UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Alessandra Cândida Rios

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PEGUILADOS REVESTIDOS COM QUITOSANA COM POTENCIAL PARA LIBERAÇÃO NASO-CEREBRAL DE ANFOTERICINA B

Sorocaba/SP
2021

Alessandra Cândida Rios

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PEGUILADOS REVESTIDOS COM QUITOSANA COM POTENCIAL PARA LIBERAÇÃO NASO-CEREBRAL DE ANFOTERICINA B

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Sorocaba/SP
2021

Ficha Catalográfica

Rios, Alessandra Cândida
R453d Desenvolvimento e caracterização de lipossomas peguilados revestidos com quitosana com potencial para liberação naso-cerebral de anfotericina B / Alessandra Cândida Rios. – 2021.
104 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Química farmacêutica. 2. Medicamentos – Formas de dosagem. 3. Medicamentos - Administração. 4. Sistema nervoso central. 5. Materiais biomédicos. I. Chaud, Marco Vinícius, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

Alessandra Cândida Rios

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PEGUILADOS REVESTIDOS COM QUITOSANA COM POTENCIAL PARA LIBERAÇÃO NASO-CEREBRAL DE ANFOTERICINA B

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 25 / 02 / 2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Universidade de Sorocaba

Prof ª. Dra. Patrícia Severino

Universidade Tiradentes

Prof. Dr. André Moreni Lopes

Universidade Estadual de Campinas

Prof ª. Dra. Mariana Battaglin Villas Boas Alvaro

Universidade Paulista

Prof ª. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Universidade Estadual Paulista

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Cleide Maria Cândida Rios e Antônio Maia Rios

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que buscam, de alguma forma, melhorar o mundo. Obrigada àqueles que gentilmente compartilharam comigo um pouco do seu conhecimento para auxiliar na composição do meu trabalho: "*...aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós*" (Antoine de Saint-Exupéry).

Agradeço a Deus por colocar no meu caminho pessoas e oportunidades grandiosas, às quais me ajudam a evoluir como pessoa e como profissional.

Com muita gratidão dedico este trabalho aos meus pais, que apesar de não terem tido a oportunidade de estudar, sempre foram meus maiores incentivadores e exemplos de vida.

Agradeço ao meu marido, meus amigos e familiares, por compreenderem minha ausência e me incentivarem sempre.

Agradeço imensamente ao meu orientador, professor Dr. Marco Vinícius Chaud, por ter confiado e acreditado em mim. Obrigada por compartilhar, com tanta generosidade, seus imensos conhecimentos.

Agradeço à toda equipe do Labnus pelo apoio, à Cecilia Torqueti de Barros pelo auxílio na extração das membranas de porco, ao Fernando Batain por acompanhar os processos e ajudar no que fosse preciso, ao Denicezar Baldo por sempre estar disponível para me ajudar no CLAE e especialmente à querida Thais Francine Ribeiro Alves, pela generosidade com que me ajudou durante todo processo e mais efetivamente nos ensaios *in vivo*.

Muita gratidão pela minha querida amiga Franciely C. C. N. Lopes, por compartilhar todos os anseios deste período e por me ajudar sempre. Obrigada pelo carinho, respeito, atenção e amizade.

Agradeço ao açougue da Lua por cortar as cabeças de porco, facilitando nosso trabalho e por contribuir assim, com aquilo que podem, para que a ciência no Brasil aconteça.

À Universidade de Sorocaba e aos professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Farmacêuticas, por me receberem tão bem e por contribuírem com o meu aprendizado.

Sinceros agradecimentos aos professores presentes na banca. Muito obrigada pelo carinho com que avaliaram este trabalho e pelas valiosas contribuições para a melhoria desta tese de doutorado.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida no âmbito do programa PROSUC.

“Life is very short, and there´s no time for fussing and fighting, my friend.”

The Beatles in We Can Work it Out

(John Lennon / Paul McCartney)

RESUMO

O tratamento de patologias que acometem o sistema nervoso central (SNC) muitas vezes é limitado devido à proteção deste sistema através da barreira hemato-encefálica. A permeação de nano-carreadores, através da via naso-cerebral tem demonstrado potencial eficácia nesta transposição. Este estudo propôs a liberação naso-cerebral de anfotericina B encapsulada em lipossomas peguilados revestidos com quitosana. Os lipossomas foram avaliados quanto ao encapsulamento do fármaco, tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e características de liberação do fármaco *ex vivo* com membrana nasal suína e *in vivo*, utilizando ratos Wistar. Por meio de uma abordagem de análise multifatorial para auxiliar no planejamento experimental da formulação, foi obtida uma eficiência de encapsulação de 98,30 ± 0,02% e, após processo de extrusão por membranas, os lipossomas peguilados apresentram tamanho de vesícula de 60,64 ± 0,62 nm, índice de polidispersão de 0,120 ± 0,056 e potencial zeta + 17,88 ± 2,02 mV, após revestimento com quitosana. Adicionalmente, foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificação da anfotericina B, também através de planejamento fatorial com análise multivariada dos fatores envolvidos na cromatografia líquida de alta eficiência. Assim, este estudo propôs um lipossoma peguilado revestido com quitosana com potencial para o direcionamento da anfotericina B diretamente ao cérebro através da via naso-cerebral. Esta pesquisa foi importante como ponto de partida e para abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de sistemas de liberação naso-cerebral que promovam a absorção do fármaco de forma efetiva, criando alternativas para o tratamento de patologias que acometem o SNC.

Palavras-chave: Liberação nasal. Liberação naso-cerebral. Lipossoma peguilado. Quitosana. Anfotericina B. Sistema Nervoso Central.

ABSTRACT

The treatment of pathologies that affect the central nervous system (CNS) is often limited due to the protection of this system through the blood-brain barrier. The permeation of nano-carriers through the nose-to-brain pathway has demonstrated potential effectiveness in this transposition. This study proposed the nose-to-brain release of amphotericin B encapsulated in pegylated liposomes coated with chitosan. Liposomes were evaluated for drug encapsulation, hydrodynamic size, polydispersion index, zeta potential and drug release characteristics *ex vivo* with porcine nasal membrane and *in vivo*, using Wistar rats. Through a multifactorial analysis approach to assist in the experimental planning of the formulation, an encapsulation efficiency of 98.30 ± 0.02% was obtained and, after the membrane extrusion process, the pegylated liposomes had a vesicle size of 60.64 ± 0.62 nm, a polydispersion index of 0.120 ± 0.056 and zeta potential of + 17.88 ± 2.02 mV, after had been coating with chitosan. Additionally, an analytical method for quantifying amphotericin B was developed and validated, also through factorial design with multivariate analysis of the factors involved in high performance liquid chromatography. Thus, this study proposed a pegylated liposome coated with chitosan promising for delivery amphotericin B directly to the brain via the nose-to-brain pathway. This research was important as a starting point and to open new perspectives for the development of systems of naso-cerebral release that promote the absorption of the drug, creating alternatives for the treatment of pathologies that affect the CNS.

Keywords: Nasal delivery. Nose-to-brain delivery. Flexible liposome. Chitosan, Amphotericin B. Central nervous system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Liberação naso-cerebral através da via olfatória.....20
Figura 2 – Representação gráfica de lipossoma funcionalizado com quitosana e polietilenoglicol.....28
Figura 3 – Estrutura molecular da anfotericina B 32
Figura 4 - Solubilidade da anfotericina B em diferentes valores de pH.....33
Figura 5 – Representação gráfica do protocolo para obtenção dos lipossomas peguilados revestidos com quitosana contendo AmB 43
Figura 6 - Esquema ilustrativo da célula de difusão de Franz.....48
Figura 7 - Diagrama das etapas envolvidas no trabalho de pesquisa 52
Figura 8 - Efeito obtido na resolução entre os picos de anfotericina A e anfotericina B **(a)** e o tempo de retenção **(b)** para o pico de anfotericina B.....54
Figura 9 - Cromatograma obtido com a melhor condição cromatográfica após planejamento de misturas *Simplex Centroide* 55
Figura 10 - Cromatograma obtido através do resultado da otimização analítica 58
Figura 11 - Cromatograma obtido com a solução amostra controle e solução placebo 59
Figura 12 - Cromatogramas obtidos com as soluções após serem submetidas à degradação forçada com a finalidade de observar interferência de possíveis produtos de degradação 60
Figura 13 - Gráfico de linearidade 62
Figura 14 - Gráfico de probabilidade normal dos efeitos na eficiência de encapsulação observados para cada fator independente, assim como suas interações 66
Figura 15 – Gráfico "*Predict vs. Actual*" para avaliação do efeito do modelo 69
Figura 16 - Formulação com propilenoglicol (a) e formulação com polietilenoglicol (b).....70
Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta para eficiência de encapsulação (EE) observados na interação entre fosfatidilcolina de soja (FTC) e colesterol (CH) nos experimentos contendo como modificador de superfície o Lipoid PE® (PEG) 71
Figura 18 – Gráfico de contorno para o efeito da fosfatidilcolina de soja (FTC) e do colesterol (CH) nos experimentos contendo como ativador de superfície o Lipoid PE® (PEG) na resposta de eficiência de encapsulação (EE) de anfotericina B em lipossomas 72
Figura 19 – Imagem dos lipossomas antes da redução do tamanho das vesículas.....73
Figura 20 – Lipossomas peguilados de anfotericina B revestidos com quitosana (LipPeAmB-CH) 77

Figura 21 - Observação do precipitado de anfotericina B não encapsulada nos lipossomas .. 78
Figura 22 - Evolução temporal dos valores de resposta médios para tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e teor para os lipossomas peguilados de antotericina B revestidos com quitosana 80
Figura 23 – Ensaio de permeação em célula de difusão de Franz com membrana nasal suína 82
Figura 24 – Administração nasal da suspensão de lipossomas peguilados de AmB revestidos com quitosana em rato Wistar 84
Figura 25 - Trabalho de pesquisa desenvolvido 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento de misturas *Simplex Centroide* 40
Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central para avaliação da melhor condição cromatográfica..... 40
Tabela 3 - Planejamento fatorial exploratório, com os valores dos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1) para cada fator avaliado 44
Tabela 4 - Planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central para avaliação da melhor eficiência de encapsulação..... 45
Tabela 5 - Descrição das 11 corridas cromatográficas executadas e resultados obtidos em termos de resolução e tempo de retenção 53
Tabela 6 - Descrição das 11 corridas cromatográficas executadas e resultados obtidos em termos de resolução, assimetria, pureza de pico e tempo de retenção..... 56
Tabela 7 - Dados obtidos para repetibilidade do método 62
Tabela 8 - Dados obtidos para exatidão de anfotericina B 63
Tabela 9 - Descrição do estudo e resultados em termos de eficiência de encapsulação obtidos para os 19 experimentos do estudo exploratório para desenvolvimento da formulação de lipossomas peguilados 65
Tabela 10 - Descrição dos 14 experimentos realizados na segunda etapa do planejamento fatorial para desenvolvimento da formulação de lipossomas..... 68
Tabela 11 - Valores de tamanho hidrodinâmico médio (n=3) com desvio padrão associado e concentração obtida de anfotericina B (AmB) 73
Tabela 12 - Resultados obtidos após revestimento com 0,1% de quitosana, em termos de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e concentração de anfotericina B (AmB) 75
Tabela 13 - Composição centesimal dos lipossomas peguilados de anfotericina B revestidos com quitosana..... 76
Tabela 14 - Valores de resposta médios e desvios padrão associados para tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e teor para os lipossomas peguilados revestidos com quitosana contendo anfotericina B 79
Tabela 15 - Solubilidade da anfotericina B em diferentes candidatos à meio receptor..... 81
Tabela 16 – Permeação *ex vivo* através de membrana nasal suína após 24 h..... 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos lipossomas baseado em diâmetro médio e lamelaridade 26
Quadro 2 - Medicamentos comerciais contendo anfotericina B 34
Quadro 3 - Resumo das conclusões do estudo de linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários) 61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AmA	Anfotericina A
AmB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCS	Sistema de classificação biofarmacêutica
BHE	Barreira hematoencefálica
CH	Quitosana
CLAE	Cromatografia à líquido de alta eficiência
CV	Coeficiente de variação
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo à média
EDTA.2Na	Ácido etilenodiaminotetraacético dissódico
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	*United States Food and Drug Administration*
FNS	Fluído nasal simulado
HS	Tamanho hidrodinâmico
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IV	Via intravascular
LC-MS	Cromatógrafo à líquido acoplado à espectrômetro de massas
LipPeAmB-CH	Lipossomas peguilados com anfotericina B revestido com quitosana
LipPePLC-CH	Placebo de lipossomas peguilados revestido com quitosana
VUG	Vesícula unilamelar grande
MeOH	Metanol
VML	Vesícula multilamelar
MM	Massa molecular
mM	miliMolar
VMV	Vesícula multivesicular
NE	Nanoemulsão
nm	Nanômetro

PDI	Índice de polidispersão
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema nervoso central
VUP	Vesícula unilamelar pequena
Tc	Temperatura crítica ou temperatura de transição de fase
THF	Tetraidrofurano
VI	Via intranasal
VO	Via oral
ZP	Potencial Zeta
σ	Desvio padrão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 REVISÃO DA LITERATURA 19

2.1 Liberação naso-cerebral 19

2.2 Fisiologia nasal 21

2.3 Limitações 22

2.4 Sistemas nanoestruturados para liberação naso-cerebral de fármacos 23

2.5 Lipossomas 25

2.5.1 Incorporação de polietilenoglicol em lipossomas 28

2.5.2 Revestimento de quitosana em lipossomas 29

2.6 Meningite criptocócica 30

2.7 Anfotericina B 31

3 OBJETIVO 36

3.1 Geral 36

3.2 Específicos 36

4 MÉTODOLOGIA EXPERIMENTAL 37

4.1 Materiais 37

4.1.1 Reagentes e consumíveis 37

4.1.2 Material biológico 37

4.1.3 Equipamentos analíticos e outros 37

4.2 Procedimento experimental 38

4.2.1 Desenvolvimento analítico 38

4.2.2 Planejamento experimental no desenvolvimento analítico 39

4.2.3 Validação analítica por CLAE para quantificação da AmB 41

4.2.3.1 Seletividade 41

4.2.3.2 Linearidade 41

4.2.3.3 Limite de detecção 41

4.2.3.4 Precisão 42

4.2.3.5 Exatidão 42

4.2.4 Síntese das vesículas lipossomais 42

4.2.4.1 Planejamento experimental para síntese das vesículas lipossomais 44

4.2.4.2 Redução do tamanho dos lipossomas 45

4.2.4.3 Revestimento com quitosana 45

4.2.5 Caracterização das propriedades físico-químicas dos lipossomas 46

4.2.5.1 Avaliação do tamanho, potencial zeta e índice de polidispersidade 46

4.2.5.2 Determinação da eficiência de encapsulamento 46

4.2.5.3 Estudos de estabilidade do sistema lipossomal contendo o fármaco 47

4.2.6 Avaliação da permeação *ex vivo* 47

4.2.6.1 Estudo de solubilidade 47

4.2.6.2 Ensaio de permeação *ex vivo* utilizando célula de difusão de Franz 48

4.2.7 Avaliação da biodisponibilidade em ratos 49

4.2.7.1 Estudo em ratos Wistar 50

4.2.7.2 Extração das amostras 50

4.2.7.3 Condições cromatográficas 50

5 RESULTADOS 52

5.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação da anfotericina B 53

5.1.1 Resultados do planejamento experimental no desenvolvimento analítico 53

5.2 Validação do método analítico para quantificação da anfotericina B 58

5.2.1 Seletividade 59

5.2.2 Linearidade 61

5.2.3 Limite de detecção 62

5.2.4 Precisão 62

5.2.5 Exatidão 63

5.2.6 Robustez 64

5.3 Síntese dos lipossomas 64

5.3.1 Resultados do planejamento experimental 64

5.3.2 Redução do tamanho dos lipossomas para escala nanométrica 72

5.3.3 Alteração da carga eletrônica dos lipossomas 74

5.3.4 Definição da formulação 76

5.4 Caracterização das propriedades físico-químicas 77

5.4.1 Eficiência de encapsulação da anfotericina B 77

5.4.2 Avaliação do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e teor 78

5.5 Ensaio de permeação *ex vivo* 81

5.5.1 Escolha do meio receptor 81

5.5.2 Permeação *ex vivo* de anfotericina B 82

5.6 Avaliação da biodisponibilidade *in vivo* 83

6 CONCLUSÕES 87

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO 89

REFERÊNCIAS 90

1 INTRODUÇÃO

Os benefícios da administração intranasal como uma rota não invasiva para liberação de fármacos tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. O epitélio nasal é altamente vascularizado, permeável e apresenta grande superfície de absorção, o que permite a permeação direta do fármaco para a circulação sistêmica, evitando assim o metabolismo hepático de primeira passagem e degradação gástrica de fármacos administrados através do trato gastrointestinal (CHATURVEDI *et al*., 2011; THWALA *et al*., 2016).

Apesar da concentração plasmática de fármacos administrados pela via nasal serem comparáveis à administração intravenosa (CHATURVEDI *et al*., 2011), possibilitando ação farmacológica em todo organismo, o interesse desta via de administração para ação direcionada ao sistema nervoso central (SNC) é bastante importante, devido à complexidade deste sistema biológico. O acesso ao tecido cerebral é limitado pelas barreiras hemato-encefálica e barreira cérebro-espinhal, que são responsáveis, além da nutrição do cérebro, pelo bloqueio da entrada de substâncias neurotóxicas, moléculas polares ou de alta massa molecular (MARIANECCI *et al*., 2017).

O acesso ao SNC para o tratamento de patologias que o acometem como esquizofrenia, enxaqueca, Alzheimer, síndrome de Parkinson, tumores cerebrais e infecções em geral é um desafio a ser vencido. A barreira hemato-encefálica muitas vezes restringe a ação de fármacos potenciais nestes tratamentos.

A abordagem de veiculação de fármacos em formas farmacêuticas que permitam a modificação do tamanho de partícula para uma nano-escala dentro do intervalo de tamanho de 10-100 nm, de forma a favorecer o transporte passivo através da via naso-cerebral, promovendo assim a biodistribuição através do sistema de drenagem linfático hipervascularizado pode ser promissor (MADANE; MAHAJAN, 2016).

Diferentes sistemas de liberação de fármacos têm sido estudados e desenvolvidos para a administração nasal, tendo como alvo o tecido cerebral. Sistemas como nanopartículas, lipossomas e micelas poliméricas apresentam potencial aplicação devido à baixa toxicidade ao epitélio nasal e SNC (KHAN *et al*., 2017).

Neste contexto, o desenvolvimento de sistemas promotores de permeação que permitam a liberação intranasal do fármaco e promovam a transposição da barreira hematoencefálica, possibilitando a ação direta no sistema nervoso central pode ser uma alternativa promissora para melhorar a biodisponibilidade e, de um modo generalista, dar suporte à existência de um caminho direto para o cérebro, partindo da cavidade nasal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Liberação naso-cerebral

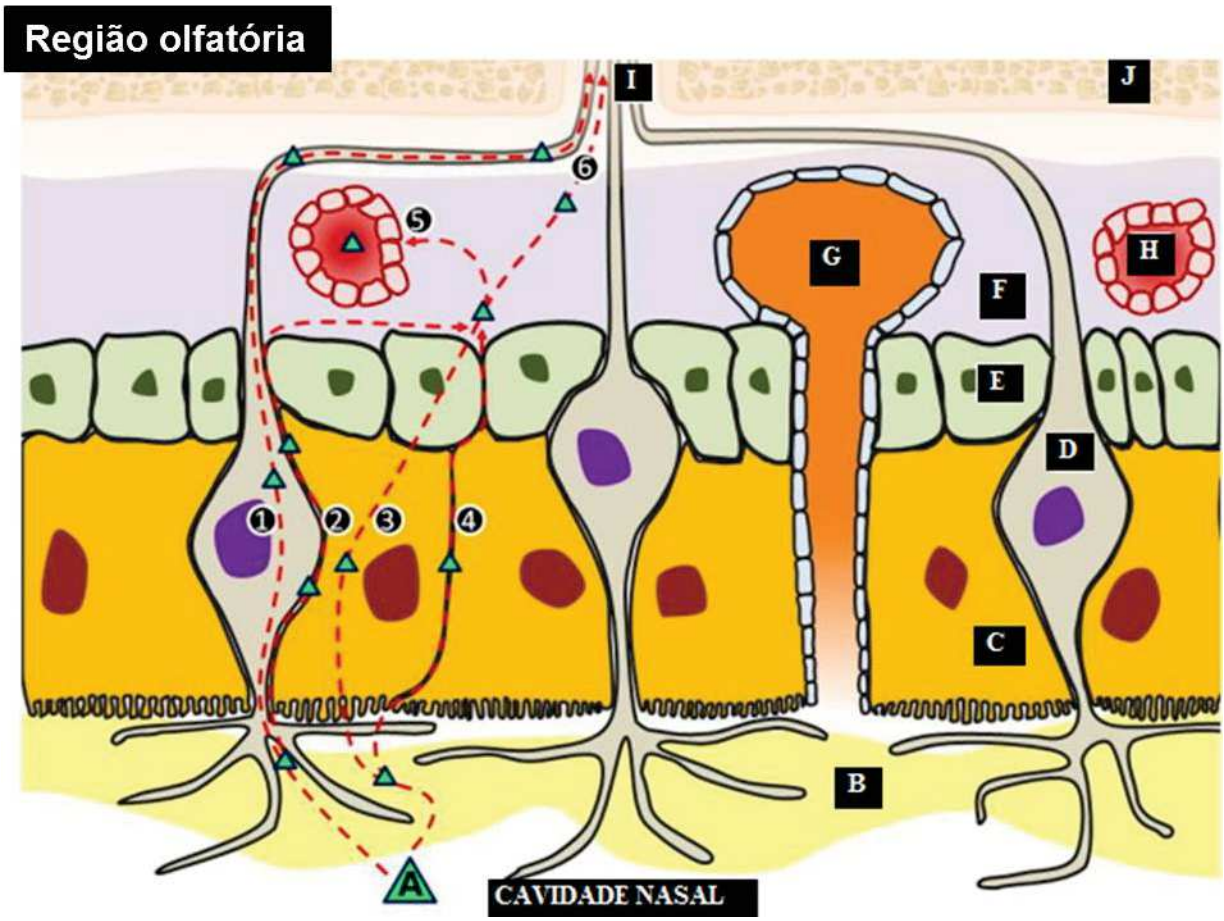
Os principais obstáculos para os fármacos que tem como órgão alvo o cérebro são a barreira hematoencefálica e barreira cérebro-espinhal, seja através da administração convencional pela via oral (VO) ou via intravenosa (IV), seja pela administração por via intranasal (VI). Nos fármacos com característica hidrossolúvel e alta massa molecular, a difusão passiva paracelular é limitada uma vez que as junções das células endoteliais dos capilares que formam a barreira hematoencefálica são extremamente estreitas e limitam este tipo de transporte. Enquanto que as moléculas de característica lipofílica, capazes de serem transportadas por difusão passiva transcelular são, muitas vezes, impedidas de alcançarem concentrações adequadas no cérebro pelo fato de poderem ser substratos para transportadores de efluxo (RUIGROK; DE LANGE, 2015; AGRAWAL *et al*., 2018).

A vantagem explorada para a via nasal é a possibilidade dos fármacos atingirem diretamente o cérebro com a administração intranasal, transpondo a barreira hematoencefálica, através da via trigeminal e da via olfatória, cujos nervos iniciam no cérebro e finalizam, respectivamente, no epitélio respiratório e no neuroepitélio olfativo, localizados na cavidade nasal (BAHADUR; PATHAK, 2012; KHAN *et al*., 2017; MISTRY *et al*., 2009) e, ainda, através da via sistêmica vascular ou linfática permitindo a absorção do fármaco para a circulação sistêmica com efeito semelhante à uma administração intravenosa (ILLUM, 2004; AGRAWAL *et al*., 2018). Dentre estas vias, o transporte através dos nervos olfatórios e trigeminal apresentam os mecanismos mais significativos na liberação naso-cerebral (AGRAWAL *et al*., 2018).

No transporte de moléculas da cavidade nasal para o cérebro através da via olfatória, exemplificado na Figura 1, o fármaco passa através do epitélio olfatório para o bulbo olfatório e depois para o tecido cerebral ou para o líquido cefalorraquidiano e este processo pode ocorrer de forma intracelular e/ou extracelular. O transporte via intracelular é bastante lento. Neste processo ocorre a endocitose da molécula mediada por receptores que se encontram nas células olfativas da mucosa nasal, as quais sofrem transcitose pelos fascículos destas células levando até o bulbo olfativo, onde as moléculas saem das células por exocitose, atravessam a fenda sináptica e são captados pelas dendrites das células mitrais, migrando depois pelo cérebro até alcançarem o corpo estriado (BAHADUR; PATHAK, 2012). O transporte mais rápido seria o extracelular, onde a molécula se difunde pelo meio extracelular das células olfativas e, por meio

de movimentos celulares e de propagação de potenciais de ação, o fármaco atravessa através das células, por um transporte paracelular, até atingir o bulbo olfativo (BAHADUR; PATHAK, 2012; AGRAWAL *et al*., 2018).

Figura 1 – Liberação naso-cerebral através da via olfatória



Legenda: (A) Fármaco; (B) Cílios na cavidade nasal e muco; (C) Células epiteliais olfatórias; (D) Neurônios sensoriais olfatórios; (E) Células basais; (F) Lâmina própria; (G) Glândula de Bowman; (H) Vasos sanguíneos; (I) Trato olfatório; (J) Placa cribriforme; (1) Transcelular – neurônio sensorial olfatório; (2) Paracelular – neurônio sensorial olfatório e células epiteliais; (3) Transcelular - células epiteliais olfatórias; (4) Paracelular - células epiteliais olfatórias; (5) Circulação sistêmica ou linfática; (6) Extracelular – canais perineurais ou perivasculares.
Fonte: Adaptado de KATARE *et al*. (2017).

No transporte através dos neurônios trigeminais, a molécula atravessa via nervo trigêmeo e assim evita a barreira hematoencefálica (PARDESHI; BELGAMWAR, 2013; AGRAWAL *et al*., 2018). O nervo trigeminal inicia no cérebro e algumas ramificações finalizam na cavidade nasal, sendo assim, desde que o fármaco seja capaz de atravessar o epitélio olfativo e respiratório, é possível que através de processos intra e extracelulares o fármaco possa atingir o cérebro através do nervo trigeminal (RUIGROK; LANGE, 2015).

Como para esta passagem a permeação através da membrana epitelial, da camada de muco e da barreira juncional é necessária, esta via se torna mais favorável para sistemas com características lipofílicas e tamanhos inferiores à 0,1-0,7 μm (RUIGROK; LANGE, 2015; BOURGANIS *et al*., 2018).

O transporte através das vias sistêmica ou linfática ocorre com a permeação do fármaco através da alta vascularização do epitélio nasal (BOURGANIS *et al*., 2018; ILLUM, 2004). Estas vias representam rotas naso-cerebral indiretas, uma vez que, após permeação através do epitélio nasal para as vias sistêmica ou linfática, vão atingir o tecido cerebral de forma semelhante à administração intravenosa, possivelmente à uma velocidade maior, no entanto, enfrentando as mesmas barreiras dependentes da característica lipofílica da substância, tempo de meia-vida circulatória, ligações às proteínas plasmáticas, integridade da BHE, metabolismo hepático e renal assim como a falta de especificidade aos tecidos cerebrais (KOZLOVSKAYA *et al*., 2014; BOURGANIS *et al*., 2018).

Muitas vezes a maneira como o fármaco atinge o tecido cerebral através da administração nasal não é clara e é possível que as vias trigeminal, olfatória, sistêmica e linfática contribuam de maneira independente ou sinérgica no transporte dos fármacos (BOURGANIS *et al*., 2018).

2.2 Fisiologia nasal

Dentro da cavidade nasal são observadas três regiões distintas. A região vestibular que corresponde à porção frontal, onde são encontrados o muco e as células ciliadas que bloqueiam as partículas estranhas através da depuração mucociliar (CROWE *et al*., 2018).

A região respiratória que corresponde à maior porção, cobrindo cerca de 130 cm^2 da área total, apresenta quatro tipos celulares: célula basal, célula caliciforme, célula epitelial colunar ciliada e não ciliada (MERKUS *et al*., 1998). A alta vascularização nessa região pode facilitar a absorção de fármacos para a circulação sistêmica. Esta região compreende também os neurônios sensoriais trigêmios que possibilitam o transporte do fármaco via nervo trigêmeo evitando a barreira hematoencefálica (PARDESHI; BELGAMWAR, 2013; CROWE *et al*., 2018).

Por último, a região olfativa, que está situada na porção superior da cavidade nasal, logo abaixo do osso etmóide. Esta região possui quatro tipos celulares: células de suporte, células microvilares, células basais e neurônios receptores olfativos com uma pequena porção de neurônios trigêmeos. E ainda, abaixo do epitélio olfativo e respiratório, existe a lâmina própria

que contém vasos sanguíneos, rede linfática, glândula de *Bowman*, espaços perivasculares, axônios e tecidos conjuntivos (DHURIA *et al*., 2010).

2.3 Limitações

Vários mecanismos protegem a via nasal da entrada e permanência de substâncias exógenas e estes mecanismos de defesa se apresentam como limitações físicas para a administração naso-cerebral. Entre elas estão a depuração mucociliar, a degradação enzimática e a baixa retenção do fármaco na mucosa nasal, assim como a toxicidade epitelial (AGRAWAL *et al*., 2018).

O mecanismo de depuração mucociliar transporta a camada de muco que cobre o epitélio nasal, através dos cílios nasais, para o sistema nasofaríngeo onde é deglutido ou expectorado e este processo evita a entrada de substâncias indesejadas, como microorganismos e sujidades do ambiente externo para o sistema respiratório, promovendo ainda a manutenção da umidade do sistema com a promoção da troca de água e íons (MISTRY *et al*., 2009). Com isso, contribui para uma redução do período em que o fármaco está em contato com a mucosa nasal, o que pode limitar a absorção (AGRAWAL *et al*., 2018; CROWE *et al*., 2018).

A camada mais expessa e viscosa de muco que cobre o epitélio respiratório é excretada pelas células caliciformes. Este muco é composto por aproximadamente 3% de mucina e 90-95% de água contendo eletrólitos, proteínas séricas, imunoglobulinas e lipídios. O tempo de cerca de 12 a 15 min de trânsito mucociliar em humanos leva à baixa retenção do fármaco na mucosa nasal, o que limita a sua absorção (MERKUS *et al*., 1998).

Em relação à retenção e absorção do fármaco, moléculas com massa molecular até 300 Da são melhor absorvidas, enquanto que moléculas com massa molecular acima de 1000 Da tem a absorção prejudicada, ainda que estas substâncias sejam apolares e hidrofóbicas (PIRES, 2009). A projeção de partículas carregadas com o fármaco também leva em consideração o tamanho como parâmetro crítico para uma retenção suficiente que permita a permeação, pois elas podem ficar depositadas em diferentes locais do sistema respiratório. Partículas com um diâmetro superior a 10 μm podem permanecer na cavidade nasal enquanto partículas menores, se não forem absorvidas, tendem a percorrer todo o caminho respiratório através da passagem nasal atingindo a garganta e pulmões (PIRES, 2009).

Algumas outras propriedades são recomendadas para contornar as limitações e favorecer a absorção de um fármaco pela via naso-cerebral como baixa massa molecular, alta concentração do fármaco, fluidez da formulação e miscibilidade com água, para que possa ser

administrada em forma de spray, lipofilicidade adequada que permita atravessar as barreiras biológicas e, ainda, apresentar pH entre 5,0 e 6,5 para evitar a irritação da mucosa nasal (PIRES; SANTOS, 2018; BAHADUR; PATHAK, 2012).

Diante disso, fica claro que se faz necessário atender a alguns requisitos para que o fármaco esteja apto a ser liberado no cérebro, pela via nasal. O desenvolvimento da formulação deve ter como objetivo transpor estas limitações, de forma a manter o fármaco tempo suficiente na cavidade nasal, evitando a depuração mucociliar e aumentando o tempo de residência da formulação, assim como favorecer o rápido transporte das moléculas através da mucosa nasal (KUMAR *et al*., 2009; AGRAWAL *et al*., 2018; YU *et al*., 2019).

2.4 Sistemas nanoestruturados para liberação naso-cerebral de fármacos

Diferentes tipos de formulações farmacêuticas já foram estudados para a incorporação de fármacos com o objetivo de liberação naso-cerebral. Estes sistemas incluem: lipossomas (ARUMUGAM *et al*., 2008; AL ASMARI *et al*., 2016; SALADE *et al*., 2017), transferossomas (SALAMA *et al*., 2012), nanoestruturas lipídicas (MADANE; MAHAJAN, 2016; GADHAVE; KOKARE, 2019; MATARAZZO *et al*., 2021), nanoemulsão (MAHAJAN; GATTANI, 2009; ESPINOZA *et al*., 2019), hidrogel (GU *et al*., 2016), nanopartículas (SEJU *et al*., 2011), cristal líquido (SOUZA *et al*., 2021) entre outros.

Espinoza *et al*. (2019) estudaram a possibilidade de transpor a BHE com uma nanoemulsão (NE) para administração intrasanal de donepezil, fármaco utilizado no tratamento da doença de Alzheimer. A estratégia utilizada foi o desenvolvimento de uma NE com a combinação das propriedades de bioadesão e melhoramento da permeação através da incorporação de pluronic F-127® na fase aquosa. O polímero não-iônico pluronic F-127® é solúvel em água e, devido à sua natureza anfifílica, permitiria a interação da formulação com as cadeias glicoprotéicas da mucina que forma o mucu, permitindo assim um maior tempo de permanência da NE na mucosa nasal. Para a formulação contendo 6,25 $mg.mL^{-1}$ de donepezil, foi utilizado o capriol 90® como componente oleoso que dissolveu o fármaco, labrasol® como surfactante e transcutol-P® como co-surfactante e, na fase aquosa, foi adicionado o polímero pluronic F-127. A NE apresentou formato esférico com tamanho de 128,50 ± 1,03 nm e índice de polisdispersão de 0,12 ± 0,01. Nos estudos de permeação *ex vivo*, utilizando membrana nasal suína como barreira e uma solução de transcutol-P® e água (60:40, v/v) como meio receptor, foi observada maior permeação para a NE contendo pluronic F-127® (28,39%, 6h de ensaio) quando comparada à mesma NE sem a adição do polímero (10,64%, 6h de ensaio). Não foram

realizados estudos *in vivo* com a formulação, mas os resultados encontrados *in vitro* e *ex vivo* foram promissores.

Em outro estudo recente, que investigou a administração nasal de teriflunomide (TFM), utilizado no tratamento de esclerose múltipla, Gadhave & Kokare (2019) otimizaram uma formulação para carrear TFM em nanopartícula lipídica (TFM-NLC) com e sem ação mucoadesiva. A combinação do agente geleificante termorresponsivo poloxamer 407® com uma mistura do agente mucoadesivo HPMC K4M® foram utilizados para revestir as TFM-NLC formando TFM-MNLC. A TFM-NLC atingiu tamanho de 99,82 ± 1,36 nm, potencial zeta de -22,29 ± 1,8 mV e eficiência de encapsulação de 83,39 ± 1,24%. Nos estudos *ex vivo*, utilizando mucosa nasal de ovelha em difusor de célula de Franz, a formulação com mucoadesão foi 2,0 vezes mais permeada do que a formulação comparativa. O estudo *in vivo* avaliou a ação terapêutica do TFM em ratos Wistar com neurodegeneração e neuropsiquiatria ativada pelo agente cuprizone (0,6%). Para avaliar os resultados da administração oral e intranasal de TFM, 4 grupos com 3 animais, sendo grupo I (controle normal), grupo II (controle negativo com cuprizone 0,6%), grupo III (TFM-NLC 100 µg/mL solução oral contra cuprizone 0,6%) e grupo IV (TFM-MNLC 50 µg/mL por via intranasal contra cuprizone 0,6%) foram dasafiados no modelo de avaliação comportamental labirinto em cruz elevado e o resultado foi que a administração pela via intranasal da TFM-MNLC apresentou resultados mais rápidos na redução da neuroinflamação quando comparada à administração oral da TFM-NLC, sugerindo assim maior rapidez ao atingir o alvo pela via naso-cerebral.

Donepezil é um fármaco amplamente usado para tratamento da doença de Alzheimer e existem vários estudos de modificação farmacotécnica com a finalidade de administração intranasal para atingir com maior eficácia o tecido cerebral. No estudo realizado por Al Asmari e equipe (2016) o fármaco veiculado em lipossomas foi investigado na administração intranasal *in vivo* utilizando ratos como modelo biológico. Os lipossomas foram preparados utilizando colesterol, polietilenoglicol e 1,2-distearyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) através da técnica de hidratação da fina camada lipídica, onde os materiais na proporção de 2:0,5:1, respectivamente, foram dissolvidos em clorofórmio, o qual foi evaporado em rota vapor e hidratado com tampão pH 7,4 contendo o fármaco donezepil. Este conteúdo foi agitado em vortex e depois passou por três ciclos de congelamento (-80 ºC) seguido de descongelamento (30 ºC). Foram obtidos lipossomas com 102 ± 3,3 nm de tamanho, índice de polidispersão de 0,28 ± 0,03, potencial zeta de -28,31 ± 0,85 mV, eficiência de encapsulação de 84,91% ± 3,31% e a biodisponibilidade *in vivo* foi comparada com a via de administração oral. Os animais do grupo I e II receberam donepezil (1 mg/Kg) via oral e nasal, respectivamente, enquanto o grupo

III recebeu os lipossomas de donepezil (1 mg/Kg) por via intranasal. Seis ratos foram sacrificados após 0.5, 1, 1.5, 3, 4, 6 e 8 h da administração e foram analisados sangue e cérebro quanto à presença de donepezil, pela técnica de LC-MS e os resultados demonstraram uma biodisponibilidade dos lipossomas próxima de duas vezes maior que o fármaco livre ($P<0,05$).

A formulação de lipossomas foi a alterativa de Narayan e colaboradores (2016) para viabilizar a administração intranasal e permeação direta para o tecido cerebral do fármaco risperidona, que é lipofílico de baixa massa molecular, utilizado no tratamento de esquizofrenia. A metodologia de escolha foi da hidratação da fina camada lipídica e a composição foi otimizada através de um planejamento fatorial a fim de se obter a maior eficiência de encapsulação e menor tamanho de partícula. Os lipossomas otimizados foram revestidos com estearamina (SA) (lipossomas catiônicos) e MPEG-DSPE (lipossomas peguilados) para melhorar a penetração e os estudos *in vivo* foram realizados em ratos Wistar albinos em comparação com a administração intravenosa do fármaco. A melhor proporção de fosfatidilcolina de soja (SPC) e colesterol (CH) foi de 8:1 e a fração oleosa para o fármaco, foi de 10:1. Para os lipossomas catiônicos a proporção foi de 8:1:0,25 (SPC:CH:SA) e para os lipossomas peguilados foi de 8:1:0,20 (SPC:CH:MPEG-DSPE). Foram obtidos lipossomas com tamanho de partículas entre 90 e 100 nm, índice de polidispersão menor que 0,5, eficiência de encapsulação entre 50% e 60% e a formulação de lipossomas incorporados com polietilenoglicol demonstrou maior capacidade de atingir o cérebro, após administração nasal, em comparação com a administração intravenosa e com as demais formulações.

2.5 Lipossomas

Os lipossomas utilizados como veículo para liberação naso-cerebral de fármacos têm sido amplamente pesquisados e descritos em diversas revisões de literatura sobre o tema (BARROS *et al*., 2020; HONG *et al*., 2019; ALEXANDER *et al*., 2019).

Os lipossomas são estruturas versáteis, que podem carrear tanto fármacos hidrossolúveis como lipossolúveis e podem ser funcionalizados com a inserção de diversos ligantes para que, entre outros, facilitem a permeação, evitem o reconhecimento fagocitário e até mesmo modifiquem os padrões naturais de distribuição dos lipossomas direcionando-os para os locais onde se espera ação farmacológica (GLUKHOVA, 2020; KUMAR *et al*., 2020).

Desde sua descoberta na década de 60 por Alec D. Bangham, os lipossomas têm recebido atenção especial como sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e por permitirem carrear tanto moléculas hidrofílicas

como lipofílicas (BANGHAM *et al*., 1965; SPUCH; NAVARRO, 2011; BOZZUTO; MOLINARI, 2015). Considerado um dos mais seguros e efetivos sistemas de liberação, os lipossomas se apresentam como pequenas vesículas esféricas constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas que se arranjam espontaneamente em meio aquoso. São compostos, basicamente, por i) fosfolipídeos, sendo a fosfatidilcolina a mais utilizada devido à sua estabilidade frente a variações de pH, ii) esteróis como o colesterol e iii) antioxidantes. A camada lipídica hidrofóbica está voltada para o interior da lamela, e a fase polar voltada para o exterior aquoso (NISINI *et al*., 2018; PATIL; JADHAV, 2014; LAI *et al*., 2013).

Os lipossomas são classificados de acordo com seu tamanho e estrutura, podendo variar de 20 nm até 5 µm. Lipossomas unilamelares possuem uma única bicamada lipídica na composição e diferem no tamanho, podendo ser classificados como VUP (vesícula unilamelar pequena) ou mesmo VUG (vesícula unilamelar grande), enquanto lipossomas multilamelares são maiores e constituídos por mais do que uma camada lipídica. Lipossomas multilamelares diferem na disposição das camadas e são classificados como VML (vesículas multilamelares), onde as bicamadas lipídicas estão dispostas de forma concêntrica e VMV (vesículas multivesiculares) que são estruturas constituídas por uma vesícula de tamanho na escala micrométrica contendo em seu interior um número aleatório de vesículas de menor tamanho (KUMAR *et al*., 2020; BOZZUTO; MOLINARI, 2015; AKBARZADEH *et al*., 2013).

Quadro 1 - Classificação dos lipossomas baseado em diâmetro médio e lamelaridade

Classificação do lipossoma	Diâmetro médio	Abreviatura
Vesícula unilamelar pequena	20 – 100 nm	VUP
Vesícula unilamelar grande	> 100 nm	VUG
Vesícula unilamelar gigante	> 1000 nm	VUGI
Vesícula multilamelar	> 500 nm	VML
Vesícula multivesicular	> 1000 nm	VMV

Fonte: Adaptado de VEMURI; RHODES,1995; LAOUINI *et al*., 2012.

Diferentes técnicas são descritas na literatura para a produção de lipossomas. As técnicas consideradas clássicas e reproduzíveis em escala laboratorial são:

i) Hidratação do filme seco de lipídios ou hidratação da fina camada lipídica: Proposto por Alec Bangham e colaboradores na década de 60, os componentes hidrofóbicos como a fosfatidilcolina e o colesterol são dissolvidos em solvente orgânico, solvente o qual é

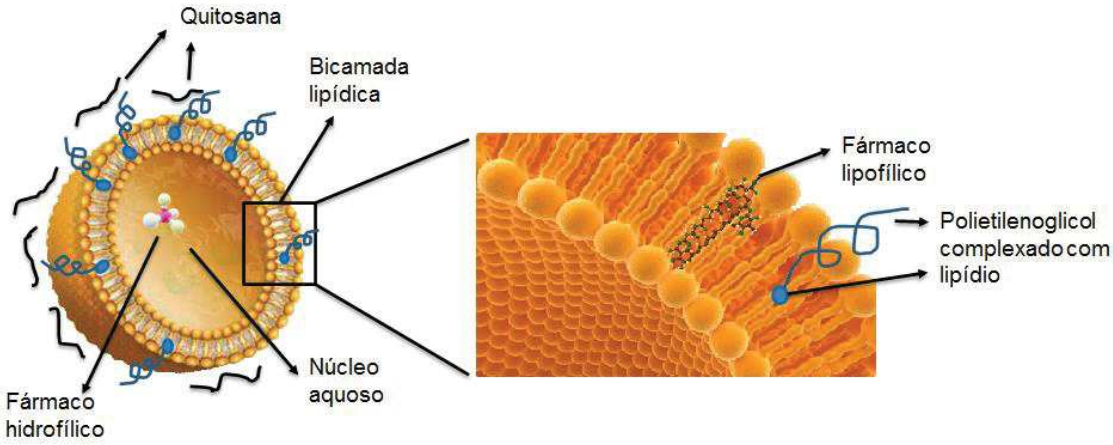
removido por evaporação, formando um filme seco que fica depositado na parede do frasco. Este filme é hidratado com uma solução aquosa através de agitação e temperatura acima da temperatura de transição de fase do lipídio utilizado. Os lipossomas formados são heterogênios a nível de tamanho e número de bicamadas e podem ser reduzidos e homogeneizados através de técnicas como sonicação, extrusão em membanas de policarbonato ou homogenizadores de alta pressão (BANGHAM *et al*., 1965; BOZZUTO; MOLINARI, 2015; AL ASMARI, 2016).

ii) Evaporação em fase reversa: Esta técnica consiste na formação de um filme lipídico inicial através da solubilização e posterior evaporação do solvente, o qual é ressuspendido em solvente orgânico, depois é adicionada a fase aquosa que, homogeneizada através de sonicação, leva à formação de uma emulsão água em óleo. O solvente orgânico é evaporado através da redução da pressão sob fluxo de nitrogênio, formando um gel viscoso e o solvente orgânico remanescente é removido por rotaevaporação à baixa pressão (SZOKA; PAPAHADJOPOULOS, 1978; PATTNI *et al*., 2015; BAOMIAO *et al*., 2017; Li *et al*., 2020).

iii) Técnica de injeção de solvente: Técnica simples, onde os componentes hidrofóbicos são dispersos no solvente orgânico (éter ou etanol) e injetados no meio aquoso, com um controle da temperatura, intensidade da agitação do meio aquoso, assim como controle da taxa e pressão aplicadas na injeção. Esse processo resulta na formação de lipossomas unilamelares pequenos (DEAMER, 1978; STANO *et al*., 2004; JUSTO; MORAES, 2011; NARENDRA *et al*., 2020).

iv) Diálise de detergente: A composição lipídica solubilizada com detergente produz micelas bem definidas, após remoção do detergente através de um processo de diálise controlada, os fosfolipídeos se organizam em vesículas unilamelares homogêneas, na faixa de tamanho de 40-180 nm, com grande capacidade de encapsulamento (ZUMBUEHL; WEDER, 1981; SCHUBERT, 2003).

Figura 2 – Representação gráfica de lipossoma funcionalizado com quitosana e polietilenoglicol



Fonte: Adaptado de https://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas e CiplaMEDVideo em https://www.youtube.com/watch?v=JzP2K60VDmc

2.5.1 Incorporação de polietilenoglicol em lipossomas

De forma a evitar o reconhecimento fagocitário, com consequente eliminação dos lipossomas do sistema circulatório, os lipossomas podem ser revestidos com componentes hidrofílicos, como polietilenoglicois (Figura 2), formando assim lipossomas de longa circulação sistêmica, para que sejam hábeis na liberação do fármaco (NOSOVA *et al*., 2019; BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Este revestimento também fornece uma característica de elasticidade, tornando as vesículas lipossomais flexíveis, capazes de sofrer deformações sem perderem sua estrutura, o que pode permitir a permeação passiva através da via paracelular (CEVC; SCHÄTZLEIN, 2002; DRAGICEVIC-CURIC *et al*., 2010). Existem muitos estudos publicados que reportam a melhora na permeação cutânea promovida pelos lipossomas flexíveis em comparação com os lipossomas convencionais (ALSHRAIM *et al*., 2019; CHEN *et al*., 2016; ALOMRANI *et al*., 2014; EL ZAAFARANY *et al*., 2010).

Os lipossomas flexíveis possuem os mesmos constituintes dos lipossomas convencionais como fosfolipídeos e esteróis, no entanto vão se tornar flexíveis com a adição de um ativador de superfície, que é frequentemente um surfactante de cadeia única (colato de sódio, desoxicolato de sódio, Tween®) ou um álcool molecular pequeno (etanol, propilenoglicol, polietilenoglicol), que possuem um alto raio de curvatura levando ao aumento da fluidez e flexibilidade das bicamadas fosfolipídicas (EL ZAAFARANY *et al*., 2010; PEREZ *et al*., 2015; WEIZE *et al*., 2012).

2.5.2 Revestimento de quitosana em lipossomas

Uma maneira de favorecer a permeação nasal de nanopartículas é a modificação da carga superficial. Corroborando com o tamanho em escala nano, uma carga positiva nas partículas favorece a interação com a membrana celular podendo levar à abertura das junções *tight*, ambiente no qual a carga é negativa. Esta atração entre cargas opostas, associada ao tamanho da nanopartícula, favorece a permeação paracelular do fármaco através da membrana nasal (BONACCORSO *et al*., 2017; SUNDERLAND *et al*., 2006).

Um material utilizado com a finalidade fornecer esta carga positiva desejada é a quitosana (unidades de β-(1–4)-2-acetamido-D-glucose e β-(1–4)-2-amino-D-glucose). Derivado deacetilado da quitina, consiste em um biopolímero natural encontrado no exoesqueleto de crustáceos e nas paredes celulares dos fungos. A quitosana é um polímero catiônico biocompatível e biodegradável que, além de possuir propriedades bioadesivas, que permitem maior permanência no muco nasal, apresenta baixa toxicidade (KUMAR *et al*., 2020; YU *et al*., 2019; SALVA *et al*., 2015; ELSABEE; ABDOU, 2013; KEAN; THANOU, 2010).

A utilização da quitosana como polímero de revestimento (Figura 2) com a finalidade de alteração da carga da superfície de nanopartículas, mucoadesão e promoção da melhora na permeação naso-cerebral tem sido amplamente estudada na formulação de sistemas de liberação de fármacos para tratamento de patologias que acometem o SNC como as neurodegenerativas doenças de Alzheimer e Parkinson (ELNAGGAR *et al*., 2015; HANAFY *et al*., 2016; FAZIL *et al*., 2012; TROTTA *et al*., 2018), caquexia (SALADE *et al*., 2017), tumor cerebral (SUN *et al*., 2012; AGRAWAL *et al*., 2017), entre outros.

Quagliariello *et al*. (2019) trabalharam com lipossomas de ácido butírico revestidos com quitosana no tratamento *in vitro* de carcinoma hepatocelular e observaram a capacidade do revestimento com quitosana na internalização dos lipossomas em células de hepatoblastoma humanas, demonstrando potencial aumento da atividade citotóxica do ácido butírico quando comparado com ele livre ou presente em lipossomas não revestidos com quitosana. Os lipossomas foram produzidos através da técnica da hidratação de filme lipídico em que o filme foi composto de fosfatidilcolina de soja, colesterol e o ácido butírico dissolvidos em clorofórmio, o qual foi evaporado na sequência, e o filme hidratado com ácido cítrico 50 mM. Após homogeneização e redução do tamanho dos lipossomas em sonicador (10 min, 1 mHz), para o mesmo volume de lipossomas, foi adicionado uma solução de quitosana (0,1%) em tampão fosfato salino pH 6,8 e incubado à 4 ºC por 1 h.

Com o objetivo de desenvolver um nano-sistema destinado à administração naso-cerebral de grelina para o tratamento de caquexia, Salade *et al*. (2017) desenvolveram lipossomas revestidos com quitosana contendo grelina, um hormônio peptídico natural, secretado no sangue principalmente pelo estômago e intestino, conhecido como hormônio do crescimento e que estimula a ingestão de alimentos. O método de escolha para a produção dos lipossomas foi também a hidratação de filme lipídico e, para o revestimento das nanovesículas obtidas, a quitosana foi dispersada sob agitação magnética em PBS pH 7,4 durante a noite até obtenção de uma solução final translúcida e homogênea (10 mg/mL). Para 9 mL de lipossomas contendo grelina (10 mg/mL) foi adicionado 1 mL da solução de quitosana, gota a gota sob agitação magnética à 3000 rpm. A dispersão dos lipossomas revestidos foi deixada durante 1 h sob agitação magnética antes de ser mantida durante a noite à 4 °C. Foi observado que a quitosana favoreceu a mucoadesão, levando a um aumento na adsorção de mucina de 22,9% e o aumento da permeação foi comprovado através do estudo *in vitro* de permeação em monocamada epitelial de células $Calu_3$, em que 10,8% de grelina foi recuperada no compartimento basal, quando encapsulada em lipossomas revestidos de quitosana enquanto nada foi recuperado com a grelina isolada.

2.6 Meningite criptocócica

Dentre as patologias que acometem o sistema nervoso central com potencial para a investigação de sistemas de permeação naso-cerebral, está a meningite. Infecção causada por bactérias, fungos, vírus ou parasitas, a meningite leva à inflamação das membranas que cobrem o cérebro e a medula espinhal e ainda hoje apresenta elevados índices de mortalidade (LIU *et al*, 2012; SPADARI *et al*., 2020). Apesar da patologia estar associada à vários patógenos, a meningite criptocócica, causada pelos fungos *Cryptococcus spp.* é uma infecção oportunista e pode ser identificada como uma ameaça à vida (HONDA; WARREN, 2009; RUSCHEL; THAPA, 2020).

O solo contaminado com as sub-espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* provenientes de excrementos de pássaros, são a principal fonte de contaminação humana causando desde infecções de pele, tecidos moles, linfonodos, ossos e articulações até infecção pulmonar e meningite (WARR *et al*, 1968). Os fungos sobrevivem no ambiente sob a forma de esporos, protegidos por uma cápsula de polissacarídeo, o que promove uma capacidade maior de virulência. Os gatos podem atuar como vetores, devido à suscetibilidade à infecção (HENAO-MARTINEZ; VELA-DUARTE, 2018).

A via de entrada respiratória leva à infecção pulmorar, no entanto, *C. neoformans e C. gattii* disseminados, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) causando a meningoencefalite onde os sintomas incluem dor de cabeça, febre, letargia e confusão mental, e os indivíduos mais predispostos são aqueles com sistema imunológico já debilitado provenientes de patologias pré existentes como, por exemplo, SIDA e lupus eritematoso (KIM, 2008; MALHOTRA *et al*, 2017; SPADARI *et al*., 2020).

A BHE oferece uma proteção ao tecido cerebral. Formada por junções celulares estreitas, junções *tight*, separa a circulação periférica do SNC, permitindo a passagem de substâncias provenientes da corrente sanguínea para garantir a manutenção da homeostase, porém bloqueando a entrada de substâncias neurotóxicas (VAN SORGE; DORAN, 2012; MARIANECCI *et al*., 2017). Apesar da existência deste bloqueio, a transposição microbiana pode ocorrer por rotas transcelulares e paracelulares em que, o patógeno sobrevive na corrente sanguínea e atravessa as barreiras hematoencefálica e barreira do líquido cefalorraquidiano atingindo o tecido cerebral (LIU *et al*, 2012; KIM, 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o tratamento da meningite criptocócica em três etapas: i) fase de indução, período de tratamento intensivo de pelo menos duas semanas de duração através de uma rápida atividade antifúngica com objetivo de promover a esterilização do líquido cefalorraquidiano, caso necessário pode levar mais tempo até que se obtenha total esterilidade; ii) fase de consolidação, onde o tratamento é continuado por, pelo menos, mais 8 semanas e (iii) fase de manutenção que varia entre 6 a 12 semanas, até total recuperação (World Health Organization, 2018; SAAG, 2000). Os medicamentos recomendados são uma combinação de anfotericina B deoxicolato, 5-flucitosina (5-FC) e fluconazol (World Health Organization, 2018; RUSCHEL; THAPA, 2020).

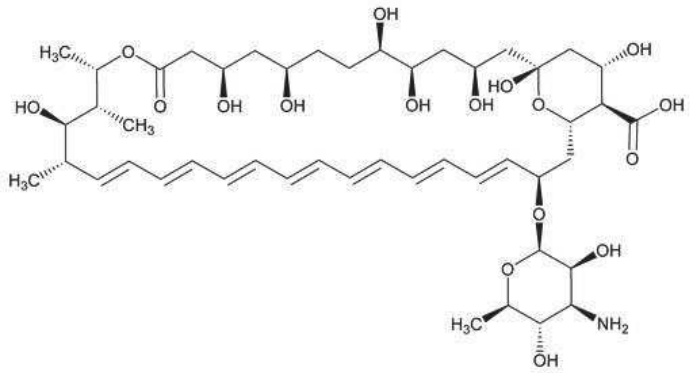
2.7 Anfotericina B

O insumo farmacêutico ativo (IFA) anfotericina B, do inglês *amphotericin B* (AmB), e nomenclatura química (IUPAC) (1R,3S,5R,6R,9R,11R,15S,16R,17R,18S,33R,35S,36R,37S)-33-[(4-amino-3,5-dihydroxy methyloxan-2-yl)oxy]-1,3,5,6,9,11,17,37-octahydroxy-15,16,18-trimethyl-13-oxo-14,3 dioxa bicyclo[33.3.1]nonatriaconta-19,21,23,25,27,29,31-heptaene-36-carboxylic acid, é um antifúngico macrolídeo da classe dos polienos, de amplo espectro, obtido de culturas bacterianas de *Streptomyces nodosus*. Descoberto em 1953 (DUTCHER, 1968), foi

o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) em 1958 (DISMUKES, 2000).

Com fórmula molecular $C_{47}H_{73}NO_{17}$ e massa molecular de 924,08 Da, o fármaco apresenta uma estrutura molecular bastante complexa (Figura 3). É caracterizado como um pó amarelo a alaranjado, inodoro ou quase inodoro e quase insípido, com potência de não menos do que 750 µg de anfotericina B por mg, na base seca. Na produção de AmB também é obtido um pequeno rendimento de anfotericina A (AmA). Como a anfotericina A demonstra menos atividade antifúngica, sua concentração deve estar abaixo de 5%, apesar dos compêndios oficiais permitirem que, em formulações destinadas ao uso na preparação de cremes, loções e pomadas dermatológicas, suspensões e cápsulas orais, possa conter um máximo de 15% de anfotericina A (United States Pharmacopeia, 2019).

Figura 3 – Estrutura molecular da anfotericina B

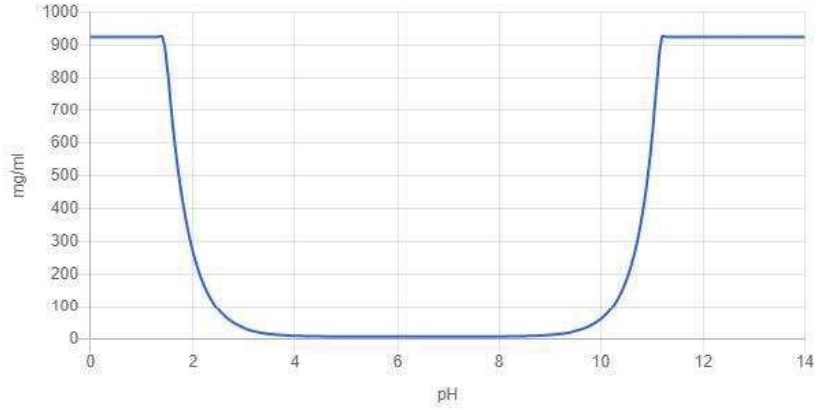


Fonte: Extraído de United States Pharmacopeia, 2019.

A anfotericina B apresenta propriedade anfotérica, devido aos lados apolar e polar do anel da lactona, e anfifílica devido à presença de grupos carboxílicos e amina ionizáveis. O pKa de 3,69 e 9,12, representa os dois grupos ionizáveis na molécula. Apresenta característica hidrofóbica (LogP –2,3), baixa solubilidade na faixa de pH fisiológico (Figura 4) e instabilidade nas condições extremas de pH em que apresenta maior solubilidade (TORRADO *et al*., 2008). O fármaco é solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) e propilenoglicol, levemente solúvel em dimetilformamida, levemente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em álcool (BRITISH Pharmacopoeia, 2020).

Estas características demonstram que o fármaco apresenta baixa solubilidade e baixa permeabilidade, levando a ser classificado como classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (BCS), sistema este descrito por Amidon e colaboradores, 1995.

Figura 4 - Solubilidade da anfotericina B em diferentes valores de pH



Fonte: ChemAxon. Disponível em: www.chemicalize.com. Acesso em 18 nov. 2019.

O mecanismo de ação da AmB é através da interação com o ergosterol, constituinte presente na membrana celular dos fungos, alterando a permeabilidade celular seletiva, com a formação de poros e consequente extravasamento de íons e substâncias vitais. Também ocorrem distúrbios na atividade enzimática das membranas levando à morte celular (ANDREOLI; MONAHAN, 1968; STEVENS, 1994; GOLENSER; DOMB, 2006; SPADARI *et al*., 2020).

Devido à baixa solubilidade aquosa, a AmB apresenta baixa absorção gastrointestinal, sendo assim administrada por via endovenosa. Com tempo de meia-vida de 24 a 48 h, na distribuição o fármaco é extensivamente ligado às proteínas plasmáticas e são encontradas altas concentrações no fígado, baço, pulmões, rim e medula óssea (BARLETT *et al*., 2004; GOLENSER; DOMB, 2006). A depuração é lenta, cerca de 5 dias e somente 5% do fármaco é metabolizado, sendo a maior parte excretada na forma inalterada através da bile e fezes BEKERSKY *et al*., 2002; GOLENSER; DOMB, 2006).

Os efeitos tóxicos atribuídos à AmB são decorrentes da sua capacidade de se ligar ao colesterol, que constitui a membrana celular dos animais. A administração prolongada está relacionada com efeitos colaterais como hipocalemia, hipernatremia, hipomagnesemia, anemia e nefrotoxicidade (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Para contornar a baixa biodisponibilidade e a instabilidade em meio aquoso, a formulação convencional de AmB utiliza uma dispersão coloidal com o surfactante desoxicolato de sódio, disponível comercialmente como o Fungizone® (Bristol Meyers Squibb,

EUA), formando um complexo micelar para aumentar a solubilidade. No entanto, o desoxicolato de sódio apresenta efeito hemolítico, o que torna a formulação nefrotóxica. Esta toxicidade levou à pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens para a administração da AmB. Na década de 1990 começam a ser comercializados formulações lipídicas contendo AmB em que a associação do fármaco com transportadores lipídicos, além de contornar o efeito tóxico do desoxicolato de sódio, também tende a reduzir a interação da AmB com o colesterol presente na membrana celular do hospedeiro (TORRADO *et al*., 2008; VYAS; GUPTA, 2006).

Além da formulação convencional Fungizone®, existem comercialmente disponíveis outros três medicamentos (Quadro 2), que consistem em preparações lipídicas para veicular o fármaco anfotericina B.

Quadro 2 - Medicamentos comerciais contendo anfotericina B

Medicamento/ Empresa	**Composição**	**Estrutura**	**Diâmetro**	**Dose [mg/Kg]**	**Carga superficial**
Fungizone®/Bristol Meyers Squibb, EUA	Desoxicolato-AmB	Dispersão coloidal (micelas)	≈1 µm	0,5 – 1,0	Negativa
Ambisome®/Nexstar Pharmaceuticals, Inc, EUA	HSPC-colesterol-DSPG-AmB (2:1:0,8:0,4)	Lipossomas VUP	< 100 nm	3,0	Negativa
Abelcet®/ The Liposome Co., EUA	DPMC- DMPG – AmB (7:3:3)	Complexo lipídico (forma de fita)	2 – 5 µm	5,0	Negativa
Amphotec® e Amphocil®/Sequus Pharmaceuticals, Inc, EUA	Colesterilsulfato de sódio- AmB (1:1)	Dispersão coloidal (forma de disco)	122:4 nm	3,0 – 4,0	Negativa

[AmB] anfotericina B; [HSPC] fosfatidilcolina hidrogenada de soja; [DSPG] diestearoilfosfatidilglicerol; [DMPC] dimiristoilfosfatidilcolina; [DMPG] dimiristoilfosfatidilglicerol; [VUP] Vesículas unilamelares pequenas.
Fonte: Adaptado de CHAUD *et al*., 2020 e BRAJTBURG; BOLARD,1996

Reduzir a toxicidade assim como melhorar a biodisponibilidade da AmB é importante devido à eficácia antifúngica comprovada do fármaco. Tornar a AmB mais biodisponível no SNC para o tratamento da meningite criptocócica apresenta alta relevância uma vez que a patologia demonstra ainda ser um sério desafio médico (SPADARI *et al*., 2020). Tornar possível a permeação direta do fármaco para o SNC, como nos casos de liberação naso-cerebral,

é uma alternativa para contornar os efeitos colaterais de depósito em órgãos adjacentes assim como manter a AmB exatamente no sítio de ação (CHAUD *et al*., 2020).

A importância do desenvolvimento tecnológico desta pesquisa aplicada reside no desenvolvimento de um sistema inovador com potencial de liberação do fármaco direto no tecido cerebral através da administração intranasal por meio de lipossomas peguilados dotados de carga positiva, capaz de proteger e estabilizar o fármaco, favorecendo assim a veiculação do fármaco antifúngico anfotericina B com propriedades farmacológicas de interesse no tratamento da meningite criptocócica.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Desenvolver um sistema inovador envolvendo lipossomas nanoestruturados peguilados e revestidos com quitosana, que visa o transporte através da via intranasal e liberação cerebral do fármaco anfotericina B promovendo uma melhora na biodisponibilidade diretamente no sistema nervoso central.

3.2 Específicos

- Desenvolver um método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da anfotericina B nos protótipos produzidos, assim como nos ensaios de desempenho *ex vivo* e *in vivo*.
- Validar a metodologia analítica por CLAE para quantificação da anfotericina B.
- Sintetizar, caracterizar e avaliar a estabilidade de lipossomas peguilados com carga superficial positiva incorporados com anfotericina B.
- Avaliar os parâmetros de permeação transepitelial em mucosa nasal de suíno (modelo *ex vivo*).
- Avaliar a biodisponibilidade do novo sistema de liberação desenvolvido através de estudos pré-clínicos em ratos Wistar.

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e consumíveis

Anfotericina B (Pureza 96,4%) foi adquirida da Synbiotics Limited. O Lipoid S 100® (fosfatidilcolina de soja, ≥ 94%), Lipoid PE® (polietilenoglicol complexado com fosfatidilcolina de soja na proporção 18:0/18:0-PEG 2000) e colesterol foram gentilmente doados pela Lipid Ingredients & Technologies. Os solventes orgânicos metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano (THF) grau HPLC foram adquiridos da Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). O ácido acético glacial, cloreto de sódio, cloreto de potássio, carbonato de cálcio diidratado, propilenoglicol e acetato de etila foram adquiridos da Labsynth (Diadema/SP, Brasil). O tensoativo não-iônico Triton X-100® (iso-octylphenoxy polyethoxy etanol) e a quitosana (baixa massa molecular, deacetilação de 76%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, E.U.A.). A água foi ultrapurificada num sistema Direct-Q® 3 UV da Millisul (Porto Alegre, Brasil) até uma condutividade final de 18.2 $M\Omega.cm^{-1}$.

4.1.2 Material biológico

Os ratos Wistar machos, com peso aproximado de 270 g, foram adquiridos do laboratório Anilab – Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda (Paulínia/SP, Brasil). As cabeças de porco para extração da membrana nasal foram cedidas pelo frigorífico Angelelli Ltda (Piracicaba/SP, Brasil) e o crânio foi gentilmente cortado para facilitar a remoção das membranas nasais pelo açougue da Lua (Piracicaba/SP, Brasil).

4.1.3 Equipamentos analíticos e outros

Para o preparo e avaliação dos lipossomas foram utilizados balança analítica Tecnal (Piracicaba/SP, Brasil) e balança micro-analítica (Shimadzu, Tóquio, Japão), rota-evaporador TE-211 acoplado ao banho termostatizado TE-2005 e bomba à vácuo TE-058 da Tecnal (Piracicaba/SP, Brasil), incubadora com agitação orbital TE-4200 e banho-maria TE-0541 da Tecnal (Piracicaba/SP, Brasil), homogeneizador por pressão Homolab 2.20 da FBF (Parma, Itália), extrusora manual Avanti® Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, EUA), centrífuga Combate Celm da UP Brasil (Cedral/SP, Brasil), banho de ultrassom da Unique

(Indaiatuba/SP, Brasil), agitador magnético em série da Cienlab (Campinas/SP, Brasil), pH-metro da Tecnal (Piracicaba/SP, Brasil) com eletrodo de pH (modelo SC09, Sensoglass, São Paulo, Brasil), vortex da FISATOM (modelo 774, São Paulo, Brasil), microscópio óptico YS2-H da Nikon (China), pipetador HandyStep (Brand, Alemanha). Para quantificação foi utilizado cromatógrafo à líquido de alta eficiência (Shimadzu, Tóquio, Japão) contendo bomba binária (LC-10AD VP), detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M10A VP), amostrador automático (SIL-10AD VP), forno de coluna (CTO-10A VP), módulo de comunicação (CBM-20A) e o *software* usado para a coleta de dados foi o LC Solution. Nas determinações analíticas de potencial zeta, tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão, foi utilizado um sistema DLSZetaPALS Plus (modelo NanoBrook 90PlusPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville NY, E.U.A.). Todo planejamento experimental foi calculado pelo *software* Design-Expert® 7.0.0 (Stat–Ease Inc., Minneapolis) e os dados de linearidade da validação analítica foram calculados pelo *software* Action Stat® (Equipe Estatcamp, São Carlos/SP, Brasil).

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 Desenvolvimento analítico

A farmacopeia dos Estados Unidos, compêndio reconhecido como oficial no Brasil, descreve a quantificação da anfotericina B em produtos farmacêuticos através da determinação da atividade (potência) antibiótica demonstrada pelo seu efeito inibitório sobre os microrganismos. O ensaio de placa de cilindro é o método de escolha, o qual se baseia na difusão do antibiótico de um cilindro vertical através de uma camada de ágar solidificado em uma placa de Petri. O crescimento dos microrganismos específicos inoculados no ágar é impedido em uma área ou zona circular ao redor do cilindro que contém a solução do antibiótico. Este halo formado é medido e a sua extensão determina o tamanho da atividade antimicrobiana (United States Pharmacopeia, 2019).

Existem algumas publicações científicas que descrevem a quantificação da anfotericina B através de métodos cromatográficos, utilizando cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE) e detecção através da absorção de luz UV-Vis (KUMAR, 2014; CHANG, 2011; ESPADA, 2008). Métodos de quantificação de fármacos por CLAE são precisos e levam a resultados mais rápidos e, diante da necessidade de otimização na realização dos ensaios de quantificação, foi realizado um desenvolvimento analítico, baseado nas metodologias dos autores que descrevem a quantificação de anfotericina B através de CLAE.

O método analítico descrito por CHANG *et al*. (2011) foi reproduzido de forma a auxiliar na identificação dos picos de anfotericina B e anfotericina A. Resumidamente, foi utilizada uma coluna com preenchimento C18, fase móvel contendo a proporção de 55 % de fase orgânica (41/18/10; metanol/acetonitrila/THF) e 45% de fase aquosa (EDTA.2Na 2,5 $mmol.L^{-1}$) com fluxo de 1,0 $mL.min^{-1}$, temperatura de forno de 30 °C, volume de injeção de 30 μL e detecção em 383 nm e 303 nm. O uso de agentes quelantes como o EDTA.2Na na fase móvel é importante para colunas cromatográficas mais antigas, que continham alta quantidade de metais. Para as colunas mais recentes, estes metais já são bastante reduzidos. Neste estudo o componente polar da fase móvel foi composto por água.

4.2.2 Planejamento experimental no desenvolvimento analítico

Com o objetivo de otimizar o tempo total da corrida analítica com manutenção da resolução adequada entre os picos, os modificadores orgânicos da fase móvel foram avaliados quanto às proporções de acordo com um planejamento de experimentos (DoE, *design of experiments*) do tipo planejamento de misturas *Simplex Centroide*.

Para a realização do planejamento de misturas *Simplex Centroide* (Tabela 1) foram realizadas 11 corridas cromatográficas, de sequência aleatória, contendo um ponto em duplicata, com a variação da proporção de acetonitrila, metanol e uma mistura de THF com acetonitrila (1:1, v/v). Nesta etapa exploratória a fase aquosa, composta por água ultrapura, foi mantida na proporção de 50% do volume total. Os dados obtidos foram avaliados quanto à resolução entre os picos de anfotericina A e anfotericina B e tempo de retenção da anfotericina B.

As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico Shimadzu composto por bomba binária, sistema de detecção UV-Vis (DAD) à 383 nm e injetor automático com volume de injeção programado para 10 μL de uma solução de anfotericina B na concentração de 0,01 $mg.mL^{-1}$. Foi utilizada coluna cromatográfica Zorbax ODS (C18) de 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno com 5 μm de tamanho de partícula, fase móvel com modo de eluição isocrática e com fluxo mantido em 1,0 mL por min.

Tabela 1 - Planejamento de misturas *Simplex Centroide*

Ordem aleatória do ensaio	Fase orgânica[1]		
	Acetonitrila	Metanol	THF:Acetonitrila (1:1, v/v)
	(%)	(%)	(%)
1	66,7	16,7	16,7
2	0,0	100,0	0,0
3	0,0	50,0	50,0
4	0,0	0,0	100,0
5	50,0	0,0	50,0
6	16,7	16,7	66,7
7	50,0	50,0	0,0
8	33,3	33,3	33,3
9	100,0	0,0	0,0
10	16,7	66,7	16,7
11	100,0	0,0	0,0

[1]Corresponde à 50% da fase móvel total.

Fonte: elaboração própria.

A composição da fase orgânica da fase móvel que demonstrou melhor resolução entre os picos de anfotericina A e anfotericina B associado a um tempo de retenção alinhado com o objetivo de otimização da corrida cromatográfica, foi estudado frente à diferentes valores de fluxo de fase móvel, temperatura do forno de coluna e proporção de fase orgânica com a finalidade de obter valores adequados de assimetria e pureza de pico. Para tanto foi desenhado um novo de grupo de experimentos, através de um planejamento fatorial completo 2^3, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central para avaliação da melhor condição cromatográfica

Fatores independentes	Níveis		
	Nível inferior	Nível central	Nível superior
	(-1)	(0)	(+1)
Fluxo de fase móvel (mL/min)	0,8	1,0	1,2
Temperatura do forno (ºC)	25	30	35
Proporção da fase orgânica	48	50	52

Fonte: elaboração própria.

4.2.3 Validação analítica por CLAE para quantificação da AmB

A validação da metodologia analítica por cromatografia à líquido de alta eficiência foi realizada de acordo com a Resolução RDC 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017). A metodologia analítica foi validada para especificidade, precisão, limite de detecção, exatidão e linearidade. Todas as variáveis foram analisadas estatisticamente de forma que se possa concluir com exatidão os respectivos resultados.

4.2.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi verificada através da comparação de cromatogramas obtidos com a solução padrão, amostra, placebo e amostras provenientes de degradação forçada, sendo este último um estudo para a geração proposital de produtos de degradação através da exposição do fármaco à condições de estresse como luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação, de forma a fornecer informações sobre possíveis rotas de degradação e demonstrar se o método de teor é seletivo na quantificação do fármaco. A seletividade do método foi comprovada a partir da pureza do pico do ativo (>0,990) e através da resolução do pico do ativo com o pico mais próximo (R >1,5), considerando, além da matriz, os picos oriundos da degradação forçada.

4.2.3.2 Linearidade

Para determinação da linearidade foram utilizadas soluções com 7 concentrações diferentes da AmB, abrangendo o intervalo de 0,5 a 7,0 $\mu g.mL^{-1}$ (10% a 120%) que foram preparadas em triplicata, de maneira independente, a partir de 3 soluções estoque de AmB obtidas com a diluição de 5 mg de AmB (potência: 96,4%) em 100 mL do diluente metanol acidificado com 1% de ácido acético. A menor concentração do intervalo corresponde ao limite de quantificação e os cálculos foram obtidos a partir da concentração real das soluções.

4.2.3.3 Limite de detecção

Para demonstração do limite de detecção do método, a solução estoque de AmB, preparada anteriormente para avaliação da lineraridade, foi diluída, sucessivamente, e analisada até que fosse conseguido o menor pico visível capaz de ser diferenciado do ruído da linha de base, apresentando sinal-ruído superior ou igual a 3:1.

4.2.3.4 Precisão

A precisão foi determinada através da avaliação da repetibilidade com o preparo de 6 soluções amostra à 100% da concentração do teste, preparadas de forma individual e independente. Para o preparo das amostras foram diluídos 50 µL dos lipossomas peguilados de anfotericina B revestidos com quitosana em 10 mL do diluente metanol acidificado (ácido acético 1%, v/v), dissolvidos com auxílio de ultrassom por 10 min, filtrados em filtro de seringa com membrana PVDF 0,45 µm e analisados.

4.2.3.5 Exatidão

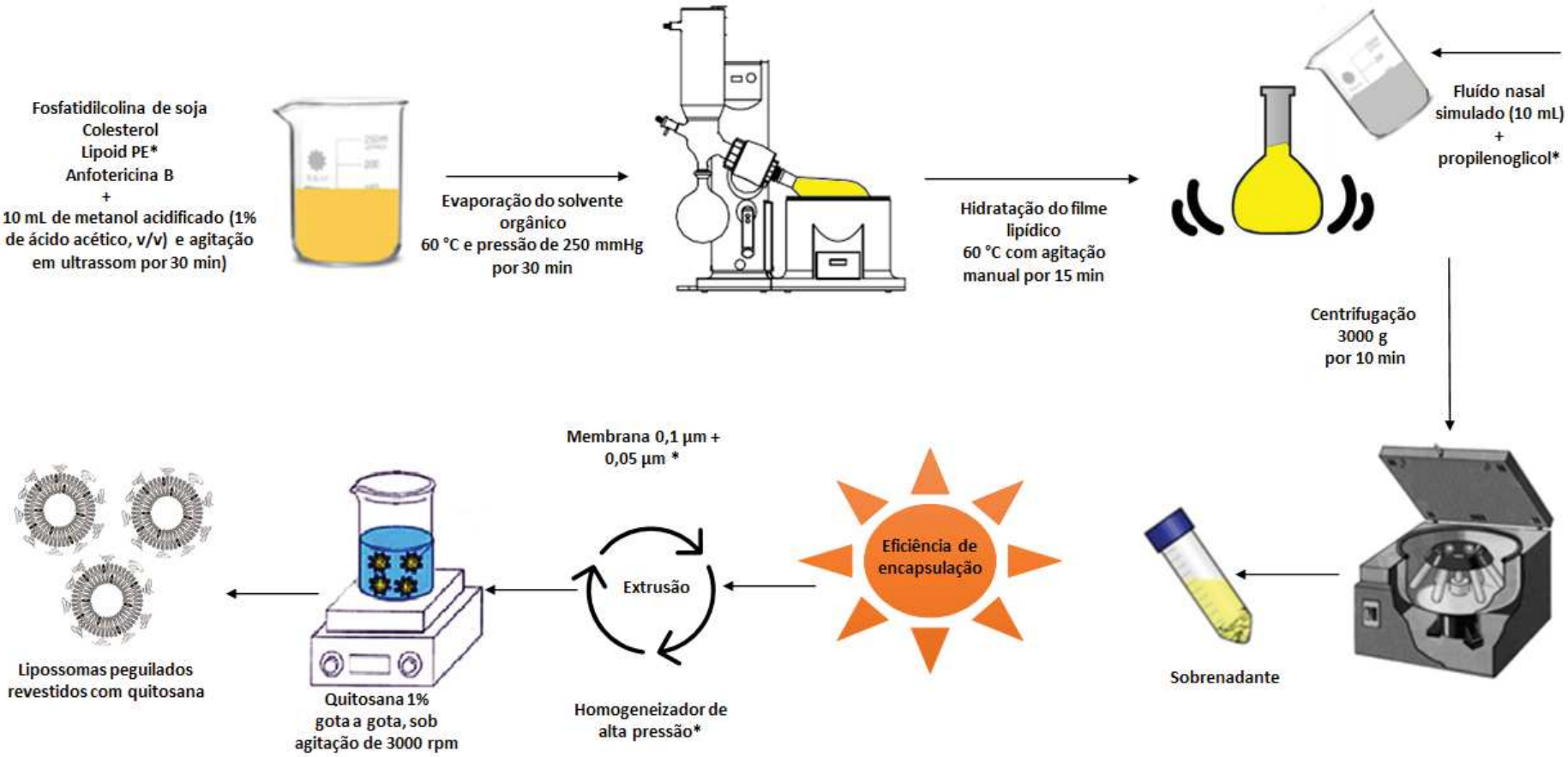
A exatidão foi avaliada pela adição de quantidades conhecidas de AmB, previamente dissolvida em metanol acidificado (ácido acético 1%, v/v) ao placebo de lipossomas peguilados revestidos com quitosana. Foram preparadas 9 soluções individuais, contemplando o intervalo linear do método analítico proposto, sendo 3 amostras no menor nível do intervalo linear (0,5 µg/mL), 3 amostras contemplando o nível 100% (5,0 µg/mL) e 3 amostras no maior nível do intervalo linear (7,0 µg/mL). O menor nível do intervalo linear corresponde ao limite de quantificação do método analítico.

4.2.4 Síntese das vesículas lipossomais

O procedimento para obtenção dos lipossomas peguilados revestidos com quitosana contendo AmB seguiu o protocolo descrito na figura 5. Para cada experimento projetado, 10 mL do solvente orgânico metanol acidificado (ácido acético 1%, v/v) foi adicionado para promover a solubilização dos componentes lipídicos e do fármaco, com auxílio de banho de ultrassom por 30 min, mantido à temperatura ambiente. Esta solução foi transferida para um balão de fundo redondo e, com auxílio de um rota-evaporador, foi realizada a evaporação da fase orgânica à uma temperatura de 60 ºC, com pressão regulada para 250 mmHg por 30 min até assegurar a remoção total dos solventes orgânicos e ácido acético.

O filme lipídico aderido à superfície interna do balão foi hidratado à 60 °C, que corresponde a uma temperatura acima da temperatura de transição de fase, ou temperatura crítica (Tc), da fosfatidilcolina de soja (55 ºC) (DA RÓZ *et al*., 2015), com agitação manual por 15 min, utilizando cerca de 10 mL de FNS (pH 5,0 – 6,5).

Figura 5 – Representação gráfica do protocolo para obtenção dos lipossomas peguilados revestidos com quitosana contendo AmB



*Dependente do processo.

Fonte: elaboração própria.

4.2.4.1 Planejamento experimental para síntese das vesículas lipossomais

Foi desenhado um planejamento fatorial completo 2^4, de carácter exploratório (Tabela 3) para testar várias concentrações dos componentes da formulação, de forma a avaliar a maior eficiência de encapsulação da AmB, indicativo do rendimento do processo. Como componentes lipídicos foram utilizados colesterol e Lipoid S100® (fosfatidilcolina de soja) e, nesta fase, foi incorporado o modificador de superfície Lipoid PE® (polietilenoglicol complexado com fosfatidilcolina de soja na proporção 18:0/18:0-PEG 2000), assim como o fármaco anfotericina B. Como fase aquosa foi utilizado o fluído nasal simulado (FNS) que apresenta pH entre 5,0 e 6,5 para evitar a irritação da mucosa nasal, composto por 7,45 mg/mL de cloreto de sódio; 1,29 mg/mL de cloreto de potássio; 0,32 mg/mL de carbonato de cálcio di-hidratado dissolvidos em água ultrapura (MELON, 1968 apud CALLENS *et al*, 2003). As formulações foram fabricadas de acordo com o protocolo sumarizado na figura 5.

Tabela 3 - Planejamento fatorial exploratório, com os valores dos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1) para cada fator avaliado

Fatores independentes	**Níveis**		
	Nível inferior	**Nível central**	**Nível superior**
	(-1)	**(0)**	**(+1)**
Lipoid S100® (mg)	100	150	200
Colesterol (mg)	5	10	15
Lipoid PE® (mg)	5	10	15
Anfotericina B (mg)	5	10	15

Fonte: elaboração própria.

Para a composição mais promissora obtida neste conjunto de experimentos, foi realizado um novo planejamento fatorial (Tabela 4), agora com as concentrações ajustadas para o melhor cenário em termos de eficiência de encapsulação. Nesta etapa também foi avaliado o modificador de superfície propilenoglicol, além do Lipoid PE® (polietilenoglicol), em que ambos têm a finalidade, nesta pesquisa, de promover flexibilidade à superfície dos lipossomas.

Com base na avaliação do conjunto de experimentos anterior, foram mantidas como variáveis fixas neste novo planejamento as quantidades de anfotericina B (13 mg), assim como do ativador de superfície Lipoid PE® (10 mg).

Para a realização dos experimentos foi adotado o mesmo procedimento de preparo descrito para a etapa anterior (Figura 5), com exceção da adição do propilenoglicol, o qual foi misturado à fase aquosa (FNS) na proporção fixa de 10% (p/p).

Tabela 4 - Planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central para avaliação da melhor eficiência de encapsulação

Fatores independentes	**Níveis**		
	Nível inferior	**Nível central**	**Nível superior**
	(-1)	**(0)**	**(+1)**
Lipoid S100® (mg)	200	225	250
Colesterol (mg)	10	15	20
Modificador de superfície	Lipoid PE® (10mg)	-	Propilenoglicol (10%)

Fonte: elaboração própria.

4.2.4.2 Redução do tamanho dos lipossomas

Foram avaliadas duas possibilidades de redução e homogeneização do tamanho das vesículas lipossomais. Uma das técnicas foi a passagem dos lipossomas por um ciclo no homogeneizador de laboratório de alta pressão (Homolab 2.20, FBF do Brasil) com pressão de 100 bar em primeiro estágio e 1000 bar em segundo estágio, onde as nanoestruturas são formadas a partir da alta tensão de cisalhamento que leva à ruptura das gotículas micrométricas. A outra técnica foi a extrusão manual do material no Avanti® Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, EUA), realizada a uma temperatura acima da Tc da fosfatidilcolina (55 °C), onde a suspensão de lipossomas foi forçada manualmente através de um filtro de policarbonato de 0,1 µm e, em seguida, através de um filtro de policarbonato de 0,05 µm.

4.2.4.3 Revestimento com quitosana

Os lipossomas revestidos com quitosana foram preparados com uma solução de quitosana 1,0% (Sigma Aldrich, baixa massa molecular, 76% de acetilação). Para o preparo da solução com 1,0% de quitosana, foi pesado 1,0 g de quitosana, que foi dispersa em 100 mL de solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) e mantida em agitação com barra magnética até obtenção de uma solução final translucente e homogênea. Esta solução foi filtrada em membrana hidrofílica de 0,45 µm de porosidade. Então 9 mL da suspensão contendo os

lipossomas peguilados de AmB foram revestidos com 1 mL da solução de quitosana 1,0%, os quais foram adicionados gota a gota, sob agitação constante de 3000 rpm, para obter uma diluição 10 vezes maior que a solução inicial de quitosana, que levou à lipossomas com 0,1% de quitosana. Foi preparada uma suspensão placebo, contendo todos os componentes, exceto a AmB. A suspensão de lipossomas peguilados de AmB revestidos com quitosana e o placebo foram deixados por 1 h sob agitação constante em mesa agitadora com barra magnética à 3000 rpm e depois armazenadas à 8 ºC até a utilização.

4.2.5 Caracterização das propriedades físico-químicas dos lipossomas

4.2.5.1 Avaliação do tamanho, potencial zeta e índice de polidispersidade

O tamanho hidrodinâmico (HS), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ZP) dos lipossomas contendo anfotericina B foi avaliado em triplicata à 25 ºC, com diluição de 30 µL da amostra em 30 mL de água ultrapura e com 1 min de tempo de equilíbrio. As avaliações foram feitas usando espalhamento dinâmico de luz (EDL) e mobilidade eletroforética (Nano Brook 90 Plus Particle Size Analyzer). A medida de tamanho foi realizada com cubeta semimicro disponível em poliestireno (Brand GmbH, Wertheim, Germany) e os resultados expressos em termos de média ± DP.

4.2.5.2 Determinação da eficiência de encapsulamento

Para determinar a taxa de carregamento do fármaco nos lipossomas, a suspensão lipossomal foi centrifugada à 3000 rpm (Força g = 1609,92 g) durante 10 min à 25 ºC para precipitação da anfotericina B não incorporada, a qual permaneceu insolubilizada no meio aquoso externo.

Foi construída uma curva de calibração a partir de uma solução estoque de anfotericina B (0,050 $mg.mL^{-1}$) com 7 pontos de concentração que foram de 0,5 até 7,0 $\mu g.mL^{-1}$ diluídas em uma solução de metanol acidificado (ácido acético 1%, v/v). Para o preparo das amostras, foram diluídos 50 µL do sobrenadante contendo os lipossomas de AmB em 10 mL do mesmo diluente, que foram solubilizados com o auxílio de banho ultrassom por 10 min à temperatura ambiente. A quantidade de fármaco incorporado na suspensão de lipossoma foi determinada por CLAE.

A eficiência de encapsulação (EE) da anfotericina B foi determinada indiretamente pela quantidade do fármaco total, adicionado na formulação, pelo fármaco encapsulado, determinado pela quantificação por CLAE, usando a equação:

$$EE(\%) = \frac{(Fármaco - total) - (Fármaco - encapsulado)}{Fármaco - total} \; x \; 100$$

4.2.5.3 Estudos de estabilidade do sistema lipossomal contendo o fármaco

A estabilidade dos lipossomas peguilados de AmB revestidos com quitosana mantidos sob refrigeração (8 °C) foi investigada. Em intervalos de tempo pré-selecionados, as amostras foram analisadas quanto à manutenção do tamanho hidrodinâmico (HS), potencial zeta (ZP) e índice de polidispersão (PDI), assim como quanto à concentração do fármaco anfotericina B.

4.2.6 Avaliação da permeação *ex vivo*

Este ensaio foi realizado após protocolo aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Uniso, CEUA UNISO 91-2016.

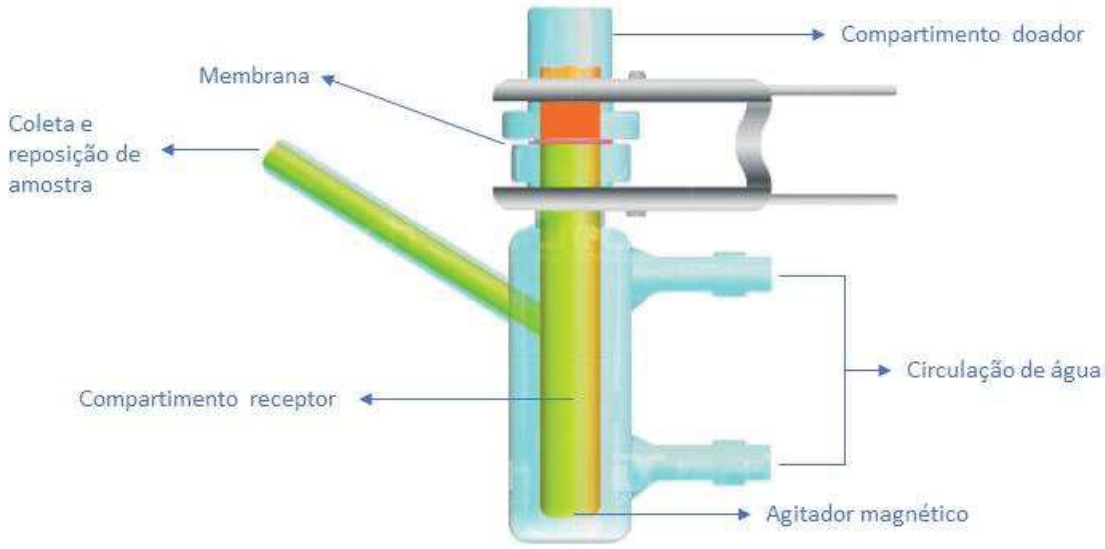
4.2.6.1 Estudo de solubilidade

A solubilidade do IFA no meio receptor escolhido deve ser considerada para promover condições de não saturação (condição *SINK*). A anfotericina B é insolúvel em meio aquoso, sendo assim, foi realizada a avaliação quantitativa da solubilidade do fármaco em diferentes candidatos à meio receptor, com a utilização do fluído nasal simulado (FNS, pH 5,0 – 6,5) acrescido de aditivos como dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e o tensoativo Triton X-100® para favorecer a solubilização. As soluções foram preparadas utilizando cerca de 3,0 mg de anfotericina B em 100 mL de cada meio receptor (0,03 mg/mL) e foram incubadas sob agitação constante em incubadora com agitação orbital à 37 °C e 150 rpm. Foram retiradas alíquotas das soluções antes da incubação para indicar a concentração no tempo zero de experimento e após 1, 3, 4 e 5 h de agitação com a finalidade de encontrar o momento em que foi atingido o equilíbrio da solubilidade. As amostras foram filtradas, imediatamente após cada coleta, em membrana de PVDF com 0,45 µm de porosidade de forma a interromper a solubilização e quantificadas por CLAE, através do método otimizado de quantificação de AmB desenvolvido neste trabalho de pesquisa.

4.2.6.2 Ensaio de permeação *ex vivo* utilizando célula de difusão de Franz

O estudo de permeação *ex vivo* foi baseado nos ensaios realizados por Madane e Mahajan (2016) em um sistema de célula de difusão de Franz. De acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos (United States Pharmacopeia, 2019), a célula de difusão de Franz (Figura 6) é um aparato adequado e reprodutível para medir a liberação de fármacos a partir de formulações semissólidas. Uma camada do produto semissólido em avaliação é colocada sobre uma membrana em contato com o meio presente no compartimento reservatório o qual age como receptor para quando o fármaco difunde da formulação e permeia através da membrana. As amostras são coletadas por um período que vai normalmente de 4h a 6h para quantificação do fármaco liberado e o volume retirado é reposto para evitar formação de espaço vazio, que impediria o contato constante do meio receptor com a membrana.

Figura 6 - Esquema ilustrativo da célula de difusão de Franz.



Fonte: Adaptado de https://www.dctech.com.br/category/testes-farmaceuticos/permeacao-cutanea

Os ensaios foram realizados em duplicata, com três diferentes composições de meios receptores, utilizando membrana nasal suína como barreira na célula de difusão de Franz. O compartimento receptor foi preenchido com 17 mL de fluido nasal simulado (FNS, pH 5,0 – 6,5) contendo 2% ou 5% do tensoativo Triton X-100® ou contendo 20% de metanol, para assegurar condições de não saturação. O sistema foi estabilizado à 37 ºC, sob constante agitação de 3000 rpm, por 15 min. As mucosas nasais suínas (membranas de animais do abatedouro

Frigorífico Angelelli, Piracicaba- SP) foram colocadas nas câmaras de difusão com o lado apical voltado para a câmara doadora e o lado basolateral voltado para a câmara receptora, resultando num fluxo de permeação do lado apical para o basolateral. A área da membrana disponível para permeação foi de 1,5 cm^2. As formulações (200 µL) foram adicionadas no compartimento doador.

Foram desafiados quanto à permeação os lipossomas peguilados contendo AmB com revestimento de quitosana (LipPeAmB-CH) e sem revestimento (LipPeAmB). Ademais, foram realizados os ensaios em cada meio receptor na ausência de amostra (branco) de forma a verificar qualquer interferência analítica na quantificação.

Amostragens de 1,0 mL foram retiradas do compartimento receptor em intervalos de tempo pré-estabelecidos, durante 24 h. O volume do meio receptor foi mantido constante pela adição de 1,0 mL de meio receptor novo após cada amostragem. A quantificação do fármaco foi realizada por CLAE através de metodologia previamente validada.

A quantidade de amostra utilizada nos ensaios (200 µL) representam cerca de 220 µg de AmB que, diluídas em 17 mL de meio contido no compartimento receptor da célula de difusão de Franz, leva a uma concentração de 12,9 µg/mL na totalidade permeada.

A membrana modelo utilizada foi a mucosa nasal suína obtida de animais de abatedouro. Para retirada da mucosa, foi seguido o procedimento descrito por ÖSTH *et al*. (2002). Resumidamente, as cavidades nasais foram separadas através de uma incisão ao longo do septo nasal. A mucosa foi removida com auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica curva, mantida em solução de cloreto de sódio 0,9% (m/v) e congelada. No dia do experimento, as mucosas foram descongeladas e mergulhadas em solução salina. A formulação selecionada foi comparada com a presença e ausência do revestimento de quitosana. A concentração inicial do fármaco em ambas as amostras foi de aproximadamente 1,1 $mg.mL^{-1}$. A quantificação do fármaco no meio receptor foi realizada por CLAE, através do método otimizado de quantificação de AmB desenvolvido neste trabalho, com base em uma curva de calibração de anfotericina B na faixa de concentração de 0,05 a 6,0 $\mu g.mL^{-1}$ diluída em cada diferente meio receptor.

4.2.7 Avaliação da biodisponibilidade em ratos

O ensaio foi realizado após protocolo aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Uniso, CEUA UNISO 91-2016.

4.2.7.1 Estudo em ratos Wistar

O protocolo seguido foi baseado nos experimentos realizados por Madane e Mahajan (2016). Ratos Wistar machos com aproximadamente 270 g foram divididos em 4 grupos com 2 animais, onde cada grupo foi sacrificado em diferentes períodos de exposição. Após anestesiados (pentobarbital 40 $mg.Kg^{-1}$), foi administrado 100 µL da suspensão de lipossomas peguilados de AmB revestidos com quitosana contendo o equivalente à aproximadamente 110 µg de anfotericina B, divididos em 25 µL em cada narina, com duas administrações dentro do intervalo de 10 min. A suspensão de lipossomas foi instilada, com auxílio de micropipeta acoplada a um tubo de 0,1 mm de diâmetro, dentro da cavidade nasal de cada animal. Os animais foram mantidos em posição de supino durante a administração. Os ratos foram humanamente sacrificados em diferentes intervalos de tempo, o crânio foi aberto e o material cerebral foi cuidadosamente retirado. O cérebro foi imediatamente lavado com solução salina estéril e, com auxílio de filtros de papel, o excesso de sangue foi retirado.

4.2.7.2 Extração das amostras

O protocolo para extração do fármaco anfotericina B do material biológico foi baseado no experimento de Wang *et al* (2012), com modificações. O material cerebral inteiro foi triturado e homogeneizado com 5 mL de água ultrapura, com auxílio de bagueta de vidro em tubo de centrífuga e agitado em vortex por 1 min. Foi adicionado 5 mL de acetato de etila ao homogenato cerebral e a mistura foi agitada intensamente, manualmente e em vortex por 5 min, seguido de centrifugação à 4000 rpm (Força g = 2862,08 g) por 10 min. Cada amostra passou pelo processo de extração por duas vezes e, em cada etapa, o sobrenadante orgânico foi transferido para um erlenmeyer. O acetato de etila recolhido foi evaporado à 40 ºC sob corrente de ar, o resíduo foi reconstituído com 2,0 mL de metanol acidificado com auxílio de ultrassom por 5 min, filtrado em filtro de seringa de PVDF com 0,45 µm de porosidade e analisado por CLAE.

4.2.7.3 Condições cromatográficas

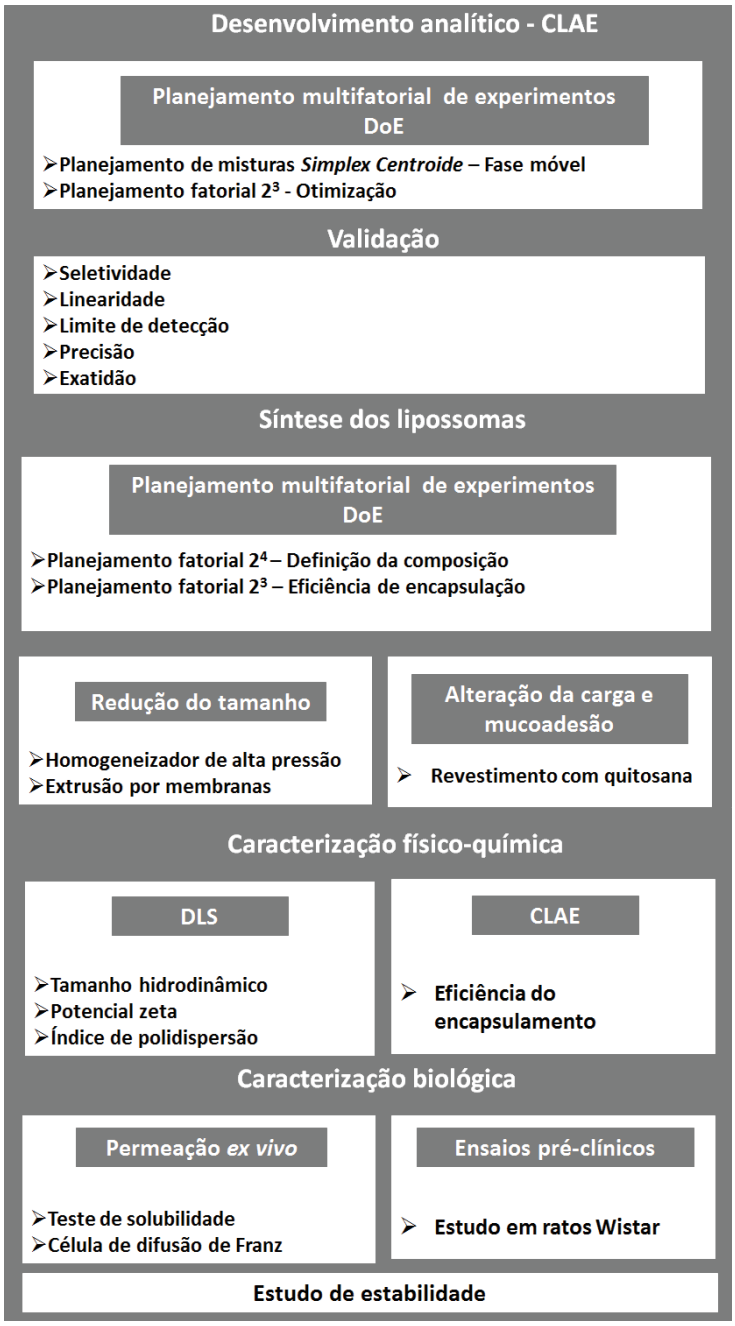
A quantificação da anfotericina B no homogenato cerebral foi realizada através do método cromatográfico desenvolvido neste trabalho de pesquisa. As amostras foram

quantificadas com base em uma curva de calibração de anfotericina B na faixa de concentração de 0,5 a 6,2 $\mu g.mL^{-1}$ diluída em metanol acidificado.

5 RESULTADOS

Neste trabalho de pesquisa (Figura 7) foi explorada a hipótese de que lipossomas peguilados revestidos com quitosana contendo o antifúngico anfotericina B possa ser administrado na cavidade nasal e transportado através da barreira hematoencefálica direto para o tecido cerebral, sendo assim, potencialmente útil para o tratamento de doenças infecciosas que acometem o cérebro como a meningite criptocóccica.

Figura 7 - Diagrama das etapas envolvidas no trabalho de pesquisa



Fonte: elaboração própria.

5.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação da anfotericina B

5.1.1 Resultados do planejamento experimental no desenvolvimento analítico

A Tabela 5 demonstra as análises realizadas e os resultados obtidos para resolução entre os picos de AmA, que corresponde ao principal produto de degradação e AmB, assim como o tempo de retenção obtido para o pico do fármaco AmB.

Tabela 5 - Descrição das 11 corridas cromatográficas executadas e resultados obtidos em termos de resolução e tempo de retenção

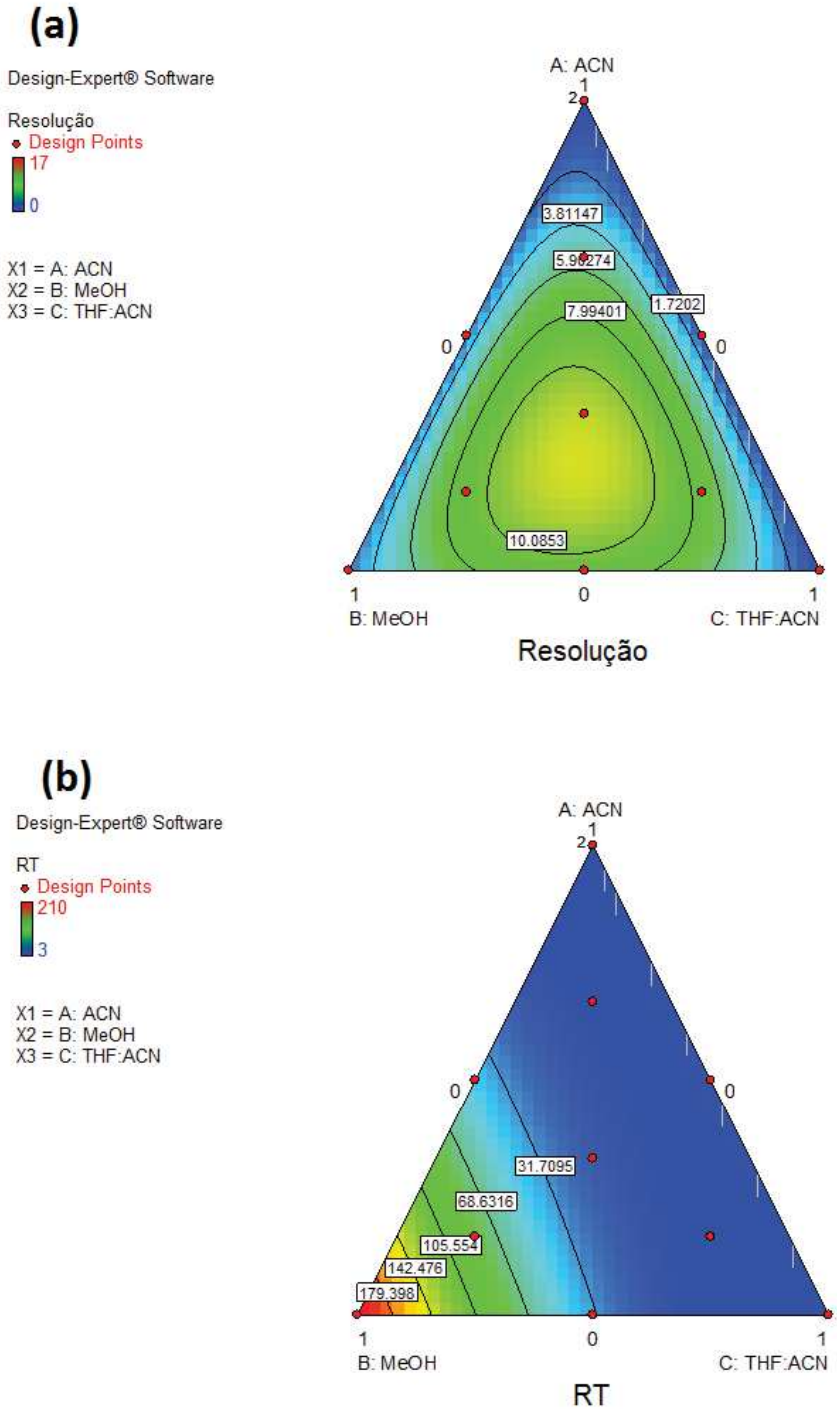
Codificação do experimento	Fatores independentes			Resultado	
	Acetonitrila (%)	Metanol (%)	THF:Acetonitrila (%)	Resolução	Tempo de retenção (min)
1	66,7	16,7	16,7	6,9	7,6
2	0,0	100,0	0,0	0,0	210,0
3	0,0	50,0	50,0	8,5	17,1
4	0,0	0,0	100,0	1,4	3,6
5	50,0	0,0	50,0	1,6	3,5
6	16,7	16,7	66,7	2,8	5,0
7	50,0	50,0	0,0	0,0	27,0
8	33,3	33,3	33,3	8,9	13,0
9	100,0	0,0	0,0	0,0	3,0
10	16,7	66,7	16,7	17,0	115,1
11	100,0	0,0	0,0	0,0	3,0

* A codificação dos experimentos corresponde à ordem aleatória de realização dos testes.

Fonte: elaboração própria.

O desenvolvimento ou otimização de um método por CLAE envolve vários fatores para a realização da separação cromatográfica, como tipo e composição da fase móvel, fluxo e coluna e este processo pode ser demorado, quando os experimentos são baseados na metodologia de tentativa e erro, com a variação de um fator por vez (OFAT, *one factor at time*), ou seja, univariado (BARMPALEXIS, 2009). O planejamento fatorial, onde a interação de vários fatores é estudada de forma multivariada, torna este processo de desenvolvimento sistemático e um tanto mais racional, na busca das condições ideais de trabalho. (BARMPALEXIS, 2009).

Figura 8 - Efeito obtido na resolução entre os picos de anfotericina A e anfotericina B **(a)** e o tempo de retenção **(b)** para o pico de anfotericina B



Legenda: ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; THF:ACN = mistura de acetonitrila com THF (1:1, v/v); RT = tempo de retenção.

Fonte: elaboração própria, obtido através do *software* Design Expert® versão 7.0.

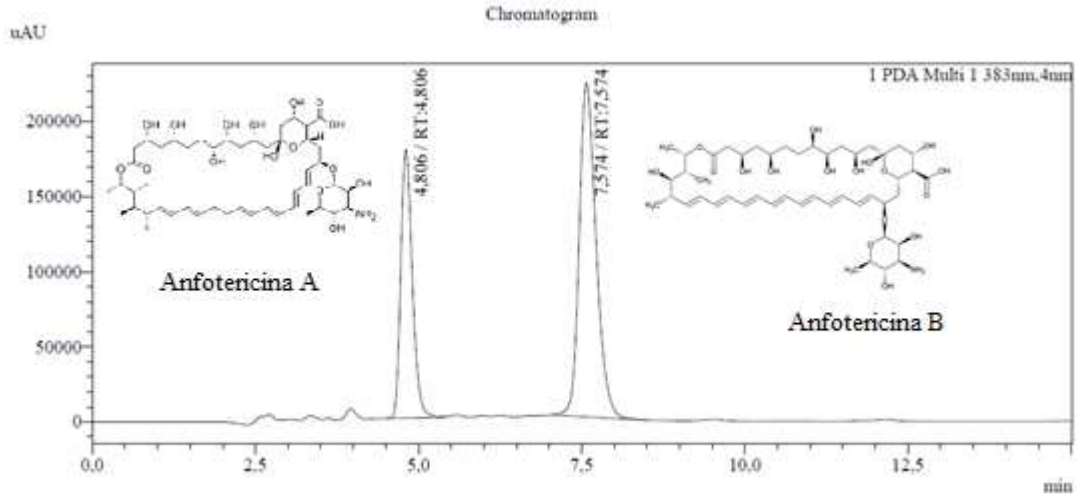
Observamos na figura 8 **(a)** que a resolução atinge níveis satisfatórios, maior do que 1,5 (CIOLA, 1998), com a mistura dos três componentes orgânicos (região central, coloração

verde-amarelo), enquanto os menores tempos de retenção, considerando uma análise otimizada, são obtidos na região onde predominam tanto acetonitrila como a mistura de acetonitrila com THF, na figura 8 **(b)**, região azul. Os pontos em vermelho, denominados como *Design Points* representam as análises cromatográficas reais, executadas neste estudo.

O modelo quadrático sugerido pelo *software* foi significativo (*p-value* = 0,0016) para a avaliação do tempo de retenção, levando à equação RT = + 1.46 * A + 216.32 * B + 0.79 * C - 263.50 *AB + 37.04 * AC - 300.66 *BC. Já o modelo não foi significativo para a avaliação da resolução, com *p-value* > 0,05. Uma maneira de melhorar o modelo seria a inserção de mais replicatas para ajustar o desvio e aumentar graus de liberdade mas, como este estudo foi exploratório, com a finalidade de compreender a interação entre os três solventes orgânicos, o resultado foi considerado satisfatório para dar sequência ao desenvolvimento analítico com a otimização dos parâmetros cromatográficos.

Com base nos resultados obtidos e na avaliação dos efeitos das variáveis escolhidas para a composição orgânica da fase móvel, o ensaio de escolha para realização dos testes de otimização dos parâmetros cromatográficos foi o experimento número 1 (Figura 9), que apresentou tempo de retenção de 7,6 min para anfotericina B e resolução de 6,9 com o pico de anfotericina A, que corresponde ao principal produto de degradação.

Figura 9 - Cromatograma obtido com a melhor condição cromatográfica após planejamento de misturas *Simplex Centroide*



Legenda: Tempo de retenção 4,806 min corresponde à anfotericina A e tempo de retenção 7,574 corresponde à anfotericina B.

Fonte: elaboração própria.

A otimização do método analítico foi realizada com a finalidade de diminuição do tempo total da corrida cromatográfica, com a manutenção dos parâmetros adequados de resolução maior do que 1,5 (CIOLA, 1998) entre os picos de anfotericina A e anfotericina B, assim como obtenção de fator de assimetria entre 0,8 e 1,2 e pureza de pico maior do que 0,99 onde, este último parâmetro, indica que o pico é atribuído a um só componente com ausência de co-eluição. A diminuição do tempo de corrida é importante para que se obtenham análises mais rápidas, com menor custo, assim como redução na geração de resíduos. A escolha de uma fase móvel com menor concentração de THF também objetivou a diminuição do custo, uma vez que se trata de um solvente orgânico de maior custo, em comparação com o metanol e acetonitrila (PACHECO, 2009).

A porção orgânica da fase móvel foi agora ajustada para uma proporção de 75% de acetonitrila, 17% de metanol e 8% de tetrahidrofurano, que corresponde à composição do experimento número 1 (Tabela 5).

Tabela 6 - Descrição das 11 corridas cromatográficas executadas e resultados obtidos em termos de resolução, assimetria, pureza de pico e tempo de retenção

Codificação do experimento*	Fatores independentes			Resultados			
	Fluxo (mL/min)	Temperatura (ºC)	Fase orgânica (%)	Resolução >1,5	Assimetria 0,8 – 1,2	Pureza de pico >0,990	RT**
1	0,8	25	52	5,745	1,201	0,9643	7,563
2	0,8	35	52	5,289	1,199	0,7308	7,048
3	1,2	25	52	5,275	1,136	0,9908	5,118
4	1,2	35	48	6,549	1,184	0,9774	6,420
5	**1,0**	**30**	**50**	**6,228**	**1,166**	**0,9924**	**6,787**
6	0,8	35	48	6,952	1,260	0,9293	9,380
7	0,8	25	48	7,445	1,263	0,9919	10,083
8	1,2	35	52	4,959	1,140	0,7575	4,783
9	**1,0**	**30**	**50**	**6,214**	**1,164**	**0,9935**	**6,777**
10	1,2	25	48	6,826	1,212	0,9947	6,911
11	**1,0**	**30**	**50**	**6,219**	**1,165**	**0,9927**	**6,777**

* A codificação dos experimentos corresponde à ordem aleatória de realização dos testes. **RT = tempo de retenção, em min.

Fonte: elaboração própria.

Para este novo conjunto de experimentos, descritos na Tabela 6, foram obtidos resultados satisfatórios para quase todos os parâmetros cromatográficos, com todos os valores maiores do que 1,5 para resolução, todos os picos apresentaram resultados dentro da faixa de 0,8 até 1,2 para assimetria e o tempo de retenção ficou baixo em todos os ensaios, variando de 4,8 min até 10,1 min. O único parâmetro que apresentou resultados insatisfatórios em algumas

corridas cromatográficas foi a pureza de pico, onde o valor considerado adequado nesta pesquisa é acima de 0,990. Este valor representa o grau de similaridade entre dois espectros, calculado com base no espectro do ápice do pico em relação aos demais pontos de toda extensão de integração do pico cromatográfico. O valor de pureza UV/Vis gerado pelo *software* LC Solution é calculado pela média de todos os fatores de correspondência spectral obtidos na extensão do pico cromatográfico. Fator de coincidência igual a zero indica nenhuma coincidência espectral, enquanto valores acima de 0,990 indicam que os espectros são similares, ou seja, o pico cromatográfico apresenta espectros homogêneos em 99% da sua extensão de integração, indicando que é atribuído a um só componente. Valores abaixo de 0,990 podem indicar a presença de outro componente como, por exemplo, um produto de degradação ou componente da matriz, que possa estar coeluindo com o pico do composto de interesse e o prejuízo quando esta coeluição é obtida é de que as áreas de todos os picos coeluídos serão somadas levando à um falso resultado na quantificação do analito principal.

Segregando assim, somente as corridas cromatográficas que apresentaram valores maiores que 0,990 de pureza, podemos selecionar a condição ideal com base em outro dos parâmetros cromatográficos avaliados, como a assimetria do pico. Os menores valores de assimetria foram obtidos no ponto central do conjunto de ensaios. A assimetria de 1,0 é considerada ideal, uma vez que indica que se dividirmos o pico em duas partes iguais, a divisão das duas metades seria 1 indicando que a dispersão das moléculas é homogênea. A faixa de 0,8 até 1,2 como valores aceitáveis é usual e existe segurança analítica em trabalhar dentro um range para este parâmetro (CIOLA, 1998).

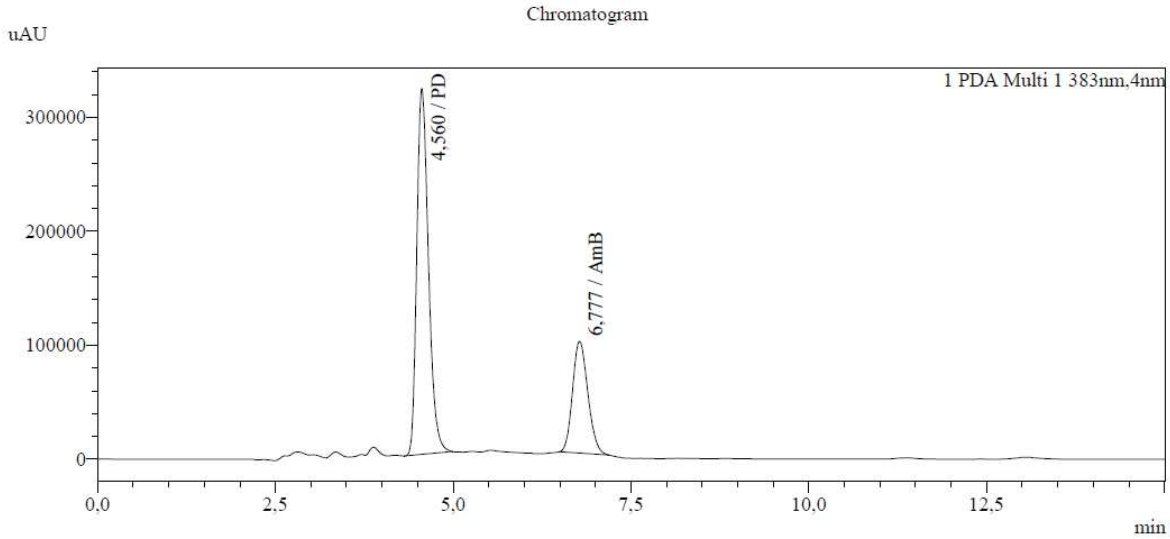
Com base nos resultados obtidos e na avaliação dos parâmetros cromatográficos considerados ideais, o ensaio de escolha para realização dos testes de quantificação da anfotericina B nos testes requeridos foi o experimento do ponto central, executado em triplicata (Tabela 6, experimentos 5, 9 e 11), com 6,8 min de tempo de retenção para o pico de AmB, apresentando resolução de 6,2 entre os picos de AmA e AmB, fator de assimetria de 1,16 e pureza do pico de anfotericina B > 990. Com esta otimização, houve uma redução importante do tempo de retenção obtido com o método de base, que era de 16 min (CHANG *et al*., 2011).

As condições cromatográficas que levaram aos resultados considerados mais adequados foram a utilização de um sistema CLAE Shimadzu composto por bomba binária, sistema de detecção UV-Vis (DAD) à 383 nm e injetor automático, com coluna cromatográfica Zorbax ODS (C18) de 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno com 5 µm de tamanho de partícula, temperatura do forno mantida em 30 ºC, fase móvel com modo de eluição isocrática, contendo a proporção de 50:50 (v/v), de água ultrapura e uma solução orgânica

composta de 75% de acetonitrila, 17% de metanol e 8% de tetrahidrofurano, com fluxo mantido em 1,0 mL.min^{-1} e volume de injeção de 10 µL.

A figura 10 representa o cromatograma de acordo com o experimento otimizado para realização dos ensaios requeridos.

Figura 10 - Cromatograma obtido através do resultado da otimização analítica



Tempo de retenção 4,560 min corresponde ao pico de AmA, principal produto de degradação (PD) e tempo de retenção de 6,777 min corresponde ao pico de anfotericina B (AmB).

Fonte: elaboração própria.

5.2 Validação do método analítico para quantificação da anfotericina B

Após definição da formulação do lipossoma peguilado de AmB revestido com quitosana (LipPeAmB-CH), o método foi validado de acordo com as diretrizes da RDC 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017).

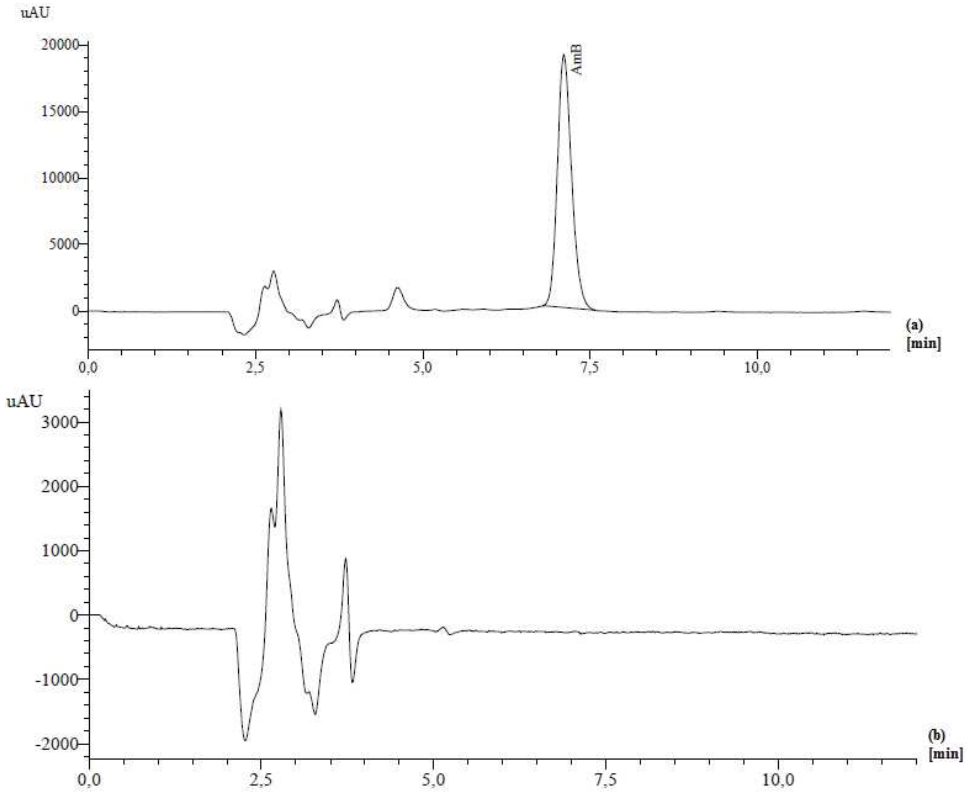
Validar um método analítico significa dar ao mesmo a validade, credibilidade e confiança. A validação objetiva, principalmente, assegurar que o método de análise funcione adequadamente dentro das condições de análise para as quais foi projetado. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado.

No estudo de validação foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção, exatidão e precisão na quantificação de anfotericina B na presença dos componentes da matriz do lipossoma e possíveis produtos de degradação.

5.2.1 Seletividade

Seletividade do método é a capacidade de medir a resposta do analito na amostra, ainda que na presença de outros componentes como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017). Através do cromatograma obtido com a solução preparada com o placebo (Figura 11, b), que contém todos os componentes da formulação, exceto o fármaco, observamos que não são visualizadas interferências na região do tempo de retenção obtido para a AmB, conforme demonstrado no cromatograma da solução preparada com a amostra LipPeAmB-CH (Figura 11, a).

Figura 11 - Cromatograma obtido com a solução amostra controle e solução placebo

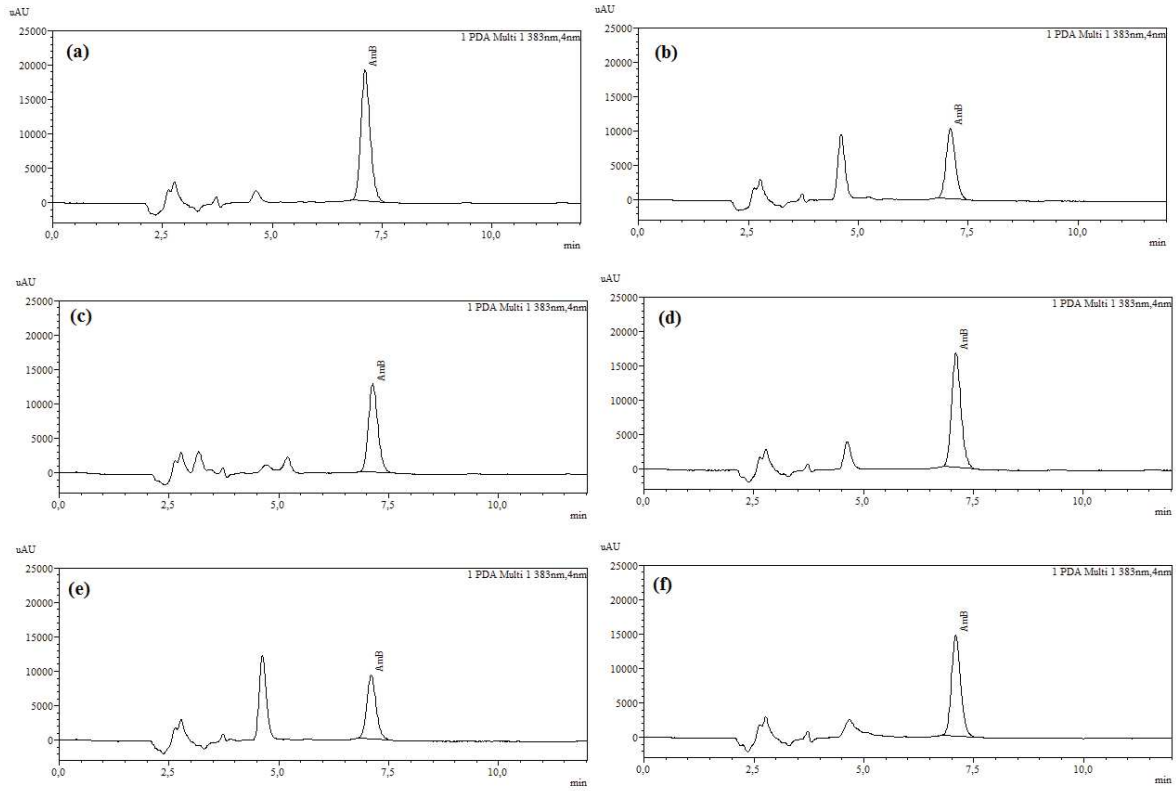


Legenda: (a) Solução amostra contendo AmB; (b) Solução placebo.
Fonte: elaboração própria.

O estudo de degradação forçada ajudou a identificar quais são as vias de degradação que a AmB é mais susceptível, característica intrínseca do ativo, que vão auxiliar, inclusive, nos estudos de estabilidade do medicamento e nos controles necessários no processo e armazenamento. Os estudos de degradação forçada foram realizados com a anfotericina B na

concentração inicial de 5,0 µg.mL^{-1}. Foi preparada uma solução estoque contendo anfotericina B na concentração de 50 µg.mL^{-1} e, desta solução, foram transferidos 1,0 mL para diferentes balões volumétricos de 10 mL os quais foram expostos às seguintes condições: i) hidrólise ácida, onde foi adicionado 1,0 mL de solução de HC1 0,1 M por 30 min; ii) hidrólise básica, onde foi adicionado 1,0 mL de solução de NaOH 0,1 M por 30 min; iii) umidade, onde foi adicionado 1,0 mL de água por 10 min à 70 °C; iv) térmica, em que a solução foi mantida à 70 °C por 10 min e v) fotolítica, em que a solução foi exposta à luz natural por 60 min. O volume dos balões foi completado com o diluente metanol acidificado com 1% de ácido acético, homogeneizados, filtrados em filtro de seringa com membrana PVDF 0,45 µm e analisados através do método desenvolvido por CLAE.

Figura 12 - Cromatogramas obtidos com as soluções após serem submetidas à degradação forçada com a finalidade de observar interferência de possíveis produtos de degradação



Legenda: (a) Amostra controle; (b) Degradação forçada ácida; (c) Degradação forçada básica; (d) Degradação forçada por umidade; (e) Degradação térmica; (f) Degradação fotolítica.
Fonte: elaboração própria.

Não foi observado interferência de excipientes ou produtos de degradação no tempo de retenção da anfotericina B conforme observado na figura 12, e a pureza de pico do fármaco foi

mantida acima de 0,9999 o que representa que não houve coeluição de outros picos com o pico de interesse. Sendo assim, o método pode ser considerado seletivo e indicativo de estabilidade, ou seja, ainda que haja degradação do princípio ativo durante o processo de fabricação dos lipossomas ou durante o armazenamento do produto, o método é capaz de quantificar o ativo sem a interferência da degradação, levando a um resultado confiável de teor.

5.2.2 Linearidade

A linearidade indica a capacidade do método em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo (BRASIL, 2017). A linearidade foi determinada com a triplicata de sete níveis de concentração, variando de 0,5 a 7,0 $\mu g.mL^{-1}$ para anfotericina B. As curvas de calibração foram estabelecidas plotando a área do pico versus a concentração. Os parâmetros de regressão, intercepto e coeficiente de correlação foram calculados e seguem resumidos no quadro 3.

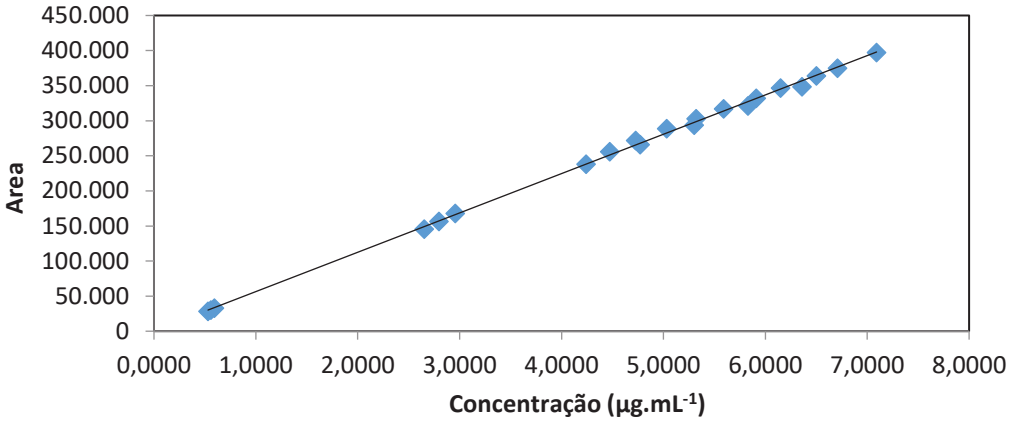
Quadro 3 - Resumo das conclusões do estudo de linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários)

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coeficiente de Correlação de *Pearson*	R = 0,9995 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectada dependência das observações

Fonte: Extraído do relatório obtido pelo *software* Action Stat versão 3.6.

Através do gráfico obtido (Figura 13) observamos visualmente uma relação linear na faixa de concentração de 0,53 a 7,09 $\mu g.mL^{-1}$. Os resíduos foram homocedásticos de acordo com o teste estatístico de *Breusch Pagan*, validando a regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Como o coeficiente de correlação de 0,9995 é maior que 0,990 (conforme especificado nas normas nacionais de validação), concluímos que existe uma relação linear adequada. A equação linear de melhor ajuste foi $y = 56.055,0418x + 415,1270$. Desta forma, o método é considerado linear dentro do intervalo especificado.

Figura 13 - Gráfico de linearidade



Fonte: elaboração própria. Regressão obtida através do *software* Excel.

5.2.3 Limite de detecção

O limite de detecção foi obtido com a diluição de 1000 vezes a solução estoque de AmB (53,89 µg.mL^{-1}) sendo o pico detectável a partir da concentração de 0,05 µg.mL^{-1} com uma relação sinal/ruído de 11 vezes.

5.2.4 Precisão

A precisão verifica a proximidade dos resultados obtidos entre si, a partir de uma mesma amostra e seguindo o mesmo preparo (BRASIL, 2017). Para avaliação da repetibilidade (% DPR) foram avaliadas seis amostras, preparadas de forma idêntica. Os critérios de aceitação dos dados incluíram precisão dentro de ± 2% de desvio padrão relativo (DPR) da série de medição conforme a fórmula "DPR=(DP/CMD)X100", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada entre as seis amostras da repetibilidade.

Tabela 7 - Dados obtidos para repetibilidade do método

Repetibilidade	**AmB (mg/mL)**
1	1,13
2	1,12
3	1,11
4	1,12
5	1,10
6	1,09
Média (n = 6)	**1,11**
Desvio Padrão relativo (n = 6)	**0,01%**

Fonte: elaboração própria.

Os resultados observados na Tabela 7 demonstram que o método analítico é preciso, pois o coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (DPR) está dentro dos limites de aceitação de ± 2,0% entre as replicatas.

5.2.5 Exatidão

Um método analítico é considerado exato quando os resultados obtidos estão em concordância com os resultados reais (BRASIL, 2017). A exatidão foi verificada com o preparo de três soluções contempladas dentro do intervalo linear do método analítico, em triplicata de preparo, totalizando nove soluções amostras onde: 3 soluções foram preparadas na concentração baixa (0,5 $\mu g.mL^{-1}$), 3 na concentração média (5,0 $\mu g.mL^{-1}$) e 3 na concentração alta (7,0 $\mu g.mL^{-1}$), conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados obtidos para exatidão de anfotericina B

Nível	**Recuperação de AmB (%)**
Baixo (LQ*) (≈0,5 $\mu g.mL^{-1}$)	100,6
	99,9
	99,8
Médio (≈5,0 $\mu g.mL^{-1}$)	99,7
	101,6
	99,4
Alto (≈7,0 $\mu g.mL^{-1}$)	98,8
	101,3
	100,9
Média (n = 9)	100,02
Desvio Padrão relativo (n = 9)	**0,93%**

*LQ = limite de quantificação.

Fonte: elaboração própria.

A recuperação média foi obtida na faixa de 98,0% a 102,0% para todos os ensaios com DPR abaixo de 2,0% para cada nível. A recuperação do fármaco adicionado ao placebo foi calculada como: % de recuperação = (Valor obtido / Valor adicionado) × 100 e os resultados obtidos demonstram que o método é exato dentro do intervalo proposto.

5.2.6 Robustez

Avaliar a robustez do método é importante para determinar o quanto o método é sensível e está susceptível à pequenas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017). A robustez do método foi confirmada através do planejamento experimental realizado na etapa de otimização do método desenvolvido, onde foram realizadas pequenas alterações na composição da fase móvel, na variação do fluxo e na variação da temperatura do forno de coluna. Os parâmetros alterados não afetaram parâmetros cromatográficos importantes na quantificação como resolução e assimetria, desta forma, o método pode ser considerado robusto com base nos resultados obtidos na etapa de desenvolvimento e otimização do método.

5.3 Síntese dos lipossomas

5.3.1 Resultados do planejamento experimental

Foi desenhado um planejamento fatorial experimental 2^4 com triplicata do ponto central de carácter exploratório (Tabela 9) para testar várias concentrações dos componentes selecionados para fabricação dos lipossomas como os componentes lipídicos fosfatidilcolina de soja (Lipoid S100®) e colesterol, o polietilenglicol conjugado com fosfatidilcolina (Lipoid PE®) e o fármaco anfotericina B, que foi integrado à fase lipídica no preparo dos lipossomas.

Para cada experimento projetado, 10 mL do solvente orgânico metanol acidificado com 1% de ácido acético glacial foi adicionado para promover a solubilização da anfotericina B e dos componentes da fase lipídica, com auxílio de banho de ultrassom por 30 min à temperatura ambiente. Esta solução foi transferida para um balão de fundo redondo e evaporado com auxílio de um rota-evaporador (TE-211-Tecnal) à uma temperatura de 60 ºC, com pressão regulada para 250 mmHg por 30 min, até assegurar a remoção total do solvente orgânico e ácido acético.

O filme lipídico aderido à superfície interna do balão foi hidratado com 10 mL de FNS (pH 5 – 6,5) à 60 ºC, com agitação manual por 15 min.

Tabela 9 - Descrição do estudo e resultados em termos de eficiência de encapsulação obtidos para os 19 experimentos do estudo exploratório para desenvolvimento da formulação de lipossomas peguilados

Codificação do experimento	Fatores independentes				Resultados
	Lipoid S100® (mg)	Colesterol (mg)	Lipoid PE ® (mg)	Anfotericina B (mg)	Eficiência de encapsulação (% de AmB)
1	100	5	5	5	99,06
2	200	5	5	5	99,25
3	100	15	5	5	96,85
4	200	15	5	5	99,33
5	100	5	15	5	96,16
6	200	5	15	5	98,15
7	100	15	15	5	97,02
8	200	15	15	5	97,99
9	100	5	5	15	45,26
10	200	5	5	15	87,99
11	100	15	5	15	37,51
12	200	15	5	15	89,28
13	100	5	15	15	53,93
14	200	5	15	15	89,75
15	100	15	15	15	42,50
16	200	15	15	15	89,16
17	150	10	10	10	96,60
18	150	10	10	10	100,00
19	150	10	10	10	98,02

* A codificação dos experimentos não corresponde à ordem de realização dos testes, os quais foram aleatorizados.
Fonte: elaboração própria.

As amostras obtidas após esta primeira etapa de desenvolvimento foram analisadas quanto à eficiência de encapsulação (detalhes do procedimento no item 4.2.5.2) e os efeitos dos componentes individuais e das interações na obtenção deste resultado foram calculados.

A anfotericina B, de característica hidrofóbica na faixa de pH fisiológico, não é solúvel em FNS (pH 5,0 – 6,5), com isso, nos protótipos em que foi obtida baixa eficiência de encapsulação (EE), foi possível observar depósito de cristais de cor amarela no fundo dos frascos (Figura 21), que indicam que o fármaco que não foi incorporado nos lipossomas, ficou livre no meio aquoso e precipitou devido à baixa solubilidade.

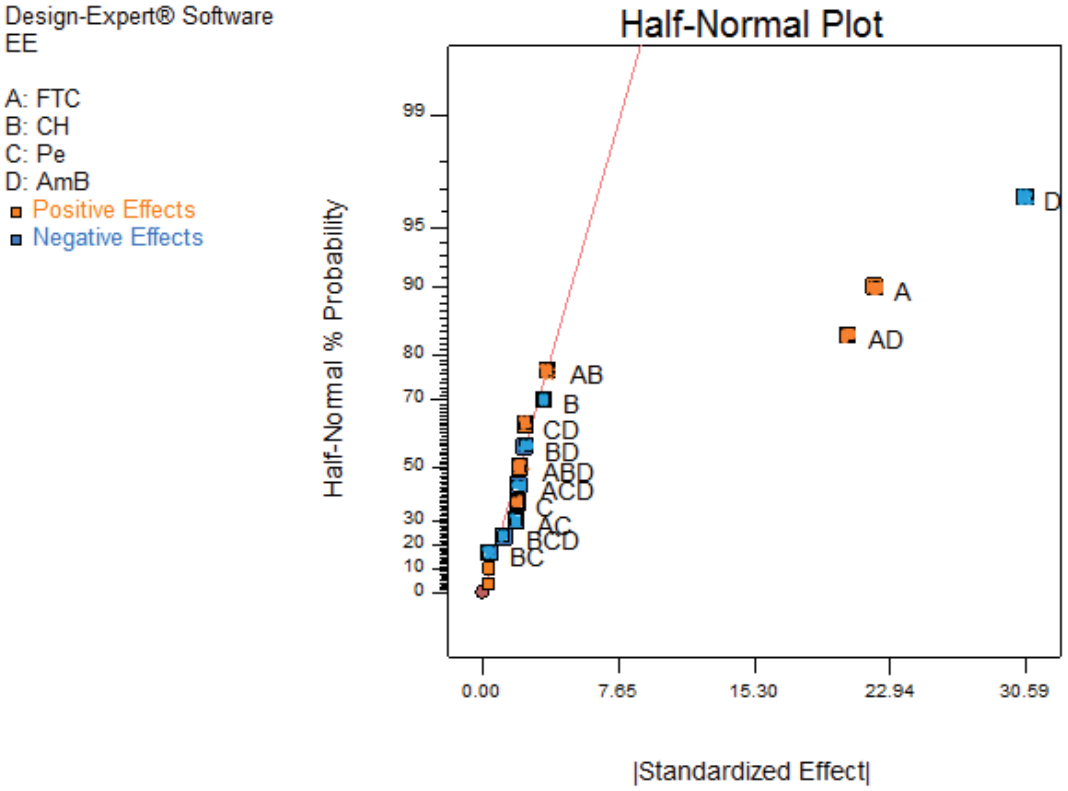
De acordo com o teste de probabilidade normal (*Half-normal plot*, *Shapiro Wilk*), que possibilita a visualização dos efeitos, observamos na figura 14 que os componentes que demonstraram maior efeito sobre a eficiência de encapsulação foram as concentrações de fosfatidilcolina de soja (Lipoid S100®) e anfotericina B, assim como a interação entre elas. A fosfatidilcolina de soja apresenta um efeito positivo (figura 14, A, representado pela cor laranja)

o que demonstra que a eficiência de encapsulação aumenta na medida em que aumenta a concentração do lipídeo. Enquanto a concentração do fármaco anfotericina B (figura 14, D, representado pela cor azul) apresenta um efeito negativo, onde quanto menor a quantidade do fármaco, melhor será a encapsulação. E a interação entre ambos leva a um efeito positivo (figura 14, AD, representado pela cor laranja).

A anfotericina B vai interagir com a camada lipídica do lipossoma, a qual é composta pela fosfatidilcolina de soja e colesterol. Desta forma, é esperado e, foi confirmado com os resultados obtidos que, uma maior a quantidade de lipídios na formulação, possibilita a incorporação de concentrações maiores do fármaco.

O efeito observado para os demais fatores ficou próximo ao desvio obtido para a triplicata do ponto central, com isso, não é possível diferenciar o que é desvio inerente ao processo daquilo que de fato é efeito sobre o resultado estudado.

Figura 14 - Gráfico de probabilidade normal dos efeitos na eficiência de encapsulação observados para cada fator independente, assim como suas interações



Legenda: [EE] eficiência de encapsulação; A: [FTC] fosfatidilcolina de soja; B: [CH] colesterol; C: [Pe] Lipoid PE®; D: [AmB] anfotericina B.

Fonte: elaboração própria, obtido através do *software* Design Expert® versão 7.0.

O objetivo deste planejamento exploratório foi de fato investigar quais seriam os pontos críticos na formulação para que, a partir destes resultados, fosse possível o delineamento de um estudo mais conciso com os objetivos esperados, de produzir lipossomas com a maior concentração possível de anfotericina B.

Um fator importante observado neste estudo exploratório foi o efeito da concentração de anfotericina B, uma vez que o objetivo é conseguir incorporar uma quantidade razoável do fármaco para seguir com os estudos *in vivo*. Como o modelo animal são ratos Wistar e na administração por via nasal não é possível administrar uma elevada quantidade do medicamento, a concentração de anfotericina B é um fator crítico para formulação.

Com base nas observações obtidas no estudo exploratório inicial, foi realizada uma nova série de experimentos para explorar a eficiência na incorporação da anfotericina B com a modificação da concentração dos componentes lipídicos da formulação. Nesta etapa, também foi incorporado um outro ativador de superfície, o propilenoglicol, além do Lipoid PE® utilizado no estudo incial, que é composto por polietilenoglicol conjugado com fosfatidilcolina de soja, de forma a avaliar as diferenças no comportamento entre polietilenoglicol e propilenoglicol.

As variáveis independentes numéricas avaliadas foram a concentração de fosfatidilcolina de soja (Lipoid S100®) e colesterol e foi incluída uma variável categórica, o tipo de ativador de superfície, polietilenoglicol (Lipoid PE®) e propilenoglicol, ambos com concentração fixa de 10 mg e 10% da fase aquosa, respectivamente. A concentração de anfotericina B foi mantida fixa em 13 mg de forma a eliminar o efeito do fármaco na formulação e entender se esta proposta geral de componentes é adequada em termos de eficiência de incorporação do ativo.

Nesta etapa foram produzidos 11 protótipos, com triplicata do ponto central, totalizando 14 experimentos, com a variação conjunta dos fatores independentes (Tabela 10). O processo de fabricação foi mantido (Figura 5). Para os experimentos que utilizaram propilenoglicol, este foi adicionado ao FNS, na proporção de 10%, p/p, na etapa de hidratação. As amostras ficaram armazenadas a 8 ºC até que fosse realizada a quantificação da eficiência de encapsulação.

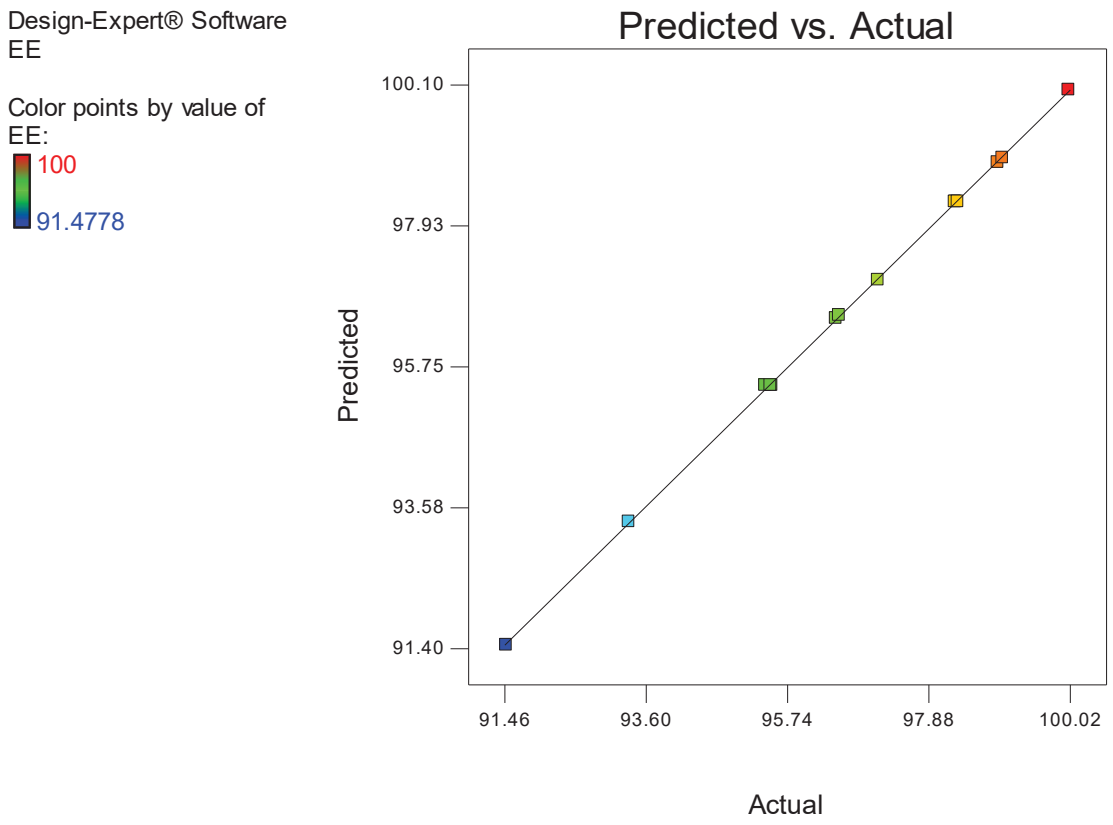
Tabela 10 - Descrição dos 14 experimentos realizados na segunda etapa do planejamento fatorial para desenvolvimento da formulação de lipossomas

Codificação do experimento	Ordem de realização do experimento	Fatores independentes			Resultados
		Lipoid S100® (mg)	Colesterol (mg)	Ativador de superfície	Eficiência de encapsulação (%)
1	12	200	10	Lipoid PE®	97,11
2	11	250	10	Lipoid PE®	100,00
3	14	200	20	Lipoid PE®	96,47
4	7	250	20	Lipoid PE®	98,93
5	1	200	10	Propilenoglicol	93,34
6	6	250	10	Propilenoglicol	91,48
7	8	200	20	Propilenoglicol	99,00
8	9	250	20	Propilenoglicol	96,52
9	**4**	**225**	**15**	**Lipoid PE®**	**98,30**
10	10	225	15	Propilenoglicol	95,50
11	**13**	**225**	**15**	**Lipoid PE®**	**98,28**
12	2	225	15	Propilenoglicol	95,40
13	**3**	**225**	**15**	**Lipoid PE®**	**98,32**
14	5	225	15	Propilenoglicol	95,48

Fonte: elaboração própria.

Para este novo conjunto de experimentos, a eficiência de encapsulação para todas as formulações foi acima de 90% (91,48% a 100,00%), conforme observado na Tabela 10. A análise dos dados apresentou uma boa relação entre os resultados obtidos (*Actual*) com os resultados preditivos pela regressão (*Predicted*) conforme observado na figura 15, indicando um bom ajuste do modelo estatístico.

Figura 15 – Gráfico "*Predict vs. Actual*" para avaliação do efeito do modelo



Legenda: [EE] eficiência de encapsulação, [Actual] resultados obtidos; [Predicted] resultados preditivos pela regressão.

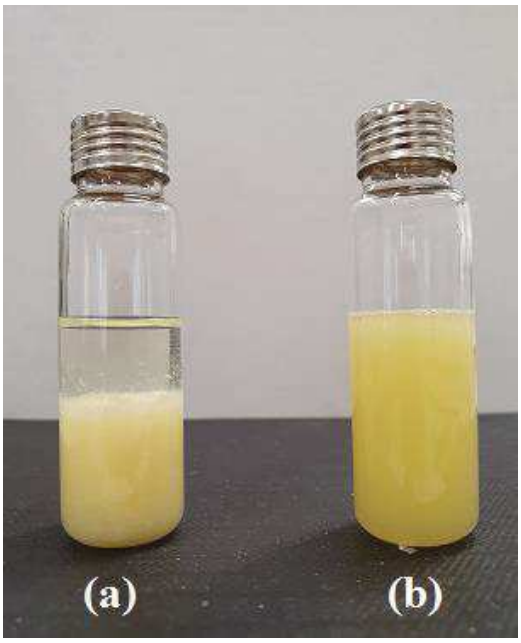
Fonte: elaboração própria, obtido através do *software* Design Expert® versão 7.0.

Os menores resultados de EE foram obtidos com a utilização do propilenoglicol incorporado à fase aquosa do lipossoma, enquanto a utilização do polietilenoglicol conjugado à fosfatidilcolina de soja (Lipoid PE®) levou a resultados superiores à 96% de eficiência de encapsulação. Todos os resultados de recuperação foram satisfatórios, no entanto, foi observada diferença no aspecto das suspensões de lipossomas. Os experimentos com propilenoglicol apresentaram separação de fases após um longo período sem agitação, a qual retorna à condição inicial após leve agitação. Já as formulações com Lipoid PE® ficaram estáveis quanto ao aspecto, mesmo após longo período de armazenamento (Figura 16).

O Lipoid PE® é um conjugado de polietilenoglicol 2000 com fosfatidilcolina de soja (Lipoid PE 18:0/18:0-PEG 2000; Lipid Ingredients & Technologies) obtido comercialmente e com a finalidade de favorecer a interação do polietilenoglicol com a composição lipídica do lipossoma. Já com o propilenoglicol isolado, sem tratamento prévio, não foi possível obter uma

interação efetiva com a fosfatidilcolina de soja, levando à separação de fases. Diante do exposto, para avaliação de escolha da fórmula ideal, foram considerados somente os experimentos com polietilenoglicol (Lipoid PE®) atuando como ativador de superfície.

Figura 16 - Formulação com propilenoglicol (a) e formulação com polietilenoglicol (b)

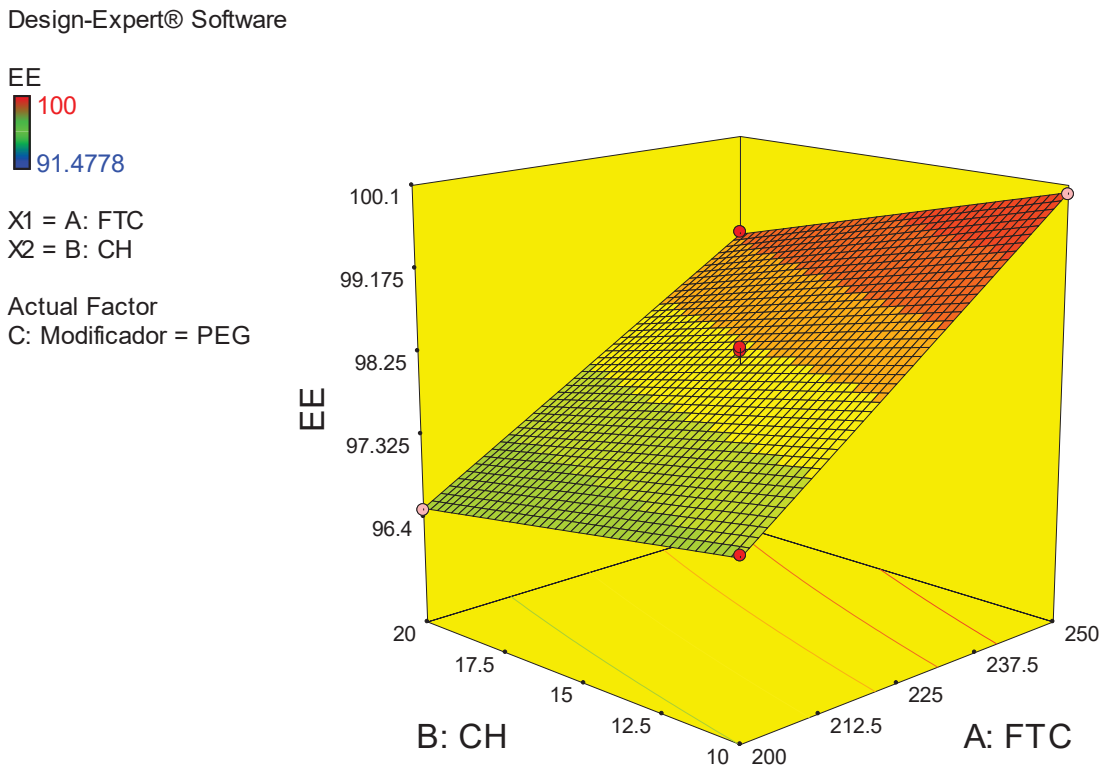


Fonte: elaboração própria.

Apesar de todos os resultados terem sido considerados satisfatórios em termos de eficiência de encapsulação, observamos no gráfico de superfície de resposta (Figura 17) que a interação dos efeitos entre a % de fosfatidilcolina de soja (FTC) e % de colesterol (CH) demonstrou um padrão linear, sem observação de curvatura na superfície. A superfície com colocação vermelha representa os maiores valores de EE obtidos com o estudo e estes se encontram na região com maior concentração de fosfatidilcolina de soja. Observamos ainda que a média dos resultados obtidos com a triplicata do ponto central não estão distantes da superfície que foi gerada a partir de todos os resultados obtidos, indicando que o modelo foi regular quanto aos desvios.

Os resultados obtidos corroboram com as conclusões obtidas no primeiro planejamento experimental, de carácter exploratório, de que quanto maior a concentração de fosfatidilcolina de soja, maior é a capacidade da formulação em incorporar a anfotericina B e que as diferentes concentrações de colesterol não afetam tanto a eficiência de encapsulação.

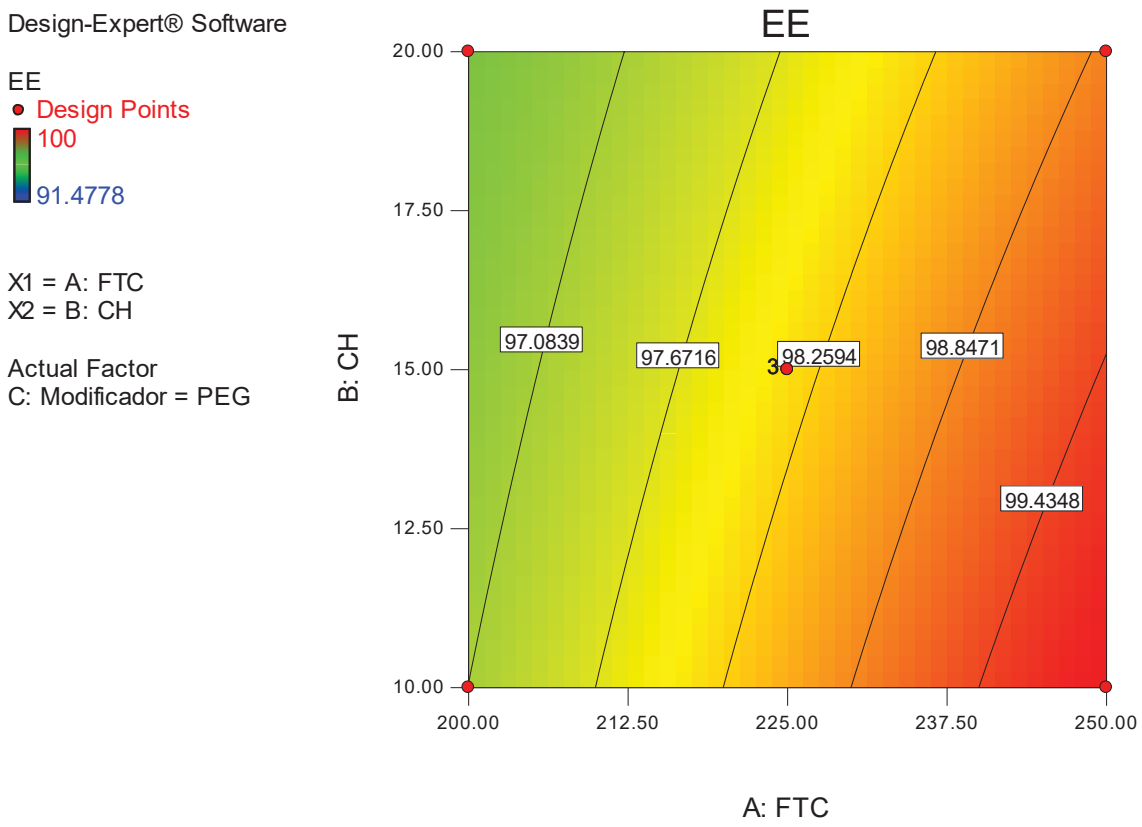
Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta para eficiência de encapsulação (EE) observados na interação entre fosfatidilcolina de soja (FTC) e colesterol (CH) nos experimentos contendo como modificador de superfície o Lipoid PE® (PEG)



Legenda: [EE] eficiência de encapsulação, [FTC] fosfatidilcolina de soja; [CH] colesterol, [PEG] Lipoid PE®.
Fonte: elaboração própria, obtido através do *software* Design Expert® versão 7.0.

Diante dos resultados obtidos com o desenvolvimento de lipossomas peguilados contendo anfotericina B com a abordagem de análise multivariada dos fatores num planejamento experimental, consideramos como formulação ideal o ponto central deste último conjunto de experimentos, que foi realizado em triplicata (9, 11 e 13, Tabela 10), utilizando como ativador de superfície para promoção da flexibilidade o polietilenoglicol conjugado com fosfatidilcolina de soja (Lipoid PE®), uma vez que foram obtidos resultados satisfatórios dentro de todo o intervalo de variação proposto, conforme observado no gráfico de contorno (Figura 18) e, trabalhando com a composição no ponto central, obtemos uma robustez importante de processo, em que pequenas variações na proporção dos componentes não vão afetar a eficiência de encapsulação.

Figura 18 – Gráfico de contorno para o efeito da fosfatidilcolina de soja (FTC) e do colesterol (CH) nos experimentos contendo como ativador de superfície o Lipoid PE® (PEG) na resposta de eficiência de encapsulação (EE) de anfotericina B em lipossomas

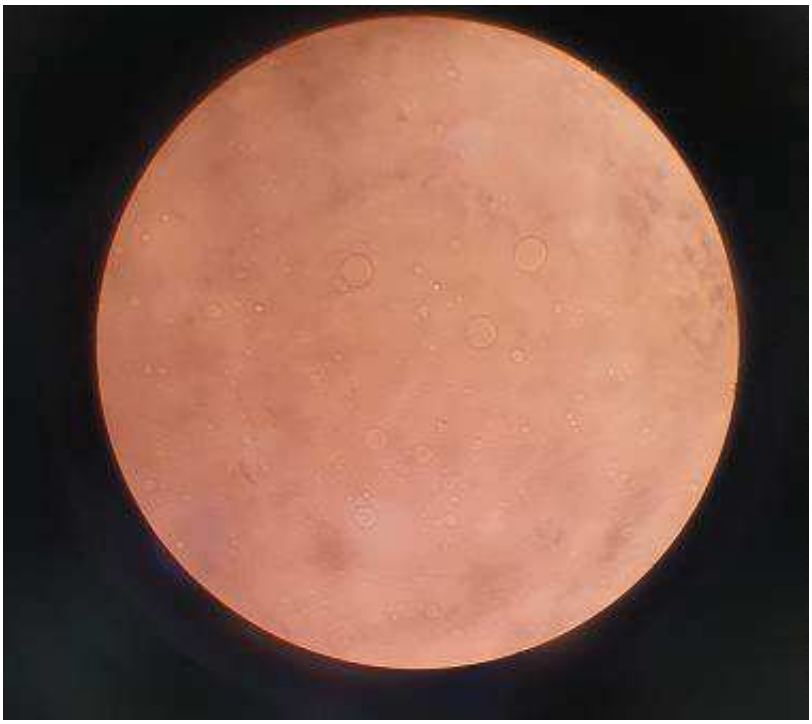


Legenda: [EE] eficiência de encapsulação, [FTC] fosfatidilcolina de soja; [CH] colesterol, [PEG] Lipoid PE®.
Fonte: elaboração própria, obtido através do *software* Design Expert® versão 7.0.

5.3.2 Redução do tamanho dos lipossomas para escala nanométrica

A formulação obtida de lipossomas peguilados de anfotericina B, apresentou tamanho de vesícula variado, maior do que 1000 nm (Tabela 11), o que possibilitou observação diretamente em microscópio óptico YS2-H da Nikon (China) com objetiva de 100 X, sem tratamento prévio (Figura 19).

Figura 19 – Imagem dos lipossomas antes da redução do tamanho das vesículas.



Fonte: elaboração própria. Microscópio óptico com objetiva de aumento de 100 X, sem tratamento prévio.

A necessidade de redução e padronização do tamanho das vesículas é importante para a finalidade proposta neste estudo, uma vez que se pretende obter lipossomas na escala nanométrica de tamanho para que seja possível a permeação da mucosa nasal. Para isso foram avaliadas duas metodologias de redução de tamanho de partícula.

Tabela 11 - Valores de tamanho hidrodinâmico médio (n=3) com desvio padrão associado e concentração obtida de anfotericina B (AmB)

Técnica	**Tamanho hidrodinâmico inicial (nm± σ)**	**Tamanho hidrodinâmico final (nm± σ)**	**Concentração inicial (AmB; mg/mL)**	**Concentração final (AmB; mg/mL)**
Homogeneizador por pressão	1048,52 ± 115,51	73,98 ± 1,53	1,28	0,20
Extrusão por membrana (0,10 µm + 0,05 µm)		71,13 ± 0,24		1,19

σ = desvio padrão

Fonte: elaboração própria.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 11, observamos que o processo de redução do tamanho da vesícula por homogeneização à pressão levou a tamanhos semelhantes de vesículas (73,98 nm) quando comparado com a técnica por extrusão em dupla membrana (71,13 nm). No entanto, observamos uma queda brusca de 84% no teor do princípio ativo quando as vesículas foram reduzidas no homogeneizador por pressão, enquanto no processo por extrusão, foi observada uma perda de 7 % de anfotericina B, em relação à concentração inicial.

No processo por homogeneização por pressão, a suspensão de lipossomas é bombeada para dentro do equipamento, à alta pressão, e colide com o anel de impacto existente nos arredores da válvula, levando a uma quebra na estrutura dos lipossomas, que se subdividem em estruturas menores devido à queda brusca de pressão e ao impacto sofrido (BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉ'S, 2001). A energia mecânica gerada a partir da alta tensão de cisalhamento, observada pelo alto aquecimento da amostra, pode ter sido responsável pela degradação ou ainda pela remoção do fármaco anfotericina B da estrutura lipossomal.

Já na técnica por extrusão em membrana não se faz necessária tanta energia no processo, que foi realizado de forma manual com temperatura mantida em 60 ºC, o que manteve as moléculas de anfotericina B íntegras, com pouca perda no processo (7%). Com isso, este foi o processo de escolha para a redução e padronização do tamanho das vesículas.

5.3.3 Alteração da carga eletrônica dos lipossomas

Os lipossomas obtidos após redução do tamanho das vesículas apresentaram carga eletrônica negativa (-21,85 Mv ± 4,21, n=3), obtido através da determinação do potencial zeta (ZP), cujo resultado é esperado devido à característica de carga negativa da fosfatidilcolina de soja presente na área superficial do lipossoma, formando a dupla camada lipídica intrínsica ao sistema obtido.

Para efetivar a interação dos lipossomas com as membranas celulares, cujo entorno possui carga negativa, com a finalidade de favorecer a permeção paracelular através das junções *tight*, se faz necessária a modificação da carga superficial dos lipossomas obtidos. Uma vez que estes lipossomas apresentem carga superficial positiva, a atração entre cargas opostas, associada ao tamanho das vesículas, pode favorecer a permeação naso-cerebral almejada (BONACCORSO *et al*., 2017; SUNDERLAND *et al*., 2006). Además, a quitosana, através da sua propriedade de mucoadesão, permite uma maior permanência da formulação na mucosa

nasal, contribuindo para melhora na permeação (YU *et al*., 2019; SALVA *et al*., 2015; ELSABEE; ABDOU, 2013; KEAN; THANOU, 2010).

O sistema lipossomal em nano escala foi revestido com quitosana de forma a fornecer carga positiva aos lipossomas e fornecer mucoadesão.

Tabela 12 - Resultados obtidos após revestimento com 0,1% de quitosana, em termos de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e concentração de anfotericina B (AmB)

Descrição do experimento	**Resultados**			
	Tamanho hidrodinâmico (nm) (média (n=3) ± σ)	**Índice de polidispersão (média (n=3) ± σ)**	**Potencial zeta (mV) (média (n=3) ± σ)**	**Concentração de AmB (mg/mL)**
Lipossoma sem processo de extrusão para redução do tamanho	1048,52 ± 115,51	0,394 ± 0,039	-17,98 ± 2,86	1,28
Lipossoma após processo de extrusão, peguilado e sem revestimento	71,13 ± 0,24	0,190 ± 0,017	-21,85 ± 4,21	1,19
Lipossoma após processo de extrusão, peguilado e revestido com quitosana 0,1%	60,64 ± 0,62	0,120 ± 0,056	+17,88 ± 2,02	1,13

σ = desvio padrão

Fonte: elaboração própria.

Os resultados descritos na Tabela 12 sugerem que houve interação entre os lipossomas e a quitosana via atração eletrostática. O alto potencial zeta (ZP) de carácter positivo obtido para os lipossomas peguilados revestidos sugere a adsorção de uma certa quantidade de quitosana na superfície lipídica, de carga inicial negativa. A anfotericina B, presente na camada lipídica do lipossoma, também pode ter contribuído com a interação através dos grupos carboxílicos presentes na molécula e que podem interagir com a quitosana. O tamanho da vesícula foi reduzido, provavelmente, devido à reorganização da superfície dos lipossomas após revestimento. O índice de polidispersão (PDI) fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição de tamanhos, sendo um parâmetro importante na manutenção da estabilidade do sistema coloidal, e os valores obtidos com os lipossomas indicam a formação de um sistema monodisperso. A leve queda no teor de anfotericina B possivelmente é decorrente da diluição da amostra (1:10) com a adição da solução de quitosana e, também, pode ser causada pelo erro analítico.

5.3.4 Definição da formulação

Com base nos resultados obtidos durante o desenvolvimento, segue descrito na Tabela 13 a composição centesimal final da formulação de lipossomas peguilados de anfotericina B revestidos com quitosana (LipPeAmB-CH), a ser caracterizada e desafiada quanto ao potencial de permeação cerebral através da via naso-cerebral.

A processo de formulação foi definido como: i) componentes hidrofóbicos anfotericina B, fosfatidilcolina de soja (Lipoid S®), colesterol e polietilenoglicol conjugado com fosfatidilcolina de soja (Lipoid PE®) dissolvidos em 10 mL do solvente orgânico metanol acidificado (1% de ácido acético, v/v) com auxílio de banho ultrassom por 30 min; ii) evaporação do solvente orgânico em rota-evaporador por 30 min, à 60 ºC; iii) hidratação com 10 mL de fluído nasal simulado (FNS, pH 5 – 6,5) à 60 ºC, com agitação manual por cerca de 15 min; iv) redução do tamanho da partícula por extrusão em membrana de policarbonato de 100 nm seguida de 50 nm de porosidade, à 60 ºC; v) adição da solução de quitosana de baixa massa molecular (1%, m/v, em solução aquosa de ácido acético 1%) na proporção de 1 : 10, sob agitação constante de 3000 rpm com barra magnética por 1 h. Adicionalmente, foi preparado um placebo (LipPePLC), contendo a mesma composição da formulação final, com a exclusão da adição da anfotericina B para contribuir com os estudos comparativos. As amostras permaneceram armazenadas a 8 ºC para utilização futura.

Tabela 13 - Composição centesimal dos lipossomas peguilados de anfotericina B revestidos com quitosana (%, m/m)

Componentes		**Função na fórmula**	**(%, m/m)**
Fase oleosa	Anfotericina B	Princípio ativo	0,117
	Fosfatidilcolina de soja (Lipoid 100®)	Lipídeo	2,025
	Colesterol	Lipídeo	0,135
	Polietilenoglicol (Lipoid PE®)	Agente de flexibilidade	0,090
Fase aquosa	Fluído nasal simulado[1]	Diluente	87,633
	Quitosana 1,0%	Potenciador de absorção e agente de mucoadesão	10,000
		TOTAL	100,000

[1] 7,45 mg/mL de cloreto de sódio; 1,29 mg/mL de cloreto de potássio; 0,32 mg/mL de carbonato de cálcio dihidratado, pH 5 – 6,5 (MELON, 1968 apud CALLENS *et al*, 2003).

Fonte: elaboração própria.

A suspensão LipPeAmB-CH (Figura 20) apresentou aspecto homogêneo e translúcido que contribui com os resultados obtidos para o tamanho hidrodinâmico (60,64 ± 0,62 nm) indicando que os lipossomas atingiram tamanho das vesículas em escala nanométrica. Não apresentou separação de fases, tampouco coalescência, indicando estabilidade do sistema coloidal em concordância com os valores obtidos para o índice de polidispersão (0,120 ± 0,056) e a manutenção da estabilidade do sistema também foi reforçada pelo valor de potencial zeta (+17,88 ± 2,02) que indica alta repulsão elétrica entre as moléculas prevenindo a formação de agregados.

Figura 20 – Lipossomas peguilados de anfotericina B revestidos com quitosana (LipPeAmB-CH)

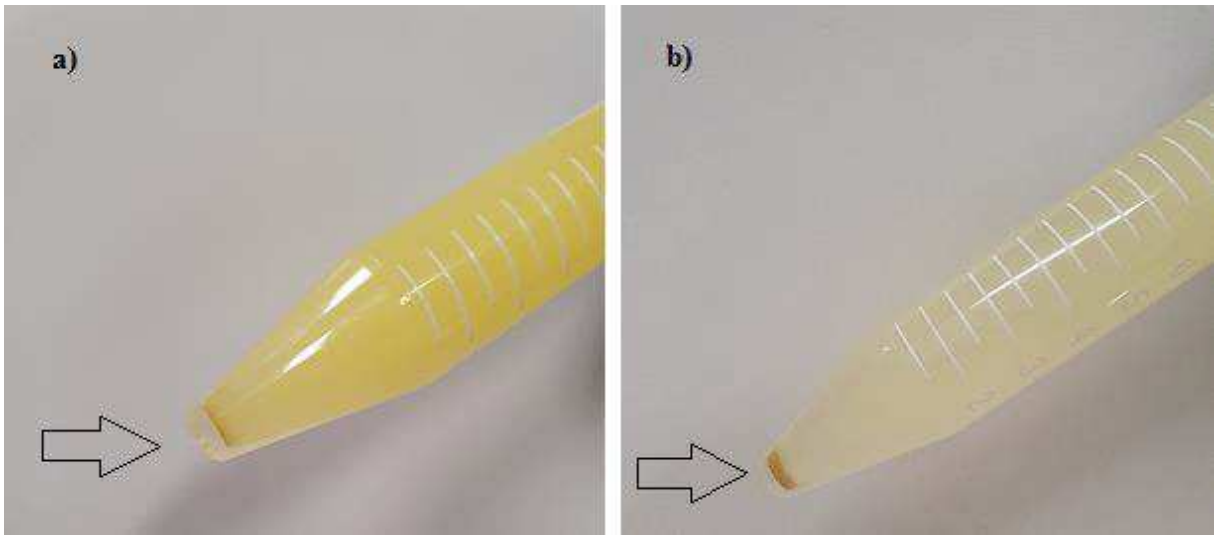
Fonte: elaboração própria.

5.4 Caracterização das propriedades físico-químicas

5.4.1 Eficiência de encapsulação da anfotericina B

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada nos experimentos de triagem, de forma a nortear a escolha da melhor formulação de lipossomas. A anfotericina B, de natureza hidrofóbica, apresenta baixa solubilidade em meio aquoso na faixa de pH fisiológico, desta forma, a porção que não foi incorporada aos lipossomas, ficou livre no meio e precipitou na presença do FNS conforme observado na figura 21. As amostras foram centrifugadas à 3000 rpm (Força g = 1609,92 g) por 10 min de forma a acelerar o processo de precipitação da anfotericina B não incorporada e a suspensão sobrenadante contendo os lipossomas foi quantificada por CLAE, através do método otimizado de quantificação desenvolvido neste trabalho de pesquisa.

Figura 21 - Observação do precipitado de anfotericina B não encapsulada nos lipossomas



Legenda: a) Lipossoma com 89,28% de eficiência de encapsulação e b) Lipossoma com 42,50% de eficiência de encapsulação.

Fonte: elaboração própria.

Com as 33 formulações produzidas, foram obtidos resultados de EE de 37,5% até 100,0% de anfotericina B encapsulada (Tabelas 9 e 10). O resultado de eficiência de encapsulação está coerente com a observação visual da AmB precipitada onde as formulações com maior conteúdo precipitado apresentaram menor eficiência de encapsulação, conforme figura 21, a) que corresponde ao experimento número 12 com 89,28% de eficiência de encapsulação (Tabela 9) e a figura 21, b) que representa o experimento número 15 com 42,50% de eficiência de encapsulação (Tabela 9).

5.4.2 Avaliação do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e teor

A formulação foi acompanhada quanto à manutenção dos parâmetros de tamanho hidrodinâmico da vesícula (nm), índice de polidispersão, potencial zeta (mV) e teor de anfotericina B (mg/mL) durante o período de armazenamento, que foi mantido à 8 ºC, de forma de avaliar a estabilidade do sistema lipossomal.

Tabela 14 - Valores de resposta médios e desvios padrão associados para tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e teor para os lipossomas peguilados revestidos com quitosana contendo anfotericina B

Tempo (meses)	Resultados			
	Tamanho (nm) (média (n=3) ± σ)	**Índice de polidispersão (média (n=3) ± σ)**	**Potencial zeta (mV) (média (n=3) ± σ)**	**Teor de AmB (mg/mL)**
0	60,64 ± 0,62	0,120 ± 0,056	17,88 ± 2,02	1,13
1	61,06 ± 0,79	0,148 ± 0,034	23,33 ± 1,80	1,12
2	58,54 ± 0,86	0,156 ± 0,035	19,50 ± 3,16	1,16
3	56,69 ± 0,93	0,138 ± 0,026	20,51 ± 1,79	1,18
4	58,07 ± 0,44	0,149 ± 0,017	21,92 ± 2,22	1,16

σ = desvio padrão relativo

Fonte: elaboração própria.

O armazenamento dos lipossomas peguilados revestidos com quitosana contendo AmB à 8 °C durante o período da avaliação levou à manutenção dos tamanhos hidrodinâmicos das vesículas entre 56,59 nm e 61,06 nm, com um pequeno aumento dos índices de polidispersão e nos valores do potencial zeta, durante 4 meses de armazenamento, demonstrando estabilização geral do sistema.

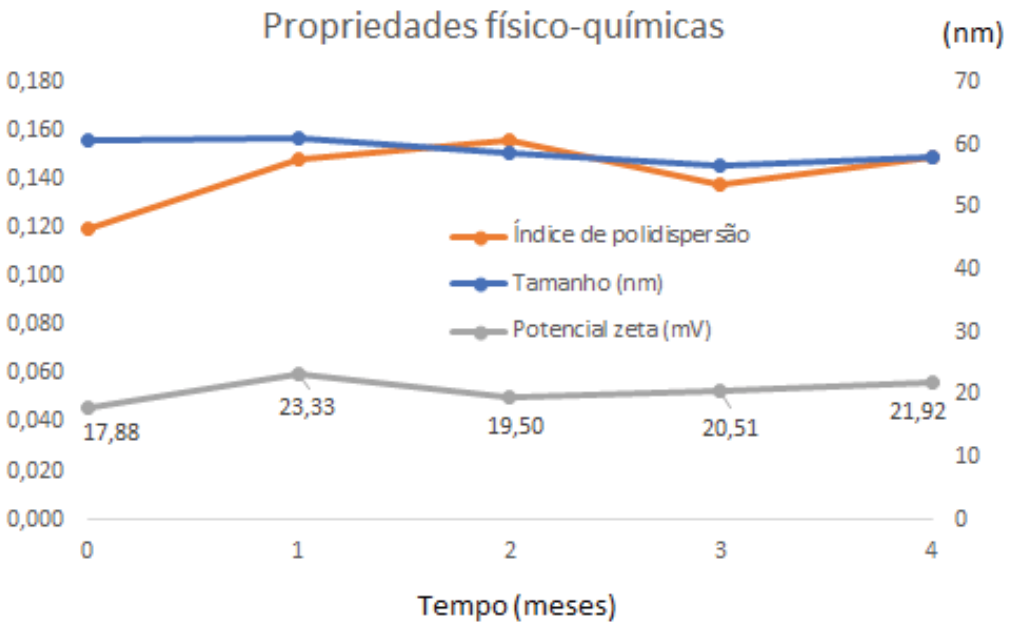
O índice de polidispersão apresentou leve aumento no decorrer do armazenamento, com valor mínimo de 0,120 na avaliação inicial, atingindo valores de 0,156 após período de armazenamento. Ainda que tenha sido observado um aumento nos valores, os índices de polidispersão continuaram adequados indicando a formação de sistemas essencialmente monodispersos para todas as formulações, conforme se pode observar na figura 22.

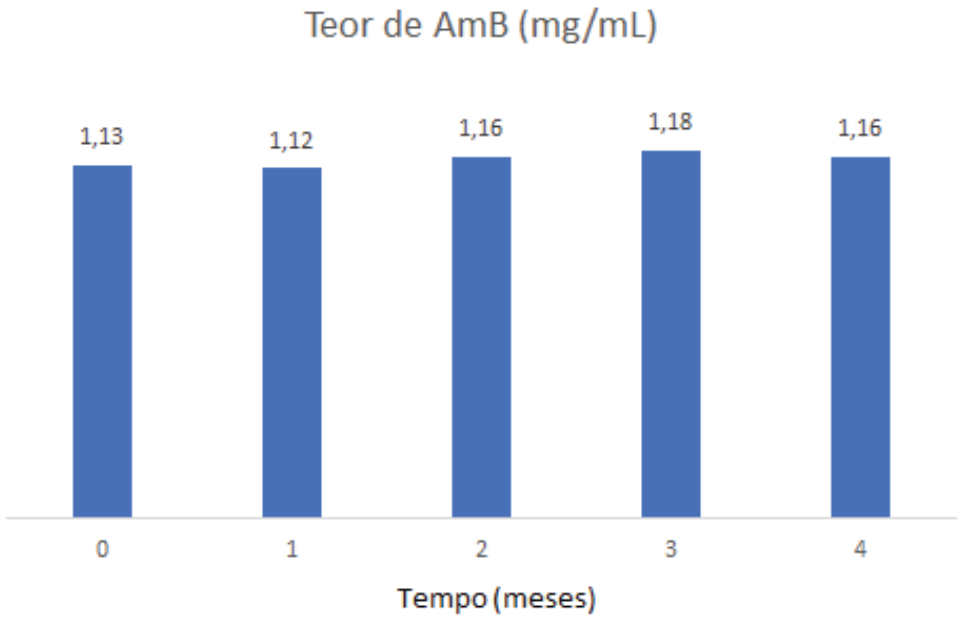
O potencial zeta é uma medida das forças repulsivas entre partículas, e uma vez que a grande maioria dos sistemas aquosos coloidais é estabilizada por repulsão eletrostática, quanto maiores forem as forças repulsivas entre partículas, menor será a probabilidade delas se aproximarem e formarem agregados, conduzindo assim a um sistema coloidal mais estável (SCHULTZ *et al*., 2008). A carga positiva (+) dos lipossomas, originalmente negativas (-), sugerem uma interação entre a quitosana com a camada lipídica formada essencialmente por fosfatidilcolina de soja e colesterol. A manutenção da característica positiva (+) é sugestivo de que o revestimento foi efetivo e prolongado, confirmando a estabilização do sistema.

A manutenção do teor de anfotericina B nos lipossomas peguilados revestidos com quitosana indicam que o sistema foi capaz de manter a integridade das moléculas. A AmB é extremamente instável quando em solução, conforme observado nos estudos de degradação forçada intencional para avaliação da seletividade do método analítico em que, quando exposta

à umidade, com a adição de 1,0 mL de água por 10 min à 70 °C já foi possível observar degradação com formação de picos secundários observados na cromatografia (Figura 12, d).

Figura 22 - Evolução temporal dos valores de resposta médios para tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e teor para os lipossomas peguilados de antotericina B revestidos com quitosana





Fonte: elaboração própria.

5.5 Ensaio de permeação *ex vivo*

5.5.1 Escolha do meio receptor

Foram encontrados poucos artigos que descrevem testes de permeação *ex vivo* para o princípio ativo anfotericina B. Hussain *et al*. (2015) utilizaram como meio receptor tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,4 contendo 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) no ensaio de permeação *ex vivo* utilizando tecido abdominal de ratos albinos na avaliação da permeação de nanoemulsão de AmB para uso tópico. O tampão fosfato pH 7,4 com 20% de metanol e pele extraída de orelha de porco foram utilizados nos ensaios de permeação realizados por Santos *et al*. (2012) na avaliação de diferentes nanocarreadores de AmB para uso tópico.

Uma solubilidade de 0,01 $mg.mL^{-1}$ para a anfotericina B é adequada para a condição *sink* considerando o uso de 200 µL da suspensão de lipossomas (220 µg de AmB) em 17 mL do meio receptor (capacidade do compartimento da célula de Franz) no ensaio.

Os resultados são apresentados na Tabela 15 e demonstram que somente o uso do tensoativo Triton X-100® nas concentrações de 2% e 5% (m/m) levaram a valores de solubilidade adequados ao fármaco no meio receptor, demonstrando capacidade de fornecer condições de não saturação.

Tabela 15 - Solubilidade da anfotericina B em diferentes candidatos à meio receptor

Meio receptor	Concentração no T0 (mg/mL)	Concentração no equilíbrio (mg/mL)
FNS + Triton X-100® 1%	0,00089	0,00336
FNS + Triton X-100® 2%	0,00276	0,01069
FNS + Triton X-100® 5%	0,00465	0,02086
FNS + DMSO 2%	0,00060	0,00072
FNS + DMSO 5%	0,00063	0,00090
FNS + Metanol 20%	0,00072	0,00186
FNS + Metanol 40%	0,00352	0,00557

Legenda: FNS = Fluído nasal simulado; T0 = Tempo zero; Triton X-100®: iso-octylphenoxy polyethoxy etanol; DMSO = Dimetilsulfóxido.

Fonte: Elaboração própria

5.5.2 Permeação *ex vivo* de anfotericina B

Conforme resultados demonstrados na Tabela 16, após 24 h de ensaio, uma ínfima quantidade de AmB foi observada após permeação da amostra revestida com quitosana (+) nos meios receptores FNS com 2% de Triton X-100® (2,99 µg) e FNS com 5% de Triton X-100® (2,98 µg). No ensaio realizado com o meio receptor FNS com 20% de metanol, assim como para as amostras não revestidas com quitosana (-), a quantidade de AmB permeada foi inferior ao limite de detecção do método analítico (0,05 µg/mL). Também não foram observadas interferências na cromatografia após injeção das soluções branco.

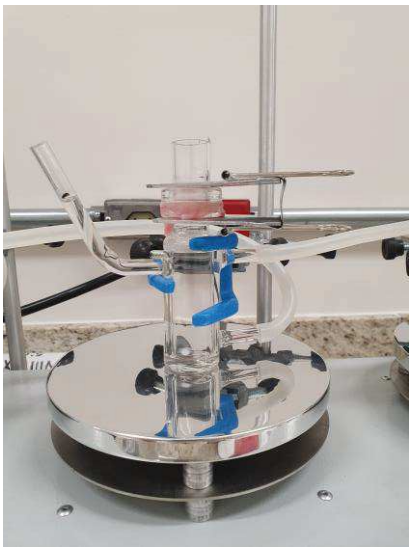
Tabela 16 – Permeação *ex vivo* através de membrana nasal suína após 24 h

Amostra	Meio receptor	Permeação (µg) (média (n=2) ± σ)	% da dose permeada
LipPeAmB (-)	FNS + Triton X-100® 2%	< LD	--
LipPeAmB-CH (+)		2,99 ± 0,06	1,36
LipPeAmB (-)	FNS + Triton X-100® 5%	< LD	--
LipPeAmB-CH (+)		2,98 ± 0,12	1,35
LipPeAmB (-)	FNS + Metanol 20%	< LD	--
LipPeAmB-CH (+)		< LD	--

Legenda: σ = desvio padrão. (-) = Potencial zeta negativo. (+) = Potencial zeta positivo. LD = Limite de detecção (0,05 µg/mL)

Fonte: Elaboração própria

Figura 23 – Ensaio de permeação em célula de difusão de Franz com membrana nasal suína



Fonte: elaboração própria.

Os resultados obtidos estão em concordância com os experimentos realizados por Santos *et al* (2012) em que a permeação de nanoemulsões de AmB com tamanho de partícula de 239 nm e potencial zeta positivo de 35 mV foi negligenciável. Os autores atribuíram o resultado de ausência de permeação ao fato da molécula de AmB possuir alta hidrofobicidade e alto tamanho molecular.

Os lipossomas peguilados revestidos com quitosana, com carga positiva (+) foram capazes de permear todo o tecido e atingir o meio receptor, diferente daqueles não revestidos com quitosana (-). Possivelmente devido ao fato da interação entre a carga negativa da superfície celular da membrana nasal e a carga positiva dos lipossomas, associada ao tamanho de vesícula nanométrico (BONACCORSO *et al*., 2017; SUNDERLAND *et al*., 2006).

Nem sempre é possível estabelecer uma correlação entre experimentos *in vitro* e o comportamento *in vivo* devido aos vários fluxos biológicos difíceis de serem reproduzidos laboratorialmente. Os ensaios *in vitro* normalmente são recomendados para avaliação de controle de qualidade lote a lote do medicamento fabricado, a fim de prevenir alterações que possam refletir no efeito terapêutico *in vivo* (U.S. Food and Drug Administration, 1997).

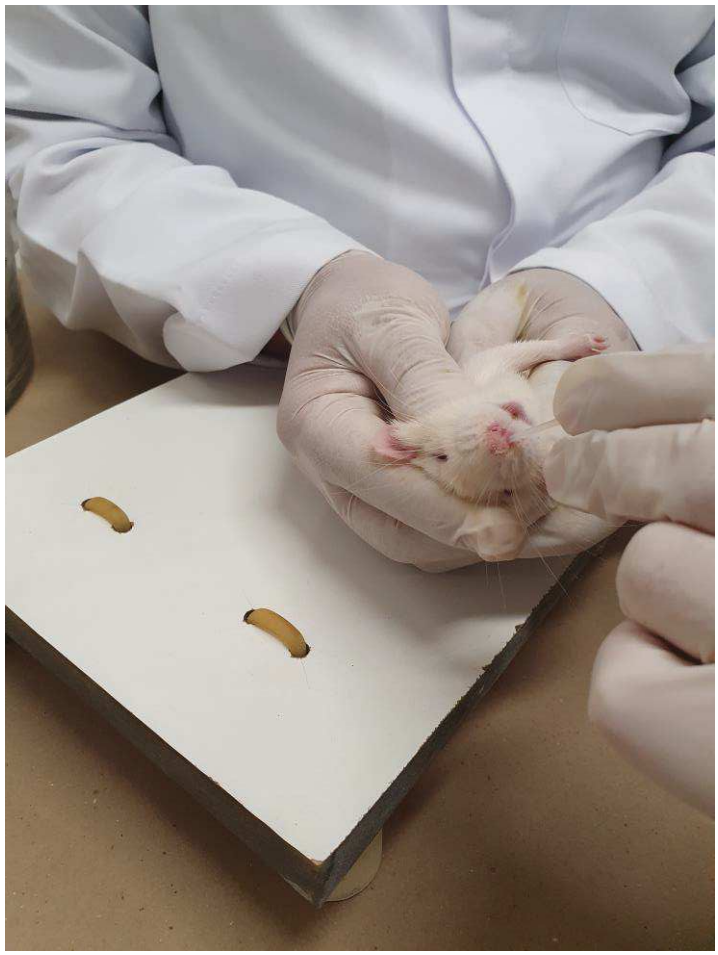
5.6 Avaliação da biodisponibilidade *in vivo*

Foi realizado um protocolo piloto, com 8 animais, onde grupos contendo 2 animais foram sacrificados e tiveram o cérebro removido para análise em diferentes períodos de exposição de forma a avaliar o tempo em que fosse atingido o máximo de absorção do fármaco e a técnica analítica de extração e quantificação da AmB no material biológico. A intenção seria repetir o experimento, com um número maior de animais, no período selecionado neste estudo piloto, comparando o sistema lipossomal revestido com quitosana (potencial zeta +) e não revestido (potencial zeta -) para comparação do efeito da quitosana na permeação.

Após 30 min (n=2), 60 min (n=2), 120 min (n=2) e 240 min (n=2) da administração de 100 µL do lipossoma peguilado revestido com quitosona (110 µg de AmB), que foram divididos em 2 doses de 25 µL em cada narina do animal (Figura 24), o material cerebral foi removido e imediatamente analisado para determinação da concentração de anfotericina B.

Não foi observado expulsão do material e nem obstrução nasal, indicando que a formulação não causou irritação na mucosa nasal dos animais.

Figura 24 – Administração nasal da suspensão de lipossomas peguilados de AmB revestidos com quitosana em rato Wistar



Fonte: elaboração própria

Após análise para quantificação da AmB nas amostras obtidas, não foi detectado o fármaco no cérebro dos animais em nenhum dos períodos avaliados.

De forma a avaliar a exatidão do processo de extração, um material cerebral foi contaminado com 25 µL do lipossoma peguilado revestido com quitosana contento anfotericina B (27,5µg). O material passou pelo processo de extração e análise em CLAE, em que foram recuperados 5,64 µg, ou seja, neste ensaio foi obtido 20% de recuperação. Este resultado indicou a necessidade do uso de um padrão interno para corrigir a deficiência da extração, assim como aperfeiçoamento da técnica de forma a levar a uma melhor capacidade de extração. Vale ressaltar que o método analítico foi capaz de identificar o anestésico pentobarbital nas amostras.

Ainda que 1% do total administrado (1,1 µg de AmB) tivesse sido permeado e fosse recuperado em um nível de 20% da capacidade de extração (0,22 µg de AmB), teria sido possível detectar o fármaco no material biológico após extração, haja visto que o limite de detecção do método cromatográfico foi de 0,05 µg, que equivale à 0,45% do total administrado.

A literatura reporta que a baixa biodisponibilidade oral da AmB é devido à sua baixa solubilidade e instabilidade no trato gastrointestinal (SPADARI *et al*., 2020; CHAUD *et al*., 2020). Assim, para evitar estes efeitos, era esperado que a liberação naso-cerebral aumentasse a biodisponibilidade da AmB. No entanto, isso não foi observado experimentalmente. Algumas sugestões são propostas para explicar os resultados obtidos:

i) O sistema pode ter sido removido da cavidade nasal pelo mecanismo de depuração mucociliar, sendo direcionado para o trato gastrointestinal ou sistema respiratório. A utilização da quitosana como revestimento dos lipossomas peguilados de AmB, não somente teve como objetivo fornecer carga superficial positiva às vesículas, mas também foi almejado seu potencial de ação como agente de mucoadesão para evitar esta remoção imediata (KUMAR *et al*., 2020; YU *et al*., 2019). A avaliação de outros sistemas de mucoadesão como agentes geleificantes e géis termorresponsivos poderia ser uma alternativa viável (GADHAVE; KOKARE, 2019; KAUR *et al*., 2016).

ii) O fármaco pode não ter permeado a mucosa. O uso do ativador de superfície polietilenoglicol, na forma de Lipoid PE® (polietilenoglicol complexado com fosfatidilcolina de soja na proporção 18:0/18:0-PEG 2000) visou fornecer flexibilidade às vesículas, no entanto, pode não ter sido suficiente, visto a falta de permeação obtida nos estudos de permeação *ex vivo* com a utilização de membrana nasal suína em sistema de difusão em células de Franz. O fármaco AmB, devido à alta hidrofobicidade e tamanho molecular de 984 Da podem ter tornado a camada lipídica rígida. A utilização de uma concentração menor de fármaco poderia reduzir este efeito, no entanto, diminuiria também a ação farmacológica esperada. Tornar a AmB mais hidrossolúvel na faixa de pH fisiológico, como com a obtenção de uma dispersão sólida, poderia permitir que o fármaco fosse encapsulado no núcleo aquoso do lipossoma, o que levaria à uma maior liberdade de flexibilidade da camada lipídica do lipossoma (MEHENNI *et al*., 2018).

iii) A permeação pode ter sido atingida, no entanto o fármaco pode ter sido absorvido pelo sistema circulatório e direcionado para outros compartimentos do organismo. A quantificação da AmB no plasma sanguíneo poderia ter sido indicativa desta hipótese. A análise paralela da quantificação do ativo não só no cérebro, como no sistema circulatório pode ser importante na determinação da farmacocinética do sistema lipossomal após administração.

iv) A administração nasal da suspensão de lipossomas no estudo *in vivo* pode não ter sido em profundidade suficiente dentro da cavidade nasal. Devido ao tamanho pequeno do

nariz do animal, a administração da suspensão de lipossomas ocorreu na porção frontal, que corresponde à região vestibular. O uso de dispositivos específicos, como os formadores de spray, poderia ter auxiliado na administração do medicamento nas porções nasais mais profundas como as regiões respiratórias e olfativas, favorecendo o transporte naso-cerebral através dos nervos olfatório e trigeminal (COSTA *et al*., 2019).

v) O aprimoramento da técnica de extração, assim como um ensaio de exatidão, com tecido cerebral dopado de diferentes concentrações de AmB e o uso de padrão interno poderiam auxiliar no entendimento da capacidade de extração da técnica analítica.

6 CONCLUSÕES

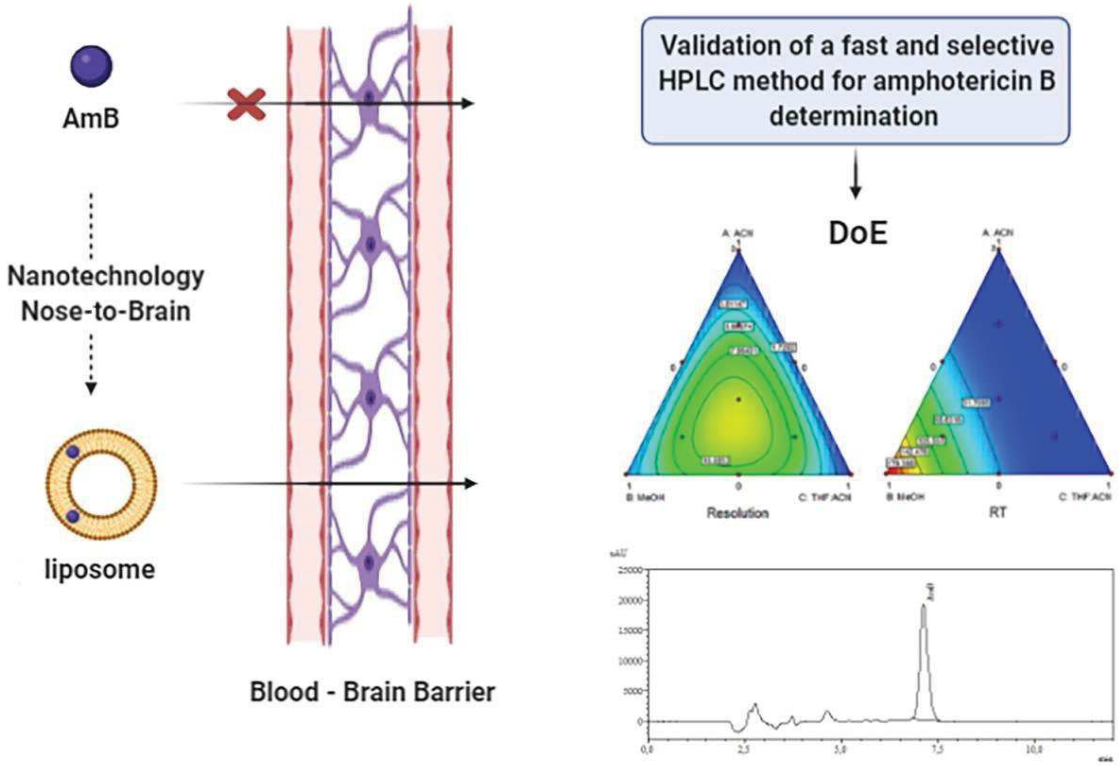
A composição que constitui o sistema lipossomal, assim como suas características, desempenham um papel importante na farmacocinética, assim como na biodisponibilidade do fármaco no órgão alvo. Nesta pesquisa, lipossomas denominados LipPeAmB-CH foram formulados com a utilização de fosfatidilcolina de soja, colesterol, polietilenoglicol e revestidos com quitosana, através de um planejamento fatorial, em duas etapas, com o objetivo de incorporar a maior concentração possível do fármaco anfotericina B (Figura 25). Os estudos de caracterização da formulação lipossomal LipPeAmB-CH mostraram um tamanho de vesícula uniforme (60,64 ± 0,62 nm), que favorecem o potencial de absorção intranasal, baixo PDI (0,12 ± 0,056), que é considerado ideal para formulação lipossomal e um alto valor de potencial zeta (17,88 ± 2,02 mV) que, além de essencial para composição de um sistema estável monodisperso, apresentou carga positiva (+), o que favorece a permeação paracelular através das junções *tight*, de carácter negativo. A alta eficiência de encapsulação (98,3% ± 0,02%) para AmB, pode ser atribuída à composição lipídica utilizada no preparo da formulação lipossomal, confirmando a alta hidrofobicidade da AmB e sua afinidade com a camada lipídica do lipossoma. A manutenção da concentração de AmB no decorrer dos meses de armazenamento demonstraram que a formulação propiciou alta estabilidade para um fármaco bastante suscetível à degradação, quando na forma livre. A adição de polietilenoglicol complexado com fosfatidilcolina (Lipoid PE®) demonstrou fornecer flexibilidade às vesículas, que apresentaram capacidade de deformação ao serem extrusadas em membranas com 100 nm e 50 nm de porosidade, levando à lipossomas estáveis.

A formulação LipPeAmB-CH obtida neste estudo não apresentou o desempenho *in vivo* esperado, e este fato pode ser atribuído tanto à estratégia da formulação, como à limitações analíticas, assim como ao modelo empregado na avaliação. Nem sempre é possível extrapolar os resultados obtidos em modelos animais, sendo eles positivos ou negativos, para o modelo humano, dada as diferenças anatômicas da cavidade nasal entre humanos e ratos. Esta pode ser uma observação a ser levada em consideração na avaliação dos resultados obtidos, em que seriam necessários ensaios clínicos para avaliar, de fato, o comportamento da formulação e os mecanismos envolvidos.

Desta forma, para obtenção da permeação naso-cerebral da AmB, se faz necessária a associação de mais estratégias, como a inserção de promotores de mucoadesão e permeação. No entanto, este estudo foi importante para abrir novas perspectivas e ser um ponto de partida para o desenvolvimento de sistemas de liberação naso-cerebral que promovam a absorção do

fármaco de forma efetiva, criando alternativas para o tratamento de patologias que acometem o SNC.

Figura 25 - Trabalho de pesquisa desenvolvido



Fonte: Elaboração própria.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

A evolução sequencial do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa permitiu extrair algumas conclusões importantes que direcionam para uma visão mais profunda em relação à caracterização do produto final desenvolvido, lipossoma peguilado revestido com quitosana, para liberação naso-cerebral de AmB. Este item apresenta, sucintamente, uma série de áreas potencialmente frutíferas para pesquisas futuras.

- Aplicação de técnicas para aumentar a solubilidade da anfotericina B, como co-precipitação com substâncias hidrossolúveis para formar uma dispersão sólida que poderia ser dissolvida na fase aquosa e incorporada no núcleo dos lipossomas, tornando a camada lipídica menos rígida e mais flexível.

- Avaliação de outros sistemas de mucoadesão, como géis termorresponsivos, para aumento do tempo de adesão da AmB na mucosa nasal, favorecendo a permeação.

- Adição de agentes de permeação na composição dos lipossomas que promovam alterações epiteliais para favorecer o transporte do sistema através das camadas biológicas.

- Aprimoramento da técnica analítica de extração do fármaco de tecidos orgânicos e validação bioanalítica.

- Elaboração de dispositivos para administração nasal em modelo animal.

- Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* em culturas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* para verificar a eficácia do produto desenvolvido na meningite criptocócica.

- Avaliação da toxicidade *in vitro* da formulação desenvolvida através de estudos com células epiteliais do cérebro humano (linhagem H4) e células epiteliais nasais extraídas de nariz humano.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, M.; SARAF, SW.; SARAF, SH.; ANTIMISIARIS, S. G.; CHOUGULE, M. B.; SHOYELE, S. A.; ALEXANDER, A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 281, p. 139–177, 2018.

AGRAWAL, P.; SONALI; SINGH, R. P.; SHARMA, G.; MEHATA, A. K.; SINGH, S.; MUTHU, M. S. Bioadhesive micelles of d-α-tocopherol polyethylene glycol succinate 1000: Synergism of chitosan and transferrin in targeted drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 277–288, 2017.

AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S; JOO, S. W.; ZARGHAMI, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; NEJATI-KOSHKI, K. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 102, p. 1-9, 2013.

AL ASMARI, A. K.; ULLAH, Z.; TARIQ, M.; FATANI, A. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of intranasally administered liposomal formulation of donepezil. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 205–215, 2016.

ALEXANDER, A.; AGRAWAL, M.; UDDIN, A.; SIDDIQUE, S.; SHEHATA, A. M.; SHAKER, M. A.; RAHMAN S. A. U.; ABDUL, M. I. M.; SHAKER, M. A. Recent expansions of novel strategies towards the drug targeting into the brain. **International Journal of Nanomedicine**, n. 14, p. 5895-5909, 2019.

ALOMRANI, A. H.; GAMAL, A. S.; AMRO, A. A.; BADRAN, M. Itraconazole-hydroxypropyl-cyclodextrin loaded deformable liposomes: In vitro skin penetration studies and antifungal efficacyusing *Candida albicans* as model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 74–81, 2014.

ALSHRAIM, M. O.; SANGI, S.; HARISA, G. I.; ALOMRANI, A. H.; YUSUF, O.; BADRAN, M. M. Chitosan-Coated Flexible Liposomes Magnify the Anticancer Activity and Bioavailability of Docetaxel: Impact on Composition. **Molecules**, v. 24, n. 250, p. 1-14, 2019.

ANDREOLI, T. E.; MONAHAN, M. The Interaction of Polyene Antibiotics with Thin Lipid Membranes. **The Journal of General Physiology**, v. 52, n. 2, p. 300–325, 1968.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution *and in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413–420, 1995.

ARUMUGAM, K.; SUBRAMANIAN, G. S.; MALLAYASAMY, S. R.; AVERINENI, R. K.; REDDY, M. S.; UDUPA, N. A study of rivastigmine liposomes for delivery into the brain through intranasal route. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, p. 287–297, 2008.

BAHADUR, S.; PATHAK, K. Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 1, p. 19–31, 2012.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238–252, 1965.

BAOMIAO, D.; XIANGZHOU, Y.; LI, L.; HUALIN, Y. Evaluation of iron transport from ferrous glycinate liposomes using Caco-2 cell model. **African Health Sciences**, v. 17, n. 3, 2017.

BARLETT, K.; YAU, E.; HARTSEL, S. C.; HAMER, A.; TSAI, G.; BIZZOTTO, D.; WASAN, K. M. Effect of heat-treated amphotericin B on renal and fungal cytotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 333-336, 2004.

BARMPALEXIS, P.; KANAZE, F. I.; GEORGARAKIS, E. Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1192−1202, 2009.

BARNADAS-RODRÍGUEZ, R.; SABE´S, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 213, p. 175–186, 2001.

BARROS, C. T.; RIOS, A. C.; ALVES, T. F. R.; BATAIN, F.; CRESCENCIO, K. M. M.; LOPES, L. J.; ZIELIŃSKA, A.; SEVERINO, P.; MAZZOLA, P. G.; SOUTO, E. B.; CHAUD, M. V. Cachexia: Pathophysiology and Ghrelin Liposomes for Nose-to-Brain Delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 5974-5990, 2020.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BEKERSKY, I.; FIELDING, R. M.; DRESSLER, D. E.; LEE, J. W.; BUELL, D. N.; WALSH, T. J. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 46, p. 828–833, 2002.

BONACCORSO, A.; MUSUMECI, T.; SERAPIDE, M. F.; PELLITTERI, R.; UCHEGBU, I. F.; PUGLISI, G. Nose to brain delivery in rats: effect of surface charge of rhodamine B labeled nanocarriers on brain subregion localization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 297-306, 2017.

BOURGANIS, V.; KAMMONA, O.; ALEXOPOULOS, A.; KIPARISSIDES, C. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 128, p. 337–362, 2018.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine,** v. 10, p. 975–999, 2015.

BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 512-531, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2017.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationary Office, 2020.

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J.P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 55, p. 323–328, 2003.

CEVC, G.; SCHÄTZLEIN, A. Ultraderformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1564, p. 21– 30, 2002.

CHANG, Y.; WANG, Y-H.; HU, C-Q. Simultaneous determination of purity and potency of amphotericin B by HPLC. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 735–739, 2011.

CHATURVEDI, M.; KUMAR, M.; PATHAK, K. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, vol. 2, n. 4, 2011.

CHAUD, M. V.; RIOS, A. C.; SANTOS, C. A.; BARROS, C. T.; SOUZA, J. F.; ALVES, T. F. R. Nanostructure self-assembly for direct nose-to-brain drug delivery: a novel approach for cryptococcal meningitis. *In*: RAI, M.; ABD-ELSALAM, K. A. (org.). **Nanomycotoxicology**: Treating Mycotoxins in the Nano Way. Academic Press, p. 449-480, 2020.

CHEN, H.; HAO, P.; PANPAN, L.; HUI, W.; XIN, W.; WEISAN, P.; YUE, Y. The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 455–462, 2016.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC. Brasil: Edgard Blücher, 1998.

CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Comparison of Fungizone, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for treatment of systemic murine cryptococcosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 899–902, 1998.

COSTA, C.; MOREIRA, J. N.; AMARAL, M. H.; SOUSA LOBO, J. M.; SILVA, A. C. Nose-to-brain delivery of lipid-based nanosystems for epileptic seizures and anxiety crisis. **Journal of Controlled Release**, v. 295, p. 187-200, 2019.

CROWE, T. P.; GREENLEE, M. H. W.; KANTHASAMY, A. G.; HSU, W. H. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. **Life Sciences,** v. 195, p. 44–52, 2018.

DA RÓZ, A. L.; LEITE, F. L.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA JR, O. N. Nanoestruturas princípios e aplicações (Coleção Nanociência e Nanotecnologia), vol. 1, Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

DEAMER, D. W. Preparation and properties of ether-injection liposomes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 308, p. 250–258, 1978.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY II, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1654–1673, 2010.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. **Clinical Infectious Disease**, v. 30, p. 653-657, 2000.

DRAGICEVIC-CURIC, N.; GRAFE, S.; GITTER, B.; WINTER, S.; FAHR, F. Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: In vitro skin penetration studies and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 384, p. 100–108, 2010.

DUTCHER, J. D. The discovery and development of amphotericin b. **Disease Chest**, v. 54, n. 1, p. 296-298, 1968.

EL ZAAFARANY, G. M.; AWAD, G. A.; HOLAYEL, S. M.; MORTADA, N. D. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 397, p. 164–172, 2010.

ELNAGGAR, Y. S. R.; ETMAN, S. M.; ABDELMONSIF, D. A.; ABDALLAH, O. Y. Intranasal piperine-loaded chitosan nanoparticles as brain-targeted therapy in Alzheimer's disease: Optimization, Biological Efficacy, and Potential Toxicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 3544–3556, 2015.

ELSABEE, M. Z.; ABDOU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1819–1841, 2013.

ESPADA, R.; JOSA, J. M.; VALDESPINA, S.; DEA, M. A.; BALLESTEROS, M. P.; ALUNDA, J. M.; TORRADO, J. J. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. **Biomedical chromatography**, v. 22, p. 402–407, 2008.

ESPINOZA, L. C.; SILVA-ABREU, M.; CLARES, B.; RODRÍGUEZ-LAGUNAS, M. J.; HALBAUT, L.; CAÑAS, M. A.; CALPENA, A. C. Formulation strategies to improve nose-to-brain delivery of donepezil. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 64, 2019.

EQUIPE ESTATCAMP (2014). *Software* Action versão 3.6. Estatcamp-Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. Disponível em: http://www.portalaction.com.br/. Acesso em: 11 fev. 2019.

FAZIL, M.; SHADAB, Md.; HAQUE, S.; KUMAR, M.; BABOOTA, S.; SAHNI, J. K.; ALI, J. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 6–15, 2012.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 167-192, 2006.

GADHAVE, D. G.; KOKARE, C. R. Nanostructured lipid carriers engineered for intranasal delivery of teriflunomide in multiple sclerosis: Optimization and *in vivo* studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 45, n. 5, p. 839-851, 2019.

GLUKHOVA, O. E. Liposome drug delivery system across endothelial plasma membrane: Role of distance between endothelial cells and blood flow rate. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1875, 2020.

GOLENSER, J.; DOMB, A. New formulations and derivates of amphotericin B for treatment of leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, v. 6, p. 153-162, 2006.

GU, F.; MA W.; MENG, G.; WU C.; WANG, Y. Preparation and *in vivo* evaluation of a gel-based nasal delivery system for risperidone. **Acta Pharmaceutica**, v. 66, p. 555–562, 2016.

HANAFY, A. S.; FARID, R. M.; HELMY, M. W.; ELGAMAL, S. S. Pharmacological, toxicological and neuronal localization assessment of galantamine/chitosan complex nanoparticles in rats: future potential contribution in Alzheimer's disease management. **Drug Delivery**, v. 23, n.8, p. 3111-3122, 2016.

HENAO-MARTINEZ, A. F.; VELA-DUARTE, D. Cryptococcal meningitis and other opportunistic fungal infections of the central nervous system: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **The Microbiology of Central Nervous System Infections**, p. 261–278, 2018.

HONDA, H.; WARREN, D. K. Central nervous system infections: Meningitis and brain abscess. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, p. 609–623, 2009.

HONG, S. S.; OH, K. T.; CHOI, H. G.; LIM, S. J. Liposomal formulations for nose-to-brain delivery: Recent advances and future perspectives. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 10, p. 540-558, 2019.

HUSSAIN, A.; SAMAD, A.; SINGH, S. K.; AHSAN, M. N.; FARUK, A.; AHMED, F. J. Enhanced stability and permeation potential of nanoemulsion containing sefsol-218 oil for topical delivery of amphotericin B. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 5, p. 780-790, 2015.

ILLUM, L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 3–17, 2004.

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 785–792, 2011.

KATARE, Y. K.; PIAZZA, J. E.; BHANDARI, J.; DAYA, R. P.; AKILAN, K.; SIMPSON, M. J.; HOARE, T.; MISHRA, R. K. Intranasal delivery of antipsychotic drugs. **Schizophrenia Research**, v. 184, p. 2-13, 2017.

KAUR, P.; GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A. K. *In situ* nasal gel drug delivery: A novel approach for brain targeting through the mucosal membrane. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, p. 1167–1176, 2016.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010.

KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 625–634, 2008.

KHAN, A. R.; LIU M; KHAN, M. W.; ZHAI, G. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. **Journal of Controlled Release**, v. 28, n. 268, p. 364-389, 2017.

KOZLOVSKAYA, L.; ABOU-KAOUD, M.; STEPENSKY, D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 133–140, 2014.

KUMAR, S.; DUTTA, J.; DUTTA, P. K.; KOH, J. A systematic study on chitosan-liposome based systems for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 470-481, 2020.

KUMAR, D.; TRIVEDI, N.; SRIVASTAVA, S.; DIXIT, R. K. Development and validation of stability indicating HPLC-UV method for the determination of amphotericin B in bulk and dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 289-293, 2014.

KUMAR, M.; PATHAK, K.; MISRA, A. Formulation and characterization of nanoemulsion-based drug delivery system of risperidone. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 4, p. 387–395, 2009.

LAI, F.; FADDA, A. M.; SINICO, C. Liposomes for brain delivery. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 10, p.1003–1022, 2013.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology,** v. 1, n. 2, p. 147-168, 2012.

LI, Y.; XU, P.; HE, D.; XU, B.; TU, J.; SHEN, Y. Long-circulating thermosensitive liposomes for the targeted drug delivery of oxaliplatin. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 6721-6734, 2020.

LIU, T. B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, n. 1, p.173–181, 2012.

MADANE, R. G.; MAHAJAN, H. S. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and *in vivo* study. **Drug delivery**, v. 23, n. 4, p. 1326-1334, 2016.

MAHAJAN, H. S., GATTANI S. G. Nasal administration of ondansetron using a novel microspheres delivery system. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 14, n. 2, p. 226–232, 2009.

MALHOTRA, A.; RAO, Q.; KELLY, S.; SCHWARTZ, D.; CHOW, R. A rare presentation of cryptococcal meningoencephalitis in an immunocompetent individual. **Clinical Practice**, v. 7, p. 121–123, 2017.

MARIANECCI, C.; RINALDI, F; HANIEH, P. N.; DI MARZIO, L.; PAOLINO, D.; CARAFA, M. Drug delivery in overcoming the blood–brain barrier: role of nasal mucosal grafting. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 325–335, 2017.

MATARAZZO, A. P.; ELISEI, L. M. S.; CARVALHO, F. C.; BONFÍLIO, R.; RUELA, A. L. M.; GALDINO, G.; PEREIRA, G. R. Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain. E**uropean Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 159, 2021.

MEHENNI, L.; LAHIANI-SKIBA, M.; LADAM, G.; HALLOUARD, F.; SKIBA, M. Preparation and characterization of spherical amorphous solid dispersion with amphotericin B. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4. 2018.

MERKUS, F. W.; VERHOEF, J. C.; SCHIPPER, N. G.; MARTTIN, E. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, p. 13-28, 1998.

MISTRY, A.; STOLNIK, S.; ILLUM, L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, p. 146–157, 2009.

NARAYAN, R.; SINGH, M.; RANJAN, O.; NAYAK, Y.; GARG, S.; SHAVI, G. V.; NAYAK, U. Y. Development of risperidone liposomes for brain targeting through intranasal route. **Life Sciences**, v. 163, p. 38–45, 2016.

NARENDRA; MEHATA, A. K.; VISWANADH, M. K.; SONKAR, R.; PAWDE, D. M.; PRIYA, V.; SINGH, M.; KOCH, B.; MUTHU, M. S. Formulation and in vitro evaluation of upconversion nanoparticle-loaded liposomes for brain cancer. **Therapeutic Delivery**, v. 9, p. 557-571, 2020.

NISINI, R.; POERIO, N.; MARIOTTI, S.; DE SANTIS, F.; FRAZIANO, M. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

NOSOVA, A. S.; KOLOSKOVA, O. O.; NIKONOVA, A. A.; SIMONOVA, V. A.; SMIRNOV, V. V.; KUDLAY, D.; KHAITOV, M. R. Diversity of PEGylation methods of liposomes and their influence on RNA delivery. **Medchemcomm**, v. 10, n. 3, p. 369-377, 2019.

ÖSTH, K.; GRASJÖ, J.; BJÖRK, E. A new method for drug transport studies on pig nasal mucosa using a horizontal ussing chamber. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 5, p. 1259–1273, 2002.

PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; OIANO-NETO, J.; ARAUJO, M. C. P.; ROSA, J. S.; MONTE, P. H. F. Recuperação e reutilização de acetonitrila utilizada em análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência. *In:* ENCONTRO NACIONAL SOBRE METODOLOGIAS E GESTÃO DE LABORATÓRIOS DA EMBRAPA, 14.; SIMPÓSIO SOBRE METODOLOGIAS DE LABORATÓRIOS DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1., 2009, Rio de Janeiro. **Anais** [...] Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010. Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29551/1/2010-306.pdf. Acesso em: 3 set. 2019.

PARDESHI, C. V.; BELGAMWAR, V. S. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 10, n. 7, p. 957-972, 2013.

PATIL, Y. P.; JADHAV S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 177, p. 8–18, 2014.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New developments in liposomal drug delivery. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 10938−10966, 2015.

PEREZ, A. P.; ALTUBE, M. J.; SCHILRREFF, P.; APEZTEGUIA, G.; CELES, F. S.; ZACCHINO, S.; OLIVEIRA, C. I.; ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 139, p. 190–198, 2015.

PIRES, A.; FORTUNA, A.; ALVES, G.; FALCÃO, A. Intranasal drug delivery: How, why and what for? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 12, n. 3, p. 288–311, 2009.

PIRES, P. C.; SANTOS, A. O. Nanosystems in nose-to-brain drug delivery: A review of non-clinical brain targeting studies. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 89–100, 2018.

QUAGLIARIELLO, V.; MASARONE, M.; ARMENIA, E.; GIUDICE, A.; BARBARISI, M.; CARAGLIA, M.; BARBARISI, A.; PERSICO, M. Chitosan-coated liposomes loaded with butyric acid demonstrate anticancer and anti-inflammatory activity in human hepatoma HepG2 cells. **Oncology Reports**, v. 41, p. 1476-1486, 2019.

RUIGROK, M. J. R.; de LANGE, E. C. M. Emerging insights for translational pharmacokinetic and pharmacokinetic-pharmacodynamic studies: Towards prediction of nose-to-brain transport in humans. **AAPS Journal**, v. 17, n. 3, 2015.

RUSCHEL, M. A. P.; THAPA, B. **Cryptococcal meningitis**. StatPearls Publishing; 2020. E-book. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525986/. Acesso em: 6 jan. 2021.

SAAG, M. S.; GRAYBILL, R. J.; LARSEN, R. A.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; POWDERLY, W. G.; DISMUKES, W. E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 710–718, 2000.

SALADE, L.; WAUTHOZ, N.; DELEU, M.; VERMEERSCH, M.; DE VRIESE, C.; AMIGHI, K.; GOOLE, J. Development of coated liposomes loaded with ghrelin for nose-to-brain delivery for the treatment of cachexia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 8531–8543, 2017.

SALAMA, H. A.; MAHMOUD, A. A.; KAMEL A. O.; HADY, M. A.; AWAD, G. A. S. Brain delivery of olanzapine by intranasal administration of transfersomal vesicles. **Journal of Liposome Research**, v. 22, n. 4, p. 336-45, 2012.

SALVA, E.; TURAN, S.O.; EREN, F.; AKBUGA, J. The enhancement of gene silencing efficiency with chitosan-coated liposome formulations of siRNAs targeting HIF-1α and VEGF. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, p. 147–154, 2015.

SANTOS, C. M.; OLIVEIRA, R. B.; ARANTES, V. T.; CALDEIRA, L. R.; OLIVEIRA, M. C.; EGITO, E. S. T.; FERREIRA, L. A. M. Amphotericin B-loaded nanocarriers for topical

treatment of cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, vol. 8, p. 322–329, 2012.

SCHUBERT, R. Liposome preparation by detergent removal. **Methods in Enzymology**, v. 367, p. 46-70, 2003.

SEJU, U.; KUMAR, A.; SAWANT, K. K. Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: *In vitro* and *in vivo* studies. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 12, p. 4169–4176, 2011.

SCHULTZ, N.; METREVELI, G.; FRANZREB, M.; FRIMMEL, F. H.; SYLDATK, C. Zeta potential measurements as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 39-44, 2008.

SOUZA, I. F. F.; SANTOS, T. Q.; PLACIDO, R. V.; MANGERONA, B. A.; CARVALHO, F. C.; BORALLI, V. B.; RUELA, A. L. M.; PEREIRA, G. R. The liquid crystalline phase behaviour of a nasal formulation modifies the brain disposition of donepezil in rats in the treatment of Alzheimer's disease. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, 2021.

SPADARI, C. C.; WIRTH, F.; LOPES, L. B.; ISHIDA, K. New approaches for cryptococcosis treatment. **Microorganisms**, v. 8, p. 613-628, 2020.

STANO, P.; BUFALI, S.; PISANO, C.; BUCCI, F.; BARBARINO, M.; SANTANIELLO, M.; CARMINATI, P.; LUISI, P. L. Novel camptothecin analogue (gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method. **Journal of Liposome Research**, v. 14, n.1-2, p. 87–109, 2004.

STEVENS, D. A. Overview of amphotericin B colloidal dispersion (Amphocil). **Journal of Infection,** v. 28 p. 45–49, 1994.

SPUCH, C., NAVARRO, C. Lipossomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer´s disease and Parkinson´s disease). **Journal of Drug Delivery**, 2011.

SUN, Y.; SHI, K.; WAN, F.; CUI, F. Methotrexate-loaded microspheres for nose to brain delivery: *in vitro/in vivo* evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 167–174, 2012.

SUNDERLAND, C. J.; STEIERT, M.; TALMADGE, J. E.; DERFUS, A. M.; BARRY, S. E. Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. **Drug Development Research**, v. 67, p. 70–93, 2006.

SZOKA, F. J.; PAPAHADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 9, 1978.

THWALA, L. N.; PRÉAT, V.; CSABA, N. S. Emerging delivery platforms for mucosal administration of biopharmaceuticals: A critical update on nasal, pulmonary and oral routes. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 14, n. 1, p. 23-36, 2016.

TORRADO, J. J.; ESPADA, R.; BALLESTEROS, M. P.; TORRADO-SANTIAGO, S. Amphotericin B formulations and drug targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 2405-2425, 2008.

TROTTA, V.; PAVAN, B.; FERRARO, L., BEGGIATO, S.; TRAINI, D.; DES REIS, L. G.; DALPIAZ, A. Brain targeting of resveratrol by nasal administration of chitosan-coated lipid microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 127, p. 250–259, 2018.

UNITED STATES pharmacopeia (USP 42 – NF 37). 42. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.

UNITED STATES, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. **Nonsterile Semisolid Dosage Forms - Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation**. SUPAC-SS, CMC 7, 1997.

VAN SORGE, N. M.; DORAN, K. S. Defense at the border: the blood–brain barrier versus bacterial foreigners. **Future Microbiology**, v. 7, p. 383–394, 2012.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 95-111, 1995.

VYAS, S. P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, p. 417-432, 2006.

WANG, S.; CHEN, P.; ZHANG, L.; YANG, C.; ZHAI, G. Formulation and evaluation of microemulsion-based in situ ion-sensitive gelling systems for intranasal administration of curcumin. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 831-840, 2012.

WARR, W.; BATES, J. H.; STONE, A. The spectrum of pulmonary cryptococcosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 69, p. 1109–1116, 1968.

WEIZE, L.; YONGQIANG, Z.; NING, Z.; BAOHUA, H.; XIAONING, W.; PENG, K. Pharmacokinetic behavior and efficiency of acetylcholinesterase inhibition in rat brain after intranasal administration of galanthamine hydrobromide loaded flexible liposomes. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, p. 272–279, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The diagnosis, prevention, and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. [S.l: s.n.], 2018.

YU, S.; XU, X.; FENG, J.; LIU, M.; HU, K. Chitosan and chitosan coating nanoparticles for the treatment of brain disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, p. 282–293, 2019.

ZUMBUEHL, O.; WEDER, H. G. Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of Lipid/detergent mixed micelles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 640, p. 252-262, 1981.