

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FERNANDO AUGUSTO PIRES DE SÁ

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS
MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS**

**BRASÍLIA
2015**

FERNANDO AUGUSTO PIRES DE SÁ

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS
MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Taís Gratieri

**BRASÍLIA
2015**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

S111d Sá, Fernando Augusto Pires de
Desenvolvimento e Caracterização de Lipossomas
Mucoadesivos para Liberação Ocular de Fármacos /
Fernando Augusto Pires de Sá; orientador Taís
Gratieri. -- Brasília, 2015.
76 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. Voriconazol. 2. Lipossomas. 3. Quitosana. 4.
Penetração corneana. 5. Iontoforese. I. Gratieri,
Taís, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Augusto Pires de Sá

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS MUCOADESIVOS PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 03 de dezembro de 2015.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Taís Gratieri
Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Graziella Anselmo Joanitti
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de Brasília** por prover um ambiente aberto ao desenvolvimento científico e acadêmico.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da Universidade de Brasília pela oportunidade de aperfeiçoamento e continuidade de meus estudos e em especial aos funcionários da secretaria pela paciência em me auxiliar com os trâmites burocráticos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Ao professor **Dr. Guilherme Gelfuso** que, extraoficialmente, me co-orientou ao longo deste trabalho e esteve sempre disponível para me auxiliar.

Aos **professores responsáveis** e aos **técnicos dos laboratórios** de Ensino, Controle de Qualidade e Farmacognosia da Faculdade de Ciências da Saúde, bem como os dos laboratórios de Microscopia Eletrônica, Genética Molecular e Imunologia Aplicada do Instituto de Biologia e do Núcleo de Física Aplicada, do Instituto de Física da Universidade de Brasília, por cederem seus espaços, material, experiência e pessoal para que eu pudesse desenvolver meus experimentos. Sem a parceria de vocês, boa parte do meu trabalho não seria possível.

A **todos os integrantes do FarmaTec-UFG**, em especial à professora **Dr.^a Stephania Fleury** e à professora **Dr.^a Eliana Martins Lima**, pela hospitalidade e paciência com que me recebem sempre que vou à Goiânia.

Aos **professores** da Universidade Católica de Brasília (UCB) que até hoje mantém contato e torcem por mim, em especial a professora **Eloá Medeiros**, uma amiga que sempre me apoiou, torceu e me incentivou a voltar para vida acadêmica e fazer o que gosto.

Ao frigorífico **Bonasa**, em especial ao Gerente **Roger Salton** que, sempre cordial como todos os funcionários da empresa, nos recebe na unidade e nos fornece os mais diversos insumos para os estudos de permeação, sempre que necessitamos.

À minha **família**, em especial à minha tia Maria José (**Dedé**), minha mãe (**DeJota**) e meu tio José Mauro (**Zeca**) por sempre apoiarem minhas decisões, demonstrarem interesse e, acima de tudo, por torcerem e acreditarem em mim. Os últimos meses têm sido bem duros conosco, mas os Pires sempre dão um jeito e sei que boas novas virão.

Aos **meus amigos do La Salle** especialmente **Viana, Fábio, Shimabuko** e meu afilhado **Renan**, por sempre compreenderem meus sumiços e por ainda estarem presentes na minha vida após tantos anos.

A todos do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (**LTMAC**), que cresceu enormemente ao longo do meu período de mestrado e está cheio de pessoas que considero como família. Agradeço especialmente minha “irmã” **Tamara** e meus “primos” de laboratório **Thaiene** e **Breno** que ensinaram muito do que sei hoje, do que é trabalhar em um laboratório de pesquisa acadêmica.

À minha melhor amiga e confidente, **Bernadete Panizza**, que vem acompanhando todas as grandes mudanças da minha vida, sempre com um sorriso, sempre presente nos bons e nos “não tão bons” momentos dos últimos anos e sempre disposta a me ajudar, colocando minha cabeça no lugar e puxando minha orelha quando preciso.

Aos meus grandes amigos **Pedro Bürgel** e **Raffael Araújo**, que considero quase como irmãos. Com certeza eu teria rido muito menos, aprendido muito menos e curtido muito menos sem a presença e conversas quase diárias e o apoio que me deram esses últimos anos.

Por último, meu maior obrigado vai à minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Taís Gratieri**. A pessoa que me suportou ao longo desses dois anos e meio de mestrado. Entrei no mestrado praticamente sem experiência acadêmica e acredito estar saindo dele com uma excelente bagagem que será extremamente útil para os planos que virão. Por todo apoio, compreensão, paciência e confiança, meu **muito obrigado!**

“A vontade de vencer é a primeira condição para a vitória.”
(Ferdinand Foch)

SÁ, Fernando Augusto Pires de. **Desenvolvimento e caracterização de lipossomas mucoadesivos para liberação ocular de fármacos**. Brasília, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Atualmente, o tratamento de infecções oculares fúngicas como a ceratite fúngica envolve a administração de drogas potentes pelas vias oral, intravenosa e intraocular – gerando grande desconforto ao paciente, já debilitado. A biodisponibilidade após a administração ocular tópica de fármacos é muito baixa em função de mecanismos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos, que chegam a reduzir a absorção destes compostos em até 90%. Desta maneira, a proposta deste trabalho foi a de desenvolver um sistema de liberação em escala nanométrica. O sistema é composto por lipossomas de voriconazol (VOR) em fosfatidilcolina, encapsulados por quitosana – polímero de origem natural com propriedades mucoadesivas. Lipossomas com 7,2 mM de fármaco foram encapsulados em solução de quitosana 0,5%, gerando partículas com diâmetro aproximado de 140 nm. A interação com a camada mucosa da córnea foi avaliada por ensaio de permeação em córnea suína, utilizando células de difusão do tipo Franz modificadas, tendo lipossomas de VOR sem quitosana e o fármaco em solução como controle. Após 30 minutos, $37,50 \pm 4,80$; $33,75 \pm 3,70$ e $20,41 \pm 2,94$ μg de VOR foram recuperados das córneas tratadas com lipossomas sem e com quitosana e do fármaco em solução, respectivamente. Além disso, os ensaios de liberação mostraram que a encapsulação por quitosana não impede a liberação do fármaco para o meio. A atividade antifúngica *in vitro*, avaliada frente ao crescimento de *Candida glabrata*, demonstrou que o fungo se mostrou susceptível às formulações em diluições condizentes com a literatura, entre 0,13 e 0,26 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A permeação e liberação do fármaco de forma ativa também foi testada, associando a administração das formulações preparadas com a técnica de iontoforese. Verificou-se que, apesar de reduzir a capacidade de permeação, a capacidade de retenção fármaco em córnea não apresentou diferença significativa nas condições testadas. De modo geral, o trabalho mostrou que a incorporação de VOR em lipossomas, revestidos ou não por quitosana, se mostrou promissora para o tratamento doenças oculares fúngicas. Acredita-se que a aplicação tópica destes sistemas poderia ser tornar uma alternativa para um tratamento menos agressivo e mais eficiente e confortável para o paciente.

Palavras-Chave: Voriconazol; Lipossomas; Quitosana; Penetração corneana; Iontoforese.

SÁ, Fernando Augusto Pires de. **Development and characterization of mucoadhesive liposomes for ocular drug delivery**. Brasília, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Nowadays, ocular fungal infections treatment, for diseases such as fungal keratitis, involves the administration of highly potent drugs orally, intravenously or even intraocularly – routes extremely uncomfortable for the patient, already suffering from its illness. Bioavailability of topical delivered drugs in the eye is very low due to several defense mechanisms of the eye itself, with an estimated precorneal drug loss of over 90%. Thus, this project aim was to develop a delivery system in nanometric scale, suitable for voriconazole (VOR) delivery in the cornea, as a way to topically treat fungal keratitis. This delivery system consists of VOR-loaded phosphatidylcholine liposomes encapsulated by chitosan. The liposomes with 7.2 mM of VOR were coated by a 0.5% chitosan solution, originating particles with average size of 140 nm. In order to assess the formulation's power to deliver the drug into the cornea, permeation studies with porcine cornea using Franz diffusion cells were performed. Permeation studies were performed comparing chitosan coated and uncoated VOR liposomes as well as VOR solution as a control. After 30 minutes of permeation, 37.50 ± 4.80 ; 33.75 ± 3.70 and 20.41 ± 2.94 μg of VOR were recovered from the corneas treated with the uncoated liposome, chitosan coated liposome and VOR solution, respectively. Drug release through synthetic membranes assays revealed no interference of the chitosan coating on VOR's release from the formulation to the media. Fungal activity was assessed with *Candida glabrata* strains and also demonstrated no interference on the drug's fungal activity, with minimum inhibitory concentration between 0.13 and 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – matching literature values for the drug. Permeation and drug release from formulation was also assessed using an active permeation technique, the iontophoresis. It was demonstrated that, although permeation was less pronounced with iontophoresis, drug recovery wasn't affected, in the conditions in which the tests were performed. This work demonstrated that VOR entrapment in liposomes with or without chitosan coating seems to be promising technique for topical ocular drug delivery, what could improve drug's efficiency and patient's comfort and compliance along ocular fungal infections treatment.

Key-words: Voriconazole; Liposome; Chitosan; Corneal Penetration; Iontophoresis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da anatomia ocular, ilustrando suas principais estruturas (Black & Lizars, 2013, com modificações).....5
- Figura 2.** Representação do filme lacrimal, apresentando suas três camadas (Allergan Inc, 2012, com modificações)..... 7
- Figura 3.** Estrutura química do voriconazol (VOR; MM 349,3, pKa 4,9, logP 1,8)..... 11
- Figura 4.** Representação de corte transversal em lipossoma unilamelar (LivOn Labs, 2014, com modificações)..... 13
- Figura 5.** Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e posterior extrusão. (UFG, 2012 (105))..... 22
- Figura 6.** Representação esquemática do processo de obtenção dos nanossistemas de lipossomas de VOR revestidos por quitosana. Ilustração do autor. 23
- Figura 7.** Representação do protocolo utilizado para a determinação do fármaco total nas formulações avaliadas. Ilustração do autor..... 24
- Figura 8.** Representação do protocolo utilizado para a determinação do fármaco livre em solução, nas formulações avaliadas. Ilustração do autor. 25
- Figura 9.** Esquema de dissecação da córnea e montagem das células de difusão. A) Globo ocular exposto, preso ao suporte pelas pálpebras; B) Botão córneo removido e limpo; C) Vista superior da célula de difusão apresentando a córnea ao centro do compartimento doador; D) Células de difusão montadas e alinhadas sobre placa agitadora magnética; E) Vista lateral da célula de difusão, presa ao suporte e sobre a placa de agitação. 27
- Figura 10.** Representação esquemática da placa de microdiluição de 96 poços, apresentando a designação dos locais reservados para amostras e controles. Ilustração do autor. 31
- Figura 11.** Esquema de preparo do eletrodo negativo (cátodo) de cloreto de prata (AgCl). 1: fio de prata com alça moldada na ponta; 2: imersão da alça em AgCl fundido; 3: alguns segundos após a retirada da alça de prata do AgCl, o composto se resfria e solidifica, formando o eletrodo de AgCl..... 32
- Figura 12.** Processo de redução do eletrodo de cloreto de prata (AgCl, negativo) para a obtenção do eletrodo de prata (Ag, positivo). 33
- Figura 13.** Representação gráfica da curva analítica de VOR em tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01) na faixa de concentração de 1,0 a 20,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 19016x + 2940,4$; coeficiente de determinação: $(R^2) = 0,999$ 36
- Figura 14.** Representação gráfica da curva analítica de VOR em metanol na faixa de concentração de 1,0 a 20,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 21489x + 5232,5$; coeficiente de determinação: $(R^2) = 0,999$ 36
- Figura 15.** Cromatogramas sobrepostos das soluções de VOR em tampão HEPES, nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 20,0 µg/mL. Fase móvel = água:acetonitrila, 50:50; fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e detecção a 255 nm. Tempo de retenção do fármaco ~ 4,1 min..... 36

- Figura 16.** Cromatogramas sobrepostos das soluções de VOR em metanol, nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 20,0 µg/mL. Fase móvel = água:acetonitrila, 50:50; fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e detecção a 255 nm. Tempo de retenção do fármaco ~ 4,1 min. 37
- Figura 17.** Representação gráfica da curva analítica estendida de VOR em tampão HEPES (pH $7,4 \pm 0,01$) na faixa de concentração de 0,4 a 40,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 15564x + 1278,7$; coeficiente de determinação: $(R^2) = 0,999$ 37
- Figura 18.** Representação gráfica da curva analítica estendida de VOR metanol na faixa de concentração de 0,4 a 40,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 15490x + 3555,5$; coeficiente de determinação: $(R^2) = 0,999$ 38
- Figura 19.** Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A) Lipossomas de VOR; (B) Nanossistemas – lipossomas de VOR revestidos por quitosana. Micrografias tiradas com magnitudes de 120 K e 100 K, para A e B, respectivamente. 45
- Figura 20.** Permeação do VOR através de córnea suína, nos tempos de 10 e 30 minutos (n = 5). 46
- Figura 21.** Quantidade de VOR retida em córnea e recupera após ensaio de permeação em córnea suína (n = 5). 47
- Figura 22.** Comparativo entre as massas de VOR permeadas passiva e ativamente (por iontoforese) em 30 minutos de estudo de permeação em córnea suína (n = 4). * ($p < 0,05$). ... 48
- Figura 23.** Massa de VOR recuperada da córnea, após ensaio de permeação (n = 4). 49
- Figura 24.** Ensaio *in vitro* de liberação de VOR em células de difusão, através de membrana de acetato de celulose, indicando a quantidade de fármaco liberado (em porcentagem da formulação total) ao longo de 360 min (n = 6). 50
- Figura 25.** Gráfico comparativo entre a capacidade de liberação de VOR pelas formulações LPS-VOR e LPS-VOR(CS) em célula de difusão, através de membrana sintética, sob condições passiva e ativa (iontoforética) (n = 6). 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise dos parâmetros de precisão e exatidão intra e interdia da metodologia para quantificação de VOR por CLAE utilizando tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01) como solvente.	38
Tabela 2. Análise dos parâmetros de precisão e exatidão intra e interdia da metodologia para quantificação de VOR por CLAE utilizando metanol como solvente.....	39
Tabela 3. Dados para determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção de VOR por CLAE em tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01).	40
Tabela 4. Dados para determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção de VOR por CLAE em metanol.	40
Tabela 5. Dados de produção dos lipossomas (LPS) de fosfatidilcolina contendo VOR. As amostras de LPS enumeradas de 1 a 6 correspondem às razões fármaco:lipídeo de 3,6:40; 4,3:40; 5,0:40; 5,8:40; 7,2:40; 14,3:40, respectivamente.	42
Tabela 6. Tamanho médio, índice de polidispersividade (PdI), Eficiência de encapsulação (EE) e Recuperação do fármaco (Rec) dos lipossomas revestidos com diferentes concentrações de quitosana.	43
Tabela 7. Tamanho médio, índice de polidispersividade (PdI), Eficiência de encapsulação (EE), Recuperação do fármaco (Rec) e Potencial Zeta (Zeta) dos lipossomas revestidos com 0,1; 0,5 e 0,75% de quitosana.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	agência nacional de vigilância sanitária
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CS	quitosana
CV	coeficiente de variação
E	Exatidão
EE	eficiência de encapsulação
FL	fármaco livre
FT	fármaco total
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico
HFL	hidratação do filme lipídico
IPd	índice de polidispersividade
LD	limite de detecção
LPS	lipossoma
LPS-BCO(CS)	lipossoma sem fármaco recoberto por quitosana
LPS-VOR	lipossoma de voriconazol
LPS-VOR(CS)	lipossoma de voriconazol recoberto por quitosana
LQ	limite de quantificação
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MLV	vesículas multilamelares
PC	fosfatidilcolina de soja
R ²	coeficiente de correlação linear ao quadrado
SM-PC	solução-mãe de fosfatidilcolina de soja
SOL-VOR	solução de voriconazol em água
SUV	vesículas unilamelares
UFC	unidade formadora de colônia
UV/VIS	ultravioleta visível
v/v	volume/volume
VOR	voriconazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. OS OLHOS.....	4
3.1.1. Anatomia Geral	4
3.1.2. Córnea	5
3.1.3. Filme Lacrimal	7
3.2. ADMINISTRAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS.....	8
3.3. INFECÇÕES OCULARES FÚNGICAS	9
3.4. VORICONAZOL	11
3.5. LIPOSSOMAS	13
3.6. QUITOSANA.....	14
3.7. IONTOFORESE.....	15
4. METODOLOGIA	17
4.1. REAGENTES E MATÉRIAS-PRIMAS.....	17
4.1.1. Córnea	17
4.2. MÉTODOS.....	17
4.2.1. Padronização do Método Analítico para Quantificação de VOR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	17
4.2.1.1. Determinação do Comprimento de Onda (λ) do VOR.....	18
4.2.1.2. Condições Cromatográficas para Detecção do VOR por CLAE	18
4.2.1.3. Validação do Método Analítico	18
4.2.1.3.1. <i>Curva Analítica do VOR</i>	19
4.2.1.3.2. <i>Linearidade</i>	19
4.2.1.3.3. <i>Precisão e Exatidão</i>	19
4.2.1.3.4. <i>Seletividade (Estudo dos Interferentes)</i>	20
4.2.1.3.5. <i>Limite de Quantificação (LQ)</i>	20
4.2.1.3.6. <i>Limite de Detecção (LD)</i>	20
4.2.2. Determinação da Solubilidade do VOR	21
4.2.3. Preparo dos Lipossomas Convencionais Contendo VOR (LPS-VOR)	21
4.2.4. Preparo dos Nanossistemas: Lipossomas Contendo VOR Revestidos por Quitosana (LPS-VOR(CS))	22
4.2.5. Caracterização das Formulações Contendo VOR	23
4.2.6. Determinações de Tamanho, Distribuição de Tamanho e Carga Superficial das Partículas	23
4.2.7. Determinações da Eficiência de Encapsulação e Recuperação do Fármaco	24
4.2.7.1. Determinação do Fármaco Total nas Dispersões	24
4.2.7.2. Isolamento do Fármaco Livre, do Encapsulado	25
4.2.7.3. Cálculo da Eficiência de Encapsulação.....	25
4.2.7.4. Cálculo da Recuperação do Fármaco	25
4.2.8. Análise Morfológica	26
4.2.9. Ensaio <i>ex vivo</i> de Permeação em Córnea Suína	26
4.2.10. Ensaio de Liberação em Membrana	28
4.2.11. Ensaios Preliminares <i>in vitro</i> de Atividade Antifúngica das Formulações Contendo VOR	29
4.2.11.1. Cultivo dos Fungos.....	29
4.2.11.2. Preparo da Suspensão-Padrão	29

4.2.11.3. Preparo do Inóculo	30
4.2.11.4. Preparo das Formulações.....	30
4.2.11.5. Microdiluição em Placa.....	30
4.2.11.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	31
4.2.12. Ensaios de Iontoforese.....	32
4.2.12.1. Eletrodos.....	32
4.2.12.2. Permeação e liberação com iontoforese	33
4.2.13. Análise de Dados.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DE VOR POR CLAE.....	35
5.1.1. Determinação do Comprimento de Onda (λ) do VOR	35
5.1.2. Validação da Metodologia Analítica para Determinação do VOR.....	35
5.1.2.1. Curva Analítica.....	35
5.1.2.2. Linearidade	37
5.1.2.3. Precisão & Exatidão	38
5.1.2.4. Seletividade (Estudo dos Interferentes).....	39
5.1.2.5. Limites de Quantificação (LQ) e Detecção (LD).....	39
5.1.3. Determinação da Solubilidade de VOR.....	41
5.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E NANOSSISTEMAS CONTENDO VORICONAZOL	41
5.2.1. Lipossomas de Fosfatidilcolina de Soja contendo Voriconazol.....	41
5.2.2. Lipossomas Encapsulados por Quitosana Contendo VOR	43
5.2.3. Análise Morfológica	44
5.3. ENSAIOS <i>EX VIVO</i> DE PERMEAÇÃO EM CÓRNEA SUÍNA.....	45
5.3.1. Ensaios de Permeação Passiva	45
5.3.2. Ensaios de Permeação Ativa (Iontoforese).....	48
5.4. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO EM MEMBRANA	49
5.4.1. Ensaios de Liberação Passiva.....	50
5.4.2. Ensaios de Liberação Ativa (iontoforese).....	51
5.5. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE CADA FORMULAÇÃO	51
5.6. RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	53
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

É notória a dificuldade encontrada pelos fármacos em atingir a córnea em concentração suficiente para exercer sua atividade farmacológica, quando incorporados em formulações convencionais. São diversos os mecanismos de perda precorneal de fármacos e isso se deve a um complexo sistema fisiológico de defesa dos olhos, que são uma região bastante sensível, importante e exposta do nosso corpo. Desta forma, a busca por sistemas mais eficientes para a liberação tópica de fármacos na córnea se mostra de extrema relevância e diferentes mecanismos para tal têm surgido, bem como associações entre diversos destes para possibilitar uma liberação mais controlada, ou mesmo, direcionada do fármaco. Os resultados destes sistemas “não-convencionais” têm se mostrado bastante satisfatórios, inclusive no que tange a redução de reações adversas e melhorias nos esquemas posológicos (GAUDANA et al., 2010; GRATIERI et al., 2010c, 2011; KAUR et al., 2004; SAHOO; DILNAWAZ; KRISHNAKUMAR, 2008).

A aplicação de conceitos derivados de estudos sobre nanomateriais e nanotecnologia e a utilização de técnicas para a incorporação de fármacos como o voriconazol (VOR) – droga antifúngica modelo deste projeto – em lipossomas, ou seu revestimento por biopolímeros (como a quitosana) têm sido amplamente discutidas e estudadas em função da boa biocompatibilidade e eficiência obtidas por estes dois mecanismos de formulação. Portanto, a soma de tais técnicas pode gerar sistemas de liberação ainda mais eficientes, possibilitando significativas melhoras no tratamento e, conseqüentemente, na qualidade de vida do paciente (DIEBOLD et al., 2007; GONÇALVES et al., 2012; KAUR et al., 2004; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013).

Lipossomas são tidos como sistemas biodegradáveis e relativamente não-tóxicos, de liberação de ativos farmacológicos em função de serem constituídos, basicamente, por fosfolipídeos e possuem capacidade de interação com a mucosa ocular (GAUDANA et al., 2010; KAUR et al., 2004).

Lipossomas carreando fluconazol já se mostraram eficazes em modelo animal, possibilitando uma readequação da posologia, diminuindo a frequência de utilização da solução oftálmica no tratamento da ceratite fúngica (HABIB; FOUAD; FATHALLA, 2008; HABIB et al., 2010). Isso se deve ao fato da superfície da córnea ser revestida por uma camada de mucina – uma glicoproteína carregada negativamente – que interage espontaneamente com os lipossomas, aumentando seu tempo de retenção córnea e, conseqüentemente, aumentando as chances de penetração do fármaco (GRATIERI et al., 2010b).

Partindo deste preceito, pode-se agregar a ideia de que, ao se recobrir a superfície dos lipossomas em um composto como a quitosana, um polissacarídeo catiônico e com propriedades mucoadesivas, a formulação terá uma capacidade ainda maior de interação com a mucina. Com isso, o tempo de retenção da formulação na superfície ocular após a aplicação do medicamento tenderá a ser maior, aumentando a biodisponibilidade do ativo e possibilitando uma posologia mais confortável e maior confiabilidade no tratamento (DIEBOLD et al., 2007; GRATIERI et al., 2010c, 2011). Ainda aproveitando-se das características eletroquímicas dos sistemas de liberação propostos e da superfície corneana, foi testada a aplicação da iontoforese como uma técnica capaz de complementar e melhorar a eficiência destes sistemas, bem como otimizar sua posologia.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo desenvolver e caracterizar sistemas lipossomais contendo voriconazol (VOR) visando sua aplicação tópica passiva ou iontoforética no tratamento da ceratite fúngica.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e obtenção de lipossomas contendo voriconazol com e sem revestimento por quitosana;
- Caracterização dos sistemas obtidos quanto ao tamanho, morfologia, potencial zeta e eficiência de encapsulação;
- Avaliação *in vitro* da cinética de liberação do fármaco a partir das formulações desenvolvidas;
- Avaliação *ex vivo* da capacidade de penetração do fármaco em córneas suínas a partir das formulações desenvolvidas;
- Avaliação e comparação *in vitro* da atividade antifúngica dos sistemas propostos;
- Avaliação do impacto da aplicação da iontoforese na capacidade de liberação e penetração em córnea suína do antifúngico trabalhado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. OS OLHOS

Os olhos são órgãos de enorme complexidade anatômica, bioquímica e fisiológica e são considerados dos mais importantes órgãos dos sentidos de nosso corpo. Este par de globos com diâmetro médio de 23 mm, se localiza no interior de cavidades ósseas do crânio e têm sua interação com o ambiente externo limitada e protegida pelas pálpebras, que também são responsáveis por distribuir o fluido lacrimal sobre a superfície ocular, evitando seu ressecamento em função do ambiente externo, por exemplo (CHOLKAR; DASARI, 2013; FORRESTER et al., 2016a; LUDWIG, 2005; SMERDON, 2000). Suas principais características, bem como as estruturas mais importantes para o entendimento deste trabalho serão abordadas nos tópicos que seguem.

3.1.1. Anatomia Geral

O olho (Figura 1) é constituído por três camadas básicas. A primeira, fibrosa e mais externa é composta, por sua vez, por dois tecidos conjuntivos: a córnea e a esclera que, juntas, formam o chamado envelope corneoescleral. A segunda camada, também chamada de úvea, ou trato uveal, é uma camada vascularizada composta pela íris, corpo ciliar e coróide. Entre a primeira e a segunda camadas encontra-se, na região frontal do olho, a câmara anterior, preenchida pelo humor aquoso. A retina é uma camada neural, a mais interna das três, composta por diversos tipos celulares, de acordo com a região do globo (CHOLKAR; DASARI, 2013; FORRESTER et al., 2016a; LUDWIG, 2005; SMERDON, 2000).

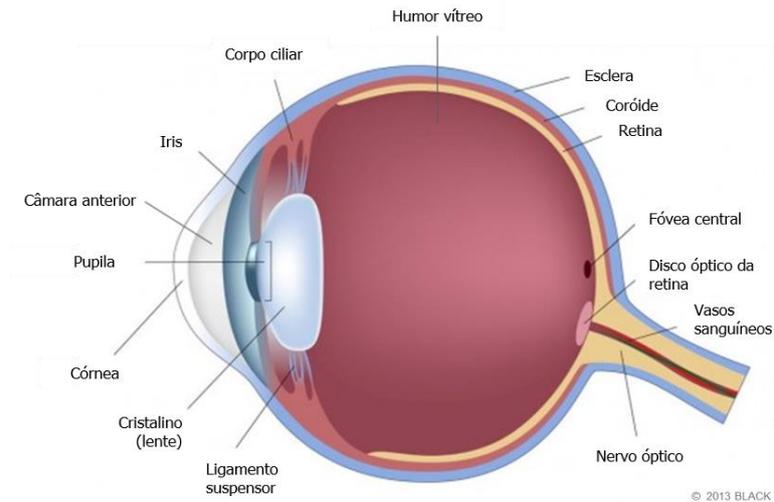


Figura 1. Esquema da anatomia ocular, ilustrando suas principais estruturas (Black & Lizars, 2013, com modificações).

3.1.2. Córnea

A córnea é um tecido elíptico, transparente e altamente enervado, sendo maior em seu eixo horizontal (~11,7 mm) que em seu eixo vertical (~10,6 mm). Apesar das dimensões, por ser convexa, aparenta ser circular quando vista de frente. Seu raio de curvatura média é de 7,8 mm em seu ponto anterior da região central, decaindo levemente ao aproximar-se da periferia. Sua espessura varia entre seus pontos central e periférico, sendo o último, mais espesso (aproximadamente 0,67mm, contra 0,58 mm na região anterior central). Ela é composta por cinco camadas distintas. Da mais interna para mais externa temos: endotélio, membrana de Descemet, estroma, membrana de Bowman e epitélio. Além destas camadas, após o epitélio há o filme lacrimal, que devido sua relevância para o trabalho será abordado em um tópico específico (CHOLKAR; DASARI; PAL, 2013; DELMONTE; KIM, 2011; FORRESTER et al., 2016a, 2016b; SMERDON, 2000).

O endotélio corneano é composto por células hexagonais em uma disposição tal que assemelham-se a um mosaico. Apesar de suas células possuírem pouca atividade mitótica, a perda de células nesta região (que mede aproximadamente 5 μm de altura e 20 μm de comprimento) é rapidamente superada à medida que as células remanescentes adjacentes são capazes de aumentar de tamanho e alterar sua forma para reocupar a região deficiente, repovoando-a. A integridade dessa camada é de extrema importância pois está relacionada com a manutenção da hidratação da córnea e consequente manutenção da transparência da mesma – uma propriedade inerente à córnea saudável e que demanda que esta esteja devidamente hidratada para ser evidenciada. Esta manutenção da hidratação é obtida por meio de bombas de

sódio/potássio, que permite ao endotélio irrigar a córnea a uma velocidade de aproximadamente $6,5 \mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{h}$ (CHOLKAR; DASARI, 2013; JÄRVINEN; JÄRVINEN; URTTI, 1995).

A membrana de Descemet é uma camada única de células que faz a interface entre o epitélio corneano e o estroma e é rica em colágeno e glicoproteínas, que estão distribuídos ao longo de suas duas partes (anterior e posterior) que, juntas somam entre 8 e $12 \mu\text{m}$ de espessura – que tende a aumentar ao longo da idade, ainda sem razão evidente (CHOLKAR; DASARI; PAL, 2013; DELMONTE; KIM, 2011).

O estroma é a maior das camadas da córnea, representando entre 80 e 85% de sua espessura total. Apesar de sua espessura, a estrutura de sua matriz extracelular, composta principalmente por proteoglicanas, bem como suas fibras estromais de colágeno são altamente organizadas, o que evita a difração de luz e aumenta a transparência e força do tecido (DELMONTE; KIM, 2011; MAURICE, 1957). Sua composição e organização tornam o estroma uma camada extremamente hidrofílica e osmoticamente ativa, com poros que permitem livre difusão de moléculas hidrofílicas o que, por consequência, reduz sua afinidade por moléculas lipofílicas, o que o torna uma espécie de barreira para essas moléculas (SCHOENWALD, 1990).

A camada de Bowman é mais uma camada de interface, desta vez, separando o estroma do epitélio da córnea. É composta por um condensado acelular fibrilar colágeno, originado da porção anterior do estroma e ajuda a manter a forma da córnea. Em função de sua composição, essa camada, que pode chegar a $15 \mu\text{m}$ de espessura não é capaz de se regenerar (DELMONTE; KIM, 2011).

A camada mais externa da córnea, é o epitélio. Esta é a primeira grande barreira, protegendo o olho do ambiente externo, fazendo a interação da córnea, com o filme lacrimal. Além de servir como barreira protetora, o epitélio tem, também, a função de absorver oxigênio e nutrientes. Ele é composto por células escamosas, estratificadas e não-queratinizadas dispostas em cinco a sete camadas de células, descritas como células colunares basais (uma camada), células intermediárias (duas a três camadas) e células superficiais (duas a três camadas). As células colunares basais se diferenciam por seu tamanho avantajado, quando comparadas as células das demais camadas (aproximadamente $20 \mu\text{m}$ de altura por $10 \mu\text{m}$ de diâmetro) e por possuírem grânulos de glicogênio e grandes quantidades de organelas em seu citoplasma. Acredita-se que o glicogênio sirva de reserva energética para suprir a alta atividade mitótica das células do epitélio basal (DELMONTE; KIM, 2011; KINOSHITA et al., 2001). As camadas de células superficiais são fundamentais na relação simbiótica que há entre a córnea e o filme lacrimal. As células dessa camada possuem extensas microvilosidades que interagem

com as células conjuntivas caliciformes responsáveis pela produção da camada de mucina do filme lacrimal. Essa interação permite que a camada hidrofílica do filme lacrimal se espalhe uniformemente ao longo de toda a superfície da córnea através do piscar dos olhos, garantindo uma superfície mais lisa, reduzindo microirregularidades que poderiam gerar difração da luz, interferindo em sua captação. Danos no glicocálice levam à alterações na interação com o filme lacrimal e possível colapso no sistema de captação de luz para posterior formação da imagem (DELMONTE; KIM, 2011).

3.1.3. Filme Lacrimal

O filme lacrimal é um componente importante na formação da primeira barreira ocular, juntamente com as células do epitélio corneano. Ele faz a interface da área exposta do olho e o ambiente externo e é formado por três camadas bastante distintas entre si (Figura 2), tanto em composição, quanto em função.

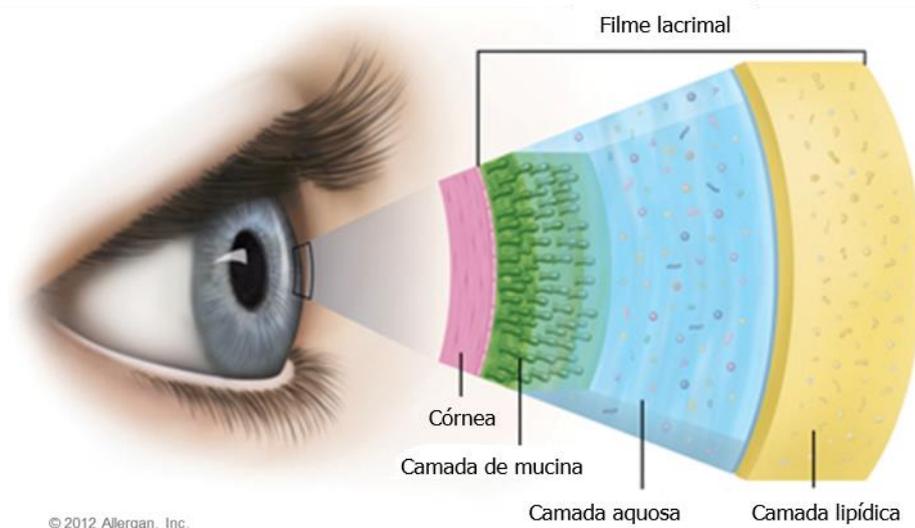


Figura 2. Representação do filme lacrimal, apresentando suas três camadas (Allergan Inc, 2012, com modificações).

A camada mais interna, é uma camada mucosa viscosa e altamente hidrofílica que atua na proteção física e na facilitação do espalhamento do filme lacrimal ao longo da superfície ocular. A glicoproteína mucina, seu principal componente, é produzida em sua maior parte por células caliciformes da conjuntiva, bem como algumas células adjacentes ao epitélio corneano. Uma larga porção do filme lacrimal é ocupada por uma camada intermediária, composta principalmente por água, eletrólitos e proteínas (inclusive imunoglobulinas e defensinas), produzida pelas glândulas lacrimais. Por fim, a camada mais externa do filme lacrimal é uma

camada lipídica, composta por ácidos graxos livres, esteroides e fosfolipídeos, originada principalmente pelas glândulas meibomiana e de Zeiss. Esta camada é importante por reduzir a taxa de evaporação do fluido lacrimal, permitindo a manutenção de sua osmolaridade (DELMONTE; KIM, 2011; FORRESTER et al., 2016a).

Sendo assim, as distintas características destas três camadas do filme lacrimal, uma altamente hidrofílica e viscosa, uma extensa camada aquosa rica em eletrólitos e uma camada externa lipofílica compõem a primeira barreira farmacotécnica a ser vencida na administração ocular de fármacos.

3.2. ADMINISTRAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS

A administração ocular de fármacos constitui um grande desafio no desenvolvimento de novos medicamentos. Soluções, suspensões, géis e pomadas são as formulações mais comumente utilizadas na administração ocular por via tópica (principal via de escolha para o tratamento da maior parte das afecções que acometem os olhos). A questão é que, exatamente por serem órgãos extremamente sensíveis e bastante expostos, os mecanismos de defesa dos olhos são diversos e bastante eficientes, também (GAUDANA et al., 2010; PATEL et al., 2013).

Já foram citadas até este ponto, algumas barreiras, como a córnea e suas diversas camadas. Juntamente à córnea, a conjuntiva, a íris e o corpo ciliar, o cristalino e bombas de efluxo são as principais barreiras classificadas como estáticas. Estas barreiras reduzem ou bloqueiam o avanço do fármaco, principalmente, por impedimento mecânico e eletroquímico. Nesta classificação encontram-se, também, as proteínas transportadoras. As proteínas transportadoras são bombas de efluxo, destinadas a expelir xenobióticos exógenos da célula e que, na ocasião da presença de um fármaco, podem ser ativadas para remover este do interior das células (GAUDANA et al., 2010; PATEL et al., 2013).

Há, também, barreiras dinâmicas. Ao contrário das barreiras estáticas, estes mecanismos fisiológicos costumam agir de maneira mais ostensiva, ainda nos primeiros momentos de contato do fármaco com o olho, impedindo o contato inicial com a córnea e, por isso, são considerados como fatores de perda pré-corneal. O principal destes fatores é o aumento da produção lacrimal. O filme lacrimal comporta cerca de 7 μ L. O aumento da produção deste reflete em quatro principais fatores: (i) a diluição do fármaco, (ii) a locupletação da capacidade de retenção do filme lacrimal, fazendo com que a secreção lacrimal transborde pelo olho, carreando consigo o fármaco, (iii) o aumento do reflexo de piscar, aumentando por

consequência a drenagem pelas vias lacrimais e (iv) a complexação do fármaco a proteínas presentes no filme lacrimal, impedindo sua ação (GAUDANA et al., 2010; PATEL et al., 2013).

A perda pré-corneal pode chegar a 90% da formulação aplicada topicamente. Por este motivo, muitos fármacos que necessitam de uma maior biodisponibilidade para exercer sua ação acabam tendo que ser utilizados por diversas vezes ao longo do dia, ou mesmo têm seu uso tópico evitando, forçando a utilização de seu uso sistêmico por via oral, ou mesmo por técnicas mais invasivas e desconfortáveis, como a administração intraocular. Esse tipo de tratamento, além de aumentar o risco de reações adversas sistêmicas, podem causar dor e desconforto, inclusive gástrico, para o caso da administração oral. Fatores esses, que acabam por reduzir a adesão do paciente ao tratamento podendo levar, inclusive, a complicações no quadro (GAUDANA et al., 2010; GRATIERI et al., 2010c; KAUR et al., 2004; PATEL et al.,; WEI et al., 2002).

3.3. INFECÇÕES OCULARES FÚNGICAS

Fungos são seres vivos amplamente encontrados na natureza, inclusive no corpo humano, porém, sem culminar em doenças. Essa relação, no entanto, pode se desequilibrar quando o sistema imune do hospedeiro apresenta falhas, ou quando o tecido onde o fungo se encontra é acometido por algum tipo de lesão. Nesses casos, os fungos tendem a agir como oportunistas, se proliferando sem controle e adentrando aos tecidos, dando origem a uma infecção fúngica. Nos olhos, a presença de fungos não é natural e a infecção raramente ocorre sem que antes haja algum tipo de lesão no olho ou disfunção do sistema imune.

As ceratites fúngicas (também chamadas de ceratomicoses) são infecções oculares fúngicas, que se desenvolvem no olho, mais especificamente, na córnea. Este tipo de infecção é grave e de mau prognóstico quando não diagnosticada e tratada no início da infecção, podendo levar à perda parcial ou total da visão, ou mesmo do globo ocular e, em casos extremos e raros, infecção generalizada e morte (KAUR; RANA; SINGH, 2008; SHUKLA; KUMAR; KESHAVA, 2008). Esta doença é encontrada por todo o globo e provocada por variados agentes etiológicos dentro do Reino Fungi, sendo *Aspergillus spp.* o responsável pelo primeiro caso relatado de ceratite fúngica, na literatura (na Alemanha, em 1879). De acordo com Shukla et al., até a década de 1950, pouco mais de 50 casos haviam sido registrados na literatura (SHUKLA; KUMAR; KESHAVA, 2008). O número de casos reportados nas últimas três décadas, porém, cresceu bastante, principalmente (mas não somente) em regiões tropicais e subtropicais. Em alguns países, como Índia (GOPINATHAN et al., 2009; LECK et al., 2002),

Gana e Arábia Saudita (HAGAN et al., 1995; KHAIRALLAH; BYRNE; TABBARA, 1992), Austrália (THEW; TODD, 2008), Tailândia (SIRIKUL et al., 2008), China (XIE et al., 2006), Brasil (IBRAHIM, 2008) e para o sul dos Estados Unidos (LIESEGANG; FORSTER, 1980), a ceratite fúngica chegou a representar mais de 30% dos casos de ceratites infecciosas reportados nas últimas décadas. Entretanto, regiões de clima temperado, apresentam menor incidência desse tipo de infecção (GALARRETA et al., 2007; TANURE et al., 2000; TUFT; TULLO, 2009).

Em regiões menos desenvolvidas e industrializadas, por exemplo, o risco maior está na população agrária, nas temporadas de colheita, em que o trabalhador passa horas exposto à micro-organismos presentes no solo e nas plantas e que podem ocasionar lesão direta e inoculação destes micro-organismos (BHARATHI et al., 2003; GODOY et al., 2004). Já em regiões mais desenvolvidas e industrializadas, o risco maior está no uso constante de lentes de contato (MARANGON et al., 2004; TODOKORO et al., 2014; WEI et al., 2014).

Dos agentes etiológicos mais comuns, destacam-se os dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Candida*, porém, outros fungos como os dos gêneros *Penicillium* e *Curvularia*, por exemplo, também são capazes de gerar esta infecção (THOMAS; KALIAMURTHY, 2013).

Os protocolos para doenças oculares, em geral, preconizam o tratamento tópico em função da comodidade para aplicação e da ação local gerar menos riscos de respostas sistêmicas adversas. Como já discutido anteriormente, há certa limitação e dificuldade em se manter um tratamento oftálmico tópico, principalmente para drogas que apresentem baixa biodisponibilidade, por exemplo – pois exigiriam um regime posológico de várias aplicações ao dia, o que reduz a adesão do paciente ao tratamento. A aplicação intravítrea ou intravenosa de antifúngico, geralmente anfotericina B é uma das técnicas mais difundidas (HARIPRASAD et al., 2008) para o tratamento de ceratites fúngicas. O transplante de córnea costuma ser indicado para os casos em que a infecção já não está mais em seu estágio inicial e pode comprometer outras regiões do globo ocular. Infelizmente, estudos realizados entre 1994 e 1999, mostraram que a taxa de recidiva na época foi de aproximadamente 50% após as cirurgias. Em muitos dos casos, o que ocorre é que o fungo já infectou regiões da borda da córnea, ou mesmo outras estruturas adjacentes, como a câmara anterior e, quando a nova córnea é implantada, a infecção volta a se proliferar na região forçando, por vezes, a remoção completa do globo ocular, para evitar a disseminação do fungo (ALVAREZ-DE-CARVALHO et al., 2001; BANITT et al., 2008; BASHIR; HUSSAIN; RIZVI, 2009; SALERA et al., 2002).

Esta problemática levanta a necessidade de se desenvolverem alternativas mais potentes e viáveis do ponto de vista do conforto e posologia. Como o desenvolvimento de novos compostos com atividade farmacológica é bastante lento e, por vezes, resulta em compostos pouco ativos em solução, ou com características que inviabilizam sua incorporação em formulações convencionais, tem sido grande o interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação otimizados, capazes de interagir com as membranas e mecanismos de defesa ocular de forma a fazer com que o fármaco atinja regiões mais internas da córnea, ou penetre mais rapidamente na mesma, evitando excessiva perda pré-corneal.

3.4. VORICONAZOL

A Figura 3 apresenta a estrutura química do voriconazol (VOR), um antifúngico da linhagem dos “novos azóis”. Ele é resultado de uma metilação do fluconazol, que também sofreu uma substituição de seu grupo triazol por um grupamento fosfopirimidínico, dando origem a um composto com espectro de atividade e potência antifúngica aumentados, fatores que limitavam o uso de triazóis de gerações anteriores como fluconazol e itraconazol (HARIPRASAD et al., 2008).

Como medicamento, o VOR foi trazido ao mercado pela Pfizer, sob a marca VFEND[®] e chegou em território nacional em 2002, após aprovação da ANVISA, sendo comercializado em forma de pó para suspensão oral, pó para solução de infusão intravenosa e comprimido.

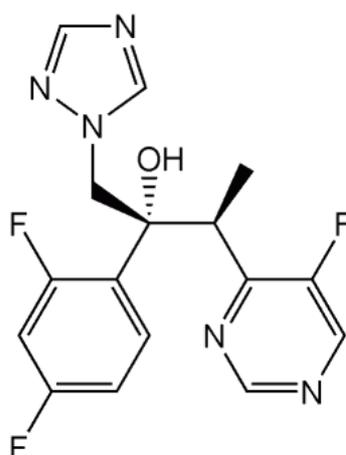


Figura 3. Estrutura química do voriconazol (VOR; MM 349,3, pKa 4,9, logP 1,8).

Apesar das alterações estruturais, o mecanismo principal de ação do VOR permanece igual ao dos outros membros de sua família, agindo na inibição da catálise da 14- α -dimetilação

do lanosterol, componente que dá origem a esteróis como o ergosterol, componente da membrana celular dos fungos, alterando sua permeabilidade e desestabilizando-a (JOHNSON; KAUFFMAN, 2003; MISRA; MALIK; SINGHAL, ; SABO; ABDEL-RAHMAN, 2000).

Já há uma quantidade significativa de estudos de caso apresentando resultados bastante positivos para o uso do VOR (inclusive topicamente, em soluções a 1%) em casos de endoftalmite e de cepas resistentes aos agentes antifúngicos mais usuais (anfotericina B, fluconazol e natamicina) (BUNYA et al., 2007; DURAND et al., 2005; EPAULARD et al., 2011; HAGAN et al., 1995; MISRA; MALIK; SINGHAL, ; OZDEMIR et al., 2012; SANATI et al., 1997; STRICTO, 2015). Há, inclusive, estudos de susceptibilidade *in vitro* com cepas isoladas de infecções oculares por *Aspergillus* atestando a eficácia do fármaco (BUNYA et al., 2007; HARIPRASAD et al., 2008; MARANGON et al., 2004).

A terapia oral utilizando VOR tem baixo impacto para infecções oculares em função da baixa biodisponibilidade ocular do fármaco por essa via. A incidência de importantes reações adversas sistêmicas é alta, tendo sido reportadas, inclusive, reações fototóxicas cutâneas e em mucosas. Essas reações, porém, mostraram estar ligadas à presença de um dos principais metabólitos do VOR, após sua metabolização pela CYP2C19, no fígado (EPAULARD et al., 2011). Este achado corrobora com a intenção de que a administração deste fármaco topicamente seria uma maneira eficiente de se tratar infecções oculares fúngicas de forma confortável e sem as principais reações adversas advindas do tratamento oral.

Uma série de estudos *in vivo* apresentando administração tópica de solução de VOR em humanos e animais relata que a taxa de permeação do VOR através da córnea é independente da concentração aplicada (alguns destes estudos compararam concentrações de 0,1 até 3% de fármaco em solução) e resulta em acúmulo médio de até 6 µg/mL no humor aquoso e 0,15 µg/mL no humor vítreo após sucessivas aplicações em intervalos de até duas horas. Tais concentrações estão dentro das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do VOR para boa parte dos fungos, porém, algumas cepas de *Fusarium* apresentam CIM acima de 8µg/mL dependendo da extensão da colônia (CLODE et al., 2006; IQBAL et al., 2008; KADIKOY et al., 2010; KINOSHITA et al., 2011; MCLINPHARM et al., 2009; SENTHILKUMARI et al., 2010; VEMULAKONDA et al., 2008).

Estes dados demonstram que o fármaco, sozinho em solução, não consegue atingir a CIM necessária para o tratamento de infecções mais graves, mesmo quando aplicado em curtos intervalos de tempo, por apresentar decaimento exponencial – chegando a uma meia-vida de 2,5 horas em coelhos (SHEN et al., 2007), ficando claro que uma formulação tópica que o ajude a permear em maior quantidade e o retenha por mais tempo no ambiente ocular poderia

representar uma melhora na taxa de ação do fármaco, principalmente em infecções por cepas menos susceptíveis ou infecções mais extensas.

3.5. LIPOSSOMAS

Os lipossomas são vesículas lamelares comumente compostas por uma bicamada de fosfolipídeos, em disposição similar à encontrada em membranas celulares (Figura 4). Estas vesículas podem ser formadas de maneira espontânea, quando os fosfolipídeos são hidratados em meio aquoso. Este processo é denominado de hidratação do filme lipídico e produz vesículas com tamanho e disposição variada dependendo de sua composição, podendo ser uni ou multilamelares e com faixa de tamanho médio variando entre 20 nm e 1 μ m. Em função de sua composição básica e disposição se assemelharem às das membranas celulares, estes sistemas são tidos como biocompatíveis e biodegradáveis e seu caráter anfifílico e compartimentalizado os possibilita encapsular tanto moléculas hidrofílicas, quanto lipofílicas, os colocando como uma interessante alternativa para o carreamento de fármacos através das barreiras oculares, inclusive aqueles mais sensíveis ao ambiente externo, facilmente degradáveis pela ação da luz ultravioleta, ou do oxigênio, por exemplo, já que estarão preservados dentro destas vesículas (GAUDANA et al., 2010; GREGORIADIS, 2006; HATHOUT et al., 2007b; LORIN et al., 2004; MEISNER; MEZEI, 1995; MUFAMADI et al., 2011).

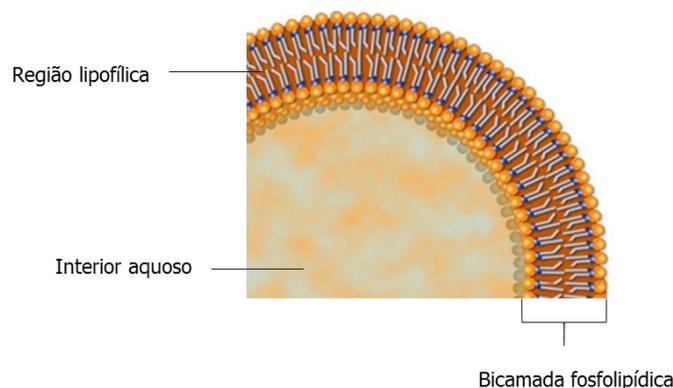


Figura 4. Representação de corte transversal em lipossoma unilamelar (LivOn Labs, 2014, com modificações).

Diversas técnicas posteriores à obtenção inicial dos lipossomas possibilitam calibrar seu tamanho, uniformizando o diâmetro das vesículas, o que ajudaria a se ter uma liberação mais uniforme de seu conteúdo, ou mesmo controlar tal liberação ao se trabalhar com diferentes faixas de tamanho dentro de uma mesma formulação (AKBARZADEH et al., 2013; FRISKEN;

ASMAN; PATTY, 2000; GREGORIADIS, 2006; MAYER; HOPE; CULLIS, 1986; MUFAMADI et al., 2011; PATIL; JADHAV, 2014; PATTY; FRISKEN, 2003).

Lipossomas já foram utilizados para encapsular diversos compostos, inclusive antifúngicos para uso ocular, como a anfotericina B e o fluconazol e mostraram ser alternativas bastante interessantes e de baixa toxicidade, capazes de otimizar a permeação e retenção do fármaco na córnea (EBRAHIM; PEYMAN; LEE, 2005; EL-BADRY; FETIH; SHAKEEL, 2014; HABIB; FOUAD; FATHALLA, 2008; HABIB et al., 2010; HATHOUT et al., 2007a; TANIGUCHI et al., 1988).

Desta forma, acredita-se que lipossomas carreando VOR sejam capazes de aumentar a eficiência de sua ação facilitando sua interação com a córnea e aumentando sua concentração local, reduzindo a ação dos mecanismos de defesa intrínsecos dos olhos.

3.6. QUITOSANA

A quitosana (CS) é um polímero derivado da quitina, presente no exoesqueleto de crustáceos e considerado biodegradável e com características extremamente interessantes para a veiculação ocular de fármacos. Este polímero mucoadesivo possui cargas superficiais positivas, que facilitam a interação eletrostática com a mucina presente na córnea, que possui cargas superficiais negativas. Apesar de ser insolúvel em água em pH fisiológico, alterações em sua estrutura, como a adição de oligossacarídeos em sua molécula já permitem sua solubilização em pH neutro e fisiológico, o que facilita sua manipulação e permite sua atividade em ambiente ocular (DE LA FUENTE et al., 2010; LI et al., 2009).

Diversos trabalhos já foram escritos demonstrando sucesso no recobrimento por quitosana de partículas para uso ocular, facilitando e controlando a permeação e aumentando o tempo de retenção de fármacos na córnea (DE LA FUENTE et al., 2010; GELFUSO et al., 2011; GRATIERI et al., 2010b, 2011; HSIAO et al., 2012; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; MALHOTRA et al., 2013; SINHA et al., 2004).

A associação da encapsulação de moléculas em lipossomas e posterior recobrimento por quitosana também já foi descrita na literatura, como sendo um sistema promissor para superar a diversidade das barreiras oculares e aumentar ainda mais a capacidade de penetração e o tempo de retenção de fármacos na córnea aumentando, conseqüentemente, seu tempo de ação e concentração em seu local de ação (ANDERSEN et al., 2013; DIEBOLD et al., 2007; GONÇALVES et al., 2012; HIRSJÄRVI et al., 2010; LI et al., 2009).

3.7. IONTOFORESE

A iontoforese é uma técnica que consiste na aplicação de uma fraca corrente elétrica sobre a área onde se pretende aumentar a absorção de alguma determinada substância. É uma técnica já bastante fundamentada e descrita na literatura e, nas últimas décadas, vem sendo bastante descrita como mecanismo de auxílio para a liberação e permeação ativa de fármacos topicamente, inclusive em mucosas (BURNETTE; ONGPIPATTANAKUL, 1987; ELJARRAT-BINSTOCK; DOMB, 2006; ERLANGER, 1954; GREEN et al., 1991; SHOEIBI; MAHDIZADEH; SHAFIEE, 2014).

A técnica consiste na criação de um circuito, em que a corrente elétrica de intensidade baixa pode ser fornecida por uma fonte de corrente ou baterias e é distribuída por meio de um eletrodo positivo (ânodo, geralmente de prata) e um negativo (cátodo, geralmente de cloreto de prata). Os eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl) são os mais utilizados na iontoforese por não influenciarem no pH do meio, uma vez que suas reações eletroquímicas ocorrem em voltagens baixas – abaixo da voltagem necessária para a hidrólise da água (GELFUSO, 2014; GRATIERI et al., 2014).

Para a aplicação da iontoforese num tecido, é necessário que haja um compartimento onde o fármaco será aplicado – em que será colocado um eletrodo de mesma polaridade – e um compartimento de retorno da carga, acoplado a um eletrodo de polaridade oposta – e que pode ser alocado em qualquer local do corpo. Assim, a carga do fármaco servirá como um condutor de corrente através da pele (ELJARRAT-BINSTOCK; DOMB, 2006; GRATIERI et al., 2014; SHOEIBI; MAHDIZADEH; SHAFIEE, 2014).

A utilização de iontoforese ocular já havia sido reportada no início do século XX, porém, a falta de padronização de um dispositivo para esta aplicação inviabilizava a elaboração de estudos mais confiáveis por não serem capazes de gerar resultados reprodutíveis e comumente lesionar os tecidos em função das altas correntes geradas por eles. Nas últimas décadas, dispositivos foram padronizados para aplicação iontoforética tanto para estudos em animais, quanto para utilização em humanos, possibilitando aplicação de baixas correntes pelas vias transescleral e transcorneana, se tornando uma alternativa à administração intracorneal e intravítrea, mais eficiente e muito melhor tolerada pelos pacientes (ELJARRAT-BINSTOCK; DOMB, 2006; GRATIERI et al., 2010a; SHOEIBI; MAHDIZADEH; SHAFIEE, 2014).

Estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo a associação da iontoforese à administração de moléculas encapsuladas na superfície ocular apresentaram resultados promissores, o que leva a crer que a administração ocular de lipossomas revestidos por quitosana contendo VOR, poderão

ter sua eficiência também aumentada, quando associados à esta técnica (ELJARRAT-BINSTOCK; DOMB, 2006; GRATIERI et al., 2010a; MANISH; KULKARNI, 2012).

4. METODOLOGIA

4.1. REAGENTES E MATÉRIAS-PRIMAS

O voriconazol (VOR) (com 99,85% de pureza), foi adquirido da Hangzhou Dayangchem Co., Ltda. (Hangzhou, China). Fosfatidilcolina de soja (PC) (fosfatidilcolina 97,5 % e liso-fosfatidilcolina 2,5 %). A quitosana (oligossacarídeo lactato de quitosana) foi adquirida da Sigma Aldrich (EUA). Os solventes orgânicos, acetonitrila e metanol, ambos de grau cromatográfico foram comprados da J. T. Baker (Pensilvânia, EUA) e o clorofórmio PA, da QHEMIS (São Paulo, Brasil). HEPES – Sal sódico (ultrapuro), também foi adquirido da J. T. Baker (Pensilvânia, EUA). A água utilizada foi purificada pelo sistema de Milli-Q da Millipore (Massachusetts, USA). Os demais reagentes e matérias-primas utilizados em ensaios específicos estão descritos em suas respectivas seções.

4.1.1. Córnea

As córneas utilizadas nos estudos *ex vivo* provêm de olhos de suínos gentilmente cedidos pelo Frigorífico Bonasa-Asa Alimentos (Distrito Federal, Brasil). Os olhos foram removidos imediatamente após o abate dos animais, antes de quaisquer procedimentos pós-abate, como a escalda. Os olhos foram mantidos resfriados (aproximadamente 4° C) durante o transporte até o laboratório, onde foram dissecados para possibilitar a remoção das córneas. Como critério de exclusão, qualquer dano verificado a olho nu na câmara anterior, ou na córnea, foi considerado e apenas as córneas íntegras foram consideradas para os ensaios, sendo a utilização destas córneas feita em até 2 horas após sua enucleação.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Padronização do Método Analítico para Quantificação de VOR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O método para doseamento do VOR por CLAE foi adaptado no próprio laboratório, baseado em metodologias descritas na literatura (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2012; PEREA et al., 2000; STEINMANN et al., 2011) e validado por um único analista. Todo o processo de

padronização, bem como as análises das formulações foram feitos em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, modelo Prominence LC-20A – sistema modular da Shimadzu Corporation (Japão), constituído por desgaseificador (DGU-20A_{5R}), bomba com pistão duplo (LC-20AT), autoinjeter de amostras (SIL-20A_{HT}), forno de coluna (CTO-20A), detector de arranjo de fotodiodo (SPD-M20A) e módulo controlador do sistema (CBM-20A). O software utilizado para operar o equipamento e processar os cromatogramas foi o LC Solution, também integrante do sistema da Shimadzu.

4.2.1.1. Determinação do Comprimento de Onda (λ) do VOR

De modo a se verificar o comprimento de onda a ser padronizado para a detecção do fármaco nas análises por CLAE, foram realizadas varreduras na faixa entre 190 e 700 nm, em um espectrofotômetro modelo Lambda XRS da Perkin Elmer (Beaconsfield, Reino Unido). As varreduras foram feitas com a solução-mãe de VOR em metanol (100 $\mu\text{g/mL}$) e com diluições desta em tampão HEPES isotonicado ($\text{pH } 7,4 \pm 0,01$), com concentrações de 50, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de modo a se verificar se a variação do solvente poderia interferir no λ máximo absorvido pelo fármaco, sendo tal valor o utilizado posteriormente nas detecções de VOR por CLAE.

4.2.1.2. Condições Cromatográficas para Detecção do VOR por CLAE

Como fase estacionária, foi utilizada uma coluna Shimadzu de fase reversa C8, 150 x 4,6 mm, com 5 μm de diâmetro e a fase móvel era constituída por uma mistura de água:acetonitrila (50:50 v/v). Foram estabelecidos como parâmetros para as análises, a leitura do comprimento de onda em 255 nm, fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 μL .

4.2.1.3. Validação do Método Analítico

A validação do método analítico aplicado para a determinação do fármaco nas diversas matrizes empregadas foi feita com base no guia Q2(R1) (ICH, 2005) e na resolução RE 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003). Os parâmetros utilizados para tal, serão abordados nos tópicos a seguir.

4.2.1.3.1. Curva Analítica do VOR

Para a curva analítica foram preparadas, em triplicata, soluções de VOR tanto em tampão HEPES isotonicado (pH $7,4 \pm 0,01$), quanto em metanol, nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.1.3.2. Linearidade

De modo se a avaliar a linearidade do método proposto, foram preparadas triplicatas de soluções de VOR nas concentrações de 0,4; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g/mL}$, preparadas nos dois solventes utilizados ao longo dos ensaios: tampão HEPES isotonicado (pH $7,4 \pm 0,01$) e metanol. Tais soluções foram, então, analisadas por CLAE e os valores de área de seus picos foram plotados em uma curva, correlacionando a área de cada pico (eixo das abcissas) com sua respectiva concentração (eixo das ordenadas). Do gráfico foram extraídos os valores da equação da reta construída que, posteriormente, foram utilizados nas análises para a determinação das concentrações reais de fármaco nas amostras das formulações testadas nos diferentes ensaios, considerando o coeficiente de determinação (R^2) = 0,999.

4.2.1.3.3. Precisão e Exatidão

As determinações intradia da precisão e da exatidão do método foram feitas injetando-se em triplicata, três das concentrações padronizadas na curva analítica: 1,0; 10; e 20 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 9$). As determinações interdía da precisão e exatidão do método foram conduzidas da mesma forma que as determinações intradia, porém, a injeção em triplicata das três concentrações foi dividida em uma replicata por dia, ao longo de três dias consecutivos ($n = 9$).

A precisão foi calculada matematicamente é expressa pelo coeficiente de variação (CV%) dos valores obtidos, de acordo com a Equação I, a seguir:

$$CV\% = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média das concentrações}} \times 100 \quad \text{Equação I}$$

A exatidão, também calculada matematicamente, é expressa por E% e representa o quão próximo um resultado individual está, quando comparado a seu valor de referência, como apresentado na Equação II:

$$E\% = \frac{\text{valor real}}{\text{valor teórico}} \times 100 \quad \text{Equação II}$$

O valor real, refere-se à concentração média de VOR determinada experimentalmente para uma amostra, enquanto o valor teórico indica a concentração teórica de VOR da mesma dada amostra.

4.2.1.3.4. *Seletividade (Estudo dos Interferentes)*

As possíveis interferências na detecção do fármaco ao longo das análises por CLAE foram determinadas injetando-se os dois principais possíveis interferentes presentes nas análises: os diluentes, tampão HEPES isotonicado (pH 7,4 ± 0,01) e metanol, tanto puros, quanto contaminados com um filtrado de córnea (matéria prima utilizada nos experimentos de permeação).

4.2.1.3.5. *Limite de Quantificação (LQ)*

Para a determinação do LQ por CLAE, foram preparadas soluções de VOR com concentrações correspondentes a 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,10; 0,20 e 0,40 µg/mL, sendo o LQ obtido através da metodologia proposta pela ANVISA (ANVISA, 2003) e representada pela Equação III que segue:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{ic} \quad \text{Equação III}$$

Em que: DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração preparadas contendo concentrações de fármaco próximas ao suposto limite de concentração e ic é a inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

4.2.1.3.6. *Limite de Detecção (LD)*

Para a determinação do LD, foram analisadas as mesmas amostras utilizadas na determinação do LD. A metodologia matemática utilizada para a determinação também foi baseada na proposta pela ANVISA (2003) e apresentada na Equação IV, a seguir:

$$LQ = \frac{DP \times 3}{ic} \quad \text{Equação IV}$$

Em que: DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração preparadas contendo concentrações de fármaco próximas ao suposto limite de concentração e α é a inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

4.2.2. Determinação da Solubilidade do VOR

De acordo com a literatura (BUCHANAN et al., 2006), o VOR é um fármaco pouco solúvel em água. Para confirmar tal afirmação e ter mais segurança na realização das análises das formulações, foi realizada a determinação da real solubilidade do VOR utilizado neste trabalho em tampão HEPES isotonicado ($\text{pH } 7,4 \pm 0,01$), uma vez que este seria o veículo das formulações propostas. A determinação procedeu com o preparo de triplicatas de uma solução saturada de fármaco a 1,0 mg/mL que foram submetidas a agitação magnética constante (500 rpm) por 24 horas, em temperatura aproximada de 25° C e, posteriormente, centrifugadas por 10 min a aproximadamente 2700 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e diluído 50 vezes para quantificação por CLAE.

4.2.3. Preparo dos Lipossomas Convencionais Contendo VOR (LPS-VOR)

Lipossomas foram preparados empregando-se a metodologia de hidratação do filme lipídico (HFL) seguida de extrusão (Figura 5). A fosfatidilcolina de soja (PC) foi utilizada como componente estrutural dos lipossomas. Esta, dissolvida em clorofórmio, constituiu a base da fase orgânica da preparação. A fase aquosa da formulação foi composta por tampão HEPES isotonicado ($\text{pH } 7,4 \pm 0,01$).

Foram testadas concentrações molares crescentes de fármaco, equivalentes às razões fármaco:lipídeo de 3,6:40; 4,3:40; 5,0:40; 5,8:40; 7,2:40; 14,3:40, com o intuito de verificar a eficiência de encapsulação máxima do fármaco no sistema lipossomal.

Inicialmente, foi preparada uma solução mãe de fosfatidilcolina em clorofórmio (SM-PC) na concentração de 200 mM. Uma alíquota de 800 μL da solução mãe de fosfatidilcolina foi retirada e colocada em um balão de fundo redondo. Uma quantidade conhecida de fármaco foi pesada, solubilizada em 200 μL de metanol e adicionada ao balão (já contendo a SM-PC). O conteúdo do balão foi, então, homogeneizado e os solventes orgânicos evaporados com auxílio de infusão de gás nitrogênio comprimido no interior do balão, formando o filme lipídico na parede do mesmo. Os balões contendo os filmes preparados foram, posteriormente,

reservados para completar a secagem do filme lipídico em estufa, em temperatura ambiente (aproximadamente 25° C), sob vácuo, por 12 horas.

Após secagem, o filme lipídico foi hidratado com 4 mL da fase aquosa por 1 hora e, em seguida, a preparação foi levada a um agitador tipo vórtex (IKA Lab Dancer, IKA, Staufen, Alemanha), formando vesículas multilamelares (MLV) e fragmentos de bicamadas. Após 6 ciclos de extrusão em extrusor de aço inox (Lipex™, Northern Lipids Inc., Canada) equipado com membrana de policarbonato com poros de 200 nm e 10 ciclos em membrana de 100 nm, sempre sob pressão de 200 psi de nitrogênio, foram obtidos lipossomas unilamelares pequenos (SUV) na concentração de 40 mM de lipídios.

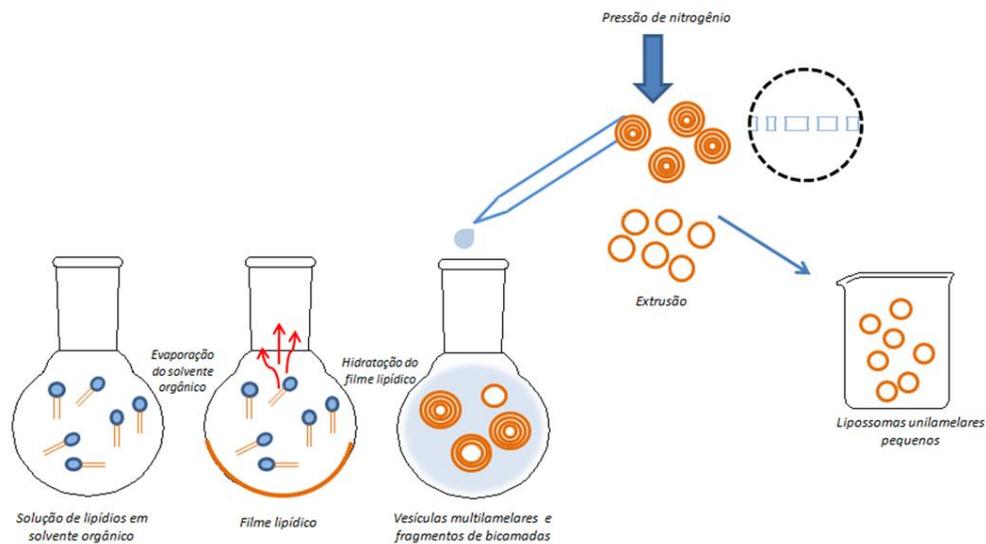


Figura 5. Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e posterior extrusão. (UFG, 2012 (FERREIRA, 2012))

4.2.4. Preparo dos Nanossistemas: Lipossomas Contendo VOR Revestidos por Quitosana (LPS-VOR(CS))

Soluções de oligossacarídeo lactato de quitosana (retratado deste ponto em diante como quitosana ou, apenas, CS) com concentrações entre 0,01 e 1,5% foram preparadas (a inclusão do oligossacarídeo à molécula de quitosana permite a solubilidade do composto em pH neutro). Estas soluções, após a determinação da concentração ideal de fármaco dentro dos lipossomas, foram utilizadas para revestir um novo lote de lipossomas de VOR para que nanossistemas com crescentes concentrações da solução de quitosana pudessem ser produzidos e também avaliados, de modo a se verificar a melhor concentração de quitosana a ser utilizada.

Os nanossistemas são obtidos a partir da adição por gotejamento (fluxo de 1 gota a cada 2 segundos) da suspensão de lipossomas (LPS-VOR) sobre a solução de quitosana, sob agitação magnética leve, na proporção nanolipossoma:solução de quitosana de 2:1 (v/v). Após toda a incorporação dos lipossomas na solução de quitosana, o sistema permanece sob agitação por mais 2 horas antes de ser analisado.

A Figura 6, a seguir, resume todas as etapas de obtenção dos nanossistemas.



Figura 6. Representação esquemática do processo de obtenção dos nanossistemas de lipossomas de VOR revestidos por quitosana. Ilustração do autor.

4.2.5. Caracterização das Formulações Contendo VOR

Todas as dispersões obtidas (tanto lipossomas, quanto nanossistemas) foram avaliadas e comparadas com base em cinco principais parâmetros: tamanho (diâmetro médio das partículas), índice de polidispersividade (IPd), potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE) e recuperação do fármaco (Rec), sendo as análises realizadas sempre em triplicata.

4.2.6. Determinações de Tamanho, Distribuição de Tamanho e Carga Superficial das Partículas

O diâmetro médio das partículas (interpretado como tamanho), bem como a medida de distribuição do tamanho das partículas nas dispersões das formulações (índice de polidispersividade), foram determinados utilizando-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz em um equipamento Zeta Sizer Nano S (Malvern Instruments, Reino Unido). Para isso, uma alíquota de cada amostra foi diluída (1:10 v/v) em tampão HEPES e introduzida em uma cubeta, posteriormente inserida no equipamento e analisada à temperatura ambiente. As leituras foram feitas em triplicata e para cada leitura foram obtidos, ao mesmo tempo, os dois valores. No mesmo equipamento, porém com uma cubeta diferente, também foi analisado o potencial zeta, que é uma maneira de se determinar a carga eletrostática superficial das partículas de um

sistema coloidal, como as suspensões contendo lipossomas e os nanossistemas fabricados neste projeto. Para tal, uma alíquota de amostra foi diluída em água (1:50 v/v) na cubeta do equipamento e levada à leitura – esta análise só foi realizada apenas após a determinação das formulações que seguiriam para as etapas seguintes do projeto, tanto dos lipossomas (LPS-VOR), quanto dos nanossistemas (LPS-VOR(CS)), como uma forma de se confirmar a alteração do caráter eletrostático superficial das partículas do sistema, gerada pela encapsulação com quitosana.

Para todas as análises, três medidas foram feitas e o número de corridas por medida foi determinado automaticamente pelo software do equipamento. Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão.

4.2.7. Determinações da Eficiência de Encapsulação e Recuperação do Fármaco

4.2.7.1. Determinação do Fármaco Total nas Dispersões

Conforme o protocolo apresentado na Figura 7, à uma alíquota da dispersão a ser avaliada foi adicionado metanol (1:10 dispersão:metanol v/v). A mistura foi homogeneizada e uma alíquota foi coletada e diluída em tampão HEPES (1:20) para posterior análise por CLAE. A função do metanol é de romper as membranas fosfolipídicas e/ou redes poliméricas da quitosana (dependendo da formulação avaliada) liberando e solubilizando todo o fármaco contido na dispersão inicial no solvente. Desta forma, pode-se verificar a quantidade de fármaco total (FT) na dada formulação (fármaco encapsulado + fármaco livre em solução = FT).



Figura 7. Representação do protocolo utilizado para a determinação do fármaco total nas formulações avaliadas. Ilustração do autor.

4.2.7.2. Isolamento do Fármaco Livre, do Encapsulado

A separação do fármaco livre do fármaco encapsulado foi realizada por ultrafiltração-centrifugação em dispositivo com tamanho de poro definido em 10 kDa (Vivaspin 2, 10000 MWCO HY, Sartorius, Goettingen, Alemanha), como pode ser verificado na Figura 8. A centrifugação foi feita por 15 minutos a 4500 rpm em centrífuga Novatecnica, modelo NT820 (São Paulo, Brasil), sendo o filtrado inteiramente constituído do fármaco livre (FL) em solução aquosa.

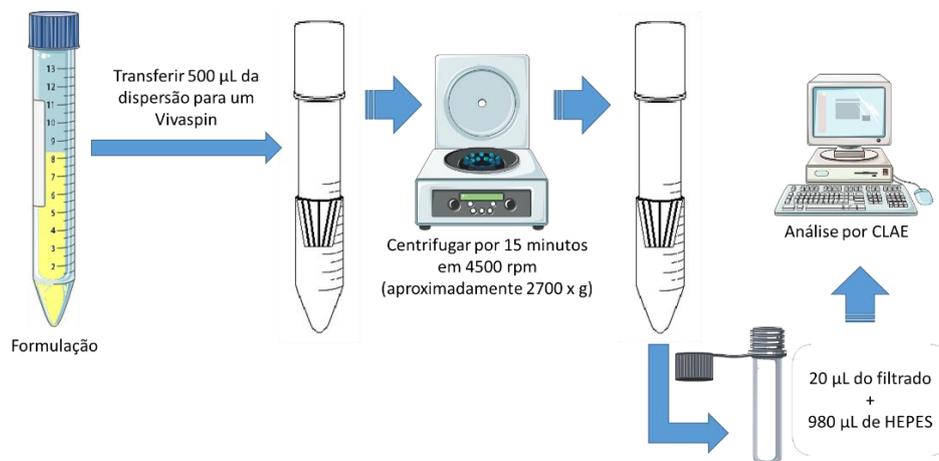


Figura 8. Representação do protocolo utilizado para a determinação do fármaco livre em solução, nas formulações avaliadas. Ilustração do autor.

4.2.7.3. Cálculo da Eficiência de Encapsulação

Com os valores de FT e FL em mãos, é possível calcular a porcentagem de eficiência de encapsulação (EE) de cada formulação analisada conforme a Equação V:

$$EE (\%) = \frac{(FT - FL)}{FT} \times 100 \quad \text{Equação V}$$

4.2.7.4. Cálculo da Recuperação do Fármaco

Para se determinar se houve saturação do sistema lipídico, ou do nanossistema, a porcentagem da recuperação do fármaco (Rec) foi calculada a relação entre fármaco total (FT) e fármaco adicionado (FA) na produção do dado lipossoma, ou nanossistema, de acordo com a Equação VI:

$$Rec (\%) = \frac{FT}{FA} \times 100 \quad \text{Equação VI}$$

4.2.8. Análise Morfológica

A análise morfológica dos lipossomas e nanossistemas de VOR foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM 1011 Transmission Electron Microscope (JEOL, Tóquio, Japão – 100 kV) com imagens capturadas através de uma câmera GATAN BioScan 820 (GATAN, Pensilvânia, EUA) utilizando o software Digital Micrograph 3.6.5 (GATAN, Pensilvânia, EUA).

Uma diluição 100x da dispersão a ser analisada foi feita em água purificada. Uma alíquota de 20 µL desta diluição foi depositada em um grid de cobre recoberto por Formvar (abertura de 300 *mesh*, Electron Microscopy Sciences, Pensilvânia, EUA) e seca à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 10 min. O excesso ocasional de formulação sobre o grid foi absorvido com papel-filtro e, em seguida, a amostra foi corada com uma gota de acetato de uranila 2% (p/v). Novamente a amostra foi reservada por 10 min para permitir a secagem da mesma e o ocasional excesso sobre o grid foi absorvido com o auxílio de papel-filtro. A amostra foi mantida ao abrigo da luz e analisada num período de até 24 h, para evitar possível degradação das partículas.

4.2.9. Ensaio *ex vivo* de Permeação em Córnea Suína

As córneas utilizadas nos experimentos *ex vivo* foram obtidas a partir de olhos suínos recolhidos imediatamente após o abate dos animais (Frigorífico Bonasa, Distrito Federal, Brasil). Os olhos não haviam sido previamente tratados termicamente no abatedouro. Os olhos foram mantidos a aproximadamente 4° C enquanto transportados para o laboratório e as córneas utilizadas dentro de, no máximo, 2 horas de enucleação. Qualquer olho com câmara anterior colapsada foi descartado. A Figura 9 ilustra o procedimento utilizado para o preparo das córneas e montagem das células.

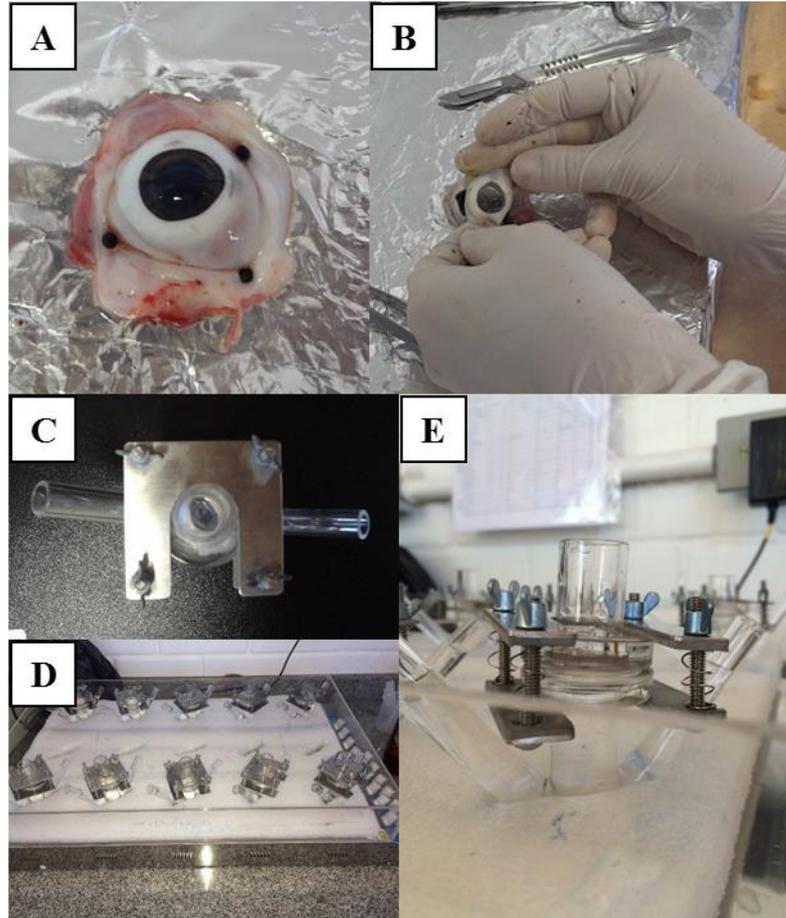


Figura 9. Esquema de dissecação da córnea e montagem das células de difusão. A) Globo ocular exposto, preso ao suporte pelas pálpebras; B) Botão córneo removido e limpo; C) Vista superior da célula de difusão apresentando a córnea ao centro do compartimento doador; D) Células de difusão montadas e alinhadas sobre placa agitadora magnética; E) Vista lateral da célula de difusão, presa ao suporte e sobre a placa de agitação.

Os botões córneos foram dissecados utilizando técnicas de banco de olhos convencionais e cuidados foram tomados para minimizar a distorção do tecido (THIEL et al., 2001). Imediatamente após a preparação da córnea, o tecido foi montado em uma célula de difusão de Franz modificada. A fim de encaixar a córnea côncava de forma adequada na célula, a abertura destinada à colocação córnea tinha suas bordas elevadas por 2 mm. A área da córnea exposta a difusão do fármaco era de 0,785 cm². O meio receptor (adicionado ao compartimento inferior da célula) consistia de 15 mL de tampão HEPES isotônico (pH 7,4 ± 0,01). Ao compartimento doador (superior) foram adicionados 250 µL das formulações de VOR em lipossomas (LPS-VOR), em nanossistemas de lipossomas encapsulados com quitosana (LPS-VOR(CS)), escolhidas para seguir com os ensaios deste trabalho, após avaliação se suas características, avaliadas de acordo com o item 4.2.5 deste trabalho. Um controle feito com uma solução aquosa de VFEND[®], forma comercial do VOR conjugado à ciclodextrina (Pfizer, Kent, Reino Unido), denominada de SOL-VOR. O VFEND[®], comercializado em forma de pó

liofilizado para reconstituição, foi solubilizado em água ultrapura de acordo com as especificações do fabricante e diluído no mesmo solvente até atingir concentração equivalente à concentração do fármaco nas formulações LPS-VOR e LPS-VOR(CS).

As células foram colocadas sob agitação magnética para assegurar a homogeneidade da solução receptora. Foram feitas permeações nos tempos de 10, 20 e 30 min. Ao final de cada tempo, uma amostra do permeado foi coletada, filtrada e analisada por CLAE. Após a coleta das amostras, as células foram desmontadas e as córneas submetidas ao procedimento de extração. A extração do VOR das córneas foi realizada cortando as mesmas em pedaços pequenos que foram, então, vedados em um recipiente contendo 3,0 mL de metanol, posto em agitação magnética à 600 rpm por 60 minutos. Ao término do procedimento de extração, as amostras foram filtradas e analisadas por HPLC. Para fins de comparação, a formulação LPS-VOR foi previamente diluída em tampão HEPES (2:1, LPS-VOR:tampão) de modo que todas as formulações fossem testadas contendo a mesma concentração de VOR.

4.2.10. Ensaio de Liberação em Membrana

Os estudos de liberação visam avaliar a capacidade que uma determinada formulação possui em liberar o fármaco nela contida para o meio, onde ele reagirá. Estes estudos também são realizados em células de difusão do tipo Franz modificadas sendo que, o elemento que faz a interface dos compartimentos doador e receptor, é uma membrana de diálise, composta por acetato de celulose, previamente lavada em água ultrapura para remoção de impurezas de fabricação.

Ao compartimento doador, foi adicionado 1,0 mL da formulação a ser testada (para este ensaio, apenas LPS-VOR e LPS-VOR(CS) foram testados), enquanto o compartimento receptor foi acrescido de 15 mL de tampão HEPES isotônico (pH $7,4 \pm 0,01$) com extrema cautela para evitar a formação de bolhas no interior da célula, que poderiam reduzir o fluxo de difusão do fármaco pela membrana. As células montadas foram, então, colocadas sob agitação magnética por um período de 360 minutos. Alíquotas de 1,0 mL foram coletadas nos tempos de 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a formulação ser adicionada ao compartimento doador, sendo que imediatamente após a retirada de cada alíquota, o meio receptor foi reabastecido com 1,0 mL de tampão HEPES de modo a manter o gradiente de concentração e fluxo das células ao longo do tempo. As alíquotas retiradas foram filtradas e analisadas por CLAE.

4.2.11. Ensaios Preliminares *in vitro* de Atividade Antifúngica das Formulações Contendo VOR

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado com a técnica de microdiluição em caldo, utilizando leveduras da espécie *Candida glabrata*, baseando-se na norma aprovada M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, na sigla em inglês), ex-*National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, na sigla em inglês), que apresenta as diretrizes para testes de sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica (NCCLS, 2002).

4.2.11.1. Cultivo dos Fungos

A cepa de *C. glabrata* (ATCC 90030), gentilmente cedida pelo Laboratório 3 de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, foi inoculada em um meio de congelamento composto de 70% de caldo Sabouraud e 30% glicerol, sendo mantida em alíquotas congeladas a -20° C por até dois anos (SILVA; COSTA; RECHE, 2008).

Previamente a seu uso, a alíquota contendo o fungo foi descongelada e cultivada em meio caldo Saboureaud dextrose por 24 horas, a 35° C, em estufa microbiológica. Após este período, foi feito o repique do fungo, transferindo-se uma pequena alíquota das leveduras em caldo para um tubo de ensaio contendo ágar Saboureaud dextrose. O tubo contendo as leveduras retornou à estufa por mais 24 horas, estando o fungo pronto para a utilização em seguida (NCCLS, 2002).

4.2.11.2. Preparo da Suspensão-Padrão

Após o crescimento dos fungos em ágar, uma pequena porção de colônias (entorno de cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm) foi transferida e suspensa em solução salina estéril (0,85%), na qual foi diluída até atingir uma densidade óptica (avaliada por espectrofotometria de absorção a 530 nm) equivalente a uma suspensão-padrão da escala de McFarland 0,5. A densidade óptica atingida representa uma concentração de $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL e, deste ponto em diante, a dada suspensão foi denominada de suspensão-padrão.

4.2.11.3. Preparo do Inóculo

O inóculo do fungo para o ensaio de microdiluição em caldo foi preparado a partir de diluições da suspensão-padrão em meio líquido RPMI-1640. Inicialmente, a suspensão-padrão foi diluída 1:50 em RPMI-1640, sendo a diluição obtida novamente diluída, na proporção de 1:20, também em meio RPMI-1640, originando o inóculo 2X concentrado utilizado no ensaio (de $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL). O inóculo foi utilizado em até 15 minutos após seu preparo para evitar possível perda de atividade por parte do fungo.

4.2.11.4. Preparo das Formulações

Para que as concentrações de VOR nos poços da placa de microdiluição estivessem em uma faixa que possibilitasse a visualização dos pontos de concentração inibitória mínima (CIM) do fungo pelo fármaco, as formulações foram primeiramente diluídas na proporção de 1:10 em água ultrapurificada estéril para se obter uma concentração 10X (de 166,7 $\mu\text{g/mL}$) a concentração mais alta de droga a ser testada. As diluições foram, então, diluídas 1:5 em meio líquido RPMI-1640, obtendo-se a concentração 2X (de 33,34 $\mu\text{g/mL}$) utilizada no ensaio. Foram testadas as duas formulações contendo VOR propostas – LPS-VOR e LPS-VOR(CS). Além das duas formulações objeto deste trabalho, foram utilizadas mais duas formulações tidas como controle: a mesma solução aquosa de VFEND[®] utilizada para os ensaios em permeação (SOL-VOR) e uma preparação de lipossomas recobertos por quitosana, porém sem o fármaco, denominada de LPS-BCO(CS). Todas as formulações contendo fármaco foram utilizadas na mesma concentração para fins comparativos. Para tal, a formulação LPS-VOR foi diluída em tampão HEPES (2:1 LPS-VOR:tampão) previamente às diluições descritas nesta subseção.

4.2.11.5. Microdiluição em Placa

Para o ensaio, foram utilizadas placas de microdiluição estéreis de 96 poços com fundo chato. Cada linha da placa representava, ou a replicata de uma diluição seriada, ou um controle de esterilidade ou crescimento. Cada formulação foi testada em triplicata. Além das formulações SOL-VOR e LPS-BCO(CS), foram utilizados o inóculo e o meio líquido RPMI-1640 puro como controles de crescimento e esterilidade, respectivamente.

Na placa, a cada poço de replicata foram adicionados 100 μL de inóculo 2X concentrado e, em seguida, 100 μL da formulação 2X diluída foram adicionados apenas ao primeiro poço

de cada respectiva replicata. O primeiro poço foi, então, homogeneizado com o auxílio de uma micropipeta automática. Após homogeneização, foram transferidos 100 μL do primeiro poço para o poço imediatamente seguinte, seguindo a linha do poço inicial. Este segundo poço foi homogeneizado e teve 100 μL transferidos para o terceiro poço e assim sucessivamente, até o último poço (12 $^{\circ}$), onde os 100 μL retirados foram descartados. Ao longo da linha referente ao controle de esterilidade foram adicionados 100 μL de meio RPMI-1640 e ao longo da linha de controle de crescimento, foram adicionados 100 μL de inóculo diluído em meio RPMI-1640 na condição de 1:1, resultando em um inóculo 1X concentrado.

Desta forma, cada linha da placa continha VOR em uma faixa de concentração decrescente variando de 16,67 a 0,008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (com exceção das linhas contendo os controles positivo e negativo e as linhas referentes à formulação sem fármaco).

Após o término do preparo, as placas foram tampadas e isoladas com filme termoplástico e incubadas em estufa microbiológica a 35 $^{\circ}$ C, por 24 horas. Após este período, as placas foram retiradas e avaliadas perante o padrão de crescimento fúngico em seus poços.

A Figura 10 ilustra a organização das placas de microdiluição com as delimitações de cada controle e amostra.

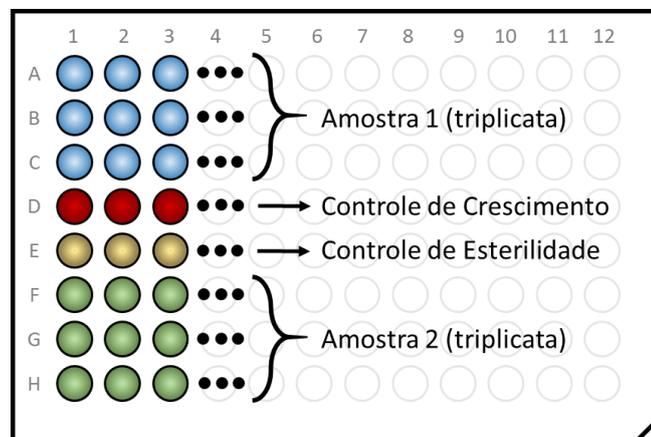


Figura 10. Representação esquemática da placa de microdiluição de 96 poços, apresentando a designação dos locais reservados para amostras e controles. Ilustração do autor.

4.2.11.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi feita baseada na norma M27-A2, onde a CIM é definida como sendo “concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo” (NCCLS, 2002). Desta maneira, após o período de incubação de 24 horas em estufa a 35 $^{\circ}$ C, as

placas de microdiluição foram retiradas e analisadas visualmente quanto a presença ou ausência de colônias e/ou turbidez em seus poços. A CIM foi, então, estabelecida como sendo a concentração correspondente ao poço com diminuição mais acentuada (ou óbvia) de crescimento.

4.2.12. Ensaios de Iontoforese

4.2.12.1. Eletrodos

Para os ensaios de iontoforese, foram utilizados eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl) preparados no próprio laboratório. O eletrodo negativo (cátodo), foi obtido com o auxílio de um bico de Bunsen e um cadinho de porcelana. Ao cadinho, foi fundida quantidade suficiente de AgCl para cobrir as alças moldadas nas pontas de pequenos fios de prata. Estas alças foram mergulhadas no cadinho contendo AgCl fundido para que fossem cobertas pelo composto. O processo foi repetido por mais duas vezes para garantir que, ao final, as alças estivessem completamente cobertas pelo AgCl originando, assim, o eletrodo de cloreto de prata (Figura 11).

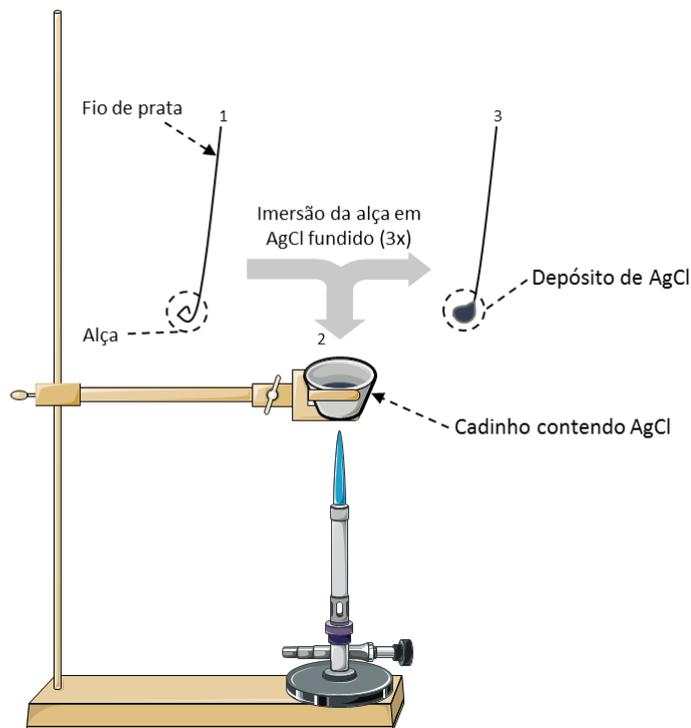


Figura 11. Esquema de preparo do eletrodo negativo (cátodo) de cloreto de prata (AgCl). 1: fio de prata com alça moldada na ponta; 2: imersão da alça em AgCl fundido; 3: alguns segundos após a retirada da alça de prata do AgCl, o composto se resfria e solidifica, formando o eletrodo de AgCl.

O preparo do eletrodo positivo (ânodo) é feito a partir da montagem de um circuito elétrico. Em um recipiente contendo solução salina (5,78 M) são postos o eletrodo de AgCl previamente preparado e um pedaço de fio de platina. O terminal positivo da fonte geradora de corrente ao circuito é acoplado ao fio de platina e o negativo desta mesma fonte, ao eletrodo de AgCl (Figura 12). A corrente de 0,2 mA aplicada por 24 horas no sistema e transportada ao longo deste pela solução salina, reduz o AgCl do eletrodo negativo à Ag, transformando o eletrodo de AgCl, outrora negativo, em um eletrodo de prata (Ag), agora positivo.

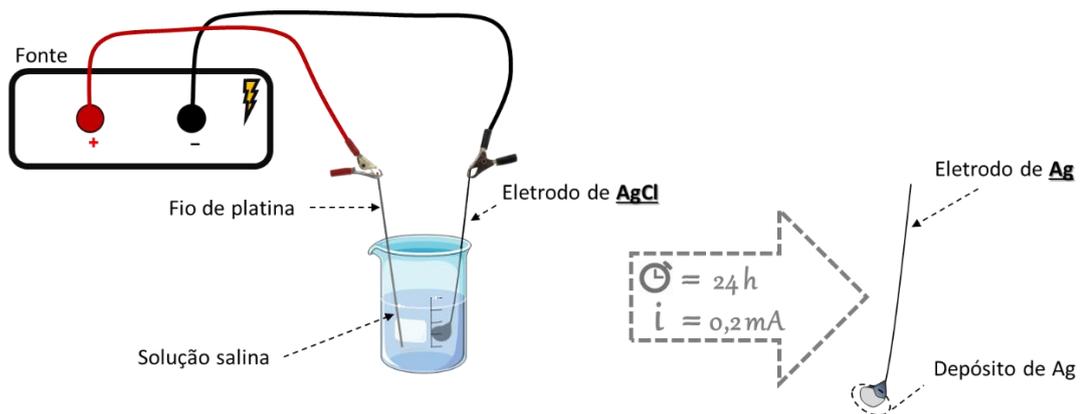


Figura 12. Processo de redução do eletrodo de cloreto de prata (AgCl, negativo) para a obtenção do eletrodo de prata (Ag, positivo).

4.2.12.2. Permeação e liberação com iontoforese

Além dos ensaios de permeação e liberação passiva (subseções 4.2.9 e 4.2.10), a iontoforese associada a estes ensaios também foi testada. Os parâmetros de preparo das células de difusão foram exatamente os mesmos dos utilizados para os testes passivos, diferindo apenas, nos tempos. As permeações foram realizadas apenas no tempo de 30 minutos, enquanto a liberação foi feita nos tempos de 10, 20 e 30 minutos. Para os ensaios, a corrente, ajustada para 0,85 mA e os eletrodos positivo e negativo foram colocados nos compartimentos doador e receptor, respectivamente.

4.2.13. Análise de Dados

Os dados brutos obtidos foram, inicialmente, trabalhados no programa Microsoft Excel 2013. A análise estatística destes dados foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism v.6.01. Nele foram avaliadas por análise de variância *one* (ou *two*) way ANOVA, seguida do

teste de Tukey com comparação múltipla de dados, as diferenças significativas entre os dados obtidos, com nível de significância estatística fixado em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DE VOR POR CLAE

5.1.1. Determinação do Comprimento de Onda (λ) do VOR

As varreduras feitas com as soluções de VOR apresentaram absorção máxima no comprimento de onda de 255 nm. Desta forma, padronizou-se leitura em 255 nm no detector espectrofotométrico acoplado ao cromatógrafo utilizado nas análises.

5.1.2. Validação da Metodologia Analítica para Determinação do VOR

A validação da metodologia analítica aplicada para a determinação do fármaco é de suma importância, por detectar erros sistemáticos associados aos procedimentos analíticos, confirmando sua aplicabilidade para o fim proposto. É, também, uma forma de se atestar a robustez dos processos utilizados, demonstrando que a padronização destes foi eficiente em reduzir quaisquer possíveis erros do operador na obtenção das amostras avaliadas.

De acordo com o descrito em protocolos de instituições que abordam o assunto “validação”, como ANVISA e ICH, os métodos analíticos devem ser avaliados em função de critérios de linearidade, precisão/exatidão, seletividade e limites de detecção e quantificação. Estes critérios foram avaliados e seus resultados estão apresentados ao longo desta seção (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

5.1.2.1. Curva Analítica

As curvas analíticas de VOR em tampão HEPES (pH $7,4 \pm 0,01$) e metanol, nas concentrações de fármaco de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$, analisadas por CLAE estão representadas a seguir, nas Figuras 13 (em HEPES) e 14 (em metanol). Uma sobreposição dos cromatogramas dos pontos destas tuas curvas é apresentada nas Figuras 15 e 16.

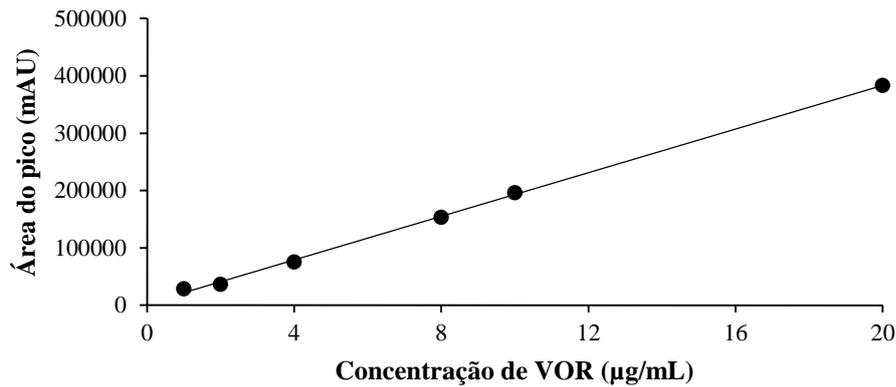


Figura 13. Representação gráfica da curva analítica de VOR em tampão HEPES (pH $7,4 \pm 0,01$) na faixa de concentração de 1,0 a 20,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 19016x + 2940,4$; coeficiente de determinação: $(R^2) = 0,999$.

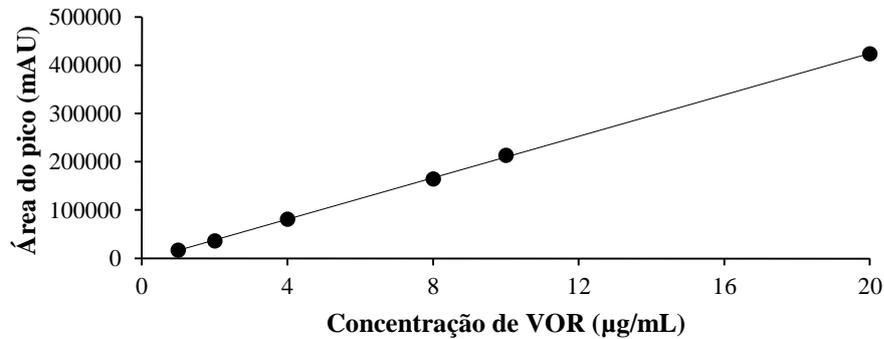


Figura 14. Representação gráfica da curva analítica de VOR em metanol na faixa de concentração de 1,0 a 20,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 21489x + 5232,5$; coeficiente de determinação: $(R^2) = 0,999$.

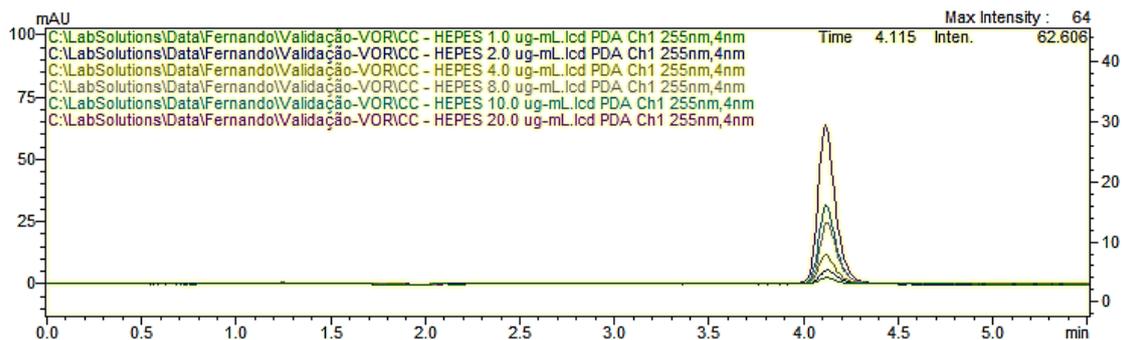


Figura 15. Cromatogramas sobrepostos das soluções de VOR em tampão HEPES, nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 20,0 µg/mL. Fase móvel = água:acetonitrila, 50:50 (v/v); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e detecção a 255 nm. Tempo de retenção do fármaco ~ 4,1 min.

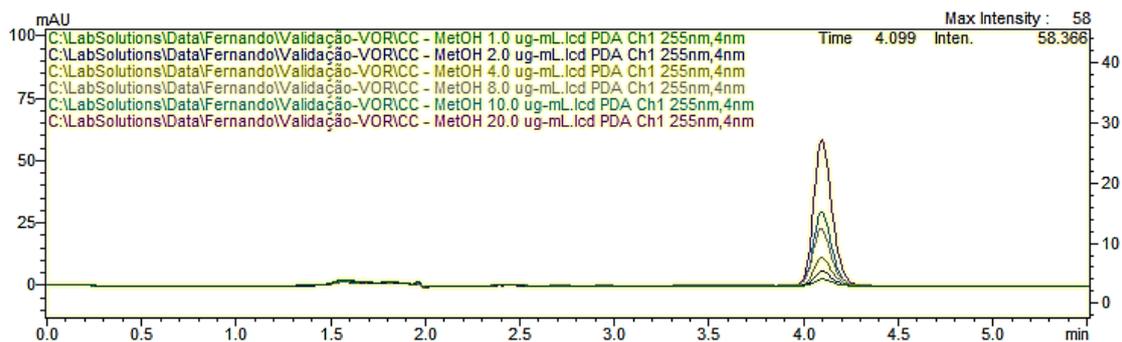


Figura 16. Cromatogramas sobrepostos das soluções de VOR em metanol, nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 20,0 µg/mL. Fase móvel = água:acetonitrila, 50:50 (v/v); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e detecção a 255 nm. Tempo de retenção do fármaco ~ 4,1 min.

As curvas analíticas apresentadas encontram-se dentro da faixa de linearidade proposta no método, uma vez que seus coeficientes de determinação (R^2) foram iguais a 0,999.

5.1.2.2. Linearidade

Para comprovar a linearidade do método analítico proposto, foi preparada uma curva estendida para os dois solventes testados (tampão HEPES e metanol), com concentrações variando de 0,4 a 40 µg/mL. As representações gráficas de tais curvas são mostradas a seguir, nas Figuras 17 e 18.

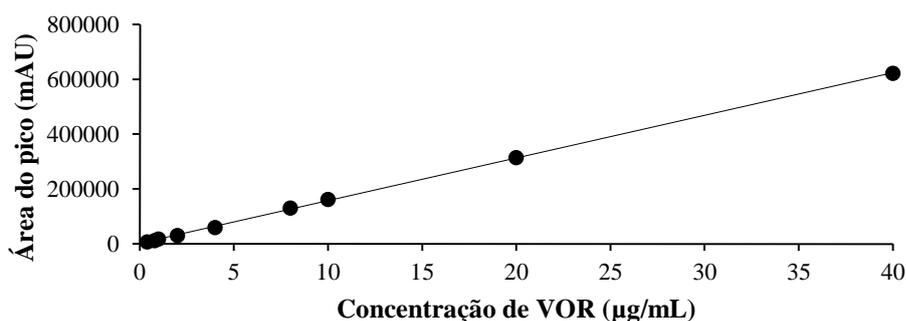


Figura 17. Representação gráfica da curva analítica estendida de VOR em tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01) na faixa de concentração de 0,4 a 40,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 15564x + 1278,7$; coeficiente de determinação: (R^2) = 0,999.

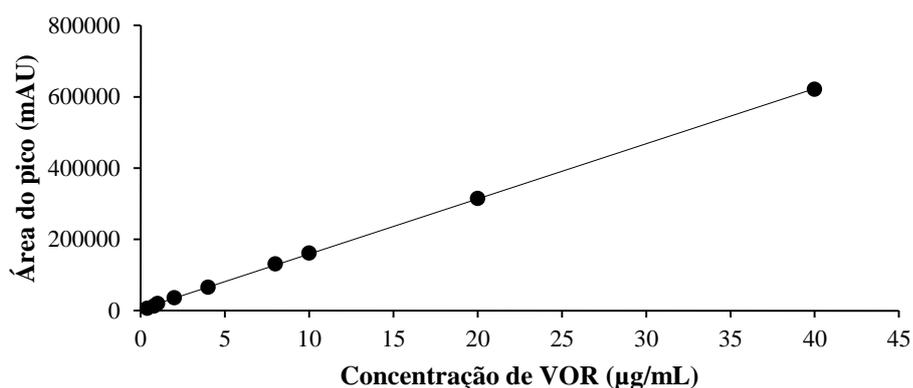


Figura 18. Representação gráfica da curva analítica estendida de VOR metanol na faixa de concentração de 0,4 a 40,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 15490x + 3555,5$; coeficiente de determinação: (R^2) = 0,999.

Como demonstrado nas Figuras 17 e 18, o método proposto mostrou-se linear, mesmo em uma faixa estendida de sua curva analítica, apresentando $R^2 = 0,999$ para ambos os casos, garantindo mais confiabilidade nos resultados das análises realizadas.

5.1.2.3. Precisão & Exatidão

Os dados de precisão e exatidão nos permitem avaliar a reprodutibilidade do método proposto, demonstrando quão precisos e exatos foram os resultados de análises realizadas em replicata intra e interdia (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Análise dos parâmetros de precisão e exatidão intra e interdia da metodologia para quantificação de VOR por CLAE utilizando tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01) como solvente.

	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL) ¹	Precisão (CV %) ²	Exatidão (E %) ³
Intradia (n = 9)	1,0	1,05 ± 0,001	0,09	105,47
	10,0	10,38 ± 0,031	0,30	103,85
	20,0	20,66 ± 0,019	0,10	103,29
Interdia (n = 9)	1,0	0,90 ± 0,023	2,59	89,91
	10,0	10,08 ± 0,282	2,80	100,78
	20,0	20,20 ± 0,377	1,86	101,01

n = número de determinações

¹ Média ± desvio padrão das concentrações obtidas (n = 9)

² Precisão calculada pelo Coeficiente de Variação = (desvio padrão / média) x 100

³ Exatidão = (concentração experimental / concentração teórica) x 100

Tabela 2. Análise dos parâmetros de precisão e exatidão intra e interdia da metodologia para quantificação de VOR por CLAE utilizando metanol como solvente.

	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$) ¹	Precisão CV (%) ²	Exatidão E (%) ³
Intradia (n = 9)	1,0	1,10 \pm 0,017	1,52	110,44
	10,0	10,03 \pm 0,068	0,68	100,28
	20,0	19,37 \pm 0,295	1,53	96,83
Interdia (n = 9)	1,0	1,00 \pm 0,038	3,84	100,12
	10,0	10,25 \pm 0,164	1,60	102,47
	20,0	20,20 \pm 0,377	4,36	100,19

n = número de determinações

¹ Média \pm desvio padrão das concentrações obtidas (n = 9)

² Precisão calculada pelo Coeficiente de Variação = (desvio padrão / média) x 100

³ Exatidão = (concentração experimental / concentração teórica) x 100

Como foi possível verificar com o auxílio das tabelas, a metodologia proposta apresentou valores satisfatórios de precisão e exatidão demonstrando, por sua vez, que o método proposto está adequado para tais parâmetros (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

5.1.2.4. Seletividade (Estudo dos Interferentes)

A metodologia utilizada para a detecção do fármaco em amostras contendo os diversos meios em que o fármaco se encontrava diluído, ao longo dos experimentos retratados neste trabalho (água MilliQ, metanol e variações destes, somados a filtrado de córnea) se mostrou adequadamente seletiva. Não foram verificadas alterações nos tempos de eluição, ou mesmo alterações nas formas e área dos picos do fármaco, quando comparados aos dados do fármaco em solução.

5.1.2.5. Limites de Quantificação (LQ) e Detecção (LD)

Os limites foram estipulados após a análise em quintuplicata de amostras preparadas com baixas concentrações de VOR diluído (0,02; 0,04; 0,08; 0,10; 0,20; 0,40; 0,80; 1,00) de modo a testar a capacidade do equipamento em detectar e/ou quantificar tais concentrações (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Dados para determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção de VOR por CLAE em tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL) ¹	Precisão (CV %) ²	Exatidão (E %) ³
0,02	*	**	**
0,04	*	**	**
0,08	0,08 ± 0,009	11,73	98,09
0,10	0,10 ± 0,007	6,79	101,83
0,20	0,20 ± 0,012	6,23	99,85
0,40	0,43 ± 0,013	3,05	106,45
0,80	0,82 ± 0,002	0,18	102,02
1,00	0,97 ± 0,002	0,23	96,76

¹ Média ± desvio padrão das concentrações obtidas (n = 5)

² Precisão calculada pelo Coeficiente de Variação = (desvio padrão / média) x 100

³ Exatidão = (concentração experimental / concentração teórica) x 100

* Valores não detectados por CLAE

** Cálculo de precisão/exatidão não passível de ser realizado

Valores de LD e LQ grifados

Tabela 4. Dados para determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção de VOR por CLAE em metanol.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL) ¹	Precisão (CV %) ²	Exatidão (E %) ³
0,02	*	**	**
0,04	*	**	**
0,08	0,07 ± 0,010	14,93	85,90
0,10	0,10 ± 0,003	3,02	101,21
0,20	0,20 ± 0,007	3,57	102,24
0,40	0,41 ± 0,015	3,58	101,71
0,80	0,82 ± 0,020	2,38	102,62
1,00	1,05 ± 0,009	0,90	104,64

¹ Média ± desvio padrão das concentrações obtidas (n = 5)

² Precisão calculada pelo Coeficiente de Variação = (desvio padrão / média) x 100

³ Exatidão = (concentração experimental / concentração teórica) x 100

* Valores não detectados por CLAE

** Cálculo de precisão/exatidão não passível de ser realizado

Valores de LD e LQ grifados

Com base nos dados apresentados da detecção de VOR nos solventes em que o fármaco se encontra diluído, estipulou-se que o LQ de VOR em tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01) seria de 0,4 µg/mL, enquanto em metanol, seria de 0,1 µg/mL.

5.1.3. Determinação da Solubilidade de VOR

Enquanto o fármaco se mostra livremente solúvel em metanol, de acordo com a literatura, a solubilidade do VOR em meio aquoso, é tida como baixa, entorno de 700 µg/mL (BUCHANAN et al., 2006). Desta forma, verificar a real solubilidade do fármaco no tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01) se mostra um ponto crucial para que os estudos de permeação e liberação do fármaco fossem realizados em condição *sink*. A condição *sink* é uma condição em que a concentração máxima de fármaco no meio de dissolução (neste caso, meio receptor das células de Franz) ao longo do experimento, não ultrapasse 10% da solubilidade do dado fármaco, neste mesmo meio. Desta forma, o fluxo de fármaco do meio doador para o meio receptor das células não será prejudicado em função da saturação do meio receptor, o que inviabilizaria a quantificação correta do fármaco permeado através do tempo.

A determinação da solubilidade do VOR em tampão HEPES (pH 7,4 ± 0,01) foi feita de acordo com o proposto no item 4.2.2 deste trabalho. Após as análises, a solubilidade encontrada foi de 716,96 ± 0,36 µg/mL, que vai de encontro com o valor de solubilidade aquosa do VOR apresentado por Buchanan (2007), de aproximadamente 700 µg/mL. Para os estudos desenvolvidos neste trabalho, o valor foi arredondado e a solubilidade do fármaco no tampão testado foi considerada como sendo de 700 µg/mL.

5.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E NANOSSISTEMAS CONTENDO VORICONAZOL

5.2.1. Lipossomas de Fosfatidilcolina de Soja contendo Voriconazol

Todas as formulações de lipossomas (LPS) preparadas e avaliadas por espalhamento dinâmico de luz demonstraram distribuição unimodal e diâmetros em escala nanométrica, independente da razão molar fármaco:lipídeo testada. Todas as formulações apresentaram tamanho de partícula próximo a 100 nm de diâmetro e baixos índices de polidispersividade (menores que 0,2), demonstrando homogeneidade quanto ao tamanho de partícula (Tabela 5). As formulações foram codificadas como de 1 a 6 na ordem crescente de suas razões fármaco:lipídeo. Portanto, LPS1, LPS2, LPS3, LPS4, LPS5 e LPS6 correspondem as formulações com as razões fármaco:lipídeo de 3,6:40; 4,3:40; 5,0:40; 5,8:40; 7,2:40; 14,3:40, respectivamente.

Tabela 5. Dados de produção dos lipossomas (LPS) de fosfatidilcolina contendo VOR. As amostras de LPS enumeradas de 1 a 6 correspondem às razões molares fármaco:lipídeo de 3,6:40; 4,3:40; 5,0:40; 5,8:40; 7,2:40; 14,3:40, respectivamente.

Amostra	VOR (mM)	Tamanho (nm)	IPd	Potencial zeta (mV)	EE (%)	Rec (%)
LPS1	3,6	114,4 ± 3,5	0,08 ± 0,01	-1,16 ± 3,64	87,3 ± 0,5	97,6 ± 4,1
LPS2	4,3	116,6 ± 4,7	0,12 ± 0,05	-4,35 ± 3,17	83,1 ± 0,2	99,2 ± 1,4
LPS3	5,0	110,7 ± 2,2	0,05 ± 0,01	-2,20 ± 3,51	91,1 ± 0,8	103,3 ± 8,7
LPS4	5,8	109,1 ± 7,8	0,05 ± 0,04	-1,15 ± 2,30	92,3 ± 0,3	97,8 ± 3,7
LPS5	7,2	116,6 ± 5,9	0,17 ± 0,06	-7,35 ± 4,12	86,8 ± 0,1	105,6 ± 0,1
LPS6	14,3	104,8 ± 5,5	0,02 ± 0,05	-7,44 ± 2,22	87,3 ± 0,5	43,8 ± 1,0

Dados apresentados por média ± desvio padrão. (n = 3)

IPd = índice de polidispersividade

EE = eficiência de encapsulação do fármaco pelos lipossomas

Rec = recuperação do fármaco adicionado na formulação

Os valores ligeiramente negativos de potencial zeta (carga residual negativa) para os lipossomas (entre -1 e -7 mV, aproximadamente), são característicos da fosfatidilcolina (GARBUZENKO et al., 2005).

Nenhuma das concentrações de VOR testadas alterou significativamente as características físicoquímicas das formulações ($p > 0,05$). Porém, na formulação LPS6, contendo a razão fármaco:lipídeo de 14,3:40 mM apresentou menos de 50% de VOR puderam ser recuperados. Essa baixa recuperação do fármaco possivelmente reflete a saturação do sistema lipossomal, que poderia levar à retenção da droga na membrana de filtração, durante o processo de extrusão. Há, também, a hipótese de que parte do fármaco, juntamente com parte do filme lipídico formado no interior da parede de vidro do balão de fundo redondo após a evaporação do solvente orgânico possa ficar aderida nesta parede, mesmo após a reidratação do filme. Desta maneira, uma maior concentração de droga, neste caso, poderia significar uma maior perda de fármaco devido à tais razões.

Por conter a maior concentração de fármaco possível de ser mantida com bons valores de eficiência de encapsulação e recuperação do fármaco, a formulação escolhida para dar continuidade aos estudos foi a LPS5, com razão molar fármaco:lipídeo de 7,2:40, equivalente a aproximadamente 2,5 mg de VOR por mL de formulação e que será referenciada, deste ponto em diante, apenas por LPS-VOR.

5.2.2. Lipossomas Encapsulados por Quitosana Contendo VOR

O processo de encapsulação com quitosana mostrou-se bastante viável tecnicamente e os resultados obtidos (apresentados na Tabela 6, a seguir) demonstraram EE acima dos 60% para a maioria das concentrações. Os lipossomas utilizados para o preparo dos nanossistemas apresentavam tamanho médio de $97,2 \text{ nm} \pm 1,7 \text{ nm}$ e índice de polidispersividade (IPd) de $0,14 \pm 0,00$.

Tabela 6. Tamanho médio, índice de polidispersividade (PdI), Eficiência de encapsulação (EE) e Recuperação do fármaco (Rec) dos lipossomas revestidos com diferentes concentrações de quitosana.

Quitosana (%)	Tamanho (nm)	IPd	EE (%)	Rec (%)
0,01	$98,1 \pm 2,5$	$0,09 \pm 0,005$	$70,6 \pm 4,2$	$56,1 \pm 2,3$
0,025	$96,1 \pm 1,2$	$0,08 \pm 0,016$	$66,3 \pm 3,0$	$47,7 \pm 1,3$
0,05	$98,1 \pm 1,3$	$0,08 \pm 0,001$	$55,8 \pm 4,3$	$38,3 \pm 1,9$
0,1	$101,1 \pm 3,5$	$0,15 \pm 0,027$	$78,5 \pm 3,1$	$62,9 \pm 10,9$
0,5	$117,1 \pm 3,0$	$0,14 \pm 0,000$	$77,3 \pm 5,0$	$56,8 \pm 8,8$
0,75	$131,8 \pm 3,0$	$0,18 \pm 0,010$	$66,7 \pm 0,3$	$40,9 \pm 1,5$
1,0	$136,8 \pm 2,3$	$0,18 \pm 0,001$	$74,5 \pm 2,3$	$49,1 \pm 0,6$
1,5	$161,2 \pm 0,8$	$0,19 \pm 0,011$	$65,7 \pm 5,4$	$36,1 \pm 5,2$

*Dados apresentados por média \pm desvio padrão. (n = 3)

Os índices de polidispersividade de todas as formulações foram baixos, indicando uniformidade de tamanho nas amostras analisadas. Entre a faixa testada de 0,1 a 1,0% de quitosana não houveram diferenças estatísticas no que diz respeito a EE e Rec, apenas as diferenças de tamanho foram estatísticas (valores de $p = 0,0645$; $0,1208$ e $0,001$ para EE, Rec e Tamanho, respectivamente). Com base nos resultados, a formulação com concentração de 0,5% de quitosana foi escolhida e, para confirmar se esta seria a melhor escolha, optou-se por fazer novos lotes de nanossistemas encapsulados com 0,1, 0,5 e 0,75% de quitosana (uma acima e uma abaixo da concentração escolhida - três lotes de cada), desta vez, acrescentando o ensaio de avaliação do potencial zeta da formulação, cujos resultados podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7. Tamanho médio, índice de polidispersividade (PdI), Eficiência de encapsulação (EE), Recuperação do fármaco (Rec) e Potencial Zeta (Zeta) dos lipossomas revestidos com 0,1; 0,5 e 0,75% de quitosana.

Quitosana (%)	Tamanho (nm)	IPd	EE (%)	Rec (%)	Potencial Zeta (mV)
0,1	112,1 ± 1,9	0,10 ± 0,003	62,4 ± 4,4	63,3 ± 6,4	-17,5 ± 0,6
0,5	137,3 ± 2,0	0,18 ± 0,022	61,2 ± 2,6	62,1 ± 1,1	9,9 ± 0,4
0,75	127,5 ± 0,2	0,39 ± 0,410	69,5 ± 1,9	87,5 ± 2,0	10,3 ± 0,9

*Dados apresentados por média ± desvio padrão. (n = 3)

A formulação com 0,1% apresentou potencial zeta negativo, o que seria um indicativo de que a quitosana (que tem carga residual positiva) não estaria recobrando o lipossoma (que possui carga superficial residual negativa). Já as formulações com 0,5 e 0,75% de quitosana apresentaram bons resultados de EE e Rec. A formulação com 0,75% apresentou índices um pouco melhores para estes dois parâmetros ($p < 0,05$ para ambos) porém, com potencial zeta estatisticamente igual e tamanho significativamente menor ($p < 0,05$ para ambos). Pela análise estatística não fica claro qual formulação seria a melhor, tendo em vista que não há certeza quanto a quais parâmetros analisados seriam os mais relevantes para aumentar a permeação do fármaco ou mesmo se a diferença estatística apresentada de fato influenciaria no comportamento desses sistemas perante um estudo de permeação. Desta forma, por ter apresentado bons resultados e consumir menos matéria prima, a formulação com 0,5% de quitosana permaneceu a escolhida para perpetuar-se pelos ensaios seguintes, identificada como LPS-VOR(CS). Em função da diluição da dispersão de lipossomas ao longo do processo de obtenção dos nanossistemas, a concentração de fármaco nos LPS-VOR(CS) ficou estabelecida em aproximadamente 1,7 mg/mL de formulação.

5.2.3. Análise Morfológica

Macroscopicamente, as formulações (enquanto dispersões) se apresentavam com coloração levemente esbranquiçada e, no caso dos nanossistemas revestidos por quitosana, levemente esbranquiçadas com reflexo azulado (em decorrência de um efeito Tyndall mais pronunciado, possivelmente em função da presença do polímero).

Por meio de um microscópio eletrônico de transmissão, foram obtidas as imagens a seguir, que ilustram a morfologia dos lipossomas de VOR, bem como a destes lipossomas após sua incorporação na solução de quitosana, originando os nanossistemas de lipossomas de VOR revestidos por quitosana.

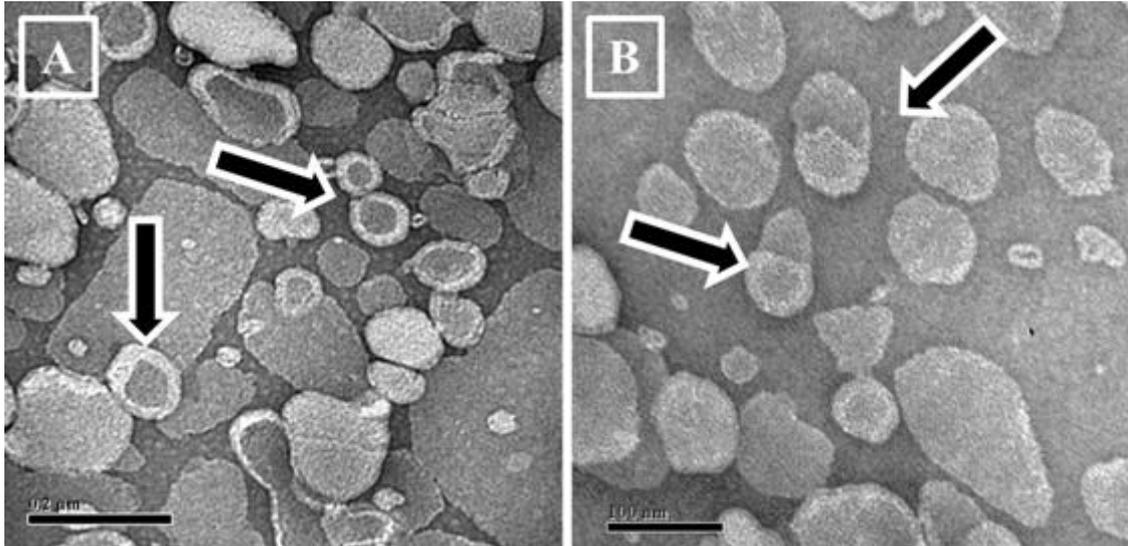


Figura 19. Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A) Lipossomas de VOR; (B) Nanossistemas – lipossomas de VOR revestidos por quitosana. Micrografias tiradas com magnitudes de 120 K e 100 K, para A e B, respectivamente.

A Figura 19 apresenta as primeiras imagens obtidas destes lipossomas e nanossistemas de VOR, capturadas por microscopia eletrônica de transmissão. Detalhe para a bicamada lipídica que pode ser vista ao redor dos lipossomas (mais facilmente visualizadas na imagem (A)). As micrografias possibilitaram a confirmação final da existência das vesículas lipossomais, bem como de suas características morfológicas principais, como formato circular e aparentemente mais flexível no caso dos lipossomas (A). Na imagem B, lipossomas se apresentam circundados por um outro elemento, que julga-se ser o depósito de quitosana, haja a vista que a quitosana foi o único composto acrescido para a formação destes nanossistemas e que os complexos, que não aparecem na imagem (A), apresentam tamanho condizente com os tamanho médios dos LPS-VOR(CS) analisados por espalhamento dinâmico de luz.

Otimizações no tratamento das amostras estão sendo estudadas para que seja possível maior distinção entre possíveis artefatos e, por consequência, melhores imagens capazes de exprimir mais dados sobre a morfologia destas vesículas.

5.3. ENSAIOS *EX VIVO* DE PERMEACÃO EM CÓRNEA SUÍNA

5.3.1. Ensaios de Permeação Passiva

O estudo de permeação em córnea suína foi realizado com o VOR em três diferentes composições: em lipossomas (LPS-VOR), em lipossomas revestidos por quitosana (LPS-

VOR(CS)) e em solução (SOL-VOR) preparada a partir da diluição em água ultrapura de VFEND[®], medicamento referência para o fármaco – vendido como pó para reconstituição composto por voriconazol complexado em beta-ciclodextrina. De modo a reduzir interferências relativas à possíveis diferenças de gradiente de concentração entre as formulações testadas, a concentração da formulação LPS-VOR foi ajustada para a mesma concentração teórica da formulação LPS-VOR(CS), que continha menor concentração de fármaco (aproximadamente 1,7 mg/mL). A diluição foi feita em tampão HEPES isotônico (pH 7,4 ± 0,01), mesmo diluente utilizado no preparo dos lipossomas, de forma a não haver interferências decorrentes da diluição. A SOL-VOR foi preparada com água ultrapura, de acordo com as instruções do fabricante, já na concentração de 1,7 mg/mL.

Os ensaios de permeação mostraram que não havia permeação do fármaco através da córnea nos primeiros 20 minutos de contato com quaisquer das três formulações contendo VOR testadas (Figura 20).

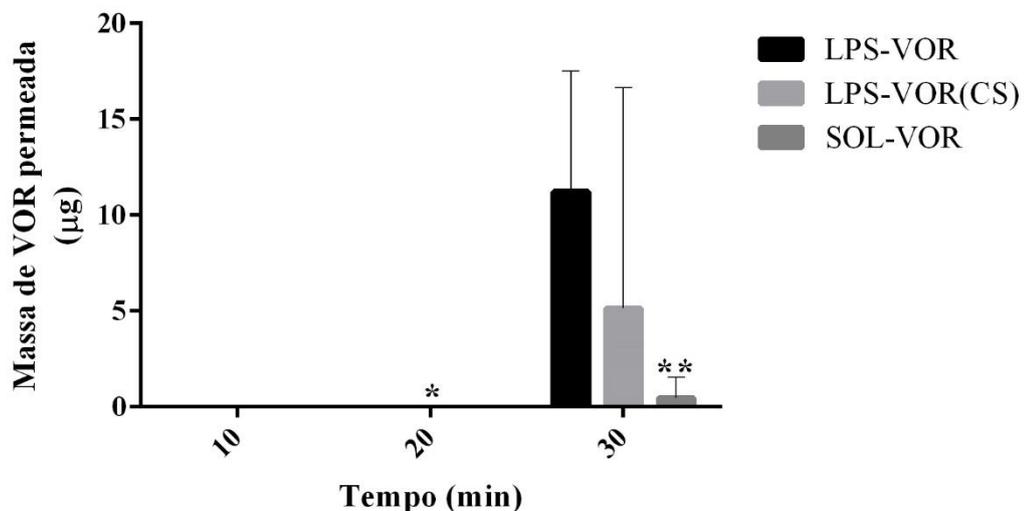


Figura 20. Permeação do VOR através de córnea suína, nos tempos de 10 e 30 minutos (n = 5).

* a formulação SOL-VOR não foi testada no tempo de 20 minutos.

** diferença estatística (p < 0,05) quando comparada com a formulação LPS-VOR.

A Figura 20 apresenta a quantidade fármaco que difundiu do meio doador para o receptor da célula de difusão, através da córnea, ao término do tempo de ensaio. Na comparação entre formulações, após 30 minutos, foram difundidos 11,23 ± 6,28 µg/mL de VOR da formulação LPS-VOR e 5,15 ± 11,51 µg/mL da formulação LPS-VOR(CS). Do fármaco em solução, complexado com ciclodextrina (SOL-VOR), somente 0,47 ± 1,07 µg/mL foi difundido pela córnea.

A análise em função do tempo, revelou uma diferença estatística entre quantidade de VOR difundido através da córnea através da formulação LPS-VOR aos 30 minutos quando comparada aos outros tempos. O mesmo, porém, não se aplica à formulação LPS-VOR(CS), cujas análises revelaram não haver diferença estatística em função do tempo de permeação. Este resultado se deu em função do número de replicatas que apresentaram difusão do fármaco no tempo de 30 minutos. Em apenas uma das replicatas desta formulação houve difusão, o que reduz a confiabilidade deste resultado. A hipótese mais provável é a de que a córnea utilizada nesta replicata poderia apresentar algum dano não verificado na inspeção visual (feita antes da montagem das células), o que poderia facilitar a permeação do fármaco.

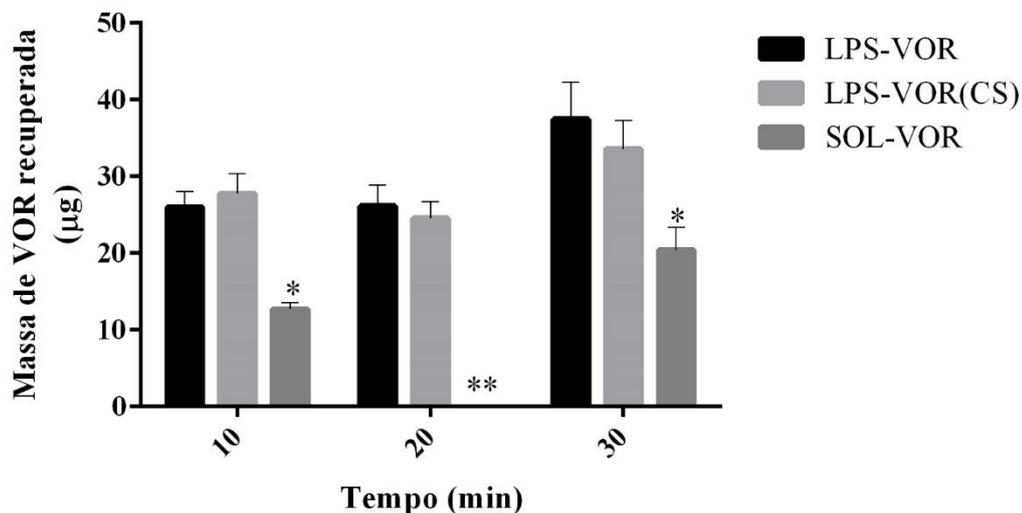


Figura 21. Quantidade de VOR retida em córnea e recupera após ensaio de permeação em córnea suína (n = 5).
 * diferença estatística quando comparada com as demais formulações ($p < 0,05$).
 ** a formulação SOL-VOR não foi testada no tempo de 20 minutos.

A Figura 21 apresenta os dados de recuperação do fármaco retido em córnea após o ensaio de permeação e posterior extração do fármaco da matriz biológica. Não houve diferença significativa ao comparar o desempenho das duas formulações alvo de estudo neste trabalho entre si, para cada tempo estudado isoladamente ($p > 0,05$). Nesta mesma análise, porém, as quantidades de fármaco recuperadas destas formulações superaram estatisticamente, as quantidades de VOR recuperado da SOL-VOR nos tempos de 10 e 30 minutos (a formulação SOL-VOR não foi testada no tempo de 20 minutos) ($p > 0,05$).

Nas análises ao longo do tempo de ensaio, entre os tempos de 10 e 20 minutos, nenhuma das formulações testadas para esses tempos apresentou diferença estatística da quantidade de fármaco retido e recuperado da córnea ($p > 0,05$). Entre 20 e 30 minutos, tanto LPS-VOR, quanto LPS-VOR(CS) apresentaram diferença pequena, porém estatística entre as quantidades

de VOR recuperadas ($p < 0,05$). Por fim, ao se avaliar os tempos de 10 e 30 minutos, é percebido um aumento real das quantidades recuperadas de fármaco retidas na córnea, todas as formulações ($p < 0,05$), alcançando-se $37,50 \pm 4,80$; $33,75 \pm 3,70$ e $20,41 \pm 2,94$ μg de VOR recuperado das formulações LPS-VOR, LPS-VOR(CS) e SOL-VOR, respectivamente, ao final de 30 minutos de permeação.

5.3.2. Ensaios de Permeação Ativa (Iontoforese)

Os ensaios de permeação ativa, utilizando iontoforese, visam elucidar se a associação dessa técnica, já utilizada com o intuito de melhorar a penetração e/ou permeação de fármacos através de membranas, seria interessante para melhorar a eficiência das formulações de lipossomas e nanossistemas contendo VOR desenvolvidas neste trabalho. Os dados das permeações passivas foram utilizados como controle e, novamente, a solução de VOR (SOL-VOR) também foi testada, de modo a verificar se os efeitos da técnica também poderiam ser verificados com o fármaco “livre” em solução.

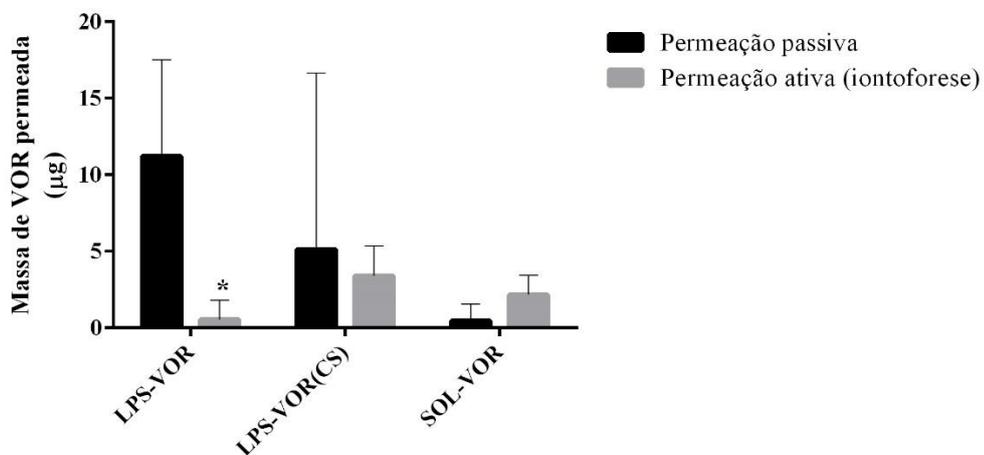


Figura 22. Comparativo entre as massas de VOR permeadas passiva e ativamente (por iontoforese) em 30 minutos de estudo de permeação em córnea suína ($n = 4$).
* ($p < 0,05$).

Como observado no gráfico da Figura 22, a aplicação da iontoforese resultou em uma redução da permeabilidade do fármaco através da córnea, para as formulações LPS-VOR e LPS-VOR(CS), porém, apenas a diferença entre as permeações passiva e ativa dos lipossomas contendo VOR foi estatisticamente relevante. Tanto a redução da permeabilidade pela formulação LPS-VOR(CS) e o aumento da permeabilidade do fármaco pela SOL-VOR foram apenas relativos e não estatísticos ($p > 0,05$).

Quando comparadas no âmbito da permeabilidade do fármaco frente à iontoforese, o desempenho da formulação LPS-VOR(CS) foi o mais expressivo dentre as três formulações testadas, sendo a diferença estatística para tais casos ($p < 0,05$). A diferença, porém, não foi estatisticamente expressiva quando comparados LPS-VOR e SOL-VOR.

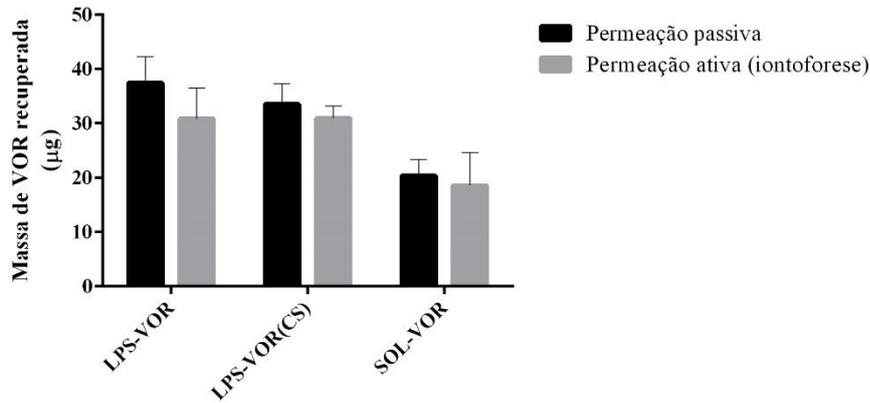


Figura 23. Massa de VOR recuperada da córnea, após ensaio de permeação ($n = 4$).

Com a aplicação da iontoforese foi possível observar, entre as três formulações testadas, certa diferença na capacidade de retenção do fármaco pela córnea. As formulações LPS-VOR e LPS-VOR(CS) não tiveram diferenças significativas entre si, mas foram capazes de fazer uma quantidade de VOR maior penetrar na córnea, quando comparadas com a SOL-VOR. Quando cada formulação foi analisada quanto às diferenças entre os dois tipos de permeação, nenhuma diferença foi considerada estatística.

Estes dados, apresentados na Figura 23, demonstraram que, apesar de uma redução relativa na capacidade de promover retenção do fármaco na córnea, as diferenças entre os dois tipos de permeação não foram estatísticas e, ao contrário do que foi verificado com a permeação, a recuperação seguiu exatamente o mesmo padrão para ambas as formas de permeação.

Isto pode indicar que a aplicação de iontoforese pode, em alguns casos, controlar a capacidade de permeação do fármaco através da córnea sem, porém, alterar de forma expressiva a capacidade de penetração do mesmo em seu local primário de ação (que é a córnea, propriamente dita).

5.4. ENSAIOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO EM MEMBRANA

Uma das preocupações mais genuínas ao se preparar sistemas de liberação de fármacos é a de que este sistema criado de fato seja capaz de liberar o fármaco em um determinado momento ou região. Caso o contrário, o fármaco encapsulado não estará disponível para exercer

suas ações farmacológicas e o projeto de um sistema de liberação terá falhado em sua essência. Ensaios *in vitro* de liberação em membrana possibilitam verificar a capacidade que um sistema de liberação tem de liberar o fármaco do ambiente em que está retido na formulação para, assim, poder exercer sua ação.

A capacidade de liberação passiva de VOR pelas formulações de lipossomas e nanossistemas contendo o fármaco foram avaliadas ao longo de seis horas (360 min), enquanto a liberação ativa, por meio da aplicação de iontoforese, foi avaliada no período de até 30 min.

5.4.1. Ensaio de Liberação Passiva

Como pode ser visualizado na Figura 23, ao longo dos 360 minutos, é verificado um aumento gradual da liberação de VOR pelas formulações, atingindo aproximadamente 50% da quantidade total do fármaco presente no compartimento doador da célula de difusão, ao término dos 360 minutos de ensaio.

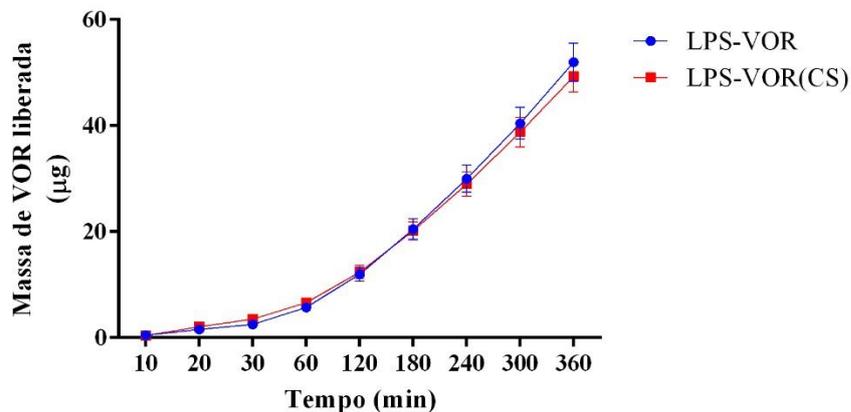


Figura 24. Ensaio *in vitro* de liberação de VOR em células de difusão, através de membrana de acetato de celulose, indicando a quantidade de fármaco liberado (em porcentagem da formulação total) ao longo de 360 min (n = 6).

Com exceção do tempo 30 minutos, em que a formulação encapsulada por quitosana liberou estatisticamente mais que a formulação sem quitosana (aproximadamente 3,5% contra 2,5% para LPS-VOR(CS) e LPS-VOR, respectivamente), a quantidade de fármaco liberada por ambas as formulações se manteve equivalente, ao longo de todo o tempo do experimento. Isso demonstra que a presença da quitosana de maneira alguma interfere na capacidade de liberação passiva do fármaco.

5.4.2. Ensaios de Liberação Ativa (iontoforese)

Ao longo de 30 minutos, não foi verificada diferença estatística entre a capacidade de liberação por parte das formulações testadas sob a condição de liberação ativa. Na condição de liberação passiva, como apresentado anteriormente, não houve diferença estatística entre as formulações nos minutos 10 e 20, porém, o minuto 30 apresentou maior porcentagem de liberação por parte da formulação de lipossomas encapsulados por quitosana. Quando as comparações foram feitas levando-se em consideração a presença ou ausência da aplicação de iontoforese durante o processo de liberação, nenhuma diferença significativa foi verificada entre as formulações, ao longo dos tempos de amostragem (Figura 25).

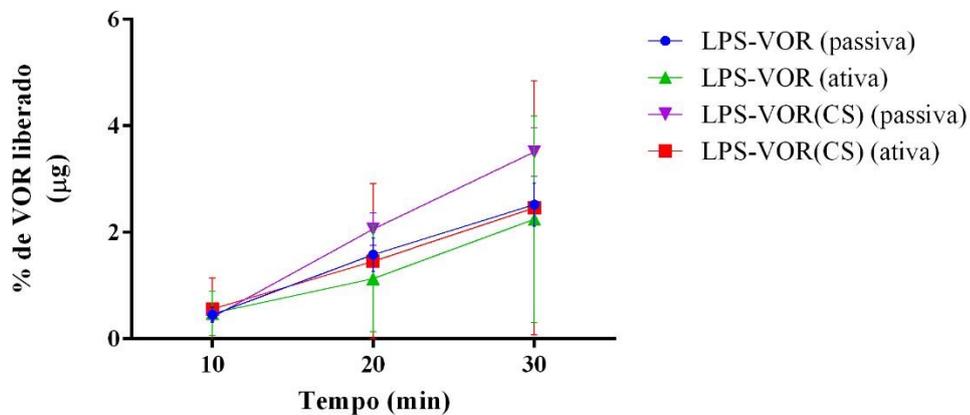


Figura 25. Gráfico comparativo entre a capacidade de liberação de VOR pelas formulações LPS-VOR e LPS-VOR(CS) em célula de difusão, através de membrana sintética, sob condições passiva e ativa (iontoforética) (n = 6).

Estes resultados corroboram com os resultados da liberação passiva no quesito ausência de interferência na liberação do fármaco por parte da quitosana complexada aos lipossomas, na formulação LPS-VOR(CS).

Outro dado importante é de que a iontoforese não interfere, em si, no processo de liberação do fármaco de seu sistema de liberação, mostrando que o fenômeno visto nos ensaios de permeação possivelmente está ligado ao fato da iontoforese permitir uma interação mais íntima entre os sistemas e a matriz biológica estudada (córnea), em função das cargas elétricas intrínsecas a ambos.

5.5. ENSAIOS *IN VITRO* DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE CADA FORMULAÇÃO

Os estudos de atividade antifúngica feitos na forma de microdiluição em caldo nos permitem avaliar a capacidade que uma dada formulação tem em combater um determinado fungo ao longo de uma faixa de concentração conhecida de fármaco conhecida. Embora organismos como a CLSI publiquem diretrizes padronizando diversos tipos de ensaios de sensibilidade e atividade microbiana, estes são montados como base em formulações comerciais dos fármacos. Porém, a metodologia utilizada se mostra válida e é usualmente replicada e citada em ensaios avaliando atividade antifúngica (por exemplo) de formulações em desenvolvimento, como é o caso.

De acordo com o guia M27-A2, acima de 1 µg/mL a maioria das variedades de *Candida spp.* se apresenta inibida pela ação do VOR. Para estipular a concentração inibitória mínima (CIM) para as formulações preparadas, os ensaios foram montados com uma faixa de concentração de VOR nas formulações que variava entre 0,008 e 16,67 µg/mL.

Os ensaios foram realizados com quatro formulações: LPS-VOR, LPS-VOR(CS), SOL-VOR e LPS-BCO(CS) em triplicata para todas as concentrações. Controles de crescimento e esterilidade foram adicionados a cada placa de teste e seus resultados se mostraram de acordo (presença de crescimento no controle de crescimento e ausência de crescimento no controle de esterilidade) demonstrando que não houve contaminação das placas ao longo das 24 horas de estudo.

O comportamento das formulações frente a presença do fungo foi o mesmo, com exceção da formulação que não possuía fármaco: a análise das placas revelou diminuição acentuada do crescimento fúngico entre os poços 8 e 7 da placa de diluição, que representavam as concentrações de 0,13 e 0,26 µg/mL. A formulação sem fármaco, como esperado, não foi capaz de inibir o fungo em nenhuma proporção, salvaguardando as formulações testadas, quanto a possibilidade de inibição do crescimento fúngico por parte de quaisquer outros componentes da formulação, que não o fármaco em si.

A equivalência da capacidade inibitória das formulações LPS-VOR e LPS-VOR(CS) frente ao fármaco em solução (SOL-VOR) é mais um indicativo da não interferência (positiva ou negativa) da quitosana na formulação (desta vez, sob o aspecto da atividade antifúngica).

5.6. RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

A produção, tanto de lipossomas contendo VOR, quanto de nanossistemas de lipossomas contendo VOR, recobertos por quitosana, é um processo relativamente simples e rápido e que se mostrou robusto de acordo com os parâmetros de razão fármaco:lipídeo e concentração de quitosana estabelecidos. Ambas as formulações se apresentaram com baixo índice de polidispersividade, tamanho de partícula entorno de 100 nm e eficiência de encapsulação e taxa de recuperação do fármaco da formulação acima dos 60%, o que demonstra a homogeneidade da formulação final.

Analisando os dados obtidos neste trabalho, vê-se que a utilização de sistemas de liberação para o carregamento de VOR até a córnea traz benefícios, como o aumento da retenção do fármaco nesta matriz biológica, onde seu efeito é esperado.

Além disso, as concentrações de VOR retidas na córnea ultrapassaram, com uma boa margem, as concentrações de fármaco necessárias para se notar redução acentuada do crescimento fúngico para *C. glabrata* e ultrapassam as CIM encontradas na literatura para diversas espécies de fungos (MARANGON et al., 2004).

A utilização da iontoforese associada às formulações preparadas não se apresentou, nos ensaios em que foi testada, como sendo de grande vantagem, porém, cabe-se ressaltar que diversos fatores fisiológicos podem gerar respostas alternativas quando do uso desta técnica (vide comparação da capacidade de difusão do fármaco quando a formulação encontrava-se sobre membrana sintética e matriz biológica). Ensaios mais completos, envolvendo aplicação de corrente associada ao uso das formulações em placa de cultura, por exemplo, poderá elucidar se as alterações promovidas pela corrente não possibilitariam uma infiltração mais eficiente do fármaco no meio e fosse capaz de reduzir a MIC.

Ensaios de irritabilidade em membrana corioalantóide de ovos de galinha (HET-CAM), bem como ensaios opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos (BCOP) por fluido lacrimal simulado foram realizados com amostras da formulação LPS-VOR. Estes ensaios são importantes ensaios para avaliação da segurança de formulações oftálmicas, como alternativas para testes *in vivo*. Os resultados do ensaio de HET-CAM, apontaram a formulação como “não irritante” e, apesar de índices de retenção de fármaco aproximadamente metade dos valores encontrados para a permeação estática, em córnea suína, esses valores ainda estão acima dos valores de CIM mencionados acima (DE SÁ et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

A incorporação do voriconazol em sistemas lipossomais é uma técnica promissora para o tratamento de doenças fúngicas oculares. Aplicações tópicas de lipossomas contendo voriconazol, revestidos ou não com quitosana, podem ser uma alternativa viável para um tratamento menos agressivo e mais confortável ao paciente. Estudos clínicos são necessários para confirmar a eficácia terapêutica destas formulações e estabelecer o regime terapêutico ideal.

7. REFERÊNCIAS

- AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale research letters**, v. 8, p. 102, 2013.
- ALVAREZ-DE-CARVALHO, A. C. et al. [Fungal keratitis in the State of Paraná-Brazil: clinical, epidemiological and diagnostic findings]. **Revista iberoamericana de micología**, v. 18, n. 2, p. 76–8, jun. 2001.
- ANDERSEN, T. et al. Pectosomes and chitosomes as delivery systems for metronidazole: The one-pot preparation method. **Pharmaceutics**, v. 5, p. 445–456, 2013.
- ANVISA. **Resolução RE nº 899/2003**. Disponível em: <<http://goo.gl/ViYgDN>>. Acesso em: 19 out. 2015.
- BANITT, M. et al. **A case of polymicrobial keratitis violating an intact lens capsule**. *Cornea*, 2008.
- BASHIR, G.; HUSSAIN, W.; RIZVI, A. Bipolaris hawaiiensis keratomycosis and endophthalmitis. **Mycopathologia**, v. 167, p. 51–53, 2009.
- BHARATHI, M. J. et al. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. **Indian journal of ophthalmology**, v. 51, p. 315–321, 2003.
- BUCHANAN, C. M. et al. Solubility and dissolution studies of antifungal drug:hydroxybutenyl- β -cyclodextrin complexes. **Cellulose**, v. 14, n. 1, p. 35–47, 26 jul. 2006.
- BUNYA, V. Y. et al. Topical and oral voriconazole in the treatment of fungal keratitis. **American journal of ophthalmology**, v. 143, n. 1, p. 151–3, jan. 2007.
- BURNETTE, R. R.; ONGPIPATTANAKUL, B. Characterization of the permselective properties of excised human skin during iontophoresis. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 76, n. 10, p. 765–73, out. 1987.
- CHOLKAR, K.; DASARI, S. R. Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery. In: **Ocular Transporters and Receptors**. 1. ed. Woodhead Publishing, 2013. p. 1–36.
- CHOLKAR, K.; DASARI, S. R.; PAL, D. **Ocular Transporters and Receptors**. Elsevier, 2013.
- CLODE, A. B. et al. Evaluation of concentration of voriconazole in aqueous humor after topical and oral administration in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 296–301, 2006.
- DE LA FUENTE, M. et al. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 100–17, 31 jan. 2010.
- DE SÁ, F. A. P. et al. Liposomal voriconazole (VOR) formulation for improved ocular delivery. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 133, p. 331–8, 1 set. 2015.

- DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of cataract and refractive surgery**, v. 37, n. 3, p. 588–98, mar. 2011.
- DIEBOLD, Y. et al. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). **Biomaterials**, v. 28, n. 8, p. 1553–64, mar. 2007.
- DURAND, M. L. et al. **Successful treatment of Fusarium endophthalmitis with voriconazole and Aspergillus endophthalmitis with voriconazole plus caspofungin** *American Journal of Ophthalmology*, 2005.
- EBRAHIM, S.; PEYMAN, G. A.; LEE, P. J. **Applications of liposomes in ophthalmology** *Survey of Ophthalmology*, 2005.
- EL-BADRY, M.; FETIH, G.; SHAKEEL, F. Comparative topical delivery of antifungal drug croconazole using liposome and micro-emulsion-based gel formulations. v. 7544, n. 1, p. 34–43, 2014.
- ELJARRAT-BINSTOCK, E.; DOMB, A. J. Iontophoresis: a non-invasive ocular drug delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 110, n. 3, p. 479–89, 21 fev. 2006.
- EPAULARD, O. et al. **Phototoxicity and photocarcinogenesis associated with voriconazole** *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2011.
- ERLANGER, G. Iontophoresis, a Scientific and Practical Tool in Ophthalmology. **Ophthalmologica**, v. 128, n. 4, p. 232–246, 1 jul. 1954.
- FERREIRA, F. S. **Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação da Atividade Antiproliferativa de Paclitaxel e Rapamicina em Lipossomas Alvo-Específicos Contra Células de Câncer de Mama HER2-Positivas**. Universidade Federal de Goiás - UFG, 2012.
- FORRESTER, J. V. et al. The eye. In: **The Eye**. 4. ed. Elsevier, 2016a. p. 486–538.e1.
- FORRESTER, J. V. et al. Biochemistry and cell biology. In: **The Eye**. 4. ed. Elsevier, 2016b. p. 157–268.e4.
- FRISKEN, B. J.; ASMAN, C.; PATTY, P. J. Studies of Vesicle Extrusion. **Langmuir**, v. 16, n. 3, p. 928–933, fev. 2000.
- GALARRETA, D. J. et al. Fungal keratitis in London: microbiological and clinical evaluation. **Cornea**, v. 26, p. 1082–1086, 2007.
- GARBUZENKO, O. et al. Electrostatics of PEGylated micelles and liposomes containing charged and neutral lipopolymers. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 21, n. 6, p. 2560–8, 15 mar. 2005.
- GAUDANA, R. et al. Ocular drug delivery. **The AAPS journal**, v. 12, n. 3, p. 348–60, set. 2010.
- GELFUSO, G. M. et al. **Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate** *Journal of Microencapsulation*, 2011.

- GELFUSO, G. M. *Therapeutic Delivery*. v. 5, p. 493–496, 2014.
- GODOY, P. et al. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4494–4497, 2004.
- GÓMEZ-LÓPEZ, A. et al. **Voriconazole serum levels measured by high-performance liquid chromatography: a monocentric study in treated patients** *Medical Mycology*, 2012.
- GONÇALVES, M. C. F. et al. Chitosan coated liposomes as an innovative nanocarrier for drugs. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 240–50, abr. 2012.
- GOPINATHAN, U. et al. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. **Indian journal of ophthalmology**, v. 57, n. 4, p. 273–9, 1 jan. 2009.
- GRATIERI, T. et al. Excised Porcine Cornea Integrity Evaluation in an in vitro Model of Iontophoretic Ocular Research. **Ophthalmic Research**, v. 43, n. 4, p. 208–216, jan. 2010a.
- GRATIERI, T. et al. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 186–93, jun. 2010b.
- GRATIERI, T. et al. Current efforts and the potential of nanomedicine in treating fungal keratitis. **Expert Review of Ophthalmology**, v. 5, n. 3, p. 365–384, 9 jun. 2010c.
- GRATIERI, T. et al. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 320–7, out. 2011.
- GRATIERI, T. et al. Iontophoretic transport kinetics of ketorolac in vitro and in vivo: demonstrating local enhanced topical drug delivery to muscle. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 86, n. 2, p. 219–26, fev. 2014.
- GREEN, P. G. et al. Iontophoretic delivery of a series of tripeptides across the skin in vitro. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 9, p. 1121–7, set. 1991.
- GREGORIADIS, G. **Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques**. CRC Press, 2006.
- HABIB, F. S. et al. Liposomes as an ocular delivery system of fluconazole: in-vitro studies. **Acta ophthalmologica**, v. 88, n. 8, p. 901–4, dez. 2010.
- HABIB, F. S.; FOUAD, E. A.; FATHALLA, D. Liposomes as an ocular delivery system for fluconazole: in-vivo study. **Bull Pharm Sci**, v. 31, n. 2, p. 249–263, 2008.
- HAGAN, M. et al. Causes of suppurative keratitis in Ghana. **The British journal of ophthalmology**, v. 79, p. 1024–1028, 1995.
- HARIPRASAD, S. M. et al. Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: a review of current literature. **The British journal of ophthalmology**, v. 92, n. 7, p. 871–8, jul. 2008.

HATHOUT, R. M. et al. Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 1, p. 1, 2007a.

HATHOUT, R. M. et al. Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 1, p. 1, jan. 2007b.

HIRSJÄRVI, S. et al. Layer-by-layer surface modification of lipid nanocapsules. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 76, n. 2, p. 200–7, out. 2010.

HSIAO, M. et al. Design and characterization of a novel amphiphilic chitosan nanocapsule-based thermo-gelling biogel with sustained in vivo release of the hydrophilic anti-epilepsy drug ethosuximide. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 942–948, 2012.

IBRAHIM, M. M. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Ceratite Fúngica Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Ceratite Fúngica. 2008.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Disponível em: <<http://goo.gl/7C3uXj>>. Acesso em: 23 out. 2015.

IQBAL, N. J. et al. Determination of in vitro susceptibility of ocular Fusarium spp. isolates from keratitis cases and comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 and E test methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 348–350, 2008.

JÄRVINEN, K.; JÄRVINEN, T.; URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3–19, ago. 1995.

JOHNSON, L. B.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 36, n. 5, p. 630–7, 1 mar. 2003.

KADIKOY, H. et al. **Persistent photopsia following course of oral voriconazole.** **Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics**, 2010.

KAUR, I. P. et al. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 1–14, jan. 2004.

KAUR, I. P.; RANA, C.; SINGH, H. Development of effective ocular preparations of antifungal agents. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 481–93, out. 2008.

KHAIRALLAH, S. H.; BYRNE, K. A.; TABBARA, K. F. Fungal keratitis in Saudi Arabia. **Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology**, v. 79, p. 269–276, 1992.

KINOSHITA, J. et al. Mechanism of voriconazole-induced transient visual disturbance: Reversible dysfunction of retinal ON-bipolar cells in monkeys. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 52, p. 5058–5063, 2011.

KINOSHITA, S. et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. **Progress in**

retinal and eye research, v. 20, n. 5, p. 639–73, set. 2001.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2010.

LECK, A. K. et al. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. **The British journal of ophthalmology**, v. 86, p. 1211–1215, 2002.

LI, N. et al. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, p. 131–138, 2009.

LIESEGANG, T. J.; FORSTER, R. K. Spectrum of microbial keratitis in South Florida. **American journal of ophthalmology**, v. 90, p. 38–47, 1980.

LORIN, A. et al. Les liposomes : description, fabrication et applications. v. 8, n. 3, p. 163–176, 2004.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595–639, 3 nov. 2005.

MALHOTRA, M. et al. Development and characterization of chitosan- PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. p. 2041–2052, 2013.

MANISH, K.; KULKARNI, G. T. Recent advances in ophthalmic drug delivery system. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 387–394, 2012.

MARANGON, F. B. et al. In vitro investigation of voriconazole susceptibility for keratitis and endophthalmitis fungal pathogens. **American journal of ophthalmology**, v. 137, n. 5, p. 820–5, maio 2004.

MAURICE, D. M. The structure and transparency of the cornea. **The Journal of physiology**, v. 136, n. 2, p. 263–86, 30 abr. 1957.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 858, n. 1, p. 161–168, jun. 1986.

MCLINPHARM, D. L. et al. Penetration of 1% voriconazole eye drops into human vitreous humour: A prospective, open-label study. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 37, p. 197–200, 2009.

MEISNER, D.; MEZEI, M. Liposome ocular delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 95, p. 75–93, ago. 1995.

MISRA, R.; MALIK, A.; SINGHAL, S. Comparison of the activities of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical and environmental isolates of *Aspergillus* species. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 54, n. 1, p. 112–6, jan. .

MUFAMADI, M. S. et al. A review on composite liposomal technologies for specialized drug

delivery. **Journal of drug delivery**, v. 2011, p. 939851, jan. 2011.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras: Norma Aprovada - Segunda Edição**. Disponível em: <<http://goo.gl/YnNVUc>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

OZDEMIR, H. G. et al. **Antifungal susceptibility of ocular fungal pathogens recovered from around the world against itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and caspofungin** *Medical Mycology*, 2012.

PATEL, A. et al. Ocular drug delivery systems: An overview. **World journal of pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 47–64, jan. 2013.

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

PATTY, P. J.; FRISKEN, B. J. The pressure-dependence of the size of extruded vesicles. **Biophysical journal**, v. 85, n. 2, p. 996–1004, ago. 2003.

PEREA, S. et al. Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1209–1213, 2000.

SABO, J. A.; ABDEL-RAHMAN, S. M. Voriconazole: a new triazole antifungal. **The Annals of pharmacotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1032–43, set. 2000.

SAHOO, S. K.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 3-4, p. 144–51, fev. 2008.

SALERA, C. M. et al. Perfil das ceratites fúngicas no Hospital São Geraldo Belo Horizonte - MG. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 65, n. 65, p. 15–19, 2002.

SANATI, H. et al. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2492–2496, 1997.

SCHOENWALD, R. D. Ocular drug delivery. Pharmacokinetic considerations. **Clinical pharmacokinetics**, v. 18, n. 4, p. 255–69, abr. 1990.

SENTHILKUMARI, S. et al. Single and multidose ocular kinetics and stability analysis of extemporaneous formulation of topical voriconazole in humans. **Current eye research**, v. 35, p. 953–960, 2010.

SHEN, Y. C. et al. Clearance of intravitreal voriconazole. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 48, p. 2238–2241, 2007.

SHOEIBI, N.; MAHDIZADEH, M.; SHAFIEE, M. Iontophoresis in ophthalmology: A review of the literature. **Reviews in Clinical Medicine**, v. 1, n. 4, p. 183–188, 1 jul. 2014.

SHUKLA, P. K.; KUMAR, M.; KESHAVA, G. B. S. Mycotic keratitis: an overview of diagnosis and therapy. **Mycoses**, v. 51, n. 3, p. 183–99, maio 2008.

- SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Yeasts maintenance for freezing at -20°C . **Rev. bras. anal. clin.**, v. 40, n. 1, p. 73–74, 2008.
- SINHA, V. R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1–33, 15 abr. 2004.
- SIRIKUL, T. et al. Predisposing factors and etiologic diagnosis of ulcerative keratitis. **Cornea**, v. 27, p. 283–287, 2008.
- SMERDON, D. Anatomy of the eye and orbit. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 11, n. 6, p. 286–292, dez. 2000.
- STEINMANN, J. et al. Comparison and evaluation of a novel bioassay and high-performance liquid chromatography for the clinical measurement of serum voriconazole concentrations. **Mycoses**, v. 54, p. e421–e428, 2011.
- STRICTO, S. In Vitro Activities of Amphotericin B , Terbinafine , and Azole Drugs against Clinical and Environmental Isolates of *Aspergillus terreus*. v. 59, n. 6, p. 3619–3622, 2015.
- TANIGUCHI, K. et al. Assessment of ocular irritability of liposome preparations. . **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, v. 11, n. 9, p. 607–611, 19 fev. 1988.
- TANURE, M. A. et al. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania. **Cornea**, v. 19, p. 307–312, 2000.
- THEW, M. R. J.; TODD, B. Fungal keratitis in far north Queensland, Australia. **Clinical & experimental ophthalmology**, v. 36, p. 721–724, 2008.
- THIEL, M. A. et al. A simple corneal perfusion chamber for drug penetration and toxicity studies. **The British journal of ophthalmology**, v. 85, p. 450–453, 2001.
- THOMAS, P. A; KALIAMURTHY, J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. **Clinical microbiology and infection**, v. 19, n. 3, p. 210–20, mar. 2013.
- TODOKORO, D. et al. Topical voriconazole therapy of *Purpureocillium lilacinum* keratitis that occurred in disposable soft contact lens wearers. **International ophthalmology**, v. 34, n. 5, p. 1159–63, out. 2014.
- TUFT, S. J.; TULLO, A. B. Fungal keratitis in the United Kingdom 2003-2005. **Eye (London, England)**, v. 23, p. 1308–1313, 2009.
- VEMULAKONDA, G. A. et al. Aqueous and vitreous concentrations following topical administration of 1% voriconazole in humans. **Archives of ophthalmology**, v. 126, p. 18–22, 2008.
- WEI, C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* infectious keratitis in a high oxygen transmissible rigid contact lens rabbit model. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 55, n. 9, p. 5890–9, set. 2014.
- WEI, G. et al. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: The rheological and gamma scintigraphic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 65–74,

2002.

XIE, L. et al. Spectrum of fungal keratitis in north China. **Ophthalmology**, v. 113, n. 11, p. 1943–8, nov. 2006.

ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 104–20, jan. 2013.