

Camila Fernanda Konell

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA
CONTENDO NISTATINA VISANDO A LIBERAÇÃO TÓPICA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia
Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio
Segatto Silva
Coorientadora: Dr^a. Andrea Mayumi
Koroishi

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Konell, Camila Fernanda

Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas de cloridrato de quitosana contendo nistatina visando a liberação tópica. / Camila Fernanda Konell ; orientador, Marcos Antonio Segatto Silva ; coorientadora, Andrea Mayumi Koroishi. - Florianópolis, SC, 2014.
114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Nistatina. 3. Cloridrato de quitosana. 4. Micropartículas poliméricas. 5. Atividade antifúngica. I. Segatto Silva, Marcos Antonio. II. Koroishi, Andrea Mayumi. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.


**“DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE
QUITOSANA CONTENDO NISTATINA VISANDO
LIBERAÇÃO TÓPICA”**

POR

Camila Fernanda Konell

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:**

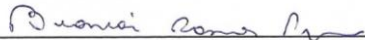
Banca Examinadora:



**Dra. Betina Giehl Zanetti Ramos (NANOVETORES – Membro
Titular)**



Dra. Leticia Mazzarino (UFSC – Membro Titular)



Profa. Dra. Bianca Ramos Pezzini (UNIVILLE – Membro Titular)



Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva (UFSC – Orientador)

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 09 de maio de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais, Alencar e Deise, por todo o apoio e confiança depositados em mim e aos meus irmãos, Bianca e Luccas, pela paciência e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Marcos Segatto, pela confiança, oportunidade e compreensão; E à minha coorientadora, Andrea Koroishi, que confiou e acreditou neste trabalho, repassando-me toda sua experiência na pesquisa e docência;

Às Professoras Hellen Stulzer e Simone Cardoso pela amizade e incentivo; E a todos os colegas do “Lab. CQ”: Gis, Rafa, Vivi, Paola, Cinira, Sana, Dani, Karol, Cassi, Ana Carol, Thaís, Jéssica’s, Gabi, Juli, Bruno, Lari, Amarilis, Pablo, Aline, Marihá, por todas as risadas, cafés e discussões que foram imprescindíveis no período de realização do trabalho, em especial à Manoela K. Riekes pela amizade, dedicação, paciência e diversão;

Aos colaboradores desse trabalho, Thiago Caon e Talitha Caldas, bem como suas orientadoras Cláudia Maria Oliveira Simões e Angela Campos, respectivamente, por toda ajuda, disponibilidade e orientação;

Ao professor Adailton Bortoluzzi, do Departamento de Química desta Universidade, pela confiança e gentileza na utilização do difratômetro de raios X de pó; E à Eliana Endo do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá, que realizou todas as análises de microscopia eletrônica de varredura;

A todos os professores, servidores e demais colegas que contribuíram, de alguma forma, na realização deste trabalho;

À esta Universidade, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Ampara à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR), por todo o apoio financeiro e infraestrutura disponibilizados;

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, confiança e admiração, se não fosse o apoio de vocês, esse sonho seria impossível; Aos “pais” que Floripa me deu, meus tios, Fedra e Djalma que sempre estiveram de ‘portas abertas’; E a toda minha família pelo incentivo sempre;

E, por fim, a Deus, pela vida, família e amigos!

RESUMO

O uso indiscriminado de antimicrobianos na terapêutica tem desencadeado diversos tipos de mecanismos de resistência, o que tem impulsionado cada vez mais pesquisas focando na obtenção de novos fármacos, desenvolvimento ou melhoramento das formulações disponíveis no mercado. A nistatina é um antifúngico poliênico amplamente utilizado no tratamento de candidíases. Seu mecanismo de ação deve-se à ligação ao ergosterol, esteróide presente na membrana celular de fungos patogênicos como a *Candida* sp, promovendo a desestruturação e liberação do seu conteúdo celular. Além disso, a nistatina pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, de modo que sua atividade biológica é impactada por sua baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Neste contexto, sistemas microparticulados de cloridrato de quitosana destinados à via tópica foram desenvolvidos através de *spray drying* e emulsificação/evaporação de solvente seguida de liofilização objetivando um aumento da retenção cutânea e melhorias na atividade microbiológica da nistatina. Os sistemas foram obtidos em diferentes proporções de fármaco:polímero (1:1; 1:2 e 1:3, m/m), sendo caracterizados quanto às suas propriedades cristalinas, térmicas e morfológicas e avaliados no tocante ao teor e eficiência de encapsulação, atividade microbiológica e capacidade de retenção cutânea. Os resultados demonstram adequados valores de eficiência de encapsulação para todas as formulações e parâmetros físico-químicos dependentes da técnica de preparo aplicada. Em relação aos testes microbiológicos frente a cepas de *Candida albicans*, a formulação obtida por *spray drying* na proporção 1:2 (fármaco:polímero, m/m) apresentou o dobro da atividade antifúngica do fármaco puro, resultando em valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de 0,4 µg/mL e 1,6 µg/mL, respectivamente. Esta formulação, quando avaliada por modelo *ex vivo* em amostras de pele de orelha suína, apresentou alta retenção de nistatina na derme e epiderme. Os resultados são considerados estatisticamente diferentes em comparação ao fármaco puro e demonstram o potencial deste sistema no tratamento tópico da candidíase.

Palavras-chave: nistatina, cloridrato de quitosana, micropartículas poliméricas, atividade antifúngica, retenção cutânea.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN HYDROCHLORIDE MICROPARTICLES CONTAINING NYSTATIN FOR TOPICAL DELIVERY

The indiscriminate use of antimicrobials has triggered various types of resistance mechanisms, which have continuously stimulated researches focused on the obtainment of new drugs, development or improvement of dosage forms available for marketing. Nystatin is a polyene antifungal widely employed on the treatment of candidiasis. Its mechanism of action occurs via its binding to ergosterol, a steroid present in the cell membrane of pathogenic fungi such as *Candida* sp, which promotes the disintegration and release of cellular contents. In addition, nystatin belongs to Class IV of the Biopharmaceutical Classification System, and so its biological activity is affected by its low solubility and low permeability. In this context, microparticulate systems of chitosan hydrochloride intended for the topical route were developed through spray drying and through emulsification/solvent evaporation followed by freeze drying, aiming an enhancement of the skin retention and microbiological activity of nystatin. The samples were obtained in different drug:polymer ratios (1:1, 1:2 and 1:3, w/w), being characterized by means of their crystalline, thermal and morphological properties and evaluated regarding their content, entrapment efficiency, microbiological activity and skin retention. Results demonstrate that all microparticles presented adequate entrapment efficiencies and that their physicochemical properties were dependent on the obtainment technique. Microbiological tests against strains of *Candida albicans* revealed that the spray dried sample composed of a 1:2 drug:polymer (w/w) ratio presented an increase up to a 2 factor in the antifungal activity with minimum inhibitory concentration and minimum fungicide concentration of 0.4 µg/mL and 1.6 µg/mL, respectively. This formulation, when submitted to *ex vivo* studies in porcine ear skin presented high retention of nystatin on both dermis and epidermis. These results are considered statistically different in comparison to the pure drug and demonstrate the potential of this microparticle for the topical treatment of candidiasis.

Keywords: nystatin, chitosan hydrochloride, polymeric microparticles, antifungal activity, skin retention.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Filogenia dos fungos	29
Figura 2	Parede célula fúngica	33
Figura 3	Estrutura química da nistatina	35
Figura 4	Desenho esquemático do <i>spray dryer</i>	39
Figura 5	Estrutura do cloridrato de quitosana	40
Figura 6	Difratograma de pó da nistatina	47
Figura 7	Curva de DSC da nistatina	48
Figura 8	Curva de TG da nistatina	49
Figura 9	Espectro no infravermelho de nistatina	50
Figura 10	Fotomicrografias da nistatina em magnitudes de 1000 x (a) e 3000 x (b)	51
Figura 11	Curva de calibração média da nistatina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência a 305 nm, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).....	61
Figura 12	Cromatogramas obtidos da matéria-prima nistatina em sua concentração de injeção (10 µg/mL) (a); micropartícula branca obtida por liofilização [L0] (b) e micropartícula branca obtida por <i>spray drying</i> [S0] (c).....	62
Figura 13	Curva de calibração média obtida por cromatografia líquida de alta eficiência, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).....	65
Figura 14	Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência de amostra de pele sem fármaco.....	66
Figura 15	Esquema representativo da câmara de difusão de Franz.....	72
Figura 16	(a) Curvas de DSC das matérias-primas: nistatina (A), cloridrato de quitosana (B); mistura física fármaco:polímero (1:3) (C); e formulações: branca S0 (D), S1 (E), S2 (F) e S3 (G); (b) Curvas de DSC da nistatina (A), cloridrato de quitosana (B), mistura física 1:3 (C), L0 (D), L1 (E), L2 (F) e L3 (G).....	82
Figura 17	Espectros no infravermelho: (a) Matérias-primas, mistura física 1:3 (nistatina:cloridrato de quitosana) e formulações obtidas por <i>spray drying</i> ; (b) Fármaco, polímero, tensoativo, mistura física 1:3 e formulações liofilizadas.....	84

Figura 18	Perfis de difração de raios X de pó obtidos para o fármaco, o polímero, mistura física 1:3 (nistatina:cloridrato de quitosana), formulações brancas e contendo nistatina obtidas por <i>spray drying</i> e emulsificação/evaporação do solvente.....	86
Figura 19	Fotomicrografias: (a) formulações obtidas por <i>spray drying</i> , com aumento de 1000 x e (b) produzidas através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente, aumento de 150 x.....	88
Figura 20	Microplaca com resultados de concentração inibitória mínima para as formulações e Tween 80 [®]	91
Figura 21	Placas de Petri de nistatina e a formulação S2 de análise realizada em triplicata para fins de avaliação de concentração fungicida mínima.....	92
Figura 22	Quantidade (%) de nistatina retida na epiderme e derme após 6 h de ensaio.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das principais micoses humanas e agentes etiológicos	30
Tabela 2	Agentes Antifúngicos	32
Tabela 3	Frequências de absorção características das vibrações de ligação da matéria-prima nistatina	50
Tabela 4	Resultados dos ensaios de precisão do método.....	63
Tabela 5	Dados referentes à exatidão do método.....	63
Tabela 6	Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez do método.....	64
Tabela 7	Dados referentes à exatidão do método.....	66
Tabela 8	Composição das formulações para técnica de emulsificação/evaporação de solvente.....	74
Tabela 9	Composição das formulações para técnica de <i>spray drying</i>	74
Tabela 10	Resultados da eficiência de encapsulação (%) e teor (mg/100 mg de formulação) obtidos com as formulações contendo nistatina.....	81
Tabela 11	Granulometria das micropartículas $d_{(4,3)}$: diâmetro médio em volume; $d_{(0,1 \mu\text{m})}$, $d_{(0,5 \mu\text{m})}$ e $d_{(0,9 \mu\text{m})}$: diâmetro de partícula correspondente a, respectivamente, 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada; polidispersão de tamanhos (<i>span</i>).....	89
Tabela 12	Valores de concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) das amostras testadas e determinadas após 24 h de incubação.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Micrograma
 μL – Microlitro
 μm – Micrometro
ACN – Acetonitrila
AIDS – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
AnfB – Anfotericina B
ANOVA – Análise de Variância
ATCC – *American Type Culture Collection*
CFM – Concentração Fungicida Mínima
CIM – Concentração Inibitória Mínima
Cl.QTS – Cloridrato de Quitosana
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm – Centímetros
CMI – Central de Microscopia
COMCAP – Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa
DMF – Dimetilformamida
DMSO – Dimetilsulfóxido
DP – Desvio Padrão
DPR – Desvio Padrão Relativo
DRX – Difração de raios X de pó
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG – Derivada de curva termogravimétrica
EE – Eficiência de Encapsulação
g/mol – Grama/mol
h – Hora
ICH – International Conference on Harmonisation
IV – Espectroscopia na região do infravermelho
kV – Quilovolt
L (0, 1, 2, 3) – Formulações liofilizadas
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
LVA – Laboratório de Virologia Aplicada
m – Massa
mA – Miliampére
MeOH – Metanol
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MF – Mistura Física
mg – Miligrama
min – Minuto

mL – Mililitro
mM – Milimolar
mUA – mili unidades de absorvância
NYS – Nistatina
°C – Graus Celsius
pH – Potencial hidrogeniônico
QTS – Quitosana
rpm – Rotação por minuto
s – Segundo
S (0, 1, 2, 3) – Formulações obtidas por spray drying
SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TG – Termogravimetria
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
USP – United States Pharmacopoeia
UV – Ultravioleta
v/v – Volume/volume
Vis– Visível
 ΔH – Variação de Entalpia
 Δm – Variação de massa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	23
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1 FUNGOS	29
1.1 GÊNERO CANDIDA	31
2 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS	31
2.1 ANTIFÚNGICOS POLIÊNICOS	33
2.1.1 Nistatina	34
3 SISTEMAS MICROPARTICULADOS	36
3.1 TÉCNICAS DE PREPARO DE MICROPARTÍCULAS	37
3.1.2 Cloridrato de quitosana	39
3.2 APLICAÇÃO TÓPICA DE MICROPARTÍCULAS ..	40
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA NISTATINA	
1 INTRODUÇÃO	45
2 METODOLOGIA	46
2.1 MATERIAIS	46
2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NYS NO ESTADO SÓLIDO	46
2.2.1 Difração de raios X de pó (DRX)	46
2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	46
2.2.3 Termogravimetria (TG)	46
2.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	47
2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRX)	47
3.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	48
3.3 TERMOGRAVIMETRIA (TG)	49
3.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)	50
3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	51

4	CONCLUSÕES	52
----------	-------------------------	-----------

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE NISTATINA EM MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA E EM AMOSTRAS DE PELE

1	INTRODUÇÃO	55
2	METODOLOGIA	56
2.1	MATERIAIS	56
2.2	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	56
2.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO	56
2.4	VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE NYS POR CLAE.....	57
2.4.1	Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	57
2.4.2	Especificidade	58
2.4.3	Precisão	58
2.4.4	Exatidão	58
2.4.5	Robustez	58
2.4.6	Análise estatística	59
2.5	REVALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE NYS EM AMOSTRAS DE PELE.....	59
2.5.1	Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	59
2.5.2	Especificidade	59
2.5.3	Exatidão	59
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE	60
3.2	VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE NYS POR CLAE	60
3.2.1	Linearidade, LD e LQ	60
3.2.2	Especificidade	62
3.2.3	Precisão	63
3.2.4	Exatidão	63
3.2.5	Robustez	63

3.3	REVALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE NYS EM AMOSTRAS DE PELE.....	64
3.3.1	Linearidade, LD e LQ	64
3.3.2	Especificidade	66
3.3.3	Exatidão	66
4	CONCLUSÕES	67

CAPÍTULO 4 - MICROPARTÍCULAS DE CLORIDRATO DE QUITOSANA CONTENDO NISTATINA DESTINADAS À APLICAÇÃO TÓPICA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *EX VIVO*

1	INTRODUÇÃO	71
2	METODOLOGIA	73
2.1	MATERIAIS	73
2.2	DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE NYS	73
2.2.1	Preparo de micropartículas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente	73
2.2.2	Preparo de micropartículas pela técnica de <i>spray drying</i>	74
2.3	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DAS FORMULAÇÕES	75
2.4	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	75
2.4.1	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	76
2.4.2	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	76
2.4.3	Difração de raios X de pó (DRX)	76
2.4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	76
2.4.5	Determinação do tamanho de partícula	76
2.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	77
2.5.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	77
2.5.2	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	78
2.6	AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CUTÂNEA DE NYS	78
2.6.1	Obtenção da pele de orelha suína	78
2.6.2	Avaliação da retenção de NYS em pele de orelha suína	79
2.6.3	Análise estatística	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DAS FORMULAÇÕES	80

3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS ..	81
3.2.1	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	81
3.2.2	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	83
3.2.3	Difração de raios X de pó (DRX)	85
3.2.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	87
3.2.5	Determinação do tamanho de partícula	89
3.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	90
3.3.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	90
3.3.2	Concentração Fungicida Mínima (CFM)	92
3.4	AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CUTÂNEA DE NYS	93
3.4.1	Avaliação da retenção de NYS em pele de orelha suína	93
4	CONCLUSÕES	94
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

INTRODUÇÃO GERAL

O uso generalizado de antibióticos de amplo espectro, os quais podem promover a redução da flora bacteriana que normalmente compete com os fungos patogênicos, vem sendo considerado fator responsável pelo aumento na incidência de resistência microbiana (RANG et al., 2007).

A candidíase é a infecção fúngica mais comum e acredita-se que pelo menos 75% das mulheres tem, no mínimo, um episódio de candidíase vaginal em sua vida e, aproximadamente 40 a 50%, podem apresentar reincidência, dentre elas, 5% devido ao tratamento ineficaz (BEREK; NOVAK, 2008).

Os antifúngicos da classe de poliênicos são amplamente indicados para o tratamento desta patologia e caracterizam-se pelo mecanismo de ação que ocorre através da ligação com o ergosterol, esteroide presente na membrana plasmática das células fúngicas, formando canais transmembranares que promovem a desorganização celular (TAVARES, 1996).

A nistatina é um fármaco pertencente a essa classe de antifúngicos e que apresenta um amplo espectro de ação, classificada no grupo IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica por apresentar baixas solubilidade e permeabilidade quando administrada por via oral, o que limita consideravelmente sua aplicação (BRESCANSIN, 2006).

A produção de formulações lipossomais deste fármaco mostrou que os sistemas obtidos apresentam atividade antifúngica maior do que o próprio fármaco livre, aumento no tempo de meia-vida do mesmo e diminuição de seus efeitos colaterais.

Os sistemas microencapsulados, em geral, proporcionam inúmeros benefícios tais como a solubilização de ativos lipofílicos, o aumento na biodisponibilidade, a proteção da molécula frente a diversos fatores (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007).

As técnicas de preparo destes sistemas são divididas conforme a combinação entre o ativo e o material encapsulante, a exemplo do *spray drying*, inclusão molecular, emulsificação/evaporação de solvente, liofilização e polimerização interfacial (VALGAS, 2007).

No presente trabalho optou-se por avaliar a atividade antifúngica de formulações contendo nistatina em comparação ao fármaco livre e obter dados quanto à retenção do mesmo na pele a partir de sistemas particulados de cloridrato de quitosana considerados promissores para a via de administração cutânea.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar micropartículas de cloridrato de quitosana contendo o fármaco antifúngico nistatina visando aplicação tópica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o fármaco nistatina no estado sólido;

Desenvolver e validar metodologia de doseamento da nistatina por cromatografia líquida de alta eficiência;

Desenvolver micropartículas de cloridrato de quitosana contendo nistatina através dos métodos de emulsificação/evaporação de solvente seguida de secagem por liofilização e de *spray drying*;

Caracterizar as micropartículas obtidas no estado sólido, determinar a eficiência de encapsulação e teor de fármaco desses sistemas;

Avaliar a atividade microbiológica do fármaco livre e associado às micropartículas pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima, bem como a concentração fungicida mínima, sendo essa última em ágar;

Realizar avaliação da retenção cutânea da nistatina livre e associada às micropartículas em pele de orelha suína através do método da câmara de difusão de Franz.

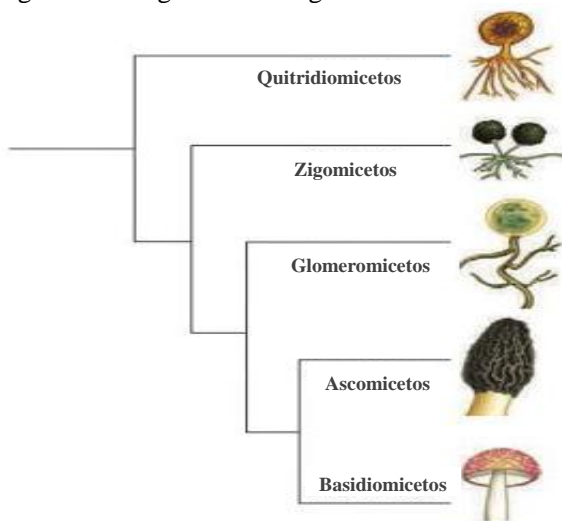
CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica

1 FUNGOS

Os fungos compõem um grande e diverso grupo de organismos com aproximadamente 100.000 espécies descritas. Podem estabelecer associações simbióticas ou patógenas aos seus hospedeiros, sendo essa última causadora de inúmeras doenças de suma importância econômica (MADIGAN et al., 2010).

Trata-se de um grupo de organismos eucarióticos que possuem um núcleo bem definido, podendo ser unicelular (leveduras) ou filamentoso (bolores). A classificação desses microrganismos é feita de forma taxonômica com base na filogenia fúngica (Figura 1) e, em adição a essa classificação, são consideradas também as infecções fúngicas, de acordo com os tecidos infectados (Tabela 1) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; MADIGAN et al., 2010).

Figura 1 - Filogenia dos fungos



Fonte: Madigan e colaboradores (2010).

O grupo de fungos ascomycetos, ao qual pertence o gênero *Candida*, constitui um grupo bastante distinto de fungos, do qual são encontrados representantes em ambientes aquáticos e terrestres. Recebe esse nome devido à produção de ascas, células onde dois núcleos haploides, provenientes de tipos de acasalamento distintos, unem-se e

fundem-se formando um núcleo diploide, o qual sofre meiose, originando ascósporos haploides (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; MADIGAN et al., 2010).

Tabela 1 – Classificação das principais micoses humanas e agentes etiológicos

Superficiais	Cutâneas e Subcut.	Endêmicas	Oportunistas
<i>Piedra preta</i>	Dermatofitoses	Blastomicose	Aspergilose
<i>Piedraia hortae</i>	<i>Microsporum</i> spp.	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Tinea nigra</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>	Histoplasmose	<i>A. flavus</i>
<i>Phaeoannelomyces Werneckii</i>	<i>Tinea unguium</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>A. niger</i>
<i>Pitiriase versicolor</i>	<i>Trichophyton</i> spp.	Coccidioidomicose	<i>A. terreus</i>
<i>Malassezia furfur</i>	Onicomicoses	Peniciliose	Candidíase
<i>Piedra branca</i>	<i>Phialophora</i> spp.	<i>Penicillium marneffeii</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Trichosporon</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	Paracoccidioidomicose	<i>C. glabrata</i>
	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>P. brasiliensis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
	<i>Trichosporon</i> spp.		<i>C. tropicalis</i>
	<i>Geotrichum</i> spp.		Criptococose
	Ceratite micótica		Cryptococcus neoformans
	<i>Fusarium</i> spp.		Tricosporonose
	Cromoblastomicose		<i>Trichosporon</i> spp.
	<i>Fonsecaea</i> spp.		Hialo-hifomicose

Fonte: Adaptado de Murray e colaboradores, 2006.

1.1 GÊNERO *CANDIDA*

Isoladas pela primeira vez de um paciente com tuberculose em 1844, existem mais de 80 espécies do gênero *Candida*, sendo leveduras que apresentam-se em parasitismo na forma de hifas septadas, com células leveduriformes no ponto de constrição das hifas (NEUFELD, 1999; ODDS, 1994).

Candidíase é a micose causada por fungos desse gênero, em especial da espécie *Candida albicans*, que corresponde a 51,6% dos casos e as outras espécies do gênero com potencial patogênico incluem *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitanae* e *C. stellatoidea* (COUTO; CARLOS; MACHADO, 2011; POUD; DREW; PEPECT, 2002). A infecção pode ser aguda ou crônica e suas manifestações clínicas podem apresentar-se de três formas: mucocutânea, cutânea ou sistêmica (MENEZES et al., 2004).

A forma disseminada da candidíase é rara, e a susceptibilidade à infecção está relacionada com alterações no sistema imunológico e desequilíbrio da microbiota endógena. Ocorre, principalmente, em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, imunossupressivas e após transplantes de órgãos (GROSSI, 2009; PEREIRA et al., 2009). Nesses casos, pode atingir diferentes órgãos e tecidos, como os pulmões, meninges, rins, bexiga, articulações, fígado, coração e olhos (ARAÚJO; SCHACHNER, 2006; KONEMAN, 2008; KAUFFMAN et al., 2011).

Para o tratamento de afecções causadas por espécies do gênero *Candida*, compostos de iodo, violeta de genciana, nistatina (NYS) e derivados imidazólicos são as substâncias mais comumente utilizadas (BRESCANSIN, 2006).

2. FARMACOS ANTIFÚNGICOS

Os fungos representam problemas especiais para o desenvolvimento de quimioterápicos, uma vez que pertencem ao domínio *Eukarya*, portanto, a maior parte das organelas celulares é idêntica àquela dos animais e humanos. Dessa forma, os agentes antifúngicos que afetam as vias metabólicas dos fungos frequentemente afetam as vias correspondentes das células hospedeiras, tornando-os tóxicos (MADIGAN et al., 2010).

Os antifúngicos possuem uma considerável diversidade de alvos específicos nas células fúngicas (Tabela 2) e a classificação está

relacionada, direta ou indiretamente, com o envolvimento da célula (parede e membrana plasmática). Alvos distintos aos relacionados com o envolvimento das células fúngicas podem ser bastante promissores para biodisponibilidade sistêmica desses agentes (ODSS, 2003).

Fármacos fungo-específicos, que possuem toxicidade seletiva para fungos, vêm exibindo importância crescente desde os anos 70, à medida que as infecções fúngicas sistêmicas secundárias sérias em indivíduos imunodeprimidos tornaram-se mais prevalentes (MADIGAN et al., 2010; RANG et al., 2007).

Tabela 2 – Agentes Antifúngicos

Categoria	Alvo	Exemplos	Uso
Alilaminas	Síntese do Ergosterol	Terbinafina	Oral, Tópico
Antibiótico aromático	Inibidor da mitose	Griseofulvina	Oral
Azóis	Síntese do Ergosterol	Clotrimazol	Tópico
		Miconazol, Fluconazol, Itraconazol, Cetoconazol, Voriconazol, Posoconazol, Ravuconazol	Oral Experimental
Inibidor de síntese de quinina	Síntese de quinina	Nicomicina Z	Experimental
Equinocandinas	Síntese da parede celular	Caspofungina	Intravenoso
Análogos de ácido nucleico	Síntese de DNA	5-fluorocitosina	Oral
Polienos	Síntese do Ergosterol	Anfotericina B	Oral, intravenoso
		Nistatina	Oral, tópico
Polioxinas	Síntese de quitina	Polioxina A	Agrícola
		Polioxina B	Agrícola

Fonte: Adaptado de Madigan e colaboradores, 2010.

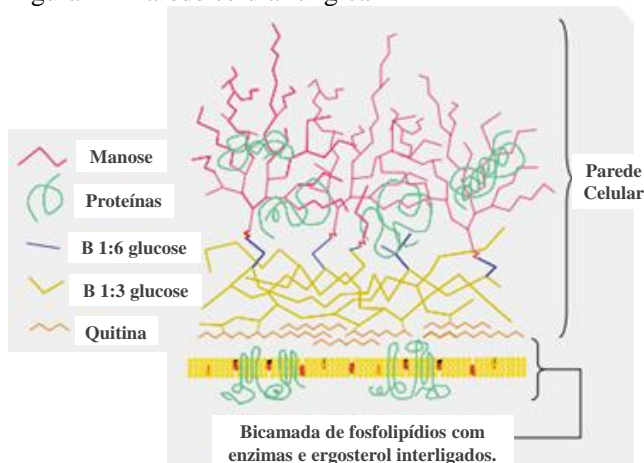
Os fármacos antifúngicos estão classificados em dois grupos: o primeiro, os antibióticos antifúngicos que ocorrem naturalmente, tais como os polienos, equinocandinas, e o segundo, os fármacos sintéticos, incluindo os azóis, as pirimidinas fluoradas (RANG et al., 2007).

2.1. ANTIFÚNGICOS POLIÊNICOS

Os antifúngicos poliênicos são fármacos que possuem como mecanismo de ação a ligação na membrana citoplasmática de fungos sensíveis resultando na formação de um pequeno “poro químico” que resulta em perda do equilíbrio hidroeletrolítico celular (Figura 2). Em geral, os antifúngicos poliênicos têm maior afinidade pelo esterol fúngico, o ergosterol, que pelo humano, o colesterol (LEIBOVITZ, 2002).

São considerados, portanto, fármacos fungicidas e que atuam independentemente da etapa do ciclo de crescimento em que o fungo se encontra (GRAÇA, 2013).

Figura 2 – Parede célula fúngica



Fonte: Odds (2003)

Estruturalmente, antifúngicos poliênicos são caracterizados pela presença do grupo dos tetraenos, que são polienos que apresentam quatro duplas ligações não saturadas em sequência. São considerados macrolídeos, devido a sua estrutura grande e cíclica (ZHANG; CAMP; ELEWSKI, 2007; TAVARES, 2001).

Essa classe de fármacos possui como principal vantagem, sobre as outras classes de antifúngicos, a ação fungicida e baixa incidência de

patógenos resistentes, sendo dependentes apenas da presença de esteróis na membrana das células sensíveis (BOLARD, 1986).

A anfotericina B (AnfB), principal representante dessa classe, é amplamente utilizada em tratamentos de infecções sistêmicas como meningite causada por *Cryptococcus*, infecções invasivas e zygomicoses (HECTOR, 2005).

Um grande problema associado ao uso de fármacos dessa classe, por via oral, está relacionado aos efeitos colaterais intensos que podem trazer, incluindo nefrotoxicidade (níveis de reatinina no sangue devem ser acompanhados durante o tratamento com AnfB intravenosa) e toxicidade para células mamárias (ODDS, 2003).

Dentro desta classe de fármacos, destacam-se a AnfB e a NYS, antifúngicos de aplicação, normalmente, tópica que também são utilizados em infecções por *Candida* (GRAÇA, 2013; RANG et al., 2007).

2.1.1 Nistatina

A nistatina (NYS) ($C_{47}H_{75}NO_{17}$) ou fungicidina (massa molar 926,13 g/mol) (Figura 3) foi descoberta em 1950 por Hazen e Brown da divisão de laboratórios e pesquisa do departamento de saúde do Estado de Nova York, Estados Unidos da América (HAZEN; BROWN, 1950; MICHEL, 1972).

Apesar de ser um fármaco que está disponível há mais de 50 anos no mercado, seu uso recente está associado ao aumento de casos de candidíases em pacientes imunocomprometidos, como em pacientes com neoplasias, AIDS e outras desordens sistêmicas (GROESCHKE et al., 2006; SHIP et al., 2007)

O fármaco consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (BRASIL, 2013) sob a forma de suspensão oral para o tratamento de infecções fúngicas de forma tópica e anti-infectante ou como semissólido em associação com óxido de zinco para tratamento de dermatite aguda.

Existem também medicamentos comerciais que contêm NYS na forma de semissólidos para candidíase vaginal, cutânea e oral, sendo essa última para infecções apenas no trato gastrintestinal superior (BULÁRIO, 2014).

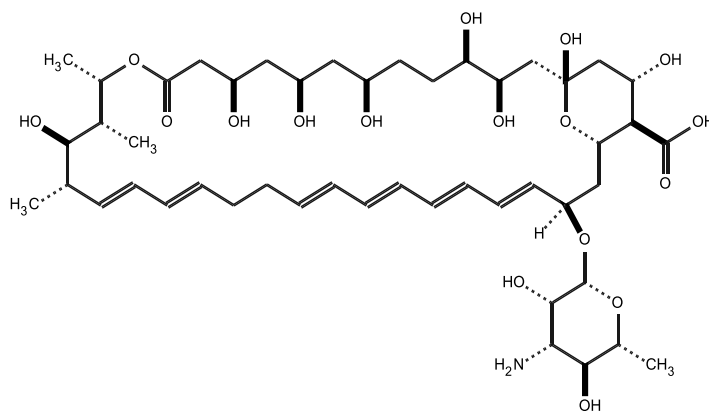
Extraído através de um processo de fermentação de cultura de *Streptomyces albidus* e *S. noursei*, o fármaco NYS consiste na mistura de duas ou mais substâncias relacionadas e ativas biologicamente,

designados como A1, A2 e A3 (POROWSKA et al., 1972; MICHEL, 1972). O principal componente do complexo é o composto A1 (Figura 3), que apresenta em sua estrutura um amino açúcar (D-micosamina) ligado ao oxigênio do carbono 19 (BRESCANSIN, 2006).

A solubilidade desse fármaco é bastante limitada, sendo classificado como insolúvel em água, etanol, clorofórmio, porém bastante solúvel em dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) (MARTINDALE, 1999; TAVARES, 2001; TALLURY et al., 2007; F.BRAS, 2010)

Apresenta-se na forma de pó higroscópico, de coloração amarela a marrom claro e odor semelhante a de cereais. Quando em suspensão aquosa a 3% (p/v) possui pH entre 6,0 e 8,0. Calor, luz e presença de oxigênio aceleram sua decomposição, mais fortemente quando em solução ou suspensão, pois começa a perder sua atividade logo após o preparo. Dessa forma, seu acondicionamento deve ser feito em recipiente hermeticamente fechado, protegido da luz e em temperatura em torno de 2 a 8 °C (INDEX MERCK, 2006; MARTINDALE, 1999; GROESCHKE et al., 2006; USP 30, 2007).

Figura 3 - Estrutura química da nistatina



Possui ampla atividade fúngica, de ambas as formas, fungicida e/ou fungistática, no tratamento de infecções fúngicas mucocutânea causadas por *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (KARIYUAMA et al., 2005). Apresenta amplo espectro de ação antifúngica *in vitro*, inclusive mais amplo do que o principal membro

dessa classe de fármacos, AnfB, pois a atua em fungos AnfB resistentes (GROLL et al., 1999).

Apesar de ser extremamente ativa contra *Candida albicans*, o uso de NYS é limitado à via tópica, pois pertence à classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, possui baixa solubilidade e permeabilidade se administrado via oral, e, aditivamente, devido à alta toxicidade apresentada quando administrada via parenteral (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2002). Sua absorção é bastante insignificante quando em pele intacta, membranas mucosas ou trato gastrointestinal (ZHANG; CAMP; ELEWSKI, 2007; BENNETT, 1993).

Os efeitos adversos, quando usada na forma tópica, são incomuns, podendo ocorrer episódios de náuseas, vômitos e diarreias. Reações alérgicas são raras (TAVARES, 2001; GILMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2003; GARTY, 1991; WASILEWSKI, 1970).

Apesar de já existirem trabalhos com formulações contendo NYS, na sua maioria de natureza lipossômica, as características de solubilidade e permeabilidade ainda são objeto de estudo para promover melhorias (ALONSO-VARGAS et al., 2000; WALLACE et al., 1999; MEHTA, 1987), uma vez que pesquisas relacionados à caracterização físico química e desenvolvimento de formulações contendo NYS são ainda muito pouco relatadas.

3. SISTEMAS MICROPARTICULADOS

A microencapsulação consiste em uma tecnologia de encapsulação de materiais, sejam eles líquidos, sólidos ou gasosos, que vem sendo amplamente utilizada para promover, principalmente, a vetorização de fármacos, como alternativa para a melhoria da qualidade de produtos farmacêuticos (CAVALCANTI; BUTTOW, 1999; ROSINA; BARONI; CAVALCANTI).

De uma forma geral, esses sistemas proporcionam inúmeros benefícios tais como o aumento da biodisponibilidade de ativos, bem como solubilidade, liberação modificada de fármacos e proteção da molécula frente a fatores como calor, umidade (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007).

A forma como ocorre a encapsulação dos ativos é que classifica os sistemas como: microesferas, sistemas matriciais nos quais o fármaco encontra-se disperso de forma uniforme e/ou dissolvido numa rede polimérica; ou microcápsulas, sistemas reservatórios constituídos por

um núcleo rodeado por membrana ou revestimento (SILVA et al., 2003; LIU et al., 2006; DESAI; PARK, 2005).

Trata-se de sistemas micrométricos (1-100 μm) capazes de promover liberação modificada de ativos (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005).

A liberação de fármacos desses sistemas é dependente de muitas características dos mesmos, tais como o peso molecular, a lipofilicidade e o grau de ionização. Intrinsecamente relacionada está a via de administração. Com intuito de realizar administração tópica desses sistemas, por exemplo, fatores como o estado físico e grau de hidratação do estrato córneo devem ser levados em consideração (FÖRSTER et al., 2009; MIHRANYAN; FERRAZ; STROMME, 2011).

A exemplo disso, Baras e colaboradores (2000) propuseram um método de encapsulação de antígenos com derivados do ácido poli(lático-co-glicólico) e diferentes perfis de liberação e, conseqüentemente, variáveis na indução da resposta imunológica foram observadas. Essas diferenças foram justificadas pelos autores com base no tamanho das partículas obtidas, na taxa de degradação dos polímeros utilizados, bem como no peso molecular dos mesmos.

Sistemas nano/microparticulados têm sido muito produzidos para encapsular antifúngicos, com o objetivo de modificar a farmacocinética dos mesmos, resultando em tratamentos mais eficientes e com menos efeitos (GRATIERI, 2010).

Dentre os antifúngicos estudados, além da NYS, destacam-se o voriconazol (PENG et al., 2008), AnfB (SINGH; TIWARY; RANA, 2013; ESPUELAS et al., 2002; AMARAL et al., 2009), fluconazol (GRATIERI, 2010) e itraconazol (CHOI et al., 2009).

3.1 TÉCNICAS DE PREPARO DE MICROPARTÍCULAS

A vetorização de fármacos, como alternativa para melhoria de propriedades farmacêuticas, vem sendo muito explorada. Buscam-se alternativas para promoção de aumento, principalmente nas características relacionadas à solubilidade e permeabilidade de diferentes ativos onde a microencapsulação vem se mostrando muito eficiente nesse quesito (ROSINA; BARONI; CAVALCANTI, 2004).

Os diferentes métodos de preparação permitem encapsular fármacos com características tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, conferindo grande variedade de aplicações terapêuticas (VILOS; VELASQUEZ, 2012).

Diversos são os métodos físico-químicos de obtenção de sistemas microparticulados, tais como, coacervação simples ou complexa, polimerização interfacial, emulsificação seguida da evaporação do solvente, *spray drying*, fluido supercrítico, dentre outras (AGNIHOTRI et al., 2004; BENITA, 2006; PIRES REIS et al., 2006; SINHA et al., 2004).

Características físico-químicas como morfologia e tamanho das micropartículas, estão estritamente relacionadas aos parâmetros e condições no método de obtenção das mesmas, conseqüentemente, à encapsulação e liberação de ativos (ANDRÉ-ABRANT; TAVERDET; JAY, 2001; LI ROUAUD; PONCELET, 2008).

Para a escolha da técnica mais apropriada, deve-se levar em consideração requisitos como a manutenção da estabilidade e atividade do ativo que se pretende encapsular, bem como taxa de encapsulação da técnica e reprodutibilidade da mesma (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

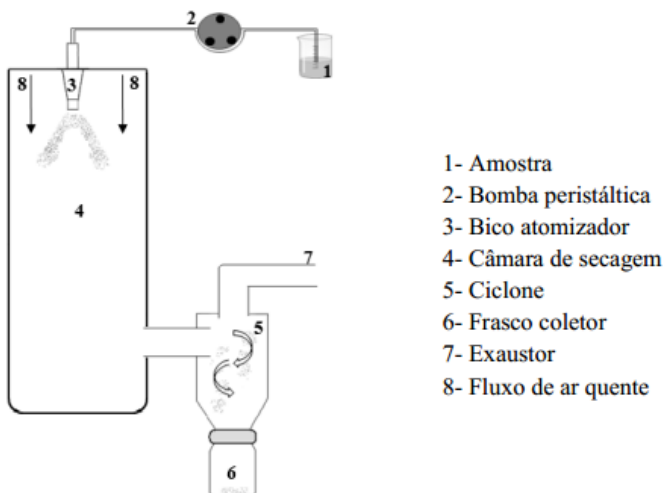
Um método de secagem que vem sendo amplamente utilizado, tanto na indústria farmacêutica, quanto em outros segmentos industriais, é o *spray drying*. Trata-se de um processo rápido e eficiente, aplicável em grandes escalas e que, além do processo de desidratação, é utilizado também para encapsular ativos em tamanhos micrométricos (JACKSON; LEE, 1993; OLIVEIRA et al., 2008).

O método de atomização por *spray drying* (Figura 4), trata-se de um processo de secagem de pós a partir de suspensões aquosas ou orgânicas por meio de um gás aquecido que promove a secagem das gotículas da formulações quando aspergidas pelo aparelho, onde o fármaco é incorporado juntamente ao material revestidor solubilizado ou fundido. A técnica tem por finalidade produzir grânulos que podem apresentar diferentes morfologias que variam de esferas, agulhas, roscas a grânulos alongados ou achatados (VALGAS, 2007).

A rápida evaporação da água permite manter a temperatura das partículas reduzida, de maneira que esse não seja um aspecto que afete a estabilidade do ativo (RATTES; OLIVEIRA, 2007).

Diferentes parâmetros de secagem em *spray dryer* foram avaliados e modificados por He e colaboradores (1999) e dentre os testados, o tamanho do diâmetro da agulha de aspersão foi o que apresentou influência mais significativa sob o tamanho das partículas obtidas.

Figura 4 – Desenho esquemático do *spray dryer*



Fonte: Adaptado de Chan e colaboradores (2003)

3.1.2 Cloridrato de quitosana

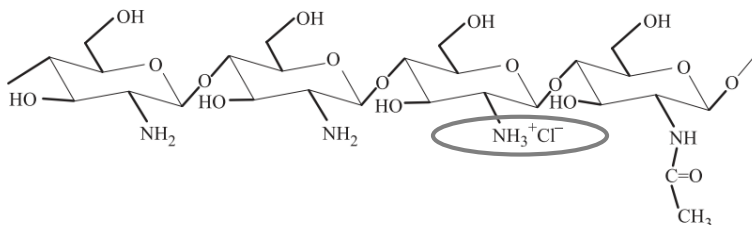
A quitosana (QTS) é obtida a partir da desacetilação, em meio alcalino, da quitina, polímero natural extraído do exoesqueleto de crustáceos, insetos e alguns fungos (AGNIHOTRI et al., 2004; SINHÁ et al., 2004; MOURYA; INAMDAR, 2008; LARANJEIRA; FAVERE, 2009).

Trata-se de um polieletrólito catiônico, ou seja, é portadora de sítios iônicos que desenvolvem cargas positivas quando dissolvido em solvente apropriado. Pode sofrer processo de purificação para obtenção de formas salinas hidrofílicas e, em geral, solúveis em água à temperatura ambiente (CAMPANA FILHO; SIGNINI, 2001)

Dessa maneira, sais purificados de QTS podem ser facilmente obtidos, resultando em materiais hidrossolúveis, que vêm sendo largamente aplicados no ramo industrial farmacêutico e cosmético (GOOSEN, 1997; CAMPANA FILHO; DESBRIÈRES, 2000).

Dentre as diversas formas de purificação desse polímero na forma de sal, o cloridrato de quitosana (Cl.QTS) (Figura 5) tem se mostrado a forma mais hidrofílica que o acetato ou a forma neutra da QTS, por exemplo (CAMPANA FILHO; SIGNINI, 2001).

Figura 5 – Estrutura do cloridrato de quitosana



Fonte: Geremias, 2006

He e colaboradores (1999) avaliaram a influência de diferentes fatores no preparo de micropartículas de Cl.QTS contendo cimetidina por *spray drying*. Dentre eles, diferentes concentrações de polímero foram testadas e, quanto mais Cl.QTS havia na solução inicial, maiores os tamanhos de partículas obtidos.

Um significativo aumento na taxa de liberação de carbamazepina foi promovido por formulações de micropartículas de Cl.QTS, produzidas pela técnica de *spray drying*, independentemente da taxa de proporção fármaco:polímero analisada, sob a qual cerca de 90 a 100% de carbamazepina foi liberada em menos de 2 h de análise, enquanto que o fármaco livre apresentou um perfil de dissolução de menos de 60% em 3 h (GAVINI et al., 2006).

3.3 APLICAÇÃO TÓPICA DE MICROPARTÍCULAS

A administração de fármacos topicamente pode ser promovida por aplicação dos mesmos em áreas como a pele, olhos, região bucal e pulmões, para efeitos locais e sistêmicos. Quando os ativos atravessam as diversas barreiras da pele e alcançam a circulação, tem-se as terapias transdérmicas (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004).

Recentemente, diversos pesquisadores vêm buscando novas alternativas tecnológicas e de sistemas diferenciados para veiculação de fármacos por via tópica, com o intuito de promover uma liberação simples, rápida e de tratamento eficaz (LABOUTA; EL-KHORDAGUI, 2010).

De uma forma geral, as preparações dermatológicas são indicadas para que se concentrem nas camadas superficiais da pele,

possibilitando um efeito local (é o caso do que vem sendo utilizado comercialmente com antibióticos, antifúngicos, corticoide, retinóides, entre outros) (FÖRSTER. et al., 2009).

Os promotores de permeação são agentes amplamente utilizados para facilitar o transporte de fármaco através de mecanismos que envolvem características como o aumento da solubilidade de fármacos, da atividade termodinâmica, da fluidez dos lipídeos do estrato córneo, ou promovendo a partição, dentre outros mecanismos (MITRAGOTRI, 2000; THONG; ZHAI; MAIBACH, 2007).

As técnicas de nano/microencapsulação são utilizadas para promover o transporte facilitado de ativos através da pele e mucosas, pois, independente do método de obtenção, geralmente é utilizado um promotor de permeação, seja ele de natureza lipídica ou polimérica (SEZER; CEVHER, 2012).

CAPÍTULO 2: Caracterização em estado sólido da nistatina

1. INTRODUÇÃO

A caracterização no estado sólido de insumos farmacêuticos é etapa essencial para definição e avaliação de propriedades físico-químicas dos mesmos, principalmente na área de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, para assegurar a eficácia, segurança e qualidade do produto final (BYRN; XU; NEWMAN, 2001; STEPHENSON; FORBES; REUTZEL-EDENS, 2001).

A necessidade de rever e aprimorar a especificação ou caracterização de fármacos é iminente, de modo que apenas os testes descritos em farmacopeias e compêndios oficiais, não são suficientes para evidenciar diferenças sutis entre as matérias-primas.

Tendo em vista a complexidade da composição da NYS, que é produzida através de um processo de fermentação a partir do qual obtém-se três componentes (A1, A2 e A3), a caracterização da mesma torna-se primordial.

Além do mais, essa etapa serve para estabelecer parâmetros de controle de processo, uma vez que se trata de um fármaco instável na presença de luz, calor e oxigênio (STEFANOVIC et al., 2012).

Neste contexto, este capítulo objetiva a caracterização da matéria-prima NYS, visando à identificação das características físico-químicas da amostra.

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS

Matéria-prima comercial NYS, obtida através da Galena Distribuidora de Produtos Químicos LTDA, Campinas-SP, Brasil, lote 1105002506.

2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NYS NO ESTADO SÓLIDO

2.2.1 Difração de raios X de pó (DRX)

O padrão de DRX de NYS foi obtido em difratômetro θ - θ (D2 Phaser, Bruker), com uma radiação de cobre K ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operando em uma corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV. A detecção foi realizada através de um detector contador de cintilação unidimensional (LYNXEYE). As medidas foram obtidas à temperatura ambiente, através de varredura angular de 2θ na faixa de 5° a 50° , com *step* angular de 0.091° .

2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu, Kioto, Japão) utilizando cadinhos de alumínio fechados hermeticamente, contendo aproximadamente 2 mg de amostra. A faixa de temperatura analisada foi de 40 a 250 $^\circ\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ e sob atmosfera dinâmica de N_2 de 100 mL/min. A célula de DSC foi previamente calibrada com padrão de referência índio (ponto de fusão: 156,6 $^\circ\text{C}$, $\Delta H_{\text{fusão}} = -28,54 \text{ J/g}$) e zinco (ponto de fusão 419,5 $^\circ\text{C}$). Os dados obtidos foram processados em *software* TA-60.

2.2.3 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria (TG) foi realizada em termobalança TGA-50, utilizando cadinho de platina com aproximadamente 3 mg de amostras analisadas a razão de aquecimento de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$, na faixa de 30 a 900 $^\circ\text{C}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 de 50 mL/min. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de oxalato de cálcio, com pureza de 99,99%. Os dados foram processados em *software* TA-60.

2.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros IV foram obtidos em equipamento Frontier FT-IR/NIR (PerkinElmer, Brasil) na faixa de 4000 e 515 cm^{-1} , com uma média de 10 *scans* por análise.

2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

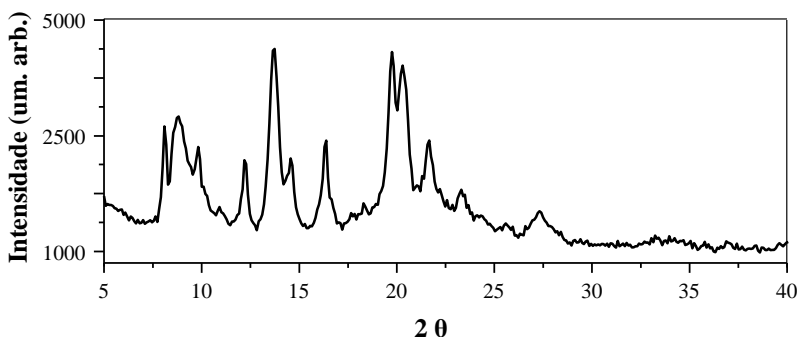
As análises de microscopia foram realizadas na Central de Microscopia (CMI), do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá. As fotomicrografias da NYS foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550. As amostras foram fixadas em suporte específico e revestidas com ouro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRX)

A Figura 6 mostra o difratograma obtido por DRX para a matéria-prima nistatina. Apesar do alargamento na linha de base, que sugere um leve grau de amorfização da amostra, o difratograma obtido confirma o caráter cristalino da NYS, com picos característicos em 8,19°; 8,82°; 13,72°; 16,39°; 19,68° e 20,3°. Estes resultados confirmam dados previamente relatados em literatura referentes ao perfil cristalino de NYS (SAKEER et al., 2010b).

Figura 6 – Difratograma de pó da nistatina



3.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

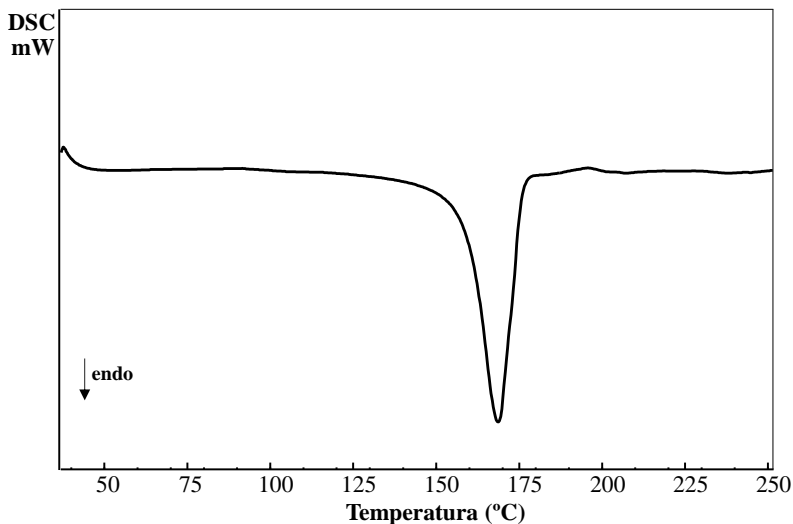
As técnicas termoanalíticas, na caracterização de amostras, fornecem resultados de pureza, fusão e compatibilidade de componentes.

Na Figura 7, tem-se curva de aquecimento por DSC da amostra de NYS apresentando um pico endotérmico, largo e único em 168,77 °C, correspondente à temperatura de fusão da nistatina, conforme dados previamente relatados (BRESCANSIN; PORTILHO; PESSINE, 2013).

O alargamento do pico pode indicar que trata-se de uma mistura de NYS A1, A2 e A3, ou pela possibilidade da decomposição gradual fármaco ter ocorrido acima de 160 °C sem fundir (MICHEL, 1972).

A presença de um único pico evidencia a prevalência de um composto (A1), normalmente o mais abundante na mistura, caracterizando a presença de uma única estrutura cristalina para a amostra, com ausência de polimorfos (BRESCANSIN, 2006).

Figura 7 – Curva de DSC da nistatina



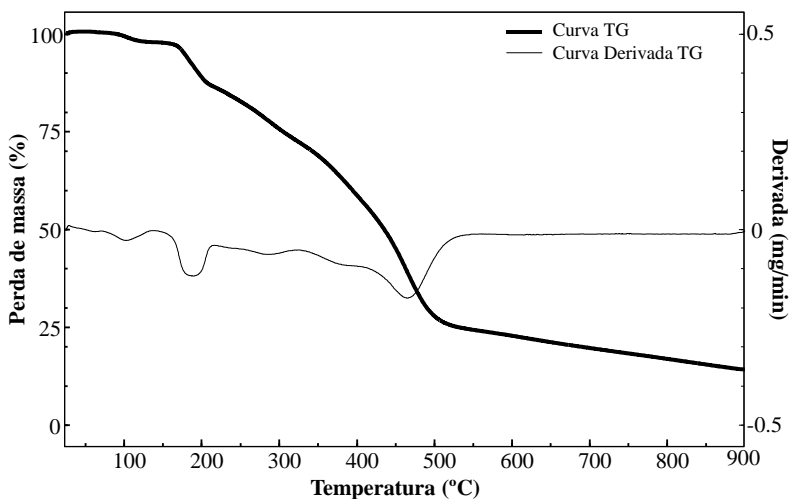
3.3 TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A curva TG da amostra de NYS está ilustrada na Figura 8. A perda de massa de NYS ocorreu de forma gradual em mais de uma etapa de degradação, iniciando em 90 °C com a primeira etapa, que pode estar relacionada à água por se tratar de um fármaco higroscópico, mantendo-se até o fim da análise (900 °C).

De acordo com a DTG da amostra, após a perda de água residual, a curva apresenta dois eventos principais de decomposição no intervalo analisado (30 a 900 °C), o primeiro na região entre 178,83 °C e 186,09 °C ($\Delta m = 10,52\%$) e o segundo, uma etapa não muito bem definida, mas que compreende a região entre 209,80 °C e 520,20 °C ($\Delta m = 61,60\%$).

O perfil obtido de perda de massa em função do aumento da temperatura obtido para NYS é bastante semelhante ao resultado obtido por Brescansin (2006) com outras amostras para o mesmo fármaco e por Koontz e colaboradores (2003) em estudo realizado com o antifúngico natamicina, pertencente à mesma classe que a NYS, o que comprova o comportamento característico dessas moléculas.

Figura 8 – Curva de TG da nistatina



3.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

O espectro e as bandas características da NYS encontram-se na Figura 9 e são descritos na Tabela 3. O espectro apresenta bandas características do fármaco, descritas anteriormente também por Stefanovic e colaboradores (2012) e por Silverstein, Webster e Kiemle (2005).

Figura 9 - Espectro no infravermelho de nistatina

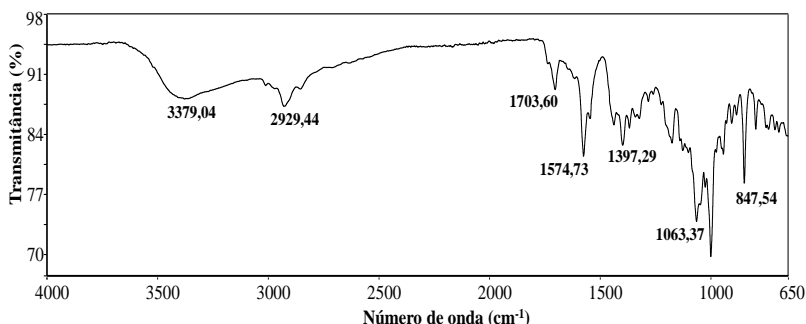


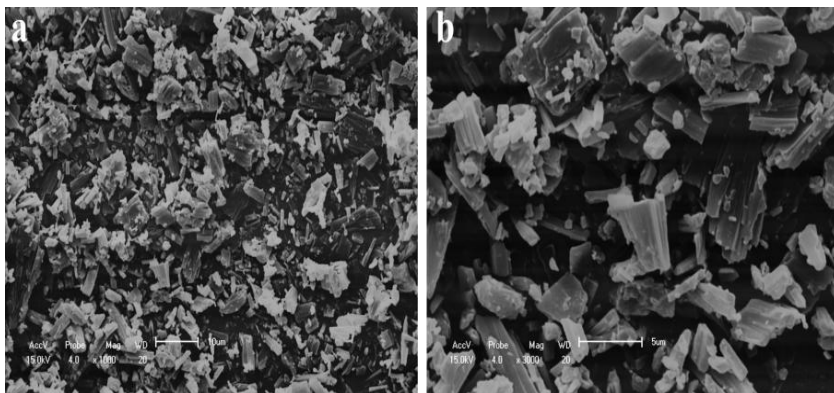
Tabela 3 - Frequências de absorção características das vibrações de ligação da matéria-prima nistatina

Frequência (cm ⁻¹)	Modo vibracional
847,54	Duplas ligações CH=CH
1063,37	Estiramento simétrico de CH ₃
1397,29	Deformação simétrica de CH ₃
1574,73	Íon Carboxilato
1703,60	Lactona
2929,44	Estiramento assimétrico de CH ₂
3379,04	Estiramento NH, OH

3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As fotomicrografias obtidas através de MEV (Figura 10) comprovam a característica cristalina da amostra de NYS, complementarmente ao que fora analisado através da técnica de DRX.

Figura 10 – Fotomicrografias da nistatina em magnitudes de 1000 x (a) e 3000 x (b)



4 CONCLUSÕES

A caracterização físico-química da matéria-prima foi realizada através de diferentes técnicas analíticas e os resultados obtidos foram comparados com as especificações da literatura.

Por se tratar de um fármaco pertencente a uma classe de antifúngicos que possuem, além do mecanismo de ação, estruturas químicas bastante semelhantes, os resultados obtidos foram também comparados aos dados da literatura relacionados à caracterização de outros fármacos pertencentes à mesma classe.

O espectro na região do infravermelho foi primordial nessa etapa, pois, por se tratar de uma técnica bastante simples e rápida, pode-se compará-lo às bandas características do fármaco obtidas em diversos outros trabalhos realizados anteriormente.

A curva termogravimétrica mostra o comportamento característico da classe de fármacos à qual a NYS pertence, com perfil de perda de massa que ocorre de forma gradual e em várias etapas.

Através da técnica de DSC pode-se inferir que, apesar de tratar-se de uma mistura de compostos (A1, A2 e A3), característica essa observada através do alargamento no evento endotérmico, existe um composto majoritário no lote analisado, supostamente A1, por apresentar um único evento de fusão.

Sendo assim, pode-se concluir que a amostra de NYS possui característica cristalina, baseando-se no evento único de fusão obtido (próximo a 160 °C), reflexões características no difratograma e fotomicrografias.

**CAPÍTULO 3: Desenvolvimento e validação de método analítico
por cromatografia líquida de alta eficiência
para quantificação de nistatina em micropartículas poliméricas de
cloridrato de quitosana e em amostras de pele**

1 INTRODUÇÃO

Durante as diversas fases do desenvolvimento farmacêutico, seja na produção ou no controle de qualidade, a identificação e quantificação da amostra são requeridas. Para tal, métodos analíticos são desenvolvidos e validados com o intuito de atestar que os resultados obtidos são precisos, exatos, específicos e confiáveis, para a finalidade planejada (ICH, 2005; STÖCKL; D'HONDT; THIENPONT, 2009).

O método analítico farmacopeico para NYS, bem como para outros antimicrobianos, é bastante limitado e realizado sob o ponto de vista apenas microbiológico, ou seja, relacionado à potência do fármaco, fator limitante no que diz respeito à quantificação dessas amostras.

Com base nisso, este capítulo apresenta os resultados obtidos no desenvolvimento e validação de método analítico que será utilizado para quantificar NYS nas formulações, em amostras de pele de orelha suína (para cuja finalidade será posteriormente revalidado), bem como para monitorar a integridade da amostra frente a possíveis degradações durante o processo.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS

Matéria-prima comercial de NYS foi obtida através da Galena Distribuidora de Produtos Químicos LTDA, Campinas-SP, Brasil, lote 1105002506.

Todos os reagentes utilizados possuem grau analítico. A água ultrapura foi obtida por sistema gradiente Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

2.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises de CLAE foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LC 10A (Kyoto, Japão), equipado com bombas LC-10AD, degaseificador DGU-14A, detector UV/VIS de comprimento de onda variável (fixado em 305 nm) SPD-10AV, unidade controladora de sistema SCL-10AVP e auto injetor Jasco AS-2055 Plus. As áreas obtidas foram integradas automaticamente pelo software Shimadzu Class VP[®] versão 6.12.

A quantificação de NYS foi realizada em fase reversa utilizando uma coluna analítica Phenomenex (Torrance, Estados Unidos) Gemini C₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), mantida a temperatura ambiente (25 °C) e protegida por pré-coluna C₁₈ (4,0 mm x 3,0 mm). A fase móvel foi composta isocraticamente por acetonitrila (ACN): solução aquosa de EDTA dissódico 0,025 mM (37:63, v/v), em fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, após filtração em filtros de membrana de 0,45 µm.

2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

A solução estoque do fármaco foi preparada pesando-se 25 mg de matéria-prima NYS e transferindo-a, cuidadosamente, para um balão de 25 mL, sofrendo posterior dissolução em 1% de DMF e com o volume completado em proporções de ACN: EDTA dissódico 0,025mM iguais as da fase móvel, para obtenção de 1000 µg/mL.

As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente através da diluição das soluções estoque até a concentração de 10 µg/mL de NYS com ACN: EDTA dissódico 0,025mM (37:63, v/v).

As amostras de formulação branca foram obtidas por meio do mesmo processo de extração de NYS que fora aplicado às amostras que continham o fármaco, método de lavagem com solventes (DMF e água purificada), posteriormente foi realizada a diluição em fase móvel e ambas amostras foram filtradas em filtro de membrana de náilon de 0,45 μm .

2.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE NYS POR CLAE

A validação do método analítico foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no guia ICH Q2R1 que descreve a validação de procedimentos analíticos (ICH, 2005) e na resolução da ANVISA RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). O método foi validado para quantificação de NYS em micropartículas nos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção e quantificação, robustez, especificidade, precisão, exatidão.

2.4.1 Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A linearidade do método foi determinada por meio de três curvas de calibração analíticas independentes em oito níveis de concentração variando de 0,1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de NYS. As análises foram realizadas em triplicata e a média das áreas obtidas foi plotada contra as concentrações teóricas para obter a curva analítica. O método dos mínimos quadrados foi aplicado para obter a equação de calibração e o coeficiente de correlação (r), a curva média foi obtida por regressão linear.

Os valores de LD e LQ, apesar de não serem exigidos para quantificação de fármacos, foram determinados para posteriores análises das amostras. Esses limites foram estabelecidos através da curva analítica levando-se em consideração o desvio padrão da resposta (σ) e o coeficiente angular (S), obtidos através da equação da reta média, demonstrado nas equações 1 e 2, LQ e LD, respectivamente.

$$\text{LQ} = (10 \sigma) / S \quad (1)$$

$$\text{LD} = (3,3 \sigma) / S \quad (2)$$

2.4.2 Especificidade

A especificidade de um método baseia-se na habilidade em determinar o analito na presença de seus excipientes, impurezas e produtos de degradação.

As micropartículas brancas, utilizadas para comprovar a especificidade do método, foram obtidas através de suspensões de Cl.QTS submetidas ao processo de secagem em *spray dryer* e liofilizador.

A influência do polímero foi avaliada por meio da injeção de uma solução da formulação sem o fármaco (branca) e analisadas nas mesmas condições experimentais das amostras contendo fármaco.

2.4.3 Precisão

A precisão do método analítico foi determinada a partir da repetibilidade (intradia) e da precisão intermediária (interdia). A repetibilidade foi avaliada pela determinação de seis análises da mesma concentração de NYS (10 µg/mL), no mesmo dia e sob as mesmas condições, enquanto que a precisão intermediária foi realizada a partir de análises da mesma concentração de fármaco em três dias diferentes, intradia e interdias. As medidas foram realizadas em triplicata e expressas como desvio padrão relativo (DPR) (%).

2.4.4 Exatidão

A exatidão foi definida pela recuperação de quantidades conhecidas de NYS de 8, 10 e 12 µg/mL, correspondendo a 80, 100 e 120% da concentração de injeção, adicionadas a suspensões de micropartículas brancas, analisadas em triplicata. A exatidão foi calculada como sendo a diferença percentual de recuperação entre a concentração experimental média e a concentração teórica em cada nível.

2.4.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de variações no comprimento de onda (303, 305 e 307 nm), volume de injeção da

amostra (19, 20 e 21 μL) e temperatura do forno (20, 25 e 30 $^{\circ}\text{C}$). As amostras submetidas a essas condições foram analisadas em triplicata.

2.5 REVALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE NYS EM AMOSTRAS DE PELE

O método analítico proposto, utilizado para quantificação de NYS nas formulações, foi revalidado de acordo com a ICH (2005) através das análises dos parâmetros de especificidade, linearidade, LD, LQ e exatidão.

2.5.1 Linearidade, LD e LQ

Conforme descrito anteriormente, a linearidade do método foi determinada através de três curvas de calibração de oito concentrações de NYS que variam entre 0,1 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados das análises, em triplicata, e a média das áreas obtidas foram plotados contra as concentrações teóricas para obtenção da curva analítica.

Em seguida, aplicou-se o método dos mínimos quadrados para obter a equação de calibração e o coeficiente de correlação (r), a curva média foi obtida por regressão linear, através da qual se determinou os valores de LD e LQ, levando-se em consideração o desvio padrão da resposta (σ) e o coeficiente angular (s), conforme as equações 1 e 2.

2.5.2 Especificidade

Para confirmar a especificidade do método, uma solução contendo apenas pele foi analisada, após período de extração de proteínas (24 h em MeOH), nas mesmas condições experimentais das amostras contendo NYS.

2.5.3 Exatidão

Para análise da exatidão do método analítico, as amostras de pele foram contaminadas com quantidades conhecidas de NYS de 8, 10 e 12 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 80, 100 e 120% da concentração de injeção e analisadas em triplicata. A exatidão foi calculada a partir do percentual de recuperação do fármaco.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi conduzida através de análise de variância ANOVA, nos quais resultados significativos apresentam probabilidade menor do que 5% ($p < 0,05$ com intervalo de confiança de 95 %). A avaliação estatística dos resultados foi realizada no software MS Excel[®].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE

Considerando que a matéria-prima NYS pode ser composta de uma ou mais substâncias (A1, A2, A3), conforme mencionado previamente, várias condições cromatográficas foram propostas para que apenas a forma majoritária (A1) fosse quantificada na análise.

Diversas composições de fase móvel foram testadas, variando proporções de diferentes tampões, ACN, água e metanol (MeOH), taxas de fluxo e temperatura de forno.

A taxa de fluxo e adição do EDTA foram aplicadas com base no trabalho de Cione, Liberale e Silva (2010) e a proporção utilizada desse tampão e ACN diminuiu o tempo de retenção do fármaco, tornando, conseqüentemente, o tempo da corrida cromatográfica curto e de fácil reprodução. O ajuste da temperatura a 25 °C foi mantido às condições ambientes para manter a estabilidade do fármaco.

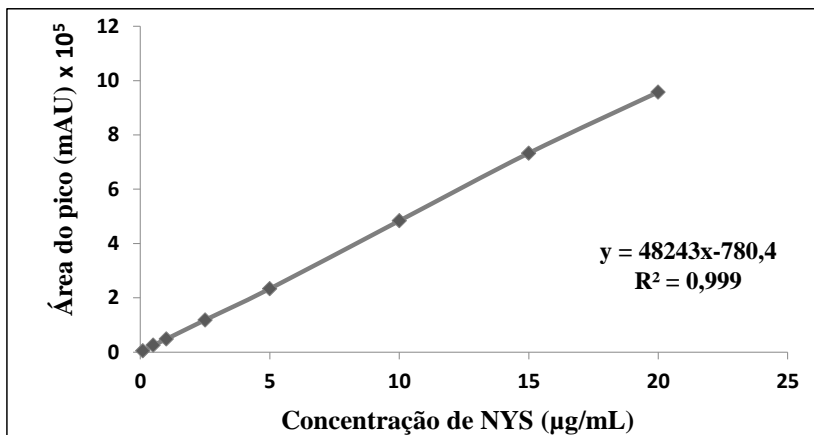
3.2 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE NYS POR CLAE

3.2.1 Linearidade, LD e LQ

A avaliação da linearidade demonstrou que a NYS apresentou uma correlação linear na faixa de 0,1 a 20 µg/mL. A equação da reta média foi $y = 48243x - 780,4$, onde x refere-se à concentração em µg/mL e y corresponde à área do pico em volts e coeficiente de correlação de 0,9999, conforme Figura 11.

Os dados foram avaliados por meio de análise estatística ANOVA, a qual demonstrou regressão linear significativa ($p < 0,05$) e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$).

Figura 11 - Curva de calibração média da nistatina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência a 305 nm, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2)



Os valores de LQ e LD foram de 0,076 e 0,025 µg/mL, respectivamente, garantindo a sensibilidade do método em valores abaixo do primeiro ponto da curva de calibração.

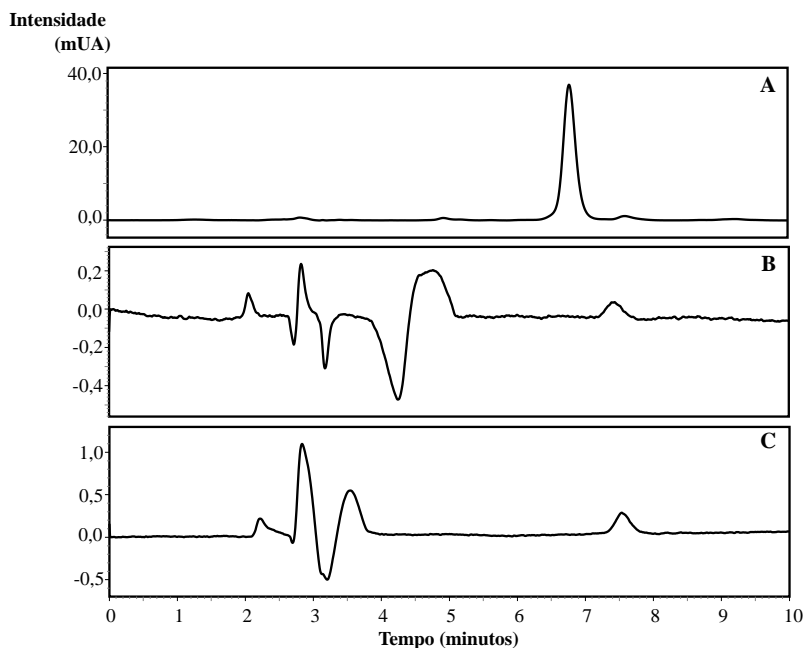
3.2.2 Especificidade

A Figura 12 apresenta os cromatogramas da solução de fármaco a 10 µg/mL (Figura 12a) e formulações brancas: liofilizada (L0) (Figura 12b) e obtida por *spray drying* (S0) (Figura 12c).

Diferença entre os cromatogramas é observada aos 4,2 min de análise, através da presença de um pico na amostra liofilizada inexistente na amostra obtida por *spray drying*, o qual pode estar atribuído ao Tween[®] nessas amostras.

O resultado exposto mostra que o método é específico e que não houve sobreposição ou interferência dos excipientes com o pico da NYS, no comprimento de onda de 305 nm.

Figura 12 – Cromatogramas obtidos da matéria-prima nistatina em sua concentração de injeção (10 µg/mL) (a); micropartícula branca obtida por liofilização [L0] (b) e micropartícula branca obtida por *spray drying* [S0] (c)



3.2.3 Precisão

Os resultados de precisão interdia e intradia estão descritos na Tabela 4, expressos em DPR (%). O teor de NYS encontrado nos três dias diferentes foi equivalente ($p \leq 0,05$) e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 5% (ICH, 2005; RIEKES, 2013).

Tabela 4 – Resultados dos ensaios de precisão do método

Precisão Interdia	% Recuperado	DPR^a (%)
Dia 1 (n=3)	104,61	3,3
Dia 2 (n=3)	103,96	1,3
Dia 3 (n=3)	101,19	1,7
Precisão Intradia (n=12)	103,25	1,76

^a Desvio padrão relativo

3.2.4 Exatidão

Baseando-se na análise das formulações brancas contaminadas com concentrações conhecidas de NYS (80, 100 e 120%) não foram observadas diferenças significativas entre a quantidade adicionada de NYS e a quantidade encontrada ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos (Tabela 5) são expressos como percentual de NYS encontrada, variando entre 98,1 e 100,4% satisfazendo os critérios do estudo.

Tabela 5 - Dados referentes à exatidão do método

Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração média encontrada (µg/mL)	Recuperação (%) (DPR %)^a
8,0	7,98	99,8 (0,13)
10,0	9,81	98,1 (0,12)
12,0	12,05	100,4 (0,02)

^a Desvio padrão relativo

3.2.5 Robustez

Os resultados e a faixa experimental das variáveis estudadas estão descritos na Tabela 6, a partir da qual pode-se perceber que a quantificação de NYS determinada através de pequenas e deliberadas variações de parâmetros críticos comprovou a robustez do método.

Tabela 6 – Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez do método

Variável	Faixa investigada	Teor NYS^a (%)	DPR^b (%)
Comprimento de onda (nm)	303	98,58	0,02
	305	102,75	0,55
	307	106,90	0,23
Temperatura da coluna (°C)	20	105,62	0,12
	25	103,87	0,99
	30	106,35	0,22
Volume de injeção (µL)	19	103,90	0,06
	20	108,28	0,05
	21	112,31	0,27

^a Média de três replicatas

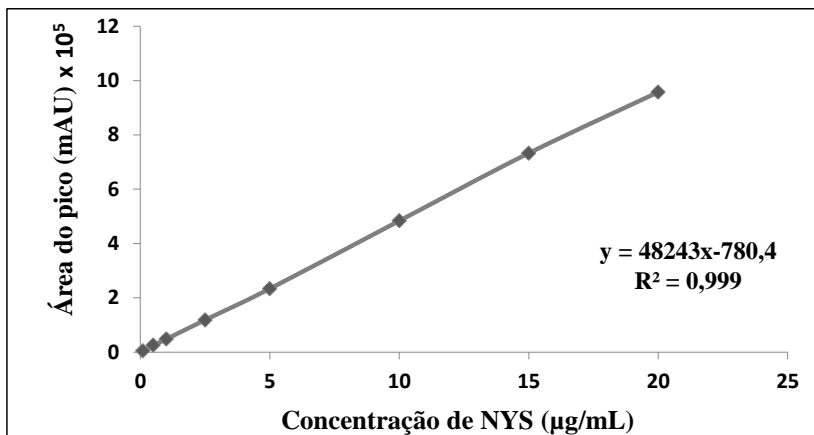
^b Desvio padrão relativo

3.3 REVALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE NYS EM AMOSTRAS DE PELE

3.3.1 Linearidade, LD e LQ

A NYS apresentou uma correlação linear na faixa de 0,1 a 20 µg/mL. Conforme a Figura 13, a equação da reta média foi $y = 48243x - 780,4$, onde x refere-se à concentração em µg/mL e y corresponde à área do pico em volts e coeficiente de correlação de 0,9999.

Figura 13 - Curva de calibração média obtida por cromatografia líquida de alta eficiência, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2)



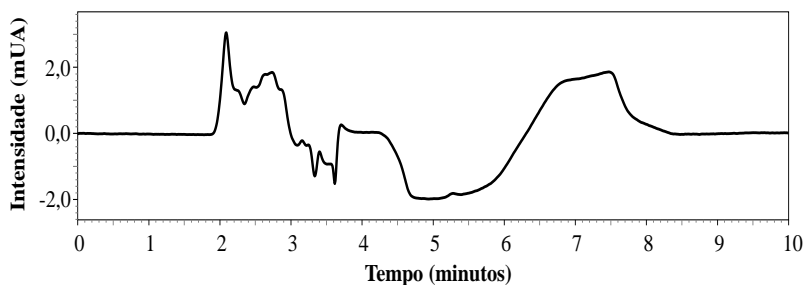
Os resultados das avaliações efetuadas em triplicata foram avaliados por meio de análise estatística ANOVA, que demonstrou regressão linear significativa ($p < 0,05$) e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$).

Os valores de LQ e LD foram previamente apresentados no capítulo 3. Esses limites foram determinados, principalmente, para esta etapa do trabalho, uma vez que valores baixos de permeação de NYS já eram esperados. Sendo assim, os LQ e LD obtidos foram 0,076 e 0,025 µg/mL, respectivamente, garantindo a sensibilidade do método em valores abaixo do primeiro ponto da curva de calibração.

3.3.2 Especificidade

O cromatograma obtido com a amostra de pele sem a presença de NYS está apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência de amostra de pele sem fármaco



Na região em que ocorre a absorção da NYS (tempo de retenção de 6,8 min), conforme Figura 12 do capítulo anterior, não é visualizada interferência dos componentes da pele, apenas oscilações consideradas normais na linha de base, comprovando a especificidade do método.

3.3.3 Exatidão

Os resultados obtidos para o ensaio de exatidão estão descritos na Tabela 7. Valores de recuperação entre 98,4 e 102,7 % foram apresentados após extração do fármaco de amostras de pele, satisfazendo os critérios do estudo.

Tabela 7 - Dados referentes à exatidão do método

Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação ^b (%) (DPR %) ^a
8,0	7,96	99,6 (0,42)
10,0	9,84	98,4 (0,30)
12,0	12,32	102,7 (0,28)

^a Desvio padrão relativo

^b Média de triplicatas

4 CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido é seguro, simples e rápido, uma vez que apresentou tempo de corrida cromatográfica de apenas 10 minutos, considerado excelente em termos de reprodução de análises.

Pequenas e deliberadas alterações nas condições cromatográficas não influenciaram de forma significativa a quantificação do fármaco, tampouco os excipientes presentes nas formulações brancas utilizadas como contaminantes. Sendo assim, pode-se dizer que o método é específico, robusto, linear, sensível e exato.

O método para quantificação de NYS em amostras de pele fora revalidado e mostrou-se, mais uma vez, específico, sem interferências dos componentes da pele; exato, ou seja, as alterações na quantificação de concentrações conhecidas do fármaco na presença da pele não foram significativas; e os dados quanto à linearidade, LD e LQ foram os mesmos da sua validação.

Análises por CLAE são amplamente aplicadas, pois revelam resultados muito confiáveis na quantificação de fármacos associados a partículas. Sendo assim, o método proposto é adequado para o objetivo inicial de quantificar NYS nas formulações de cloridrato de quitosana e tornou-se ferramenta fundamental durante o desenvolvimento deste trabalho.

CAPÍTULO 4: Micropartículas de cloridrato de quitosana contendo nistatina destinadas à aplicação tópica: Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro* e *ex vivo*

1 INTRODUÇÃO

NYS é um antifúngico com espectro de ação maior do que outros fármacos pertencentes à mesma classe de antifúngicos, a exemplo da AnfB (OFFNER et al., 2004). No entanto, possui administração limitada, basicamente, através da via tópica devido à alta toxicidade quando administrado sistemicamente (MEHTA et al., 1987) e poucos relatos existem sobre a caracterização físico-química e desenvolvimento de formulações contendo NYS (BRESCANSIN, 2006).

A encapsulação de fármacos em sistemas nano/microparticulados é uma estratégia amplamente adotada quando a intenção é aumentar a permeabilidade/retenção cutânea de substâncias.

Para tal, o polímero QTS é, indiscutivelmente, um dos mais utilizados para veicular esses sistemas, assim como o Cl.QTS, na sua forma de sal, devido as características favoráveis como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, a baixa toxicidade e bioadesão (SHAH et al., 2012).

Muitas publicações descrevem diferentes técnicas de obtenção desses sistemas, além da via de administração dos mesmos. Um aumento considerável na dissolução de fármacos de baixa solubilidade, como a carbamazepina, foi obtido com o uso de sais de QTS para formulações visando a via nasal (GAVINI et al., 2006).

Outro relato da literatura mostra que o Cl.QTS utilizado em sistema microparticulado produzidos por *spray drying*, promoveu aumento na mucoadesão de fármacos de características hidrossolúveis, tal qual o polímero, como cimetidina e famotidina (HE; DAVIS; ILLUM, 1998).

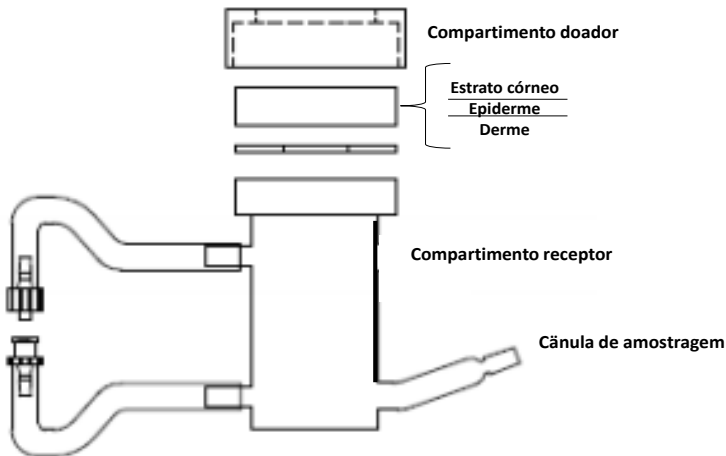
O Cl.QTS é um sal de cargas positivas que, quando em solução, podem interagir com os ácidos graxos livres presentes no estrato córneo através de interações eletrostáticas, influenciando na penetração de fármacos (GAVINI et al., 2006; KIM et al., 2010). Essas interações podem se tornar um aspecto negativo na permeação de ativos, quando se leva em consideração que o contrário também é possível, basta o fármaco interagir de tal maneira com o polímero, que a penetração fica inviável, aspecto dependente das características eletrostáticas de ambos (TAGLIARI, 2012).

Dentre os modelos utilizados para avaliação de permeação/retenção de ativos, a pele de porco tem sido amplamente utilizada em função da praticidade em se adquirir esse material em abatedouros e sua similaridade funcional e estrutural com a pele humana. Estudos demonstram que a permeação de fármacos é bastante

similar entre ambas, uma vez que possuem características comuns que vão desde a composição lipídica, como distribuição esparsa de pelos, vascularização e pigmentação (HASANOVIC et al., 2011; CHANG et al., 1994; SCHMOOK; MEINGASSNER; BILLICH, 2001).

Um modelo de avaliação de permeabilidade de ativos através de amostras de pele que é muito utilizado é o de difusão em câmara de Franz, no qual o tecido é colocado entre dois compartimentos denominados: doador (superior) e receptor (inferior). A disposição da amostra é feito conforme ilustrado na Figura 15.

Figura 15 – Esquema representativo da câmara de difusão de Franz



Fonte: Adaptado de Hanson Research (2004)

No compartimento doador são colocadas as soluções de amostras a serem testadas e no receptor, soluções tamponantes. Os experimentos são conduzidos a, normalmente, 37 °C, temperatura corporal. Através da cânula de amostragem que dá acesso ao compartimento receptor, alíquotas de amostras são coletadas nos períodos pré-determinados e as mesmas são quantificadas, geralmente, através de técnicas espectrofotométricas e cromatográficas (FÖRSTER et al., 2009).

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS

NYS, matéria-prima comercial, foi adquirida por Galena Distribuidora de Produtos Químicos LTDA, Campinas-SP, Brasil, lote 1105002506.

O Cl.QTS, polímero utilizado nas formulações, foi obtido através de um processo patenteado de síntese a partir do polímero QTS (GEREMIAS et al., 2006).

A água ultrapura foi obtida por sistema gradiente Milli-Q (Millipore, Estados Unidos) e todos os reagentes utilizados possuem grau analítico.

Culturas de *Candida albicans* ATCC (*American Type Culture Collection*) 10231 mantidas a 4 °C, ágar e caldo Sabouraud, solução salina 0,9% e DMSO, para os ensaios microbiológicos.

2.2 DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE NYS

As micropartículas a base de Cl.QTS foram desenvolvidas por técnicas distintas, emulsificação/evaporação de solvente e *spray drying*, conforme metodologias descritas a seguir.

2.2.1 Preparo de micropartículas pela técnica de emulsificação/evaporação de solvente

Soluções de Cl.QTS a 0,5%, 1% e 1,5% em volumes de 10 mL cada, foram preparadas em água contendo 2% de polissorbato (Tween[®]) 80, sob as quais foram gotejadas soluções de 1 mL contendo NYS na concentração de 50 mg/mL em MeOH (Tabela 8), sob agitação em ultraturrax (T 25 basic IKA-Werke, Staufen, Germany) por 5 min a uma velocidade de 17500 rpm, metodologia adaptada de Gavani e colaboradores (2005).

A formulação branca seguiu o mesmo procedimento descrito, exceto pela adição de fármaco, no lugar do mesmo foi gotejado apenas o MeOH sob a solução de Cl.QTS 1% (10 mL).

Em seguida, essas amostras foram congeladas a -20 °C e submetidas a secagem em liofilizador (Terroni LD 1500) por 48 horas a -50 °C sob pressão de 133,3 mBar. Finalizada a operação, os liofilizados

foram mantidos em dessecador e refrigeração até a caracterização físico-química.

Tabela 8 – Composição das formulações para técnica de emulsificação/evaporação de solvente

Formulação^a	Cl.QTS (10 mL)
L0	1% (10 mg/mL)
L1	0,5% (5 mg/mL)
L2	1% (10 mg/mL)
L3	1,5% (15 mg/mL)

^a Formulações preparadas em triplicata com NYS (50 mg/mL) e 2% Tween 80[®]

2.2.2 Preparo de micropartículas pela técnica de *spray drying*

Conforme o procedimento descrito anteriormente para a técnica de emulsificação/evaporação do solvente, manteve-se as proporções de fármaco:polímero para as suspensões submetidas ao processo de secagem em *spray dryer* (Tabela 9).

Tabela 9 – Composição das formulações para técnica de *spray drying*

Formulação^a	Cl.QTS (10 mL)
S0	1% (10 mg/mL)
S1	0,5% (5 mg/mL)
S2	1% (10 mg/mL)
S3	1,5% (15 mg/mL)

^a Formulações preparadas em triplicata com NYS (50 mg/mL)

Foram adicionadas, às soluções de Cl.QTS preparadas em água, soluções de NYS 50 mg/mL em MeOH que, sob agitação magnética, foram aspiradas em *spray dryer* B-290 (Buchi, Suíça), temperatura de entrada de 120 °C, temperatura de saída de 76 °C, fluxo de ar de 10 mL/min e aspiração a 90%.

Da mesma forma que para as formulações submetidas à secagem em liofilizador, a formulação branca seguiu o mesmo procedimento, mas sem o fármaco. Sendo assim, 1 mL de MeOH foi adicionado à solução de Cl.QTS 1% (10 mL), sob agitação magnética.

As amostras secas foram armazenadas em dessecador sob refrigeração até o uso.

2.3 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DAS FORMULAÇÕES

A determinação da concentração total de ativo associado às micropartículas foi realizada pela técnica de ultrafiltração/centrifugação utilizando método cromatográfico desenvolvido e validado (Capítulo 3), na qual o ativo total, associado aos sistemas obtidos, foi quantificado após completa dissolução das micropartículas (BOONSONGRIT; MITREVEJ; MUELLER, 2006; SUN et al., 2008).

A eficiência de encapsulação (EE%), ou seja, a quantidade de NYS associada nas micropartículas, foi determinada a partir de uma alíquota de 10 mg das formulações, às quais foram adicionadas proporções iguais de solventes específicos para solubilização do polímero (água) e do fármaco (DMF), completando um volume final de 1 mL. Essas suspensões foram agitadas em aparato do tipo vortex[®] por 5 min e, em seguida, centrifugadas por igual período. As diluições posteriores das soluções obtidas foram realizadas em proporções de fase móvel ACN: EDTA dissód. 0,025mM (37:63, v/v).

A partir da concentração total de NYS foi estabelecido o teor de fármaco nas suspensões, conforme equação 3.

A EE (%) foi calculada de acordo com a equação 4.

$$\text{Teor} = \frac{\text{quantidade de NYS em mg}}{100 \text{ mg de micropartículas}} \quad (3)$$

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{quantidade de NYS associada}}{\text{quantidade de NYS teórica/inicial das formulações}} \times 100 \quad (4)$$

2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A realização do estudo de caracterização das micropartículas obtidas através de ambas as técnicas descritas acima, foram aplicadas as metodologias propostas para a caracterização da matéria-prima no Capítulo 2. O objetivo da caracterização foi avaliar a influência da técnica de preparo e das proporções fármaco:polímero testadas na produção destes sistemas.

2.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC contendo aproximadamente 2 mg das amostras foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu, Kioto, Japão) utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados. Sob atmosfera dinâmica de N₂ de 100 mL/min, com razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 40 a 250 °C.

A célula de DSC foi previamente calibrada com padrão de referência índio e zinco. Os dados obtidos foram processados em *software* TA-60.

2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros IV foram obtidos em equipamento Frontier FT-IR/NIR (PerkinElmer, Brasil) na faixa de 4000 e 515 cm⁻¹, com uma média de 10 *scans*.

2.4.3 Difração de raios X de pó (DRX)

Para avaliação da cristalinidade, padrões de raios X foram obtidos em difratômetro θ - θ (D2 Phaser, Bruker), com uma radiação de cobre K ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operando em uma corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, através de varredura angular de 2θ na faixa de 5° a 50°, com *step* angular de 0.091°. A detecção foi realizada através de um contador de cintilação unidimensional detector LYNXEYE.

2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As formulações obtidas por ambas as técnicas foram fixadas em suporte específico e revestidas com ouro. Em seguida, procederam-se as análises de microscopia em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550, realizadas na Central de Microscopia (CMI), do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá.

2.4.5 Determinação do tamanho de partícula

O diâmetro médio e distribuição granulométrica das micropartículas foram avaliados por difração a laser em equipamento

Mastersizer 2000 Hydro (Malvern Instruments, UK), do laboratório de Farmacotécnica desta Universidade.

As amostras para análise foram dispersas, com auxílio de agitação em vortex[®] por 1 min, em acetona, por se tratar de um solvente no qual nem o polímero e nem o fármaco são solúveis.

A distribuição granulométrica foi referida como *span*, calculada conforme a equação 5.

$$Span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}} \quad (5)$$

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para avaliação da atividade antifúngica da NYS nas formulações obtidas, culturas de *Candida albicans* ATCC 10231 foram ativadas em caldo Sabouraud à temperatura de 37 °C e padronizadas em salina de acordo com a escala 0,5 de McFarland, correspondente a 0,5 → 1,5 x 10⁶ UFC/mL. Essa solução foi diluída (1:100) no momento do procedimento, com o intuito de obter-se a concentração de 1,5 x 10⁴ UCF/mL de leveduras.

2.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da atividade antifúngica da NYS e formulações obtidas foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010) e o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, protocolo M27-A).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através da diluição seriada (1:2) das amostras, em intervalo entre 50 e 0,1 µg/mL de NYS matéria-prima e proporcionalmente para as formulações e MF (fármaco:polímero), diluídas em caldo Sabouraud.

Inicialmente, 100 µL de caldo Sabouraud foram adicionados em cada um dos 96 poços das microplacas. Em seguida, 100 µL das soluções testes foram colocadas em seus respectivos poços, seguidas da diluição seriada 1:2.

Posteriormente, 10 µL do inóculo padronizado, *Candida albicans* ATCC 10231, foram inoculados em cada poço. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C, em câmara úmida, por 24 a 48 horas.

Com o intuito de assegurar o controle do experimento, em todas as microplacas haviam poços para controle positivo (caldo Sabouraud e inóculo) e negativo (apenas o meio). Diluições de Tween 80[®] e DMSO

foram avaliadas para fins de avaliar sua influência no efeito antifúngico das amostras.

A CIM considerada foi a menor concentração que não possuiu crescimento visual de microrganismos das análises realizadas em triplicata.

2.5.2 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima (CFM), ou seja, a concentração mínima que garantirá não só a inativação, como a morte desses microrganismos foi determinada a partir de uma alíquota de 10 μ L dos poços das diluições que apresentaram perfil de CIM, uma sub-inibitória e duas concentrações acima de CIM, foram transferidas para uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud, em triplicata e incubadas em estufa a 37 °C, por 24 a 48 horas.

Esta etapa foi realizada apenas com a formulação que apresentou o melhor CIM em comparação à NYS.

2.6 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CUTÂNEA DE NYS

2.6.1 Obtenção da pele de orelha suína

Através de um matadouro situado na cidade de Antônio Carlos (SC), obteve-se as orelhas suínas que foram armazenadas em tampão Krebs¹, a 4 °C, até o uso no procedimento em questão.

Logo após a lavagem com água destilada, foram retirados os pelos com tesoura e selecionadas, então, as partes íntegras, ou seja, livres de manchas ou de lesões.

Em seguida, foi realizada a dissecação para extrair derme e epiderme das amostras, com o auxílio de uma pinça e bisturi, descartando a hipoderme. Os fragmentos dissecados foram acondicionados em papel alumínio e armazenados a -80 °C, imersas em solução tampão Krebs até a utilização.

Para realizar o descongelamento foi utilizada solução tampão de Krebs em temperatura ambiente.

¹ Solução tampão de Krebs: NaCl (20mM); KCl (4,7mM); KH₂PO₄ (1,2mM); NaHCO₃ (25mM); CaCl₂ (2,5mM); MgCl₂ (1mM); glicose (5,5mM), pH 7,4.

2.6.2 Avaliação da retenção de NYS em pele de orelha suína

Realizada no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC, esta etapa foi executada pelo doutorando Thiago Caon, sob supervisão da Prof^a Dr^a Cláudia Maria Oliveira Simões.

As câmaras de Franz foram alocadas em banho termostaticado a 37 °C sob agitação Multiponto (Dist). O compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de tampão PBS. O tecido foi colocado na interface dos compartimentos da câmara de Franz sob agitação a 800 rpm.

Para avaliar a retenção de NYS a partir da formulação que apresentou o melhor resultado quanto a ação antifúngica em comparação ao fármaco livre (matéria-prima), soluções de concentrações proporcionais a 10 mg/mL de NYS foram preparadas em 2 mL de água e colocadas no compartimento doador do sistema.

Estudos prévios mostraram que para que a permeação transdérmica de ativos seja significativa, os mesmos devem ter, dentre outras características, peso molecular menor que 500 g/mol, diferente da NYS (926,13 g/mol) (LANGOTH; BERNKOP-SCHNURCH; KURIYAMA et al., 2005). Dessa forma, para analisar a concentração de fármaco retida nas diferentes camadas de pele, foram selecionados os tempos de coleta do experimento: 2, 4 e 6 horas. Alíquotas de 400 µL da solução receptora foram retiradas em cada tempo e armazenadas a -20 °C.

As amostras foram ressuspensas em ACN, componente da fase móvel, agitadas em aparato vortex[®] por 5 min, colocadas em banho de ultrassom por 15 min, centrifugadas e analisadas através de CLAE utilizando método previamente validado.

A retenção da NYS na epiderme e derme foi avaliada ao final do experimento, ou seja, após 6 horas do início do experimento. As amostras de pele foram retiradas do equipamento, lavadas para remoção do excesso de fármaco. Em seguida, com bisturi, a epiderme foi cuidadosamente separada da derme e apenas a região central, equivalente à área de permeação, foi recortada e picotada. Os fragmentos obtidos foram armazenadas em ACN para promover a extração do fármaco nas amostras e mantidos em repouso por 24 h.

No momento da análise quantitativa das amostras, foram submetidas à agitação (vortex[®] por 5 min) para o rompimento das células e aumento da eficiência de extração. As proteínas, restos celulares e outros interferentes foram removidos pela filtração.

As amostras foram centrifugadas e analisadas através do método quantitativo em CLAE descrito no capítulo 3.

2.6.3 Análise estatística

A comparação estatística entre amostras, em derme e epiderme, foi conduzida através de teste-*t* de *Student*. Neste, resultados significativos devem apresentar probabilidade menor do que 5% ($p < 0,05$) com intervalo de confiança de 95%. A avaliação estatística dos dados foi realizada em *software* GraphPad PRISM® (San Diego, CA, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DAS FORMULAÇÕES

As formulações preparadas conforme metodologia descrita no item 2.2 foram submetidas à análise em CLAE utilizando método analítico descrito no capítulo 3, para determinação da EE (%) que traduz a quantidade de fármaco associado ao sistema e o teor, ou seja, quantidade de fármaco presente em cada 100 mg de formulação, conforme Tabela 10.

Neste trabalho todas as formulações apresentaram EE maior que 70%, o que demonstra que ambas as técnicas foram capazes de encapsular fisicamente a NYS.

Considerando que fármaco e polímero são compostos extremamente opostos no que diz respeito à solubilidade, sugere-se que a NYS não poderia estar solubilizada na fase externa do sistema, o que limitaria a sua encapsulação (TAGLIARI, 2012).

As micropartículas preparadas pela técnica de *spray drying* apresentaram maior EE (%) e teor com relação ao outro método testado e entre as amostras submetidas ao mesmo processo, a proporção fármaco:polímero (1:2) mostrou-se mais eficiente, com cerca de 98,37% de EE.

Tabela 10 - Resultados da eficiência de encapsulação (%) e teor (mg/100 mg de formulação) obtidos com as formulações contendo nistatina

Formulação	EE (%) \pm DP^b	Teor^a (DPR^c %)
S1	92.17 \pm 4,35	44.83 (4,72)
S2	98.37 \pm 5,52	33.85 (5,61)
S3	88.94 \pm 1,58	22.23 (1,78)
L1	77.95 \pm 9,29	13.87 (11,92)
L2	82.61 \pm 12,64	10.81 (15,30)
L3	72.17 \pm 5,86	9.38 (8,12)

Média dos resultados obtidos de triplicatas de cada formulação

^a Teor (mg NYS/100 mg de formulação)

^b Desvio padrão

^c Desvio padrão relativo (%)

Os valores mais baixos de EE (%) para as formulações secas em liofilizador podem ser influenciados pela velocidade de solidificação do polímero durante o preparo das mesmas (JELVEHGARI et al., 2011).

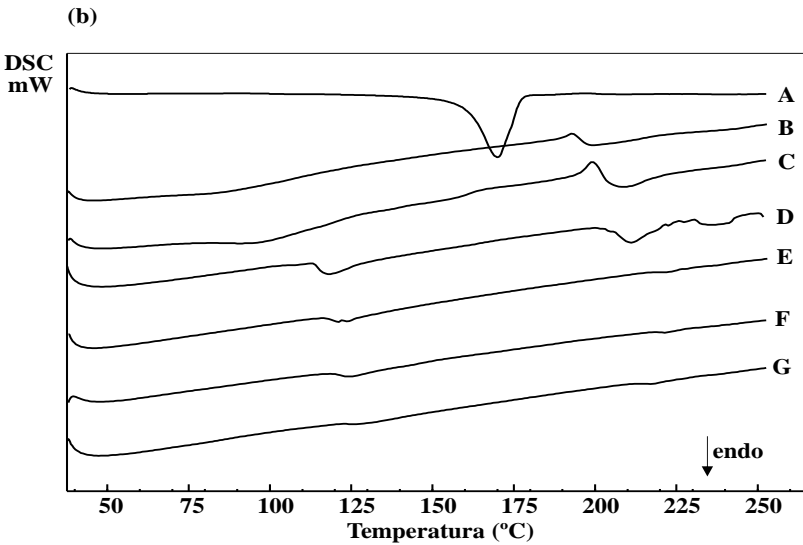
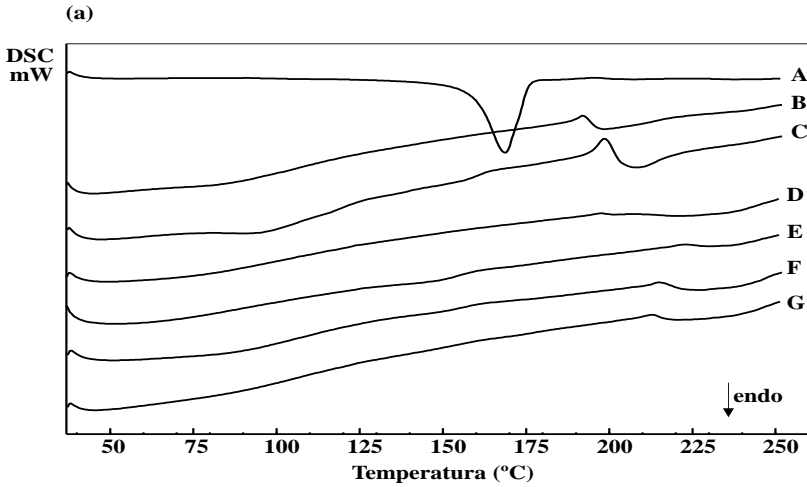
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

3.2.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

DSC tem sido proposta para avaliar interações físico-químicas entre os componentes da formulação através da comparação entre as curvas obtidas a partir da mistura física (MF) dos mesmos (VERMA; GARG, 2004; BERNARDI et al., 2009).

A Figura 16 mostra as curvas de DSC das matérias-primas (fármaco e polímero), MF com a menor proporção de NYS (1:3, NYS:Cl.QTS), e formulações, obtidas pela técnica de *spray drying* (Figura 16a) e por emulsificação/evaporação do solvente que foram, posteriormente, liofilizadas (Figura 16b).

Figura 16 - (a) Curvas de DSC das matérias-primas: nistatina (A), cloridrato de quitosana (B); mistura física fármaco:polímero (1:3) (C); e formulações: branca S0 (D), S1 (E), S2 (F) e S3 (G); (b) Curvas de DSC da nistatina (A), cloridrato de quitosana (B), mistura física 1:3 (C), L0 (D), L1 (E), L2 (F) e L3 (G)



Conforme observado na caracterização da matéria-prima NYS, no Capítulo 3, o fármaco apresenta um único evento de fusão próximo à 160 °C, que sugere pureza e característica cristalina da amostra. O polímero não apresenta evento de fusão específico, por ser considerado amorfo.

O deslocamento e/ou diminuição no evento endotérmico característico do fármaco na curva obtida para a mistura física e micropartículas, pode estar relacionado, dentre diversos fatores, à transformação parcial da NYS para a forma amorfa, ou a interação química entre os componentes da formulação (STULZER, 2008). Esse comportamento foi observado para todas as formulações obtidas contendo o fármaco, o que sugere uma amorfização dessas amostras, característica comprovada posteriormente pela técnica de DRX.

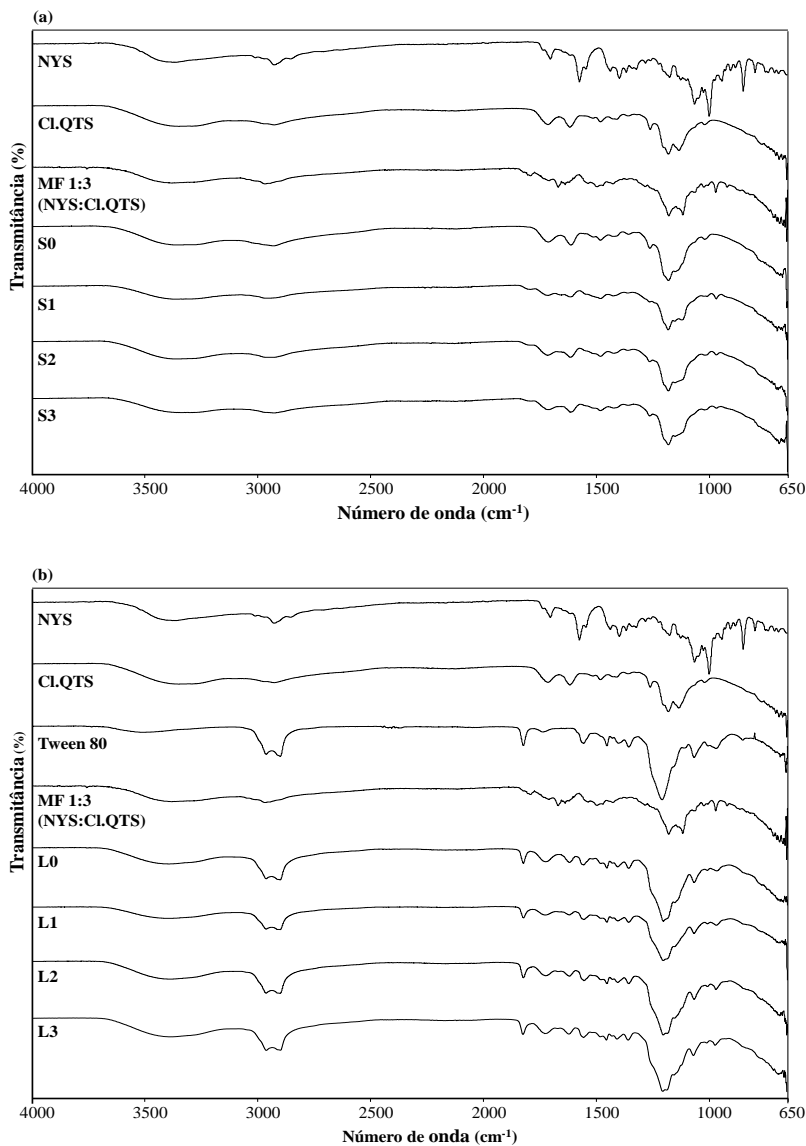
3.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Considerando os estiramentos característicos do fármaco, evidenciadas no Capítulo 3 deste trabalho, foi realizada a comparação dos espectros (Figura 17a) da NYS e Cl.QTS com os obtidos para a mistura física e as formulações produzidas por *spray drying*. Ambos sugerem interações entre o fármaco e o polímero devido a deslocamentos e desaparecimento de alguns estiramentos na faixa entre 1000 e 1750, a exemplo do estiramento em 1704 cm^{-1} que está relacionado à lactona do fármaco. Tais interações podem ser do tipo ligações de hidrogênio, as quais envolvem grupamentos C=O, C-C-O e O-C-C (SAKEER et al., 2010a).

As formulações (S1, S2 e S3) apresentaram um pico mais intenso na região de 1065 cm^{-1} , estiramento simétrico de CH_3 , que para o fármaco e/ou polímero de forma isolada.

Os espectros obtidos com as formulações produzidas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente com secagem em liofilizador estão mostrados na Figura 17b. No entanto, os resultados relacionados às possíveis interações entre NYS e Cl.QTS, nessas formulações, são inconclusivos. Uma vez que os espectros se apresentaram iguais e com estiramentos característicos do tensoativo (Tween 80, presente na Figura 17b), sobrepondo a todos os outros que relacionariam fármaco e polímero.

Figura 17 – Espectros no infravermelho: (a) Matérias-primas, mistura física 1:3 (nistatina:cloridrato de quitosana) e formulações obtidas por *spray drying*; (b) Fármaco, polímero, tensoativo, mistura física 1:3 e formulações liofilizadas



O espectro da MF (1:3, NYS:Cl.QTS), em ambas as figuras, corresponde a superposição dos dois componentes individuais, com diminuição na intensidade dos picos.

3.2.3 Difração de raios X de pó (DRX)

A NYS apresentou características cristalinas e as suas reflexões mais evidentes, especificadas anteriormente no Capítulo 2 deste trabalho, foram tomadas como referência para avaliar o comportamento cristalino da MF e dos sistemas microparticulados produzidos.

Os difratogramas (Figura 18) revelam uma amorfização nas formulações obtidas.

O fármaco possui caráter cristalino; o polímero, semicristalino; e a suspensão de ambos, quando submetida ao processo de secagem em *spray dryer*, origina difratograma com reflexões referentes às da NYS sobrepostas ao halo semicristalino do Cl.QTS.

O fenômeno de amorfização de amostras é atribuído à técnica de *spray drying*, devido ao rápido processo de secagem, característica que impede a organização do sistema para forma cristalina, processo também visualizado por outros autores (KLEEMANN, 2012; SHU et al., 2006; COLUMBANO; BUCKTON; WIKLEY, 2003).

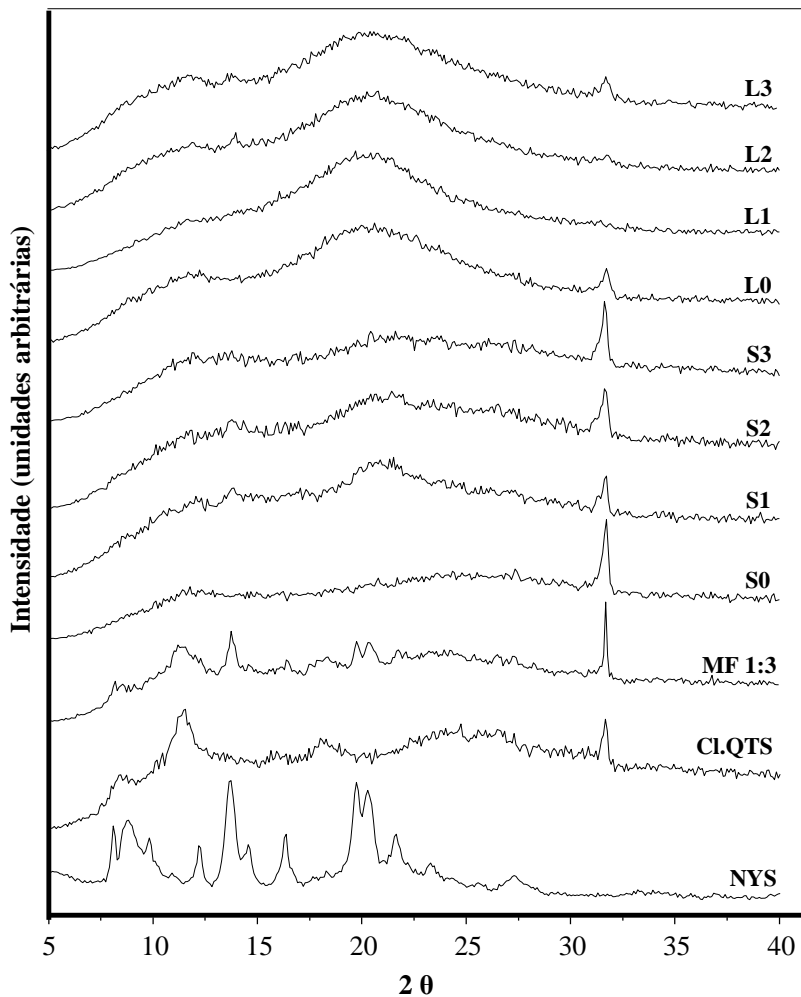
As formulações obtidas pela técnica de emulsificação/evaporação de solvente revelam um processo de amorfização ainda maior destas amostras, difratogramas também presentes na Figura 18.

Perfil semelhante foi observado para a MF o que sugere que houve uma reorganização da NYS para um estado mais amorfo nas micropartículas.

Uma notável diminuição da intensidade das reflexões para os sistemas microparticulados sugere uma dissolução da substância ativa no polímero testado, uma vez que, num estado amorfo, a energia requerida para separar as moléculas é baixa, pois são arranjadas ao acaso, conseqüentemente a dissolução do sistema ocorre de forma mais rápida (JANSSENS et al., 2008).

Eventos de fusão para as micropartículas não foram observados através da técnica de DSC e a completa amorfização dessas amostras foi confirmada por DRX, já que os difratogramas não apresentaram picos referentes à cristalinidade do fármaco.

Figura 18 – Perfis de difração de raios X de pó obtidos para o fármaco, o polímero, mistura física 1:3 (nistatina:cloridrato de quitosana), formulações brancas e contendo nistatina obtidas por *spray drying* e emulsificação/evaporação do solvente



3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica das micropartículas, realizada por meio de imagens obtidas por MEV, revelou partículas bastante diferentes obtidas por duas técnicas distintas.

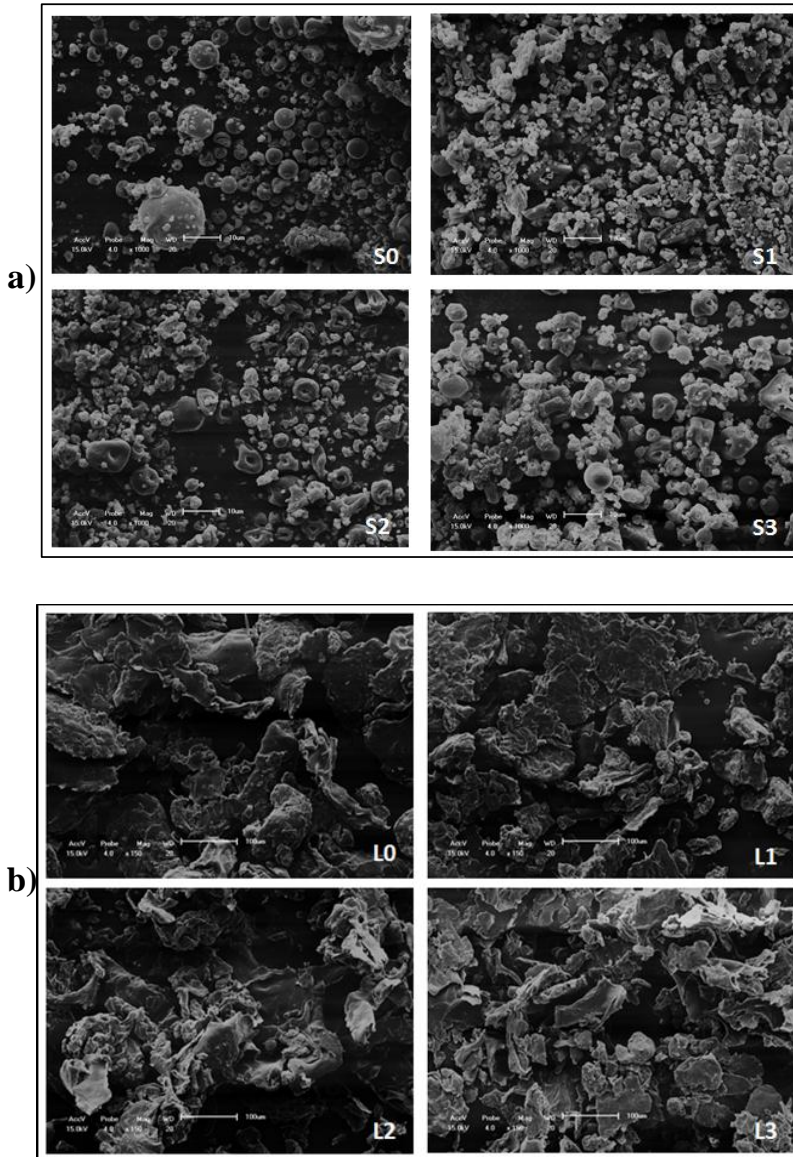
A Figura 19 apresenta as diferenças na morfologia das amostras sob o mesmo aumento de imagem entre formulações de mesma técnica de preparo, em comparativo com base na proporção fármaco:polímero da seguinte forma: S0/L0 (0:2); S1/L1 (1:1), S2/L2 (1:2) e S3/L3 (1:3).

Os sistemas obtidos pela técnica de *spray drying* (Figura 19a) apresentaram partículas esféricas e com aspecto de murchas. Essa característica morfológica está relacionada à contração irregular das gotículas aspergidas durante o processo de secagem, fator intimamente relacionado à viscosidade do líquido que é aspergido pelo sistema. A tendência sobre a morfologia em questão aumenta, conforme o aumento na viscosidade da amostra inicial (FOSTER; LAETHERMAN, 1995).

Os resultados apontam para o oposto, quando obtidos através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente (Figura 19b), a qual apresenta formação de inúmeros agregados, sem forma definida. Esse aspecto pode ser atribuído à presença do tensoativo nas amostras, o que evidencia a morfologia heterogênea das mesmas.

As diferenças nas características morfológicas entre as técnicas testadas podem ser atribuídas, de uma forma geral, ao modo de preparo das mesmas. As variações nas proporções de fármaco:polímero não influenciaram significativamente na morfologia dos sistemas.

Figura 19 – Fotomicrografias: (a) formulações obtidas por *spray drying*, com aumento de 1000 x e (b) produzidas através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente, aumento de 150 x



3.2.5 Determinação do tamanho de partícula

O alto grau de agregação observado, através das fotomicrografias das formulações liofilizadas, impediu a obtenção de dados confiáveis quanto ao tamanho de partícula destes sistemas.

Os resultados obtidos para as micropartículas obtidas por *spray drying* estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Granulometria das micropartículas $d_{(4,3)}$: diâmetro médio em volume; $d_{(0,1 \mu\text{m})}$, $d_{(0,5 \mu\text{m})}$ e $d_{(0,9 \mu\text{m})}$: diâmetro de partícula correspondente a, respectivamente, 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada; polidispersão de tamanhos (*span*)

Amostras	Tamanho (μm)				
	$d_{4,3}$	$d_{10\%}$	$d_{50\%}$	$d_{90\%}$	<i>Span</i>
S0	84,54	11,78	44,07	199,19	4,25
S1	10,18	1,41	7,39	23,12	2,94
S2	22,53	1,96	12,38	48,41	3,75
S3	13,37	1,73	10,31	28,53	2,60

A formulação S1 apresentou diâmetro médio em volume de 10 μm e faixa granulométrica variando de 1,41 e 23,12 μm . Já as amostras S2 e S3 apresentaram variações de tamanho de 1,96 a 48,41 μm e 1,73 e 28,53 μm , bem como diâmetro médio 22,53 μm e 13,37 μm , respectivamente para ambos os dados.

Quanto à distribuição de tamanhos dessas formulações, representada pelo número de *spans*, todos os sistemas apresentaram valor acima do considerado máximo (cerca de 1,0), indicando uma alta polidispersão nas amostras (KLEEMAN, 2012).

Entretanto, a variação e polidispersão maior foi visualizada para as formulações brancas, ou seja, aquelas que continham apenas o polímero.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade antifúngica foi baseada na obtenção da CIM por meio de inspeção visual, através da qual se determinou que, qualquer turvação no micropoço, é considerada como crescimento microbiano. A Tabela 12 demonstra os valores de CIM encontrados para todas as amostras testadas.

As formulações preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação de solvente não apresentaram melhorias em relação ao fármaco livre no que diz respeito à CIM, pelo contrário, as concentrações com atividade antimicrobiana foram maiores.

Tabela 12 – Valores de concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) das amostras testadas e determinadas após 24 h de incubação

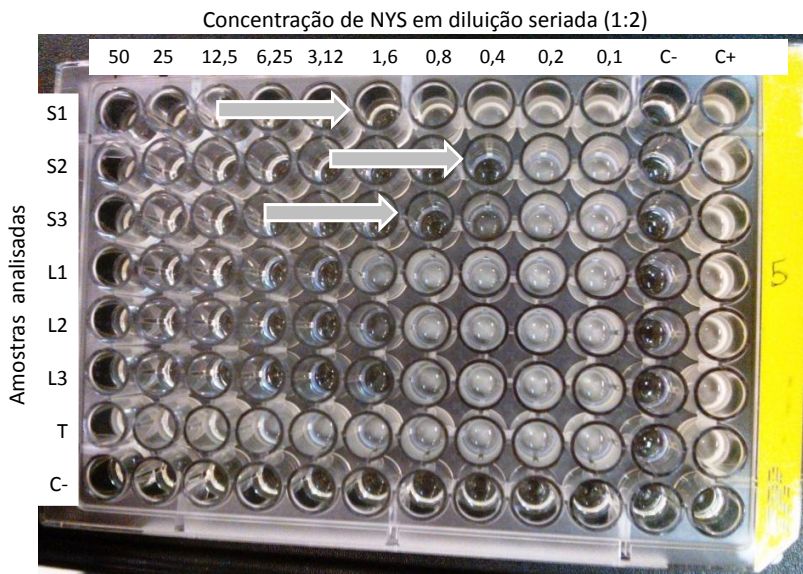
Amostras	Denominação	CIM ^a ($\mu\text{g/mL}$)
Matérias-primas	NYS	0,8
	Cl.QTS	*
Misturas físicas	MF 1:1	0,8
	MF 1:2	0,8
	MF 1:3	0,8
Formulações obtidas em <i>spray dryer</i>	S1	1,6
	S2	0,4
	S3	0,8
Formulações liofilizadas	L1	3,2
	L2	1,6
	L3	1,6
Formulações brancas	L0	*
	S0	*
Excipientes	DMSO ^c	20%
	Tween 80 [®]	*

^{a,b} Valores de CIM obtidas pela média de triplicatas

^c DMSO: a maior concentração testada foi extrapolada para 20% de DMSO

* Não houve inibição nas concentrações testadas

Figura 20 – Microplaca com resultados de concentração inibitória mínima para as formulações e Tween 80®



(T) Tween 80®; (C-) Controle negativo; (C+) Controle positivo.

A presença de tensoativo pode justificar a diminuição da atividade das formulações liofilizadas, uma vez que a pesagem das mesmas levou em consideração a proporção de fármaco em relação ao percentual de pó inicial utilizado para preparo dessas formulações. Sendo assim, a presença de tensoativo, conforme previamente observado nos espectros de infravermelho para essas formulações, sugere que a concentração do fármaco nessas amostras era menor do que as preparadas por *spray drying*, matéria-prima e MF.

Os excipientes, Tween 80® e DMSO, não apresentaram influência sob a atividade das amostras, bem como as formulações brancas e matéria-prima de Cl.QTS. Apesar de muitos estudos relatarem sobre a atividade antimicrobiana da QTS (MARTINS, 2010; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; FELT; BURI; GURNY, 1998), o mesmo não foi observado contra as cepas de *Candida albicans* testadas para o Cl.QTS nessas concentrações.

Apesar disso, estudos recentes realizados, sob as mesmas condições experimentais, com conjugados de NYS e goma arábica apresentaram concentrações de CIM maiores do que as observadas para

as formulações obtidas tanto por *spray drying*, quanto as liofilizadas (STEFANOVIC et al., 2012).

Outros autores avaliaram a atividade de lipossomas contendo o fármaco e os resultados, quanto à CIM, foram bastante semelhantes aos encontrados para as formulações obtidas por *spray drying* neste estudo (CARRILLO-MUÑOZ et al., 1999; JOHNSON et al., 1999), as quais apresentaram CIM na faixa de 0,4 a 1,6 $\mu\text{g/mL}$, conforme observado na Figura 20.

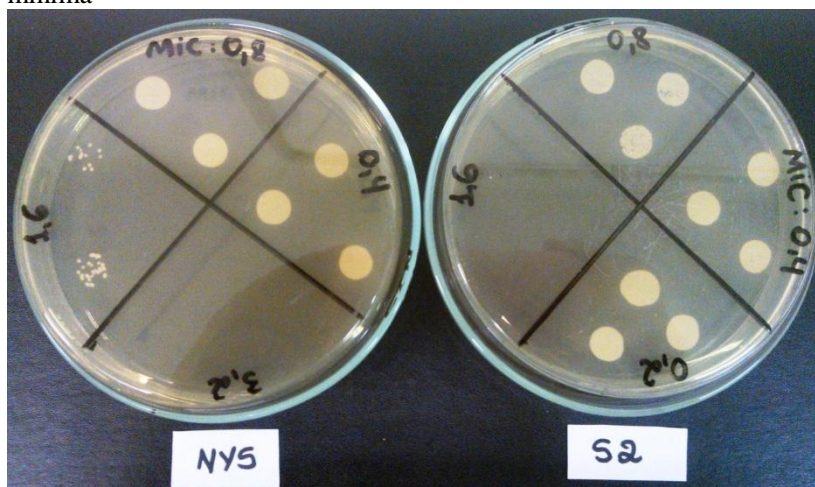
Os resultados obtidos sugerem que a proporção de fármaco:polímero (1:2) na forma de micropartículas produzidas por *spray drying*, ou seja, a formulação S2, mostrou-se a mais efetiva contra cepas de *Candida albicans*, no que diz respeito à CIM.

3.3.2 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para fins de comprovação e análise da CFM, foram retiradas alíquotas da CIM e concentração superiores, bem como a sub-inibitória da formulação S2, pois apresentou CIM menor que a observada para o fármaco livre.

A imagem das placas de Petri (Figura 21) mostra que, além da CIM, a formulação S2 possui ação fungicida 2x mais eficaz que a NYS livre (CFM_{NYS} = 3,2 $\mu\text{g/mL}$ e CFM_{S2} = 1,6 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 21 – Placas de Petri de nistatina e a formulação S2 de análise realizada em triplicata para fins de avaliação de concentração fungicida mínima



Com base nos resultados de CIM e CFM, prosseguiu-se a análise quanto à retenção cutânea das formulações apenas com aquela que mostrou melhor resultado que a NYS, ou seja, a amostra S2, fator que pode estar relacionado à EE ($98.37 \pm 5,52\%$) dessa formulação que foi a maior observada dentre os sistemas obtidos.

3.4 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CUTÂNEA DE NYS

3.4.1 Avaliação da retenção de NYS em pele de orelha suína

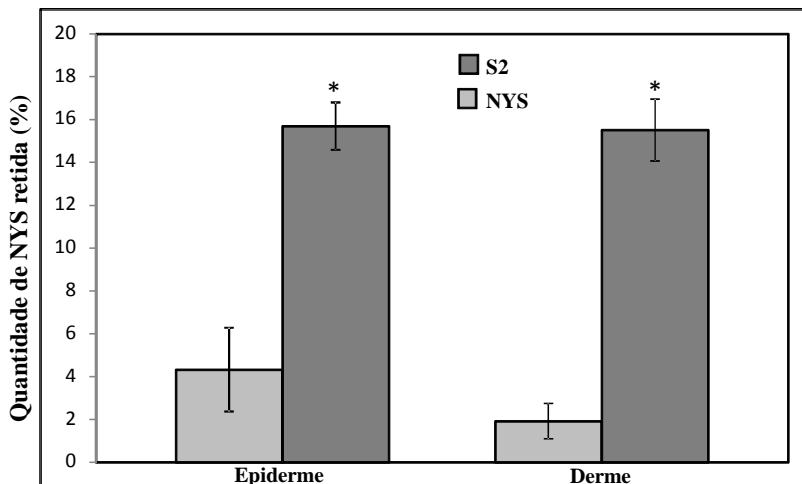
Considerando o alto peso molecular do fármaco e que sua permeação seria muito baixa, ou inviável, as amostragens foram realizadas apenas para as primeiras horas (2, 4 e 6 h) e os resultados obtidos comprovam que o fármaco não atingiu o compartimento receptor em níveis quantificáveis. Desta forma, não foi possível obter perfis de permeação que relacionam a quantidade de fármaco *versus* tempo.

Entretanto, com relação à retenção dessas amostras nas camadas epiteliais, observou-se que a retenção das micropartículas foi maior, tanto em derme quanto em epiderme, quando comparada ao fármaco livre (Figura 22). Estes resultados são considerados estatisticamente diferentes para ambas as camadas ($p < 0.05$).

Esse resultado pode ser atribuído à característica do polímero de adquirir cargas positivas quando em solução que formam forças eletrostáticas com as cargas negativas das células da pele, promovendo maior afinidade do sistema com esse órgão, consequentemente, maior retenção desses à mesma.

Esse perfil de afinidade de derivados de QTS com a pele vem sendo explorado há anos, tendo sido aplicado de forma bem sucedida para veiculação de plasmídeos de DNA em formulações para via ocular (KLAUSNER; ZHANG; CHAPMAN, 2010), insulina para aplicações via nasal (WILLIAMS; COSTER, 2010), micropartículas de clorexidina para efeito local na região bucal (GIUNCHEDI; JULIANO; GAVINI, 2002) e, neste trabalho, para a veiculação NYS em formulações promovendo uma liberação diferenciada do ativo por via tópica.

Figura 22 - Quantidade (%) de nistatina retida na epiderme e derme após 6 h de ensaio. O símbolo * representa resultados significativos em relação à nistatina



4 CONCLUSÕES

Através das técnicas físico-químicas para caracterização de amostras, percebe-se que as formulações obtidas por ambos os processos de preparo, apresentaram perfis bastante característicos desses sistemas.

As amostras sofreram leve processo de amorfização, visualizado nos espectros de DRX e sugerido nas curvas de DSC.

A morfologia obtida para as diferentes técnicas foi bastante diversificada: micropartículas enrugadas características da técnica de *spray drying*; e aglomerados sem forma definida nos sistemas obtidos por emulsificação/evaporação do solvente, aspecto que impossibilitou a avaliação do tamanho desses sistemas, enquanto que o diâmetro médio das micropartículas contendo nistatina obtidas por *spray drying* (S) variou entre 10,18 e 22,53 μm . Não foram evidenciadas diferenças significativas morfológicas e de tamanho das partículas, quando realizadas alterações nas proporções de fármaco:polímero.

Apesar de o rendimento ser um grande atrativo da técnica de secagem por liofilizador com relação ao *spray drying*, esse último apresentou rendimento superior a 50%, o qual é preconizado como ideal para a técnica (54,1 a 64,19%).

As formulações produzidas por emulsificação/evaporação de solvente seguida por processo de secagem em liofilizador apresentaram baixos valores com relação à EE (%) e teor em relação aos sistemas microencapsulados obtidos por *spray drying*, os quais mostraram-se, conseqüentemente, mais promissores em termos da atividade biológica avaliada.

O sistema microparticulado que apresentou melhores resultados quanto à CIM ($CIM_{NYS} = 0,8 \mu\text{g/mL}$ e $CIM_{S2} = 0,4 \mu\text{g/mL}$) e CFM ($CFM_{NYS} = 3,2 \mu\text{g/mL}$ e $CFM_{S2} = 1,6 \mu\text{g/mL}$), está representado pela formulação S2, com proporções de fármaco:polímero (1:2) secas em *spray dryer*, foi selecionada para posterior avaliação quanto à retenção do fármaco em amostras de pele.

A avaliação de retenção da NYS foi realizada através do método de câmara de difusão de Franz. Levando em consideração que a permeação do fármaco seria inviável, devido o tamanho da molécula do mesmo, o tempo de análise foi relativamente curto, até 6 h.

A formulação testada, além de apresentar atividade microbiológica mais potente que o fármaco livre, possui características de maior afinidade com a pele, promovida pelo polímero (Cl.QTS). Após 6 h de análise, a quantidade de NYS retida na derme e epiderme, através da formulação (S2) foi de 15,51% e 15,69%, respectivamente, enquanto que o fármaco livre não apresentou percentual maior que 5% em nenhuma das camadas analisadas.

Os baixos limites de detecção e quantificação, obtidos no Capítulo 3, foram primordiais para garantir dados conclusivos sobre a quantidade de fármaco nas alíquotas retiradas do sistema de avaliação da retenção/permeação dessas amostras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Os estudos físico-químicos em estado sólido mostraram que a matéria-prima nistatina possui um componente principal, supostamente A1, e parâmetros característicos relacionados à amostra foram observados através das técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X de pó e calorimetria exploratória diferencial;
- ✓ O método desenvolvido e validado, por cromatografia líquida de alta eficiência, foi utilizado para quantificação de nistatina nas formulações de micropartículas e em amostras de pele;
- ✓ A completa caracterização das formulações obtidas comprovou a formação de sistemas bastante diferentes quanto à morfologia e características cristalinas, principalmente, entre as técnicas de *spray drying* e emulsificação/evaporação do solvente;
- ✓ A eficiência na encapsulação e teor do fármaco dos sistemas obtidos variaram conforme a técnica de preparo empregada, bem como proporções de fármaco:polímero utilizadas;
- ✓ As micropartículas obtidas por *spray drying* na proporção 1:2 de fármaco:polímero (S2) evidenciaram um aumento de duas vezes na potência antifúngica da nistatina, expressos na forma de concentração inibitória e fungicida mínima;
- ✓ A formulação que apresentou melhor resultado quanto à atividade biológica também promoveu aumento na retenção do fármaco nas camadas de derme e epiderme, quando comparada à nistatina na forma livre, e apresentou valores muito baixos de absorção sistêmica, sendo ideal para aplicação tópica;
- ✓ Considerando que uma das patologias que mais acometem o homem nos dias de hoje é a candidíase cutânea, que a NYS é um fármaco de amplo espectro de ação, indicado também para o tratamento destas afecções e que formulações dermatológicas destinadas ao tratamento de patologias cutâneas devem ser

capazes de reter o fármaco na pele, sem promover efeito sistêmico do mesmo; a formulação proposta, além de ser obtida por um processo simples, que pode ser facilmente produzido por larga escala e fazer uso de polímero biocompatível, é um sistema bastante promissor para o objetivo proposto.

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S. A. et al. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5-28, 2004.

ALONSO-VARGAR, R. et al. Actividad in vitro de una formulación liposómica de nistatina (Nytotran®) frente a *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 90-92, 2000.

AMARAL, A. C. et al. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. 526-533, 2009.

ANDRÉ-ABRANT, A.; TAVERDET, J. L.; JAY, J. Microencapsulation par évaporantion de solvant. **European Polymer Journal**, v. 37, n. 5, p. 955-963, 2001.

ARAÚJO, T.; SCHACHNER, L. Erupções vesicopustulosas benignas no neonato. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 4, p. 359-366, 2006.

BARAS, B. et al. Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. **Vaccine**, v.18, p. 1495-1505, 2000.

BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2. ed. New York: Taylor and Francis, 2006.

BENNETT, J. E. Antimicrobial agents: antifungal agents. In: Gilaman AG, Nies AS, editors. **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGrawHill, 1993. p. 1165–81.

BERNARDI, L. S. et al. Characterization of venlafaxine hydrochloride and compatibility studies with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 729-733, 2009.

BEREK, J. S.; NOVAK, E. R.. **Tratado de Ginecologia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 138 p.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – **Resolução 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em 17 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME**, 8ª edição. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.

BRESCANSIN, E. G. **Desenvolvimento e Caracterização de Formulações Lipossomais contendo o Fármaco Nistatina**. 2006. 123 f. Tese de Doutorado – Unicamp, São Paulo, 2006.

BRESCANSIN, E. G.; PORTILHO, M.; PESSINE, F. B. T. Physical and chemical analysis of commercial nystatin. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 2, p. 215-221, 2013.

BOLARD, J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?, **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 864, p. 257-304, 1986.

BOONSONGRIT, U.; MITREVEJ, A.; MUELLER, B. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, p. 267-274, 2006.

BULARIO.net. Disponível em: <www.bulário.net> Acesso em: 05 fev. 2014.

BYRN, S. R.; XU, W.; NEWMAN, A. W. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 115–136, 2001.

CAMPANA FILHO, S.P.; SIGNINI, R. Características e Propriedades de Quitosanas Purificadas nas formas neutra, acetato e Cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001.

CAMPANA FILHO, S. P.; DESBRIÈRES, J. **Chitin, Chitosan**

and Derivatives, in: Natural Polymers and Agrofibers Composites, cap. 3, E. Frollini; A. Leão e L. H. C. Mattoso (eds.), EMBRAPA Instrumentação Agropecuária, São Paulo, 2000.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. In vitro Antifungal activity of liposomal Nystatin in Comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 397-401, 1999.

CAVALCANTI, O. A.; BUTTOW, N. C. Perspectivas dos sistemas de liberação colo-específicos. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 3, p. 227-238, 1999.

CHANG, J. Y. et al. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 24, n. 1, p. 155-163, 2002.

CHANG, S. K. et al. Percutaneous absorption, dermatopharmacokinetics and related biotransformation studies of carbaryl, lindane, malathion, and parathion in isolated perfused porcine skin. **Toxicology**, v. 91, p. 269-280, 1994.

CHOI, C. et al. Preparation and Characterization of Deoxycholic Acid-Conjugates Low molecular Weight Water-Soluble Chitosan Nanoparticles for Hydrophobic Antifungal Carrier. **Polymer-Korea**, v. 33, n. 4, p. 389-395, 2009.

CIONE, A. P. P.; LIBERALE, M. J.; SILVA, P. M. da. Development and validation of na HPLC method for stability evaluation of nystatin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 2010.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; CLSI document M27-A (ISBN 1-56238-328-0), **The National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Pennsylvania, 1997.

COLUMBANO, A.; BUCKTON, G.; WIKLEY, P. Characterisation of surface modified salbutamol sulphate-alkylpolyglycoside microparticles

prepared by spray-drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 253, p. 61-10, 2003.

COUTO, E. M. P.; CARLOS, D.; MACHADO, E. R. Candidíase em neonatos: Uma revisão epidemiológica. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas**, Agrárias e da Saúde, Valinhos, v. 15, n. 4, p. 197-213, 2011.

DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and Polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 505-521, 2007.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

ESPUELAS, M. S. et al. Invitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(épsilon-caprolactone) nanospheres. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 8, p. 593-599, 2002.

F.BRAS, V. FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/>> Acesso em: 03 abr. 2014.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 979-993, 1998.

FÖRSTER, M. et al. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of cutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-323, 2009.

FÖSTER, T. P.; LAETHERMAN, M. W. Powder characteristics of proteins spray-dried from different spray-dryers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 21, p. 1705-1723, 1995.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 313-332, 2005.

GARTY, B. Z. Stevens-Johnson syndrome associated with nystatin treatment. **Archives of Dermatological**, v. 127, n. 5, p. 741-742, 1991.

GAVINI, E. et al. Nasal administration of Carbamazepine using chitosan microspheres: in vitro/in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 9-15, 2006.

GEREMIAS, R. et al. Lipid Lowering Activity of Hydrosoluble Chitosan and Association with Aloe vera L. and Brassica olearaceae L. **Phytotherapy Research**, v.20, p. 288-293, 2006.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003, p. 413, 867, 971, 972, 982.

GIUNCHEDI, P.; JULIANO, C.; GAVINI, E. et al. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. **European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 53, p. 233-239, 2002.

GOOSEN, M. F. A. **Applications of Chitin and Chitosan**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1997.

GRAÇA, F. F. **Drogas Antifúngicas**. Disponível em: <<http://www.caalunicamp.com.br/>>. Acesso em: 01 out. 2013.

GRATIERI, T. **Sistemas de liberação ocular contendo fluconazole: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo***. 2010. 171 f. Tese de Doutorado – USP, Ribeirão Preto, 2010.

GROESCHKE, J. et al. Stability of amphotericin B and nystatin in antifungal mouthrinses containing sodium hydrogen carbonate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 362-366, 2006.

GROLL, A. H. et al. High-performance liquid chromatographic determination of liposomal Nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies, **Journal of Chromatography B**, 735, p. 51-62, 1999.

GROSSI, P. A. Clinical aspects of invasive candidiasis in solid organ transplant recipients. **Drugs**, Rome, v. 69, n. 1, p. 15-20, 2009.

HANSANOVIC, A. et al. Modification of the conformational skin structure by treatment with liposomal formulations and its correlation to the penetration depth of acyclovir. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 76-81, 2011.

HANSON RESEARCH CORPORATION. **Manual Diffusion Cell: operation manual**. Chatsworth: Hanson Research, 2004, 36 p.

HAZEN E. L., BROWN, R. Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. **Science**, v. 112, n. 2911, p. 423, 1950.

HE, P. et al. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 53-65, 1999.

HECTOR, R. F. An overview of antifungal drugs and their use for treatment of deep and superficial mycoses in animals. **Clinical Techniques in small animal practice**, v. 20, p.240-249, 2005.

ICH, **Validation of Analytical Procedures: Test and Methodology Q2(R1), (November 2005) International Conference on harmonization**. Geneva, Switzerland. Guideline, I. H. T. 2005.

JANSSENS, S. et al. Influence of polyethylene glycol chain length on compatibility and release characteristics of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethylene glycol/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 35, n. 3, p. 203-210, 2008.

JELVEHGARI, M. et al. Effects of process variables on micromeritic properties and drug release of non-degradable microparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 1, n. 1, p. 18-26, 2011.

JOHNSON, E. M. et al. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1412-1416, 1998.

KAUFFMAN, C. A. et al. *Candida* Urinary Tract Infections – Diagnosis. **Clinical Infectious Diseases**, Michigan, v. 52, n. 6, p. 452-456, 2011.

KIM, J. et al. The design of polymer-based nanocarriers for effective transdermal delivery. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, p. 1171-1176, 2010.

KLAUSNER, E. A.; ZHANG, Z.; CHAPMAN, R. L. et al. Ultrapure chitosan oligomers as carriers for corneal gene transfer. **Biomaterials**, v. 31, p. 1814-1820, 2010.

KLEEMAN, C. R. **Desenvolvimento e Avaliação de Sistemas Microestruturados contendo Chalconas para o Tratamento oral do Diabetes Melito**. 2012. 149 f. Dissertação de Mestrado – UFSC, Florianópolis, 2012.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 2008. p. 1565.

KOONTZ, J. L. et al. Stability of natamycin and its Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7111-7114, 2003.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

KURIYAMA, T. et al. In vitro susceptibility of oral Candidato seven antifungal agents. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 6, p. 349–353, 2005.

LABOUTA, H. A.; EL-KHORDAGUI, L. K.; Polymethacrylate microparticles gel for topical drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 2106-2118, 2010.

LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial médico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEIBOVITZ, E. Neonatal candidosis: clinical picture, management, controversies, consensus and new therapeutic options, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 69-73, 2002.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008.

LIU, C. et al. Drug Release Kinetics of spray-dried chitosan microspheres. **Drying Technology**, v. 24, p. 769-776, 2006.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINDALE. **The Complete Drug Reference**. 32. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 1999, 386 p.

MARTINS, P. **Avaliação da atividade Antimicrobiana, mutagênica e toxicidade aguda de derivados anfílicos da O-carboximetilquitosana**. 2010. 83 f. Dissertação de Mestrado – Univali, Itajaí, 2010.

MEHTA, R. T. et al. Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated nystatin for systemic fungal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 1901-1903, 1987.

MENEZES, E. A. et al. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Ceará, v. 40, n. 5, p. 299-305, 2004.

MICHEL, G. W. **Analytical profiles of drug substances**, 1. ed. New Jersey: Academic Press, 6, 1972.

MITRAGOTRI, S. Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 1354-1359, 2000.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, p. 1013-1051, 2008.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K, S; PFALLE, M. A. **Microbiologia Médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NEUFELD, P. M. **Manual de Micologia Médica: Técnicas básicas de diagnóstico**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Qualidade, 1999, p. 1, 214.

ODDS, F. C. *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, p. 1-8, 1994.

ODDS, F. C. et al. Collaborative Consensus for Optimized Multilocus Sequence Typing of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5265-5266, 2003.

OFFNER, F. et al. Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B. **Antimicrobial Agent and Chemotherapy**, v. 48, p. 4808-4812, 2004.

OLIVEIRA, I. R. W. Z. et al. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p.1195-1201, 2009.

PÁL, et al. Technological and biopharmaceutical optimization of nystatin release from a multiparticulate based bioadhesive drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, p.258–264, 2013.

PENG, H. S. et al. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration nad antifungal efficacy. **International Journal Pharmaceuticals**, v. 352, n. 1-2, p. 29-35, 2008.

PEREIRA, D. N. et al. Infecção disseminada por *Trichosporon* spp em recém-nascido prematuro relato de um caso. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 85, n. 5, p. 459-461, 2009.

PIRES REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 2-8, 2006.

POROWSKA, N. et al. Composition of Polifungin, a new antifungal agent, **Recueil des Travaux Chimiques** v. 91, p. 780-784, 1972.

POUD, M. W.; DREW, R. H.; PEFFECT, J. R. Recent advances in the epidemiology, prevention, diagnosis and treatment of fungal pneumonia. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 183-194. 2002.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Rev.**, v. 3, p. 115-124, 2004.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v. 171, p.7-14, 2007.

RIEKES, M. K. **Nimodipino: do polimorfismo à obtenção de dispersões sólidas amorfas destinadas ao tratamento da hipertensão arterial**. 2013. 282 f. Dissertação de Mestrado – UFSC, Florianópolis, 2013.

ROSINA, C. R.; BARONI, S., CAVALCANTI, O. A. Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade de filmes isolados de polimetacrilato contendo polissacarídeo da raiz de Lótus (*Nelumbo nucifera*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 425-431, 2004.

SAKEER, K. et al. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 11, p. 1771-1779, 2010 (a).

SAKEER, K. et al. Use of xanthan and its binary blends with synthetic polymers to design controlled release formulations of buccoadhesive

nystatin tablets. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 15, p. 360-368, 2010 (b).

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

SEZER, A. D.; CEVHER, E. Topical drug delivery using chitosan nano- and microparticles. **Expert Opin. Drug Delivery**, v. 9, n. 9, p. 1129-1146, 2012.

SHAH, P. P. et al. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 33, p. 1607-1617, 2012.

SHIP, J. A. et al. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, **Oral Radiology and Endodontology**, v. 103, Supplement 1, p.S6.e1-S6.e14, 2007.

SHU, B. et al. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 664-669, 2006.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 1-20, 2003.

SILVA, H. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of organic compound**. 7. ed. New York: John Wiley and Sons, 2005.

SINGH, K.; TIWARY, A. K.; RANA, V. Spray dried chitosan-EDTA superior microparticles as solid substrate for the oral delivery of

amphotericin B. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 310-319, 2013.

SINHA, V. R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p.1-33, 2004

STEFANOVIC, J. et al. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activity of Nystatin-Gum Arabic Conjugates. **Journal of Applied Polymer Science**. Disponível em: <www.materialsviews.com>. Acesso em: 24 jan. 2014.

STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A.; REUTZEL-EDENS, S. M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 67-90, 2001.

STÖCKL, D.; D'HONDT, H.; THIENPONT, L. M. Method validation across the disciplines – Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. **Journal of Chromatography B**, v. 866, p. 2180-2190, 2009.

STULZER, H. K. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas microparticulados de liberação modificada a base de quitosana contendo o antiviral aciclovir**. 2008. 122 f. Dissertação de Mestrado – UFSC, Florianópolis, 2008.

SUN, W. et al. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and enoxaparin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 417-425, 2008.

TAGLIARI, M. P. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico, ácido salicílico ou cafeína visando liberação tópica**. 2012. 229 f. Tese de Doutorado – UFSC, Florianópolis, 2012.

TALLURY, P. et al. Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial and antifungal on their release rates from ethylene vinyl acetate copolymer. **Dental Material**, v. 23, p. 977-982, 2007.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 3. ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2001, p. 2001, p. 20, 21, 747, 748, 749, 758, 759.

THE INDEX MERCK, 14 th ed. Whitehouse Station: Merck and CO., 2006, p. 6737.

THONG, H. Y.; ZHAI, H.; MAIBACH, H. I. Percutaneous penetration enhancers: an overview. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 20, p. 272-282, 2007.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 30 th ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VALGAS, L. **Influência de variáveis de processamento sobre as propriedades elétricas de varistores de SnO₂ atomizados via “spray dryer”**. 2007. 68 f. Tese Doutorado – UFPR, Curitiba, 2007.

VERMA, R. K.; GARG, S. Compatibility studies between isosorbide mononitrate and selected excipients used in the development of extended release formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 3, p. 449-458, 2004.

VILOS, C.; VELASQUEZ, L. A. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 9, 2012.

WALLACE, T. et al. In vitro antifungal activity of Nyotran (liposomal nystatin) versus four formulations of amphotericin B, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. 4 ed. **International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis**, Londres, 1999.

WASAN, E. K. et al. Development and characterization of oral lipid-based Amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, p. 76-84, 2009.

WASILEWSKI, C. JR. Allergic contact dermatitis from nystatin. **Archives of Dermatological**, v. 102, n. 2, p. 216–217, 1970.

WILLIAMS, K. A.; COSTER, D. J. Gene therapy for diseases of the cornea – a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 38, p. 93-103, 2010.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 3, p. 311-321, 2011.

ZHANG, A. Y.; CAMP, W. L.; ELEWSKI, B. E., Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatologic Clinics**, Birmingham, USA, v. 25, p. 165-183, 2007.