



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Tese de Doutorado

Giovana Damasceno Sousa

Avaliação biofarmacotécnica e do potencial irritante de sistemas microemulsionados e convencionais contendo o óleo de *Syagrus cearensis* para administração tópica de Anfotericina B, utilizando métodos alternativos

Recife, 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Tese de Doutorado

Avaliação biofarmacotécnica e do potencial irritante de sistemas microemulsionados e convencionais contendo o óleo de *Syagrus cearensis* para administração tópica de Anfotericina B, utilizando métodos alternativos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Orientanda: M.Sc. Giovana Damasceno Sousa

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Recife, 2016.

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

S725a Sousa, Giovana Damasceno.
Avaliação biofarmacotécnica e do potencial irritante de sistemas microemulsionados e convencionais contendo o óleo de *Syagrus cearensis* para administração tópica de Anfotericina B, utilizando métodos alternativos / Giovana Damasceno Sousa. – 2016.
120 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Davi Pereira de Santana.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.

Inclui referências e apêndices.

1. Anfotericina B. 2. Administração tópica. 3. Técnicas in vitro. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-034)

GIOVANA DAMASCENO SOUSA

Avaliação biofarmacotécnica e do potencial irritante de sistemas microemulsionados e convencionais contendo o óleo de *Syagrus cearensis* para administração tópica de Anfotericina B, utilizando métodos alternativos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Leila Bastos Leal (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Danielle Cristine Almeida Silva de Santana (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Kátia Aparecida da Silva Aquino (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice – Reitor

Silvio Romero de Barros Marques

Diretor de Ciências da Saúde – CCS

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice – Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo de Faria

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Elba Lúcia Cavalcanti Amorim

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

*À minha avó, Zenaide (in memoriam),
por sempre me mostrar o verdadeiro
valor das coisas.*

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu sabedoria, força para alcançar meus objetivos e a oportunidade de conhecer tantas pessoas maravilhosas ao longo dessa caminhada.

À minha família, por ser a base, especialmente à minha mãe, Adalice, pelos incentivos, pelo amor e apoio incondicional de sempre.

À minha avó do coração, Belinha, por ser todo o exemplo de amor incondicional e bondade que existe.

À Profa. Leila, agradeço pela confiança, pela amizade, pelo carinho, pelo cuidado, pelas oportunidades e, principalmente, por ser a minha família em Recife, enfim, não há quem mereça mais agradecimentos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Davi Santana, pelo carinho, orientação dedicada, disponibilidade, confiança e por ser um exemplo a seguir.

Ao meu querido Raphael, por estar presente nos momentos mais importantes, por sempre acreditar em mim e por ser o maior incentivador.

À Juliana, por toda a colaboração na condução do trabalho e pela amizade, que tenho certeza será para toda a vida.

Aos amigos, Ana Rosa, Maria Alice, Noely, Karine, Thalita, Maira, Irla, Isabelle, Karol, Gustavo e Ellison pela amizade e pronta ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga, Rafaela, por sua disponibilidade para contribuir, aconselhar e apoiar, em especial, nos momentos de dificuldade.

Aos meus amigos Pedro, Homero, Virna, Sardón, Gean e Thaís pela disposição em ajudar em diversos momentos e pela paciência nas situações de estresse.

Às minhas amigas do coração Gérsica e Suzana pelo incentivo, parceria e acolhida.

A todos os funcionários da Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade por todo o apoio e torcida.

À Profa. Ana Amélia Lira, ao Prof. Victor Sarmiento e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas SP, Brasil), pela ajuda com as análises de SAXS, através da proposta nº 20150273.

Ao Victor pela força na extração no óleo e ao Cícero pela fundamental ajuda na aquisição do coco catolé.

À Profa. Kátia Aquino, agradeço por todos os ensinamentos e colaboração.

Aos funcionários do INCQS Octávio Presgrave, Isabella Delgado e Ronald Silva pela valorosa contribuição.

Ao matadouro de Paulista, em especial ao Dr. Sílvio, pela disponibilidade em ceder pele suína e olhos bovinos para a realização dos ensaios de permeação cutânea e BCOP, respectivamente.

Aos professores e funcionários do PPGCF-UFPE, especialmente Nerilin, pela disponibilidade e paciência.

À FACEPE pelo auxílio financeiro ao projeto e pela bolsa de estudos concedida.

“Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.”

Confúcio

RESUMO

A anfotericina B (AnB) é um antibiótico macrolídeo derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, de reconhecida atividade antifúngica e leishmanicida. No entanto, tem seu uso limitado em razão da elevada toxicidade. Para tentar reduzir essa toxicidade na forma convencional tem se estimulado o desenvolvimento de novos sistemas de liberação. A via tópica oferece algumas vantagens, todavia a eficácia tópica só é obtida quando o fármaco apresenta adequado grau de penetração na pele. As microemulsões (MEs) são uma proposta interessante para a veiculação por via tópica da AnB, pois atuam como promotores de permeação, devido ao reduzido tamanho das gotículas formadas, assim como pelo seu alto conteúdo de tensoativos, que desorganiza os lipídeos da pele. Além disso, as MEs podem proporcionar uma modificação na biodisponibilidade e na diminuição da toxicidade dos fármacos, visto que esses sistemas apresentam-se como reservatórios capazes de liberar e direcionar os fármacos para tecidos e células específicas do organismo. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e comparar as características biofarmacêuticas e potencial irritante de MEs e sistemas convencionais (SCs) contendo óleo de *Syagrus cearensis* para administração tópica de AnB. Diagramas de fase pseudo-ternários foram construídos utilizando o método de titulação de água para desenvolver as MEs e os SCs foram preparados de acordo com a técnica clássica de inversão de fase. No estudo de permeação e retenção cutânea, pele de porco dermatomizada sem estrato córneo foi utilizada como um modelo de biomembrana lesionado. O potencial de irritação foi avaliado utilizando três métodos alternativos, os ensaios da membrana corioalantóide (HET-CAM e CAM-TBS) e o teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP). A formulação otimizada (ME02) consistiu em Anfotericina B a 0,1% (p/p), óleo catolé 9,1% (p/p), Smix (1:1, Tween 20 e Kolliphor EL) 81%, tamanho de gotícula de $31,02 \pm 0,9$ nm, potencial zeta de -23,4 mV e viscosidade $0,63 \pm 0,1$ Pa.s. A ME02 exibiu maior retenção de AnB nas camadas de pele ($84,79 \pm 2,08$ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) do que todas as outras formulações. Em geral, as MEs apresentaram maior liberação e retenção do fármaco do que os SCs e todas as formulações mostraram maior retentividade que permeabilidade. Apenas as MEs desenvolvidas usando Labrasol/Plurol (L/PO) como par de tensoativos exibiram um potencial de irritação moderado, todas as outras formulações foram classificadas como não-irritantes ou levemente irritantes. Os resultados indicam que as formulações contendo óleo de *S. cearensis* são alternativas promissoras para a administração tópica da AnB visando o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chaves: Anfotericina B. Administração tópica. Técnicas *in vitro*.

ABSTRACT

Amphotericin B is a macrolide antibiotic derived from a strain of *Streptomyces nodosus*, known for its antifungal and antileishmanial activity. However, it has limited use due to the high toxicity. In order to reduce the toxicity in the conventional way, the development of new delivery systems has been stimulated. Topical administration of active drugs is a route that offers certain advantages, however, topical efficacy is only obtained from drugs with a suitable degree of penetration into the skin. Microemulsions are an interesting proposal for topical administration of Amphotericin B, because they act as permeation enhancers, due to the small size of the droplets formed, as well as to its high content of surfactants, which disrupts the skin lipids. Moreover, the MEs can also provide a change in bioavailability and by decreasing the toxicity of drugs, since such systems are presented as reservoirs capable of releasing drugs and targeting tissues and specific cells of the organism. Therefore, the aim of this study was to compare the biopharmaceutical characteristics and irritation potentials of microemulsions (MEs) and conventional systems (CSs) containing oil from *Syagrus cearensis* for intradermal delivery of Amphotericin B (AmB). Pseudo-ternary phase diagrams were constructed using a water titration method to develop the MEs, and the CSs were prepared according to the classical technique of phase inversion. In the skin permeation and retention study, dermatomed pig skin without stratum corneum was used as an alternative disturbed skin model. The irritation potential was evaluated using three different methods, chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS), and bovine corneal opacity and permeability test (BCOP). The optimized formulation (ME02) consisting of 0.1% (w/w) Amphotericin B, 9.1% (w/w) catolé oil, 81% (w/w) Smix (1:1, Tween 20 and Kolliphor EL) possessed droplet size of 31.02 ± 0.9 nm, zeta potential of -23.4 mV and viscosity 0.63 ± 0.1 Pa.s. ME02 exhibited greater retention of AmB in to skin layers (84.79 ± 2.08 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) than all the others formulations. In general, MEs showed higher drug release and retention than CSs and all of the formulations showed greater retentivity than permeability. Only MEs developed using Labrasol/Plurol Oleique (L/PO) as the surfactant and co-surfactant exhibited a moderate irritation potential, all other MEs and CSs were classified as non-irritants or slight irritants. The results indicate that formulations containing oil from *S. cearensis* are promising alternatives for the delivery of AmB targeting the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Amphotericin B. Topical administration. *In Vitro* techniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da Anfotericina B	27
Figura 2 – a) Coco catolé; b) Palmeira <i>Syagrus cearensis</i>	31
Figura 3 – Lesões causadas pela Leishmaniose Tegumentar Americana	33
Figura 4 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Kolliphor [®] /Tween 20 [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 1:1.....	55
Figura 5 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Kolliphor [®] /Tween 20 [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 2:1.....	55
Figura 6 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Kolliphor [®] /Tween 20 [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 5:1.....	56
Figura 7 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Labrasol [®] /Plurol Oleique [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 1:1.....	56
Figura 8 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Labrasol [®] /Plurol Oleique [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 2:1.....	57
Figura 9 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Labrasol [®] /Plurol Oleique [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 5:1.....	57
Figura 10 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20 [®] /Span 80 [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 1:1.....	58
Figura 11 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20 [®] /Span 80 [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 2:1.....	58
Figura 12 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20 [®] /Span 80 [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 5:1.....	59
Figura 13 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20 [®] /Labrasol [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 1:1.....	59
Figura 14 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20 [®] /Labrasol [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 2:1.....	60
Figura 15 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20 [®] /Labrasol [®] , óleo de catolé e água para proporções T:CO 5:1.....	60
Figura 16 – Fotomicrografias obtidas utilizando microscópio de luz polarizada.....	67
Figura 17 – Curvas de fluxo de microemulsões contendo de AnB (0,1%).....	68
Figura 18 – Curvas de fluxo de emulgel (SC1) e emulsão (SC2) contendo de AnB (0,1%)....	68
Figura 19 – Espectro de SAXS das microemulsões desenvolvidas.....	70

Figura 20 – Curva de Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração.....	71
Figura 21 – Cromatograma referente ao ponto 15 µg/mL da curva padrão.....	71
Figura 22 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações estudadas utilizando membrana sintética de ésteres de celulose 0,45 µm.....	74
Figura 23 – Perfil de permeação <i>ex vivo</i> das formulações estudadas utilizando membrana natural sem estrato córneo.....	75
Figura 24 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> comparativo entre as microemulsões ME02 e ME12 utilizando membrana sintética de ésteres de celulose 0,45 µm.....	76
Figura 25 – – Perfil de permeação <i>ex vivo</i> comparativo entre as microemulsões ME02 e ME12 utilizando membrana natural sem estrato córneo.....	77
Figura 26 – Retenção cutânea de formulações tópicas contendo AnB 0,1%.....	78
Figura 27 – – Ensaio de permeação cutânea: a) Sistema de difusão em células de Franz automatizadas; b) membrana sintética ésteres de celulose 0,45µm; c) pele dermatomizada; d) Tewameter® TM 300.....	84
Figura 28 – Teste HET-CAM: a) Incubadora de ovos; b) lupa iluminadora e suporte; c) CAM após contato com produto irritante; d) CAM após contato com produto irritante leve.....	90
Figura 29 – Teste BCOP: a) Opacitômetro BASF-3.0; b) Suporte de córneas; c) Excisão das córneas; d) Córneas excisadas.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos Alternativos reconhecidos pelo CONCEA – RN 18/2014.....	35
Tabela 2 – Métodos Alternativos reconhecidos pelo CONCEA – RN 31/2016.....	36
Tabela 3 – Meios utilizados no estudo de solubilidade do fármaco.....	42
Tabela 4 – Composição centesimal das formulações convencionais.....	43
Tabela 5 – Fórmulas utilizadas para obtenção de parâmetros físico-químicos através da utilização de espectros integrados de RMN H ¹	47
Tabela 6 – Solubilidade da Anfotericina B em óleos, tensoativos e cotensoativos.....	55
Tabela 7 – Composição das formulações obtidas nos diagramas pseudoternários.....	62
Tabela 8 – Máxima incorporação de Anfotericina B nas microemulsões	62
Tabela 9 – Condutividade elétrica e pH das formulações.....	64
Tabela 10 – Tamanho das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta (n=3)	66
Tabela 11 – Viscosidade das formulações.....	68
Tabela 12 – Caracterização físico-química do óleo de catolé.....	73
Tabela 13 – Solubilidade da Anfotericina B em diferentes meios receptores.....	75
Tabela 14 – Quantidade permeada após 24h (Q ₂₄ ± D.P.), Fluxo ± D.P (J) e Kp de Anfotericina B 0,1% nas microemulsões, emulgel e emulsão.....	78
Tabela 15 – Recuperação da Anfotericina B nas peles utilizadas.....	79
Tabela 16 – Resultados dos estudos de estabilidade as formulações contendo 0,1% de AnB quando armazenadas à 5 ± 2°C.....	86
Tabela 17 – Resultados dos estudos de estabilidade as formulações contendo 0,1% de AnB quando armazenadas à 25 ± 2°C.....	87
Tabela 18 – Resultados dos testes HET-CAM e CAM-TBS (média ± D.P).....	89
Tabela 19 – Resultados do teste BCOP (média ± D.P).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnB – Anfotericina B

BCOP – *Bovine Corneal Opacity and Permeability*

HET-CAM – *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*

CAM-TBS – *Chorioallantoic Membrane – Trypan Blue Staining*

DFPT – Diagramas de fase pseudoternários

RE – Resolução

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

F. BRAS – Farmacopéia Brasileira

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta

UV – ultravioleta

VIS - visível

BHT – butilhidroxitolueno

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Prótons

ANOVA – análise de variância

O/A – óleo em água

A/O – água em óleo

A/O/A – água em óleo em água

O/A/O – óleo em água em óleo

V - Teor de hidrogênios vinílicos (V)

MM – Massa Molar

II – Índice de Iodo

IS – índice de Saponificação

Ro/a – Estado de Oxidação

IA – Índice de Acidez

KOH – Hidróxido de Potássio

EHL – Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo

MEs – Microemulsões

SCs – Sistemas Convencionais

LISTA DE SÍMBOLOS

μg – micrograma

μm - micrometro

L – litro

mL - mililitro

mg – miligrama

g – grama

nm - nanômetro

mm – milímetro

cm – centímetro

h – hora

min – minuto

% – porcentagem

M – molar

T - temperatura

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

pH – potencial hidrogeniônico

J – fluxo

m – massa de fármaco

K_p – coeficiente de permeabilidade

v – volume

s – segundo

s^{-1} – segundo recíproco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3.1 Anfotericina B.....	27
3.2 Microemulsões.....	28
3.3 Catolé (<i>Syagrus cearensis</i>)	30
3.4 Leishmaniose Tegumentar Americana	31
3.5 Métodos Alternativos	33
3.5.1 <i>Absorção Cutânea: método in vitro (OECD TG 428)</i>	36
3.5.2 <i>Ensaio em membrana cório-alantóide (HET-CAM e CAM-TBS)</i>	37
3.5.3 <i>Teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP)</i>	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Materiais.....	41
4.2 Equipamentos.....	41
4.3 Solubilidade da Anfotericina B em tensoativos, cotensoativos e óleos.....	41
4.4 Desenvolvimento dos diagramas de fase pseudoternários.....	42
4.5 Máxima incorporação de Anfotericina B nas microemulsões.....	42
4.6 Preparação das microemulsões e sistemas convencionais	43
4.7 Caracterização das microemulsões desenvolvidas e sistema convencional.....	43
4.7.1 <i>Centrifugação</i>	44
4.7.2 <i>Determinação da condutividade elétrica</i>	44
4.7.3 <i>Teste de Solubilidade em Corante</i>	44
4.7.4 <i>Determinação do pH</i>	44
4.7.5 <i>Determinação do potencial zeta e tamanho das gotículas</i>	44
4.7.6 <i>Microscopia de luz polarizada</i>	44
4.7.7 <i>Viscosidade e Reologia</i>	44
4.7.8 <i>Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)</i>	44
4.8 Avaliação da estabilidade das formulações.....	45
4.9 Quantificação e validação de método para doseamento de Anfotericina B.....	45
4.10 Caracterização físico-química do óleo de catolé (<i>Syagrus cearensis</i>).....	46

4.11 Estudos de liberação <i>in vitro</i> , permeação e retenção cutânea <i>ex vivo</i>	46
4.11.1 Seleção das formulações.....	46
4.11.2 Seleção do meio receptor.....	47
4.11.3 Cinética de liberação <i>in vitro</i>	47
4.11.4 Permeação cutânea <i>ex vivo</i>	47
4.11.5 Montagem do sistema automatizado de células de difusão.....	47
4.11.6 Coleta e Quantificação das Amostras.....	48
4.11.7 Análise dos perfis de permeação cutânea <i>ex vivo</i>	48
4.11.8 Estudo de retenção cutânea.....	48
4.11.9 Recuperação cutânea de Anfotericina B.....	48
4.11.10 Avaliação da influência do óleo de catolé na liberação e permeação de Anfotericina B a partir das microemulsões.....	49
4.12 Avaliação do Potencial Irritante.....	49
4.12.1 Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).....	50
4.12.2 Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining (CAM-TBS).....	50
4.12.3 Opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP).....	50
4.13 Análises estatísticas.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Solubilidade da Anfotericina B em tensoativos, cotensoativos e óleos.....	53
5.2 Desenvolvimento dos diagramas de fase pseudoternários.....	54
5.3 Máxima incorporação de Anfotericina B nas microemulsões.....	61
5.4 Caracterização das microemulsões desenvolvidas e sistemas convencionais.....	62
5.4.1 Centrifugação.....	63
5.4.2 Determinação da condutividade elétrica e pH das formulações	63
5.4.3 Determinação do potencial zeta e tamanho das gotículas.....	64
5.4.4 Teste de Solubilidade em Corante.....	66
5.4.5 Microscopia de luz polarizada.....	66
5.4.6 Viscosidade e Reologia.....	67
5.4.7 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	69
5.5 Quantificação e validação de método para doseamento de Anfotericina B.....	70
5.6 Caracterização fisico-química do óleo de catolé (<i>Syagrus cearensis</i>).....	71
5.7 Estudos de liberação <i>in vitro</i> , permeação e retenção <i>ex vivo</i> de formulações tópicas contendo Anfotericina B.....	73
5.8 Estabilidade das formulações.....	84

5.9 Avaliação do potencial irritante	86
6. CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	96
APÊNDICE.....	111

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Anfotericina B é um antibiótico macrolídeo derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus* (CARVALHO et al., 2013; CHUDZIK et al., 2013), que possui atividade antifúngica e leishmanicida. A *Leishmania* e os fungos possuem ergosterol como principal esteróide na membrana plasmática, logo, a anfotericina liga-se ao ergosterol levando à formação de poros através das membranas lipídicas. A alteração da permeabilidade celular permite o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, levando à morte da célula (LIMA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2010).

Seu uso na forma convencional é limitado pelos efeitos adversos, dentre eles, náusea, vômito, febre, hipotensão e, principalmente, pela nefrotoxicidade (CABRALES-VARGAS; LANIADO-LABORÍN, 2009). A Anfotericina B (AnB) lipossomal é incorporada pelo macrófago onde se abriga o parasito, praticamente não reagindo com o colesterol das células do hospedeiro, aumentando a eficácia e tolerabilidade do fármaco. Assim, as formulações lipídicas da AnB têm baixa nefrotoxicidade e podem ser utilizadas em doses altas por curto tempo (MARTINEZ, 2006).

A baixa solubilidade da AnB em meio aquoso, sua alta toxicidade nas dispersões convencionais e a baixa taxa de absorção por via oral tem estimulado o desenvolvimento de novos sistemas de administração deste fármaco (CABRALES-VARGAS; LANIADO-LABORÍN, 2009).

A via tópica, por sua vez, tem sido considerada uma alternativa de interesse para a administração de fármacos, uma vez que oferece diversas vantagens, como a ausência de efeito de primeira passagem, o fato de ser indolor e a facilidade de aplicação, além de apresentar alta adesão por parte dos pacientes (WILLIAMS, 2003).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa que afeta a pele e membranas mucosas e apresenta lesões ulceradas, nódulos e únicas ou múltiplas lesões com bordas elevadas bem definidas que aparecem em várias áreas do corpo, especialmente no rosto (BASANO; CAMARGO, 2004; RAMOS-E-SILVA; JACQUES, 2002; RIBEIRO et al., 2016). A proliferação do parasita ocorre na derme e a intensidade depende da espécie e do estado imunológico do hospedeiro (HEPBURN, 2000). Os medicamentos atualmente utilizados para o tratamento de LTA não são eficazes e nenhuma vacina está disponível (LAUNOIS et al., 2008).

Diversos estudos clínicos mostraram a efetividade da AnB lipossomal no tratamento da LTA. No entanto, mesmo com a redução da toxicidade da AnB na forma lipossomal, em relação à desoxicolato, esses estudos reportaram um alto percentual de efeitos adversos, um longo período de tratamento e a necessidade de administração intravenosa, o que aumenta o custo e reduz a adesão ao tratamento (MOTTA; SAMPAIO, 2012; SOLOMON et al., 2011). Um método alternativo para tratar a LTA seria um agente tópico com alta retentividade e baixa permeabilidade através da pele, proporcionando, assim, que o fármaco seja retido na epiderme e derme, sem atingir níveis plasmáticos significativos, reduzindo os efeitos adversos relacionados com a toxicidade da AnB.

Os estudos *in vitro* utilizando células de difusão de Franz são uma ferramenta valiosa e determinante na avaliação do comportamento de formulações de uso tópico, em virtude das inúmeras variáveis que comprometem o processo de fabricação (SANTES, 2008; SATO, 2007). Os estudos *ex vivo* permitem uma melhor compreensão dos fatores relacionados com a liberação do fármaco, incluindo forma farmacêutica, retenção e permeação. Embora estes ensaios possam ser realizados com diferentes biomembranas, a pele de porco tem sido amplamente utilizada devido à sua similaridade com a pele humana e fácil disponibilidade, uma vez que é um subproduto da indústria de alimentos (BARBERO; FRASCH, 2009). Para a condução adequada de tais estudos alguns parâmetros devem ser cuidadosamente avaliados, dentre eles, a espessura e integridade da pele (NETZLAFF et al., 2005).

Medicamentos para aplicação tópica são geralmente testados em modelos de pele saudável, entretanto, o estrato córneo, principal barreira à penetração de substâncias através da pele, é frequentemente lesionado por afecções tópicas, como por exemplo nos casos das lesões causadas pela leishmaniose. Desta forma, se faz necessária a utilização de modelos de pele adequados quando se pretende avaliar a permeação de fármacos utilizados para tratar afecções que causam lesões na pele (DANCIK et al., 2015; SCHLUPP et al., 2014).

Atualmente, novos veículos para a aplicação tópica de fármacos têm sido desenvolvidos com o objetivo de permitir o tratamento de lesões cutâneas persistentes que não respondem aos tratamentos tradicionais.

Microemulsões (MEs) são sistemas transparentes, nos quais um óleo ou um fármaco é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo associado ou não, a um cotensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (DAMASCENO et al., 2011). Estes sistemas apresentam capacidade de se formarem espontaneamente, podendo existir sob várias formas estruturais e atuam como promotores de permeação de vários

fármacos, devido ao reduzido tamanho das gotículas formadas, assim como ao seu alto conteúdo de tensoativo que desorganiza os lipídeos da pele (SILVA et al., 2009). Dessa forma, correspondem a uma alternativa promissora para melhorar a biodisponibilidade e diminuir os efeitos adversos causados pelo uso da AnB. Os sistemas lipídicos convencionais (SCs), tais como emulgéis e emulsões também podem fornecer uma alternativa de baixo custo para a aplicação tópica da AnB visando o tratamento da leishmaniose cutânea.

Geralmente, os óleos e os agentes tensoativos são utilizados no desenvolvimento de emulsões, emulgéis e MEs. Os óleos vegetais têm um certo número de vantagens em comparação aos óleos minerais; são menos tóxicos, biodegradáveis e renováveis, enquanto que os produtos derivados de petróleo são finitos (DOSSAT et al., 2002).

O Catolé (*Syagrus cearensis* Noblick) é uma palmeira brasileira a partir da qual é extraído um óleo contendo um elevado teor de ácidos graxos saturados e insaturados, incluindo os ácidos oleico, linoleico e ácido palmítico (NASCIMENTO et al., 2011; NOBLICK, 2004). Estes ácidos graxos conferem aos óleos fixos propriedades emolientes, quando incorporado em formulações tópicas (LEAL et al., 2013). Essa palmeira tem sido extensivamente utilizada para fins ornamentais e o seu óleo utilizado popularmente para tratar diversas doenças, incluindo erisipela (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2011).

Ensaio biológico para avaliação da eficácia e segurança devem preceder a inserção de um produto no mercado. A avaliação do potencial irritante de uma substância é realizada com o objetivo de prever os efeitos nocivos que a mesma poderá desencadear quando da exposição humana pelas diversas vias. Para cumprir este propósito, o modelo animal é o mais utilizado e requerido nos processos investigativos. Entretanto, a utilização de animais na pesquisa tem sido razão de diversas discussões em função do grande número necessário e do sofrimento causado aos mesmos (SCHEEL et al., 2011).

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados para obtenção de métodos *in vitro*, que possam ser utilizados como substitutos dos testes em animais. O teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) e o teste da membrana cório-alantóide do ovo de galinha (HET-CAM) e sua variação o CAM-TBS, são métodos *in vitro* reconhecidos internacionalmente para avaliação de potencial irritante (ICCVAM, 2010; WILSON et al., 2015). O BCOP baseia-se na avaliação do potencial irritativo e tóxico através da opacidade da córnea bovina por desnaturação proteica, precipitação celular ou indução de inchaço estromal ou pela permeabilidade corneal à fluoresceína com perda da membrana celular e barreira do epitélio da córnea (SCOTT et al., 2010). Os métodos HET-CAM e CAM-TBS visam

identificar e avaliar o potencial irritante de um produto ou substância química, sobre a Membrana Córion-alantóide (CAM) do ovo embrionado da galinha, no décimo dia de incubação (TAVASZI, BUDAI, 2007).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi desenvolver microemulsões e sistemas convencionais contendo o óleo de *S. cearensis* para a administração tópica de AnB visando o tratamento da leishmaniose cutânea, avaliar a sua liberação, permeação, retenção e potencial de irritação utilizando os métodos alternativos descritos acima.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação biofarmacotécnica e do potencial irritante de sistemas microemulsionados e convencionais contendo o óleo de *Syagrus Cearensis* para administração tópica de Anfotericina B, utilizando métodos alternativos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e utilizar diagramas pseudoternários para obtenção e identificação de regiões de microemulsões;
- Desenvolver sistemas convencionais, emulsões e emulgéis, para veiculação tópica de Anfotericina B.
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o doseamento da Anfotericina B por CLAE-DAD;
- Avaliação da incorporação máxima de Anfotericina B nas microemulsões;
- Caracterizar os sistemas obtidos utilizando os seguintes parâmetros: condutividade elétrica, pH, potencial zeta, tamanho de gotícula, microscopia de luz polarizada e espalhamento de Raio-X de Baixo Ângulo (SAXS);
- Realizar caracterização físico-química do óleo de catolé (*Syagrus cearensis*);
- Avaliar a estabilidade das microemulsões e sistemas convencionais desenvolvidos;
- Avaliar taxa de liberação *in vitro* de Anfotericina B a partir das microemulsões e sistemas convencionais;
- Avaliação *ex vivo* da permeação e retenção cutânea de Anfotericina B a partir das microemulsões e sistemas convencionais utilizando modelo de biomembrana lesionada;
- Avaliar o potencial irritante das microemulsões e sistemas convencionais utilizando os testes em membrana corioalantóide HET-CAM e CAM-TBS;
- Avaliação do potencial irritante das microemulsões e sistemas convencionais utilizando o teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP);
- Avaliar a correlação entre os métodos propostos para determinação de potencial irritante.

REVISÃO DE LITERATURA

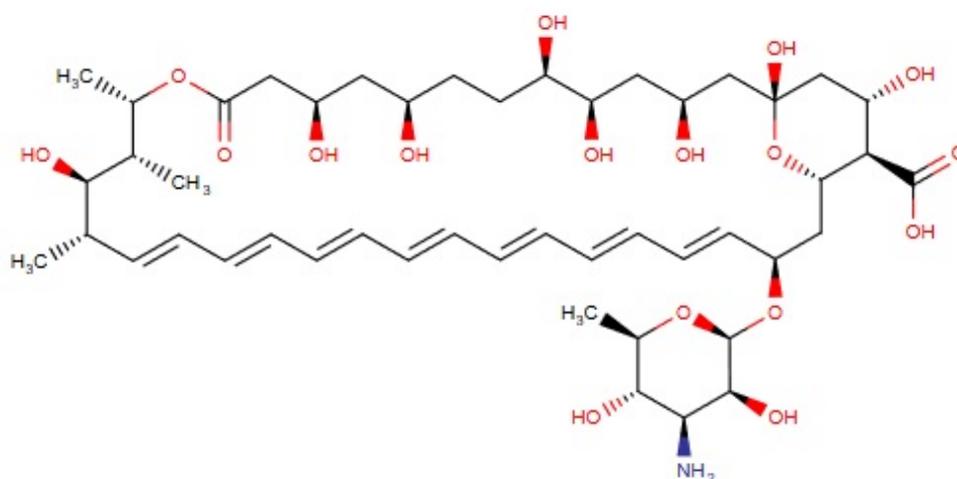
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anfotericina B

A Anfotericina B (AnB) é um antibiótico poliênico macrocíclico (Figura 1) produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* que foi inicialmente isolado em meados de 1955 (FILLIPIN; SOUZA, 2006). Trata-se de um dos agentes antifúngicos mais utilizados na prática clínica por apresentar potente ação fungicida. Sendo, também, utilizado clinicamente no tratamento de leishmanioses resistentes ao tratamento com antimoniais (YARDLEY; CROFT, 2000).

O nome Anfotericina deriva da característica anfotérica de sua estrutura molecular, apresenta características hidrofóbicas, em decorrência da parte apolar de sua molécula e características hidrofílicas, decorrentes da presença de inúmeros grupos hidroxilas, além disso, possui grupos carboxílico e amino, que lhe conferem propriedades anfifílicas (DORA, SOUZA, 2005; FILIPPIN, SOUZA, 2006; SILVEIRA, 2013).

Figura 1 – Estrutura química da Anfotericina B (DRUGBANK, 2016).



Apresenta-se como um pó amarelo alaranjado, que apresenta baixíssima solubilidade na maioria dos solventes, com exceção de dimetilsulfóxido (DMSO) e da dimetilformamida. O fármaco é sensível à luz, ao calor e ao pH abaixo de 6 e acima de 9 (FRANZINI, 2006). Esta baixa solubilidade leva a permeabilidade em membrana e biodisponibilidade limitadas, o que dificulta o desenvolvimento de formulações por via oral, que é a via mais conveniente e aceitável para os pacientes (SILVA et al., 2013) e, por isso, requer estratégias de formulação complexas para administração parenteral. (GANGADHAR et al., 2014).

O principal mecanismo de ação da Anfotericina B consiste na habilidade que sua molécula possui em interagir com os esteróis da membrana, colesterol das membranas

plasmáticas de células animais e o ergosterol das membranas celulares fúngicas, e formar, com isso, canais, na qual há a liberação de constituintes internos. Esta liberação, seguida de um desequilíbrio na atividade enzimática das membranas afeta, conseqüentemente, a vida celular (ARAÚJO et al., 2005; FILIPPIN, SOUZA, 2006; NASCIMENTO et al., 2010).

No entanto, por tal ação não ser exclusiva às células fúngicas, seu uso é limitado, muitas vezes, sendo necessária a interrupção do tratamento em razão dos graves efeitos adversos, como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsão, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia (GIANNINI et al., 2004; MARTINEZ, 2006).

Na tentativa de diminuir a nefrotoxicidade da Anfotericina B na sua formulação convencional, AnB-desoxicolato (Fungizone[®]), formulação que está disponível desde 1960 e é uma dispersão coloidal da AnB, e aumentar o seu potencial efeito terapêutico tem se incentivado o desenvolvimento de novos sistemas de liberação, como por exemplo, dispersões sólidas, lipossomas, emulsões lipídicas, nanocápsulas, AnB em cristais líquidos, nanopartículas lipídicas sólidas e complexos de AnB com íons específicos (GOLA et al., 2016; GANGADHAR et al., 2014; PESTANA et al., 2008).

Formulações lipídicas de anfotericinaB, dentre elas a Anfotericina B lipossomal (Ambisome[®]), complexo lipídico de AnB (ABLC, Abelcet[®]) e dispersão coloidal de AnB (ABCD, Amphocil[®]) são mais seguras do que a Anfotericina B desoxicolato porque são menos nefrotóxicas e podem alcançar uma maior concentração em alguns tecidos, incluindo o sistema nervoso central. Estas formulações são a primeira opção no tratamento de várias micoses sistêmicas, como a histoplasmose grave, mucormicose e criptococose, no entanto, todas requerem administração parenteral (PEÇANHA et al., 2016).

3.2 Microemulsões

As microemulsões (MEs) foram descritas inicialmente por Hoar e Schulman em 1943 e definidas como sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água (DAMASCENO et al., 2011; FORMARIZ et al., 2005).

Para delinear um sistema microemulsionado, o desenvolvimento e o estudo de diagramas de fase pseudoternários mostram-se uma ferramenta extremamente importante. Geralmente, os diagramas são construídos para determinar a proporção das fases oleosa,

aquosa e de tensoativos que farão parte da ME. Assim, água, óleo e uma proporção de dois tensoativos são representados em cada vértice do diagrama (DAMASCENO et al., 2011).

A mistura dos componentes da fase aquosa, fase oleosa, tensoativo e cotensoativo, na região de ME de um diagrama de fases, é capaz de formar diferentes estruturas internas. A estrutura formada é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos componentes utilizados e da razão entre os componentes. Quando a fase aquosa é a interna, dispersa ou descontínua, ao passo que o óleo compõe a fase externa, dispersante ou contínua, o sistema é conhecido como sendo do tipo A/O. Inversamente, quando moléculas lipossolúveis estão localizadas no interior das gotículas esféricas de óleo e envolvidas por moléculas de tensoativos em um meio contínuo de água, esse sistema é conhecido como sendo do tipo O/A (SILVA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2013; ZHAO et al., 2011).

Atualmente, inúmeros fármacos são veiculados em formas farmacêuticas ditas convencionais e geralmente não conseguem atingir concentrações apreciáveis no tecido alvo do organismo porque, entre o local de aplicação e o alvo onde deve exercer seu efeito farmacológico, interpõem-se uma série de barreiras biológicas, as quais expõem os tecidos normais do organismo aos efeitos potencialmente tóxicos do fármaco (DALMORA et al., 2001).

Comparando as microemulsões com as formulações convencionais, as MEs apresentam várias vantagens, melhoraram a solubilidade do fármaco, apresentam estabilidade termodinâmica, facilidade de obtenção e aumento na biodisponibilidade transdérmica de fármacos, em razão da grande quantidade de tensoativos presentes em sua formulação, a interação com o estrato córneo em que a bicamada lipídica seria desestruturada e a permeabilidade dos fármacos facilitada. Ainda, são sistemas adequados para veiculação tanto de fármacos solúveis em água, quanto insolúveis. Portanto, trata-se de um promissor veículo para administração tópica de medicamentos (SAHOO et al., 2014; SHAH et al., 2009; SILVA et al., 2009).

É possível estabelecer claramente diferenças entre uma ME e uma emulsão. A tensão interfacial de uma ME é muito baixa quando comparada com a tensão interfacial de uma emulsão, o que pode levar a formação espontânea das MEs e, conseqüentemente, a um pequeno tamanho das gotículas. Enquanto isso, as emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica (DAMASCENO et al., 2011; FORMARIZ et al., 2005; YUAN, 2009).

3.3 Catolé (*Syagrus cearensis*)

O Brasil possui uma grande biodiversidade distribuída em diferentes biomas, como por exemplo, Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. No entanto, apesar desta biodiversidade, a maioria das espécies permanece não cultivadas e poucas pesquisas científicas têm sido conduzidas para descrever tal diversidade. Estima-se que apenas 5% das espécies conhecidas tenham sido investigadas quanto ao potencial agrônomo, fitoquímico e biológico (MEDINA et al., 2011; BESKOW et al., 2015).

A região Nordeste do Brasil tem a maior parte de seu território ocupado pela caatinga que se caracteriza por ser uma vegetação xerófila, de fisionomia e florística variada (OLIVEIRA et al., 2009).

O Catolé (*Syagrus cearensis* Noblick) é uma palmeira pertencente à família *Arecaceae* típica da Caatinga do Nordeste brasileiro, é cultivado mais comumente nos estados Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco (NOBLICK, 2004).

O *Syagrus Cearensis* possui, normalmente, cerca de 3 a 5 metros, podendo chegar a medir 10 metros de altura. As flores são pequenas, reunidas em cachos que surgem predominantemente de maio a agosto, embora floresça e frutifique durante todo o ano, amadurecem no período de outubro a dezembro. Os frutos têm cerca de 5cm de comprimento e possuem um sabor adocicado, sendo consumidos *in natura* (LORENZI et al., 2004; LORENZI et al., 2010).

A partir do coco catolé é extraído um óleo, cerca de 70g/100g de coco, contendo um elevado teor de ácidos graxos saturados e insaturados, incluindo os ácidos oleico, linoleico e palmítico (NASCIMENTO et al., 2011; NOBLICK, 2004). Estes ácidos graxos conferem aos óleos fixos propriedades emolientes, quando incorporados em formulações tópicas (LEAL et al., 2013).

É comum o uso das folhas do catolé para a produção de artefatos como vassouras, chapéus, bolsas, abanadores e para outros propósitos ornamentais (SOUTO, 2014). O óleo do coco catolé é utilizado tanto na culinária quanto em cosméticos, terapêuticamente, de forma popular, é utilizado para tratamento do estômago, erisipela, diarreia e também como diurético (FERREIRA-JÚNIOR ET al., 2011; ROSA et al., 2015; RUFINO et al., 2008). No entanto, não há na literatura, relatos da utilização deste como constituinte farmacêutico e/ou cosmético.

Figura 2 – a) Coco catolé (NASCIMENTO et al., 2011); b) Palmeira *Syagrus cearensis* (SILVA, 2012).



3.4 Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa crônica não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania* da família *Trypanosomatidae* (COELHO et al., 2016). É uma doença negligenciada de impacto global na saúde pública. Estima-se que, a cada ano, cerca de 1,5 milhões adquirem a doença (ESPIR et al., 2016).

Essa infecção é caracterizada por úlceras cutâneas que podem se espalhar e causar destruição tecidual do nariz e da boca (Figura 3), considerada uma doença tropical negligenciada e uma grave ameaça para a saúde global devido à sua expansão contínua, é favorecida pelo ciclo de vida do seu organismo causador que é mantido em reservatórios de animais domésticos e espécies antropofílicas de moscas de areia (COSTA et al., 2016; LIMA et al., 2016).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelas deformidades que pode produzir no ser humano, e também, pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição, com registro de casos em todas as regiões brasileiras, no entanto, com maior prevalência nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2010).

A administração parenteral de compostos antimoniais pentavalentes permanece como a terapia de primeira escolha para todas as formas de leishmaniose (DESJEUX et al., 2004). A quimioterapia oral da leishmaniose consiste na administração dos antimoniais, miltefosina e

paromomicina, por cerca de três semanas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). Contudo, a resistência e a elevada frequência dos efeitos secundários são ainda problemas relevantes associados a esses tratamentos. A anfotericina B é uma terapia de segunda linha útil para o tratamento da leishmaniose, em caso de falhas no tratamento com os compostos antimoniais, sendo administrada atualmente em um ambiente de internação, necessitando de infusão ao longo de várias horas devido ao seu potencial para gerar nefrotoxicidade aguda e hemólise (MATLASHEWSKI et al., 2011).

A resistência aos antimoniais é crescente e a inclusão da anfotericina B lipossomal no tratamento é cada vez mais recomendada (BALASEGARAM et al., 2012). Estudos recentes têm mostrado a eficácia da AnB lipossomal no tratamento da LTA. No entanto, mesmo com a redução da toxicidade da AnB na forma lipossomal, em relação à forma convencional, desoxicolato de sódio, os estudos reportaram um alto percentual de efeitos adversos e um longo período de tratamento (SOLOMON et al., 2011; MOTTA; SAMPAIO, 2012). Mesmo na forma lipossomal, a AnB é administrada por infusão intravenosa lenta, trata-se de um procedimento de internação e representa um ônus adicional nos locais pobres em recursos (GAHART et al., 2016).

Portanto, é conveniente o desenvolvimento de novos sistemas de liberação que possibilitem ofertar alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose cutânea, mas, que além de seguros e eficazes, reduzam os custos associados à administração intravenosa e aumentem os índices de adesão ao tratamento.

Figura 3 – Diferentes tipos de lesões causadas pela Leishmaniose Tegumentar Americana (BRASIL, 2010).



3.5 Métodos Alternativos

A utilização de animais em pesquisa científica é descrita desde o século V a.C., no entanto, a primeira lei a regulamentar o uso de animais para este fim só foi proposta em 1876 pelo Reino Unido, através do *British Cruelty to Animal Act*. (MIZIARA et al., 2012; RAYMUNDO; GOLDIM, 2002).

Em 1959, William Russell e Rex Burch publicaram o livro *The principles of humane experimental technique* onde estabelecem os 3R's da pesquisa em animais, *Refine, Replace e Reduce*. Tal proposta, não proibia a utilização de animais em pesquisa, mas tinha o sentido de humanizar a prática para que fosse tratada sempre considerando as questões éticas e científicas (RUSSELL; BURCH, 1959).

O refinamento (*refine*) está relacionado com o alívio ou minimização da dor, sofrimento ou estresse causado ao animal; a redução (*reduce*) trata da obtenção de métodos que possam ter mesmo nível de confiabilidade, mas que utilizem número menor de animais; a substituição (*replace*) estabelece que um determinado desfecho seja alcançado sem a utilização de animais vertebrados vivos (RAYMUNDO; GOLDIM, 2002; RUSSELL; BURCH, 1959).

A partir da publicação dos princípios dos 3R's, aumentaram-se os esforços para o desenvolvimento de métodos alternativos que pudessem substituir, refinar e/ou reduzir a utilização de animais para fins de pesquisa.

Métodos alternativos são procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que: não utilizem animais; usem espécies de ordens inferiores; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos *ex vivos*; ou diminuam ou eliminem o desconforto (BRASIL, 2009).

A participação da Comissão Internacional em atividades destinadas à validação de métodos alternativos aos ensaios em animais teve início em 1991 com o lançamento do primeiro centro de validação, o EURL-ECVAM (*European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing*). A validação, neste caso, consiste em demonstrar a reprodutibilidade e relevância de um dado método, considerando a capacidade preditiva da resposta *in vivo*, para uma determinada aplicação (QUANTIN et al., 2015). A disponibilização mundial dos métodos alternativos validados ocorre após harmonização através da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2005).

No Brasil, a regulamentação específica da pesquisa em animais se deu apenas em 2008, com a aprovação da Lei nº 11.794/08, conhecida como Lei Arouca, que instituiu o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e regulamentou a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica. A este Conselho compete monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa, credenciar as instituições que utilizem animais em seus trabalhos, além de conceber as normas brasileiras de criação e utilização de animais de laboratório (BRASIL, 2008).

O Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC) estabeleceu, através da portaria nº 491 de 03 de Julho de 2012, a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). Rede composta por três Laboratórios Centrais, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), além dos Laboratórios Associados, públicos ou privados, com reconhecida competência na realização e desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais de experimentação, e que têm a função de contribuir para a disseminação e desenvolvimento dos métodos alternativos e constituir a infra-estrutura de ensaio de métodos alternativos do país. Atualmente a RENAMA possui dezenove Laboratórios Associados distribuídos pelos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Bahia e Pernambuco (Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos da Universidade Federal de Pernambuco – NUDFAC/UFPE).

Outros marcos importantes na regulamentação de Métodos Alternativos no Brasil foram a criação do Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM, *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*) em 2013, através de Portaria da Direção do INCQS, a Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014 e a Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016, ambas do CONCEA, que reconhecem o uso no país de métodos alternativos validados, que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa e conferem prazo de cinco anos a partir de suas respectivas publicações para utilização exclusiva do método alternativo.

As Tabelas 1 e 2 mostram os métodos reconhecidos pelo CONCEA através das Resoluções Normativas 18/2014 e 31/2016.

Tabela 1 – Métodos Alternativos reconhecidos pelo CONCEA – RN 18/2014.

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014

I - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele:

- a) Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica *in vitro*: Teste de Resistência Elétrica Transcutânea;
- b) Método OECD TG 431 - Corrosão dérmica *in vitro*: Teste da Epiderme Humana Reconstituída;
- c) Método OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana *in vitro*; e
- d) Método OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea *in vitro*.

II - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:

- a) Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina;
- b) Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha; e
- c) Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína.

III - Para avaliação do potencial de Fototoxicidade:

- a) Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.

IV - Para avaliação da absorção cutânea:

- a) Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método *in vitro*.

V - Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea:

- a) Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local; e
- b) Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local.

VI - Para avaliação de toxicidade aguda:

- a) Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas;
- b) Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda;
- c) Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento "Up and Down"; e
- d) Método OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica.

VII - Para avaliação de genotoxicidade:

- a) Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro*.
-

Tabela 2 – Métodos Alternativos reconhecidos pelo CONCEA – RN 31/2016.**RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 18 DE AGOSTO DE 2016****I - Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:**

- a) Método OECD TG 491 - Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares;
- b) Método OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído;

II - Avaliação do potencial de sensibilização cutânea:

- a) Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea *in chemico*;
- b) Método OECD TG 442D - Sensibilização cutânea *in vitro*;

III - avaliação de toxicidade reprodutiva:

- a) Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento;
- b) Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva; e

IV - Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:

- a) Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira).

3.5.1 Absorção Cutânea: método in vitro (OECD TG 428)

A administração tópica de fármacos é uma via de administração atraente em comparação com vias mais convencionais, tais como a administração oral de fármacos, uma vez que evita o metabolismo de primeira passagem, e pode superar os problemas de baixa adesão pelo paciente (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012).

Os estudos de absorção cutânea desempenham um papel essencial na seleção dos fármacos para aplicação dérmica ou transdérmica. Portanto, a escolha de modelos preditivos de penetração *in vitro* são extremamente importantes (SCHMOOK et al., 2001).

As células de difusão de Franz (CDF) são os modelos de células estáticas mais comumente utilizados nos estudos de absorção cutânea. As CDF consistem em dois compartimentos, um doador e outro receptor, que devem ser separados por uma membrana, seja sintética ou natural. As membranas sintéticas são normalmente utilizadas para os estudos de liberação de fármaco e as biomembranas (humana ou animal) para estudos de absorção cutânea, devido às diferentes propriedades de difusão oferecidas pelos modelos de membranas (SIMON et al., 2016).

A substância de ensaio, que pode ser marcada radioativamente, é aplicada à superfície da membrana, no compartimento doador. O compartimento receptor é preenchido com uma solução que favorece as *sink conditions*, isto é, uma condição de não saturação do sistema dinâmico (SILVA et al, 2009), possibilitando um fluxo contínuo do fármaco. O produto teste permanece na membrana por um tempo determinado e sob condições especificadas, antes da remoção por um procedimento de limpeza apropriado. O fluido receptor é amostrado em tempos pré-determinados ao longo da experimentação e analisado por métodos analíticos apropriados para quantificar a substância de ensaio e/ou seus metabolitos (OECD, 2004).

O modelo ideal de biomembrana para os estudos de absorção cutânea é a pele humana *ex vivo*, no entanto, devido à dificuldade de obtenção, alta variabilidade e às questões éticas, os modelos animais são extensivamente utilizados (SCHMOOK et al., 2001; BARBERO; FRASCH, 2009).

Vários modelos de peles de animais têm sido utilizados em substituição à pele humana, por exemplo, pele excisada de rato, de rato sem pelo, de camundongo, de porco e de cobaia, para prever a absorção cutânea de substâncias em humanos (BARBERO & FRASCH, 2009; BRONAUGH et al., 1982). No entanto, o estrato córneo desses animais difere do humano na espessura, no conteúdo aquoso, no perfil lipídico e na morfologia (BRONAUGH et al., 1982; BARRY; WILLIAMS, 2008). Diversos estudos relatam que a permeação percutânea em pele do porco apresenta-se como o modelo mais adequado para substituir a pele humana, devido à similaridade e capacidade preditiva (BRONAUGH et al., 1982; SCHMOOK et al., 2001).

Alguns parâmetros são críticos para o delineamento de um ensaio de absorção cutânea, dentre os quais deve-se destacar a espessura e a integridade do modelo de pele utilizado.

É necessária a avaliação da integridade da pele antes de iniciar os ensaios de absorção cutânea, no entanto, não há uma padronização do método específico e dos valores possivelmente aceitos (OECD, 2004). A medição da perda de água transepidermal (TEWL) e resistência elétrica transepitelial (TEER) são métodos bem estabelecidos para avaliar a integridade da barreira cutânea, uma vez que quando a pele é danificada, sua função de barreira é prejudicada, resultando em maior perda de água (MACHADO et al., 2010; RAVICHANDRAN et al., 2011; SCHLUPP et al., 2014).

3.5.2 Ensaio em membrana córneo-alantóide (HET-CAM e CAM-TBS)

Os conhecidos testes de irritação ocular e cutânea, utilizados com o objetivo de determinar o grau de irritabilidade, de diversas substâncias e produtos foram inicialmente

descritos por John H. Draize (DRAIZE et al., 1944) e, em muitos países ainda são adotados oficialmente até hoje (WILHELMUS, 2001). Todavia, são testes que utilizam muitos animais e que causam intenso sofrimento aos mesmos (OLIVEIRA et al., 2012). Por estas razões há uma pressão crescente para substituir os testes *in vivo* por ensaios *in vitro* que alcancem vantagens como: maior eficácia, menor custo e maior facilidade de difusão e incorporação de tais metodologias por outros laboratórios, sendo, portanto, uma questão bastante relevante (WORTH; BALLS, 2002; ABREU et al., 2008).

O HET-CAM (*Hens Egg Test- Chorion Allantoide Membrane*) é um ensaio que utiliza a membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha da raça Leghorn, no décimo dia de incubação. Tem como objetivo avaliar o potencial irritante de uma substância ou produto acabado (produtos solúveis, emulsões, géis e óleos). O ensaio é baseado na observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação), após 5 minutos da aplicação do produto, puro ou diluído, sobre a membrana cório-alantóide (ICCVAM, 2010; NÓBREGA et al., 2012).

Tanto o HET-CAM, quanto sua versão modificada, o CAM-TBS (*Chorionallantoic membrane – trypan blue staining*), que avalia os danos à membrana cório-alantóide pela quantidade do corante azul de Trypan absorvido pela mesma, são métodos válidos e reconhecidos internacionalmente (ICCVAM, 2010; OLIVEIRA et al., 2012; WILSON et al., 2015).

Estudos recentes demonstraram a maior sensibilidade e capacidade de predição do CAM-TBS em relação ao HET-CAM e de ambos em relação ao *Fluorescein Leakage Test* (FLT), *3T3-Neutral Red Uptake* (NRU) *cytotoxicity assay*, *Red Blood Cell* (RBC) *haemolysis assay* (YANG et al., 2011) e, ainda, grande especificidade dos testes de CAM, especialmente o HET-CAM, para substâncias ou produtos com baixo ou nenhum potencial irritante (SCHEEL et al., 2011).

Atualmente, o BraCVAM está conduzindo a validação do teste HET-CAM, é o primeiro ensaio de validação de um método alternativo em território nacional, o que permitirá ao país obter experiência no processo de validação e contribuir para a redução dos animais utilizados em experimentação. Caso tenha êxito, o método alternativo poderá então ser regulamentado, ensinado e empregado rotineiramente.

3.5.3 Teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP)

Embora alguns métodos alternativos ao teste de irritação ocular de Draize, como o teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP, *bovine corneal opacity and*

permeability) e o teste do olho enucleado de galinha (ICE, *isolated chicken eye*), tenham sido formalmente validados, estes não se aplicam à avaliação de produtos com baixo potencial irritante, pois possuem boa capacidade de predição apenas para produtos corrosivos ou com potencial irritante severo (DONAHUE et al., 2011; OECD, 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

O teste de opacidade de córnea bovina (BCOP) já é validado internacionalmente pelo EURL-ECVAM e aceito para fins regulatórios no Brasil pela ANVISA (BRASIL, 2014). Todos os tipos de substâncias, incluindo formulações podem ser avaliadas. As limitações do ensaio são as elevadas taxas de falsos positivos para álcoois e cetonas e de falsos negativos para sólidos. A exclusão destes compostos melhora a precisão do ensaio (ICCVAM, 2006).

O método baseia-se na medida da opacidade e da permeabilidade da córnea bovina após o contato com o produto teste. A medida da opacificação da córnea é realizada com o auxílio de um opacitômetro, aparelho que determina a diferença de transmissão do fluxo luminoso entre a córnea a ser avaliada, fixando um valor numérico da opacidade. A medida da permeabilidade da córnea é realizada conforme o tempo de contato, adicionando fluoresceína e medindo a densidade óptica em 490 nm, obtendo-se uma escala que considera os fenômenos observados (BHASKER et al., 2015; CHORILLI et al., 2009; CRUZ, 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foi utilizada Anfotericina B- lote 02139/2013, Cristália; Miristato de Isopropila, Polietilenoglicol 400, Tween[®] 20 (Polissorbato 20), Span[®] 80 (Mono-oleato de sorbitano), Tween[®] 80 (Polissorbato 80), Álcool Isopropílico, Vetec, Brasil; Plurol oleique[®], (poligliceril-6 dioleato), Labrasol[®] (Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides), Gatefossé, França; Kolliphor[®] EL (Polyoxyl 35 Castor Oil), fluoresceína sódica, Corante Azul de Trypan, Minimum Essential Medium Eagle, Ácido oléico, Óleo de Oliva, Sigma-Aldrich, Brasil; Metanol e Acetonitrila grau HPLC, JT Baker, EUA; BRIJ[®]O20 (Polyoxyethylene 20 oleyl ether), Croda, Reino Unido; Óleo de Licuri (*Syagrus coronata*), Coopes, Brasil; Óleo de Catolé (*Syagrus cearensis*); filtros de seringa e membranas filtrantes de ésteres de celulose de 0,45µm e 0,22 µm, Millipore[®]; água deionizada em sistema de ultra purificação Purelab, Elga, EUA.

4.2 Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: Banho Dubnoff Microprocessado Q226M, Quimis, Brasil; Centrífuga, Centribio 80-2B, Brasil; Agitador magnético 713D, Fisatom, Brasil; Pipetas automáticas, Eppendorf, Alemanha; Banho Ultrassom Quimis; pHmetro pH21, Hanna Instruments Inc., EUA; Condutivímetro GEHAKA[®] CG 2200, Brasil; ZetaSizer[®] Nano-ZS90, Malvern[®] Instruments, Reino Unido; Microscópio de Luz Polarizada, RMN-1 (300 MHz) Leica, Reino Unido; Cromatógrafo líquido Nexera X2, Shimadzu, Japão; Vision[®] Microette[™], Hanson, Reino Unido; opacitômetro BASF-OP 3.0, Alemanha; chocadeira IP 70D Premium Ecológica, Brasil; Iluminador por fibra ótica MGA-D, Brasil; Dermatômetro Nouvag, Alemanha; Tewameter[®] TM 300, Courage+Khazaka, Alemanha.

4.3 Solubilidade da Anfotericina B em tensoativos e óleos

Visando selecionar os tensoativos e óleos mais adequados para o desenvolvimento das microemulsões, a solubilidade da Anfotericina B, em vários meios, conforme a tabela abaixo, foi investigada por adição de 100 mg de fármaco em frascos âmbar com 5 mL de cada meio. Em seguida, os frascos contendo a mistura foram mantidos em incubadora com agitação (técnica *shake-flask*) a 25°C durante 48 horas para obter o equilíbrio. Após as 48 horas os tubos com a mistura foram centrifugados (4000 rpm \approx 1500 g), por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa 0,45 µm e diluído em metanol. O teor do

fármaco foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (PESTANA et al., 2008; SHAH et al., 2009).

Tabela 3 – Meios utilizados no estudo de solubilidade da anfotericina B

MEIO	
Óleos	Ácido Oléico
	Miristato de Isopropila
	Óleo de Oliva
	Óleo de Licuri
	Óleo de Catolé
Tensoativos	Tween 80®
	Tween 20®
	Álcool Isopropílico
	Span 80®
	Labrasol®
	Kolliphor EL®
	Plurol Oleique®

4.4 Desenvolvimento dos diagramas de fase pseudoternários

Os tensoativos foram misturados nas seguintes proporções (p/p): 1:1, 2:1 e 5:1. A esta mistura de tensoativos, foi adicionada a fase oleosa nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As titulações foram feitas com água purificada tipo Milli-Q®, utilizando uma pipeta automática ajustada a 1000 µL, adicionando lentamente, à temperatura ambiente. Durante a titulação, a mistura foi homogeneizada utilizando agitador magnético, por 3 minutos, e as mudanças do aspecto visual foram observadas. Considerando-se as proporções dos componentes dos sistemas, após as titulações aquosas foram marcadas as áreas em que se deu a formação de sistema isotrópico e opticamente transparente (PATEL et al., 2013; ZHAO et al., 2011).

4.5 Máxima incorporação de Anfotericina B nas microemulsões

Fármaco em excesso (100 mg) foi adicionado diretamente à 5 mL das formulações previamente preparadas e a mistura agitada em vórtex por 5 minutos. As amostras foram submetidas à agitação magnética a 300 rpm por 48 horas e em seguida à ultrassom em modo

descontínuo por 60 minutos à temperatura ambiente. Ao fim da sonicação, centrifugadas (4000 rpm \approx 1500 g) por 20 minutos, para eliminar o excesso de fármaco não incorporado. O sobrenadante foi filtrado e diluído em metanol para a quantificação da Anfotericina B na formulação por CLAE.

4.6 Preparação das microemulsões e sistemas convencionais contendo Anfotericina B

Após a construção dos diagramas de fase, diferentes formulações foram selecionadas para a incorporação do fármaco. 0,1% (p/p) de Anfotericina B foi dissolvido gradualmente em água em pH 11. Em seguida, a solução aquosa com o fármaco foi adicionada lentamente à quantidade selecionada da mistura óleo e tensoativos sob agitação magnética contínua. O pH foi ajustado e a formulação foi sonicada por 30 min.

O emulgel (SC1) e a emulsão (SC2) foram preparados, em triplicata, de acordo com a técnica clássica de inversão de fase. As fases foram misturadas a $70 \pm 5^\circ\text{C}$, mantendo a agitação a 1000 rpm durante 30 minutos. A anfotericina B, numa proporção de 0,1% (p/p) foi incorporada após resfriamento das formulações sob agitação mecânica constante de 900 rpm durante 15 minutos. Para obtenção do emulgel e da emulsão utilizou-se óleo de catolé, BHT como antioxidante, Span 80 e Tween 80 como tensoativos, carbopol 940 e cera polawax como espessantes, em concentrações que estão demonstradas na tabela abaixo.

Tabela 4 – Composição centesimal de emulgel e emulsão contendo anfotericina B.

Composição (%)	SC1	SC2
AnB	0,1	0,1
Óleo de Catolé	10,0	10,0
Span 80	1,5	1,5
Tween 80	3,5	3,5
Carbopol	0,4	–
Polawax	–	10,0
BHT	0,1	0,1
Água	84,4	74,8

4.7 Caracterização das microemulsões e sistemas convencionais desenvolvidos

Diversos métodos podem ser utilizados para caracterizar um sistema de liberação de fármacos, entretanto, para se obter informações mais detalhadas sobre sua estrutura e dinâmica, devem-se levar em consideração os resultados de mais de um método.

De acordo com as regiões de microemulsão nos diagramas de fase e com a capacidade dos sistemas selecionados de solubilizar o fármaco, quatro microemulsões e duas formulações convencionais, emulgel e emulsão, foram preparadas e avaliadas através dos seguintes parâmetros. Todas as análises foram realizadas, no mínimo, em triplicata.

4.7.1 *Centrifugação*

As formulações foram centrifugadas, durante 20 min a 1500 g e após a centrifugação observou-se a ocorrência ou não de separação de fases.

4.7.2 *Determinação da condutividade elétrica*

A condutividade elétrica das formulações foi determinada em condutivímetro CG 2200 - GEHAKA[®], aferido com solução padrão de KCl de 1412 $\mu\text{S}/\text{cm}$, à temperatura ambiente.

4.7.3 *Teste de solubilidade em corante*

Um corante solúvel em água (FD&C Red 40) foi adicionado às microemulsões e a fase do sistema foi avaliada visualmente (BUTANI et al., 2014).

4.7.4 *Determinação do pH*

O pH das formulações foi determinado através de pHmetro Hanna[®] pH21, previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura ambiente.

4.7.5 *Determinação do potencial zeta e tamanho das gotículas*

As medidas de potencial zeta e tamanho de gotículas das formulações foram determinadas utilizando o ZetaSizer[®] Nano-ZS90 (Malvern[®], Inglaterra). As formulações foram diluídas em 1:10 com água destilada.

4.7.6 *Microscopia de luz polarizada*

As formulações foram avaliadas através de Microscópio de Luz Polarizada (DM 750P – Leica[®]) para avaliar a isotropia ou anisotropia dos sistemas.

4.7.7 *Viscosidade e Reologia*

A viscosidade e as propriedades reológicas dos sistemas convencionais foram determinadas em temperatura ambiente utilizando um viscosímetro rotacional Rheology International Digital. As microemulsões foram analisadas com um reômetro oscilatório MCR 101 Anton Paar, à temperatura de $25 \pm 0,2$ °C.

4.7.8 *Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)*

As amostras selecionadas foram submetidas a esse estudo para obter informações sobre a estrutura e distribuição de tamanho dos objetos espalhadores dos sistemas. As medidas foram realizadas na estação de medidas D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, que é equipado com um monocromador do tipo Silício (111), produzindo feixe de raios-X incidente ($\lambda = 1,55\text{Å}$), uma câmara de ionização, um detector vertical e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento. A distância amostra-detector foi de 1,536 nm. O espalhamento $I(q)$ foi expresso em unidades arbitrárias e o espalhamento de ar parasita (espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra) foi subtraído de intensidade total da amostra. As curvas resultantes foram normalizadas levando em consideração os efeitos do decaimento natural, da intensidade da fonte de luz síncrotron, da sensibilidade do detector e da transmitância. Os dados foram tratados utilizando o software Origin Pro v.8.

4.8 Avaliação da estabilidade das formulações

Para avaliar a estabilidade das microemulsões e sistemas convencionais contendo 0,1% de Anfotericina B (p/p), as mesmas foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e à temperatura de $5 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 90 dias. As formulações foram avaliadas 24 horas após a fabricação e a cada 30 dias quanto ao teor de fármaco, tamanho e distribuição das gotículas.

4.9 Quantificação e validação de método para doseamento de Anfotericina B

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu com controlador SCL-10AVP, auto Injetor SIL-30AC, bomba LC-30AD e DAD (UV-Vis) Detector SPD-M20A, com fase móvel constituída por Metanol:Acetonitrila:EDTA 2,5mM (40:30:30), fluxo de 1,0 mL/min, com coluna Kinetex® 5 μm C18, 100 Å, 150 x 4,6 mm, volume de injeção de 15 μL e detecção em comprimento de onda de 406 nm, com tempo de análise de 6 minutos. Os dados foram obtidos utilizando o software LC Solution® versão 1.25.

O método foi validado segundo RE n° 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003). A linearidade do método foi verificada nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20 $\mu\text{g/mL}$ a partir de uma solução inicial de 100 $\mu\text{g/mL}$.

A solução inicial de anfotericina B foi preparada pesando-se analiticamente 10 mg de anfotericina B, que foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e a este adicionou-se 50 mL de metanol, em seguida sonicou-se por 15 minutos, por fim, completou-se o volume com metanol.

4.10 Caracterização físico-química do óleo de catolé (*Syagrus cearensis*)

O óleo de catolé foi obtido por extração através de uma prensa hidráulica manual. As análises de acidez, saponificação, peróxidos e material insaponificável foram realizadas em triplicata de acordo com o método geral preconizado pela Farmacopeia Brasileira V (2010). A partir do espectro integrado de RMN ^1H , que utiliza os valores das áreas encontradas em deslocamentos específicos no espectro, foram realizados os cálculos para obtenção de parâmetros físico-químicos que foram utilizados na comparação com as análises por volumetria. Para tanto, foram utilizadas as fórmulas que estão apresentadas na Tabela 5 (CARNEIRO et al., 2005; REDA et al., 2007).

Os espectros de RMN ^1H das amostras foram obtidos através de espectrômetro Varian, modelo UNITY plus-300 MHz utilizando clorofórmio deuterado como solvente. Foram acumuladas 16 repetições para cada decaimento induzido e tempo de aquisição de aproximadamente 4 segundos.

Tabela 5: Fórmulas utilizadas para obtenção de parâmetros físico-químicos do óleo de catolé através da utilização de espectros integrados de RMN H^1 .

Parâmetro	Fórmula
Teor de hidrogênios vinílicos (V)	$V = (\text{área do deslocamento em } 2 \text{ ppm} / 2) + \text{área do deslocamento em } 2,9 \text{ ppm}$
Massa molar (MM) g/mol	$MM = 119,70 + 703,6 + 5,983 V$
Índice de Iodo (II) gI/100g	$II = [126,91 \times 100 V] / MM$
Índice de Saponificação (IS) mgKOH/g	$IS = -0,2358 MM + 398,42$
Estado de Oxidação (Ro/a)	$Roa = V / \text{área do deslocamento em } 0,9 \text{ ppm}$ (referente a soma dos hidrogênios ligados ao grupo metila)
Acidez livre (A) mg KOH/g	$AL = 3,0597 [Roa]^2 - 6,3181 Roa + 3,3381$

4.11 Estudos de liberação, permeação e retenção cutânea

4.11.1 Seleção das formulações

As formulações foram selecionadas a partir dos resultados dos diagramas de fase desenvolvidos, dos ensaios de caracterização físico-química e, sobretudo, da capacidade de incorporação do fármaco.

4.11.2 *Seleção do meio receptor*

O líquido receptor foi selecionado avaliando-se a solubilidade da Anfotericina B em diversos meios, tampão fosfato pH 7.4, tampão fosfato pH 7.4 com *polyoxyethylene 20-oleyl ether* (Brij[®] 020) a 2%, tampão fosfato pH 7.4 com *polyoxyethylene 20-oleyl ether* (Brij[®] 020) a 4%, tampão fosfato pH 7.4 com lauril sulfato de sódio 0,1% e tampão fosfato pH 7.4 com lauril sulfato de sódio 0,5%. Para tanto, (100 mg) excesso de AnB foi adicionado à 5mL de diferentes meios receptores. Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação à temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 24 horas e, em seguida, centrifugadas (1500g) durante 20 minutos. Em seguida, foi retirada uma alíquota do sobrenadante e filtrou-se em membrana filtrante 0,45 μm . A concentração da AnB foi determinada através de CLAE-DAD.

4.11.3 *Cinética de liberação in vitro*

A membrana sintética utilizada, contendo ésteres de celulose e porosidade de 0,45 μm (Millipore[®]), foi previamente hidratada no meio receptor selecionado por um período de 12 horas.

4.11.4 *Permeação cutânea ex vivo*

As peles de orelha de porco foram obtidas em um abatedouro público (Paulista-PE) e excisadas cuidadosamente. Em seguida, foram dermatomizadas para uniformizar a espessura das peles utilizadas. Para simular um modelo de pele lesionado, como ocorre nas feridas causadas pela leishmaniose cutânea, o estrato córneo foi removido pelo método de *tape stripping* utilizando 30 fitas adesivas (3M Durex[®]).

Para avaliar a integridade inicial e confirmar os danos causados às peles, a perda de água transepidermal (TEWL; g/hm²) foi aferida antes e depois da remoção do estrato córneo. Utilizou-se, para tanto, um tewâmetro, cujo princípio da medição é baseado na primeira lei de Fick (FOKUHL et al., 2103).

4.11.5 *Montagem do sistema automatizado de células de difusão*

O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido com a solução receptora selecionada. As membranas foram dispostas nas células de modo que ficassem em contato com a solução receptora sem a formação de bolhas. No compartimento doador foram aplicados 400 mg (área difusional 1,77 cm²) de cada formulação. O sistema foi mantido sob agitação magnética constante (250 rpm) e as células foram mantidas em banho circulante a $32 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.11.6 Coleta e Quantificação de anfotericina B nas amostras

Nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, para o estudo de cinética de liberação, e nos intervalos de tempo pré-definidos, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas, para o ensaio de permeação cutânea, alíquotas de 1 mL foram coletadas e filtradas em membrana 0,45 μm , o volume retirado durante as coletas foi repostado automaticamente com solução receptora. As amostras foram quantificadas através de CLAE-DAD.

4.11.7 Análise dos perfis de liberação e permeação cutânea

A quantidade corrigida do fármaco liberado/absorvido foi dividida pela área da membrana utilizada e esses valores foram plotados em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética para visualização do perfil de permeação do fármaco (BOLZINGER et al., 2012).

- Ordem zero: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (h);
- Higuchi: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus raiz do tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (h).

A partir da análise de regressão linear, deve-se determinar o coeficiente de determinação (R^2) para cada modelo de cinética. O modelo que apresentou valor de R^2 mais próximo a 1 foi selecionado (COSTA, LOBO, 2001).

A quantidade de AnB permeada através da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi representada graficamente como uma função do tempo (t) para cada formulação. O fluxo (J, $\mu\text{g}/[\text{cm}^2 \cdot \text{h}]$) foi determinado a partir do declive da porção linear da permeação cumulativa do fármaco em função do tempo. O coeficiente de permeabilidade (K_p , cm/h) foi calculado por meio da relação entre o fluxo e a concentração inicial do fármaco no compartimento doador (BUTANI et al., 2014; WAN et al., 2015).

4.11.8 Estudo de retenção cutânea

Ao final do estudo de permeação, a área difusional da pele foi cortada em pequenas partes e transferidas para um tubo Eppendorf contendo 5 mL de metanol. A anfotericina B foi extraída utilizando um homogeneizador de tecidos por 5 minutos para trituração, seguida de sonicação por 60 minutos e centrifugação por 10 minutos em 1500 g. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado e analisado por HPLC.

4.11.9 Recuperação cutânea de Anfotericina B

Para avaliar a recuperação de AnB, amostras de pele com área difusional de 1,77 cm² foram picotadas e colocados em tubos Falcon. A estes tubos foram adicionados volumes conhecidos de solução padrão de AnB, para obter concentração de 10 µg/mL. Após total evaporação do metanol, foi adicionado 5 mL de metanol e o tubo foi colocado em homogeneizador de tecidos por 5 minutos para trituração, e em banho de ultrassom por 60 minutos, seguindo por centrifugação por mais 10 minutos a 1500 g, por fim a solução foi filtrada (0,45 µm) e quantificada por CLAE-UV.

Os valores de recuperação foram determinados pela seguinte equação:

[1]

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} \times 100$$

4.11.10 Avaliação da influência do óleo de catolé na liberação e permeação de Anfotericina B a partir das microemulsões

Com o intuito de avaliar a influência do óleo de catolé na liberação e permeação da Anfotericina B a partir das microemulsões, foi preparada uma microemulsão similar à ME02, contendo o mesmo par de tensoativos e nas mesmas concentrações, mas substituindo 9,1% de óleo de catolé por 9,1% de ácido oléico. Essa formulação foi denominada ME12.

4.12 Avaliação do Potencial Irritante

Para avaliar o potencial de irritação das formulações, foram utilizados três métodos alternativos. Solução salina (NaCl 0,9% p/v) e uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. As microemulsões foram avaliadas sem diluição. No entanto, devido a alta viscosidade, as formulações convencionais foram diluídas 1: 1 com NaCl a 0,9%.

4.12.1 *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM)

Para cada formulação testada, foram utilizados quatro ovos SPF (*Specific Pathogen Free*) fertilizados de galinhas da raça Leghorn. Os ovos foram incubados a 37 ± 0,5 °C com uma humidade relativa de 65 ± 2% durante 10 dias. No décimo dia, a membrana da casca foi removida, expondo a membrana corioalantóide (CAM). Com o auxílio de uma lupa, foi realizada análise visual para verificar se a CAM estava adequada para o teste, em seguida, 300 µL de cada formulação foi colocada sobre a superfície da CAM. Após 20 segundos, a formulação foi removida com solução salina. A CAM foi observada durante 5 min para determinar a incidência de efeitos de irritação nos vasos sanguíneos da CAM (lise vascular,

hemorragia e/ou coagulação). Os efeitos vasculares foram classificadas de acordo com os critérios descritos no método de ensaio do Protocolo ICCVAM. (SCHEEL et al., 2011; ICCVAM, 2010). Para classificação do potencial irritante, as formulações foram classificadas de acordo com os seguintes parâmetros: 0 – 0,99 corresponde a uma formulação não irritante; 1,00 – 4,99 corresponde a uma formulação irritante leve; 5,00 – 8,99 correspondente a uma moderadamente irritante (MI); e 9,00 – 21,00 corresponde a uma severamente irritante (SI).

4.12.2 *Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining (CAM-TBS)*

A fase inicial do teste é semelhante ao HET-CAM, onde são utilizados quatro ovos no décimo dia de incubação e a membrana córioalantóide também é exposta. No entanto, o método CAM-TBS utiliza o corante azul de trypan como um indicador da lesão na CAM. Após a remoção da formulação, 0,5 mL de tampão fosfato contendo 0,1% de azul de trypan foram adicionados à CAM em uma zona delimitada por um anel de silicone. O excesso do corante foi removido com água destilada e a área da CAM que foi delimitada pelo anel de silicone foi recortada, colocada em tubo contendo 5 mL de formamida e, em seguida, agitada em vórtex e centrifugada (1500g por 10 min). A absorvância do sobrenadante foi medida através de espectrofotometria a 595 nm. A quantidade de azul de trypan absorvido pela membrana corioalantóica foi calculada usando a equação abaixo (LAGARTO et al., 2006).

$$\text{Corante absorvido} = \text{Absorvância} \times 5 \text{ nmol} / 1000 \times 10^9$$

[2]

A curva de calibração do corante foi feita com soluções de azul de trypan em formamida nas concentrações 10^{-6} , 10^{-5} e 5×10^{-5} mol/L, lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. As formulações foram classificadas de acordo com os parâmetros: 0-6,99 corresponde a não irritante/ligeiramente irritante (NI / SLI); 7,00-14,50 correspondente a moderadamente irritante (MI); > 14,50 correspondente a irritante severo (SI).

4.12.3 *Opacidade e Permeabilidade em Córnea Bovina (BCOP)*

Olhos bovinos foram adquiridos em abatedouro público (Paulista- PE) e mantidos em meio *Minimum Essential Medium Eagle* (EMEM), por no máximo duas horas até as respectivas córneas serem excisadas. Após excisão cuidadosa das córneas, as mesmas foram inspecionadas visualmente e montadas nos suportes do opacitômetro previamente calibrado, as câmaras do suporte foram preenchidas com o EMEM e incubadas durante 1 hora a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, para a primeira medida de opacidade. Em seguida, o meio da câmara anterior foi retirado e as

córneas foram expostas a 750 µL de cada formulação teste durante 10 min. Posteriormente, as córneas foram lavadas com EMEM contendo o vermelho de fenol e incubadas novamente a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 horas, quando a opacidade final foi aferida.

Para avaliar a permeabilidade, as córneas foram tratadas com 1 mL de solução de fluoresceína sódica a 0,4% e incubadas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 90 min. Após a exposição de fluoresceína, foi determinada a densidade óptica a 490 nm (OD490) da solução em EMEM na parte posterior da câmara. Para calcular o valor de irritação *in vitro* (IVIS) para cada grupo de tratamento, foi utilizada a Equação 3 (OECD, 2009). De acordo com o protocolo OECG TG 437, nenhuma predição pode ser realizada quando os valores de IVIS estão abaixo de 55. Acima deste valor, todas as substâncias são classificadas como irritantes de Categoria 1.

$$IVIS = \text{valor médio de opacidade} + (15 \times \text{média permeabilidade OD490 valor})$$

[3]

4.13 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como médias \pm DP (Desvio Padrão) de pelo menos três valores. Os dados foram analisados por análise de variância. O nível de significância estatística foi fixado em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Solubilidade da Anfotericina B em tensoativos, cotensoativos e óleos

Algumas das preocupações associadas ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é, sem dúvida, a escolha dos componentes. Essa seleção deve ser criteriosa e atender alguns requisitos, como ausência de toxicidade e irritabilidade, capacidade de solubilização do fármaco a ser incorporado no sistema e a capacidade de formar o sistema desejado (LAWRENCE, REES, 2000; FORMARIZ et al., 2005).

A otimização dos componentes a serem utilizados na formulação das microemulsões foi realizada com base na solubilidade da Anfotericina B em diversos tensoativos, cotensoativos e óleos, uma vez que apenas fármacos dissolvidos podem permear as membranas biológicas. Estudos anteriores relatam que a melhor liberação de fármacos em direção à pele, a partir destes sistemas, ocorre quando há uma maior capacidade dos componentes em solubilizar o fármaco (SAHOO et al., 2014; SHAH, et al., 2009; LAWRENCE, REES, 2000).

Dentre os óleos, a Anfotericina B apresentou maior solubilidade em óleo de catolé, seguido de miristato de isopropila, óleo de licuri, óleo de oliva e ácido oléico. Sendo, portanto, o óleo de catolé o escolhido para o desenvolvimento das microemulsões. Quanto aos tensoativos, obteve maior solubilidade em Plurol Oleique[®], um tensoativo lipofílico de EHL (Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo) 6,0.

O valor do EHL pode indicar a extensão da preferência de migração na interface entre fases oleosas e aquosas, o que é importante no papel dos tensoativos de formarem as microemulsões, pois eles diminuem a tensão interfacial para valores mais baixos (DAMASCENO et al., 2011). A adição de um cotensoativo modifica o valor do EHL do sistema para um valor ótimo e adequado para a formulação de microemulsões, tendo em vista que a mistura de tensoativos deve apresentar um EHL que esteja próximo do EHL exigido pela fase oleosa (SILVA et al., 2013). A tabela abaixo mostra detalhadamente os resultados da avaliação da solubilidade de Anfotericina B.

Tabela 6 – Solubilidade da Anfotericina B em óleos, tensoativos e cotensoativos.

Tensoativos e óleos	Solubilidade (mg.mL ⁻¹)
Kolliphor EL [®]	1,194 ± 0,216
Tween 20 [®]	1,289 ± 0,149
Tween 80 [®]	1,456 ± 0,178
Álcool Isopropílico	0,207 ± 0,062
Span 80 [®]	1,016 ± 0,085
Plurol Oleique [®]	2,073 ± 0,283
Labrasol [®]	1,712 ± 0,122
Miristato de Isopropila	0,556 ± 0,098
Óleo de Catolé	0,997 ± 0,076
Óleo de Oliva	0,157 ± 0,056
Óleo de Licuri	0,174 ± 0,047
Ácido Oléico	0,061 ± 0,021

5.2 Desenvolvimento dos diagramas de fase pseudoternários

Baseando-se nos resultados da solubilidade da anfotericina B e no interesse de testar vários sistemas que evidenciem a relação entre solubilização, incorporação, liberação, permeação e retenção do fármaco, foram construídos diferentes diagramas de fase pseudoternários. As diferentes proporções entre os pares de tensoativos, óleo de catolé e água, permitiram caracterizar o domínio dos pontos em que se deu a formação de um sistema homogêneo, límpido, translúcido e isotrópico, característico de microemulsões (SAHOO et al., 2014; DAMASCENO et al., 2011; SILVA et al., 2009).

Dessa forma, após as titulações, foi possível definir as regiões microemulsionadas, como representadas nas figuras abaixo.

Figura 4 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Kolliphor[®]/Tween 20[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 1:1.EHL 13,00

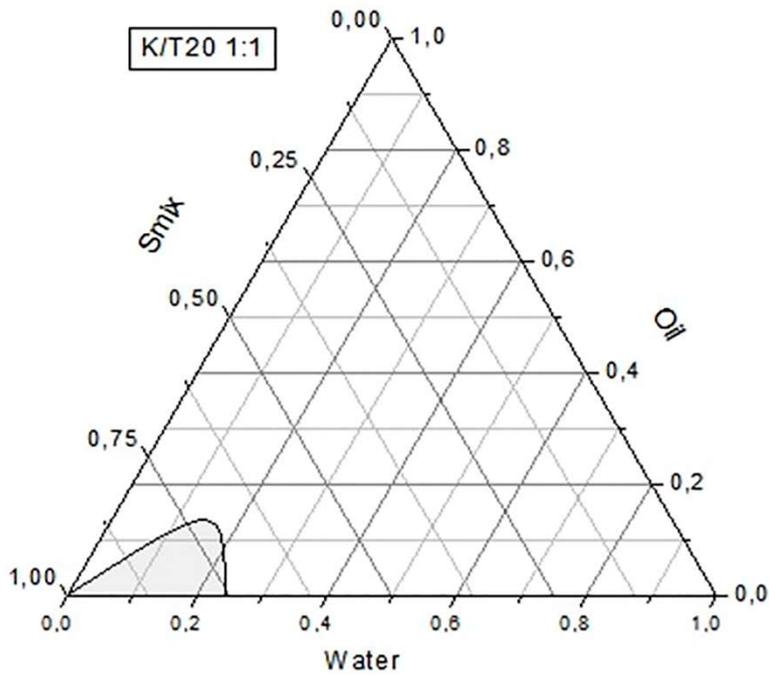


Figura 5 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Kolliphor[®]/Tween 20[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 2:1.EHL 14,75

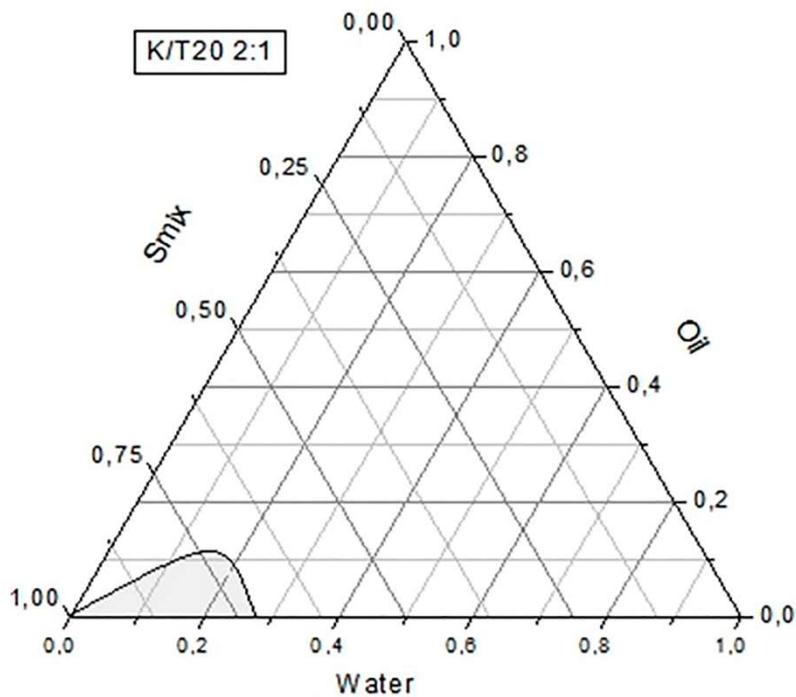


Figura 6 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Kolliphor[®]/Tween 20[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 5:1.EHL 14,45

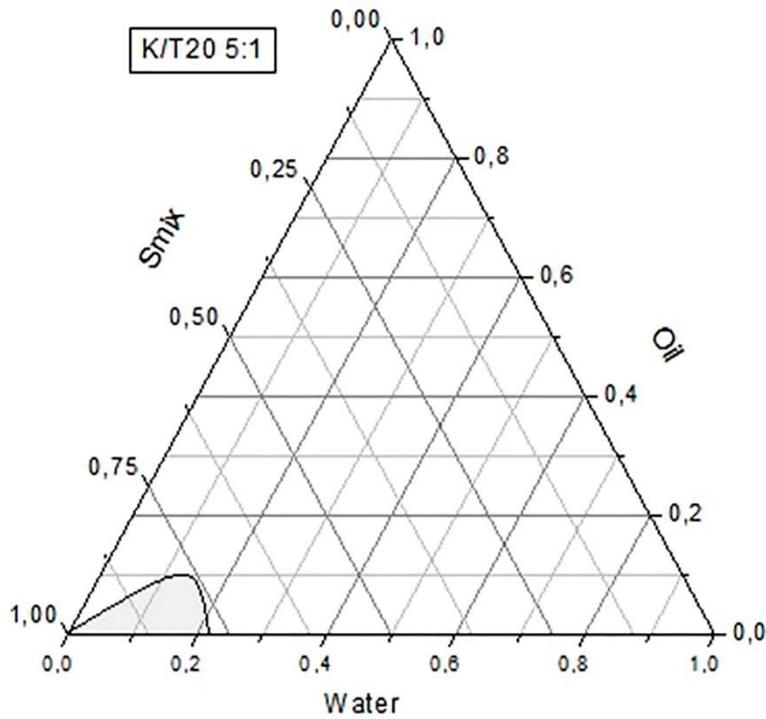


Figura 7 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Labrasol[®]/Plurol Oleique[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 1:1.EHL 10,00.

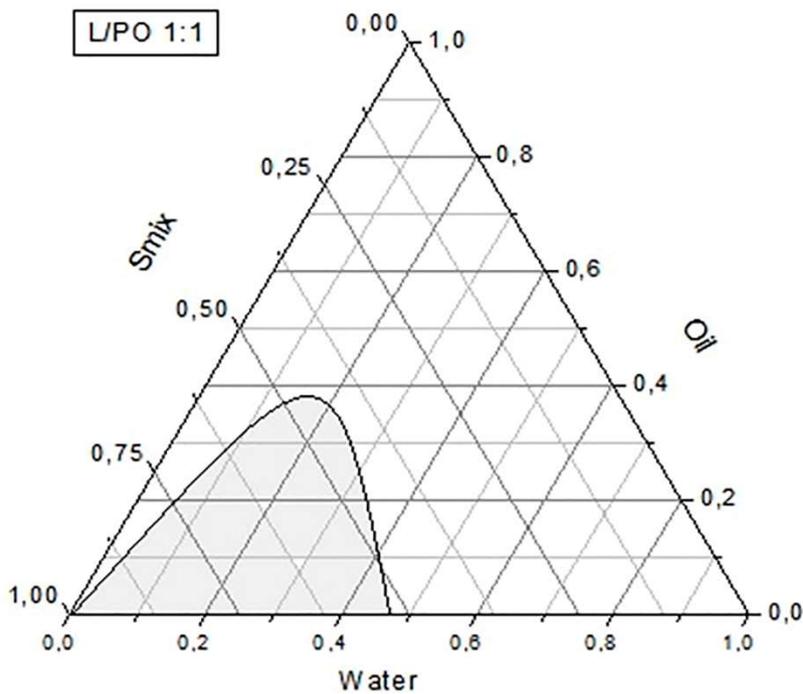


Figura 8 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Labrasol[®]/Plurol Oleique[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 2:1.EHL 11,36

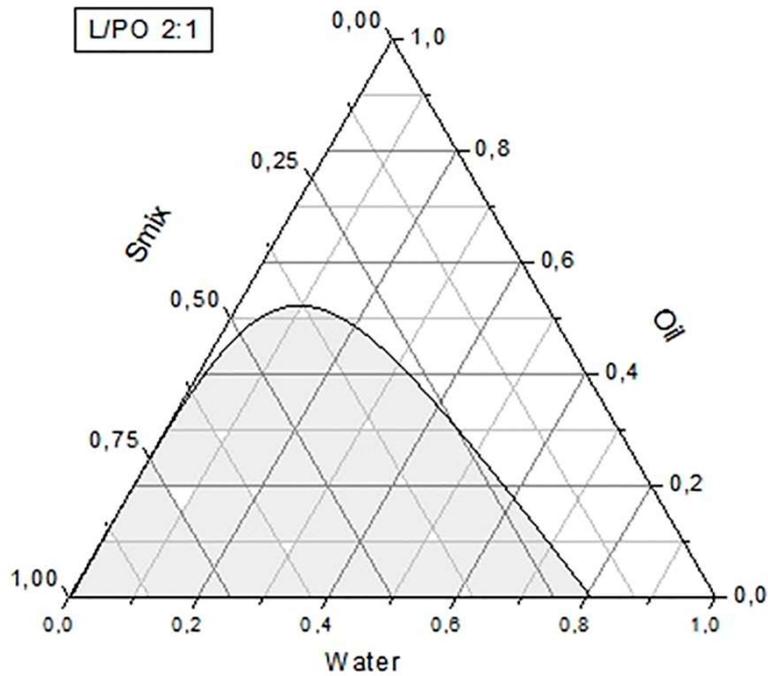


Figura 9 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Labrasol[®]/Plurol Oleique[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 5:1. EHL 12,62

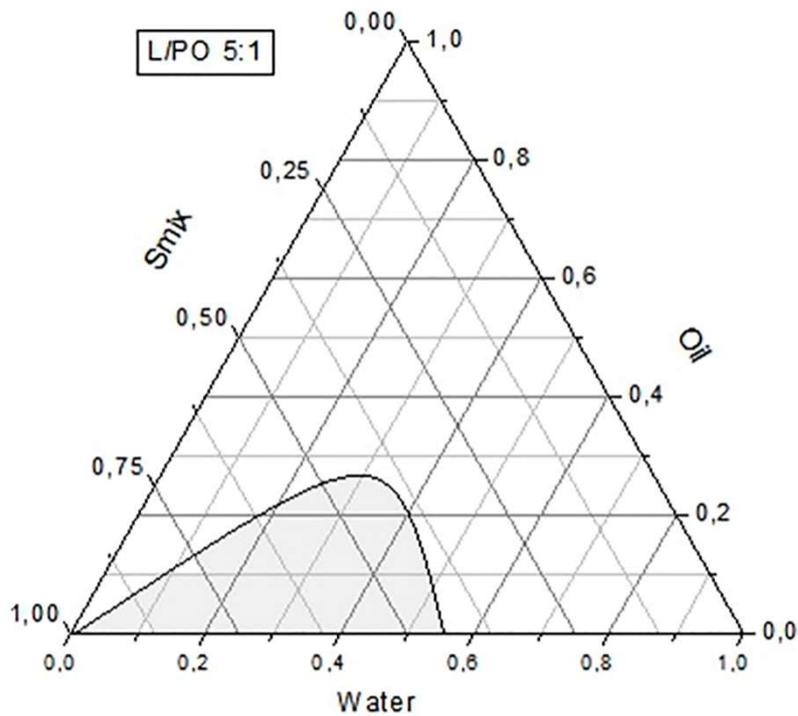


Figura 10 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20[®]/Span 80[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 1:1. EHL 10,50

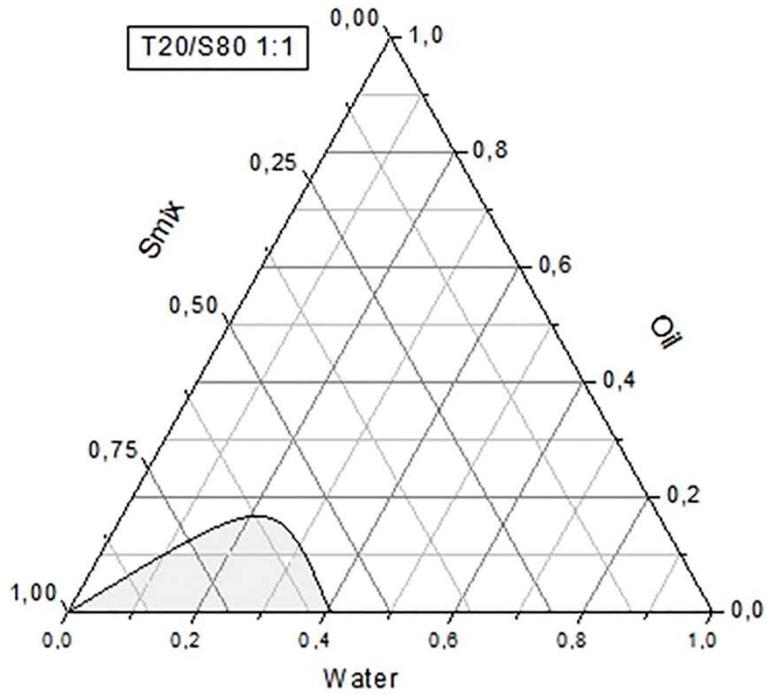


Figura 11 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20[®]/Span 80[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 2:1.EHL 12,43

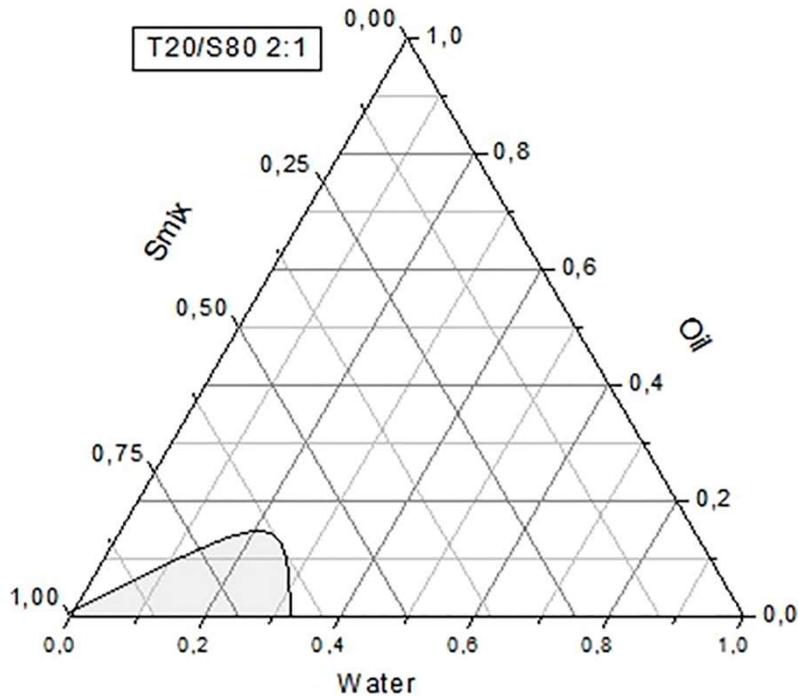


Figura 12 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20[®]/Span 80[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 5:1.EHL 14,59

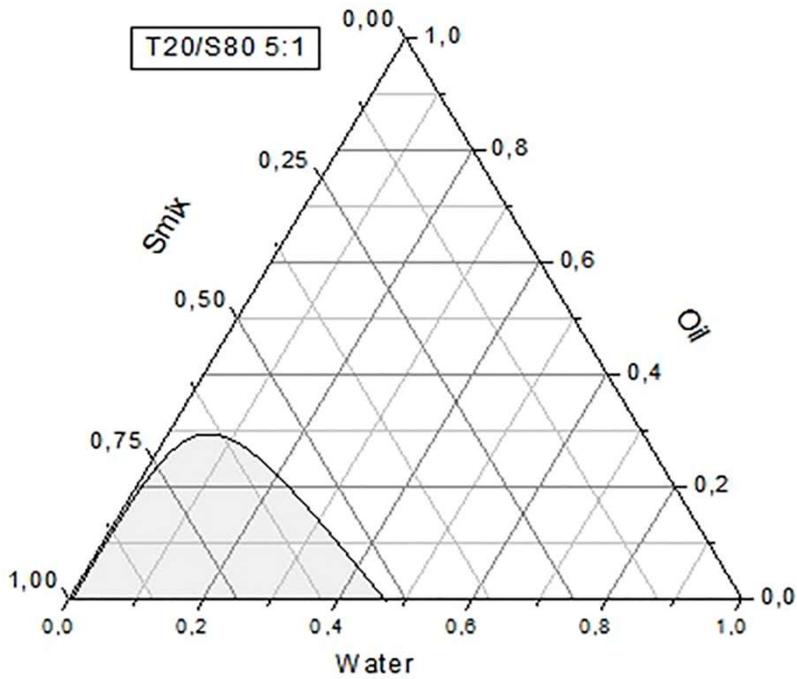


Figura 13 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20[®]/Labrasol[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 1:1.EHL 14,35

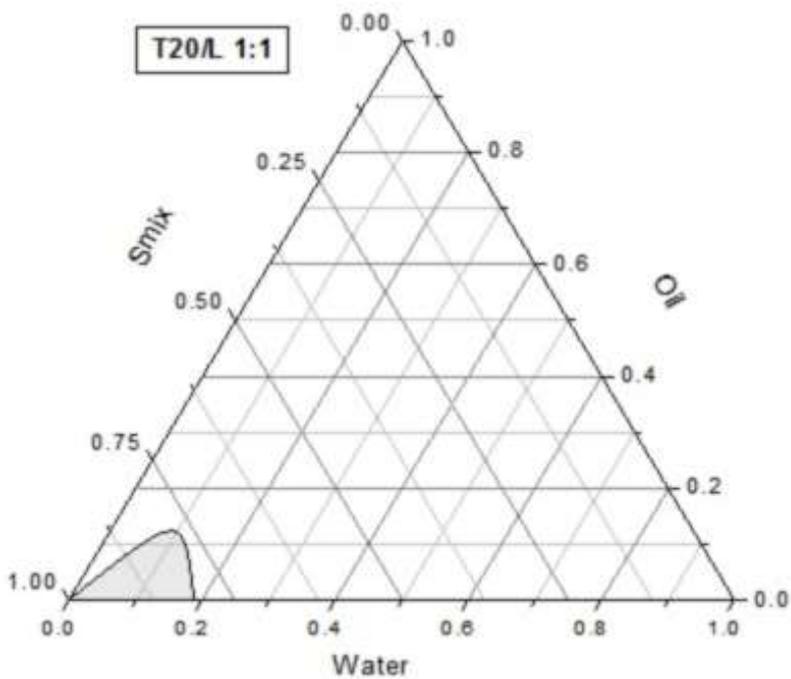


Figura 14 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20[®]/Labrasol[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 2:1.EHL 14,98

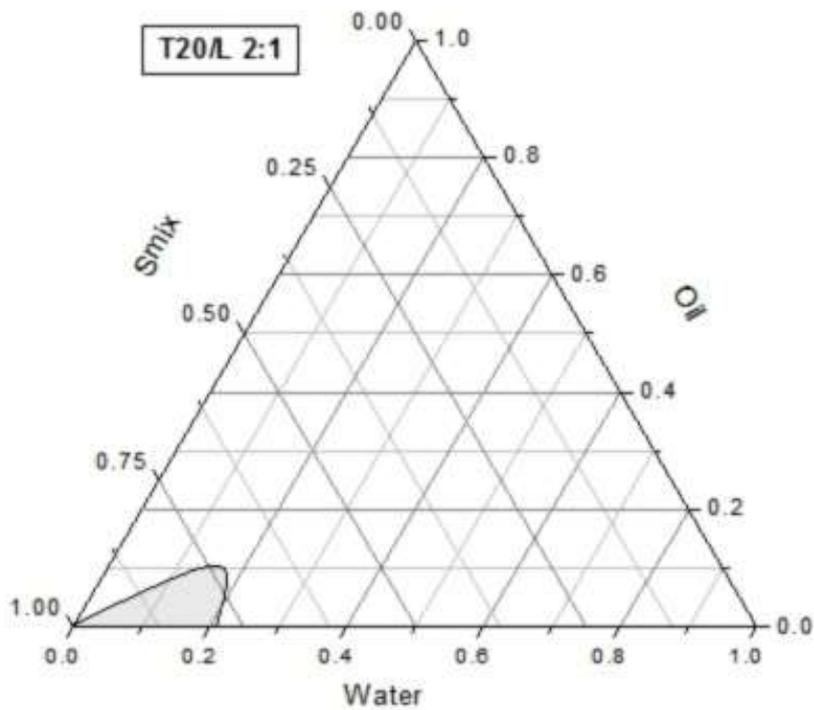
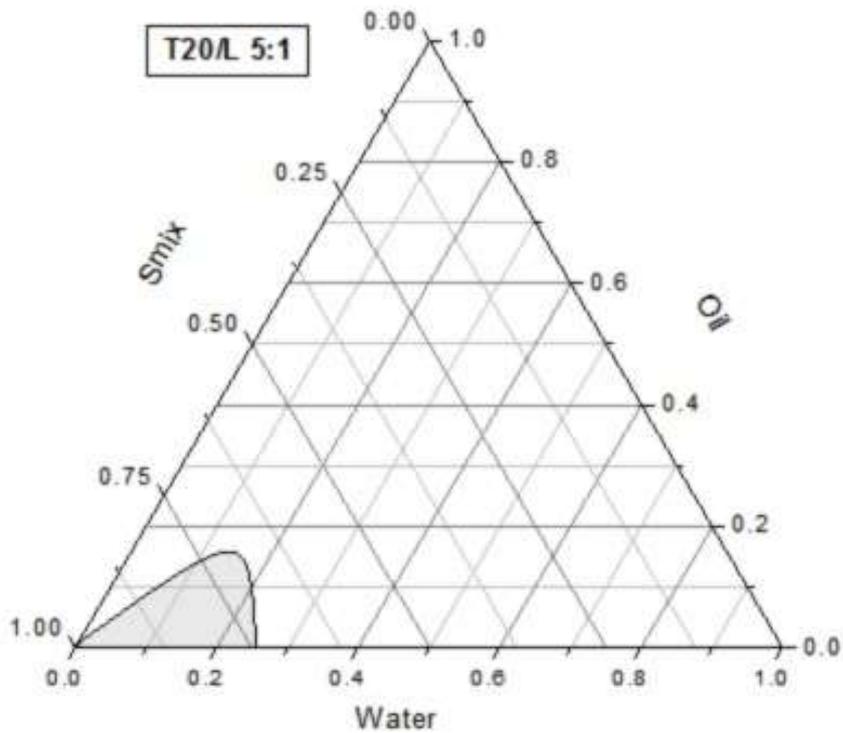


Figura 15 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 20[®]/Labrasol[®], óleo de catolé e água para proporções T:CO 5:1.EHL 15,9



Foi possível verificar área de existência de microemulsões contendo o óleo de catolé em todas as combinações de pares de tensoativos testadas. A área de microemulsões nos diagramas expandia-se à medida que o percentual de tensoativos aumentava, sendo maior para o par de tensoativos Labrasol[®]/Plurol Oleique[®].

A partir das regiões microemulsionadas verificadas, foram selecionadas onze formulações, cuja composição centesimal está descrita na Tabela 7.

Tabela 7: Composição das formulações obtidas nos diagramas pseudoternários.

Composição (%)	ME01	ME02	ME03	ME04	ME05	ME06	ME07	ME08	ME09	ME10	ME11
Tween 20 [®]	—	40,9	—	—	—	57,7	62,5	54,5	—	—	53,5
Labrasol [®]	44,4	—	55,2	48,0	54,5	24,7	—	—	23,6	33,3	—
Kolliphor [®]	—	40,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Plurol Oleique [®]	22,2	—	11,1	24,0	27,3	—	—	—	11,8	16,7	—
Span 80 [®]	—	—	—	—	—	—	12,5	27,3	—	—	10,7
Óleo de Catolé	16,7	9,1	16,6	8,0	9,1	9,2	8,3	9,1	8,9	5,7	7,3
Água q.s.p.	16,7	9,1	17,1	20,0	9,1	9,1	16,7	9,1	55,7	44,3	28,5

5.3 Máxima incorporação de Anfotericina B nas microemulsões

As principais desvantagens do uso de Anfotericina B estão relacionadas com a sua baixa solubilidade em água, instabilidade em solução aquosa, sensibilidade à luz e temperaturas acima de 10°C. Sua baixa solubilidade aquosa resulta em baixa biodisponibilidade oral e uma absorção altamente variável, que restringe seu uso por via oral e requer estratégias de formulação complexas para a administração parenteral. Por essa razão, uma alternativa para mitigar tal problema e oferecer novas vias de administração, tem sido a formulação de diferentes sistemas, tais como lipossomas, microemulsões e nanopartículas lipídicas (GANGADHAR et al., 2014). Sistemas micelares de AnB previamente formulados com diferentes tensoativos tais como Tween 80, poloxamer e polietilenoglicol, aumentaram a solubilidade e permeabilidade de AnB nas membranas biológicas (MORENO-RODRÍGUEZ et al., 2015).

A Tabela 8 mostra que foi possível incorporar maior quantidade de AnB nas formulações ME02, ME05, ME10 e ME11, constituídas de diferentes pares de tensoativos. Observa-se, ainda, através dos valores de incorporação determinados, que a ME05, contendo o par de tensoativos Labrasol[®]/Plurol Oleique[®], possibilitou uma maior incorporação de AnB

no sistema, e que esta incorporação está diretamente relacionada à concentração dos tensoativos, visto que a ME10 também constituída por este par de tensoativos, mas com concentração inferior de tensoativos e percentual de água 4 vezes maior, apresentou solubilidade significativamente inferior, indicando que, neste caso, a solubilização da AnB foi favorecida quando havia maior quantidade de tensoativo na microemulsão, já que este facilita a solubilização do fármaco no sistema.

Entre as ME02 e ME11, não houve diferença estatisticamente significativa dos valores máximos de AnB incorporados ($p < 0,05$). Considerando a solubilidade da AnB em soluções aquosas no pH fisiológico, as referidas microemulsões apresentam-se como uma alternativa para aumentar a solubilidade desse fármaco.

Tabela 8 – Máxima incorporação de Anfotericina B nas microemulsões.

Microemulsões	Máxima Incorporação (mg mL^{-1}) \pm DP
ME01	0,953 \pm 0,166
ME02	1,863 \pm 0,176
ME03	0,722 \pm 0,108
ME04	0,748 \pm 0,229
ME05	2,605 \pm 0,216
ME06	0,908 \pm 0,343
ME07	0,974 \pm 0,371
ME08	0,961 \pm 0,115
ME09	0,917 \pm 0,180
ME10	1,295 \pm 0,137
ME11	1,895 \pm 0,221

5.4 Caracterização das microemulsões desenvolvidas e sistema convencional

Para os ensaios de caracterização foram utilizadas as microemulsões ME02 utilizando o par de tensoativos K/T20, ME05 e ME10 contendo L/PO e ME11 utilizando T20/S80, descritas na Tabela 7, o emulgel (SC1) e a emulsão (SC2) que estão descritos na Tabela 4. Todas essas formulações foram avaliadas antes e após serem acrescidas de 0,1% p/p de Anfotericina B. A seleção das formulações foi baseada nos resultados da máxima incorporação de AnB, uma vez que foram as formulações onde foi possível solubilizar quantidade igual ou superior a 1,0 mg/mL do fármaco.

5.4.1 *Centrifugação*

O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das gotículas e antecipando possíveis instabilidades (BRASIL, 2004). Todas as formulações mantiveram-se estáveis nos ensaios de centrifugação, não apresentando turvação, tão pouco separação de fase, dessa forma, a velocidade de centrifugação não provocou alterações nos sistemas.

5.4.2 *Determinação da condutividade elétrica e pH das formulações*

A condutividade elétrica é uma importante alternativa para determinar o tipo de ME, caracterizá-la fisicamente e fornecer informações estruturais principalmente sobre possíveis transições após diluição (DAMASCENO et al., 2011; LI et al., 2014). Já demonstrou-se que existe uma forte correlação entre a estrutura de uma microemulsão e o seu comportamento eletrocondutor. As medidas de condutividade apresentam-se como importantes meios na determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos em um sistema microemulsionado (LAWRENCE, REES, 2000; ROSSI et al., 2007).

Os valores apresentados pelas formulações (Tabela 9) estão relacionados às propriedades de condutividade da fase externa aquosa ou oleosa. Para as microemulsões, o percentual aquoso foi determinante para aumento da condutividade elétrica. Os sistemas convencionais, mesmo apresentando percentuais de água próximos, mostraram condutividades significativamente diferentes, o que pode estar relacionada à fase externa aquosa do emulgel, composta por um carbômero e a composição oleosa da cera polawax.

O pH ideal de uma formulação tópica é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância da pele, sendo aceitáveis valores entre 5,5 e 8,0 (SILVA et al., 2009). A AnB possui estabilidade na faixa de pH entre 6,0 e 9,0 (SILVEIRA et al., 2013). Portanto, os valores de pH evidenciados para as formulações avaliadas (Tabela 9) encontram-se dentro da faixa ideal para a anfotericina B e para a aplicação tópica.

Tabela 9 – Condutividade elétrica e pH das formulações

	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) \pm DP		pH \pm DP	
	Placebo	0,1% AnB	Placebo	0,1% AnB
SC1	92,5 \pm 1,5	91,9 \pm 1,0	6.10 \pm 0.1	6.30 \pm 0.1
SC2	24,1 \pm 1,0	24,5 \pm 0,5	6.50 \pm 0.1	6.20 \pm 0.1
ME02	6,4 \pm 0,8	6,6 \pm 0,5	6.70 \pm 0.1	8.13 \pm 0.1
ME05	12,9 \pm 0,9	13,5 \pm 0,6	7.22 \pm 0.1	8.09 \pm 0.1
ME10	96,6 \pm 2,3	100,8 \pm 1,7	7.06 \pm 0.1	8.07 \pm 0.1
ME11	67,8 \pm 1,9	71,1 \pm 2,2	6.84 \pm 0.1	7.89 \pm 0.1

5.4.3 Determinação do tamanho das gotículas e potencial zeta

Microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, com diâmetro de gotícula na faixa de 10-300 nm (DAMASCENO et al., 2012). A determinação do tamanho das gotículas e de sua distribuição corresponde a um dos parâmetros mais importantes para se avaliar a estabilidade dos sistemas microemulsionados e a influência da incorporação de fármacos pouco solúveis que poderiam causar uma instabilidade sobre o sistema.

Estudos previamente reportados mostram que a incorporação da AnB aumenta o tamanho da gotícula originada inicialmente com a ME sem o fármaco. Isto se deve, provavelmente, as propriedades físico-químicas intrínsecas da molécula, anfotericidade e anfifilicidade, que levam o fármaco a se localizar dentro da gotícula ou até mesmo em sua região interfacial. Entretanto, este fato não é capaz de alterar a estabilidade do sistema e as propriedades isotrópicas são, portanto, mantidas (BUTANI et al., 2014; SILVA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013). As emulsões são dispersões termodinamicamente instáveis com diâmetros de gotículas superiores a 300 nm. Os emulgéis são emulsões espessadas com um agente gelificante e que são geralmente utilizados como sistemas de distribuição para fármacos insolúveis em água (ALEXANDER et al., 2013).

Os resultados apresentados na tabela abaixo, corroboram com as informações acima, onde as microemulsões e sistemas convencionais apresentaram tamanho de gotícula característicos, 15 - 70 μm e 400 - 490 μm , respectivamente, e que a incorporação da AnB aumenta o tamanho das gotículas, sem necessariamente, desestabilizar o sistema.

Apenas para as ME02 e ME11 o aumento do tamanho das gotículas após a incorporação do fármaco foi estatisticamente significativo $p < 0,05$. Não houve relação direta entre a concentração dos tensoativos e do óleo e o tamanho das gotículas.

Os valores de índice de polidispersão (IPD) observados para as microemulsões foram entre 0,191 e 0,298, indicando que as gotículas das microemulsões eram homogêneas e com distribuição de tamanho uniforme. Para o emulgel e a emulsão, os valores de IPD estavam entre 0,505 e 0,626, o que permite inferir que as gotículas apresentavam distribuição pouco uniforme (CONEAC et al., 2015).

O potencial zeta tem um papel importante na determinação da estabilidade de sistemas dispersos e nas interações entre as gotículas presentes (KHAN et al., 2013). Sistemas mais estáveis apresentam valores de potencial zeta iguais ou superiores ao módulo de 20 mV, porém esta regra não pode ser aplicada irrestritamente, pois existem algumas formulações com estabilizantes que possuem um potencial zeta menor e nem por isso não são estáveis.

Geralmente, a agregação entre as gotículas é menor quando há repulsão eletrostática entre elas, o que leva a concluir que altos valores de potencial zeta evitam a agregação das gotículas das microemulsões, aumentando a estabilidade do sistema. Normalmente, a estabilidade de MEs contendo em sua composição tensoativos não-iônicos, como as formulações do presente estudo, não depende unicamente do potencial zeta.

Não há relação direta entre estabilidade e certo valor do potencial Zeta. A origem da carga de interface depende da composição do óleo, do pH e eletrólitos presentes na fase aquosa e a repulsão eletrostática entre partículas depende do valor do potencial zeta, quanto maior o potencial zeta, mais forte a repulsão, mais estável se torna o sistema (KITIPONGPITAYA et al., 2016).

Os valores apresentados na Tabela 10 mostraram medições de potencial Zeta que indicam que a interface está carregada negativamente, mesmo utilizando apenas tensoativos não-iônicos, isto se deve, provavelmente, aos ácidos graxos livres do óleo e muitos emulsionantes tais como Tween 20, que podem contribuir com cargas negativas em formulações emulsionadas, esta carga aumentará a estabilidade das formulações provocando uma repulsão de duas camadas entre as gotículas (BUTANI et al., 2016; KITIPONGPITAYA et al., 2016).

Os dados mostraram também que apenas o emulgel e a emulsão, apresentaram valores inferiores ao módulo de 20 mV, indicando, possivelmente, maior estabilidade das microemulsões.

Tabela 10 – Tamanho das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta (n=3).

	Tamanho de Gotícula (nm)		IPD		Potencial Zeta (mV)	
	Placebo	0,1% AnB	Placebo	0,1% AnB	Placebo	0,1% AnB
SC1	408.63 ± 12.9	420.43 ± 10.1	0,505± 0,06	0,574± 0,19	-12.9 ± 0.8	-11.8 ± 1.1
SC2	466.15 ± 15.2	489.22 ± 14.5	0,615± 0,10	0,626± 0,12	-18.79 ± 0.1	-19.21 ± 0.1
ME02	15.16 ± 0.6	31.02 ± 0.9	0,218± 0,11	0,256± 0,07	-27.7 ± 2.8	-23.4 ± 1.4
ME05	77.04 ± 1.5	89.86 ± 1.2	0,191±0,05	0,215±0,05	-29.7 ± 1.6	-26.8 ± 0.7
ME10	54.80 ± 1.5	63.68 ± 1.6	0,266± 0,09	0,298± 0,10	-31.8 ± 6.2	-24.1 ± 2.3
ME11	20.67 ± 1.2	34.42 ± 0.4	0,223± 0,05	0,245± 0,04	-21.1 ± 2.1	-22.7 ± 2.4

5.4.4 *Teste de solubilidade em corante*

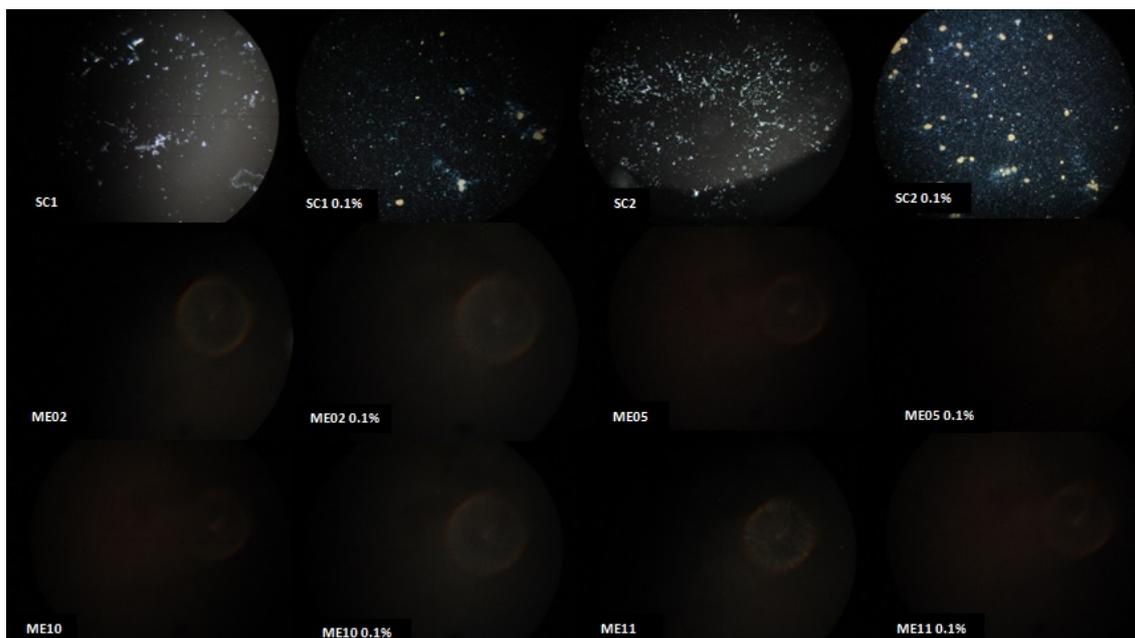
O resultado do teste de solubilidade do corante mostrou que o corante solúvel em água se espalhou uniformemente em todos os sistemas MEs e isto indica que as MEs formadas foram do tipo O/A. Normalmente, o EHL requerido para formar ME O/A situa-se entre 12 e 18, valores abaixo, indicam a formação de sistemas A/O (KAWAKAMI et al., 2002). Neste caso, mesmo as MEs constituídas pelo par de tensoativos Plurol e Labrasol na proporção de 2:1, resultando em um EHL de 11,36, formaram um sistema O/A, considerando a maior proporção de Labrasol, tensoativo hidrofílico de EHL 14. As demais microemulsões corroboram as informações anteriores.

5.4.5 *Microscopia de luz polarizada*

As microemulsões são isotrópicas e podem ser diferenciadas dos sistemas líquido-cristalinos, que são anisotrópicos (FORMARIZ et al., 2005). Os materiais isotrópicos têm propriedades ópticas, independente da direção da luz incidente, enquanto que as propriedades ópticas dos materiais anisotrópicos variam com a direção da luz incidente (MORAIS, 2006).

Para observar os efeitos da birrefringência e isotropia, é necessária uma luz polarizada linear. As microemulsões não apresentaram nenhum desvio ou vibração da luz polarizada e a incorporação de Anfotericina B não alterou o comportamento isotrópico (Figura 16), ou seja, sob o plano de luz polarizado não desvia luz, confirmando a manutenção de sistema microemulsionado. Já as fotomicrografias do emulgel e da emulsão, mostraram claramente a anisotropia dos sistemas antes e após a incorporação do fármaco.

Figura 16 – Fotomicrografias obtidas utilizando microscópio de luz polarizada.



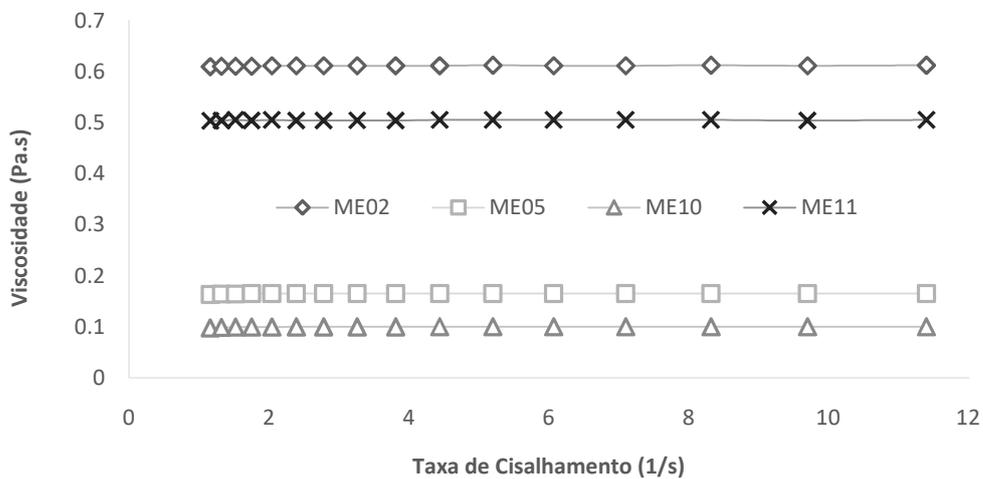
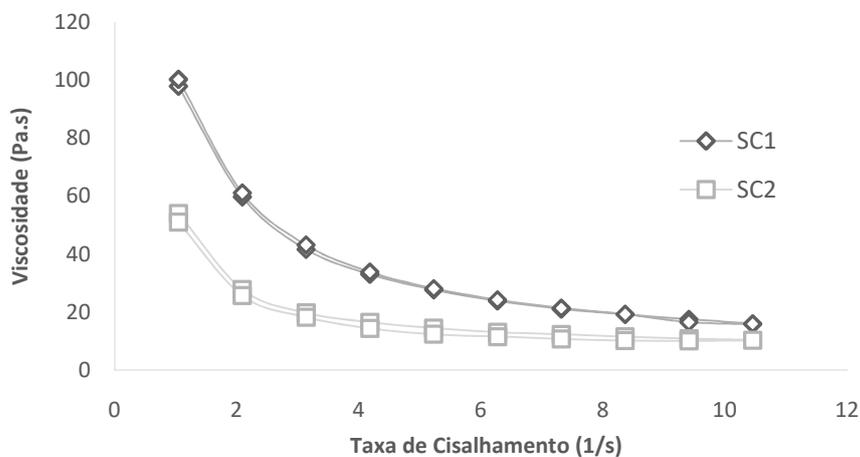
5.4.6 Viscosidade e Reologia

A viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento das formulações tópicas de AnB, está apresentada nas Figuras 17 e 18. Claramente, a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de cisalhamento para os sistemas convencionais, mas é constante para as microemulsões. Também, foi possível verificar, através da Tabela 11, que a viscosidade das MEs foi maior na seguinte ordem, $ME02 > ME11 > ME05 > ME10$, tal resultado está diretamente relacionado com as características dos tensoativos que compõem as formulações, visto que o Labrasol[®], componente da ME05 e ME10 tem baixíssima viscosidade em comparação aos demais tensoativos, e também, ao percentual de fase aquosa das formulações. Ainda, foi possível confirmar a baixa viscosidade das MEs, o que é uma característica desses sistemas, e que a incorporação do fármaco não modificou significativamente a viscosidade de nenhuma das formulações ($p < 0,05$).

Os valores de viscosidade das MEs são independentes da variação de tensão de cisalhamento, indicando que o fluxo newtoniano, que é típico desses sistemas, foi observado (LI et al., 2012). Os SCs apresentaram fluxo pseudoplástico, o que é uma característica interessante para formulações semi-sólidas, uma vez que os valores de viscosidade são reduzidos com o aumento da tensão de cisalhamento, facilitando sua espalhabilidade na pele. Em ambos os casos, foram avaliadas curvas ascendentes e descendentes para verificar a influência do tempo no comportamento reológico das formulações. Ambas as formulações foram independentes do tempo, e assim, não se observou tixotropia.

Tabela 11 – Viscosidade das formulações (n=3).

	Viscosidade (Pa.s) 30 rpm	
	Placebo	0,1% AnB
SC1	15.90 ± 0.5	15.93 ± 0.5
SC2	10.29 ± 0.5	10.35 ± 0.4
ME02	0.63 ± 0.1	0.63 ± 0.1
ME05	0.16 ± 0.1	0.16 ± 0.1
ME10	0.09 ± 0.1	0.09 ± 0.1
ME11	0.62 ± 0.1	0.61 ± 0.1

Figura 17 – Curvas de fluxo de microemulsões contendo de AnB (0,1%).**Figura 18** – Curvas de fluxo de emulgel (SC1) e emulsão (SC2) contendo de AnB (0,1%).

5.4.7 Espalhamento de Raio-X de Baixo Ângulo (SAXS)

Tendo em vista os atuais avanços no desenvolvimento de micro e nanoestruturas para o carregamento de fármacos, onde o tamanho e a morfologia são fundamentais e definidores das funções desses sistemas, uma caracterização completa e consistente da estrutura dos nanosistemas é de importância crucial no desenvolvimento dessas formulações (GARCIA-DIEZ et al., 2016).

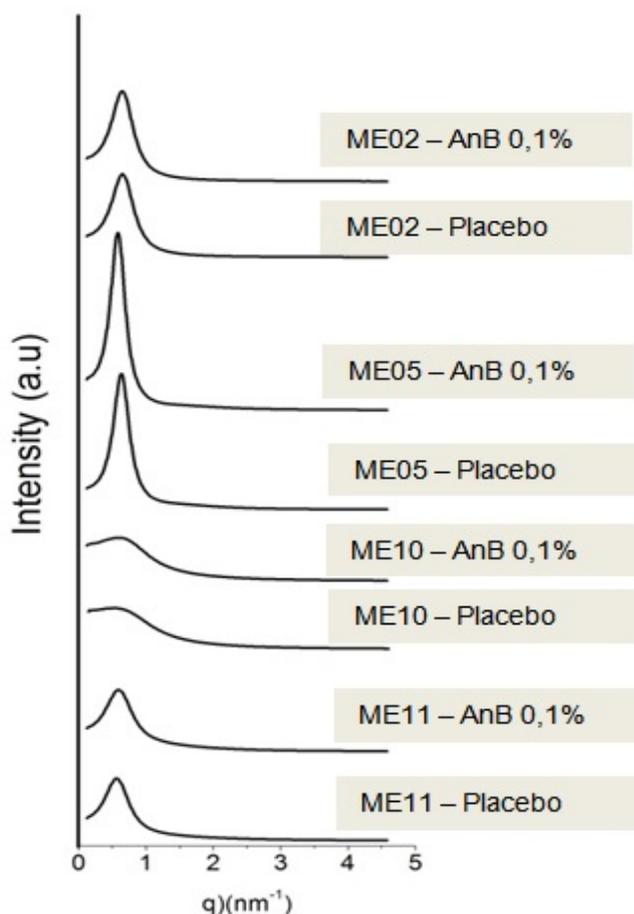
A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é amplamente utilizada para as investigações da estrutura interna de sistemas nanoestruturados, permitindo obter informações da ordem de nanômetros (TOMSIC et al., 2006). Dessa forma, para uma análise mais criteriosa dos sistemas selecionados foram realizadas análises de SAXS.

As curvas de SAXS para sistemas líquido-cristalinos exibem picos, cujo número e razão entre as distâncias de correlação permitem determinar o tipo de arranjo que os átomos formam na matriz. Assim, para que, apenas pela análise da curva de SAXS um tipo de arranjo líquido-cristalino seja identificado, pelo menos três picos devem ser bem definidos (CHORILLI et al., 2011).

Os espectros de SAXS experimentais para as ME02, ME05, ME10 e ME11, estão exibidas em um gráfico (Figura 19) que relaciona a intensidades do espalhamento $I(q)$ e o vetor de espalhamento (q). As microemulsões foram avaliadas sem a incorporação do fármaco e com o fármaco, e foi possível observar que estrutura interna das formulações se mantém mesmo após a incorporação de 0,1% de Anfotericina B.

Os picos são mais estreitos e expressivos para ME02 e ME05, que possuem maior teor de tensoativos e menor teor aquoso, já a ME10 que possui em sua composição maior teor aquoso, apresentou picos mais largos e inexpressivos. Não foram observados outros picos no intervalo de 0,1 a 1,5 nm^{-1} no perfil de SAXS, como os característicos de mesofases (estrutura de cristal líquido liotrópico, por exemplo), sendo, portanto, espectros característicos de microemulsões.

Figura 19 – Espectro de SAXS das microemulsões desenvolvidas.



5.5 Quantificação e validação de método para doseamento de Anfotericina B

O método utilizado para quantificação da Anfotericina B mostrou seletividade, especificidade e linearidade adequada. A curva de calibração da AnB apresentou equação ($y = 63346x$) com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9999. Segundo a RE 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de R^2 obedece aos limites estabelecidos (Figura 20). O cromatograma apresentado na figura abaixo mostra o tempo de retenção do fármaco de aproximadamente 3,2 minutos e boa definição e separação do pico cromatográfico da Anfotericina B, confirmando que o método é adequado para a quantificação do fármaco. Os limites de quantificação e detecção foram 0,05 e 0,02 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 20 – Curva de Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração.

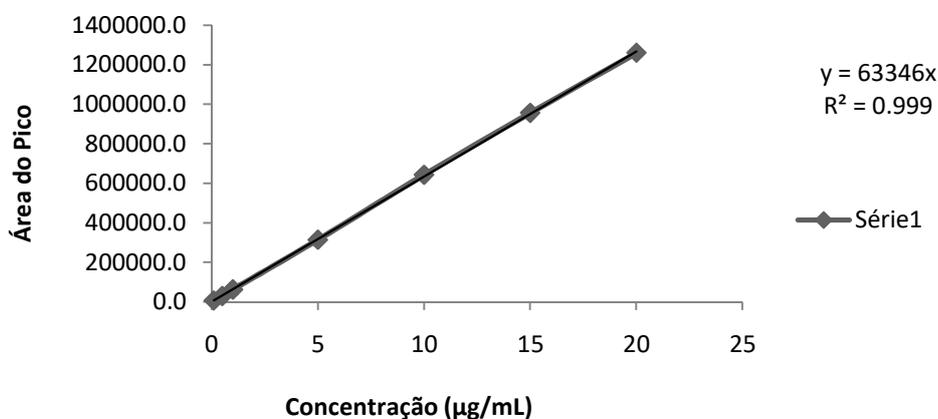
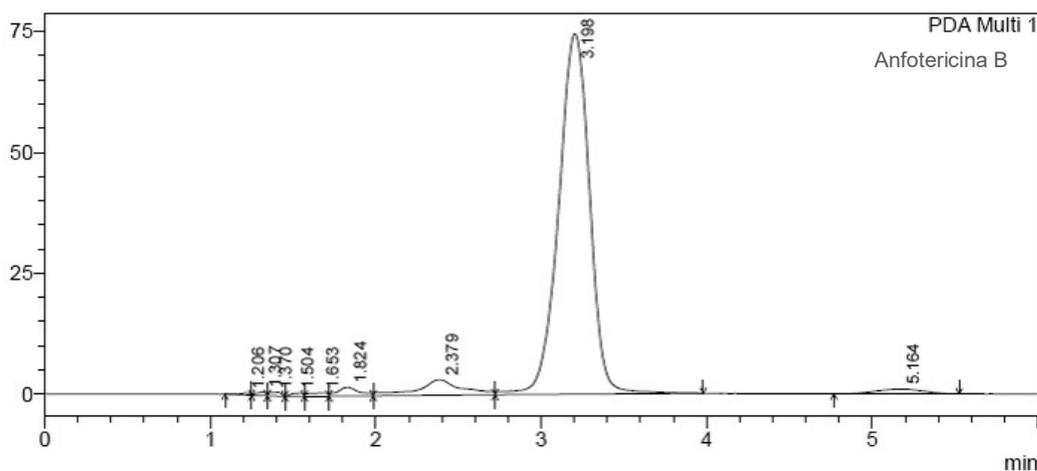


Figura 21 – Cromatograma referente ao ponto 15 µg/mL da curva padrão



5.6 Caracterização físico-química do óleo de catolé (*Syagrus cearensis*)

O catolé (*Syagrus cearensis*) é fruto de uma palmeira típica da região Nordeste do Brasil. De sua amêndoa é extraído um óleo com alto teor de ácidos graxos saturados e insaturados, como o ácido oléico, aproximadamente 12%, e o linoleico (CARACIOLO, 2016).

Atualmente, as análises de óleos vegetais para controle de qualidade estão voltadas principalmente para a acidez, índice de peróxidos e técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa (HIDALGO, ZAMORA, 2003). Estas técnicas são usadas principalmente para medição quantitativa de compostos conhecidos, e, com estes critérios de análise, diferentes regulamentos internacionais foram estabelecidos para definir a qualidade do óleo. Uma desvantagem para estes procedimentos é

que existem muitos ensaios para serem aplicados às análises de rotina. Além disso, alguns desses métodos exigem o isolamento e análise de compostos minoritários por meio de procedimentos que são demorados e numerosos. Portanto, é conveniente aplicar técnicas analíticas, como a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN ^1H), que podem produzir resultados semelhantes ou superiores aos obtidos quando da utilização de procedimentos clássicos (CARNEIRO et al., 2005).

Os resultados encontrados experimentalmente e os calculados através de espectros integrados de RMN ^1H estão representados na tabela abaixo.

Tabela 12: Caracterização físico-química do óleo de catolé, valores calculados a partir de dados de espectros integrados de RMN ^1H .

Parâmetro	$^1\text{HNMR}$	Experimental
Índice de Iodo (gI/100g)	12.57 ± 2.39	-
Índice de saponificação (mgKOH/g)	203.14 ± 1.17	201.15 ± 4.80
Acidez (mgKOH/g)	$2.9131 \pm 0.10^*$	$2.55 \pm 1.70^*$
Material Insaponificável (%)	-	8.468 ± 0.50
Índice de peróxidos (mmol/kg)	-	3.2 ± 0.20

(*) Valores com diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

A acidez e o índice de peróxidos são descritos como parâmetros referenciais para determinar a qualidade de óleos vegetais (FERREIRA et al., 2006).

O índice de acidez expressa, em miligramas, a quantidade necessária de hidróxido de potássio para a neutralização dos ácidos graxos livres em 1 g de amostra. Índices elevados de acidez são sugestivos de hidrólise acentuada dos ésteres constituintes da matéria graxa (F. BRAS. V, 2010).

O índice de peróxido é o número que exprime, em miliequivalentes de oxigênio ativo, a quantidade de peróxido em 1000 g de substância. É um dos métodos mais utilizados para medir o estado de oxidação de óleos e gorduras (CECCHI, 2003).

A Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece como valores máximos permitidos para os índices de acidez e de peróxidos para óleos e gorduras não refinadas 4,0 mg KOH/g e 15 meq/Kg, respectivamente.

O índice de saponificação é definido como o número de (mg) de hidróxido de potássio (KOH), necessários para saponificar os ácidos graxos, resultantes da hidrólise de um grama da amostra pode estabelecer o grau de deterioração e a estabilidade, verificar se as propriedades dos óleos estão de acordo com as especificações e identificar possíveis fraudes e adulterações (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Com relação aos teores dos índices de saponificação determinados observa-se que a média do valor determinado experimentalmente está dentro dos limites especificados pela Farmacopeia Brasileira V (2010), que estabelece valores entre 200 - 300 mgKOH/g.

Os dados obtidos a partir da caracterização do óleo de catolé mostraram que, embora tenha havido uma diferença estatisticamente significativa entre os valores de acidez calculados por RMN ^1H e volumetria ($p < 0,05$), este e os demais parâmetros estão de acordo com os padrões referenciais de qualidade.

5.7 Estudos de liberação, permeação e retenção de formulações tópicas contendo Anfotericina B

As características de liberação de um fármaco a partir de um veículo dermatológico podem ser avaliadas determinando-se o coeficiente de partição óleo/água. Entretanto, estudos de liberação *in vitro* e *in vivo* proporcionam dados mais significativos (AULTON, 2005). A solução receptora para os experimentos *in vitro* deve ser selecionada com base na solubilidade do fármaco, pois é necessária a manutenção das condições *sink* para permitir o fluxo contínuo do fármaco e garantir a obtenção de resultados efetivos (SILVA et al., 2009).

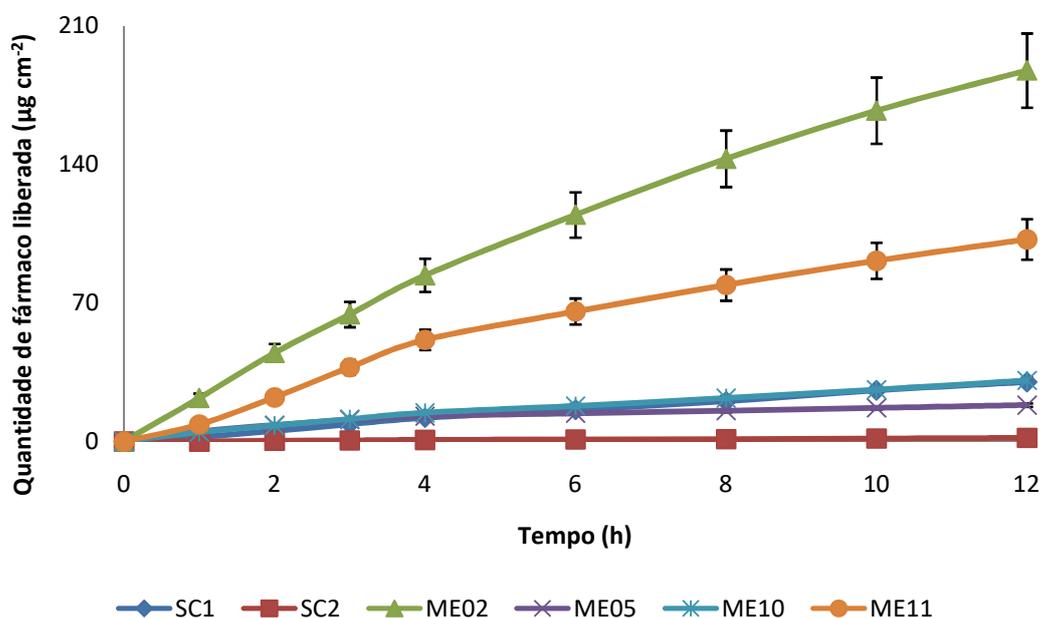
De acordo com os resultados da solubilidade da AnB em diversos meios receptores que estão apresentados na tabela abaixo, selecionou-se como meio receptor Tampão pH 7,4 + Brij 020[®] 2,0 %, não por ter apresentado maior solubilidade, mas por já possibilitar manter as condições ideais para condução do estudo e evitar todos os interferentes, como a formação de excesso de espuma, associados à utilização de uma maior quantidade de Brij 020[®] ou lauril sulfato de sódio.

Tabela 13 – Solubilidade da Anfotericina B em diferentes meios receptores.

Meios receptores	Solubilidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) \pm DP
Tampão fosfato pH 7.4	$6,76 \pm 0,12$
Tampão pH 7,4 + Brij 020 [®] 2,0 %	$44,76 \pm 0,23$
Tampão pH 7,4 + Brij 020 [®] 4,0 %	$48,98 \pm 0,18$
Tampão pH 7,4 + LSS 0,1%	$16,70 \pm 2,81$
Tampão pH 7,4 + LSS 0,5%	$61,25 \pm 6,72$

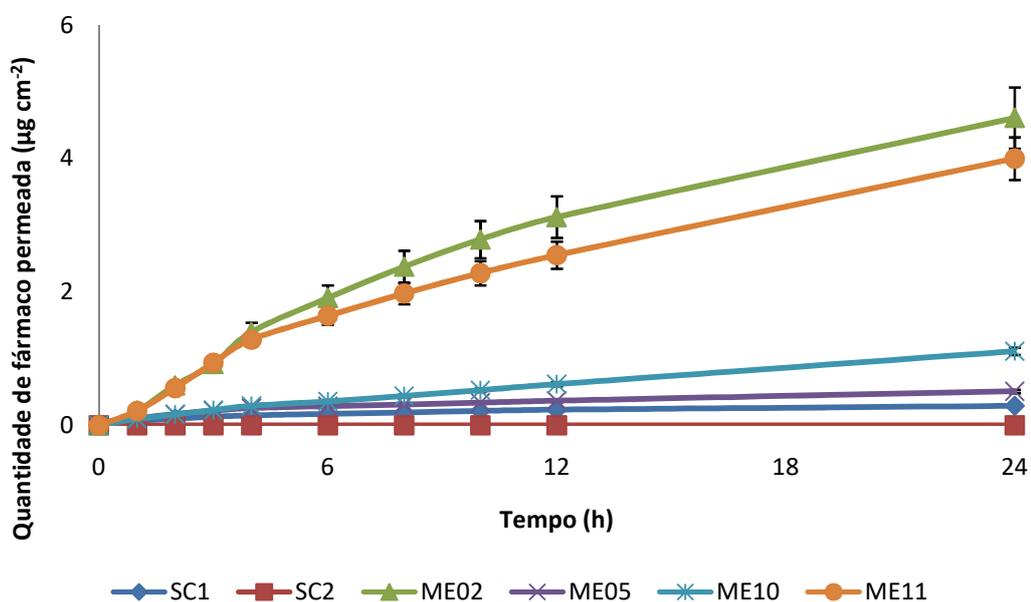
LSS – Lauril Sulfato de Sódio

A Tabela 14 e as Figuras 22 e 23 mostram o perfil de liberação e permeação das formulações estudadas após um período de 12 e 24 horas, respectivamente.

Figura 22 – Perfil de liberação *in vitro* das formulações estudadas utilizando membrana sintética de ésteres de celulose 0,45 μm .

O gráfico da quantidade de Anfotericina B liberada das formulações selecionadas (Figura 22) após 12 horas, mostra que a ME02 e a ME11 liberaram maiores quantidades de AnB através da membrana sintética utilizada e que não existiu diferença estatisticamente significativa entre as quantidades liberadas de SC1, ME05 e ME10. Entretanto, as ME02 e ME11, diferem entre si e das outras formulações ($p < 0,05$).

Figura 23 – Perfil de permeação *ex vivo* das formulações estudadas utilizando membrana natural sem estrato córneo.



Os resultados de permeação corroboram os resultados do perfil de liberação, as formulações ME02 e ME11 apresentaram maior permeação do fármaco que as outras. Todas apresentaram permeação cumulativa do fármaco após 24 horas em quantidade inferior a 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspondendo a aproximadamente 1,25% do fármaco aplicado (Figura 23). A emulsão não apresentou uma quantidade significativa de permeabilidade de AnB através da biomembrana.

O óleo de catolé apresentou potencial promotor de permeação para um fármaco hidrofílico e para um fármaco lipofílico testado em um estudo utilizando pele de cobra (CARACIOLO, 2016). Para verificar a influência do óleo de catolé na liberação e permeação da Anfotericina B a partir das microemulsões, uma microemulsão similar à ME02, mas substituindo o óleo de catolé por ácido oléico, que é constituinte comum de microemulsões e possui reconhecida capacidade promotora de permeação, foi preparada (ME12) e avaliada. Os perfis de liberação e permeação comparativos entre essas formulações estão demonstrados nas figuras abaixo.

Figura 24 – Perfil de liberação *in vitro* comparativo entre as microemulsões ME02 e ME12 utilizando membrana sintética de ésteres de celulose 0,45 μm .

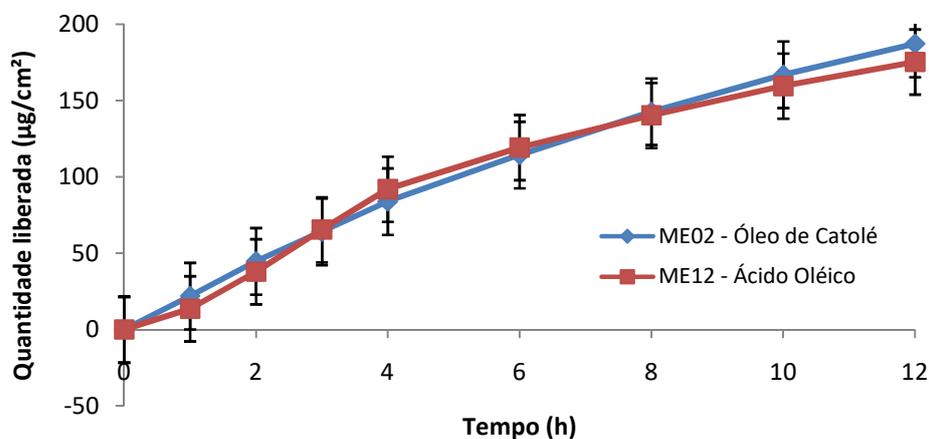
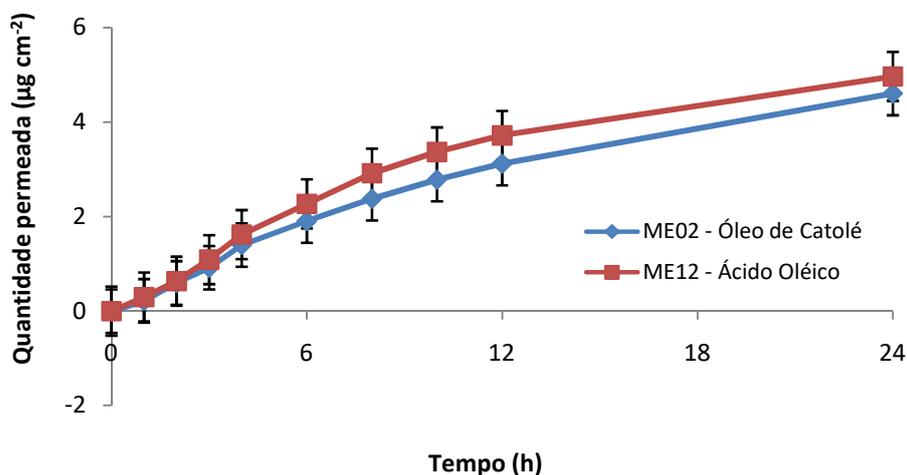


Figura 25 – Perfil de permeação *ex vivo* comparativo entre as microemulsões ME02 e ME12 utilizando membrana natural sem estrato córneo.



Através das Figuras 23 e 24 foi possível verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os perfis de liberação e permeação de AnB a partir das microemulsões contendo óleo de catolé ou ácido oléico como fase oleosa ($p < 0,05$). De acordo com esse resultado, podemos inferir que o alto teor de tensoativos dessas microemulsões, que têm características de desorganizar os lipídeos da pele e assim contribuir para maior permeação do fármaco, é o fator primordial, mas também, que o óleo de catolé tem efeito aparentemente

semelhante ao ácido oléico na permeação do referido fármaco através das formulações avaliadas.

Verificou-se que o fluxo (J) para as formulações contendo AnB (0,1% p/p) estava entre 0,018 e 0,289 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ e o coeficiente de permeabilidade (Kp) de AnB entre 0,45 e 7,22 cm/h, os dados estão apresentados detalhadamente na Tabela 14.

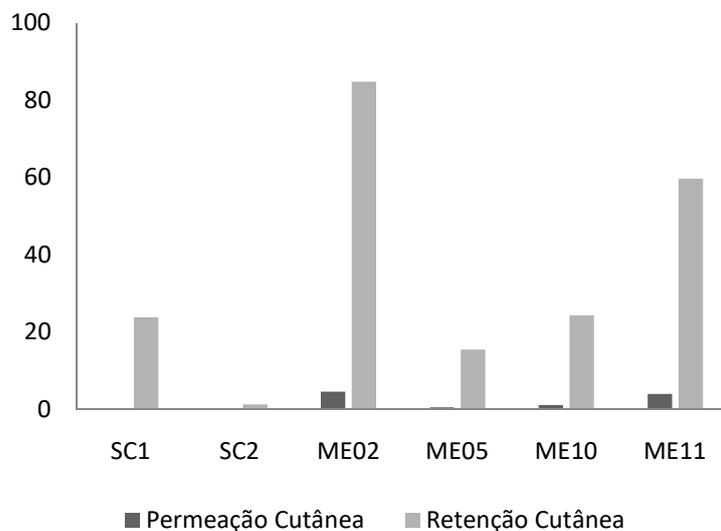
O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,95 para ME02 e 0,99 para ME11 quando os resultados da concentração cumulativa de AnB permeada através da biomembrana foram plotados em função do tempo. Para SC1, ME05 e ME10 os valores de R^2 foram maiores quando os resultados de permeação do fármaco foram plotados em função da raiz quadrada do tempo, 0,98, 0,98 e 0,95, respectivamente.

O estrato córneo das peles utilizadas em cada ensaio de permeação foi removido utilizando 30 fitas. As peles mostraram um valor de TEWL de $9,0 \pm 1,5$ g/hm² antes e valores entre 69,78 e 72,56 g/hm² após remoção do estrato córneo.

A retenção de AnB nas peles foi de 23,83, 1,26, 84,79, 15,52, 24,36 e 59,67 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ para SC1, SC2, ME02, ME05, ME10 e ME11, respectivamente. As microemulsões ME02 e ME11 apresentaram maior deposição nas camadas internas da pele, derme e epiderme, seguidas pela ME10 e emulgel (SC1). Observou-se que os valores de retenção de todas as formulações contendo AnB foram estatisticamente superiores ($p < 0,05$) aos valores de permeação (Figura 25).

Tabela 14 - Quantidade permeada após 24h ($Q_{24} \pm \text{D.P.}$), Fluxo $\pm \text{D.P}$ (J) e Kp de Anfotericina B 0,1% nas microemulsões, emulgel e emulsão

	SC1	SC2	ME02	ME05	ME10	ME11
$Q_{24} (\mu\text{g cm}^{-2})^a$	0.2909	0	4.6076	0.5087	1.1098	3.9988
$J (\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1})^a$	0.018	0	0.289	0.032	0.051	0.246
$K_p (\text{cm h}^{-1}) \times 10^{-3}$	0.45	0	7.225	0,8	1.275	6.15
$Q_{ED} (\mu\text{g cm}^{-2})^a$	23.828	1.257	84.728	15.521	24.356	59.666

Figura 26 – Retenção cutânea de formulações tópicas contendo AnB 0,1%.

Com o intuito de verificar se o método selecionado era adequado para avaliar a retenção de Anfotericina B nas peles, a recuperação do fármaco foi avaliada. Os resultados foram expressos em percentual de Anfotericina B recuperado e estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Recuperação da Anfotericina B nas peles utilizadas

Recuperação de Anfotericina B nas peles		
10 µg/mL (n=3)		
Média±DP (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)
9,129±0,188	2,065	91,29

Os valores da recuperação estão diretamente relacionados com a capacidade do método de extrair o fármaco no modelo de biomembrana utilizado, a recuperação deve ser $100 \pm 10\%$, para garantir resultados adequados (OECD, 2004). Portanto, os resultados apresentados, demonstram que não houve perda significativa nem degradação da substância analisada durante os procedimentos de retenção cutânea, uma vez que o fármaco avaliado foi recuperado em quantidades superiores a 90%, assim, os resultados confirmam que o método utilizado foi adequado e os resultados são confiáveis.

Vários fatores estão relacionados com a liberação de um fármaco a partir de formulações emulsionadas, dentre eles estão o tamanho de gotícula, viscosidade e as

interações entre a formulação e o fármaco, entretanto, para a permeação através da pele, o fator limitante é o estrato córneo intacto (FORMARIZ et al., 2005; YUTANI et al., 2016).

Os medicamentos para aplicação tópica são geralmente testados em pele saudável, no entanto, o estrato córneo (EC) é comumente lesionado por doenças de pele. A principal função do estrato córneo como a camada mais externa da pele é proteger o organismo contra substâncias nocivas do ambiente e controlar a evaporação da água do tecido viável subjacente. A combinação dos lípidos lamelares intercelulares juntamente com o ambiente intracelular altamente queratinizado nos corneócitos mortos e achatados torna o estrato córneo uma barreira muito eficaz neste contexto (FOKUHL et al., 2013).

Assim, as condições dermatológicas que alteram a fisiologia e/ou estrutura da pele podem interferir significativamente na permeação de substâncias através da pele e, subsequentemente, propiciar absorção sistêmica de substâncias que em condições normais não atravessariam as camadas da pele. Portanto, é importante utilizar um modelo de pele adequado para avaliar a permeação de fármacos utilizados no tratamento tópico de doenças que causam lesões na pele (SCHLUPP et al., 2014).

Neste caso específico, é necessário considerar que as formulações serão aplicadas sobre pele escarificada, que perdeu o estrato córneo e, possivelmente, mais da epiderme. (OSPINA et al., 2014). Dessa forma, se faz necessário avaliar a permeação e retenção em um modelo de pele lesionado a fim de verificar se o fármaco realmente se concentra no local de ação, ou seja, nas camadas da pele.

As formulações ME02 e ME11 mostraram maior liberação do fármaco, permeação e retenção na pele do que as outras formulações, e o emulgel apresentou resultados superiores à emulsão, como mostrado nas Figura 22 e 23 e Tabela 14 ($p < 0,05$). Essas MEs apresentaram um tamanho de gotícula menor, mas uma viscosidade mais elevada do que as microemulsões utilizando o par tensoativos L/PO (ME05 e ME10). Neste caso, provavelmente, os fatores determinantes foram o tamanho de gotícula e a interação entre a formulação e o fármaco, independentemente da viscosidade do sistema, uma vez que a ME05 apresentou uma maior capacidade de solubilizar AnB, porém, taxas mais baixas de liberação, permeação e retenção do que as outras microemulsões. As formulações convencionais são significativamente mais viscosas e possuem gotículas maiores do que as MEs, confirmando a maior dificuldade para o fármaco de ser liberado a partir destes sistemas.

Considerando apenas o tamanho das gotículas das microemulsões, que são inferiores ao poro da membrana sintética utilizada, seria de se esperar a passagem de todo o fármaco a

partir desses sistemas no estudo de liberação *in vitro*, no entanto, não é apenas o tamanho dos poros da membrana o que determina a penetração das gotículas e, conseqüentemente, do fármaco, no meio receptor. A viscosidade e interação/solubilidade do fármaco com a formulação também são fatores determinantes. Além disso, comparamos a liberação do fármaco a partir de sistemas macro e microestruturados, cujas características e viscosidades eram totalmente diferentes.

Este resultado corrobora o artigo de Franz (1983), onde o autor afirma que o fator essencial que impõe limitações práticas às relações entre a concentração de drogas e a liberação é a solubilidade adequada, visto que uma solubilidade muito alta também pode dificultar a liberação do fármaco a partir de uma determinada formulação.

A difusão é um processo fundamentalmente individual no qual as moléculas do fármaco solubilizadas se movem através da barreira ou do meio. Ao mesmo tempo, em geral, para o mesmo tipo de preparação, aqueles que têm a viscosidade mais elevada liberam o fármaco de forma menos eficiente. No entanto, quando são feitas comparações entre diferentes tipos de preparações, as de maior viscosidade nem sempre fornecem menos fármaco. Dessa forma, a utilização de um teste de liberação *in vitro* utilizando membranas artificiais mostra que a estrutura dos excipientes é um aspecto essencial nas preparações dermatológicas (SANTANA, 1992).

As MEs 02 e 11 apresentaram maior coeficiente de correlação quando os resultados da concentração permeada foram plotados em função do tempo, indicando que o modelo cinético de ordem zero é mais apropriado e que o fluxo é independente da concentração do fármaco. Para SC1, ME05 e ME10, os valores dos coeficientes de correlação foram mais próximos de 1 após a regressão linear da concentração permeada em função da raiz quadrada do tempo, demonstrando que as formulações seguem o modelo cinético de Higuchi, em que a difusão é controlado pelo sistema (BOLZINGER et al., 2012; DASH et al., 2010).

Considerando o desfecho de absorção cutânea, o ensaio OECD TG 428 indica apenas em linhas gerais como o ensaio deve ser realizado, no entanto, existem dificuldades relativas à padronização do mesmo, questões como o tipo de pele a ser utilizada (humana, suína ou de roedores), controle da espessura e garantia da sua integridade, fatores que impactam diretamente no resultado obtido.

A avaliação das diferenças fisiológicas e estruturais entre a pele humana e animal é desafiadora devido à alta variabilidade na pele humana em relação ao local do corpo, à idade e à exposição a vários fatores externos. Este é, particularmente, o caso de parâmetros como a

espessura da pele humana e o fluxo sanguíneo. As diferenças entre os seres humanos e os animais na expressão enzimática e no impacto do metabolismo na permeação de substâncias através da pele são difíceis de avaliar, particularmente quantitativamente, devido à escassez de dados em animais. Qualitativamente, pela similaridade estrutural, parece claro que a pele suína é o modelo mais adequado (DANCIK et al., 2015).

O guia OCDE TG 428, exige a realização de testes de integridade antes de realizar experimentos de permeação, o documento de orientação para a realização desses estudos especifica essa afirmação recomendando a medição da perda de água transepidermal (TEWL), resistência elétrica ou o uso de materiais de referência, como a água tritiada, como marcador de permeação (OECD, 2004).

A avaliação da perda de água transepidermal (TEWL) é um método bem estabelecido em dermatologia para avaliar a integridade da barreira cutânea. Quando a pele está danificada, sua função de barreira é prejudicada resultando em maior perda de água. Em comparação com os outros métodos, a avaliação da TEWL tem a vantagem de não ser necessário adicionar soluções para realizar o teste de integridade de barreira para além das utilizadas nos ensaios de permeação (NETZLAFF et al., 2006; SCHLUPP et al., 2014).

As medições de TEWL permitem descobrir as perturbações na função protetora da pele numa fase inicial, mesmo antes de serem visíveis. A pele normal permite a perda de água apenas em pequenas quantidades. No caso de afecções tóxicas, a perda de água é muito maior. A determinação da TEWL é um importante suporte para investigar a irritação da pele que ocorre por várias influências físicas e químicas (MUNDLEIN et al., 2008).

Uma outra questão de interesse é a influência da temperatura ambiente e da umidade do ar ambiente nos resultados da medição. As medições TEWL devem ser realizadas em uma sala especial com condições padrão, temperatura e humidade controladas. Sabe-se também que o valor TEWL depende não apenas do tipo de pele, mas também de parâmetros externos que possam alterar a função da barreira significativamente. Portanto, tendo em vista todas estas variáveis, podemos inferir que as medições de TEWL podem detectar danos graves ao estrato córneo, mas não pequenas alterações, que, no entanto, já podem influenciar a difusão do fármaco (MUNDLEIN et al., 2008; SCHLUPP et al., 2014).

Normalmente os valores de TEWL para uma pele íntegra estão entre 3,2 e 10,9 g/m²/h, as afecções da pele tendem a resultar em aproximadamente 5 ou mesmo 10 vezes maiores valores de TEWL do que a pele saudável (FOKUHL et al., 2013). Diversos métodos podem ser utilizados para lesionar um modelo de pele para estudos de permeação cutânea. O método

de *tape stripping* tem demonstrado ser feituoso e em estudo previamente realizado, observou-se que não houve diferença entre o método *tape stripping* e o método de abrasão (SCHLUPP et al., 2014). O Tewameter TM 300 e o AquaFlux AF200 são equipamentos bastante utilizados para avaliação da perda de água transepidermal em modelos de pele, com base na Lei de Difusão de Fick.

Através das medidas TEWL realizadas, foi possível inferir que a condição de lesão da pele foi a mesma para todos os ensaios, uma vez que todas as peles utilizadas mostraram valores de TEWL estatisticamente semelhantes após a remoção do estrato córneo ($p < 0,05$), e que, efetivamente as peles foram lesionadas, já que os valores de TEWL aumentaram aproximadamente 8 vezes em relação às medidas iniciais (FOKUHL et al., 2013).

O tratamento de feridas também tem recebido muita atenção por parte dos profissionais de saúde, campo no qual se tem observado crescente aplicação de formulações de uso tópico. As formulações empregadas no tratamento das afecções tóxicas são preparações de consistência semi-sólida destinadas a serem aplicadas sobre a pele ou sobre determinadas mucosas a fim de exercer uma ação local ou de promover a passagem de princípios medicamentosos através das camadas da pele e oferecer uma liberação sustentada do fármaco (BUTANI et al., 2016).

Mesmo com o entendimento de que as formulações lipídicas de AnB permitem a redução da toxicidade do fármaco em relação à forma convencional, um outro ponto que dificulta o tratamento com essas formulações lipídicas de Anfotericina B, atualmente aprovadas para a leishmaniose, é seu alto custo, visto que requerem administração parenteral e são, de fato, formulações caras.

Todas as formulações apresentaram maior retentividade que permeabilidade, o que é essencial para "depósito" de AnB na epiderme e derme, destinada a tratar as lesões de leishmaniose cutânea e as infecções bacterianas ou fúngicas secundárias associadas com a lesão inicial (RAMOS-SILVA; JAQUES, 2002).

Os resultados de um estudo *in vivo* utilizando formulações contendo 0,1% de AnB na forma farmacêutica gel, administradas por via subcutânea, em camundongos infectados com leishmaniose tegumentar, mostraram redução significativa das lesões em um intervalo curto de tempo, no entanto, ainda apresenta a vantagem de requerer administração parenteral (MENDONÇA et al., 2016).

As formulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram várias vantagens, uma delas foi a utilização de um novo óleo vegetal, sinalizando o uso de recursos naturais com

desenvolvimento sustentável e, conseqüentemente, contribuição social. Além disso, nosso estudo objetivou desenvolver formulações com alta retentividade e baixa permeabilidade, mesmo utilizando um modelo de pele lesionada. Microemulsões e as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) previamente desenvolvidas para aplicação tópica de anfotericina B apresentaram maior permeabilidade do que as formulações aqui desenvolvidas (BUTANI et al., 2014; BUTANI et al., 2016). Vale a pena acrescentar que a ME02 desenvolvida exibiu uma retenção de fármaco duas vezes maior em comparação com as SLNs e retentividade comparável às melhores microemulsões desenvolvidas por Butani et al., 2014. Por outro lado, em ambos os estudos anteriores, pele de rato foi utilizada como biomembrana e a relação quantidade/área de formulação aplicada foi superior.

Figura 27 – Ensaio de permeação cutânea: a) Sistema de difusão em células de Franz automatizadas; b) membrana sintética ésteres de celulose 0,45 μ m; c) pele dermatomizada; d) Tewameter[®] TM 300. Fonte: Autor próprio.



5.8 Estabilidade das formulações

A estabilidade de sistemas emulsionados está diretamente relacionada com a manutenção do tamanho de gotícula das formulações quando submetidas a diferentes condições de armazenamento. O colapso de um sistema de emulsionado é manifestado pela fusão de gotículas que em última análise separam da fase dispersa como gotículas maiores através de um processo conhecido como coalescência (LI et al., 2012).

Estudos anteriores propuseram a estratégia para a incorporação de AnB em nanoemulsões, sem a utilização de solventes orgânicos, empregando o perfil de solubilidade de pH do fármaco e, mais especificamente, a sua maior solubilidade em água a pH básico, método utilizado neste trabalho. No entanto, estes autores relataram alterações significativas no tamanho de gotícula das formulações contendo AnB após 7 dias, mostrando que eram muito instáveis (CALDEIRA et al., 2015).

Todas as microemulsões e o emulgel desenvolvidos permaneceram fisicamente estáveis ao longo do período de estudo. Não houve separação de fases ou agregação significativa das gotículas e, também, não foi observada turbidez. Quanto ao teor de AnB, não houveram diferenças significativas entre a concentração inicial e a concentração após 3 meses ($p < 0,05$). Em relação à emulsão, após 60 dias houve agregação intensa das gotículas, especialmente quando armazenadas à temperatura ambiente, confirmando a estabilidade das microemulsões desenvolvidas mesmo utilizando o método de preparação descrito anteriormente. Os resultados estão detalhados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 – Resultados dos estudos de estabilidade as formulações contendo 0,1% de AnB quando armazenadas à $5 \pm 2^\circ\text{C}$

	Tamanho de Gotícula (nm) $5 \pm 2^\circ\text{C}$			
	24 horas	30 dias	60 dias	90 dias
SC1	420.43 \pm 10.1	425.87 \pm 9.1	428.37 \pm 10.5	436.93 \pm 10.1
SC2	489.22 \pm 14.5	515.31 \pm 12.6	537.21 \pm 15.8	590.88 \pm 13.1
ME02	31.02 \pm 0.9	30.95 \pm 1.1	33.74 \pm 2.1	34.05 \pm 2.1
ME05	89.86 \pm 1.2	90.15 \pm 1.0	92.34 \pm 2.5	92.96 \pm 1.9
ME10	63.68 \pm 1.6	65.18 \pm 1.2	66.20 \pm 2.6	66.70 \pm 1.5
ME11	34.42 \pm 0.4	34.66 \pm 1.1	35.12 \pm 1.8	36.43 \pm 2.0
	Teor de Fármaco (%) $5 \pm 2^\circ\text{C}$			
	24 horas	30 dias	60 dias	90 dias
SC1	97.6 \pm 0.8	97.1 \pm 1.0	96.5 \pm 1.0	95.4 \pm 1.7
SC2	98.2 \pm 1.1	95.9 \pm 1.2	92.3 \pm 1.5	90.8 \pm 2.0
ME02	99.1 \pm 1.5	98.5 \pm 1.5	98.0 \pm 1.2	96.2 \pm 1.1
ME05	99.6 \pm 0.9	99.6 \pm 0.9	98.6 \pm 1.5	97.8 \pm 1.2
ME10	99.5 \pm 0.5	99.2 \pm 1.0	99.0 \pm 1.7	98.5 \pm 1.0
ME11	98.9 \pm 1.4	97.2 \pm 1.6	96.8 \pm 1.2	96.5 \pm 1.8

Tabela 17 – Resultados dos estudos de estabilidade as formulações contendo 0,1% de AnB quando armazenadas à $25 \pm 2^\circ\text{C}$

	Tamanho de Gotícula (nm) $25 \pm 2^\circ\text{C}$			
	24 horas	30 dias	60 dias	90 dias
SC1	420.43 \pm 10.1	428.22 \pm 8.5	436.65 \pm 10.5	442.31 \pm 11.5
SC2	489.22 \pm 14.5	528.15 \pm 10.2	597.10 \pm 12.5	690.45 \pm 15.0
ME02	31.02 \pm 0.9	33.15 \pm 1.5	33.74 \pm 2.7	35.22 \pm 1.5
ME05	89.86 \pm 1.2	91.08 \pm 1.0	92.16 \pm 2.5	92.96 \pm 1.9
ME10	63.68 \pm 1.6	66.15 \pm 1.5	68.20 \pm 2.6	68.70 \pm 3.5
ME11	34.42 \pm 0.4	36.69 \pm 1.2	37.45 \pm 2.2	37.52 \pm 2.4
	Teor de Fármaco (%) $25 \pm 2^\circ\text{C}$			
	24 horas	30 dias	60 dias	90 dias
SC1	97.6 \pm 0.8	96.8 \pm 1.4	95.0 \pm 1.5	94.4 \pm 1.9
SC2	98.2 \pm 1.1	94.2 \pm 1.6	90.9 \pm 1.0	89.5 \pm 1.5
ME02	99.1 \pm 1.5	98.9 \pm 1.1	98.5 \pm 1.4	97.2 \pm 1.7
ME05	99.6 \pm 0.9	98.6 \pm 1.2	98.0 \pm 1.5	97.5 \pm 2.0
ME10	99.5 \pm 0.5	99.0 \pm 1.5	98.2 \pm 1.3	97.9 \pm 1.9
ME11	98.9 \pm 1.4	96.6 \pm 2.6	95.9 \pm 1.9	96.1 \pm 1.5

5.9 Avaliação do potencial irritante de formulações tópicas contendo Anfotericina B

Desde a década de 40, a avaliação do potencial irritante de diversas substâncias químicas e produtos, como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos de uso dermatológico, é realizada a partir do uso de animais de laboratório. Várias pesquisas têm sido conduzidas nas últimas décadas para desenvolver alternativas a estes testes, em especial ao teste de Draize, utilizado em um contexto regulatório para avaliar os potenciais de irritação ocular. Embora nenhum único ensaio *in vitro* tenha emergido como sendo completamente aceitável para a substituição total, vários testes são considerados adequados e são usados regularmente para avaliar certos aspectos (SCHEEL et al., 2011).

Os ensaios de membrana corioalantóide, principalmente o teste em membrana corioalantóide de ovo de galinha (HET-CAM), o Ensaio Vascular de Membrana Corioalantóide (CAMVA) e o teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP) têm sido utilizados durante muitos anos pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas para avaliar o potencial de irritação ocular, porque são testes rápidos, confiáveis, baratos e não requerem o uso de animais vivos (DONAHUE et al., 2011).

A CAM é a membrana respiratória vascularizada encontrada dentro de um ovo de galinha fertilizado, contendo um processo vascular e inflamatório semelhante ao tecido conjuntival de olhos de coelho (ICCVAM, 2010). O teste HET-CAM é utilizado para fornecer informações qualitativas sobre os efeitos potenciais que ocorrem na conjuntiva após exposição a uma substância e através da observação da coagulação que pode refletir potencial dano na córnea.

O teste CAM-TBS adiciona valor ao teste HET-CAM clássico, incorporando uma leitura quantitativa, obtida pela medição da quantidade de azul de trypan absorvida pelas células da CAM expostas (LAGARTO et al., 2006). Estudos anteriores mostram grande especificidade dos testes de CAM, especialmente o HET-CAM, para substâncias ou produtos com baixo ou nenhum potencial irritante. O HET-CAM apresenta uma predição correta de mais de 95% para substâncias não irritantes ou ligeiramente irritantes, e menor previsibilidade para irritantes ou irritantes graves *in vivo* (SCHEEL et al., 2011).

O ensaio de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) é um teste *top-down* geralmente aceito como um método alternativo *in vitro* validado para o teste de irritação ocular de Draize para detectar irritantes oculares corrosivos e graves (Categoria 1), mas não demonstrou ser suficientemente sensível para discriminar com precisão os compostos de categoria 2A/2B, irritantes leves e não irritantes (OECD, 2009), no entanto, a avaliação histológica pode ser realizada para melhorar a discriminação entre irritantes leves e moderados e fornecer informações sobre a profundidade e a natureza da lesão que pode ser usada para prever se o dano é ou não reversível (DONAHUE et al., 2011).

No ensaio de BCOP atualmente aceito, a opacidade é determinada pela quantidade de transmissão de luz através da córnea e a permeabilidade é determinada pela quantidade do corante fluoresceína de sódio que passa através de todas as camadas de células da córnea. Ambas as medições são utilizadas para atribuir uma pontuação de irritação *in vitro* (IVIS) para a predição do potencial de irritação ocular *in vivo* de uma substância teste (VERSTRAELEN et al., 2013).

De acordo com a linha de orientação da OCDE, os fatores críticos do teste BCOP estão relacionados com assegurar que a substância teste cubra adequadamente a superfície epitelial e que seja adequadamente removida durante as etapas de lavagem (OECD, 2009).

Os resultados dos testes HET-CAM, CAM-TBS e BCOP são mostrados nas Tabelas 18 e 19. As pontuações para o HET-CAM e o CAM-TBS mostraram que as formulações ME05 e ME10 foram irritantes moderadas e todas as outras MEs e SCs foram classificadas como não-

irritantes ou irritantes leves. De acordo com os resultados do BCOP, as ME05 e ME10 estão na categoria 1, irritantes, e nenhuma previsão pode ser feita para qualquer das outras MEs ou SCs. O óleo de catolé também foi avaliado separadamente e classificado como não irritante.

De acordo com os três métodos utilizados, os valores de potencial irritante da ME05 e ME10 estão diretamente relacionados com um aumento do percentual do par de tensoativos Labrasol/Plurol Oleique, ao passo que outras formulações contendo diferentes tensoativos nas suas composições não apresentaram potencial de irritação significativo.

Por essa razão, os tensoativos Labrasol e Plurol Oleique foram avaliados isoladamente, os resultados confirmam as observações anteriores, o Labrasol é considerado irritante de acordo com os três métodos utilizados, já o Plurol, não demonstrou potencial de irritação significativo.

É possível observar ainda que a pontuação das formulações após a incorporação do fármaco aumentou para as ME02, 05 e 10, assim, podemos inferir que esse resultado deve estar relacionado ao aumento do pH das formulações com AnB, devido ao método de incorporação do fármaco. O pH dessas formulações está próximo de 8,0, valor bem superior ao pH lacrimal que é entre 7 e 7,4, mesmo assim, esse acréscimo no pH em relação à formulação sem fármaco não foi suficiente para modificar a classificação das formulações, sendo o pH um fator importante, mas neste caso, o determinante para apresentação de potencial irritante foi a composição das formulações.

Ambos os testes estão relacionados à irritação ocular, que pode estar associada à aplicação de substâncias na face próximo à mucosa ocular. As formulações, com exceção de ME05 e ME10, foram classificadas como não irritantes ou ligeiramente irritantes, sugerindo que são seguras para aplicação dérmica.

Tabela 18 – Resultados dos testes HET-CAM e CAM-TBS (média ± D.P)

	HET-CAM			CAM-TBS		
	Placebo	0,1% AnB	Classe	Placebo	0,1% AnB	Classe
SC1	0.75±0.2	1.25±0.3	SLI	2.10±0.3	2.65±0.4	NI/SLI
SC2	0.75±0.3	1.00±0.5	SLI	2.35±0.2	2.40±0.2	NI/SLI
ME02	2.00±0.2	4.00±0.4	SLI	1.95±0.2	2.02±0.2	NI/SLI
ME05	6.00±0.4	8.00±1.0	MI	3.80±0.4	7.30±0.5	MI
ME10	5.25±0.4	5.25±0.4	MI	3.70±0.4	7.1±0.7	MI
ME11	0.25±0.2	0.75±0.2	NI	1.70±0.4	1.05±0.6	NI/SLI
Oleo de Catolé	0.25±0.2	—	NI	1.15±0.2	—	NI/SLI
0.1NNaOH	19.0±1.5	—	SEI	13.1±0.3	—	SEI
Labrasol	7.00±0.4	—	MI	5.80±0.5	—	MI
Plurol Oleique	1.25±0.2	—	SLI	2.40±0.2	—	NI/SLI

NI – não irritante; SLI - levemente irritante; MI – irritante moderado; SEI – irritante severo.

Tabela 19 – Resultados do teste BCOP (média ± D.P)

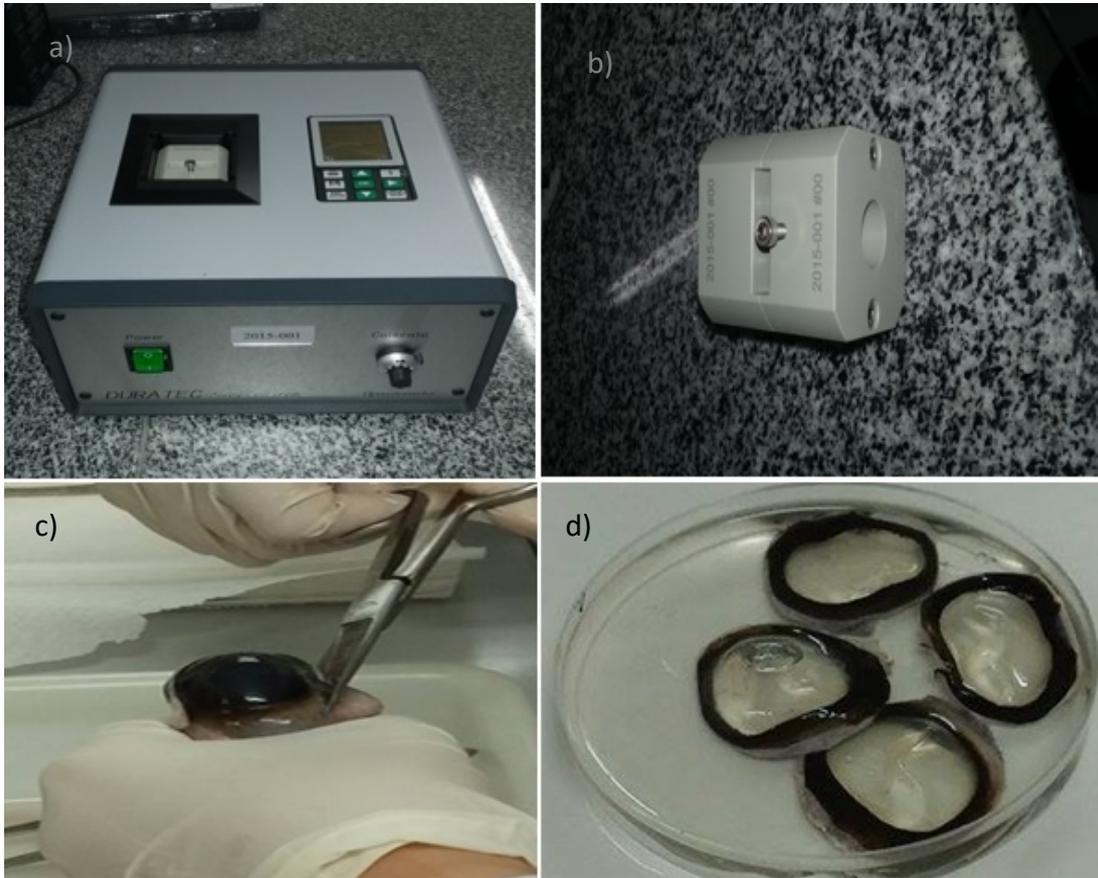
	BCOP		
	Placebo	0,1% AnB	Classe
SC1	28.40±5.6	31.02±10.2	ND
SC2	32.15±8.4	37.75±6.7	ND
ME02	20.45±2.9	19.85±4.5	ND
ME05	92.3±11.2	100.3±14.6	CAT1
ME10	86.68±7.8	96.68±9.4	CAT1
ME11	21.18±4.9	21.18±6.6	ND
Oleo de Catolé	12.95±4.2	—	ND
0.1NNaOH	425.75±36.8	—	CAT1
Labrasol	98.88±8.2	—	CAT1
Plurol Oleique	21.20±4.5	—	ND

CAT1 - Categoria 1; ND – Não determinado.

Figura 28 – Teste HET-CAM: a) Incubadora de ovos; b) lupa iluminadora e suporte; c) CAM após contato com produto irritante; d) CAM após contato com produto irritante leve. Fonte: Autor próprio.



Figura 29 – Teste BCOP: a) Opacitômetro BASF-3.0; b) Suporte de córneas; c) Excisão das córneas; d) Córneas excisadas. Fonte: Autor próprio.



CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ Após seleção dos tensoativos e da fase oleosa, baseando-se não apenas no critério de solubilidade, mas também no interesse de formular e avaliar diversos sistemas microemulsionados partindo de componentes variados, foi possível desenvolver diagramas de fase pseudoternários e delinear áreas onde existiu a formação de sistemas microemulsionados.
- ✓ Os estudos de centrifugação, condutividade elétrica, pH, tamanho de gotícula, potencial zeta, microscopia de luz polarizada e SAXS permitiram caracterizar adequadamente as microemulsões e os sistemas convencionais. Após incorporação da Anfotericina B, os sistemas se mantiveram estáveis, e no caso das microemulsões, opticamente translúcidos.
- ✓ As análises realizadas mostraram que o óleo de catolé apresenta-se dentro das especificações de qualidade para óleos vegetais não refinados e que uma única análise de espectros RMN ^1H permitiu a determinação de um grande número dos parâmetros para a avaliação da qualidade do óleo em estudo.
- ✓ Os estudos de permeação das formulações mostraram que os diferentes sistemas microemulsionados apresentaram modelos cinéticos de permeação diferentes, a ME02 e ME11 seguiram o modelo cinético de ordem zero, já emulgel e as demais microemulsões seguiram o modelo cinético de pseudo-primeira ordem (Higuchi).
- ✓ As formulações microemulsionadas contendo óleo de catolé foram desenvolvidas com sucesso, sendo portanto, o óleo de catolé um candidato para utilização como adjuvante farmacêutico em formulações tópicas, como alternativa, inclusive, ao ácido oleico.
- ✓ Os métodos alternativos utilizados para avaliar o potencial de irritação das formulações revelaram-se reprodutíveis, mostraram resultados semelhantes e determinaram que as formulações são seguras para aplicação tópica, com exceções das ME 05 e 10 que apresentaram potenciais de irritação moderados. Estes métodos alternativos podem ser aceitáveis para avaliar o potencial irritante de novos sistemas, como as microemulsões, e não apenas formulações convencionais.

- ✓ A formulação otimizada (ME02) constituída por Anfotericina B a 0,1% (p/p), 9,1% (p/p) de óleo catolé, Smix (1: 1, Tween 20 e Kolliphor EL) a 81%, apresentou estabilidade física e química durante pelo menos 3 meses a 5 ± 2 ° C e à temperatura ambiente (25 ± 2 ° C), viscosidade adequada para aplicação tópica e não mostrou nenhum potencial de irritação em nenhum dos três testes realizados.

- ✓ As formulações emulsionadas contendo Kolliphor, Tween 20 e Span 80 são as mais promissoras considerando a alta retenção, menor potencial de irritação e menor custo em comparação com aquelas que contêm Labrasol e Plurol Oleique como tensoativos.

- ✓ Finalmente, a administração de AnB através de formulações tópicas não irritantes com elevada retentividade nas camadas de pele é uma alternativa promissora para o tratamento de leishmaniose cutânea, assim, a lesão seria tratada de uma forma localizada, os efeitos tóxicos relacionados com a absorção sistêmica de AnB seriam eliminados, a administração do fármaco seria facilitada e provavelmente poderia haver um menor custo e maior adesão ao tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C.L.C. Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3. Dissertação de Mestrado INCQS - Rio de Janeiro, 2008.

ALEXANDER, Amit et al. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 2, p. 122-132, 2013.

ARAUJO, I.B.; DAMASCENO, B.P.; DE MEDEIROS, T.M.; SOARES LA, DO EGITO EST. Decrease in Fungizone toxicity induced by the use of Lipofundin as a diluent: an in vitro study. **Curr Drug Deliv** 2005; 2(2): 199-205.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª edição. Artmed Editora, 2005.

BALASEGARAM, M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M.A.; BURZA, S.; GENOVESE, O.G.; MILANI, B.; et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opin Emerging Drugs**. 17:493-510, 2012.

BARBERO, A.M.; FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in Vitro**, 23, 1–13, 2009.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A.; Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n.3, 2004.

BHASKER, S.; KISLAY, R.; RUPINDER, K.K.; JAGAT, K.R. Evaluation of nanoformulated therapeutics in an *ex-vivo* bovine corneal irritation model. **Toxicol In Vitro**. 29:917–925, 2015.

BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 27, p. 4671-4677, 2012.

BESKOW, G. T.; HOFFMANN, J. F.; TEIXEIRA, A. M.; FACHINELLO, J. C.; CHAVES, F. C.; ROMBALDI, C. V. Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). **Food chemistry**, 172, 699-704, 2015.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **J Antimicrob Chemother**, 53(2):158-66, 2004.

BRASIL. Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Diário Oficial da União. 16 de Julho de 2009.

BRASIL. Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Diário Oficial da União, 9 outubro de 2008.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 18, de 24 de Setembro de 2014. Diário Oficial da União 25 de setembro de 2014.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 31, de 18 de Agosto de 2016. Diário Oficial da União 19 de Agosto de 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003..

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 1. ed. Brasília: Anvisa; 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. 2010.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F.; CONGDON, E.R. Methods for in vitro percutaneous absorption studies. II. Animal models for human skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 62, 481–488, 1982.

BOLZINGER, M.A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. 17, 156-165, 2012.

BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 139: 17–24, 2016.

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

CALDEIRA, L. R.; FERNANDES, F. R.; COSTA, D. F.; FRÉZARD, F.; AFONSO, L. C. C.; FERREIRA, L. A. M. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 70, 125-131, 2015.

Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p.

CARNEIRO, P. I. B.; REDA, S. Y.; CARNEIRO, E. B. B. ¹H NMR characterization of seed oils from Rangpur Lime (*Citrus limonia*) and “scilian” lemom (*Citrus limom*). **Annals of Magnetic Resonance**. v. 4, p. 64-68; 2005.

CARVALHO, R.F.; RIBEIRO, I.F.; MIRANDA-VILELA, A.L.; DE SOUZA FILHO, J.; MARTINS, O.P.; et al. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Exp Parasitol**, 135: 217-222, 2013.

CHUDZIK, B.; TRACZ, I.B.; CZERNEL, G.; FIOŁKA, M.J.; BORSUK, G.; GAGOŚ, M. Amphotericin B–copper(II) complex as a potential agent with higher antifungal activity against *Candida albicans*. **Eur J Pharm Sci**, 49: 850–857, 2013.

CARACIOLO, A.F. Óleo de catolé: determinação do ehl, ação promotora de absorção de fármacos e efeito hidratante na pele humana. Dissertação de Mestrado, UFPE, Recife, 2016.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. Campinas: Unicamp, 2003.

CHORILLI, M.; SCARPA, M.V; LEONARDI, G.R;FRANCO, Y.O. Toxicologia dos Cosméticos.**Lat. Am. J. Pharm.**26 (1): 144-54 (2007).

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.13, p.123-133, 2001.

CRUZ, A.S. Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP São Paulo, 2003.

COELHO, E. A. F.; COSTA, L. E.; LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; GARDE, E.; JESUS PEREIRA, N. C.; MAGALHÃES-SOARES, D. F. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, 215, 63-71, 2016.

CONEAC, G.; VLAIA, V.; OLARIU, I.; et al. Development and evaluation of new microemulsion-based hydrogel formulations for topical delivery of fluconazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 889-904, 2015.

COSTA, L. E.; SALLES, B. C.; ALVES, P. T.; DIAS, A. C.; VAZ, E. R.; RAMOS, F. F.; TAVARES, C. A. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, v. 434, p. 39-45, 2016.

DALMORA, M.E.A.; DALMORA, S.L.; OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, p.45-55, 2001.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.32, n.1, p.9-18, 2011.

DAMASCENO, B.P.G.L.; DOMINICI, V.A.; URBANO, I.A.; SILVA, J.A.; SANTOSMAGALHÃES, N.S.; SILVA, A.K.A.; MEDEIROS, A.C.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.8, n.2, p.290-300, 2012.

DANCIK, Y.; BIGLIARDI, P.L.; BIGLIARDI-QI, M. What happens in the skin? Integrating skin permeation kinetics into studies of developmental and reproductive toxicity following topical exposure. **Reproductive Toxicology**, 58, 252–281, 2015.

DASH, S.; MURTHY, P.M.; NATH, P.; CHOWDHURY, P. kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Vol. 67 No. 3 pp. 217–223, 2010.

DONAHUE, D. A.; KAUFMAN, L. E.; AVALOS, J.; SIMION, F. A.; CERVEN, D. R. Survey of ocular irritation predictive capacity using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA) and Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years. *Toxicology in Vitro*, 25(2), 563-572, 2011.

DORA, C.L.; SOUZA, L.C.; Novas formas comerciais de Anfotericina B. **Revista de Ciências Médicas**, v.14, n.2, 2005.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzym. Microb. Technol.**, 30, 90-94, 2002.

DRAIZE, J.H. ; WOODARD, G. ; CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, **J.Pharmacol. Exp. Ther.** 82 (1944) 377–390.

ESPIR, T. T.; GUERREIRO, T. S.; FARIAS NAIFF, M.; DE PAULA FIGUEIRA, L.; SOARES, F. V.; ILVA, S. S.; FRANCO, A. M. R. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental parasitology**, v. 167, p. 1-6, 2016.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5^a ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização Físico-Química da Amêndoa, Torta e Composição dos Ácidos Graxos Majoritários do Óleo Bruto da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **Alimentos e Nutrição**. v.17, n.2, p.203-208, 2006.

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

FOKUHL, J.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Modified TEWL in vitro measurements on transdermal patches with different additives with regard to water vapour permeability kinetics. **International journal of pharmaceutics**, v. 444, n. 1, p. 89-95, 2013.

FORMARIZ, T.P; URBAN, M.C.C.; JÚNIOR, A.A.S.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.03, p. 301 -313, 2005.

FRANZ, T. J. Kinetics of cutaneous drug permeation. **Inter. J. Dermatol.** 22, 499-505, 1983.

FRANZINI, C.M. Estudo de microemulsões e subemulsões contendo Anfotericina B para administração oral. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, 2006.

GAHART, G.L.; NAZARENO, A.R.; ORTEGA, M.Q.; Intravenous Medications: a Handbook for Nurses and Health Professionals, 32 ed. Elsevier, p. 2016.

GANGADHAR, K. N.; ADHIKARI, K.; SRICHANA, T. Synthesis and evaluation of sodium deoxycholate sulfate as a lipid drug carrier to enhance the solubility, stability and safety of an amphotericin B inhalation formulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 471, n. 1, p. 430-438, 2014.

GIANNINI, F.A.; AIMAR, M.L.; SORTINO, M.; GOMES, R.; STURNIOLLO, A.; JUAREZ, A. ZACCHINO, S.; ROSSI, R.D. In vitro antifungal evaluation and structureactivity relationship of 3-H-1,2-dithiole-3-thione derivates. **Fármaco.**, v.59, p.245-254, 2004.

GOLA, J.; STRZAŁKA-MROZIK, B.; KRUSZNIIEWSKA-RAJS, C.; JANISZEWSKI, A.; SKOWRONEK, B.; GAGOŚ, M.; MAZUREK, U. A new form of amphotericin B–the complex with copper (II) ions–downregulates sTNFR1 shedding and changes the activity of genes involved in TNF-induced pathways: AmB–Cu²⁺ downregulates sTNFR1 shedding and changes the activity of genes involved in TNF-induced pathways. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 1, p. 22-28, 2017.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, 25, 363-370, 2000.

HIDALGO F. J.; ZAMORA, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recent advances and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**.v.14, n.12, p. 499-506, 2003.

ICCVAM. Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication 10-7553. ResearchTriangle Park, NC:NationalInstituteof Environmental Health Sciences, 2010.

ICCVAM. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods- *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives, 2006.

JÚNIOR, W. S. F.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of ethnopharmacology**, 138(1), 238-252, 2011.

KAWAKAMI, K.; YOSHIKAWA, T.;MOROTO, Y.; KANAOKA, E.;TAKAHASHI, K.; NISHIHARA, Y.;MASUDA, K. Microemulsion formulation forenhanced absorption of poorly soluble drugs.I. Prescription design, **Journal of ControlledRelease**, v.81, n.1/2, p.65-74, 2002.

KHAN, J.; ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN; SARAF, SWARNLATA; SARAF,SHAILENDRA. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. **Journal of Controlled Release** , v.168, n.1, p.50-60, 2013.

LAGARTO, A.; VEJA, R.; GUERRA, I.; GONZÁLEZ, R.; et al. *In vitro* quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue taining as alternative to eye irritation test. **Toxicol In Vitro** 20: 699–702, 2006.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Ver Iberoam Micol.** 26 (4): 223–227, 2009.

LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; KIENY, M.P., Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine. **Expert. Rev. Vaccines**, 7, 1277–1287, 2008.

LAWRENCE, M. J. & REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, p.89-121, 2000.

LEAL, L.B.; SOUSA, G.D.; SEIXAS, K.B.; SOUZA, P.H.N.; SANTANA, D.P. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Braz J Pharm Sci**, 49: 167-173, 2013.

LI, GUILING et al. In vitro and in vivo evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. **International journal of pharmaceutics**, v. 425, n. 1, p. 53-61, 2012.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. Flora brasileira Arecaceae (Palmeiras). São Paulo Brasil: Instituto Plantarum, 2010.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; MEDEIROS-COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. 2004. Palmeira Brasileiras e Exóticas Cultivadas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. Nova Odessa. 416p.

LIMA, E.B.; PORTO, C.; MOTTA, J.O.C.; SAMPAIO, R.N.R.; Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.82, n.2, 2007.

LIMA, B. S. S.; PIRES, S. F.; FIALHO, L. C.; OLIVEIRA, E. J.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; Andrade, H. M. A Proteomic Road To Acquire An Accurate Serological Diagnosis For Human Tegumentary Leishmaniasis. **Journal of proteomics**, 2016.

MACHADO, M.; SALGADO, T. M.; HADGRAFT, J.; LANE, M. E. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. **International journal of pharmaceutics**, 384(1), 73-77, 2010.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.32, n.5, 2006.

MATLASHEWSKI, G.; ARANA, B.; KROEGER, A.; BATTACHARYA, S.; SUNDAR, S.; DAS, P.; SINHA, P.K.; RIJAL, S.; MONDAL, D.; ZILBERSTEIN, D.; ALVAR, J. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. **Lancet. Infect. Dis**, 11, 322-325, 2011.

MEDINA, A. L.; HAAS, L.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R. C.; DA SILVA, W. P.; NORA, L.; ROMBALDI, C. V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with in vitro and in vivo antioxidant activity, antimicrobial activity and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, 128, 916–922, 2011.

MENDONÇA, D. V.; LAGE, L. M.; LAGE, D. P.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; LUDOLF, F.; ROATT, B. M.; BARICHELLO, J. M. Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: In vitro biological activity, toxicity and in vivo therapeutic efficacy against murine tegumentary leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, 169, 34-42, 2016.

MIZIARA, I. D.; MAGALHÃES, A.T.M.; SANTOS, M.A.; GOMES, E.F.; OLIVEIRA, R.A. Ética da pesquisa em modelos animais. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 78(2), 128-131, 2012.

MORAIS, G.G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite). Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, 2006.

MORENO-RODRÍGUEZ, A. C.; TORRADO-DURÁN, S.; MOLERO, G.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. J.; TORRADO-SANTIAGO, S. Efficacy and toxicity evaluation of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. **International journal of pharmaceutics**, 494(1), 17-22, 2015.

MOTTA, J.O.; SAMPAIO, R.N. A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. 26:331-5, 2012.

MUNDLEIN, M.; et al. Comparison of transepidermal water loss (TEWL) measurements with two novel sensors based on different sensing principles. **Sensors and Actuators A**, 142: 67–72, 2008.

NASCIMENTO, R.C.Z.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; PEREIRA, L.I.A.; OLIVEIRA, M.A.P.; DIAS, F.R.; DORTA, M.L.; ULIANA, S.R.B.; In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health**, v.15, n.1, 2010.

NASCIMENTO, V. T.; MOURA, N. P.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Research International**, 44(7), 2112-2119, 2011.

NETZLAFF, F. F.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 63, 44–50, 2006.

NOBLICK, L.R. *Syagrus cearensis*, a Twin-Stemmed New Palm from Brazil. **Palms**, 48(2): 70–76, 2004.

NÓBREGA, A.M.; ALVES, E.N.; PRESGRAVE, R.F.; COSTA, R.N.; DELGADO, I.F. Determination of eye irritation potential of low-irritant products: comparison of in vitro results with the in vivo draize rabbit test. **Braz. arch. biol. technol.** Curitiba, v. 55, n. 3, 2012.

OECD. Guideline for the testing of chemical, n° 428. Skin Absorption: *in vitro* Method, Paris, France, 2004.

OECD. 2005. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. Number 34. ENV/JM/MONO(2005)14. Paris, France.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Section 4: Health Effects. 2009.

OLIVEIRA, P. T. B.; TROVÃO, D. M. D. B. M.; DE CARVALHO, E. C. D.; DE SOUZA, B. C.; FERREIRA, L. M. R. Florística e fitossociologia de quatro remanescentes vegetacionais em áreas de serra no Cariri Paraibano. **Revista Caatinga**, 22(4), 169-178, 2009.

OLIVEIRA, A.G.L.; SILVA, R.S; ALVES, E.N.; PRESGRAVE, R.F.; PRESGRAVE, O.A.F; DELGADO, I.F. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative

tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 71(1):153-9, 2012.

OSPINA, V.E.; MANTILLA, J.C.; CONDE, C.A.; ESCOBAR, P. Human Skin Permeation of a Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion for Optimization of Topical Cutaneous Leishmaniasis Formulations. **Rev Cienc Salud**, 12(2):195-211, 2014.

PATEL, H.K.; BAROT, B.S.; PAREJIYA, P.B.; SHELAT, P.K.; SHUKLA, A. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: Ex vivo permeation and skin irritation studies. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 102: 86– 94, 2013.

PEÇANHA, P. M.; SOUZA, S.; FALQUETO, A.; GRÃO-VELOSO, T. R.; LÍRIO, L. V.; FERREIRA, C. U. G.; TUON, F. F. Amphotericin B lipid complex in the treatment of severe paracoccidioidomycosis: a case series. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 4, p. 428-430, 2016.

PESTANA, K.C.; FORMARIZ, T.P.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 253-9, 2008.

QUANTIN, P.; THÉLU, A.; CATOIRE, S.; FICHEUX, H. Perspectives and strategies of alternative methods used in the risk assessment of personal care products. In: **Annales Pharmaceutiques Françaises**. Elsevier Masson, 2015. p. 422-435.

RAMOS-E-SILVA, M.; JACQUES, C.M.C. Leishmaniasis and other Dermatozoonoses in Brazil. **Clinics in Dermatology**, 20:122–134, 2002.

RAYMUNDO, M.M.; GOLDIM, J.R. Ética da pesquisa em modelos animais. *Bioética*, v.10, n.1, p.31-44, 2002.

REDA, S. Y.; COSTA, B.; FREITAS, R. J. S. Determination of iodine value in ethylic biodiesel samples by ¹H-NMR. **Annals of Magnetic Resonance**.v. 6, p. 69-75; 2007.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 2004. p. 194. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Parte I. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

ROSSI, C. G. F. T. ; DANTAS, T. N. de C.; NETO, A. A.D.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista**

Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR, v. 26, n. 1-2, p. 45-66, 2007.

ROSA, J.; JESUS, D.; DUARTE, F.; LIMA, A.; PEREIRA, V. Otimização e validação de estratégias analíticas para avaliação do teor do leite de coco do catolé. Disponível em: <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/view/81>. Acessado em: 15/10/2015.

RUFINO, M.U.L.; MEDEIROS-COSTA, J.T.; SILVA, V.A.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento e uso do ouricuri (*Syagrus coronata*) e do babaçu (*Orbignya phlerata*) em Buíque, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasílica** 22: 1141-1149, 2008.

RUSELL, W.M.S.; BURCH, R.L.; Principles of Human Experimental Technique, UFAW, England: Hyperion Books Inc., 1959.

SAHOO, S.; PANIA, N.R.; SAHOO, S.K. Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 120, 193–199, 2014.

SANTES, A.K. Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 156p., 2008.

SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SCHLUPP, P. ; WEBER, M. ; SCHMIDTS, T. ; GEIGER, K. ; RUNKEL, F. Development and validation of an alternative disturbed skin model by mechanical abrasion to study drug penetration. **Results Pharma Sci**, 4: 26–33, 2014.

SCHEEL, J.; KLEBER, M.; KREUTZ, J.; LEHRINGER, E.; MEHLING, A.; REISINGER, K.; STEILING, W. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). **Regul Toxicol Pharmacol**, 59: 471-492, 2011.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, 215, 51–56, 2001.

SCOTT, L.; ESKES, C.; HOFFMANN, S.; ADRIAENS, E.; ALEPÉE, N.; BUFO, M.; et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. **Toxicol in Vitro**. 24: 1-9, 2010.

SHAH, R.R.; MAGDUM, C.S.; WADKAR, K.A.; NAIKWADE, N.S. Fluconazole Topical Microemulsion: Preparation and Evaluation. **Research J. Pharm. and Tech.** v. 2, n. 2, 2009.

SIMON, A.; AMARO, M. I.; HEALY, A. M.; CABRAL, L. M.; SOUSA, V. P. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with *in vivo*-*in vitro* correlation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 234-241, 2016.

SILVA, A.E.; BARRAT, G.; CHÉRON, M.; EGITO, E.S.T. Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. **International Journal of Pharmaceutics** 454, 641– 648, 2013.

SILVA, J.A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.G.C.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A.A.M.; EGITO, E.S.T. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quim. Nova**, vol.32, nº6, p. 1389-1393, 2009.

SILVEIRA, W.L.L. Desenvolvimento e caracterização de um sistema microemulsionado contendo Anfotericina B para uso oftalmológico. Dissertação de Mestrado - UFRN, Natal, 2013.

SILVEIRA, W.L.L.; DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, K.G.H.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Aspectos fundamentais no desenvolvimento de sistemas microemulsionados contendo anfotericina B para uso oftálmico. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 34(1):09-15, 2013.

SOLOMON, M.; PAVLOTSKY, F.; LESHEM, E.; EPHROS, M.; TRAU, H.; SCHWARTZ, E. Liposomal amphotericin B treatment of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. 2011;25:973-7.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin. Pharmacother**. 14, 53-63, 2013.

TAVASZI, J.; BUDAI, P. The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation: communications. **Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 72, n. 2, p. 137-141, 2007.

VERSTRAELEN, S.; JACOBS, A.; DE WEVER, B.; VANPARYS, P. Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, 27(4), 1298-1311, 2013.

WAN, T.; XU, T.; PAN, J.; QIN, M.; PAN, W.; ZHANG, G.; WU, Z.; et al. Microemulsion based gel for topical dermal delivery of pseudolaric acid B: In vitro and in vivo evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 493, n. 1, p. 111-120, 2015.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced. Drug Delivery Reviews**, v.56, n.5, p. 603-618, 2004.

WILLIAMS, A. C. **Transdermal and Topical Drug Delivery**. From Theory to Clinical Practice. Pharmaceutical Press, London. 242pp, 2003.

WILHELMUS, K. R. The Draize Eye Test. *Surv. Ophthalmol.* 6, 493-515, 2001.

WORTH, A. P.; BALLS, M. The importance of the prediction model in the validation of alternative test. *Alternative Laboratory Animal* 29: 135-143, 2001.

WILSON, S.L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicol* 2015; 327: 32–46.

YARDLEY, Vanessa; CROFT, Simon L. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 13, n. 4, p. 243-248, 2000.

YUAN, J.S. Linker-based lecithin microemulsions as transdermal drug delivery systems.2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Química Aplicada) – University of Toronto, Toronto, Canadá, 2009.

YUTANI, R.; KOMORI, Y.; TAKEUCHI, A.; TERAOKA, R.; KITAGAWA, S. Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion. **J Pharm Pharmacol**, 68: 46-55, 2016.

YANG, Y.; YANG, X.; XUE, J.; CURREN, R.; HUANG, J.; TAN, X.; XIONG, X. A procedure for application of eye irritation alternative methods on cosmetic ingredients. **ALTEX Proceedings**, 1, 12, 2010.

ZHAO, Y.G.; DING, W.; WEI, J. Preparation of a bis-demethoxy curcumin microemulsion based on pseudoternary phase diagrams and an orthogonal test analysis. **Journal of Pesticide Science**, v.36, p.248-251, 2011.

APÊNDICE

Research Article

Biopharmaceutical Assessment and Irritation Potential of Microemulsions and Conventional Systems Containing Oil from *Syagrus cearensis* for Topical Delivery of Amphotericin B Using Alternative MethodsGiovana D. Sousa,^{1,4} Juliana Kishishita,¹ Kátia A. S. Aquino,² Octávio A. F. Presgrave,³ Leila B. Leal,¹ and Davi P. Santana¹

Received 16 August 2016; accepted 31 October 2016

Abstract. The aim of this study was to compare the biopharmaceutical characteristics and irritation potentials of microemulsions (MEs) and conventional systems (CSs) containing oil from *Syagrus cearensis* for topical delivery of Amphotericin B (AmB). Pseudo-ternary phase diagrams were constructed using a water titration method to develop the MEs, and the CSs were prepared according to the classical technique of phase inversion. In the skin permeation and retention study, dermatomed pig skin without stratum corneum was used as an alternative disturbed skin model. The irritation potential was evaluated using three different methods, chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS), and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test. The optimized formulation (ME1) consisting of 0.1% (w/w) Amphotericin B, 9.1% (w/w) catolé oil, 81% (w/w) Smix (1:1, Tween 20 and Kolliphor EL) possessed droplet size of 31.02 ± 0.9 nm, zeta potential of -23.4 mV, and viscosity 0.63 ± 0.1 Pa.s. ME1 exhibited greater retention of AmB in to skin layers (84.79 ± 2.08 $\mu\text{g cm}^{-2}$) than all the others formulations. In general, MEs showed higher drug release and retention than CSs and all of the formulations showed greater retentivity than permeability. Only MEs developed using Labrasol/Plurol Oleique (L/PO) as the surfactant and co-surfactant exhibited a moderate irritation potential; all other MEs and CSs were classified as non-irritants or slight irritants. The results indicate that formulations containing oil from *S. cearensis* are promising alternatives for the delivery of AmB targeting the treatment of cutaneous leishmaniasis.

KEY WORDS: alternative methods; formulation; *Syagrus cearensis*; topical delivery.**INTRODUCTION**

Amphotericin B (AmB) is a macrolide antibiotic derived from a strain of *Streptomyces nodosus* known for its antifungal and antileishmanial activity (1, 2). However, its use is limited owing to high toxicity (3). In order to reduce the toxicity, the focus has been on the development of new delivery systems. Topical administration of active drugs is a route that offers certain advantages; however, topical efficacy is only obtained from drugs with a suitable degree of penetration into the skin (4, 5).

American tegumentary leishmaniasis (ATL), a public health problem, is a vector-transmitted infectious disease that affects the skin and mucous membranes and presents ulcerated lesions, nodules, and single or multiple well-defined elevated edges that appear in various areas of the body, especially the face (6, 7). The proliferation of the parasite occurs in the dermis and the intensity depends on the species of parasite and on the immune status of the host (8). Current drugs for the treatment of ATL are not efficacious, and no effective vaccine is available (9).

Several clinical studies showed the effectiveness of liposomal Amphotericin B applied intravenously in the treatment of ATL. However, even with the reduction of the toxicity of Amphotericin B in liposomal form in relation to deoxycholate, the studies reported a high percentage of adverse events, a long period of treatment, and the need for intravenous administration, which reduces the adhesion (10, 11). An important alternative method to treat the disease would be a topical agent that has high retentivity and low skin permeability, thereby delivering the drug directly to the site

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.²Department of Nuclear Energy, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.³Oswaldo Cruz Foundation - Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.⁴To whom correspondence should be addressed. (e-mail: giovana.sousa@nudfac.com.br)

of action but not achieving plasma levels, reducing the adverse effects related to the toxicity of AmB.

Microemulsions (MEs) are an interesting proposal for the topical administration of AmB because they can provide a change in bioavailability and decrease the toxicity of drugs by operating as reservoirs capable of releasing drugs and targeting specific tissues and cells of the organism (12). Conventional systems (CSs) such as emulgels and emulsions can also provide low-cost alternatives to topical placement of AmB in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Generally, oils and surfactants are used for the preparation of emulsions, emulgels, and MEs. Vegetable oils have a number of potential advantages compared to their mineral counterparts. They are less toxic, biodegradable, and renewable, while petroleum chemicals are finite (13).

The catolé (*Syagrus cearensis* Noblick) is a Brazilian palm tree from which oil is extracted containing a high content of saturated and unsaturated fatty acids, including oleic, linoleic, and palmitic acid (14, 15). These fatty acids give fixed oils emollient properties when incorporated into topical formulations (16). This palm is widely used for ornamental purposes and its oil used popularly for treating some diseases including erysipelas (17).

Bioassays evaluating efficacy and safety must precede the insertion of a product into the market, most commonly using animal models. However, the use of animals in research has been the subject of various discussions due to the large numbers required and pain that is caused. Recently, many studies have been conducted to obtain *in vitro* methods that can be used as substitutes for animal testing (18, 19).

Ex vivo studies using Franz diffusion cells enable a greater understanding of the facts related to application to the skin and release of the drug, including dosage form, retention, and permeation. While these assays can be performed with different biomembranes, pig skin is widely used owing to its similarity to human skin and easy availability since it is a byproduct of the food industry (20).

An evaluation of the toxicity of a substance is performed in order to predict the harmful effects it might trigger upon exposure to humans by various routes. The bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test, test of the chorioallantoic chicken egg membrane (HET-CAM), and its variation (CAM-TBS) are alternative *in vitro* methods internationally recognized for irritation potential evaluation (21, 22).

Therefore, the aim of this study was to develop and assess microemulsions, emulgels, and emulsions containing oil from *S. cearensis* for local delivery of AmB into the skin layers in order to treat cutaneous leishmaniasis, using the alternative methods described above.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Amphotericin B was obtained as a gift from Cristália Ltd. (Itapira, Brazil); oleic acid, Tween[®] 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate), Span[®] 80 (Sorbitane monooleate), Tween[®] 80 (Polyoxyethylenesorbitan monooleate), and Kolliphor[®] EL (Macrogolglycerol ricinoleate) were purchased from Sigma-Aldrich (Sao Paulo, Brazil); Labrasol[®] (Caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides) and Plurol Oleique[®] (Polyglyceryl-3

diolate) were kindly donated by Gattefossé (Lyon, France); and BRIJ[®]O20 (Polyoxyethylene 20 oleyl ether) was purchased from Croda (East Yorkshire, UK). Catolé oil was extracted from catolé coconuts using a hydraulic press.

Construction of Pseudo-Ternary Phase Diagrams

To determine the concentration ranges of components for the existence of ME, pseudo-ternary phase diagrams were constructed using a water titration method (23). Three pairs of surfactants/co-surfactants were used, Labrasol/Plurol (L/PO), Kolliphor EL/Tween20 (K/T20), and Tween 20/ Span80 (T20/S80); they were blended at weight ratios of 1:1, 2:1, and 5:1. The ratios of catolé oil to the mixture of surfactant and co-surfactant (S_{mix}) were varied at 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, and 9:1. Subsequently, the mixtures were evaluated visually and the ME phase was identified as the region in the phase diagram where flowable and transparent formulations were obtained (24).

The solubility of AmB in the microemulsions was assessed in order to set the concentration of drug to be incorporated in the formulations. To do this, an excess of AmB was added to the blank MEs, and the systems were vortexed for 5 min. Then, the mixtures were left for 48 h under magnetic stirring. After stirring, the MEs were sonicated for 60 min and centrifuged at 1500 g for 20 min to remove the excess of drug. The supernatant was recovered and filtered using a 0.22- μ m cellulose ester membrane. The filtrate was diluted in methanol for the quantitative analysis of the AmB by HPLC.

Preparation of MEs

Different formulations were selected from the microemulsion region for incorporation of drug. AmB (0.1%) was dissolved gradually in water at pH 11. After complete solubilization, this mixture was added to S_{mix} and oil under moderate stirring and the pH was adjusted as necessary using a hydrochloric acid solution (HCl) 0.1 N.

Preparation of CSs

The emulgel (CS1) and emulsion (CS2) were prepared according to the classical technique of phase inversion. The phases were mixed at $70 \pm 5^\circ\text{C}$, maintaining stirring at 1000 rpm for 30 min. Amphotericin B in a proportion of 0.1% (w/w) was incorporated after cooling the formulation under constant mechanical stirring.

Characterization of MEs and CSs

According to the ME regions in the phase diagrams, four MEs and two CSs formulations were prepared and evaluated for the following parameters. The compositions of CS and ME are shown in Table I. All measurements were made in triplicate.

Droplet size and zeta potential of the formulations were analyzed using the Zetasizer[™] Nano-ZS90 (Malvern Instruments, UK) by employing a dynamic light scattering method. All of the samples were analyzed by dilution 1:10 with water and passed through a 0.45- μ m filter.

Formulations Containing Oil from *Syagrus cearensis*

Table I. Composition of Microemulsions and Conventional Systems

Quantity in (%)	CS1	CS2	ME1	ME2	ME3	ME4
AmB	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Catolé oil	10.0	10.0	9.1	9.1	5.6	7.2
Span 80	1.5	1.5	–	–	–	10.7
Tween 80	3.5	3.5	–	–	–	–
Labrasol	–	–	–	54.5	33.3	–
Plurol	–	–	–	27.2	16.7	–
Kolliphor	–	–	40.9	–	–	–
Tween 20	–	–	40.9	–	–	53.5
Carbopol	0.4	–	–	–	–	–
Polawax	–	10.0	–	–	–	–
BHT	0.1	0.1	–	–	–	–
Water	84.4	74.8	9.0	9.1	44.3	28.5

The formulations were centrifuged at 4000 rpm for 30 min to assess the physical stability of the ME and CS.

The pH of the formulations was determined by the pH 21 pH meter (Hanna, USA), previously calibrated with buffer solutions of pH 7.0 and pH 4.0.

The viscosity and rheological properties of the CSs were determined at ambient temperature using the Rheology International Digital Viscometer. MEs were analyzed with the MCR 101 oscillatory rheometer (Anton Paar).

The formulations were assessed using a polarized light microscope (DM750P, Leica®) to assess the isotropy or anisotropy of the systems.

A water-soluble dye (FD&C Red 40) was added to the MEs system and the phase system was evaluated.

Stability of MEs

The physical and chemical stability of AmB 0.1% MEs and CSs were investigated by observing the pH, aspect, droplet size, and drug concentration in the formulations for 3 months. The formulations were kept at temperatures of 5 ± 2 and $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and analyzed once a month.

Characterization of Oil from *S. cearensis*

The analysis of the acidity index, saponification, peroxides, and unsaponifiable material was performed in triplicate in accordance with the Brazilian Pharmacopoeia V (25). The ^1H NMR spectrum integrated was used to obtain physicochemical parameters that were used in comparison with the classical determinations. The equations that were

used are shown in Table II (26, 27). The ^1H NMR spectra data were recorded from a Varian spectrometer UNITY plus-300 MHz using deuterated chloroform as the solvent.

In Vitro Release and Ex Vivo Skin Permeation

These studies were performed using Franz cells (Microette™, Hanson) with a diffusional area of 1.77 cm^2 . Dermatomed pig skin without stratum corneum was used for the evaluation of permeation and $0.45\text{ }\mu\text{m}$ cellulose ester membranes for the *in vitro* release study. The stratum corneum was removed using 30 serial tape strips (3 M Durex®) to simulate a disturbed skin model. The transepidermal water loss (TEWL; g/hm^2) was measured before and after removal of the stratum corneum. The receptor chamber was filled with phosphate buffer pH 7.4 + 2.0% Brij 020. The receptor medium was maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ and was magnetically stirred at 250 rpm. Weighed quantities of 0.4 g of ME and CS were applied to the donor compartments. At predetermined time intervals (12 h for *in vitro* release, 24 h for the permeation study), the fluid in the receptor chamber was sampled, filtered, and analyzed using HPLC. The amount of AmB permeated through the skin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) was plotted as a function of time (t) for each formulation. The permeation rate (J , $\mu\text{g}/[\text{cm}^2\text{ h}]$) was determined from the slope of the linear portion of the cumulative drug permeation *versus* time. The permeability coefficient (K_p , cm/h) was calculated through the relationship between J and the initial drug concentration in the donor compartment (28, 29).

Skin Retention Study

At the end of the permeation experiment, the skin was minced into small pieces and transferred to an Eppendorf tube with 5 mL methanol. AmB was extracted from the skin by vortex followed by sonication for 60 min and centrifugation for 10 min at 4000 rpm. Next, the supernatant was filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ membrane and analyzed by HPLC.

HPLC Analysis

Analyses were performed with an ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) system (Nexera, Shimadzu). Separation was carried out on a Kinetex®C185 μm , $100\text{ }\text{Å}$, $150 \times 4.6\text{ mm}$ column. The mobile phase consisted of methanol:acetonitrile:EDTA 2.5 mM (40:30:30). The flow rate was $1.0\text{ mL}/\text{min}$, the detection wavelength was set at 406 nm , and the column temperature was 25°C . The data were obtained

Table II. Equations Used to Obtain Physicochemical Parameters from the ^1H NMR Spectra

Parameter	Equation
Vinyl hydrogen (V)	$V = (\text{displacement area at } 2\text{ ppm}/2) + \text{displacement area at } 2.9\text{ ppm}$
Triacylglycerol molecular weight (Mw) g/mol	$Mw = 119.70 + 703.6 + 5.983 V$
Iodine index (II) gI/100 g	$II = [126.91 \times 100 V]/MW$
Saponification index (SI) mgKOH/g	$SI = -0.2358 MW + 398.42$
Oxidation (Roa)	$Roa = V/\text{displacement area at } 0.9\text{ ppm}$
Free acidity (FA) mgKOH/g	$FA = 3.0597 [Roa]^2 - 6.3181 Roa + 3.3381$

using LC Solution® software version 1.25. The method was validated according to the following parameters: linearity, specificity, accuracy, sensibility, precision, and robustness. The linearity of the method was observed in the concentrations 0.1; 0.5; 1.0; 5.0; 10.0; 15.0 e 20.0 µg/mL from an initial solution of 100 µg/mL.

Irritation Potential Evaluation

To evaluate the irritation potential of the formulations, three alternative methods were used. Saline solution (0.9% NaCl *w/v*) and 0.1 N sodium hydroxide (NaOH) were used as a negative and positive control, respectively. MEs were evaluated undiluted, but the CSs were diluted 1:1 with 0.9% NaCl.

Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test

For each formulation tested, four fresh fertile Leghorn eggs were used. The eggs were incubated at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with a relative humidity of $65 \pm 2\%$ for 10 days. On the tenth day, the shell membrane was removed, exposing the chorioallantoic membrane (CAM). Visual analysis was used to verify if the CAM was suitable to test, then 0.3 mL of each formulation was placed on the CAM surface. After 20 s, the formulation was removed with saline solution. The CAM was observed under a magnifying glass for 5 min to determine the incidence of any irritation effects in the CAM blood vessels (vascular lysis, hemorrhage, or coagulation). The vascular effects were observed according to the criteria described in the Protocol ICCVAM HET-CAM test method. Each formulation was classified according to the scores: 0–0.99 corresponding to non-irritant; 1.00–4.99 corresponding to slightly irritant; 5.00–8.99 corresponding to moderately irritant (MI); and 9.00–21.00 corresponding to severely irritant (SI) (19, 21).

Chorioallantoic Membrane-Trypan Blue Staining Test

The initial phase of testing is similar to the hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test, but the chorioallantoic membrane-Trypan blue staining (CAM-TBS) test uses Trypan blue as an indicator of CAM injury. After the removal of the formulation, 0.5 mL of phosphate saline buffer with 0.1% Trypan blue were added to the CAM in an area limited by a silicone ring. The excess Trypan blue was rinsed off with distilled water, and the CAM area that was limited by the silicone ring was removed with scissors and placed into 5 mL of formamide and then agitated and centrifuged. The absorbance of the supernatant was measured by spectrophotometry at 595 nm. The amount of Trypan blue absorbed by the chorioallantoic membrane was calculated using the following equation: $\text{absorbed dye} = \text{absorbance} \times 5 \text{ nmol}/1000 \times 10^9$. The formulations were classified according to the scores: 0–6.99 corresponding to non-irritant/slightly irritant (NI/SLI); 7.00–14.50 corresponding to moderately irritant (MI); and >14.50 corresponding to severely irritant (SI) (30).

Bovine Corneal Opacity and Permeability Test

The bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay was performed according to the OECD TG 437 protocol. Selected corneas without macroscopic tissue

damage were mounted in holders and incubated with Eagle's minimum essential medium (EMEM) for 1 h. Baseline opacity was measured after removing the medium using the BASF-OP 3.0 Opacitometer. The corneas were treated with 0.75 mL of each test formulation for 10 min, then the opacity was observed again. To evaluate the permeability, the corneas were treated with 1 mL of 0.4% sodium fluorescein solution and incubated at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ for 90 min. Following fluorescein exposure, optical density at 490 nm (OD490) of the EMEM solution in the posterior of the chamber was determined. To calculate an *in vitro* irritancy score (IVIS) for each treatment group, this equation was used: $\text{IVIS} = \text{mean opacity value} + (15 \times \text{mean permeability OD490 value})$. No prediction can be made when the IVIS values are below 55. Above this value, all substances are classified as category 1 irritants (31).

Statistical Analysis

The results are expressed as means \pm SD of at least three values. Data were analyzed by one-way analysis of variance. Statistical significance was fixed at $p < 0.05$.

RESULTS

Construction of Pseudo-Ternary Phase Diagrams

The different proportions between pairs of surfactants, oil, and water allowed us to characterize the domain of points that gave the formation of a homogeneous, clear, and isotropic system, characteristic of ME. Pseudo-ternary phase diagrams using catolé oil and different pairs of surfactants are shown in Fig. 1. The area of the ME region in the phase diagrams was expanded as the percentage of surfactants increased, and was largest using the L/PO pair. Four microemulsions were selected, ME1 using K/T20, ME2, ME3 using L/PO, and ME4 using T20/S80. The solubilities of AmB in these systems were 1.863, 2.605, 1.295, and 1.895 mg/mL, respectively.

Characterization of MEs and CSs

The MEs showed droplet sizes less than 100 nm and CSs values above 400 nm. For both systems, the addition of AmB caused increase in droplet diameter and did not influence the viscosity and rheological properties of the formulations (Table III). The apparent viscosity as a function of shear rate for the CSs and MEs was presented in Fig. 2. Clearly, the apparent viscosity decreases with an increasing shear rate for conventional systems but is constant for microemulsions. All formulations were stable in the centrifuge test, showing no turbidity or phase separation. Figure 3 shows that all of the ME were transparent, without any precipitates, and optically isotropic, but the photomicrographs of emulsion and emulgel clearly show the anisotropy of these systems before and after incorporation of the drug. The pH range for CS and ME was 6.10–8.13. The values shown in Table III reveal that only CSs showed zeta potential values lower than $|20 \text{ mV}|$. The dye solubility test result showed that a water-soluble dye spreads uniformly throughout the MEs systems and this indicates that the formed MEs were o/w type.

Formulations Containing Oil from *Syagrus cearensis*

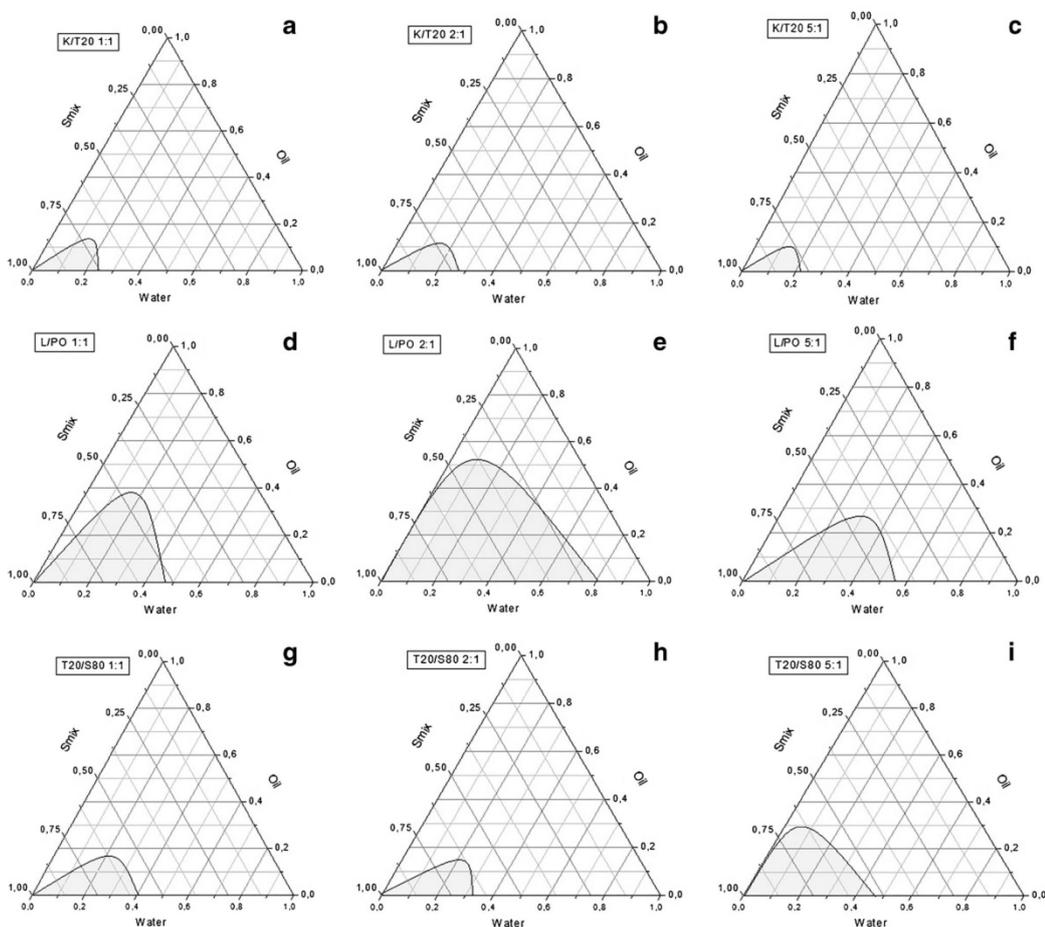


Fig. 1. Pseudo-ternary phase diagrams of the region of existence of the microemulsion systems. K/T20 **a** 1:1, **b** 2:1, and **c** 5:1; L/PO **d** 1:1, **e** 2:1, and **f** 5:1; and T20/S80 **g** 1:1, **h** 2:1, and **i** 5:1

Stability of MEs

All microemulsions and the emulgel remained physically stable throughout the study period. There was no phase

separation or significant aggregation of droplets and turbidity were not observed. As for the AmB content, there was no significant difference between the initial concentration and the concentration after 3 months. Concerning to the emulsion

Table III. Characterization (Mean \pm S.D.) of Selected AmB Formulations

	Droplet size (nm)		pH		Zeta potential (mV)		Viscosity (Pa.s)	
	Free	Loaded	Free	Loaded	Free	Loaded	Free	Loaded
CS1	408.63 \pm 12.9	420.43 \pm 10.1	6.10 \pm 0.1	6.30 \pm 0.1	-12.9 \pm 0.8	-11.8 \pm 1.1	15.90 \pm 0.5	15.93 \pm 0.5
CS2	466.15 \pm 15.2	489.22 \pm 14.5	6.50 \pm 0.1	6.20 \pm 0.1	-18.79 \pm 0.1	-19.21 \pm 0.1	10.29 \pm 0.5	10.35 \pm 0.4
ME1	15.16 \pm 0.6	31.02 \pm 0.9	6.70 \pm 0.1	8.13 \pm 0.1	-27.7 \pm 2.8	-23.4 \pm 1.4	0.63 \pm 0.1	0.63 \pm 0.1
ME2	77.04 \pm 1.5	89.86 \pm 1.2	7.22 \pm 0.1	8.09 \pm 0.1	-29.7 \pm 1.6	-26.8 \pm 0.7	0.16 \pm 0.1	0.16 \pm 0.1
ME3	54.80 \pm 1.5	63.68 \pm 1.6	7.06 \pm 0.1	8.07 \pm 0.1	-31.8 \pm 6.2	-24.1 \pm 2.3	0.09 \pm 0.1	0.09 \pm 0.1
ME4	20.67 \pm 1.2	34.42 \pm 0.4	6.84 \pm 0.1	7.89 \pm 0.1	-21.1 \pm 2.1	-22.7 \pm 2.4	0.62 \pm 0.1	0.61 \pm 0.1

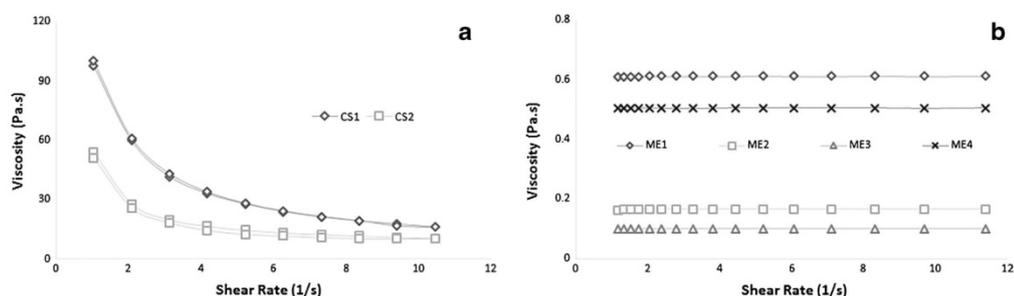


Fig. 2. Flow curves of **a** Amphotericin B (AmB)-loaded conventional systems and **b** AmB-loaded microemulsions

after 2 months, there was intense aggregation of the droplets, especially when stored at ambient temperature.

Characterization of Oil from *S. cerevisiae*

The results obtained experimentally and calculated by the integrated ^1H NMR spectra are shown in Table IV.

In Vitro Release and Ex Vivo Skin Permeation

The cumulative AmB released after 12 h from the selected AmB formulations (Fig. 4a) shows that ME 1 and 4 release higher amounts of AmB through the synthetic membrane used, and that there is no statistically significant difference between the amounts released from CS 1, ME 2, and ME 3. However, ME 1-4 differ between themselves and the other formulations ($p < 0.05$).

The permeation results corroborate the release results; therefore, the ME 1 and 4 formulations show higher permeation than the others. All showed cumulative drug permeation after 24 h at doses less than $5 \mu\text{g/mL}$, corresponding to 1.25% of the applied drug (Fig. 4b). CS2 showed no significant amount of permeability across the biomembrane.

The permeation rates (J) for the AmB-loaded (0.1% w/w) formulations were found to be 0.018–0.289 $\text{g}/(\text{cm}^2 \text{ h})$. The permeability coefficient (Kp) of AmB was 0.45, 7.22, 0.80, 1.27, and 6.15 cm^2/h for CS 1, ME 1, ME 2, ME 3, and ME 4, respectively.

The correlation coefficient (R^2) was 0.95 for ME 1 and 0.99 for ME 4 when the permeate concentration results were plotted versus time. For CS 1, ME 2, and ME 3, the R^2 values were increased when the drug permeation results were set as a function of the square root of the time, 0.98, 0.98, and 0.95, respectively.

The stratum corneum of skins used for each permeation were removed using 30 serial tape strips. The skins showed a

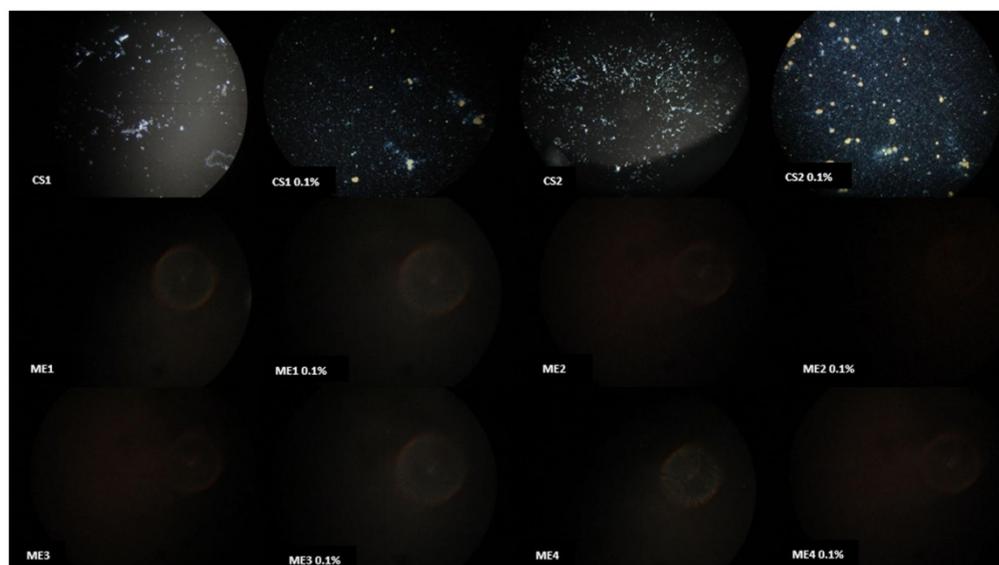


Fig. 3. Cross-polarized light microscopy of selected Amphotericin B formulations

Formulations Containing Oil from *Syagrus cearensis*

Table IV. Characterization (Mean \pm S.D.) of Oil from *Syagrus cearensis*

Parameter	¹ H NMR	Experimental
Iodine index (gI/100 g)	12.57 \pm 2.39	–
Saponification index (mgKOH/g)	203.14 \pm 1.17	201.15 \pm 4.80
Acidity (mgKOH/g)	2.9131 \pm 0.10 ^a	2.55 \pm 1.70 ^a
Unsaponifiable matter (%)	–	8.468 \pm 0.50
Peroxide value (mmol/kg)	–	3.2 \pm 0.20

^a Values with statistically significant difference ($p < 0.05$)

value of TEWL 9.0 ± 1.5 g/hm² before and values between 69.78 and 72.56 g/hm² after removal of the stratum corneum.

HPLC Analysis

The method used for AmB quantification showed specificity, accuracy, sensibility, robustness, and suitable linearity. The calibration curve of AmB presented the equation ($y = 63346x$) with a correlation coefficient (R^2) of the 0.9999. The retention time of the drug was 3.2 min, with good definition and separation of the chromatographic peaks, confirming that the method is appropriate for drug quantification.

Skin Retention Study

The skin retention of AmB was 23.83, 1.26, 84.79, 15.52, 24.36, and 59.67 μ g for CS 1, CS 2, ME 1, ME 2, ME 3, and ME 4, respectively. ME 1 and ME 4 had a greater deposition on the inner layers of the skin, dermis, and epidermis, followed by ME 3 and CS 1. It was observed that the retention values of all AmB-loaded formulations were statistically higher ($p < 0.05$) than the permeation values (Fig. 4c).

Irritation Potential Evaluation

The results of the HET-CAM, CAM-TBS, and BCOP tests are shown in Table V. The classification scores for the HET-CAM and CAM-TBS showed that the ME 2 and ME 3 formulations were moderate irritants, and all of the other MEs and CSs were classified as either non-irritants or slight irritants. According to the BCOP results, ME 2 and 3 are in category 1, and no prediction can be made for any of the other MEs or CSs. Catolé oil also was evaluated separately and classified as a non-irritant.

DISCUSSION

MEs are thermodynamically stable systems, with droplet diameters in the range of 10–100 nm (32). Determination of droplet size and distribution is one of the most important parameters for evaluating the stability of ME systems and the influence it will have on the incorporation of poorly soluble drugs. Previously reported studies show that the incorporation of AmB increases the droplet size in relation to the ME without the drug (28, 33). This is due to the intrinsic physicochemical properties of the molecule; however, this does not change the system stability or isotropic properties.

Emulsions are thermodynamically unstable dispersions with droplet diameters higher than 100 nm. Emulgels are emulsions that are mixed with a gelling agent, and are generally used as delivery systems for water-insoluble drugs (34).

The results presented in this work corroborate the above information; microemulsions, emulgels, and emulsions present characteristic droplet sizes, which are increased by the incorporation of AmB without destabilizing the system.

The optimum pH of a topical formulation is standardized according to the pH stability of the active components used and the skin tolerance, with acceptable values between 5.5 and 8.0 (35). AmB is a drug sensitive to light and heat with

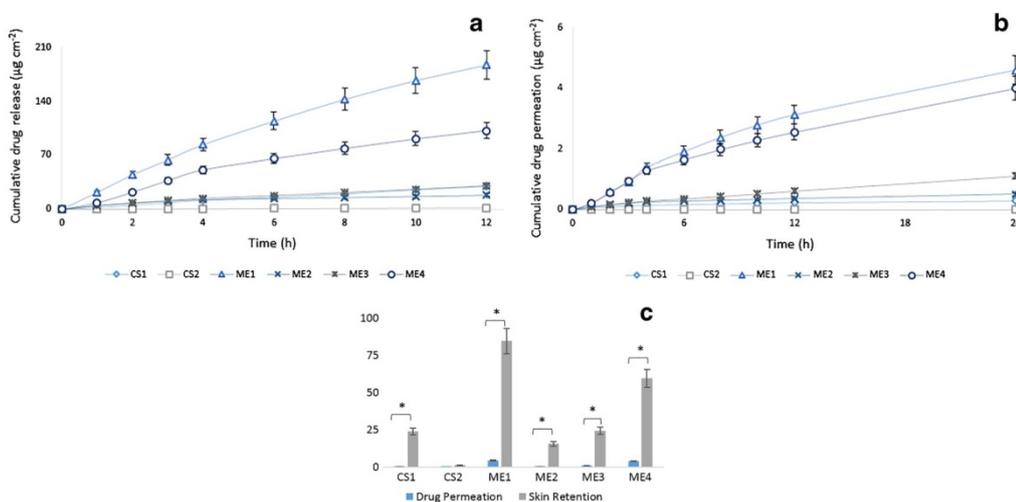


Fig. 4. a *In vitro* released, b *ex vivo* skin permeation, and c skin retention (μ g) of Amphotericin B loaded 0.1% formulation (mean \pm S.D.; $n = 6$). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). * ($p < 0.05$)

Table V. HET-CAM, CAM-TBS, and BCOP Results (Mean \pm S.D.)

	HET-CAM score			CAM-TBS score			BCOP score		
	Free	Loaded	Class	Free	Loaded	Class	Free	Loaded	Class
CS1	0.75 \pm 0.2	1.25 \pm 0.3	SLI	2.10 \pm 0.3	2.65 \pm 0.4	NI/SLI	28.40 \pm 5.6	31.02 \pm 10.2	ND
CS2	0.75 \pm 0.3	1.00 \pm 0.5	SLI	2.35 \pm 0.2	2.40 \pm 0.2	NI/SLI	32.15 \pm 8.4	37.75 \pm 6.7	ND
ME1	2.00 \pm 0.2	4.00 \pm 0.4	SLI	1.95 \pm 0.2	2.02 \pm 0.2	NI/SLI	20.45 \pm 2.9	19.85 \pm 4.5	ND
ME2	6.00 \pm 0.4	8.00 \pm 1.0	MI	3.80 \pm 0.4	7.30 \pm 0.5	MI	92.3 \pm 11.2	100.3 \pm 14.6	CAT1
ME3	5.25 \pm 0.4	5.25 \pm 0.4	MI	3.70 \pm 0.4	7.1 \pm 0.7	MI	86.68 \pm 7.8	96.68 \pm 9.4	CAT1
ME4	0.25 \pm 0.2	0.75 \pm 0.2	NI	1.70 \pm 0.4	1.05 \pm 0.6	NI/SLI	21.18 \pm 4.9	21.18 \pm 6.6	ND
Catolé Oil	0.25 \pm 0.2	–	NI	1.15 \pm 0.2	–	NI/SLI	12.95 \pm 4.2	–	ND
0.1 N NaOH	19.0 \pm 1.5	–	SEI	13.1 \pm 0.3	–	MI	425.75 \pm 36.8	–	CAT1

CAT1 category 1, NI non-irritant, SLI slight irritant, MI moderate irritant, SEI severe irritant, ND not determined

pH stability between 6 and 9 (36). Therefore, the pH values of the tested formulations are within the optimal ranges for both AmB and topical application.

The zeta potential performs an important role in determining the stability of disperse systems and interactions between the droplets present (37). Droplet aggregation is less when there is electrostatic repulsion between them, leading to the conclusion that the high zeta potential values reported prevent the aggregation of the droplets in the formulations and thus greater stability of the MEs.

To observe the effects of birefringence and isotropy, a linear polarized light is required. ME showed no deviation or vibration of the polarized light, and the incorporation of AmB did not change the isotropic behavior. Microemulsions are isotropic and can be distinguished from conventional systems, which are anisotropic (38).

The viscosity values of MEs are independent of shear stress variation or time, indicating that typical Newtonian flow was obtained (39). CSs exhibited pseudoplastic flux, which is an interesting feature for semi-solid formulations because the viscosity values are reduced with increasing shear stress, facilitating their spreading on the skin. In both cases, upward and descendant curves were created to verify the influence of time on the rheological behavior of formulations. Both formulations were independent of time, and so thixotropy was not observed.

The main analysis to determine the quality of a vegetable oil involves establishing the free acidity, saponification number, and peroxide index. The data obtained from the characterization of catolé oil showed that although there has been a statistically significant difference between the acidity values calculated by ^1H NMR and volumetry ($p < 0.05$), it and the other parameters are in accordance with the quality reference standards (40).

Several factors are related to the drug release from emulsified formulations, such as droplet size, viscosity, and interactions between the formulation and the drug, but for skin permeation, the limiting factor is an intact stratum corneum (23, 38). Medicines for dermal application are usually tested on healthy skin; however, the stratum corneum is often impaired by skin diseases. These skin conditions can influence the permeation of drugs; therefore, it is important to use a disturbed skin model to evaluate the permeation of drugs used to treat diseases that cause injury to the skin (41).

In this case, it is necessary to consider that the formulations are applied on ulcerated skin that has lost the stratum corneum and possibly more of the epidermis (42). Thus, it is important to evaluate the permeation and retention in an injured skin model and see if the drug really focuses on local action, that is, the skin layers.

ME 1 and 4 showed higher drug release, permeation, and skin retention than other formulations, and the emulgel was delivered more effectively than the emulsion, as shown in Fig. 4 ($p < 0.05$). These MEs showed a smaller droplet size but higher viscosity than the microemulsions using the surfactant pair L/PO (ME 2 and ME 3). The determining factor is likely particle size, and thus the interaction between the formulation and the drug, regardless of the system viscosity, since ME 2 showed a higher AmB solubilization but lower rates of release, permeation, and retention than other microemulsions. CSs are significantly more viscous with larger droplets than ME, confirming that it was more difficult for the drug to be delivered from these systems.

MEs 1 and 4 showed a higher correlation coefficient when the results of concentration released were plotted versus time, indicating that the zero-order kinetic model is more appropriate and that the flow is independent of drug concentration. For CS 1, ME 2, and ME 3, the values of the correlation coefficients were closer to 1 after performing the linear regression of the concentration released as a function of the square root of time, demonstrating that the formulations follow the Higuchi kinetic model, in which diffusion is controlled by the system (43, 44).

Through the TEWL measures that have been used extensively to characterize the skin barrier function (41), it was possible to infer that the condition of the skin damage was the same for all assays, since all skins used showed TEWL values statistically similar following the removal of the stratum corneum ($p < 0.05$).

All of the formulations showed greater retentivity than the permeability, which is essential for effective delivery of AmB into the skin layers aimed to treat lesions of cutaneous leishmaniasis and secondary bacterial or fungal infections associated with the initial injury (6).

These formulations showed several advantages, and one of them was the use of a new vegetable oil, signaling the use of natural resources with sustainable development and consequently social contribution. Furthermore, our study aimed at developing

Formulations Containing Oil from *Syagrus cearensis*

formulations with high retentivity and low permeability, even using a damaged skin model. Microemulsion and solid lipid nanoparticles (SLNs) previously developed for topical placement of amphotericin B had higher permeability than our formulations (28, 45). It is worth adding that the ME1 developed here exhibited twofold higher drug retention as compared to SLNs and retentivity comparable to the best microemulsions developed by Butani *et al.* On the other hand, in both previous studies, rat skin was used as biomembrana, and the ratio of formulation amount applied to area was higher.

CAM is the vascularized respiratory membrane found within a fertilized chicken egg, containing a vascular and inflammatory process similar to the conjunctival tissue of rabbit eyes (21). The HET-CAM test is used to provide qualitative information on the potential effects occurring in the conjunctiva following exposure to a substance; the observation of coagulation can reflect potential corneal damage. The CAM-TBS test adds value to the classic HET-CAM test by incorporating a quantitative reading, obtained by measuring the amount of Trypan blue absorbed by the exposed CAM cells (30).

Previous studies show great specificity of the tests on CAM, especially the HET-CAM, for substances or products with low or no irritant potential. HET-CAM features a more than 95% correct prediction for not irritating or slightly irritating substances, and less predictivity for irritants or severe irritants *in vivo* (19).

BCOP is a top-down test performed to measure the transmittance of light through the bovine cornea in order to evaluate its permeability following exposure to potential irritants; it is more predictive for products with potential to cause serious damage to the cornea (19, 31).

According to the three methods used, ME 2 and 3 were shown to be potential irritants with values directly related to an increase of the percentage of the L/PO pair of surfactants, while other formulations containing different surfactants in their compositions did not show significant irritation potential.

Both tests are related to ocular irritation, which can be associated with the application of substances on the face near the ocular mucous membrane. Formulations, with the exceptions of ME 2 and 3, were classified as non-irritating or slightly irritating, suggesting that they are safe for dermal application.

The optimized formulation (ME1) consisting of 0.1% (*w/w*) Amphotericin B, 9.1% (*w/w*) catolé oil, and 81% (*w/w*) Smix (1:1, Tween 20 and Kolliphor EL) possessed greater retentivity, physical and chemical stability for at least 3 months at $5 \pm 2^\circ\text{C}$ and at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), viscosity suitable for topical application, and showed no irritation potential in any of the three tests carried out.

The AmB administration through non-irritant topical formulations with high retentivity in the skin layers is a promising alternative for the treatment of ATL; thus, the lesion would be treated in a localized form, the toxic effects of AmB systemically would be eliminated, drug administration would be facilitated, and probably there could be a lower cost and higher treatment adhesion.

CONCLUSIONS

Formulations containing oil from *S. cearensis* were successfully developed and demonstrated high skin retentions and low permeabilities, showing promising alternatives for the topical delivery of AmB targeting the treatment of

cutaneous leishmaniasis. The alternative methods used to evaluate the irritation potential of the formulations proved to be reproducible, revealed similar results, and determined that the formulations are safe for dermal application, with the exceptions of ME 2 and 3 which exhibited moderate irritation potentials. These alternative methods can be acceptable to evaluate the toxicity of new systems among than microemulsions and not only conventional formulations. Emulsified formulations containing Kolliphor, Tween 20, and Span 80 are the most promising considering the high retention, less irritation potential, and less cost compared to those that contain Labrasol and Plurol Oleique as surfactants. Finally, the oil from *S. cearensis* presents itself as a candidate for use as a pharmaceutical adjuvant in topical formulations.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Carvalho RF, Ribeiro IF, Miranda-Vilela AL, de Souza Filho J, Martins OP, *et al.* Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Exp Parasitol* 2013; 135: 217–222.
- Chudzik B, Tracz IB, Czernel G, Fiolka MJ, Borsuk G, Gagoś M. Amphotericin B–copper (II) complex as a potential agent with higher antifungal activity against *Candida albicans*. *Eur J Pharm Sci.* 2013;49:850–7.
- Bose PP, Kumar P, Dwivedi MK. Hemoglobin guided nanocarrier for specific delivery of Amphotericin B to Leishmania infected macrophage. *Acta Trop.* 2016;158:148–59.
- Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *J. Control. Release* 2015; In Press, Corrected Proof.
- Marku D, Wahlgren M, Rayner M, Sjöo M, Timgren A. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *Int J Pharm.* 2012;428:1–7.
- Ramos-e-Silva M, Jacques CMC. Leishmaniasis and other Dermatozoonoses in Brazil. *Clin Dermatol.* 2002;20:122–34.
- Ribeiro JBP, Miranda-Vilela AL, Graziani D, *et al.* Evaluation of the efficacy of systemic miltefosine associated with photodynamic therapy with liposomal chloroaluminum phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL/6 mice. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;13:282–90.
- Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:363–70.
- Launois P, Tacchini-Cottier F, Kiény MP. Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2008;7:1277–87.
- Solomon M, Pavlotsky F, Leshem E, Ephros M, Trau H, Schwartz E. Liposomal amphotericin B treatment of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25:973–7.
- Motta JO, Sampaio RN. A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26:331–5.
- Damasceno BPGL, Dominić VA, Urbano IA, *et al.* Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. *J Biomed Nanotechnol.* 2012;8:290–300.
- Dossat V, Combes D, Marty A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. *Enzym Microb Technol.* 2002;30:90–4.

14. Nascimento VT, Moura NP, Vasconcelos MAS, Maciel MIS, Albuquerque UP. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. *Food Res Int.* 2011;44:2112–9.
15. Noblick LR. *Syagrus cearensis*, a Twin-Stemmed New Palm from Brazil. *Palms.* 2004;48(2):70–6.
16. Leal LB, Sousa GD, Seixas KB, Souza PHN, Santana DP. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. *Braz J Pharm Sci.* 2013;49:167–73.
17. Ferreira-Junior WS, Ladioc AH, Albuquerque UP. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. *J Ethnopharmacol* 2011; 238– 252.
18. Nóbrega AM, Alves EN, Presgrave RF, Costa RN, Delgado IF. Determination of eye irritation potential of low-irritant products: comparison of *in vitro* results with the *in vivo* draize rabbit test. *Braz Arch Biol Technol.* 2012;55:381–8.
19. Scheel J, Kleber M, Kreutz J, et al. Eye irritation potential: usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011;59:471–92.
20. Barbero AM, Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro.* 2009;23:1–13.
21. ICCVAM. Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication 10-7553, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2010.
22. Wilson SL, Ahearne M, Hopkinson A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicol.* 2015;327:32–46.
23. Yutani R, Komori Y, Takeuchi A, Teraoka R, Kitagawa S. Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68:46–55.
24. Patel HK, Barot BS, Parejya PB, Shelat PK, Shukla A. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: *ex vivo* permeation and skin irritation studies. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2013;102:86–94.
25. Brazilian Pharmacopoeia. 5th edition, ANVISA 2010, Brasília, 150-156.
26. Carneiro PIB, Reda SY, Carneiro EBB. ¹H NMR characterization of seed oils from Rangpur Lime (*Citrus limonia*) and “scilian” lemom (*Citrus limom*). *Ann Magn Reson.* 2005;4:64–8.
27. Reda SY, Costa B, Freitas RJS. Determination of iodine value in ethylic biodiesel samples by ¹H-NMR. *Ann Magn Reson.* 2007;6:69–75.
28. Butani D, Yewale C, Misra A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2014;116:351–8.
29. Wan T, Xu T, Pan J, et al. Microemulsion based gel for topical dermal delivery of pseudolaric acid B: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm.* 2015;493:111–20.
30. Lagarto A, Vega R, Guerra I, et al. *In vitro* quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue taining as alternative to eye irritation test. *Toxicol In Vitro.* 2006;20:699–702.
31. OECD. *Guidelines for the Testing of Chemicals.* Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. *Section 4: Health Effects.* 2009.
32. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;45:89–121.
33. Silva AE, Barratt G, Chéron M, Egito ES. Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. *Int J Pharm.* 2013;454:641–8.
34. Ajazuddin AA, Khichariya A, Gupta S, Patel RJ, Giri TK, Tripathi DK. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. *J Control Release.* 2013;171:122–32.
35. Silva JA, Santana DP, Bedor DCG, Borba VFC, Lira AAM, Egito EST. *In vitro* release and permeation of a diclofenac diethylamine from microemulsion gel-like. *Quim Nova.* 2009;32:1389–93.
36. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001., p. 98
37. Khan J, Alexander A, Ajazuddin, Saraf S, Saraf S. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. *J Control Release* 2013; 168: 50-60.
38. Formariz TP, Urban MCC, Silva Júnior AA. Microemulsion and liquid crystals as drug delivery systems. *Braz J Pharm Sci.* 2005;41(3):301–13.
39. Li G, Fan Y, Li X, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. *Int J Pharm.* 2012;425:53–61.
40. 40 Technical Regulation for vegetable oils, fats vegetables and vegetable cream. ANVISA Brazil 2005. RDC/ANVISA/MS N° 270.
41. Schlupp P, Weber M, Schmidts T, Geiger K, Runkel F. Development and validation of an alternative disturbed skin model by mechanical abrasion to study drug penetration. *Results Pharma Sci.* 2014;4:26–33.
42. Ospina VE, Mantilla JC, Conde CA, Escobar P. Human skin permeation of a chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion for optimization of topical cutaneous leishmaniasis formulations. *Rev Cienc Salud.* 2014;12(2):195–211.
43. Bolzinger MA, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2012;17:156–65.
44. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.* 2010;67:217–23.
45. Butani D, Yewale C, Misra A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: design and development. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2016;139:17–24.