.
- 46 Shikanai-Yasuda MA, Telles FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML et al. (2006). **Consenso em Paracoccidioidomicose.** *Rev Soc Bras Medic Tropical*, **39 (3)**: 297-310.
- 47 Martinez R. (2006). **Atualização no Uso de Agentes Antifúngicos.** *J Bras Pneumol*, **32**: 449-460.
- 48 Lignell A, Johansson A, Lowdin E, Cars O, Sjolin J. (2007). **A New In-Vitro Kinetic Model to Study the Pharmacodynamics of Antifungal Agents: Inhibition of the Fungicidal Activity of Amphotericin B Against *Candida albicans* by Voriconazole.** *Clin Microbiol Infect*; **13**: 613–619.
- 49 Hong Y, Shaw PJ, Nath CE, Yadav SP, Stephen KR, Earl JW, McLachlan AJ. (2006). **Population Pharmacokinetics of Liposomal Amphotericin B in Pediatric Patients with Malignant Diseases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**:935-942.
- 50 Echevarría I, Barturen C, Renedo MJ, Dios-Viéitez MC. (1998). **High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Amphotericin B in Plasma and Tissue. Application to Pharmacokinetic and Tissue Distribution Studies in Rats.** *J Chromatographic A*, **819**:171-176.
- 51 Guyton. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1993, cap. 20-23, p. 167-198.
- 52 Risovic V, Boyd M, Choo E, Wasan KM. (2003). **Effects of Lipid-Based Oral Formulations on Plasma and Tissue Amphotericin B Concentrations and Renal Toxicity in Male Rats.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 3339-3342.

- 53 Yoo BK, Miah MAJ, Lee ES, Han K. (2006). **Reduced Renal Toxicity of Nanoparticulate Amphotericin B Micelles Prepared with Partially Benzylate Poli-L-Aspartic Acid.** *Biol. Pharm. Bull*, **29**: 1700-1705.
- 54 Khan MA, Owais M. (2006). **Toxicity, Stability and Pharmacokinetics of Amphotericin B in Immunomodulator Tuftsin-Bearing Liposomes in a Murine Model.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58**: 125-132.
- 55 Hossain MA, Maesaki S, Razzaque MS, Tomono K, Tagushi T, Kohno S. (2000). **Attenuation of Nephrotoxicity by a Novel Lipid Nanosphere (NS-718) Incorporating Amphotericin-B.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46**: 263-268.
- 56 Krejcirova L, Lauschova I, Horkya D, Doubek M, Mayer J, Doubek J. (2004). **Influence of Amphotericin B Deoxycholate or Amphotericin B Colloidal Dispersion on Renal Tubule Epithelium in Rat.** *Biomed. Papers*, **148(2)**: 221-223.
- 57 Lincopan N, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. (2005). **Low Nephrotoxicity of an Effective Amphotericin B Formulation with Cationic Bilayer Fragments.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **55**: 727-734.
- 58 Olson JA, Adler-Moore JP, Schwartz J, Jensen GM, Proffitt RT. (2006). **Comparative Efficacies, Toxicities, and Tissue Concentrations of Amphotericin B Lipid Formulations in a Murine Pulmonary Aspergillosis Model.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50(6)**: 2122-2131.
- 59 Kshirsagar NA, Pandya SK, Kirodian BG, Sanath S. (2005). **Liposomal Drug Delivery System from Laboratory to Clinic.** *J Postgrad Med*, **51**: 5-15.
- 60 Larabi M, Pages N, Pons F, Appel M, Gulik A, Schlatter J, Bouvet S, Barratt G. (2004). **Study of the Toxicity of a New Lipid Complex Formulation of Amphotericin B.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**: 81-88.

- 61 Lewis RE, Liao G, Hou J, Chamilos G, Prince RA, Kontoyiannis DP. (2007). **Comparative Analysis of Amphotericin B Lipid Complex and Liposomal Amphotericin B Kinetics of Lung Accumulation and Fungal Clearance in a Murine Model of Acute Invasive Pulmonary Aspergillosis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**: 1253-1258.
- 62 Groll AH, Lyman CA, Petraitis V, Petraitiene R, Armstrong D, Mickiene D, Alfaro RM, Schaufele RL, Sein T, Bacher J, Walsh TJ. (2006). **Compartmentalized Intrapulmonary Pharmacokinetics of Amphotericin B and its Lipid Formulations.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**: 3418-3423.
- 63 Manosroi A, Kongkaneramt L, Manosroi J. (2004). **Stability and Transdermal Absorption of Topical Amphotericin B Liposome Formulations.** *International Journal of Pharmaceutics*, **270**: 279–286.
- 64 Alexiou C, Jurgons R, Schmid R, Hilpert A, Bergemann C, Parak F, Iro H. (2005). **In Vitro and In Vivo Investigations of Targeted Chemotherapy with Magnetic Nanoparticles.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **293**: 389-393.
- 65 Vaughn JM, McConville JT, Burgess D, Peters JI, Johnston KP, Talbert RL, Williams III RO. (2006). **Single Dose and Multiple Dose Studies of Itraconazole Nanoparticles.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **63(2)**: 95-102.
- 66 Walsh TJ, Jackson AJ, Lee JW, Amantea M, Sein T, Bacher J, Zech L. (2000). **Dose-Dependent Pharmacokinetics of Amphotericin B Lipid Complex in Rabbits.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 2068-2076.
- 67 Allendoerfer R, Loebenberg D, Rinaldo MG, Graybill JR. (1995). **Evaluation of SCH51048 in an Experimental Model of Pulmonary Aspergillosis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 1345–1348.

- 68 De Azevedo M.M.M. (2003). **Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos.** *Monografia LQES – Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP.* Disponível em: <<http://lqes.iqm.unicamp.br>>. Acesso em 10 abr. 2007.
- 69 De Azevedo, M.M.M., Duran, N. (2003). **O que é Nanobiotecnologia? Atualidades e Perspectivas.** *Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica, UNICAMP.* Disponível em: <<http://lqes.iqm.unicamp.br>>. Acesso em: 15 jul. 2007.
- 70 Chiller TM, Sobel RA, Luque JC, Clemons KV, Stevens DA. (2003). **Efficacy of Amphotericin B or Itraconazole in a Murine Model of Central Nervous System *Aspergillus* Infection.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 813-815.
- 71 MacCallum DM, Odds FC. (2002). **Efficacy of Parenteral Itraconazole Against Disseminated *Candida albicans* Infection in Two Mouse Strains.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **50**: 225-229.
- 72 Yu BG, Okano T, Kataoka K, Kwon G. (1998). **Polymeric Micelles for Drug Delivery: Solubilization and Haemolytic Activity of Amphotericin B.** *Journal of Controlled Release*, **53**: 131-136.
- 73 Cabral, P.K.A. (2005). **Sistemas de Liberação Controlada de Drogas: Uma Revisão.** *Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.*
- 74 Echevarria I, Barturen C, Renedo MJ, Troconíz IF, Dios-Viéitez MC. (2000). **Comparative Pharmacokinetics, Tissue Distributions, and Effects on Renal Function of Novel Polymeric Formulations of Amphotericin B and Amphotericin B-Deoxycholate in Rats.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 898-904.
- 75 Adler-Moore J, Proffitt RT. (2002). **AmBisome: Liposomal Formulation, Structure, Mechanism of Action and Pre-Clinical Experience.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49**: 21-30.

- 76 Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. (2002). **Pharmacokinetics, Excretion, and Mass Balance of Liposomal Amphotericin B (AmBisome) and Amphotericin B Deoxycholate in Humans.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 828-833.
- 77 Groeschke J, Solassol I, Bressolle F, Pinguet F. (2006). **Stability of Amphotericin B and Nystatin in Antifungal Mouthrinses Containing Sodium Hydrogen Carbonate.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **42**: 362–366.
- 78 Vogelsinger H, Weiler S, Djanani A, Kountchev J, Bellmann-Weiler R, Wiedermann CJ, Bellmann R. (2006). **Amphotericin B Tissue Distribution in Autopsy Material after Treatment with Liposomal Amphotericin B and Amphotericin B Colloidal Dispersion.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**: 1153-1160.
- 79 Gubbins PO, Gurley BJ, Bowman J. (1998). **Rapid and Sensitive High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Itraconazole and its Hydroxy-Metabolite in Human Serum.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **16**: 1005–1012.
- 80 Machard S, Theodoro F, Benech H, Grognet JM, Ezan E. (2000). **A Sensitive Amphotericin B Immunoassay for Pharmacokinetic and Distribution Studies.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 546-550.
- 81 McConville JT, Overhoff KA, Sinswat P, Vaughn JM, Frei BL, Burgess DS, Talbert RL, Peters JI, Johnston KP, Williams III RO. (2006). **Targeted High Lung Concentrations of Itraconazole Using Nebulized Dispersions in a Murine Model.** *Pharmaceutical Research*, **23(5)**: 901-911.
- 82 Walker S, Tailor SAN, Lee M, Louie L, Louie M, Simor AE. (1998). **B in Lipid Emulsion: Stability, Compatibility, and In Vitro Antifungal Activity.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 762-766.

- 83 Sanders SW, Buchi KN, Goddard MS, Lang JK, Tolman KG. (1991). **Single-Dose Pharmacokinetics and Tolerance of a Cholesteryl Sulfate Complex of Amphotericin B Administered to Healthy Volunteers.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**: 1029-1034.
- 84 Schmaltz C, Santos JV, Guterres SS. (2005). **Nanocápsulas como uma Tendência Promissora na Área Cosmética: a Imensa Potencialidade Deste Pequeno Grande Recurso.** *Infarma*, **16**: 80-85.
- 85 Suri SS, Fenniri H, Singh B. (2007). **Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems.** *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, **2(16)**: 1-6.
- 86 Bressolle F., Bromet-Petit M., Audran M. (1996). **Validation of Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods. Applications to Pharmacokinetics.** *Journal Chromatography Biomedical Appl.* **686**(1):3-10.
- 87 Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D.L., McDowall, R.D. (1998). **Validation of Bioanalytical Chromatographic Methods.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **17**: 193–218.
- 88 Shah V.P., Midha K.K., Dighe, S., McGilveray I.J., Skelly J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., MacDowall, R.D. (1991). **Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies.** Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **16(4)**: 249-255.
- 89 Tessier E, Neirinck L, Zhu Z. (2003). **High-Performance Liquid Chromatographic Mass Spectrometric Method for the Determination of Ursodeoxycholic Acid and its Glycine and Taurine Conjugates in Human Plasma.** *Journal of Chromatography B*, **798**: 295–302.
- 90 Wang LH, Smith PC, Anderson KL, Fielding RM. (1992). **High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amphotericin B in Plasma, Blood, Urine and Tissues for Pharmacokinetic and Tissue Distribution Studies.** *J Chromatographic*, **579(2)**: 259-268.

- 91 Eldem T, Arican-Cellat N. (2001). **Determination of Amphotericin B in Human Plasma Using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25**: 53-64.
- 92 Espada R, Valdespina S, Molero G, Deac MA, Ballesteros MP, Torrado JJ. (2008). **Efficacy of Alternative Dosing Regimens of Poly-Aggregated Amphotericin B.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, **32**: 55-61.
- 93 Espada R, Josa J M, Valdespina S, Dea M A, Ballesteros M P, Alunda J M, Torrado J J. (2008). **HPLC Assay for Determination of Amphotericin B in Biological Samples.** *Biomedical Chromatography*, **22**: 402-407.
- 94 Hosotsubo H, Takezawa J, Taenaka N, Hosotsubo K, Yoshiya I. (1988). **Rapid Determination of Amphotericin B Levels in Serum by High-Performance Liquid Chromatography Without Interference by Bilirubin.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **32**: 1103-1105.
- 95 Adedoyin A, Bernardo JF, Swenson CE, Bolsack LE, Horwith G, Dewitt S, Kelly E, Klasterksy J, Sculier JP, DeVareliola D, Anassie E, Berestein GL, Cuentas AL, Boyle A, Branch RA. (1997). **Pharmacokinetic Profile of ABELCET (Amphotericin B Lipid Complex Injection): Combined Experience from Phase I and Phase II Studies.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 2201-2208.
- 96 Andes D, Safdar N, Marchillo K, Conklin R. (2006). **Pharmacokinetic Pharmacodynamic Comparison of Amphotericin B (AMB) and Two Lipid Associated AMB Preparations, Liposomal AMB and AMB Lipid Complex, in Murine Candidiasis Models.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**: 674-684.
- 97 Bach PR. (1984). **Quantitative Extraction of Amphotericin B from Serum and Its Determination by High-Pressure Liquid Chromatography.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **26**: 314-317.

- 98 Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. (2002). **Plasma Protein Binding of Amphotericin B and Pharmacokinetics of Bound versus Unbound Amphotericin B after Administration of Intravenous Liposomal Amphotericin B (AmBisome) and Amphotericin B Deoxycholate.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 834-840.
- 99 Campanero MA, Espuelas MS, Azanza JR, Irache JM. (2000). **Rapid Determination of Intramacrophagic Amphotericin B by Direct Injection HPLC.** *Chromatographia*, **52 (11/12)**: 827-830.
- 100 Gershkovich P, Wasan EK, Lin M, Sivak O, Leon CG, Clement JG, Wasan KM. (2009). **Pharmacokinetics and Biodistribution of Amphotericin B in Rats Following Oral Administration in a Novel Lipid-Based Formulation.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64**: 101-108.
- 101 Ramaswamy M, Peteherych KD, Kennedy AL, Wasan KM (2001). **Amphotericin B Lipid Complex or Amphotericin B Multiple-Dose Administration to Rabbits with Elevated Plasma Cholesterol Levels: Pharmacokinetics in Plasma and Blood, Plasma Lipoprotein Levels, Distribution in Tissues, and Renal Toxicities.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 1184-1191.
- 102 Takemoto K, Yamamoto Y, Ueda Y, Sumita Y, Yoshida K, Niki Y. (2006). **Comparative Study on the Efficacy of AmBisome and Fungizone in a Mouse Model of Pulmonary Aspergillosis.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**:724-731.
- 103 Mohanraj VJ, Chen Y. (2006). **Nanoparticles – A Review.** *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **5**: 561-573.
- 104 Okassa LN, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, et.,(2007). **Optimization of Iron Oxide Nanoparticles Encapsulation Withing Poly(d,l-Lactide-co-Glycolide) Sub-Micron Particles.** *Eur J Pharm Biopharm*, **67(1)**:31-8.

- 105 Deray G. (2002). **Amphotericin B Nephrotoxicity.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49**: 37-41.
- 106 Drumond WS, Wang SH, Mothé CG. (2004). **Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (Ácido Lático-B-Glicol Etilênico).** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **14(2)**: 74-79.
- 107 Howard C. Ansel, Nicholas G. Popovich, Loyd V. Allen Jr. (2000). **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.** 6ª.ed. São Paulo: Premier. Cap.2-4, p. 25-174, cap. 9, p. 373-396.
- 108 Monteil CG, Kergueris MF, Iooss P, Thomas L, Larousse C. (1998). **Quantitation of Amphotericin B in Plasma by Second-Derivative Spectrophotometry.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **17**: 481–485.
- 109 Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. (2008). **Nano/Micro Technologies for Delivering Macromolecular Therapeutics Using Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) and its Derivatives.** *Journal of Controlled Release*, **125**: 193–209.
- 110 Pavel G, Ellen K W, Molly L, Olena S, Carlos G L, John G C, Kishor M W. (2009). **Pharmacokinetics and Biodistribution of Amphotericin B in Rats Following Oral Administration in a Novel Lipid-Based Formulation.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, doi: 10.1093/jac/dkp 140, **64**: 101-108.
- 111 Wiederhold NP, Tam VH, Chi J, Prince RA, Kontoyiannis DP, Lewis RE. (2006). **Pharmacodynamic Activity of Amphotericin B Deoxycholate Is Associated with Peak Plasma Concentrations in a Neutropenic Murine Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**: 469-473.

ANEXO**ANEXO A – DECLARAÇÃO DE AVALIAÇÃO E APROVAÇÃO DO PROJETO
PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA), DO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (IB) DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB).**


Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal
Brasília, 28 de julho de 2008.
DECLARAÇÃO
Declaramos que o projeto intitulado " FARMACOCINÉTICA DA ANFOTERICINA B NANOENCAPSULADA EM POLÍMERO BIODEGRADÁVEL DE ÁCIDO POLILÁCTICO-POLIGLICÓLICO (PLGA) ", UNBDOC nº 92268/2007, sob responsabilidade do Prof. Ricardo Títze de Almeida, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.
 Prof. Antonio Sebben Coordenador do CEUA