

**CAROLINE DANZIATO RODRIGUES**

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E TOXICIDADE *IN VITRO* DE  
NANOPARTÍCULAS DE BLENDA DE PLA-PEG CONTENDO ANFOTERICINA B**

GUARAPUAVA

2012

CAROLINE DANZIATO RODRIGUES

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E TOXICIDADE *IN VITRO* DE  
NANOPARTÍCULAS DE BLENDA DE PLA-PEG CONTENDO ANFOTERICINA B**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da UNICENTRO-PR.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rubiana Mara Mainardes

Guarapuava

2012

Rodrigues, Caroline Danziato  
R696o Obtenção e avaliação da eficácia e toxicidade *in vitro* de nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo anfotericina B / Caroline Danziato Rodrigues. -- Guarapuava, 2012  
xi, 70 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2012

Orientadora: Rubiana Mara Mainardes

Banca examinadora: Paulo Vítor Farago, Giovane Marino Fávero, Emerson Carraro (suplente), Juliana Sartori Bonini (suplente)

#### Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Farmácia. 3. Anfotericina B. 4. Nanopartículas. 5. PLA-PEG. 6. CLAE. 7. Eficiência de encapsulação. 8. Antifúngico *in vitro*. 9. Hemólise. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

**TERMO DE APROVAÇÃO**

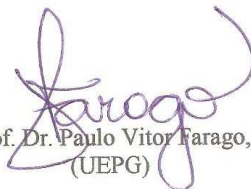
**CAROLINE DANZIATO RODRIGUES**

**“OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E TOXICIDADE *IN VITRO* DE  
NANOPARTÍCULAS DE BLENDS DE PLA-PEG CONTENDO  
ANFOTERICINA B”**

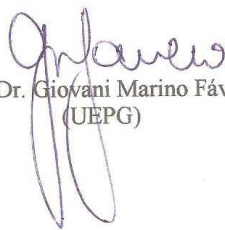
Dissertação aprovada em 31/05/2012 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes,  
(Orientadora/UNICENTRO)



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago,  
(UEPG)



Prof. Dr. Giovanni Marino Fávero  
(UEPG)

GUARAPUAVA-PR  
2012

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Alexandre  
e Marcia, pelos incentivos, ensinamentos  
e conselhos de uma vida inteira.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me levar por caminhos inimagináveis, assim como Ele mesmo disse: “... os meus caminhos são mais altos que os vossos caminhos, e os meus pensamentos são mais altos do que os vossos pensamentos”; te agradeço por tudo, e tudo que tenho e sou, é Teu.

A meus pais, por sempre me incentivarem a adentrar pelas portas do conhecimento, a sempre buscar mais e ir além daquilo que já aprendi.

Ao meu esposo Junior, pelo apoio em todo o momento, por me dar o suporte que precisei nos momentos difíceis, e acima de tudo, por cuidar tão bem do nosso presente, nos momentos em que me ausentei.

Ao meu lindo presente de Deus, Israel, que embora não tenha dito uma só palavra, somente ao olhar para seu rostinho, já recebia o ânimo que precisava para continuar.

Aos meus avós, Antunes e Dirce, Moacyr e Ina, pelo apoio incondicional durante toda a minha vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rubiana Mara Mainardes, por ver algo em mim, que por mim mesma nunca pensei que tivesse, por acreditar em mim, incentivar, e permitir que tudo isso fosse possível. Pela amizade e por compartilhar parte dos seus conhecimentos comigo, além de ser meu exemplo de dedicação, profissionalismo e paixão pela ciência.

Ao Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, pelo conhecimento transmitido, pela compreensão em momentos que errei e pelas palavras de incentivo desde antes da seleção do mestrado.

Às colegas de mestrado, Luciana D., Luciana E., Lígia, Michele, Sheila e Thuane, pelos momentos de aprendizado, experiências e descontrações que passamos juntas.

Às colegas de laboratório, Diani, Lucianas e Evana, por toda a ajuda. Sem vocês, isso não seria possível.

Aos demais colegas do laboratório de nanotecnologia, pela ajuda, pelas trocas de experiência e discussões científicas que muito acrescentaram à minha vida.

À Elisângela, por ser essa pessoa prestativa, disposta a ajudar, pela sua amizade e palavras abençoadas em momentos que precisei.

A todo o pessoal da IEQ, que foi meu suporte nesse tempo, e em especial à Aline, por assumir minha função com tanta dedicação. Não sei o que seria de mim sem você.

Aos Prof. Dr. Emerson e Juliana pelas ótimas considerações no momento da qualificação.

À CAPES pela bolsa e apoio financeiro.

*“... a excelência do conhecimento é que a sabedoria dá vida ao seu possuidor.”*

*(Eclesiastes 7:12)*

## RESUMO

A anfotericina B (AmB) é o fármaco de escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, embora, por muitas vezes, sua toxicidade limite sua utilização. Muitas formulações para carreamento da AmB baseadas na nanotecnologia (lipossomas e nanoemulsões) estão sendo avaliadas, enquanto que, algumas delas já estão sendo comercializadas. Essas formulações tem como objetivo, a diminuição dos efeitos tóxicos da AmB, mas devido à forte interação do fármaco com os lipídios presentes nessas formulações, elas não apresentam eficácia satisfatória. Neste trabalho desenvolveu-se nanopartículas de blendas de poli(ácido láctico)-polietilenoglicol (PLA-PEG) com variações na massa molecular do PEG (2, 10 ou 20 kDa) para encapsular AmB, avaliar a eficácia *in vitro* em cepas de *Candida* sp. e a toxicidade *in vitro* sobre hemácias. As nanopartículas foram preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente, e o diâmetro médio, a distribuição do tamanho e o índice de polidispersão foram determinados pela técnica do espalhamento de luz. O teste de hemólise foi realizado para avaliar o caráter protetor das nanopartículas, impedindo a lise dos eritrócitos causada pela AmB. Para avaliar a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação *in vitro* da AmB a partir das nanopartículas, foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para realizar a quantificação do fármaco. A validação foi realizada com base nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A confiabilidade da metodologia foi comprovada em todos os testes. A eficiência de encapsulação da AmB nas nanopartículas de blendas de PLA-PEG foi superior a 68,9%. A média do diâmetro das nanopartículas foi de 241 nm. O perfil de liberação *in vitro* demonstrou uma rápida liberação inicial (efeito “burst”) nas primeiras 24h, seguida por uma liberação sustentada de aproximadamente 29,5% de AmB após 26 dias de análise. As nanopartículas foram capazes de proteger as hemácias contra a lise produzida pela AmB nas primeiras 12h de incubação, sem modificar a eficácia terapêutica, considerando-se o perfil de liberação prolongada. As formulações em estudo diminuíram a toxicidade da AmB sobre as hemácias, mantiveram a eficácia *in vitro* e promoveram a liberação prolongada da AmB.

Palavras-chave: Anfotericina B. Nanopartículas. PLA-PEG. CLAE. Validação. Eficiência de encapsulação. Tamanho de partículas. Antifúngico *in vitro*. Hemólise.



## ABSTRACT

Amphotericin B (AmB) is the drug of choice for treating of systemic fungal infections, although its toxicity limitates its use. Many nanotechnology based formulations (liposomes and nanoemulsions) have been evaluated, whereas some of them are already been commercialized. The objective of these formulations is the reduction of AmB toxic effects, but due to the strong interaction between the drug and the formulations lipids, they do not present satisfactory efficacy. In this work, it was developed poly(D-L-lactide)-polyethyleneglycol (PLA-PEG) blend nanoparticles with variable molecular weight of PEG (2, 10 or 20 kDa) to encapsulate AmB and evaluate its *in vitro* efficacy over strains of *Candida* sp and *in vitro* toxicity over erythrocytes. Nanoparticles were prepared by the emulsification/solvent evaporation technique and the size, size distribution and polydispersity index were assessed by light scattering technique. Hemolysis test was performed to evaluate the protective character of the nanoparticles on erythrocytes from the lysis caused by AmB. In order to evaluate encapsulation efficiency and AmB *in vitro* release profile from nanoparticles, it was developed and validated a method by high performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the drug. The validation process was performed considering the following parameters: selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). Reliability of the methodology was assured in every test. Encapsulation efficiency of AmB in nanoparticles of PLA-PEG blends was more than 68.9%. The mean particle size of the nanoparticles was 241 nm. The *in vitro* release experiment has demonstrated a burst effect in the first 24 h, followed by a sustained release of approximately 29.5% of AmB over 26 day of observation. Nanoparticles were able to protect erythrocytes from the lysis caused by AmB in the first 12 hours of observation, and did not modify therapeutic efficacy, considering sustained release profile. The formulations in study decreased AmB toxicity over erythrocytes, maintained *in vitro* efficacy and promoted sustained release of AmB.

Keywords: Amphotericin B. Nanoparticles. PLA-PEG. HPLC. Validation. Encapsulation efficiency. Particle size. *In vitro* antifungal. Hemolysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química e estrutura esquemática da AmB.....	12
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do ergosterol e colesterol. As flechas indicam as diferenças estruturais entre elas.....	14
<b>Figura 3</b> - Tipos de nanopartículas poliméricas.....	18
<b>Figura 4</b> - Estrutura molecular do PLA, PLGA e PCL.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AmB</b>	Anfotericina B
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Humana
<b>APR</b>	Aumento da permeabilidade e retenção
<b>BSA</b>	Albumina do soro bovino
<b>DMPC</b>	Dimiristoilfosfatidilcolina
<b>DMPG</b>	Dimiristoilfosfatidilglicerol
<b>EC</b>	Etilcelulose
<b>ICH</b>	International Conference on Harmonisation
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>PBCA</b>	Poli( <i>n</i> -butilcianoacrilato)
<b>PCL</b>	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PEO</b>	Poli(óxido de etileno)
<b>PHB</b>	Poli( $\beta$ -hidroxibutirato)
<b>PICBA</b>	Poli(isobutilcianoacrilato)
<b>PIHCA</b>	Poli(isohexilcianoacrilato)
<b>PLA</b>	Poli(ácido láctico)
<b>PLGA</b>	Poli(ácido láctico- <i>co</i> -ácido glicólico)
<b>PVP</b>	Poli( <i>N</i> -vinil-2-pirrolidona)
<b>SFM</b>	Sistema Fagocitário Mononuclear

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1 Anfotericina B</b> .....	11
<b>1.1.1 Mecanismo e espectro de ação da AmB</b> .....	13
<b>1.1.2 Toxicidade da AmB</b> .....	15
<b>1.2 Nanotecnologia</b> .....	16
<b>1.2.1 Nanopartículas poliméricas</b> .....	17
<b>1.2.2 Métodos de preparação das nanopartículas</b> .....	23
<b>1.2.3 Formulações lipídicas para veiculação da AmB</b> .....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	30
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	30
<b>3 ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	31
<b>3.1 Artigo 1</b> .....	31
<b>3.2 Artigo 2</b> .....	48
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Anfotericina B

Nas três últimas décadas, houve um aumento significativo de indivíduos que apresentam o sistema imunológico comprometido devido a doenças como câncer, diabetes, AIDS e pacientes transplantados submetidos à imunossupressão farmacológica, principalmente por meio de corticosteroides, são susceptíveis às infecções oportunistas. As infecções fúngicas sistêmicas são responsáveis por 30% das mortes desses pacientes (SACHS-BARRABLE et al., 2008; WASAN et al., 2009). Os patógenos responsáveis pela maior parcela dessas infecções são os do gênero *Candida*, sendo a *Candida albicans* causadora de cerca de 50% das candidemias. Já nas infecções causadas por *Aspergillus*, o *Aspergillus fumigatus* é o agente em 80% dos casos, e a mortalidade das aspergiloses chega a mais de 85% (KLEPSER, 2011).

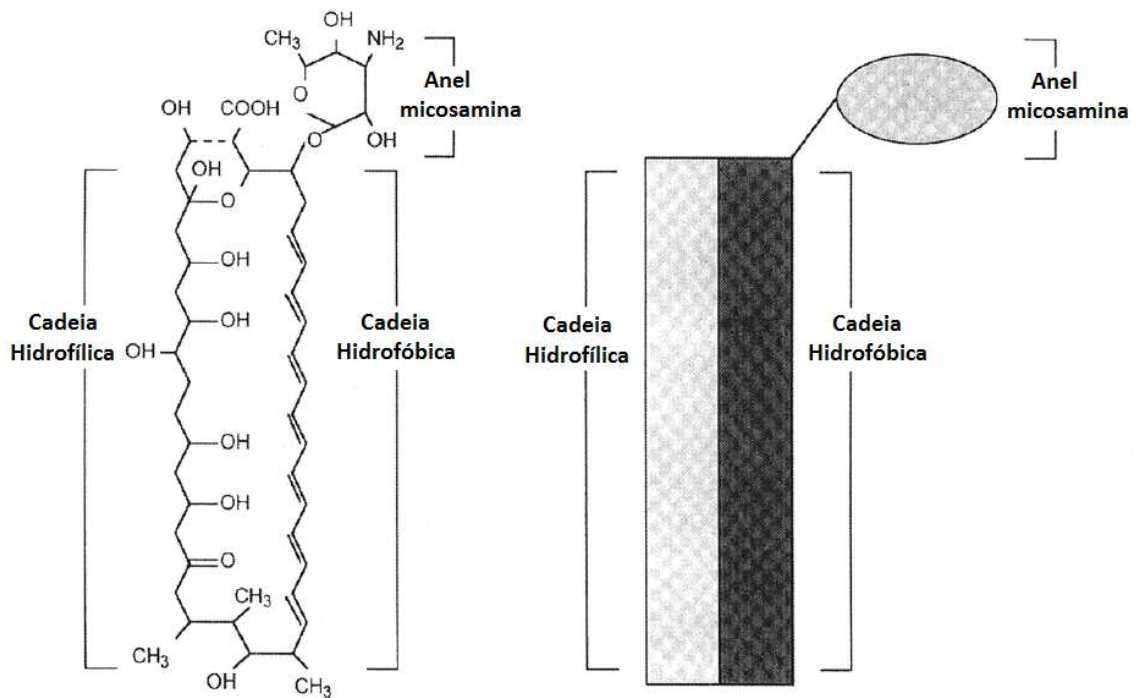
Anfotericina B (AmB) é o antifúngico mais amplamente utilizado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. É um antibiótico macrolídeo poliênico produzido por culturas de um actinomiceto, o *Streptomyces nodosus* (LANIADO-LABORÍN e CABRALES-VARGAS, 2009). Foi primeiramente isolado em 1955 e é considerado o primeiro antifúngico a ser aprovado pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 1965 (WU, 1994). Mesmo com o aparecimento de outros antifúngicos, como os azólicos sistêmicos, a AmB ainda é o fármaco de escolha para a terapia desse tipo de infecção (FILIPPIN e SOUZA, 2006).

A estrutura química da AmB (Fig. 1) é constituída por um anel macrocíclico composto por 37 átomos de carbono. Possui sete ligações duplas conjugadas não-substituídas na porção hidrofóbica do anel, grupos hidroxila na porção hidrofílica e um resíduo micosamina, lactona ligada ao anel principal por uma ligação glicosídica (JUNG et al., 2009). O grupo carboxila no anel principal e a micosamina, são responsáveis pelo comportamento anfotérico da molécula, que indica sua capacidade em formar sais solúveis tanto em meio básico como ácido, e do qual provém sua nomenclatura (FILIPPIN e SOUZA, 2006).

De natureza anfipática, a AmB detém uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica, a qual compromete sua solubilidade em meio aquoso (NEVES et al., 2010). Tal característica faz com que o fármaco seja pouco absorvido por via oral, sendo utilizado por meio dessa administração somente em casos de infecções fúngicas orofaríngeas (VISCOLI e CASTAGNOLA, 1999). Pela via intravenosa, a administração é realizada através de um acesso venoso central, e só é possível devido à formação de um complexo com o sal biliar

desoxicolato de sódio, sendo administrada lentamente em forma de suspensão micelar (JUNG et al., 2009). A formação do complexo com o desoxicolato tem o objetivo de aumentar a solubilidade do fármaco. Essa estratégia viabilizou o surgimento do primeiro medicamento à base de AmB (Fungizone®) (FILLIPIN e SOUZA, 2006; JAIN e KUMAR, 2010).

**Figura 1** - Estrutura química e estrutura esquemática da AmB



(Adaptado de HILLERY, 1997)

Embora não haja uma dose diária específica para a administração intravenosa de AmB, é usualmente utilizado de 0,5 a 1,5 mg/kg em uma solução aquosa de glicose a 5%, através de infusão com duração de mais de 4 h. A dose pode ser aumentada lentamente, em aproximadamente 0,1 mg/kg por dia. O regime terapêutico é dependente do patógeno envolvido e das circunstâncias da infecção. Em infecções graves, utiliza-se a dose máxima já no primeiro ou segundo dia de tratamento (VISCOLI e CASTAGNOLA, 1999). Pacientes com doenças crônicas prévias devem ser submetidos à dose teste de 1 mg/kg durante 2 h de infusão, para que se observe possíveis reações, a fim de que, posteriormente seja realizada a administração da dose habitual (GOODMAN e GILMAN, 2006; KATZUNG, 2006).

A ligação da AmB às proteínas plasmáticas é de mais de 90%, principalmente à  $\beta$ -lipoproteína, e a fração metabolizada do fármaco é amplamente distribuída nos tecidos, apesar de apenas 2-3% alcançar o líquido cefalorraquidiano. Por esse motivo, administrações intratecais podem ser necessárias para o tratamento de meningites fúngicas. A AmB tem

pouquíssima penetração na barreira hematoencefálica, exceto quando há processo inflamatório na região das meninges. Outras formas de administração da AmB incluem a tópica, na terapia de micoses cutâneas, principalmente em candidíases, a intratecal e a intra-articular (GOODMAN e GILMAN, 2006).

O tempo de meia-vida da AmB é de aproximadamente 15 dias, embora traços sejam encontrados na urina de pacientes cerca de dois meses após o término do tratamento. Isso ocorre, devido à sua eliminação, principalmente por via renal, ser extremamente lenta (KATZUNG, 2006; RANG et al., 2007).

A AmB é um pó amarelo ou alaranjado, geralmente inodoro. É de difícil dissolução na maioria dos solventes, sendo solúvel somente em dimetilsulfóxido, dimetilformamida, propilenoglicol, é levemente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em água e em álcool (*United States Pharmacopeia* (USP) 35, 2011; Farmacopeia Britânica, 2012). Também é solúvel em vesículas de lecitina e colesterol (FILIPPIN e SOUZA, 2006). Devido à sua baixa hidrossolubilidade e à sua estrutura anfipática, a AmB quando em solução aquosa tende a agregar-se formando dímeros e oligômeros (VANDERMEULEN et al., 2006). O desoxicolato de sódio apesar de aumentar a solubilidade não é capaz de impedir a agregação do fármaco. Ainda, é um fármaco sensível à luz quando em solução e torna-se inativo em valores de pH baixos (Farmacopeia Britânica, 2012).

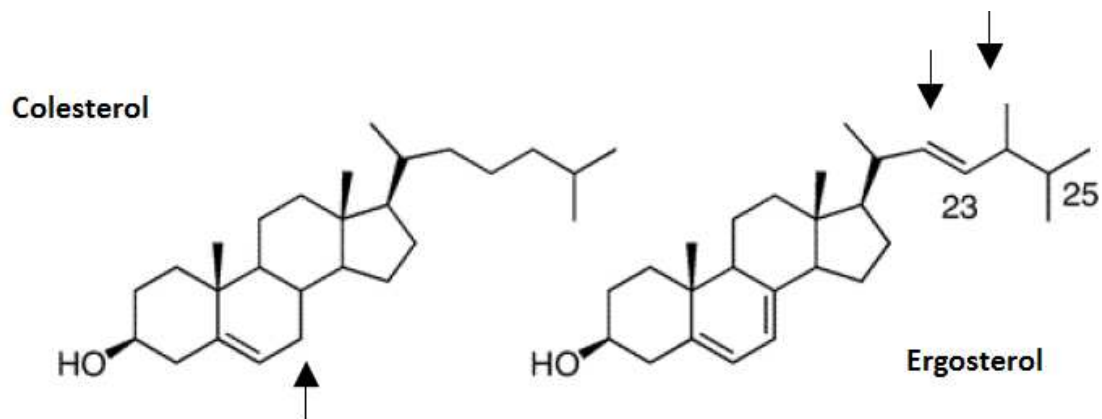
### 1.1.1 Mecanismo e espectro de ação da AmB

O mecanismo de ação da AmB dá-se pela sua ligação aos componentes lipídicos das membranas celulares, possuindo maior afinidade pelo ergosterol, constituinte da membrana dos fungos e de alguns protozoários (SACHS-BARRABLE et al., 2008). Além da afinidade com o ergosterol, o fármaco possui afinidade pelo colesterol, constituinte da membrana de células de mamíferos. O coeficiente de afinidade da AmB pelo ergosterol ( $K = 1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) em relação ao colesterol ( $K = 0,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) demonstra a sua preferência sobre células fúngicas (HILLERY, 1997). As estruturas químicas do ergosterol e colesterol estão demonstradas na figura 2.

Uma vez ligada à membrana das células fúngicas, a AmB altera a permeabilidade celular pela formação de poros na superfície, ocasionando a perda de potássio intracelular (NAHAR et al., 2008; DESHPANDE et al., 2010). A consequência desse processo é o extravasamento do conteúdo citoplasmático, o que leva à destruição e morte celular (VYAS e

GUPTA, 2006). Além disso, o fármaco inibe a enzima ATPase em células fúngicas, o que ocasiona a perda da capacidade proliferativa das células. Pode ocorrer ainda um aumento na peroxidação lipídica das membranas celulares (VYAS e GUPTA, 2006). Esses diferentes mecanismos fazem com que a AmB seja fungicida além de fungistática (DESHPANDE et al., 2010).

**Figura 2** - Estrutura química do colesterol e ergosterol. As flechas indicam as diferenças estruturais entre eles



(FERRAZ, 2005)

O espectro de ação da AmB sobre os fungos vislumbra os dimórficos *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, que provocam micoses disseminadas em regiões geográficas específicas. Também tem ação sobre as leveduras *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans* e *Rhodotorula* sp. e o fungo filamentosos *Aspergillus* sp., que são considerados fungos oportunistas, causadores de sérias doenças em pacientes imunodeprimidos (MONTEIL et al., 1998; MURRAY et al., 2004). Tem ação variável em espécies de *Fusarium* sp., e no que diz respeito ao *Trichosporon* sp., a AmB é somente fungistática. No entanto, algumas espécies de *Trichosporon* sp. e de *Scedosporium* sp. apresentam resistência ao fármaco, bem como *Candida lusitanae* e *Pseudallescheria boydii*, que apresentam resistência intrínseca à AmB (KLEPSER, 2011).

Além de sua conhecida ação sobre os fungos, a AmB tem sido utilizada no tratamento da leishmaniose, doença causada pelos protozoários do gênero *Leishmania*, principalmente em países em desenvolvimento. A forma mais grave desse processo patológico é a leishmaniose visceral, ocasionada pela *Leishmania donovani*, que se não tratada leva à morte (NEVES, 2010; SACHS-BARRABLE et al., 2008). O tratamento com a AmB leva à cura em 100% dos casos (VYAS e GUPTA, 2006).



### 1.1.2 Toxicidade da AmB

A toxicidade da AmB sobre células humanas está relacionada à pequena afinidade que ela possui com o colesterol, constituinte lipídico das membranas celulares dos mamíferos. É notório que quanto maior a quantidade de formas agregadas do fármaco, mais tóxico ele torna-se, pois sua seletividade apenas pelas células fúngicas é prejudicada (ZHANG et al., 2009; ADAMS e KWON, 2004). Observou-se que tanto formas monoméricas quanto agregadas tem ação sobre células fúngicas, mas que somente formas agregadas formam canais em membranas contendo colesterol (HUANG et al., 2002). A concentração do fármaco está diretamente relacionada com seu estado de agregação. Concentrações de AmB acima de  $5 \times 10^{-6}$  M tendem a formar oligômeros e agregados de oligômeros (MILLIE et al., 1999; MINONES et al., 2005). Esse mecanismo faz com que o indivíduo tratado apresente sérios efeitos colaterais, tais como hepatotoxicidade, hematotoxicidade, e o principal deles, a nefrotoxicidade, que ocorre em mais de 80% dos pacientes, que é evidenciada pela elevação dos níveis séricos de ureia e creatinina (VYAS e GUPTA, 2006; TIYABOONCHAI e LIMPEANCHOB, 2007). É percebida a ocorrência de anemia, pela redução da produção de eritropoietina, que é realizada pelo rim, mais especificamente nas células tubulares lesadas pelo fármaco (GOODMAN e GILMAN, 2006). A AmB também é agressiva ao endotélio das veias, podendo produzir tromboflebite. Neurotoxicidade pode ser percebida em casos de administração intratecal, com pacientes apresentando convulsões e aracnoidite crônica (KATZUNG, 2006). Em casos de administração tópica, o fármaco pode ser responsável pelo aparecimento de erupções na pele (RANG et al., 2007).

Alguns efeitos agudos também são observados logo após a administração intravenosa da AmB, como febre e calafrios (em 60% dos pacientes), hipocalemia (25% dos pacientes), náusea, vômitos, hipóxia, anorexia, hipotensão, dores de cabeça e taquipneia. Esses sintomas, normalmente podem ser amenizados pela diminuição da velocidade de infusão (ELDEM et al., 2001; GUO, 2001; HEINEMANN et al., 2001). Pode ser feita também, a administração de ácido acetilsalicílico, paracetamol, anti-histamínicos ou antieméticos, a fim de se evitar os efeitos colaterais provenientes da infusão do fármaco, para que não seja necessária a redução da dose. Outras medidas auxiliares incluem a administração de meperidina e hidrocortisona (KLEPSER, 2011).

Deve-se ter muita cautela na administração concomitante de AmB com outros nefrotóxicos, como aminoglicosídeos ou ciclosporina, pois podem produzir uma interação medicamentosa potencialmente fatal (GOODMAN e GILMAN, 2006).

A lesão renal proveniente do tratamento com AmB geralmente é reversível, a não ser em casos de terapia prolongada com dose cumulativa superior a 4 g, o que pode levar a lesões tubulares, com posterior perda de função. A toxicidade renal é evidenciada pela perda de eletrólitos, como  $K^+$  e  $Mg^{++}$  e pela acidose tubular (KATZUNG, 2006).

A necessidade da utilização da AmB para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, como também da melhoria na sobrevivência desses pacientes, fez com que novas formulações a base de AmB fossem pesquisadas, com a finalidade de que sua toxicidade fosse diminuída. Algumas dessas formulações são baseadas na nanotecnologia farmacêutica (ESPUELAS et al., 2003; JAIN e KUMAR, 2010; SHAO et al., 2010; VANDERMEULEN et al., 2006; FUKUI et al., 2003).

## **1.2 Nanotecnologia**

A nanotecnologia refere-se à produção controlada de estruturas e sistemas na escala de nanômetros, ou seja, em um bilionésimo do metro ( $10^{-9}m$ ), a partir de diferentes moléculas e materiais. Sabe-se que quando nessas dimensões, as propriedades dos materiais diferem daqueles em escala métrica. A multidisciplinariedade é uma característica da nanotecnologia, pois ela abrange diversas áreas de atuação, como química, farmácia, biologia, medicina, engenharia, fotografia, monitoramento ambiental, agricultura, ciências forenses e indústrias como a automobilística, eletrônica e têxtil (POOLEY e OWENS, 2003; FERNANDES e FILGUEIRAS, 2008; KUMARI et al., 2010).

No que diz respeito à área médica e farmacêutica, a nanotecnologia é empregada em uma variedade de aplicações. Dentre as principais, pode-se citar a terapia de diversas doenças, principalmente as de grande impacto, como câncer, para adequado carregamento de vacinas e material genético, para promover o direcionamento sítio-específico de fármacos, objetivando o incremento da eficácia terapêutica com redução da toxicidade. Na medicina diagnóstica, a nanotecnologia oferece metodologias que apresentam soluções rápidas, sensíveis e relação custo-benefício favorável. Nanopartículas de ouro e pontos quânticos são amplamente utilizados para diagnóstico de câncer, mas outras tecnologias como nanobiossensores são promissoras para aplicações clínicas. Diagnósticos de imagem podem ser realizados utilizando-se nanopartículas fluorescentes ou magnéticas (PARVEEN et al., 2012).

Referindo-se especificamente à nanotecnologia farmacêutica, nanoestruturas são utilizadas principalmente como carreadores de fármacos. Os objetivos principais dessas formulações são: a diminuição dos efeitos colaterais de fármacos; o prolongamento do tempo de liberação do fármaco no organismo; o direcionamento do princípio ativo ao sítio específico; o aumento da eficácia terapêutica através da diminuição da dose necessária para que seja atingido o efeito esperado; a melhora da biodisponibilidade e da solubilidade de fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água; o aumento da concentração do fármaco no tecido-alvo, entre outros benefícios (SOPPIMATH et al., 2001; FARAJI e WIPF, 2009).

Esses objetivos são dependentes das propriedades físico-químicas das nanoestruturas. Para o direcionamento do fármaco a um alvo específico, características como tamanho de partícula, carga de superfície, composição e presença de ligantes na superfície e hidrofobicidade, devem ser analisadas e determinadas para que se alcance a finalidade desejada. O tamanho da partícula é crucial para a interação com membranas celulares e para a penetração do fármaco nas barreiras biológicas. Outra característica importante que se deve avaliar é a carga de superfície, para que se possa determinar se ocorre a agregação das nanopartículas quando na corrente circulatória, ou se acontece adesão ou interação com membranas de células carregadas com cargas opostas. Nesse sentido, nanopartículas com superfície catiônica interagem mais facilmente com as células e são prontamente internalizadas.

Várias formulações farmacêuticas baseadas em nanoestruturas estão em diferentes fases de estudos para aplicação como medicamentos para o tratamento do câncer, AIDS, diabetes, tuberculose, e algumas delas, já estão sendo comercializadas (KUMARI et al., 2010).

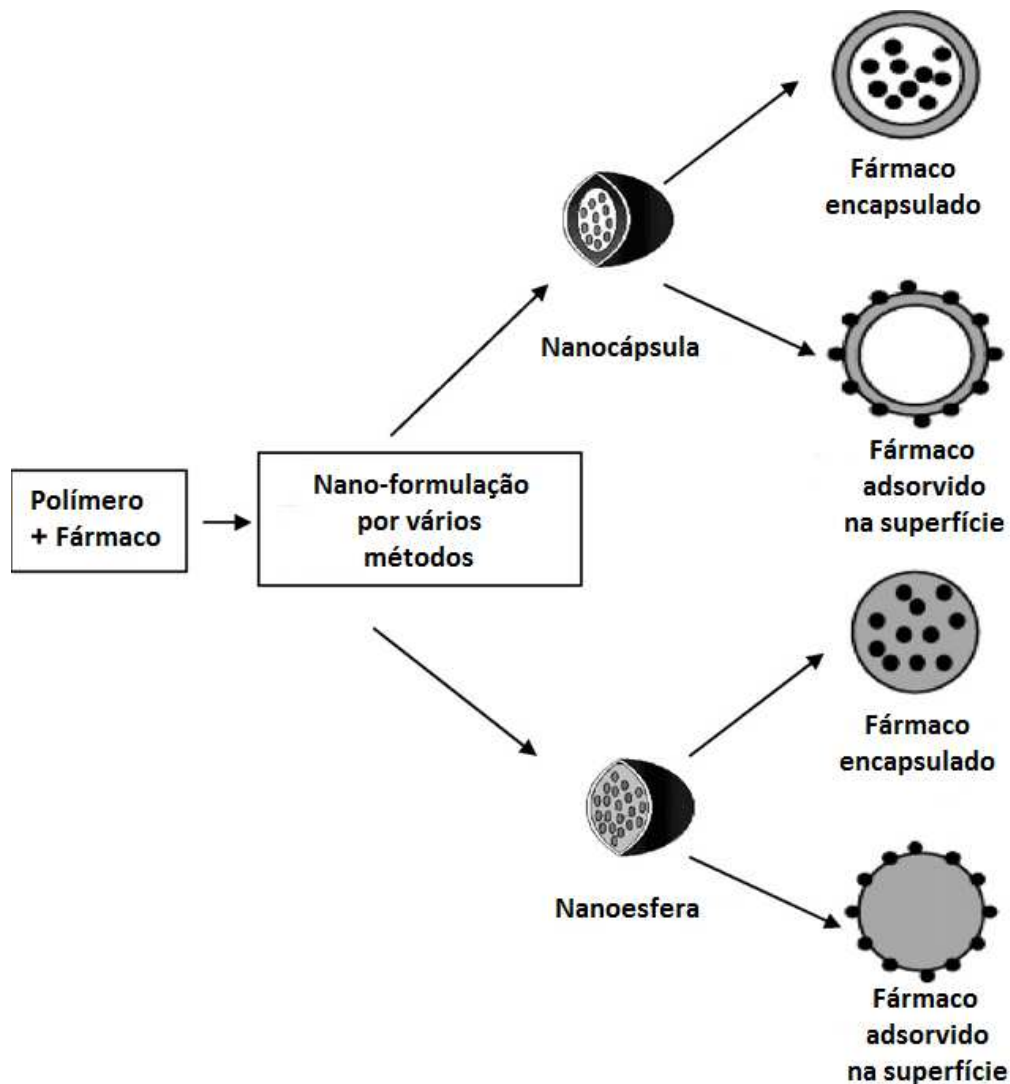
Entre as nanoestruturas utilizadas para essas finalidades, podem-se citar as nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgânicas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanocristais, microemulsões, nanotubos, dendrímeros, nanopartículas magnéticas, nanopartículas conjugadas, entre outras (FARAJI e WIPF, 2009).

### **1.2.1 Nanopartículas poliméricas**

Nanopartículas poliméricas são definidas como estruturas nanométricas sólidas compostas por polímeros que podem ou não ser biodegradáveis. As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em nanoesferas ou nanocápsulas. As nanocápsulas são

sistemas vesiculares ou reservatórios, em que o fármaco está enclausurado em um reservatório contendo óleo ou água, envolto por uma membrana polimérica ou pode estar adsorvido na superfície da membrana. Nanoesferas são sistemas matriciais em que o fármaco pode estar adsorvido na superfície da matriz e/ou disperso molecularmente na matriz polimérica, conforme apresentado na figura 3. (RAO e GECKELER, 2011; REIS et al., 2006).

**Figura 3** - Tipos de nanopartículas poliméricas



(Adaptado de KUMARI et al., 2010)

Em comparação com micropartículas, as nanopartículas parecem ser mais facilmente absorvidas, sendo que os polímeros hidrofóbicos favorecem a absorção pelo epitélio gastrointestinal. Somados às questões de solubilidade do polímero, vários fatores interferem na absorção do fármaco encapsulado, como a carga de superfície e perfil de biodegradação da composição polimérica, além da massa molecular do fármaco associado e a região da

nanopartícula em que ele está localizado (REIS et al., 2006). Para que a nanopartícula seja transportada de forma eficiente na corrente circulatória, é ideal que ela apresente um tamanho inferior a 300 nm (GUPTA e KOMPELLA, 2006). A maioria dos métodos de preparação produzem nanopartículas maiores que 100 nm, com um alto índice de polidispersão. Esse tamanho pode ser considerado grande, quando comparado com as barreiras endoteliais, cuja fenestração possui 50-60 nm de diâmetro (NIMESH et al., 2006).

Existem diferentes tipos de polímeros utilizados na formulação de nanopartículas. Os polímeros sintéticos são: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (PLGA), etilcelulose (EC), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB), acetato de celulose, poli(isobutilcianoacrilato) (PICBA), poli(iso-hexilcianoacrilato) (PIHCA), poli(*n*-butilcianoacrilato) (PBCA), poli(acrilato) e poli(metacrilato). Também há a possibilidade de utilização de polímeros naturais, como quitosana, alginato, gelatina e albumina (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2008).

A encapsulação de fármacos nas nanopartículas poliméricas pode ser realizada por meio de dois métodos: o primeiro, incorporando-se o fármaco durante o processo de produção das nanopartículas, ou o segundo, em que após a preparação das nanopartículas é acrescentada uma solução contendo o fármaco. Ambos os métodos permitem a dispersão do fármaco no polímero, a adsorção do fármaco na superfície do polímero e/ou a ligação química do fármaco ao polímero. A concentração limite do fármaco e a sua interação com a nanopartícula, depende da estrutura química do princípio ativo, do polímero e das condições da encapsulação do fármaco (KUMARI et al., 2010).

Quando *in vivo*, as nanopartículas podem chegar ao interior das células através de três mecanismos: fagocitose, pinocitose e endocitose mediada por receptor. A fagocitose refere-se à ingestão de materiais de até 10  $\mu$ m de diâmetro, realizada por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A pinocitose envolve a ingestão de materiais menores que 1  $\mu$ m ou substâncias em solução, e é realizada por todos os tipos de células. Então, micropartículas tem acesso exclusivo a células fagocitárias, enquanto que nanopartículas podem ser utilizadas como agentes carreadores de fármacos para uma ampla série de alvos celulares. No caso de endocitose mediada por receptores, as nanopartículas necessitam ter 25-50 nm de diâmetro, e tem como vantagem a especificidade dos receptores, o que é interessante quando há a necessidade de liberação em sítio específico (FARAJI e WIPF, 2009).

Uma vez que as nanopartículas são opsonizadas e removidas da corrente circulatória, elas são sequestradas pelos órgãos do sistema fagocitário mononuclear (SFM).

No caso das nanopartículas que não possuem ligantes em sua superfície, em questão de minutos elas são concentradas no fígado e no baço (OWENS III e PEPPAS, 2006).

A modificação da superfície das nanopartículas poliméricas auxilia na ampliação do tempo de circulação das mesmas no organismo e na melhora da especificidade na distribuição do fármaco. A longa permanência das nanopartículas na corrente circulatória é decorrente de ligantes de superfície que dificultam a identificação da partícula pelo SFM. O aumento da biodisponibilidade promove maior oportunidade do fármaco atingir seu alvo. Partículas menores que 100 nm com superfícies hidrofílicas tendem a escapar do SFM com mais facilidade, principalmente das células de Kupffer no fígado (NIMESH et al., 2006).

Um dos métodos mais utilizados para essa finalidade é a adsorção de polímeros hidrofílicos ou tensoativos às superfícies das nanopartículas. Exemplos deles são: polímeros, polietilenoglicol (PEG), poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP), os tensoativos como poloxâmeros, polisorbatos e os polissacarídeos como dextrano. Esses polímeros promovem uma camada hidrofílica protetora ao redor da nanopartícula, que é capaz de repelir as opsoninas do plasma por forças repulsivas. No caso do PEG, ele possui em sua estrutura cadeias longas que formam uma barreira estérica, impedindo a adesão das proteínas do plasma e consequente eliminação prematura da corrente circulatória (KUMARI et al., 2010; REIS et al., 2006; NIMESH et al., 2006). Um exemplo que se pode citar é um estudo realizado com nanopartículas poliméricas convencionais, em comparação às mesmas partículas revestidas com PEG. Após 24 h da injeção de nanopartículas PEGuiladas, 40% delas foram encontradas no fígado, enquanto que somente 3 min após a injeção de nanopartículas não-PEGuiladas, 90% já foram encontradas no fígado (OWENS III e PEPPAS, 2006).

As modificações de superfície podem ser realizadas por meio da adição de ligantes à superfície da nanopartícula, que podem funcionar como direcionadores, a exemplo de peptídeos, aptâmeros, anticorpos e pequenas moléculas. O direcionamento pode ser ativo ou passivo (PARVEEN et al., 2012).

O direcionamento passivo utiliza-se de diferenças anatômicas entre os tecidos alterados por processos patológicos e os tecidos normais para liberar o fármaco no sítio requerido. Esses tecidos afetados podem ser modificados por uma variedade de condições fisiológicas pelo efeito do aumento da permeabilidade e retenção (efeito APR). No caso de tumores, por esse efeito, as nanopartículas tendem a acumular-se nesses tecidos, pelo extravasamento vascular. O efeito APR pode ocorrer também em sítios de inflamação. Foi demonstrado que sítios de infecção ou inflamação em que há a presença de bradicinina apresentam também o efeito APR. Em tecidos normais, quando ocorre uma inflamação o

tempo de retenção é menor do que em tecidos cancerosos. Isso acontece, devido à drenagem realizada pelo sistema linfático, que ainda está operante em tecidos normais e o inchaço tecidual é dissipado em poucos dias. Já em tecidos tumorais, a retenção de fármacos lipídicos ou macromoleculares pode durar semanas. Os mesmos mediadores produzidos durante o processo inflamatório são os mesmos desencadeados por células cancerosas, embora o câncer seja uma inflamação que nunca cessa e aumenta constantemente (PARVEEN et al., 2012).

Um grande número de carreadores que são utilizados para a liberação direcionada com essas características, foi desenvolvido nas décadas de 1980 e 1990. Um exemplo desses carreadores é a formulação lipossomal modificada com PEG contendo doxorubicina. Com bom tempo de retenção e longo período de circulação, a doxorubicina lipossomal é 6 vezes mais efetiva que a doxorubicina não-lipossomal. Esse medicamento foi aprovado para o tratamento de câncer ovariano, câncer de mama com metástases e para sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS. Em modelos animais e em pacientes, houve a redução do tumor pelo mecanismo do efeito APR. Vários outros estudos corroboram os resultados relacionados à nanopartículas poliméricas que se utilizam desses mecanismos (VENKATARAMAN et al., 2011).

Já no direcionamento ativo, as nanopartículas contêm moléculas direcionadoras em sua superfície, que são capazes de interagir com o tecido circundante. As ligações com o sítio-alvo podem ocorrer através de interações ligante-receptor, antígeno-anticorpo ou por aptâmeros direcionadores, que fazem como que aconteça o acúmulo do fármaco no tecido de interesse. A utilização desses ligantes oferece excelentes oportunidades para que os fármacos possam ultrapassar barreiras biológicas, diferentes acessos a tecidos e serem mais facilmente internalizados nas células (VENKATARAMAN et al., 2011).

Diferentes materiais são utilizados para promover alterações nas propriedades das superfícies das partículas. O PEG tem sido utilizado para modificação de vários tipos de nanopartículas poliméricas. É um polímero hidrofílico não-iônico, que tem mostrado excelente biocompatibilidade. O PEG em nanopartículas de PLA diminui a interação entre as nanopartículas e as enzimas dos fluidos digestivos e aumenta a absorção do fármaco encapsulado na corrente sanguínea e no tecido linfático. Partículas com PEG apresentam maior absorção pelo baço e cérebro, do que nanopartículas convencionais. Já nanopartículas de PCL modificadas com poli(óxido de etileno) (PEO) geram elevados níveis do fármaco em tumores, além de persistirem por um longo tempo na circulação e aumentarem o tempo de meia-vida no sangue. Outra forma de modificação de superfície é a adição de lecitina às nanopartículas, com o objetivo de melhorar o transporte através da mucosa intestinal. Um

exemplo já demonstrado é o revestimento de nanopartículas de dextrano-PCL. Outro exemplo, são moléculas de IgG policlonal tem sido utilizadas para aumentar a resposta imune de nanopartículas de PLGA (KUMARI et al., 2010).

O tamanho das nanopartículas e a massa molecular dos polímeros interferem no processo de eliminação e de biodistribuição. Estruturas de massa molecular menor que 5.000 são rapidamente eliminadas pelo rim. Já no que diz respeito ao tamanho, um exemplo é o caso de nanopartículas PEGuiladas, que quando possuem 250 nm de diâmetro são muito mais rapidamente eliminadas da circulação do que as que possuem 70 nm. Um estudo demonstrou que nanopartículas PEGuiladas com raio hidrodinâmico menor que 150 nm aumentaram a absorção por células da medula óssea de coelhos, enquanto que as que possuíam diâmetro de 250 nm foram sequestradas pelo fígado e baço e somente uma pequena fração foi encontrada na medula óssea (OWENS III e PEPPAS, 2006).

Os mecanismos de liberação do fármaco são importantes, pois uma das grandes vantagens da nanotecnologia aplicada à farmacologia é a liberação sustentada. Há cinco métodos possíveis para a liberação: desorção das moléculas do fármaco ligadas à superfície; difusão através da matriz da nanopartícula; difusão através da parede polimérica das nanocápsulas; erosão da matriz da nanopartícula e uma combinação de processos de erosão/difusão. A taxa de liberação está relacionada à solubilidade, difusão e biodegradação da matriz polimérica, além da eficiência de encapsulação e tamanho da nanopartícula. Partículas maiores tem uma liberação inicial menor do que partículas menores, devido à menor área superficial. Em nanoesferas, nas quais o fármaco está distribuído uniformemente pela matriz polimérica, a liberação ocorre por difusão e/ou erosão, em condições *sink*. Uma rápida liberação inicial é indicativa de uma ligação fraca ou de uma ampla adsorção do fármaco à superfície das nanopartículas. A liberação do fármaco aumenta conforme a diminuição da massa molecular do polímero (KUMARI et al., 2010).

A natureza do fármaco, a estabilidade, a permeabilidade, a liberação do fármaco, entre outros fatores, devem ser analisados para que se possa determinar a formulação ideal, o método de síntese e a modificação de superfície que poderá ser realizada (KUMARI et al., 2010).



## 1.2.2 Métodos de preparação das nanopartículas

Atualmente, pelo conhecimento das propriedades físico-químicas do fármaco desejado, é possível eleger o polímero e o método de preparação mais adequado. Dois tipos de métodos são encontrados na literatura. Em uma das categorias, é necessária uma reação de polimerização a partir de um monômero, enquanto na outra, os métodos utilizam-se de polímeros previamente formados (REIS et al., 2006).

Os polímeros empregados para uso humano além de biodegradáveis devem ser estáveis na circulação sanguínea, não apresentar toxicidade, nem efeitos trombogênicos, imunogênicos ou inflamatórios, não ativar neutrófilos, e ser aplicáveis a várias moléculas, tais como fármacos, proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (KUMARI et al., 2010).

Os métodos de polimerização podem ser classificados em polimerização por emulsão (orgânica ou aquosa) e polimerização interfacial. Esses métodos de polimerização não são amplamente utilizados, pois podem ser formados tanto polímeros biodegradáveis como não biodegradáveis. Além disso, as moléculas residuais produzidas a partir do processo de polimerização (monômeros, oligômeros, tensoativos) podem levar à toxicidade da formulação (REIS et al., 2006).

Métodos para formulação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados são, então, mais interessantes do que aqueles que se utilizam de monômeros. Alguns deles são encontrados na literatura, tais como a emulsificação/evaporação do solvente, emulsificação/difusão do solvente, *salting-out*, nanoprecipitação, diálise e tecnologia de fluido supercrítico. O método é escolhido levando-se em consideração o sistema polimérico em questão, a área de aplicação, o tamanho requerido para a nanopartícula, entre outros fatores. Para finalidades farmacológicas, o método de escolha geralmente envolve a de evaporação do solvente ou a tecnologia do fluido supercrítico, pois não deve ser encontrado qualquer traço de solvente no produto final, para que sejam evitadas possíveis reações tóxicas ao paciente. Os solventes utilizados para a preparação de nanopartículas são: acetato de etila, clorofórmio, acetona, diclorometano, etanol, tetra-hidrofurano e acetonitrila (RAO e GECKELER, 2011).

O método de emulsificação/evaporação do solvente, apesar de ter sido a primeira metodologia desenvolvida para a formulação de nanopartículas poliméricas, ainda é amplamente utilizado. Nesse método, os polímeros são preparados em uma solução de solventes voláteis e uma emulsão é formada por sonicação. Primeiramente, a fase orgânica, que contém o polímero e o fármaco, é emulsificada em uma fase aquosa contendo um

tensoativo. A emulsão é, então, convertida em uma suspensão por meio da evaporação do solvente, que ocorre com aumento da temperatura, sob pressão e agitação constante, o que induz a precipitação do polímero em nanopartículas (REIS et al., 2006). As emulsões formadas no decorrer do método podem ser emulsões-simples óleo-em-água ou emulsões-duplas (água-em-óleo)-em-água. As emulsões-simples óleo-em-água são economicamente interessantes, pois utilizam água como não-solvente, embora só possam ser aplicadas para a encapsulação de fármacos lipossolúveis, além de requererem alta energia durante o processo de homogeneização. As emulsões-duplas (água-em-óleo)-em-água são utilizadas para a encapsulação de fármacos hidrofílicos. Após a evaporação do solvente, as nanopartículas são coletadas através de ultracentrifugação, com lavagens consecutivas com água destilada, a fim de que se elimine qualquer resíduo de tensoativos. Após esse procedimento é realizada a liofilização para posterior armazenagem. Embora muito utilizado, o método tem como desvantagem a possível permanência de resíduos de solventes na formulação, bem como o dano ambiental gerado por esses resíduos (RAO e GECKELER, 2011).

Como variação ao método da evaporação do solvente, há o método da emulsificação/difusão do solvente. O polímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente parcialmente miscível em água, como metanol, acetona ou carbonato de propileno, e é saturado com água, para garantir o equilíbrio termodinâmico entre ambos os líquidos. Essa fase é adicionada a uma fase aquosa externa, constituída de estabilizantes, formando assim uma emulsão óleo-em-água. Ocorre a difusão espontânea do solvente orgânico para a fase externa, pela adição de um excesso de água, o que promove uma turbulência interfacial entre as duas fases, levando à formação de nanocápsulas ou nanoesferas, com o carregamento do polímero para a fase aquosa. Conforme aumenta a concentração do solvente miscível em água, ocorre a diminuição do tamanho da partícula. Finalmente, o solvente é eliminado de acordo com seu ponto de ebulição, por evaporação ou filtração (SOPPIMATH et al., 2001; REIS et al., 2006).

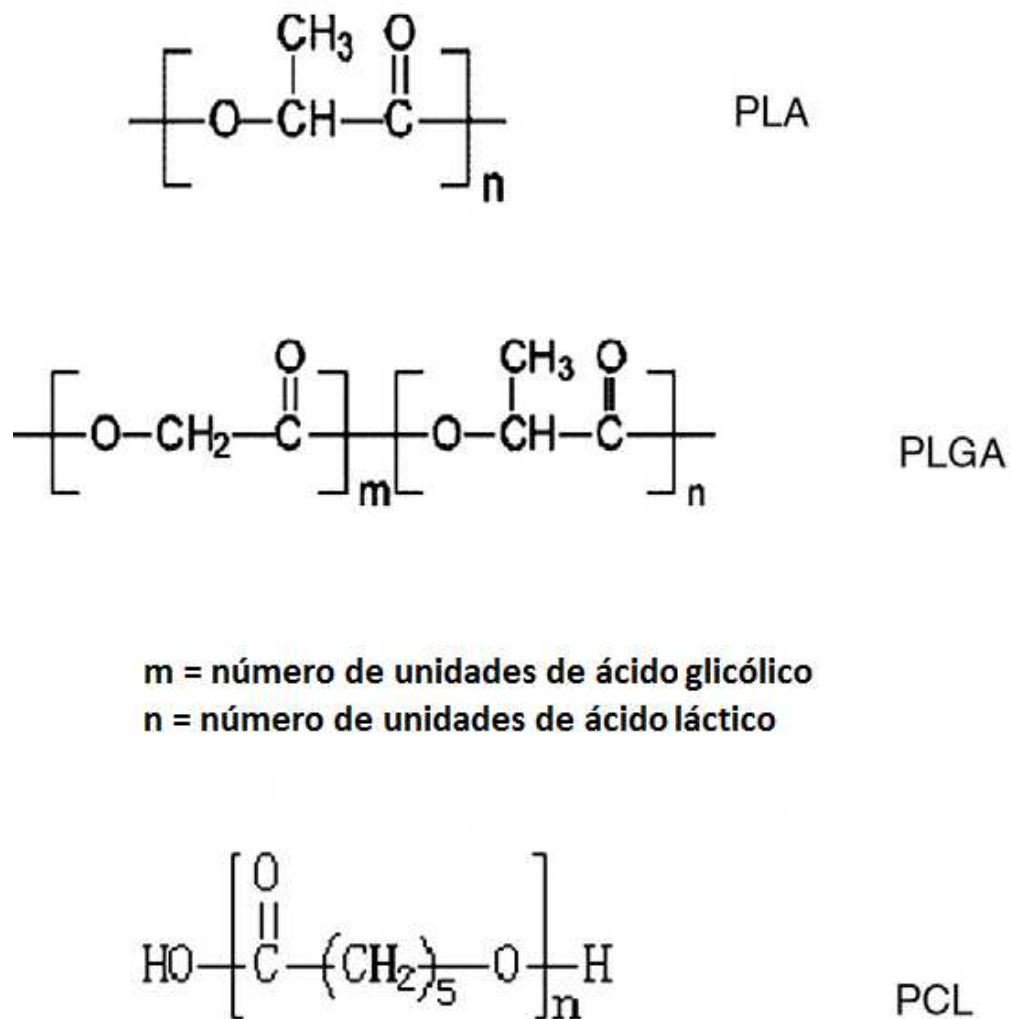
Essa técnica apresenta como vantagens, a boa eficiência de encapsulação, que é geralmente maior que 70%, a ausência de homogeneização, a alta reprodutibilidade entre os lotes produzidos, facilidade para produção em larga escala, simplicidade e estreita variação no tamanho da partícula. Como desvantagens, pode-se citar a grande quantidade de água eliminada da suspensão, além da dificuldade na eficiência de encapsulação de fármacos hidrossolúveis, já que, nesses casos, ocorre o vazamento do fármaco para a fase externa durante a emulsificação. Esse mecanismo faz com que o método seja eficaz somente para fármacos lipofílicos (REIS et al., 2006).

Outro método utilizado é o *salting-out*, que tem como vantagem não ser necessária a utilização de tensoativos e solventes clorados (RAO e GECKELER, 2011). Desenvolvido por Alleman e colaboradores (1992), o *salting-out* é uma variação do método de evaporação do solvente, em que ocorre a separação de um solvente miscível em água de uma solução aquosa, sem o emprego de qualquer força de cisalhamento (REIS et al., 2006; SOPPIMATH et al., 2001; RAO e GECKELER, 2011). Primeiramente, um solvente orgânico, geralmente a acetona, é utilizado para dissolver o fármaco e o polímero, e uma emulsão é formada em um gel aquoso contendo agentes *salting-out*, que podem ser eletrólitos, como cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, acetato de magnésio, e não eletrólitos, como sacarose. É utilizado um estabilizante, como polivinilpirrolidona e hidroxietilcelulose (REIS et al., 2006). Após a formação da emulsão óleo-em-água, é acrescentada uma quantidade de água suficiente para permitir a difusão da acetona para a fase aquosa, o que culminará na formação das nanopartículas. Para finalizar, é realizada uma filtração de fluxo cruzado, a fim de que sejam eliminados os solventes e o agente *salting-out* da formulação. O agente *salting-out* está relacionado à eficiência de encapsulação do fármaco, portanto sua escolha deve ser analisada previamente com cautela (RAO e GECKELER, 2011). É uma técnica de alta eficiência, que não necessita de altas temperaturas, o que a torna interessante para fármacos termossensíveis. As principais desvantagens são a utilização exclusiva para fármacos lipossolúveis e a quantidade de lavagens das nanopartículas (REIS et al., 2006).

Desenvolvido por Fessi e colaboradores (1989), o método da nanoprecipitação, também chamado de método do deslocamento do solvente, consiste no deslocamento de um solvente miscível em água de uma solução lipofílica, o que leva à deposição interfacial do polímero. O solvente orgânico é transferido para a fase aquosa sob agitação moderada. A rápida difusão do solvente faz com que ocorra a diminuição da tensão interfacial entre as duas fases, o que leva a formação de pequenas gotículas de solvente orgânico, pelo aumento da sua área de superfície. Para tal procedimento, um solvente orgânico solúvel em água e de fácil remoção por evaporação é escolhido como solvente do polímero, sendo a acetona frequentemente o solvente de escolha. Pode ser utilizada acetona com uma pequena parte de água, acetona com etanol e metanol. É necessária também a utilização de tensoativos naturais ou sintéticos, pois eles dificultam a agregação das nanopartículas durante um longo período de estocagem. O tamanho da partícula também é influenciado pela natureza e pela concentração do tensoativo. Já no que diz respeito aos polímeros os mais comumente utilizados são os poliésteres biodegradáveis, PLA, PLGA e PCL, que podem ser copolimerizados com PEG. Suas estruturas químicas estão descritas na figura 4.

Outro método que se pode citar é o método de diálise. O polímero é dissolvido em um solvente orgânico e colocado em um tubo de diálise. Com o deslocamento do solvente dentro da membrana, acontece a agregação progressiva do polímero e devido à diminuição da sua solubilidade, ocorre a suspensão homogênea das nanopartículas. Até o momento o método de diálise para produção de nanopartículas poliméricas não está totalmente elucidado. Acredita-se que o mecanismo seja similar ao da nanoprecipitação (RAO e GECKELER, 2011).

**Figura 4** - Estruturas moleculares do PLA, do PLGA e do PCL



(Adaptado de PARVEEN et al., 2011)

A tecnologia do fluido supercrítico é um método ecologicamente correto, que produz nanopartículas com alta pureza sem qualquer traço de solvente orgânico, sem os inconvenientes dos métodos tradicionais. Existem dois processos que se utilizam dessa tecnologia: a expansão rápida de solução supercrítica e a expansão rápida de solução supercrítica em solvente líquido.

No que se refere à expansão rápida de solução supercrítica, o soluto é dissolvido em um fluido supercrítico para que seja formada uma solução. Em seguida, ocorre uma rápida expansão da solução através de um orifício ou de um tubo capilar para o ambiente. O alto grau de supersaturação, acompanhado pela rápida diminuição da pressão durante a expansão, resulta na formação de partículas bem dispersas. Estudos demonstram que são encontradas na formulação partículas tanto na ordem de micrômetros como de nanômetros. A concentração e o grau de saturação do polímero tem efeito sobre a morfologia e o tamanho das partículas produzidas por esse método. Outros fatores como propriedades dos materiais, condições do processo, massa molecular do polímero, etc., também interferem sobre o tamanho da partícula. A principal desvantagem desse método é a maior produção de micropartículas do que nanopartículas (RAO e GECKELER, 2011).

A criação do método de expansão rápida de solução supercrítica em solvente líquido teve como objetivo contornar a principal desvantagem do método anterior. Para isso, a modificação realizada foi a expansão da solução supercrítica em um solvente líquido, ao invés do ambiente. O solvente líquido aparentemente suprime o crescimento da partícula, fazendo com que ocorra a obtenção de partículas principalmente em escala nanométrica. A desvantagem de ambas as variações do método de tecnologia do fluido supercrítico é a baixa solubilidade ou total insolubilidade dos polímeros nesses fluidos (RAO e GECKELER, 2011).

Um dos polímeros biodegradáveis mais utilizados para a encapsulação de fármacos é o PLA. No organismo, o polímero é hidrolisado em monômeros de ácido láctico, que é um intermediário natural no metabolismo de carboidratos. As nanopartículas de PLA são preparadas pelo método de evaporação do solvente, *salting-out* e emulsificação/difusão do solvente. Dados experimentais demonstraram boa eficiência de encapsulação, 95%, em nanopartículas de PLA contendo o antipsicótico savoxepina, com liberação *in vitro* superior a uma semana. A eficiência de encapsulação da proteína albumina do soro bovino (BSA) foi de mais de 71,6%. Já no caso de encapsulação de oridonina e de progesterona, a eficiência foi de 91,88% e 70%, respectivamente (KUMARI et al., 2010).

### **1.2.3 Formulações lipídicas para veiculação de AmB**

Aplicando-se a nanotecnologia para a veiculação de AmB, já existem no mercado formulações lipídicas e lipossomais que foram desenvolvidas com o intuito de aumentar a eficácia terapêutica e principalmente diminuir os efeitos tóxicos do fármaco. São elas:

AmBisome®, Abelcet® e Amphocil®. Essas três formulações apresentam notáveis diferenças em sua morfologia (HILLERY, 1997).

AmBisome® é uma vesícula unilamelar pequena, uma preparação lipossomal, com diâmetro de 50-100 nm. Possui em sua composição, fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, distearoilfosfatidilglicerol e AmB na proporção molar de 2:1:0,8:0,4. O produto é comercializado como um pó liofilizado para reconstituição (FILIPPIN e SOUZA, 2006).

Uma única dose de AmBisome® apresenta altos níveis plasmáticos de AmB e a hemólise é praticamente inexistente quando comparado com AmB livre. Foi demonstrado que o AmBisome® tem uma taxa de erradicação de 83% para *Candida* spp. e 41% para *Aspergillus* spp. em pacientes com micoses sistêmicas. Quando em terapia continuada por mais de três meses, pacientes apresentam níveis máximos cumulativos de AmB de 16,8 g, não mostrando toxicidade significativa (HILLERY, 1997).

Já o Abelcet® é uma formulação em que os lipídios dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) são complexados com AmB em uma proporção molar de 7:3:10. Esse complexo lipídico de AmB possui um diâmetro de 2-5 µm. Ao contrário do AmBisome®, o Abelcet® apresenta níveis plasmáticos bem inferiores em relação ao Fungizone®. Mas em relação à toxicidade, o Abelcet® tem mostrado eficácia na diminuição dos efeitos colaterais (HILLERY, 1997).

O Amphocil® é um complexo estável de AmB e colesterilsulfato de sódio em uma proporção molar 1:1 (FILIPPIN e SOUZA, 2006). Formam uma dispersão coloidal, com partículas em forma de discos de 122 nm de diâmetro e 4 nm de espessura. Após infusão intravenosa de Amphocil®, é notada uma rápida diminuição da concentração plasmática de AmB ao final da infusão e um grande volume de distribuição do fármaco. A eficácia terapêutica dessa formulação foi de 34% em aspergiloses e de 58% em candidemias (HILLERY, 1997).

Apesar de essas formulações lipídicas reduzirem a toxicidade da AmB, cada formulação apresenta diferenças nos seus efeitos tóxicos e nas propriedades farmacocinéticas, além de os elevados custos desses medicamentos tornarem seu uso limitado. Além disso, tem sido comprovado que a redução da toxicidade da AmB quando veiculada nessas formulações lipídicas vem acompanhada da substancial redução na sua atividade antifúngica (VAN ETTEN et al., 1995 a,b,c; VAN ETTEN et al., 1998). O mecanismo pelo qual essas formulações modificam o índice terapêutico da AmB é devido à forte interação entre o fármaco e os compostos lipídicos da formulação (SZOKA e TANG, 1993; BOLARD et al., 1993).

Outra desvantagem dessas formulações é a necessidade de altas doses para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Uma vez que a AmB é tóxica também para células humanas, doses repetidas podem levar ao acúmulo do fármaco, devido a seu lento processo de eliminação, o que pode promover uma possível toxicidade. A formulação ideal é aquela que para alcançar o efeito desejado sejam necessárias doses baixas, para que sejam evitados os efeitos colaterais (FUKUI et al., 2003).

Por esse motivo, o presente trabalho teve como objetivo a formulação de um sistema para veiculação de AmB para administração intravenosa que permita o aumento da eficácia terapêutica e a redução da toxicidade do fármaco. Para essa finalidade o sistema de liberação escolhido foi o de nanopartículas poliméricas, em que o polímero de escolha foi o PLA, pelas suas características de biodegradação e biocompatibilidade. Ao PLA foi associado o PEG, para que se obtivesse um sistema intravenoso de longa circulação, pois o PEG tem como principal vantagem, a formação de barreiras estéricas ao redor da partícula, o que dificulta a identificação da molécula pelo SFM, possibilitando a permanência prolongada das nanopartículas na corrente circulatória. Para finalidades comparativas, foi variada a massa molecular do PEG em 2, 10 e 20 kDa, e obteve-se então, três formulações diferentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Obter e caracterizar nanopartículas de blendas de PLA-PEG para a veiculação de AmB, variando-se a massa molecular do PEG em 2, 10 ou 20 kDa, para fins comparativos, e avaliar a toxicidade e a eficácia *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia analítica por CLAE para a análise de AmB;
- Obter e caracterizar nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo AmB, variando-se a massa molecular do PEG;
- Avaliar a eficiência de encapsulação da AmB nas nanopartículas;
- Avaliar o estado de agregação do fármaco nas nanopartículas;
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas;
- Avaliar a citotoxicidade da AmB encapsulada sobre eritrócitos;
- Avaliar a eficácia terapêutica da AmB encapsulada através de testes antifúngicos *in vitro*.



### **3 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **3.1 Artigo 1**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN EFFECTIVE HPLC-PDA METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMPHOTERICIN B FROM PLA-PEG BLEND NANOPARTICLES**

Caroline Danziato<sup>1</sup>, Najeh Maissar Khalil<sup>1</sup> and Rubiana Mara Mainardes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Universidade Estadual do Centro-Oeste/UNICENTRO, Rua Simeão Camargo Varela de Sá 03, 85040-080 Guarapuava, PR - Brazil

\* [rubianamainardes@pq.cnpq.br](mailto:rubianamainardes@pq.cnpq.br)

Tel: +55 (42) 36298160

Fax: +55 (42) 36298102

## **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN EFFECTIVE HPLC-PDA METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMPHOTERICIN B FROM PLA-PEG BLEND NANOPARTICLES**

### **Abstract**

The aim of this work was to develop and validate an effective chromatographic method for determining Amphotericin B (AmB) encapsulation efficiency in poly(D,L-lactide)-polyethyleneglycol (PLA-PEG) blend nanoparticles. A reversed-phase high performance liquid chromatography with a photodiode array (PDA) wavelength detector was used to develop the method. Chromatographic runs were performed on a RP C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 µm) and a mobile phase consisted of a 9% acetic acid and acetonitrile mixture (40:60), in an isocratic elution with a flow rate of 1 mL/min. AmB was detected using a PDA detector set at the wavelength of 408 nm. The validation process was performed considering the following parameters: selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). A concentration range of 1-20 µg/mL was used to construct the analytical curve, which was found to be linear. LOQ and LOD were 55 and 18 ng/mL, respectively. The mean of recovery of AmB from the samples was 99.92% (RSD = 0.34%, n = 9), and the method was robust for changes in the flow rate (maximum RSD = 4.82%). The intra and inter-assay coefficients of variation were less than 0.59%. The method was successfully used to determine the entrapment efficiency of AmB in PLA-PEG blend nanoparticles.

Keywords: Amphotericin B, HPLC, biodegradable polymers, PLA-PEG, nanoparticles, validation, encapsulation efficiency.

## 1. Introduction

Amphotericin B (AmB) is the most widely used antifungal for the treatment of systemic fungal infections. It is a polyene macrolide antibiotic produced by an actinomycete, *Streptomyces nodosus* [1] isolated in 1955, and it was the first antifungal to be approved by U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 1965 [2]. AmB chemical structure has an amphipathic nature, with a hydrophobic portion and hydrophilic portion, which compromises its water solubility [3]. In the presence of water, AmB has a tendency to self-aggregate and produce dimers and oligomers, responsible for its affinity to ergosterol, component of fungi cells membrane, and cholesterol, component of human cells membrane, which leads to its toxicity [4,5]. The aggregated form of the drug is the cause of its serious side effects, such as nephrotoxicity, hepatotoxicity, haematotoxicity, and other complications [6,7].

Many formulations have been tested in order to decrease toxicity. Some of them, based on nanotechnology are already commercially available, whereby a liposomal product Ambisome®, a lipid complex Abelcet® and a colloidal dispersion Amphocil®. Despite reducing toxic effects, these formulations also decrease AmB therapeutic effects, besides their high costs make their use impracticable [8,9]. Reduction of therapeutical efficiency of these formulations is related to their lipidic nature, which presents a very strong interaction with AmB, difficulting its release [10,11].

As an alternative to lipid formulations, polymeric nanoparticles may be interesting to solve solubility problems and mainly to reduce toxicity of AmB. They have been tested to improve drugs already established, but that present solubility drawbacks, low bioavailability and toxicity problems. Polymeric carriers are versatile because their physicochemical properties can be modulated to obtain formulations that solve these issues. Depending on the surface charge, polymer composition and molecular weight, nanoparticles can be manipulated for a particular purpose [12]. Nanoparticles optimize therapeutical regimen decreasing the dose needed for the treatment, because of their extended release capability that contributes to reduce toxicity [13]. Sustained release characteristic, promoted by polymeric nanoparticles, can be inhibited by the mononuclear phagocyte system cells that remove them from the bloodstream. To avoid opsonization and phagocytosis, nanoparticles surfaces must be coated with hydrophilic polymers. Polyethyleneglycol (PEG) has been used to this purpose, due to its long chains blocks opsonization process, extending the half-life of nanoparticles [12].

A suitable drug delivery system must present high encapsulation efficiency of the drug, in order to reach its therapeutical objective [14]. With the purpose of defining the drug content of nanoparticles, a quantitation method must be appropriately validated. Some

methods are described in the literature for determining AmB content in biological matrices, using RP-HPLC [15,16], second-derivative spectrophotometry [17], UV-spectrophotometry [18], HPLC-UV/Vis [19], in lipidic formulations using HPLC-MS-MS [20], RP-HPLC [21-23], UV/Vis-spectrophotometry [24,25], and in polymeric nanoparticles, using HPLC [8], UV/Vis- spectrophotometry [4,7,26] and RP-HPLC [27]. Most of those methods have not been validated, mainly those about polymeric nanoparticles. Consequently, the aim of this work is to develop and validate a simple and rapid RP-HPLC method to quantitate AmB loaded in poly(lactic acid)-PEG (PLA-PEG) nanoparticles.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

AmB, PLA (*M<sub>w</sub>* 85-160 kDa), PEG (2, 10 and 20 kDa) and polyvinyl alcohol (PVA, 31 kDa, 88% hydrolyzed) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Chloroform and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Biotec® (Brazil) and dichloromethane, from FMaia® (Brazil). HPLC-grade methanol and acetonitrile were purchased from JTBaker® (USA). Water was purified using a Milli-Q Plus system (Millipore®).

### 2.2. Equipments

A Waters 2695 Alliance HPLC system (Milford, MA, USA) was used for method development. This HPLC system was equipped with a column heater, an on-line degasser, a quaternary pump, an autosampler, a photodiode array wavelength detector (Waters 2998). Data acquisition, analysis, and reporting were performed using the Empower chromatography software (Milford, MA, USA). HPLC analysis was conducted using a reverse phase C18 column (Xterra, Waters) with a 5 µm particle size, 4.6 mm internal diameter, and 250 mm (in) length.

### 2.3. Chromatographic conditions

The mobile phase consisted of a 9 % acetic acid and acetonitrile mixture (40:60), in an isocratic elution with a flow rate of 1 mL/min. The sample injection volume was 20 µL, as well as the photodiode array (PDA) detector was set at the wavelength of 408 nm. The analysis was carried out at a temperature of 25°C and the method run time was 6 min.

### 2.4. Standards solutions and sample preparation

It has been weighed accurately 10 mg of AmB into a 10 mL volumetric flask and filled with DMSO, in order to obtain a stock standard solution of 1 mg/mL. The standard solutions were prepared by mixing certain amount of stock solution with a sufficient quantity of methanol, to produce seven different concentrations (1, 2, 3, 4, 5, 10 and 20 µg/mL). With the intention of determining the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of this method, other seven standard solutions were obtained likewise (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 and 2.0 µg/mL). Before the injection, it was performed the filtering of each standard and samples through a 0.22 µm pore size filter (Millipore, Bedford, USA).

## 2.5. Method validation

The HPLC method validation was performed considering the following parameters: specificity, linearity, robustness, precision, accuracy, range, LOD and LOQ. These characteristics were carried out according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines [28]. The specificity was evaluated by comparing representative chromatograms of samples containing possible interfering substances to samples containing AmB. Also, specificity was evaluated by submitting the samples to stress conditions, such as pH variation, oxidation, freeze and visible light. The linearity was determined through the construction of a regression line from the peak plot of area vs. concentration for the seven standard solutions (1, 2, 3, 4, 5, 10 and 20 µg/mL) using the linear squares methodology. Robustness was performed by modifying the flow rate (0.9 and 1.1 mL/min) from the parameters described in sub-section 2.3. Analysis of three different standard samples, three times each on the same day were carried out to evaluate the repeatability or intra-day precision. Intermediate precision was determined by analysing three different standard solutions in three different days. Precision results were reported as standard deviation (SD) and relative standard deviations (RSD). The accuracy was presented by calculating the percent recoveries of the mean concentration of AmB at three different concentrations by comparing the mean results to the theoretical value, which was considered to be 100% (RSD). The LOD and LOQ were determined from the analytical curve obtained for the seven standard solutions (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 and 2.0 µg/mL). The LOD and LOQ were defined as the lowest concentration that could be detected and quantitated, respectively. The results were based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve, using the following equations (eq. 1 and 2):

$$\text{LOD} = 3.3\sigma/S \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{LOQ} = 10\sigma/S \quad \text{Eq. 2}$$

where  $\sigma$  is the standard deviation of the response, and  $S$  is the slope of the calibration curve. All samples were analyzed in triplicate.

## 2.6. Method applicability

### 2.6.1. Preparation of AmB-loaded PLA-PEG nanoparticles

AmB-entrapped PLA-PEG nanoparticles were prepared by an oil-in-water (O/W) emulsification/solvent evaporation technique. Initially, amounts of PLA and PEG (2, 10 or 20 kDa), at PLA:PEG ratio of 5:1, were dissolved in dichloromethane. It was added in this phase and organic solution (DMSO and chloroform) containing AmB. This phase was emulsified into PVA aqueous solution (1%, w/v), and sonicated for about 5 min to produce an O/W emulsion. The emulsion was submitted to evaporation under vacuum with continuous stirring at 37°C. The nanoparticles were isolated from the non-encapsulated drug by ultracentrifugation (19,975 g, 30 min, 4°C, Cientec CT-15000R centrifuge, Brazil) and washed twice with ultrapure water. The precipitated was resuspended in sucrose 5% and freeze-dried. The resultant supernatants were collected to perform posterior analysis. All the details presented here are under patent request in Brazil and must be protected according to the Brazilian regulatory agency.

The mean particle sizes were determined by dynamic light scattering (BIC 90 plus, Brookhaven Instruments Corp.). The analyses were performed at a scattering angle of 90° and a temperature of 25°C. For each sample, the mean particle diameter, polydispersity and standard deviation for ten determinations were calculated.

### 2.6.2. Determination of AmB encapsulation efficiency

To determine the encapsulation efficiency, it was performed an indirect analysis. The supernatant containing free AmB, separated from the solid nanoparticles by ultracentrifugation, was diluted in methanol (1:10). To determine the AmB concentration in supernatant, 20  $\mu\text{L}$  of the sample were injected into the HPLC system, and the drug amount was compared to the previously constructed analytical curve. The samples were filtered through a membrane filter (0.22  $\mu\text{m}$  pore size, Millipore) prior to the injection. The amount of AmB trapped in the nanoparticles was calculated by subtracting the quantity in the supernatant from the total used initially using the following equation (eq. 3):

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{theoretical amount} - \text{analytical amount}}{\text{theoretical amount}} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

These analyses were performed in triplicate.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Method development

Initially, the runs were performed using acetonitrile and water in variable proportions as the mobile phase. Although the retention time was inferior to 4 min, the peaks presented no symmetry. Alternatively, a mobile phase consisting of acetonitrile and sodium acetate buffer was tested, but there was no peak after a run of 40 min. In order to improve the method, it was tested methanol and water as eluents in proportion of 75:25, v/v. The peak was showed after 11 min, and it presented an irregular shape. Methanol and sodium acetate buffer (25:75, v/v) were tested, and despite of presenting a short retention time, about 3 min, a tailing of the AmB peak was observed. Finally, a mobile phase consisting of acetonitrile and 9% acetic acid was used. After variations at the proportion of the eluents, a regular and symmetric peak was observed. The most acceptable mobile phase was acetonitrile and 9% acetic acid at the proportion of 60:40, v/v. The flow rate was 1 mL/min and the retention time presented was approximately 4 min (Fig. 1).

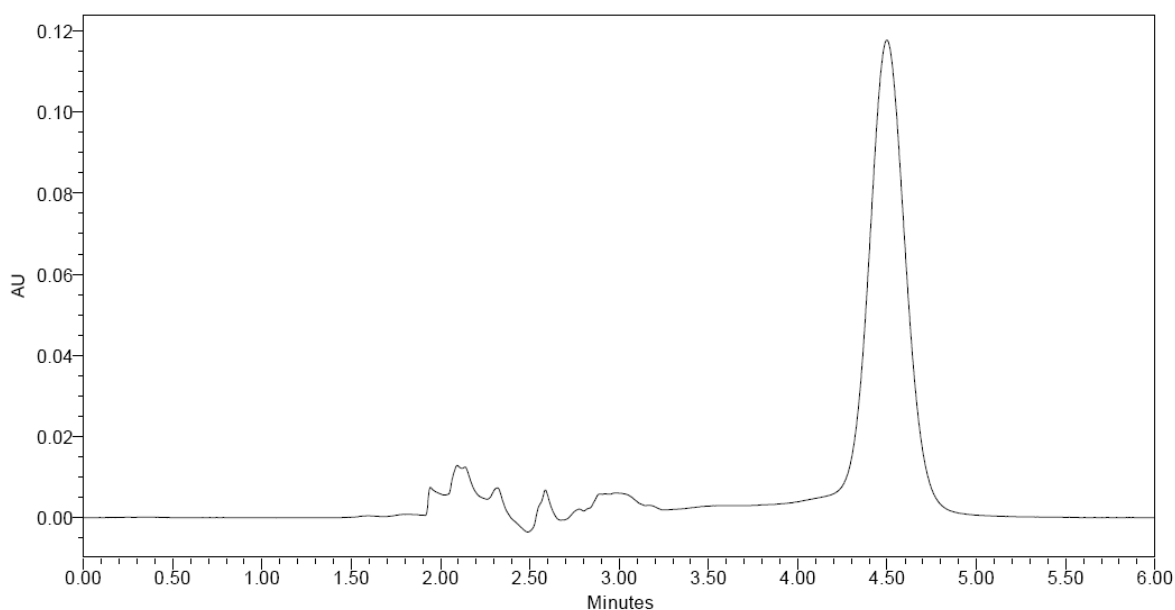


Figure 1. Representative HPLC chromatograms of 20  $\mu\text{g/mL}$  AmB standard solution. Conditions: mobile phase, 9 % acetic acid:acetonitrile (40:60, v/v); flow rate, 1 mL/min; PDA detector at a wavelength of 408 nm; column temperature, 25°C; injection volume, 20  $\mu\text{L}$ .



### 3.2. Method validation

#### 3.2.1. Linearity

The linearity was determined at seven concentration levels ranging 1 to 20  $\mu\text{g/mL}$  by calculating the regression equation and correlation coefficient ( $r$ ) by the least-squares method. Linearity is verified with an  $r$  value of nearly 1, proving the proximity between theoretical and measured concentrations. Analytical curve is demonstrated in Figure 2, and it shows the plot of the response factor vs. the standard sample concentration. The results show that the method is linear in this range.

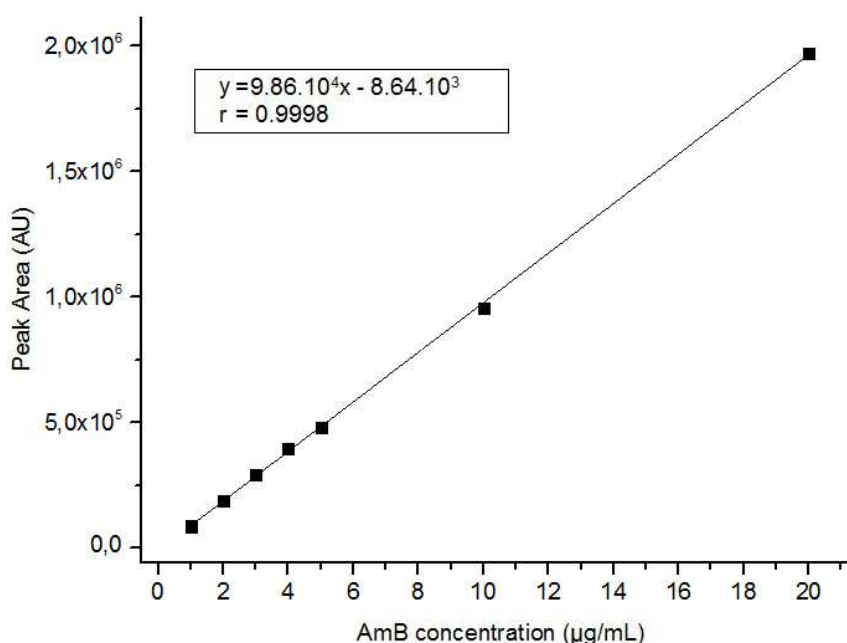


Figure 2. Analytical curve obtained with AmB methanolic solutions in the range of 1-20  $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 3$ ).

#### 3.2.2. Accuracy

The accuracy was verified through analyses of three different concentrations of standard solutions (1, 10 and 20  $\mu\text{g/mL}$ ), prepared in triplicate. It was calculated the percent recovery and RSD of the mean concentration. The detailed results are presented in Table 1.

Table 1. Accuracy results for the AmB concentrations in the standard solutions.

Standard solution ( $\mu\text{g/mL}$ )*	Recovery (%)	RSD (%)
1	99.66	0.58
10	100.23	0.23
20	99.88	0.21

\* $n=3$ ; RSD = relative standard deviation

The mean of recovery of AmB from the samples was 99.92% (RSD = 0.34%, n = 9), which indicates an agreement between the experimental and theoretical values.

### 3.2.3. Precision

Precision of the method is expressed as the RSD for the repeatability and intermediate precision. To perform this analysis, three concentrations of AmB (1, 10 and 20 µg/mL) were prepared in triplicate and analyzed in one day, for intra-day analysis, and in three days for inter-day precision. Results are shown in Table 2, presenting a maximal RSD value of 0.59%, which indicates precision.

Table 2. Precision results for the different levels of AmB in the standard solutions.

Standard solution (µg/mL)*	Measured concentration ± SD (µg/mL)	RSD (%)
Analysis repeatability (n=3)		
1	0.99 ± 0.006	0.58
10	10.00 ± 0.04	0.44
20	20.00 ± 0.04	0.21
Intermediate precision (n=3)		
Day 1		
1	0.99 ± 0.005	0.58
10	10.00 ± 0.01	0.12
20	19.96 ± 0.06	0.29
Day 2		
1	0.99 ± 0.005	0.58
10	10.03 ± 0.015	0.12
20	20.02 ± 0.05	0.26
Day 3		
1	0.98 ± 0.006	0.59
10	10.02 ± 0.015	0.15
20	20.03 ± 0.03	0.13

\*n=3; SD = Standard deviation; RSD = relative standard deviation

### 3.2.4. Robustness

Robustness test is used to prove that small alterations in the analytical parameters did not influence the results. Modifications are deliberately promoted, such as changes in the mobile phase flow rate (Table 3). The method is considered robust when percent recovery and RSD values indicate that those changes make no significant variation to the results. The maximum RSD was 4.82%, obtained when the 20 µg/mL concentration was submitted to a flow of 1.1 mL/min. It's established that RSD value cannot be greater than 5% for the method to be considered robust. Through these results can be demonstrated the robustness of the method.

Table 3. Robustness results for the different flow rates.

Changes to original method*	Percentage of Recovery (%) ± RSD (n=3)			
	1 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	Mean
None	99.66 ± 0.57	100.27 ± 0.15	100.08 ± 0.26	100.00 ± 0.32
0.9 mL/min	100.00 ± 2.64	99.00 ± 2.00	100.83 ± 0.57	99.94 ± 1.06
1.1 mL/min	96.00 ± 2.65	94.00 ± 2.00	93.66 ± 4.82	94.55 ± 3.15

\*1 mL/min. RSD = relative standard deviation

### 3.2.5. Limit of quantitation and limit of detection

The lowest concentration at which the analyte could be detected (LOD) or quantified (LOQ) with precision and accuracy was determined through the analytical curve obtained from the standard samples (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 and 2.0 µg/mL) in the low end of the proposed range [28]. The plot of the response factors vs. the standard sample concentrations indicates the linearity of the method over this range, as showed in Figure 3. The LOD and LOQ were found to be 18 and 55 ng/mL, respectively.

### 3.2.6. Range

The range that possessed the requirements of linearity, accuracy, precision and versatility, were found to be between LOQ and 20 µg/mL. Consequently, the proposed method may be considered appropriate to perform analysis in samples containing these concentrations levels.

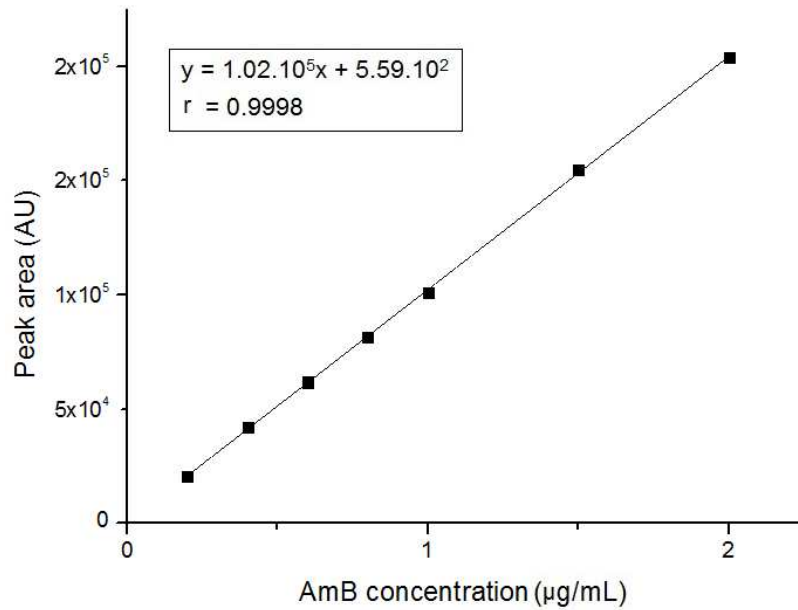


Figure 3. Analytical curve obtained with AmB methanolic solutions in the range of 200-2000 ng/mL (n = 3).

### 3.2.7. Specificity

Blank nanoparticles (without AmB) were prepared according to the procedure described in section 2.6.1. and the supernatants resultants from the ultracentrifugation process were analyzed by the HPLC method. There were no interfering peaks at the retention time of AmB (4 min) (Fig. 4).

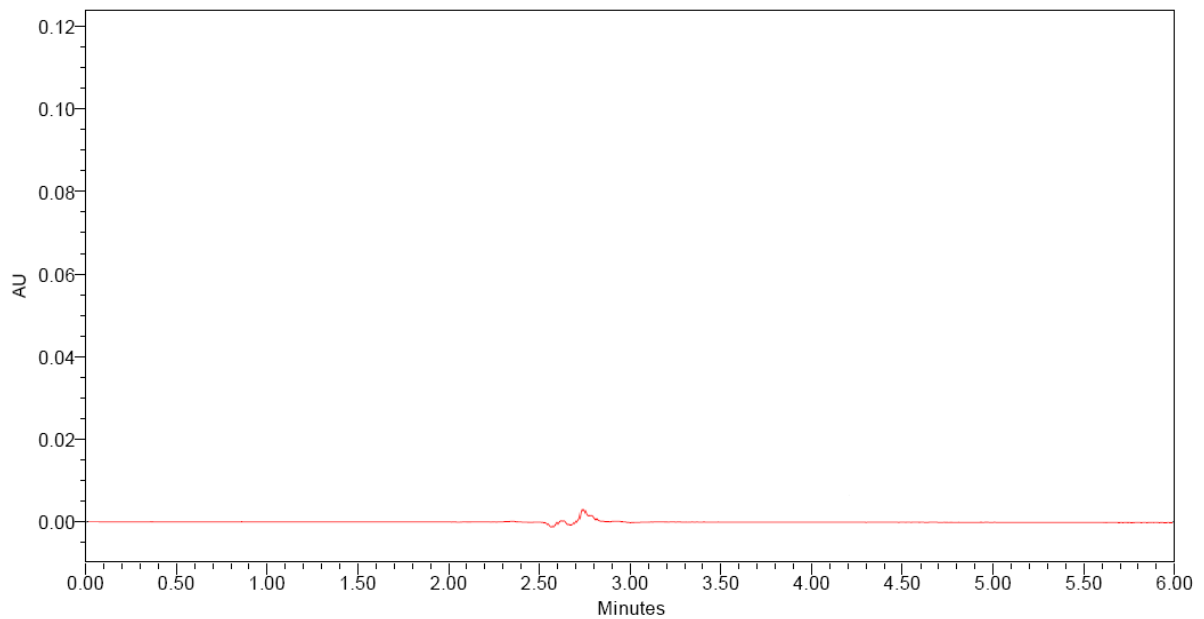


Figure 4. Representative HPLC chromatogram of the supernatant from blank nanoparticles. Conditions: mobile phase, 9 % acetic acid:acetonitrile (40:60, v/v); flow rate, 1 mL/min; PDA detector at a wavelength of 408 nm; column temperature, 25°C; injection volume, 20 µL.

Also, the specificity of the method was performed by submitting AmB to stress conditions to compare the chromatograms of AmB standards to the stressed samples. The standards were exposed to visible light for 24 h to observe the presence of possible interfering peaks from AmB degradation. Percentage of recovery results demonstrated a decrease in AmB recovery, mainly due to the photodegradation, although did not produce any interfering peak. Samples submitted to freeze ( $-18^{\circ}\text{C}$ , for 24 h), did not present any change. Oxidation and pH variation (for 2 h) were also tested. In both cases there was a significantly decrease in percentage recoveries of AmB, although there were no peaks of degradation. When the standards were submitted to acidification, there was no detection of AmB. All the results are presented at Table 4. This method may be considered specific due the absence of interfering peaks.

Table 4. Specificity assay of AmB under stress conditions.

Condition	Percentage of Recovery (%) $\pm$ RSD (n=3)			
	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	Mean
Reference (none)	99.66 $\pm$ 0.57	100.03 $\pm$ 0.11	99.83 $\pm$ 0.29	99.84 $\pm$ 0.33
Visible light (24 h)	98.33 $\pm$ 1.52	94.47 $\pm$ 2.54	90.00 $\pm$ 3.90	94.27 $\pm$ 2.66
Freeze: $-18^{\circ}\text{C}$ (24 h)	100.66 $\pm$ 1.53	96.33 $\pm$ 2.31	97.16 $\pm$ 0.57	98.05 $\pm$ 1.47
Oxidation: $\text{H}_2\text{O}_2$ (2 h)	24.33 $\pm$ 7.76	14.00 $\pm$ 2.20	21.10 $\pm$ 5.14	19.81 $\pm$ 5.03
pH variation (2 h)				
Basic: NaOH (1 M)	16.33 $\pm$ 0.57	23.00 $\pm$ 2.64	1.48 $\pm$ 0.10	13.60 $\pm$ 1.11
Acidic: HCl (1 M)	-	-	-	-

RSD = relative standard deviation

### 3.3. Method applicability

The validation of the method was performed with the aim of evaluating the encapsulation efficiency of AmB in PLA-PEG nanoparticles. The choice of an indirect method is necessary to quantitate the free AmB from the supernatant, resultant from the ultracentrifugation process. Through the specificity test, it was demonstrated that no interfering or unusual peaks were identified in the chromatograms during the quantitation.

The nanoparticles were successfully obtained by the emulsion-solvent evaporation method. The mean diameter, size distribution, polydispersity (PI) and encapsulation efficiency (EE) of AmB in PLA-PEG nanoparticles are presented in Table 5. These values indicate that the PLA-PEG nanoparticles are potential carriers for AmB, and they can be used to increase AmB solubility and decrease or avoid its toxicity.

Table 5. Characterization of PLA-PEG nanoparticles: size, size distribution, PI and EE

Nanoparticles formulations containing AmB	Size distribution	Mean size (nm)*	PI*	EE %*
PLA-PEG 2	14% (98.6-27.3 nm) e 86% (292.9-467.3 nm)	267.3 ± 43	0.154 ± 0.02	75.2 ± 4.8
PLA-PEG 10	53.6 % (142.6-332.3 nm) e 56.4% (347-467.6 nm)	223 ± 25	0.136 ± 0.05	68.9 ± 4.5
PLA-PEG 20	24.5% (128.8-269.5 nm) e 74.5% (280-354 nm)	233 ± 15	0.100 ± 0.01	73.8 ± 4.5

\* Values presented by mean ± standard deviation (n = 3).

### 3.4. Considerations about the RP-HPLC method developed and validated

The aim of this work was to develop a simple, fast and effective RP-HPLC method to quantitatively analyze AmB in polymeric nanoparticles. Spectrophotometric method is the most commonly used methodology to quantitate AmB in nanoformulations [4,7,26], but they are not as sensitive as HPLC methods. One of the few researches using HPLC-UV/Vis, is proposed by Nahar et al (2008) [4] that used a mobile phase composed of acetonitrile:acetic acid (1%):water (41:43:16, v/v/v) at a flow rate of 1.5 mL/min and retention time of 4.3 min. Even though the method appears to be adequate, the authors only cite the chromatographic conditions and do not give any information about the method validation. Jain and Kumar (2010) [27] used an HPLC-UV/Vis to quantitate AmB in nanoparticles. The mobile phase consisted of acetonitrile and 3 mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O (40:60, v/v) in a flow rate of 1 mL/min. Shao et al (2010) [29] cited the following parameters for AmB detection in polymeric nanoparticles: mobile phase consisted of acetonitrile and 10 mM sodium acetate buffer, pH 4 (40:60) and the flow rate was set as 1 mL/min. All the methods used the UV detector operating at a 408 nm wavelength. In previous papers, the authors did not mention the retention time and the method validation.

The HPLC method developed and validated in this work is an alternative to the other methodologies and the requirement for detailed data in the literature for analysis of AmB in nanoparticles. The short retention time of AmB, provides a large number of analyses in a brief period of time, promoting reduced costs.

The method fulfill most of the requirements and can be considered feasible and could be applied to other nanoparticles applications aside encapsulation efficiency, such as *in vitro* AmB release profile and stability studies.

## Conclusion

A simple, fast and reliable reversed-phase HPLC method using PDA detection for determining the encapsulation efficiency of AmB in PLA-PEG nanoparticles has been developed and validated according to the ICH guidelines. This method fulfilled the requirements to be considered a reliable and feasible method, such as the parameters of linearity, specificity, accuracy, precision, robustness, LOD and LOQ. This method has demonstrated to be suitable for the determination of AmB entrapment efficiency in polymeric nanoparticles.

## Acknowledgments

The authors thank to CNPq (process 577183/2008-7) for financial support and CAPES for scholarship.

## References

1. Laniado-Laborín, R.; Cabrales-Vargas, M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.*, **2009**, 26, 223-227.
2. Wu, T.C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. *Clin. Infect. Dis.*, **1994**, 19, 54-58.
3. Neves, J.; Sarmiento, B.; Amiji, M.M.; Bahia, M.F. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor dapivirine from polymeric nanoparticles. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 52, 167-172.
4. Zhang, X.; Zhu, X.; Ke, F.; Ye, L.; Chen, E.; Zhang, A.; Feng, Z. Preparation and self-assembly of amphiphilic triblock copolymers with polyrotaxane as a middle block and their application as carrier for the controlled release of Amphotericin B. *Polymer*, **2009**, 50, 4343-4351.
5. Adams, M.; Kwon, G. Spectroscopic investigation of the aggregation state of Amphotericin B during loading, freeze-drying and reconstitution of polymeric micelles. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2004**, 7, 1-6.

6. Vyas, S.; Gupta, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int. J. Nanomedicine*, **2006**, 1, 417-432.
7. Tiyaboonchai, W.; Limpeanchob, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **2007**, 392, 142-149.
8. Nahar, M.; Mishra, D.; Dubey, V.; Jain, N.K. Development, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomedicine.*, **2008**, 4, 252-261.
9. Espuelas, M.S.; Legrand, P.; Irache, J.M.; Gamazo, C., Orecchioni, A.M.; Devissaguet, J.; Ygartua, P. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanospheres as an alternative way to reduce Amphotericin B toxicity. *Int. J. Pharm.*, **1997**, 158, 19-27.
10. Szoka, F.C.; Tang, M. Amphotericin B formulated in liposomes and lipid based systems: a review. *J. Liposome Res.*, **1993**, 3, 363-375.
11. Bolard, J.; Joly, V.; Yeni, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. *J. Liposome Res.*, **1993**, 3, 409-427.
12. Reis, C.P.; Neufeld, R.J.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine.*, **2006**, 2, 8-21.
13. Vandermeulen, G.; Rouxhet, L.; Arien, A.; Brewster, M.E.; Pr at, V. Encapsulation of Amphotericin B in poly(ethyleneglycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-trimetylenecarbonate) polymeric micelles. *Int. J. Pharm.*, **2006**, 309, 234-240.
14. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf., B*, **2010**, 75, 1-18.
15. Italia, J.L.; Singh, D.; Kumar, M.N.V.R. High-performance liquid chromatographic analysis of Amphotericin B in rat plasma using  $\alpha$ -naphthol as an internal standard. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 634, 110-114.
16. Espada, R.; Valdespina, S.; Molero, G.; Dea, M.A.; Ballesteros, M.P., Torrado, J.J. Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **2008**, 32, 55-61.
17. Monteil, C.G.; Kergueris, M.; Iooss, P.; Thomas, L.; Larousse, C. Quantitation of amphotericin B in plasma by second-derivative spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, 17, 481-485.
18. Wasan, E.K.; Bartlett, K.; Gershkovich, P.; Sivak, O.; Banno, B.; Wong, Z.; Gagnon, J.; Gates, B.; Leon, C.G.; Wasan, K.M. 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*. *Int. J. Pharm.*, **2009**, 372, 76-84.



19. Eldem, T.; Arican-Cellat, N. Determination of amphotericin B in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2001**, 25, 53-64.
20. Deshpande, N.M.; Gangrade, M.G.; Kekare, M.B.; Vaidya, V.V. Determination of free and liposomal Amphotericin B in human plasma by liquid chromatography-mass spectroscopy with solid phase extraction and protein precipitation techniques. *J. Chromatogr. B*, **2010**, 878, 315-326.
21. Eldem, T.; Arican-Cellat, N.; Agabeyoglu, I.; Akova, M.; Kansu, M. Pharmacokinetics of liposomal Amphotericin B in neutropenic cancer patients. *Int. J. Pharm.*, **2001**, 213, 153-161.
22. Fukui, H.; Koike, T.; Nakagawa, T.; Saheki, A.; Sonoke, S.; Tomii, Y.; Seki, J. Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS®), with commercial lipid-based formulations. *Int. J. Pharm.*, **2003**, 267, 101-112.
23. Fukui, H.; Koike, T.; Saheki, A.; Sonoke, S.; Tomii, Y.; Seki, J. Evaluation of the efficacy and toxicity of Amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS®). *Int. J. Pharm.*, **2003**, 263, 51-60.
24. Filippin, F.B.; Souza, L.C. Amphotericin B associated trygliceride-rich nanoemulsion: stability studies and *in vitro* antifungal activity. *Quim. Nova*, **2008**, 31, 591-594.
25. Jung, S.H.; Lim, D.H.; Jung, S.H.; Lee, J.E.; Jeong, K.; Seong, H.; Shin, B.C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2009**, 37, 313-320.
26. Choi, K.; Bang, J.; Kim, P.; Kim, C.; Song, C. Amphotericin B-incorporated polymeric micelles composed of poly(d,l-lactide-co-glycolide)/dextran graft copolymer. *Int. J. Pharm.*, **2008**, 355, 224-230.
27. Jain, J.P.; Kumar, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)<sub>3</sub>-PLA co-polymers: Factor affecting size and *in vitro* evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2010**, 40, 456-465.
28. ICH Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
29. Shao, K.; Huang, R.; Li, J.; Han, L.; Ye, L.; Lou, J.; Jiang, C. Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain. *J. Control. Release*, **2010**, 147, 118-126.

## 3.2 Artigo 2

**AMPHOTERICIN B-LOADED PLA-PEG BLEND NANOPARTICLES:  
CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EFFICACY AND TOXICITY**

Caroline Danziato<sup>a</sup>, Diani Meza Casa<sup>a</sup>, Luciana Facco Dalmolin<sup>a</sup>, Luciana Erzinger dos Santos<sup>a</sup>, Najeh Maissar Khalil<sup>a</sup>, Rubiana Mara Mainardes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacy, Universidade Estadual do Centro-Oeste/UNICENTRO, Rua Simeão Camargo Varela de Sá 03, 85040-080 Guarapuava, PR - Brazil

\* [rubianamainardes@pq.cnpq.br](mailto:rubianamainardes@pq.cnpq.br)

Tel: +55 (42) 36298160

Fax: +55 (42) 36298102

## AMPHOTERICIN B-LOADED PLA-PEG BLEND NANOPARTICLES: CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EFFICACY AND TOXICITY

### Abstract

Amphotericin B (AmB) is the drug of choice for the treatment of systemic mycosis, despite its toxicity. Many formulations based in nanotechnology (liposomes and nanoemulsions) are being evaluated for AmB loading, some of them even already marketed, with the aim to decrease the toxic effects, but due to strong interaction of the drug with the lipid present in formulation, they fail in efficacy. The aim of this work was to develop poly(D,L-lactide)-polyethyleneglycol (PLA-PEG) blend nanoparticles with variable molecular weight of PEG (2, 10 or 20 kDa) to encapsulate AmB and evaluate its *in vitro* efficacy over strains of *Candida* sp. and *in vitro* toxicity over human erythrocytes. The nanoparticles were prepared by the emulsification/solvent evaporation technique and the size, size distribution, polydispersity index and entrapment efficiency were assessed. The mean particle size was 241 nm and encapsulation efficiency superior to 68.9% was demonstrated. The *in vitro* release experiment has demonstrated a burst effect in the first 24 h, followed by a sustained release of approximately 29.5% of AmB over 26 days of observation. Nanoparticles were able to protect erythrocytes from the lysis caused by AmB in the first 12 hours of observation, and did not modify therapeutic efficacy, considering sustained release profile. The formulations in study promoted decrease of AmB toxicity, *in vitro* efficacy and sustained release.

Keywords: Amphotericin B, nanoparticles, particle size, *in vitro* antifungal, hemolysis.

## 1. Introduction

Amphotericin B (AmB) is a broad spectrum antifungal, widely used for the treatment of systemic mycosis [1]. This disease is responsible for 30% of deaths of immunodeficient individuals, condition caused by diseases such as AIDS, cancer, diabetes and by immunosuppressive protocol for transplants [2]. More than 50 years after its isolation, AmB associated with deoxycholate, commercialized as Fungizone®, is still the drug of choice for the treatment of systemic fungal infections. Despite presenting great efficacy, its acute side effects (e.g. fever, nausea, hemolytic toxicity) and long term toxicity limits its use (mainly nephrotoxicity) [1]. Due to its amphoteric nature, in the presence of water and depending on its concentration, it can be formed monomers, dimers, oligomers and insoluble aggregates of the drug [3,4]. It would be ideal the drug to present itself only as monomers, because this form is only toxic to fungi while aggregates forms can act in fungi ergosterol and cholesterol of human cells [5].

To decrease the AmB toxicity, lipid based formulations were tested, and some commercialized with high cost as Ambisome (AmB liposomes), Abelcet (AmB lipid complex) and Amphocil (AmB colloidal dispersion). Although these formulations presented considerable decrease in AmB toxicity, they also reduced therapeutic efficacy [6-9], due to the strong interaction between the drug and their lipid composition [10,11]. These situations lead to a dose increase, what may cause the same side effects they should avoid. An ideal formulation should maintain AmB efficacy at the same time it decreases drug toxicity [12].

One of the goals of pharmaceutical nanotechnology is to provide an improvement to already established drugs. Formulations with different components are being tested, such as lipid and polymer based nanostructures [12-15]. Polymeric nanoparticles have proved to increase therapeutic benefits, decrease toxic effects and deliver the drug to the specific site of action [16].

For pharmaceutical purposes, only biodegradable and biocompatible polymers, approved by Food and Drug Administration (FDA) must be used. One of them is poly(D,L-lactide) (PLA), a hydrophobic polymer, that is degraded *in vivo* in lactide acid monomers and, in this form, becomes an intermediate in carbohydrate metabolism [17]. PLA can be copolymerized with polyethyleneglicol (PEG), a hydrosoluble polymer [18] to achieve better pharmacokinetic parameters. Particles containing PEG at its surface are able to persist longer in the bloodstream, due to its capability to make the nanoparticles invisible to the mononuclear phagocyte system [19]. Slow release performed by PLA-PEG nanoparticles can be able to avoid aggregation of AmB, allowing only monomeric forms to be delivered from

nanoparticles [13]. Furthermore, a system of copolymers PLA-PEG can be considered appropriate to deliver AmB, because of its amphiphilic character.

Based on these arguments, the objective of this work was to develop PLA-PEG blend nanoparticles containing AmB, with the aim to reduce the drug toxicity without reducing the therapeutic efficacy of the drug to parenteral administration. PEG with different molecular weight were tested, 2, 10 and 20 kDa, to define which one presented better benefits to the formulations.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

AmB, PLA (*M<sub>w</sub>* 85-160 kDa), PEG (2, 10 and 20 kDa) and polyvinyl alcohol (PVA, 31 kDa, 88% hydrolyzed) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Chloroform and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Biotec® (Brazil) and dichloromethane, from FMaia® (Brazil). HPLC-grade solvents as methanol, acetonitrile and acetic acid were purchased from JTBaker® (USA). Water was purified using a Milli-Q Plus system (Millipore®).

### 2.2. Preparation of PLA-PEG nanoparticles containing AmB

PLA-PEG nanoparticles containing AmB were prepared by an oil-in-water (O/W) emulsification/solvent evaporation technique. Initially, amounts of PLA and PEG (2, 10 or 20 kDa), at PLA:PEG ratio of 5:1, were dissolved in dichloromethane. It was added in this phase an organic solution (DMSO and chloroform) containing AmB. This phase was emulsified into a PVA aqueous solution (1%, m/v), and sonicated for about 5 min to produce an O/W emulsion. The emulsion was submitted to evaporation under vacuum with continuous stirring at 37°C. The nanoparticles were isolated from the non-encapsulated drug by ultracentrifugation (19,975 g, 30 min, 4°C, Cientec CT-15000R centrifuge, Brazil) and washed twice with ultrapure water. The precipitate was resuspended in sucrose 5% and freeze-dried. The resultant supernatants were collected to perform posterior analysis. All the details presented here are under patent request in Brazil and must be protected according to the Brazilian regulatory agency.

### 2.3. Determination of particle size and size distribution

Nanoparticles size was analyzed by collecting 20  $\mu\text{L}$  of nanoparticles resuspended in 5% sucrose, added to 4 mL ultrapure water and measured by dynamic light scattering (BIC 90 plus, Brookhaven Instruments Corp.). The measurements were carried out at a scattering angle of  $90^\circ$ , at  $25^\circ\text{C}$ , and it was performed 10 analysis of 2 minutes each. It was obtained the mean size, size distribution and polydispersity.

#### 2.4. Drug entrapment efficiency

To determine the encapsulation efficiency, it was performed an indirect analysis. The supernatant obtained by ultracentrifugation process was diluted in methanol, and these samples were analyzed by the HPLC method previously validated. The mobile phase consisted of a 9% acetic acid and acetonitrile mixture (40:60), in an isocratic elution with a flow rate of 1 mL/min. The sample injection volume was 20  $\mu\text{L}$ , as well as the photodiode array (PDA) detector was set at the wavelength of 408 nm. The analysis was carried out at a temperature of  $25^\circ\text{C}$  and the method run time was 6 min. The analyses were performed in triplicate. It was determined the entrapment efficiency (EE) according to the following equation:

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{theoretical amount} - \text{analytical amount}}{\text{theoretical amount}} \times 100.$$

#### 2.5. UV-visible spectral assay

The aggregation state of the AmB was verified by using an UV-vis spectrophotometer (Jasco, USA). Lyophilized nanoparticles containing AmB were immediately dispersed in sodium phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 M) in a cuvette and submitted to scan at 420-300 nm. AmB diluted in DMSO:methanol (50:50, v/v) and AmB diluted in DMSO:sodium phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 M) (50:50, v/v) were used as controls.

#### 2.6. *In vitro* drug release assay

The *in vitro* drug release assay was performed suspending a certain amount of lyophilized powder of nanoparticles containing 1 mg of AmB to 12 mL of sodium phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 M) containing PVA 1% (v/v) in tubes. The tubes were incubated at  $37^\circ\text{C}$  at 150 rpm in a shaking incubator (Quimis®, Brazil). At predetermined time intervals the tubes were submitted to ultracentrifugation (19,975 g) for 15 min. Resultant supernatants were submitted to HPLC analysis, to quantitate the amount of AmB released from the nanoparticles. Precipitates were resuspended and incubated again. This process was repeated every determined time. During the whole experiment, sink conditions were maintained.

Cumulative concentration of AmB released was calculated as mean ( $\pm$ SD) and plotted versus time (h) (n=3).

### 2.7. Hemolytic activity assay

In order to determine the erythrocyte lysis induced by AmB and compare to the one induced by nanoparticles containing AmB, hemolytic activity assay was performed. Human venous blood obtained from healthy volunteers was collected in tubes containing heparin. Whole blood (10 mL) was centrifuged for 5 min at 1200 g and the supernatant and buffy coat were pipetted off and discarded. Red blood cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, and suspended in PBS at a 1% hematocrit. The erythrocytes were incubated with free or nanoencapsulated AmB (25 and 50  $\mu$ g/mL of AmB). DMSO and empty nanoparticles were also tested as control. Free AmB concentrations were diluted from a 1 mg/mL previously prepared in DMSO stock solution. The reaction was incubated for 12h in a shaking incubator. Every 2h, the tubes were centrifuged at 1200 g for 5 min, and the concentration of hemoglobin which was released from the lysed cells in the supernatant was determined by measuring its absorbance at 540 nm by using a microplate reader (SpectraMax®, USA). The percentage of hemolysis was calculated by using the following equation:

$$\% \text{ Hemolysis} = \text{Abs}_N \times 100 / \text{Abs}_F$$

where  $\text{Abs}_N$  is absorbance of the sample treated by nanoparticles containing AmB, and  $\text{Abs}_F$  is the sample treated by free AmB, which was considered 100% of hemolysis.

### 2.8. *In vitro* antifungal activity

Strains of *Candida albicans* (ATCC (American Type Culture Collection) 14053 and ATCC 64548) and *Candida krusei* (ATCC 6258) were used to verify antifungal activity of AmB-entrapped nanoparticles. The test was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [20] with few changes. Inoculums of *Candida* sp. were prepared in RPMI 1640 medium, to reach a final concentration of  $1 \times 10^3$  to  $5 \times 10^3$  CFU/mL. That value was confirmed by a spectrophotometer at 530 nm. The test was performed by using 96-well microplates. On each well it was placed 140  $\mu$ L RPMI, 50  $\mu$ L inoculum and 10  $\mu$ L of the drug. Deoxycholate and entrapped AmB were diluted in saline to give final concentrations of 0.025, 0.05, 0.5 and 5  $\mu$ g/mL. The plates were incubated at 37°C for 24h



and 48h. The minimum inhibitory concentration (MIC) was considered the lowest drug amount that allowed a clearly visualization of growth inhibition of the fungi. Strains of *C. albicans* and *C. krusei* without the addition of any antifungal, were used as positive control, whereas wells containing only RPMI medium were used as negative control. Empty nanoparticles were also tested. In order to guarantee reliability to the test, it was performed the plating of the concentrations that did not present any growth.

## 2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using a one-way Analysis of Variance (ANOVA), with 5% significance ( $p < 0.05$ ) and to compare each formulation, it was used Tukey post-test, both by OriginPro 8.6 (Northampton, MA, USA).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Nanoparticles characteristics

Size distribution, polydispersity index (PI), and entrapment efficiency are shown at Table 1. The results have presented a bimodal size profile, but an acceptable PI. An increased sonication time could provide a smaller particle and a monomodal distribution, but complications from a premature solvent evaporation have been observed. Data from literature have demonstrated different kinds of nanoparticles containing AmB with higher diameter, such as chitosan-dextran sulfate nanoparticles (600-800 nm) [21], chitosan nanoparticles (506 nm) [22], poly( $\epsilon$ -caprolactone) formulation (282 and 358 nm) [13], sodium alginate nanospheres (419.6 nm) [23]. An AmB-entrapped PLA-PEG nanoformulation (polymersomes) found in literature, presented similar results to our study (199 nm) [14]. Data of PLA-PEG nanoparticles loaded with rodhamine, have shown particle size of 300-400 nm [24]. The results have demonstrated that the three different formulations presented in this work achieved smaller or similar sizes when compared to data already reported. Based on previous studies of PLA nanoparticles without the presence of PEG [25,26], it can be noticed that the presence of PEG did not affect the particle size. In our study, it was also not observed influence of varying PEG molecular weigh in particle size or encapsulation efficiency, since in these two parameters the three PEG-nanoformulations are not considered statistically different ( $p < 0.05$ ). Other data found in literature has showed that entrapment efficiency of AmB in PLA-PEG polymersomes [14] was inferior to the values achieved in our study. High entrapment efficiency guarantees an appropriate use of the formulation and shows that the method of obtaining is efficient and appropriated.

Table 1. Characterization of PLA-PEG nanoparticles: size, size distribution, PI and EE

Nanoparticles formulations containing AmB	Size distribution	Mean size (nm)*	PI*	EE %*
PLA-PEG 2	14% (98.6-27.3 nm) e 86% (292.9-467.3 nm)	267.3 ± 43	0.154 ± 0.02	75.2 ± 4.8
PLA-PEG 10	53.6 % (142.6-332.3 nm) e 56.4% (347-467.6 nm)	223 ± 25	0.136 ± 0.05	68.9 ± 4.5
PLA-PEG 20	24.5% (128.8-269.5 nm) e 74.5% (280-354 nm)	233 ± 15	0.100 ± 0.01	73.8 ± 4.5

\* Values presented by mean ± standard deviation (n = 3). All values are not considered statistically different (p>0.05)

### 3.2. Aggregation state

This assay was evaluated to verify if the nanoencapsulation process could affect the aggregation state of the AmB when in aqueous solution. Aggregation state analysis has been used to compare toxicity of the AmB formulations. Through spectrophotometric analysis it is possible to visualize if the drug is aggregated or in monomeric form. Data from literature have demonstrated that aggregated state of AmB is related to renal failure of treated patients. Spectrophotometric scan in the range of 300-429 nm, can be used to detect self-aggregation of the drug. When aggregated, AmB presents one broad peak at 328 nm, followed by three small ones, at 365, 384 and 408 nm. On the other hand, spectrum of monomeric forms of AmB is demonstrated at four bands, at 344 (lowest intensity), 365, 385 and 410 nm (highest intensity), with increasing and well-separated peaks [21]. The spectrums of free and entrapped AmB are represented in Figure 1. Free AmB diluted in DMSO:methanol (50:50, v/v) revealed the presence of monomers in a greater proportion (spectra D). Free AmB diluted in DMSO:sodium phosphate buffer (pH 7.4, 0.1M) (50:50, v/v) have presented aggregated forms of the drug (spectra E). The spectrophotometric profile of AmB-loaded PLA-PEG (2 kDa), PLA-PEG (10 kDa) and PLA-PEG (20 kDa) are presented at spectra A, B and C, respectively. AmB-entrapped nanoparticles have presented similar spectrum when compared to free AmB in buffer, as reported previously about chitosan nanoparticles containing AmB [21]. Only the formulation of PLA-PEG with molecular weight of 2 kDa have demonstrated a slightly difference at the band of 328 nm, producing a smaller peak, and slight increase in 365, 385 and 410 nm (spectra A), compared to the spectra of aggregated AmB (spectra E), indicating that although aggregated species are predominant can be found also some non-aggregated species. Even though there is an evidence of self-aggregation, hemolysis test results, presented ahead, have demonstrated a protective character of the PLA-PEG formulations, probably related to the slow release promoted by the nanoparticles.

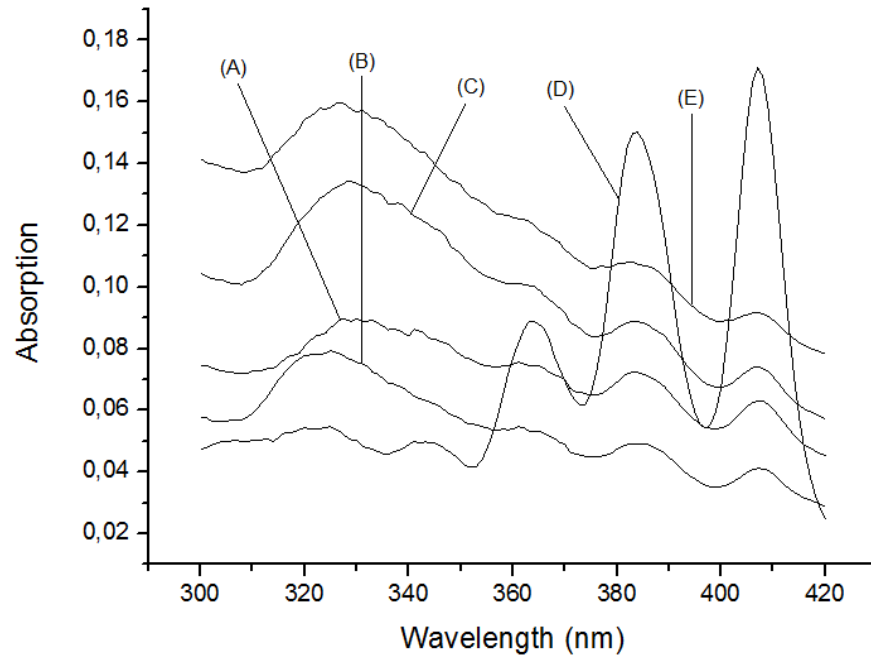


Figure 1. Representative spectrums of aggregation state of AmB in PLA-PEG 2 kDa nanoparticles (A); PLA-PEG 10 kDa nanoparticles (B); PLA-PEG 20 kDa nanoparticles (C); Free AmB diluted in DMSO:methanol (monomeric form) (D); Free AmB diluted in DMSO:buffer (aggregated form) (E).

### 3.3. *In vitro* release profile

The figure 2 represents the *in vitro* release profile of AmB from the three PLA-PEG nanoparticles. Figure 2A represents the first 24h of observation, and figure 2B represents the whole experiment, i.e. the observation over 26 days. It can be observed a burst release followed by a prolonged drug release. In 24h occurred a pronounced burst effect of approximately 20% of AmB released from each formulation (Fig. 2A). Subsequently, the release rate was decreasing gradually, what indicates a biexponential release profile, common in PLA-PEG formulations [27,28]. After 624h (26 days) of observation, 26.5, 32.6 and 32.6% of drug release was achieved from PLA-PEG 2, 10 and 20 kDa, respectively, as presented in Fig. 2B. The release profile indicates that certain amount of AmB was adsorbed in the surface of the nanoparticles and it was released by diffusional transport, what explains the burst effect, followed by a sustained deliver due to the slow diffusion process of AmB from the particle core and erosion produced as the particle degraded. Data described about PLA-PEG nanoparticles, have shown less than 20% of release within 15h of incubation [24]. Similar result was founded through our study. There were no statistical differences among the formulations with variable molecular weight of PEG by application of ANOVA ( $p < 0.05$ ). This result has demonstrated that any of the PEGs with variable molecular weight in study achieve the aim, to promote a sustained release of the drug.

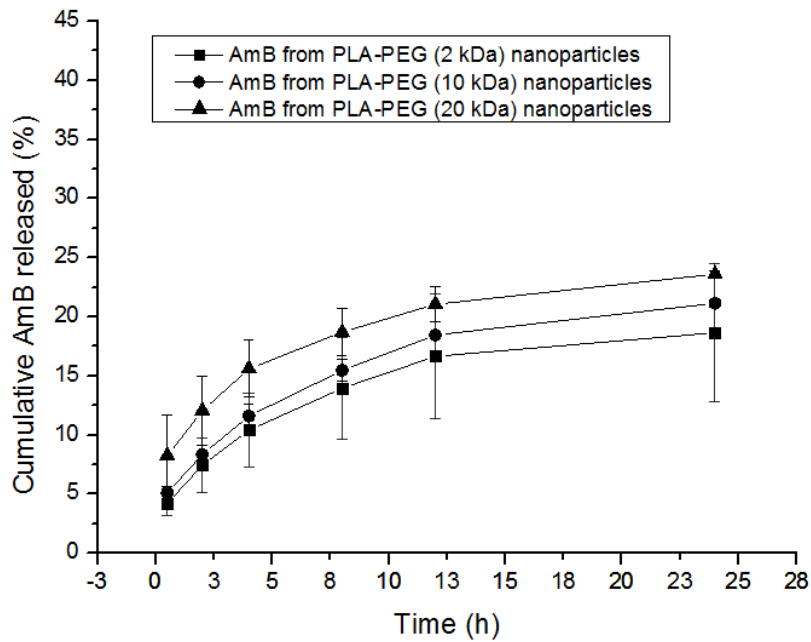


Figure 2A. *In vitro* release profile of AmB released from the PLA-PEG nanoparticles with molecular weight of PEG of 2, 10 and 20 kDa, in 24h.

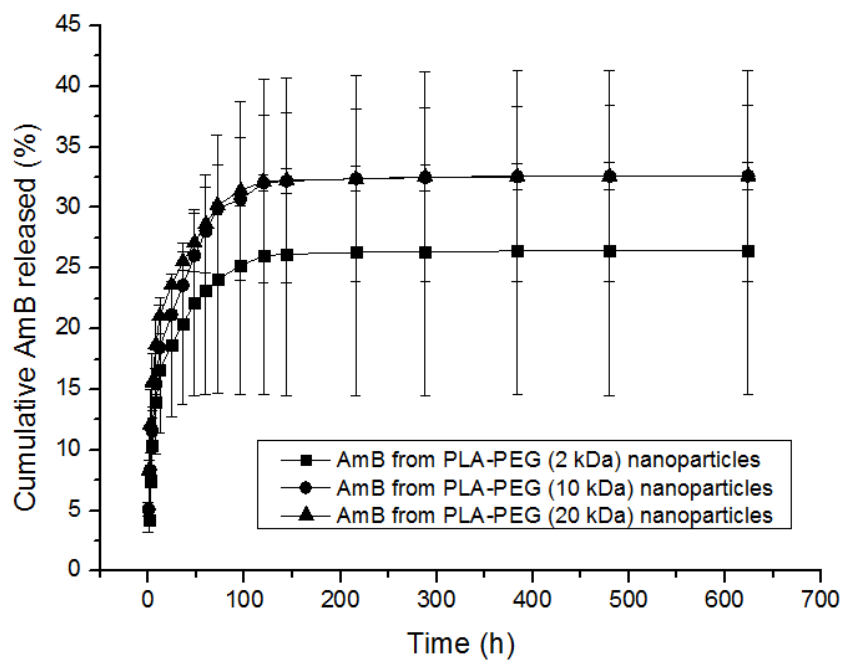


Figure 2B. Comparative *in vitro* release profile of AmB released from the PLA-PEG nanoparticles with molecular weight of PEG of 2, 10 and 20 kDa, in 624h.

### 3.4. Hemolysis test

Hemolytic activity of AmB is one of the side effects that limits its application in therapeutics of fungal infections, and also the hemolysis test is an important tool to verify the

cytotoxicity of drugs and formulations [29,30]. In this work, the hemolytic activity was assessed in function of time and AmB concentration. It was observed that free AmB (25 or 50  $\mu\text{g/mL}$ ) caused hemolysis with 30 min of incubation, 18.9 and 29%, respectively, while the AmB from nanoparticles not. Also, the polymeric formulations containing AmB, produced an insignificant percentual of hemolysis until 12h of incubation in both AmB concentrations, as shown at Figure 3A and 3B. Empty nanoparticles and DMSO control did not produce any toxicity over the erythrocytes (data not shown in figure). That result has demonstrated that the PLA-PEG nanoparticles are able to reduce AmB cytotoxicity. The low level of hemolytic activity of the polymeric nanoformulations, probably is related to the extended release of AmB from the nanoparticles. The slow delivery of the drug decreases its accumulation and reduces its toxicity [13]. There was no statistical difference among the three PLA-PEG nanoparticles at the concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$  of AmB. At a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$ , formulations containing PLA-PEG 10 and PLA-PEG 20 were considered significantly different ( $p < 0.05$ ). Nanoparticles composed by 20 kDa PEG, produced more hemolysis than the other formulations.

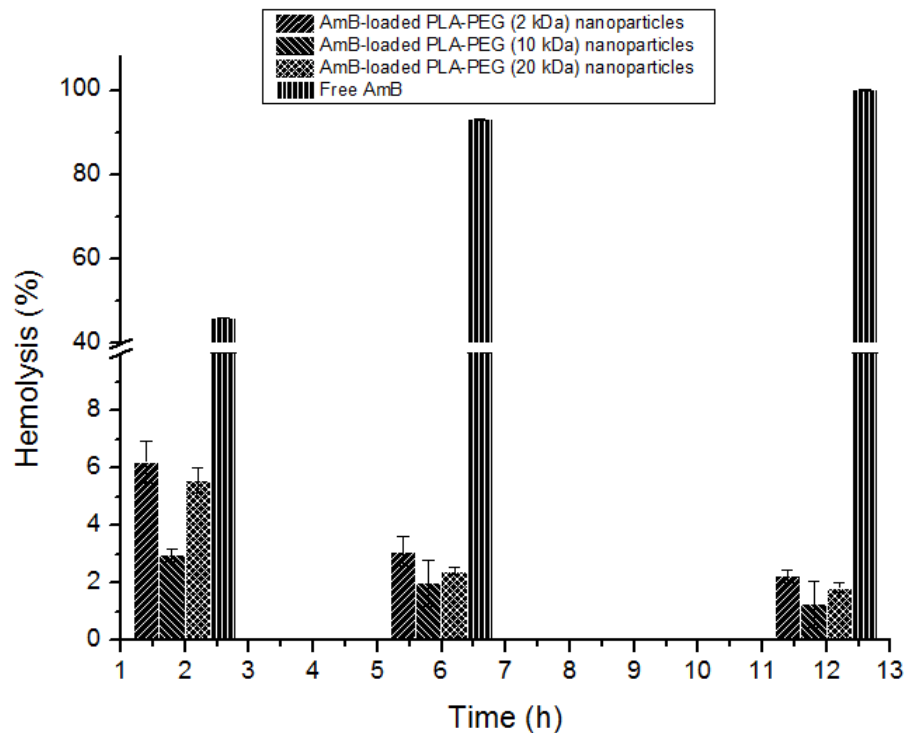


Figure 3A. Percentage of Hemolysis produced by 25  $\mu\text{g/mL}$  AmB-entrapped in PLA-PEG nanoparticles with molecular weight of PEG of 2, 10 and 20 kDa, over 12 h of incubation. Free AmB (25  $\mu\text{g/mL}$ ) was used as control.

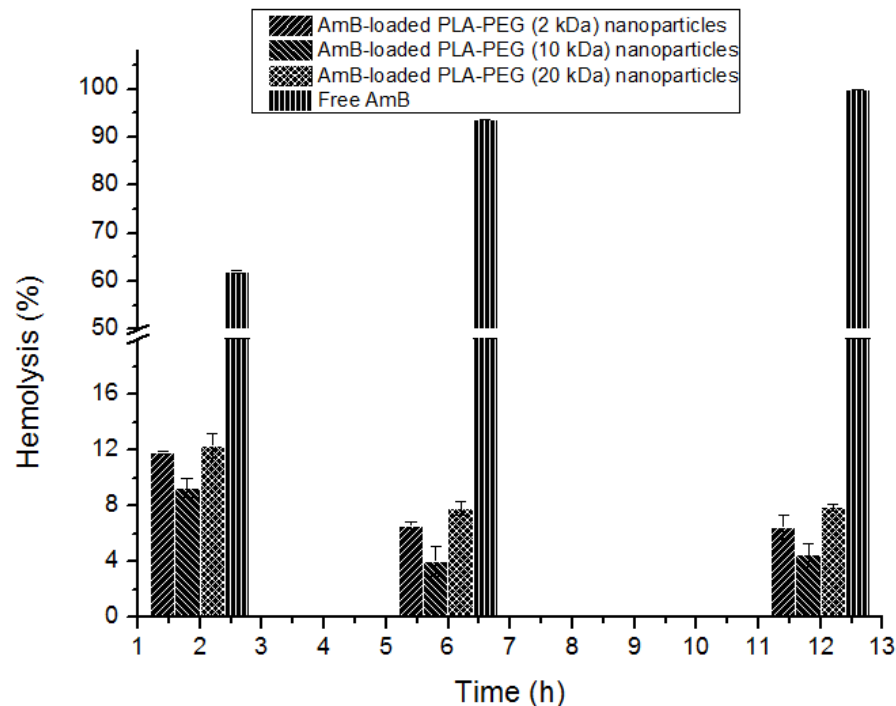


Figure 3B. Percentage of Hemolysis produced by 50  $\mu\text{g/mL}$  AmB-entrapped in PLA-PEG nanoparticles with molecular weight of PEG of 2, 10 and 20 kDa, over 12 h of incubation. Free AmB (50  $\mu\text{g/mL}$ ) was used as control.

### 3.5. *In vitro* antifungal activity

Two strains of *C. albicans* (ATCC 14053 and ATCC 64548) and one strain of *C. krusei* (ATCC 6258) were used to assess the antifungal activity of the three PLA-PEG nanoparticles containing AmB. The MIC was determined by the lowest concentration that did not present turbidity, indicating inhibition of growth. The obtained results (Table 2), posteriorly confirmed by plating after 24 and 48h of incubation, have demonstrated that concentrations of 0.5 and 5  $\mu\text{g/mL}$  of entrapped AmB in nanoparticles have inhibited growth of both species of *Candida* sp. researched. For AmB deoxycholate, the MIC was 0.05  $\mu\text{g/mL}$ . For this test, each nanoparticle formulation with variable PEG, have presented the same effect. The MIC exhibited by the AmB from nanoparticles was 10-fold superior to the one obtained with AmB deoxycholate and may be due to their sustained release. Empty nanoparticles have not presented any antifungal activity for the yeast researched. Although AmB deoxycholate was more effective at a lower concentration, 0.5  $\mu\text{g/mL}$  of MIC for encapsulated AmB was an interesting result, because serum concentration of commercialized AmB is approximately 0.5  $\mu\text{g/mL}$  [31]. That information indicates possible effectiveness *in vivo*, bringing out its possible applicability. *In vivo* antifungal assay must be performed to confirm the therapeutic efficacy of the formulations.

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of AmB in different formulations against strains of *C. albicans* and *C. krusei*

AmB formulations	MIC* ( $\mu\text{g/mL}$ )
AmB deoxycholate	0.05
PLA-PEG (2) nanoparticles	0.5
PLA-PEG (10) nanoparticles	0.5
PLA-PEG (20) nanoparticles	0.5

\*for 24 and 48h for *C. albicans* (ATCC 14053 and ATCC 64548) and *C. krusei* (ATCC 6258)

## Conclusions

PLA-PEG blend nanoparticles containing AmB were prepared by a rapid and simple emulsification/solvent evaporation technique and the influence of varying PEG molecular weight was evaluated. Nanoparticles size, polydispersity index, entrapment efficiency, presented successful results. *In vitro* AmB release from nanoparticles has proved to be sustained, which is a condition to avoid toxic effects. The PEG molecular weight did not influence these parameters. In regard to AmB toxicity, aggregation state of the formulations did not achieve great outcome, although the hemolysis test revealed that all PLA-PEG nanoparticles presented protective character to AmB cytotoxicity, since the percentage of hemolysis was very low. Finally, *in vitro* antifungal activity of PLA-PEG formulations was considered to be effective. From all assays, only one of the hemolysis results presented a worst formulation, the one which contains PEG 20 kDa. In each of the other tests, there was no difference among the formulations with variable molecular weight of PEG. PLA-PEG blend nanoparticles are potential carriers for AmB.

## Acknowledgements

The authors thank to CNPq (process 577183/2008-7) for financial support and CAPES for scholarship.

## References

- [1] R. Laniado-Laborín, M.N. Cabrales-Vargas, Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* 26 (2009) 223-227.
- [2] K. Sachs-Barrable, S. D. Lee, E.K. Wasan, S.J. Thornton, K.M. Wasan, Enhancing drug absorption using lipids: A case study presenting the development and pharmacological evaluation of a novel lipid-based oral amphotericin B formulation for the treatment of systemic fungal infections. *Adv. Drug Deliver Rev.* 60 (2008) 692-701.

- [3] P. Millie, J. Langlet, J. Berges, J. Caillet, J.P. Demaret, Self-association of Amphotericin B in water. Theoretical energy and spectroscopy studies. *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 10883-10891.
- [4] J.J. Minones, O. Conde, P. Dynarowicz-Latra, M. Casas, Penetration of amphotericin B into DOPC monolayers containing sterols of cellular membranes. *Coll. Surf. A.* 270 (2005) 129-137.
- [5] W. Huang, Z. Zhang, X. Han, J. Tang, J. Wang, S. Dong, E. Wang, Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol- containing supported bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophys. J.* 83 (2002) 3245-3255.
- [6] E.W.M. Van Etten, H.R. Chander, S.V. Snijders, et al, Interactions of liposomal amphotericin B with extracellular and intracellular *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 36 (1995a) 961-974.
- [7] E.W.M. Van Etten, M. Otte-Lambillion, W. Van Vianen, et al, Biodistribution of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B desoxycholate (AmB-deoxycholate) in uninfected immunocompetent mice and leucopenic mice infected with *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35 (1995b) 509-519.
- [8] E.W.M. Van Etten, M.T. Ten Kate, L.E.T. Stearne, et al, Amphotericin B liposomes with prolonged circulation in blood: *in vitro* antifungal activity, toxicity and efficacy in systemic candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995c) 1954-1958.
- [9] E.W.M. Van Etten, W. Van Vianen, J. Hak, et al, Activity of liposomal amphotericin B with prolonged circulation in blood versus those of AmBisome and AmB-deoxycholate against intracellular *Candida albicans* in murine peritoneal macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1998) 2437-2439.
- [10] F.C. Szoka, M. Tang, Amphotericin B formulated in liposomes and lipid based systems: a review. *J. Liposome Res.* 3 (1993) 363-375.
- [11] J. Bolard, V. Joly, P. Yeni, Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. *J. Liposome Res.* 3 (1993) 409-427.
- [12] H. Fukui, T. Koike, T. Nakagawa, A. Saheki, S. Sonoke, Y. Tomii, J. Seki, Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nanosphere (LNS®), with commercial lipid-based formulations. *Int. J. Pharm.* 267 (2003) 101-112.



- [13] M.S. Espuelas, P. Legrand, M.A. Campanero, M. Appel, M. Chéron, C. Gamazos, G. Barratt, J.M. Irache, Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 419-427.
- [14] J.P. Jain, N. Kumar, Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)<sub>3</sub>-PLA co-polymers: Factor affecting size and *in vitro* evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40 (2010) 456-465.
- [15] G. Vandermeulen, L. Rouxhet, A. Arien, M.E. Brewster, V. Préat, Encapsulation of Amphotericin B in poly(ethyleneglycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-trimetylenecarbonate) polymeric micelles. *Int. J. Pharm.* 309 (2006) 234-240.
- [16] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release.* 70 (2001) 1-20.
- [17] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf., B.* 75 (2010) 1-18.
- [18] K. Shao, R. Huang, J. Li, L. Han, L. Ye, C. Jiang, Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain. *J. Control. Release.* 147 (2010) 118-126.
- [19] D.E. Owens III, N.A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 93-102.
- [20] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standards- 2 ed. NCCLS document M27-A2. Pennsylvania: NCCLS – 2002.
- [21] W. Tiyaboonchai, N. Limpeanchob, Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 392 (2007) 142-149.
- [22] N. Limpeanchob, W. Tiyaboonchai, S. Lamlertthon, J. Viyoch, S. Jaipan, Efficacy and toxicity of amphotericin B-chitosan nanoparticles in mice with induced systemic candidiasis. *Naresuan University Journal.* 14 (2006) 27-34.
- [23] S. Sangeetha, D.N. Venkatesh, R. Adhiyaman, K. Santhi, B. Suresh, Formulation of sodium alginate nanospheres containing amphotericin B for the treatment of systemic candidiasis. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 6 (2007) 653-659.
- [24] S. Essa, J.M. Rabanel, P. Hildgen, Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density. *Int. J. Pharm.* 411 (2011) 178-187.

[25] E. Leo, B. Brina, F. Forni, M.A. Vandelli, *In vitro* evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 133-141.

[26] Z. Hou, C. Zhou, Y. Luo, C. Zhan, Y. Wang, L. Xie, Q. Zhang, PLA nanoparticles loaded with an active lactone form of hydroxycamptothecin: Development, optimization, and *in vitro-in vivo* evaluation in mice bearing H22 solid tumor. *Drug Dev. Res.* 72 (2011) 337-345.

[27] M. Rafat, C.A. Cl  roux, W.G. Fong, A.N. Baker, B.C. Leonard, M.D. O'Connor, C. Tsilfidis, PEG-PLA microparticles for encapsulation and delivery of Tat-EGFP to retinal cells. *Biomaterials.* 31 (2010) 3414-3421.

[28] X. Li, X. Deng, Z. Huang, *In vitro* protein release and degradation of poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped human serum albumin: quantitative evaluation of the factors involved in protein release phases. *Pharmaceut. Res.* 18 (2001) 117-124.

[29] R. Espada, S. Valdespina, G. Molero, M.A. Dea, M.P. Ballesteros, J.J. Torrado, Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 32 (2008) 55-61.M.

[30] Adams, G. Kwon, Spectroscopic investigation of the aggregation state of Amphotericin B during loading, freeze-drying and reconstitution of polymeric micelles. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 7 (2004) 1-6.

[31] R. Feferbaum, V.L.J. Krebs, S.R.C.J. Santos, E.M.A. Diniz, A.L.S. Galvani, F.A.C. Vaz, Amphotericin B in Colloidal Dispersion (Amphocil®) serum levels in infants with systemic candidiasis. *Pediatric Research.* 43 (1998) 245-245.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um método simples, rápido e confiável por CLAE de fase reversa foi desenvolvido e validado de acordo o guia ICH, para determinação de AmB em nanopartículas. Os parâmetros analisados foram: linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação. O método apresentou confiabilidade diante dos requisitos preconizados e alta sensibilidade. Demonstrou ser adequado para a quantificação de AmB.

As formulações de nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo AmB obtidas, apresentaram perfil de liberação prolongada, reduzindo a atividade hemolítica da AmB em relação à AmB livre, sem alterar sua atividade antifúngica frente às cepas de *Candida* sp. Apesar das formulações mostrarem-se incapazes de impedir a agregação do fármaco, foi possível demonstrar a redução na toxicidade da AmB quando comparada à AmB livre, principalmente nas formulações que continham PEG com massa molecular de 2 e 10 kDa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.; KWON, G. Spectroscopic investigation of the aggregation state of Amphotericin B during loading, freeze-drying and reconstitution of polymeric micelles. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, v. 7, p. 1-6, 2004.
- ALLEMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharm.*, v. 87, p. 247-253, 1992.
- BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 409-427, 1993.
- BRITISH Pharmacopoeia*, London: Her Majesty's Stationery Office, 2012.
- DESHPANDE, N.M.; GANGRADE, M.G.; KEKARE, M.B.; VAIDYA, V.V. Determination of free and liposomal Amphotericin B in human plasma by liquid chromatography-mass spectroscopy with solid phase extraction and protein precipitation techniques. *J. Chromatogr. B*, v. 878, p. 315-326, 2010.
- ELDEM, T.; ARICAN-CELLAT, N.; AGABEYOGLU, I.; AKOVA, M.; KANSU, M. Pharmacokinetics of liposomal Amphotericin B in neutropenic cancer patients. *Int. J. Pharm.*, v. 213, p. 153-161, 2001.
- ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, M.A.; CAMPANERO, M.; APPEL, M.; CHÉRON, M.; GAMAZOS, C.; BARRATT, G.; IRACHE, J.M. Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 52, p. 419-427, 2003.
- FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorgan. Med. Chem.*, v. 17, p. 2950-2962, 2009.
- FERNANDES, M.F.M.; FILGUEIRAS, C.A.L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). *Quim. Nova*, v. 31, n. 8, p. 2205-2213, 2008.
- FERRAZ, M.L. *Influência de citocinas e células do sistema imune na atividade do inibidor da biossíntese de ergosterol (posaconazol) na infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi*. Dissertação de mestrado. Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, fev. 2005.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BEHITA.S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v. 55, p. R1-R4, 1989
- FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 42, n. 2, abr./jun. 2006.
- FUKUI, H.; KOIKE, T.; NAKAGAWA, T.; SAHEKI, A.; SONOKE, S.; TOMII, Y.; SEKI, J. Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nano-

sphere (LNS®), with commercial lipid-based formulations. *Int. J. Pharm.*, v. 267, p. 101-112, 2003.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Ed. Mac Graw Hill, Rio de Janeiro, 11ª Edição., p. 971-974, 2006.

GUO, L.S.S. Amphotericin B colloidal dispersion: an improved antifungal therapy. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 47, p. 149-163, 2001.

GUPTA, R.B.; KOMPELLA, U.B. *Nanoparticles Technology for Drug Delivery*. Taylor & Francis. New York, v. 159, 2006.

HEINEMANN, V.; KAHNY, B.; JEHN, U.; MUHLBAYER, D.; DEBUS, A.; WACHHOLZ, K.; BOSSE, D.; KOLB, H.; WILMANN, W. Serum Pharmacology of Amphotericin B Applied in Lipid Emulsions. *Antimicrob. Agents. Ch.*, v. 41, p. 728-732, 1997.

HILLERY, A.M. Supramolecular lipidic drug delivery systems: From laboratory to clinic. A review of the recently introduced commercial liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 24, p. 345-363, 1997.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J.; DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol- containing supported bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophys. J.*, v. 83, p. 3245-3255, 2002.

JAIN, J.P.; KUMAR, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)<sub>3</sub>-PLA co-polymers: Factor affecting size and in vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 40, p. 456-465, 2010.

JUNG, S.H.; LIM, D.H.; JUNG, S.H.; LEE, J.E.; JEONG, K.; SEONG, H.; SHIN, B.C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 37, p. 313-320, 2009.

KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9ª Edição, p. 709-711, 2006.

KLEPSE, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. *J. Crit. Care*, v. 26, p. 225.e1-225.e10, 2011.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf., B*, v. 75, p. 1-18, 2010.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 26, p. 223-227, 2009.

MILLIE, P.; LANGLET, J.; BERGES, J.; CAILLET, J.; DEMARET, J.P. Self-association of Amphotericin B in water. Theoretical energy and spectroscopy studies. *J. Phys. Chem. B*, v. 103, p. 10883-10891, 1999.

- MINONES, J.J.; CONDE, O.; DYNAROWICZ-LATRA, P.; CASAS, M. Penetration of amphotericin B into DOPC monolayers containing sterols of cellular membranes. *Coll. Surf. A*, v. 270, p. 129-137, 2005.
- MONTEIL, C.G.; KERGUERIS, M.; IOOSS, P.; THOMAS, L.; LAROUSSE, C. Quantitation of amphotericin B in plasma by second-derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 17, p. 481-485, 1998.
- MURRAY, P.R.; *Microbiologia médica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4ª Edição, 2004.
- NAHAR, M.; MISHRA, D.; DUBEY, V.; JAIN, N.K. Development, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 4, p. 252-261, 2008.
- NEVES, J.; SARMENTO, B.; AMIJI, M.M.; BAHIA, M.F. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor dapivirine from polymeric nanoparticles. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 52, p. 167-172, 2010.
- NIMESH, S.; MANCHANDA, R.; KUMAR, R.; SAXENA, A.; CHAUDHARY, P.; YADAV, V.; MOZUMDAR, S.; CHANDRA, R. Preparation, characterization and in vitro release studies of novel polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 323, p. 146-152, 2006.
- OWENS III, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonizations, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 307, p. 93-102, 2006.
- PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomed-Nanotechnol.*, v. 8, p. 147-166, 2012.
- POOLE, J.P.; OWENS, F.J. *Introduction to Nanotechnology*. Ed. Wiley-Interscience, New Jersey, 2003.
- RANG, H.P., DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia*. Ed. Elsevier, 5ª Edição., p. 693-694, 2007.
- RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.*, v. 36, p. 887-913, 2011.
- REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; VEIGA, A.J. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 2, p. 8-21, 2006.
- SACHS-BARRABLE, K.; LEE, S.D.; WASAN, E.K.; THORNTON, S.J.; WASAN, K.M. Enhancing drug absorption using lipids: A case study presenting the development and pharmacological evaluation of a novel lipid-based oral amphotericin B formulation for the treatment of systemic fungal infections. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 60, p. 692-701, 2008.
- SHAO, K.; HUANG, R.; LI, J.; HAN, L.; YE, L.; LOU, J.; JIANG, C. Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain. *J. Control. Release*, v. 147, p. 118-126, 2010.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

SZOKA, F.C.; TANG, M. Amphotericin B formulated in liposomes and lipid based systems: a review. *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 363-375, 1993.

TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 392, p. 142-149, 2007.

*UNITED States Pharmacopeia-national formulary*: USP35 NF30. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

VANDERMEULEN, G.; ROUXHET, L.; ARIEN, A.; BREWSTER, M.E.; PRÉAT, V. Encapsulation of Amphotericin B in poly(ethyleneglycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-trimetylenecarbonate) polymeric micelles. *Int. J. Pharm.*, v. 309, p. 234-240, 2006.

VAN ETTEN, E. W. M.; CHANDER, H. R.; SNIJDERS, S. V.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A. Interactions of liposomal amphotericin B with extracellular and intracellular *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 36, p. 961-974, 1995a.

VAN ETTEN, E. W. M.; OTTE-LAMBILLION, M.; VAN VIANEN, W.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A. Biodistribution of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B desoxycholate (AmB-deoxycholate) in uninfected immunocompetent mice and leucopenic mice infected with *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 35, p. 509-519, 1995b.

VAN ETTEN, E. W. M.; TEN KATE, M. T.; STEARNE, L. E. T.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A. Amphotericin B liposomes with prolonged circulation in blood: in vitro antifungal activity, toxicity and efficacy in systemic candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, p. 1954-8, 1995c.

VAN ETTEN, E. W. M.; VAN VIANEN, W.; HAK, J. et al. Activity of liposomal amphotericin B with prolonged circulation in blood versus those of AmBisome and AmB-deoxycholate against intracellular *Candida albicans* in murine peritoneal macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 42, p. 2437-2439, 1998.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceut. Res.*, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2008.

VENKATARAMAN, S.; HEDRICK, J.L.; ONG, Z.Y.; YANG, C.; EE, P.P.R.; HAMMOND, P.T.; YANG, Y.Y. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 63, p. 1228-1246, 2011.

VISCOLI, C; CASTAGNOLA, E. Emerging Fungal Pathogens, Drug Resistance and the Role of Lipid Formulations of Amphotericin B in the Treatment of Fungal Infections in Cancer Patients: A Review. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 3, p. 109-118, 1999.

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

WASAN, E.K.; BARLETT, K.; GERSHKOVICH, P.; SIVAK, O.; BANNO, B.; WONG, Z.; GAGNON, J.; GATES, B.; LEON, C.G.; WASAN, K.M. 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*. *Int. J. Pharm.*, v. 372, p. 76-84, 2009.

WU, T.C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. *Clin. Infect. Dis.*, v. 19, p. 54-58, 1994.

ZHANG, X.; ZHU, X.; KE, F.; YE, L.; CHEN, E.; ZHANG, A.; FENG, Z. Preparation and self-assembly of amphiphilic triblock copolymers with polyrotaxane as a middle block and their application as carrier for the controlled release of Amphotericin B. *Polymer*, v. 50, p. 4343-4351, 2009.