



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0704816-5 B1



* B R P I 0 7 0 4 8 1 6 B 1 *

(22) Data do Depósito: 17/12/2007

(45) Data de Concessão: 24/09/2020

(54) Título: FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA

(51) Int.Cl.: A61K 31/7048; A61K 9/127.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ.

(72) Inventor(es): EDEILZA GOMES BRESCANSIN; FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE.

(57) Resumo: FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA A presente invenção trata do desenvolvimento de formulação lipossomal, contendo a Nistatina destinada a aplicações em micoses sistêmicas, bem como, diminuir a toxicidade do fármaco quando aplicado na forma parenteral. A invenção é capaz de carrear o antifúngico Nistatina e promover uma liberação sustentada do referido fármaco. O invento envolve o preparo de formulação lipossomal com uma composição em percentagem molar de: 70% de Fosfatidilcolina hidrogenada (HSPC); 20% de Colesterol; 10% de Diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), 1,3% de 2,6 - bis (1,1-dimetil) - 4 - metil fenol (BHT) e 7% de Nistatina, a caracterização físico-química do sistema e a investigação da atividade biológica, pelo teste de susceptibilidade. As preparações foram testadas com leveduras dos gêneros Candida e Cryptococcus. A formulação lipossomal com o fármaco nistatina aplica-se, especialmente, aos indivíduos portadores de micoses sistêmicas, tais como: os imunodeprimidos.

FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA

Introdução

A presente invenção trata do desenvolvimento de formulação lipossomal, contendo a Nistatina destinada a aplicações em micoses sistêmicas, diminuindo a toxicidade do fármaco quando aplicado na forma parenteral. A invenção é capaz de carrear o antifúngico Nistatina e promover uma liberação sustentada do referido fármaco.

A Nistatina (NIS) ($C_{47}H_{75}NO_{17}$) ou fungicidina (massa molar 926,13 g/mol) é um antibiótico antifúngico extraído principalmente de culturas de *Streptomyces nursei*. A NIS é pouco solúvel na água e solventes orgânicos, mas solúvel em dimetilformamida e dimetilsulfóxido.

Os antibióticos poliênicos constituem um grupo de substâncias ativas contra os fungos. Apresentam ação fungistática e fungicida sobre organismos sensíveis. O mecanismo de ação da NIS e de outros antibióticos poliênicos caracteriza-se pela sua ligação ao ergosterol presente na membrana citoplasmática de fungos sensíveis, resultando em alterações na permeabilidade da membrana pela formação de poros intramembranares, ocasionando perda dos componentes vitais intracelulares, tais como íons e pequenas moléculas, resultando na morte celular.

Em geral, os antibióticos poliênicos têm maior afinidade pelo esterol fúngico, o ergosterol, do que o das células de mamíferos, o colesterol. Todavia, a afinidade dos antifúngicos poliênicos por esteróis promove os efeitos colaterais observados para essa classe de fármacos. Quando os antibióticos poliênicos são administrados por via intramuscular e intravenosa são capazes de causar hemólise, necrose e abscessos frios nos locais de injeção. Isto se deve à imediata ligação do fármaco aos esteróis das membranas das hemácias e células tissulares, causando sua destruição.

A formulação lipossomal, objeto do presente pedido, com o antifúngico poliênico Nistatina é uma preparação destinada a aplicações na terapêutica de micoses sistêmicas, que tanto afligem indivíduos imunodeprimidos.

Os lipossomas são vesículas lipídicas microscópicas, onde uma fase aquosa é totalmente cercada por uma ou mais lamelas (bicamadas de fosfolipídios), constituindo, um dos sistemas mais importantes para encapsulação e liberação sustentada de fármacos *in vivo*.

Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas constituídas de uma parte ionizável hidrofílica, denominada cabeça polar e caudas hidrofóbicas de duas cadeias de ácido graxo.

Em geral, as moléculas de fosfolipídios são insolúveis em água e nesse meio formam estruturas agregadas decorrentes da organização das moléculas, onde as caudas hidrofóbicas excluem a água e as cabeças hidrofílicas formam ligação com a mesma. Assim no lipossoma, a parte hidrofílica do fosfolipídio será seletivamente hidratada e as cadeias hidrocarbônicas hidrofóbicas preferem ficar escondidas no interior da estrutura formada, ou seja, minimiza-se contato com meio aquoso. As moléculas de fosfolipídios se mantêm juntas, lado a lado formando “folhetos” separados por compartimentos aquosos, denominados lamelas. Dependendo do número de lamelas contidas nos lipossomas, estes podem ser classificados em multilamelares, MLV (várias lamelas separadas por compartimentos aquosos) ou unilamelares com uma única lamela.

Os lipossomas unilamelares podem ser classificados pelo tamanho; grandes e pequenos (LUV) e (SUV), respectivamente. Na **Tabela 1**, tem-se a classificação de lipossomas de acordo com seus parâmetros estruturais (tamanho e número de lamelas) (BERENHOLZ, Y.; CROMMELIN, D.J.A. *In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, New York: Marcel Dekker, p. 1-39, 1994.).

Tabela 1 – Classificação de lipossomas, baseada em parâmetros estruturais.

Classificação do Lipossoma	Tamanho
MLV – Vesículas Multilamelares	> 0,5µm
OLV – Vesículas Oligolamelares	0,1-1µm
UV - Vesículas Unilamelares	Todos os tamanhos
SUV – Vesículas Unilamelares pequenas	20-100nm
LUV – Vesículas Unilamelar grande	> 100nm
GUV – Vesículas Unilamelares gigantes	> 1µm
MVV – Vesículas Multivesicular	> 1µm

Os lipossomas podem encapsular ingredientes anfífilicos, como a Nistatina, nas bicamadas lipídicas, liberando o referido fármaco de forma controlada. Os sistemas lipossomais são atóxicos, pouco imunogênicos, biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que quando alcançam os tecidos que necessitam de tratamento podem liberar doses concentradas de fármaco aumentando sua ação terapêutica. Entretanto, ao circularem na corrente sanguínea, os lipossomas, principalmente os convencionais, funcionam como corpos estranhos, sendo rapidamente atacados pelos macrófagos que, assim, passam a transportar os fármacos,

anteriormente, veiculados nos lipossomas. Desta forma é que compostos antimicrobianos, como antifúngicos lipossomados, podem penetrar em células do sistema mononuclear fagocitário onde microrganismos patogênicos (fungos) residem, causando a morte do agente microbiano.

5 Estado da técnica

Realizando buscas em bases públicas de consulta de patentes, encontramos no USPTO a patente US 6770290 que apresenta semelhanças com o presente invento. Entretanto as razões molares de lipídios e fármaco nas 7 formulações lipossomais propostas diferem do presente invento. As proporções empregadas dos lipídios fosfatidilcolina hidrogenada (HSPC), colesterol (Col), diestearoilfosfatilglicerol (DSPG) e Fármaco (F) foram, respectivamente: 2:1:0:0,4 / 2:1:0,2:0,4 / 2:1:0,4:0,4 / 2:1:0,8:0,4 / 2:0,5:0,8:0,4 / 2:1,5:0,8:0,4 / 2:1:1:0,4. Porém, o presente invento propõe as formulações: 3,5:1:0,5:0,33 ou 1,75:0,5:0,25:0,166 ou 5,25:1,5:1:0,667. A patente citada também foi desenvolvida para o fármaco Anfotericina B e o presente invento para a Nistatina. Outras diferenças encontradas entre os inventos são: a metodologia de preparo das formulações, que associa o DSPG na forma de sal sódico com o fármaco a ser encapsulado, em meio ácido e solubiliza-se em solventes orgânicos, para posterior incorporação dos outros lipídios também dissolvidos nos mesmos solventes. Em nosso invento misturamos todos os lipídios e o fármaco e dissolvemos todos os constituintes da formulação nos solventes orgânicos. Ainda verificamos a ausência de conservante nas formulações da patente US6770290.

Verificamos também o preparo de formulações lipossomais contendo antifúngicos poliênicos nas patentes US 5032404 e US 4812312. Essas patentes empregaram lipídios diferentes dos que foram empregados em nosso invento. A primeira patente citada empregou: DMPC (dimeristoilfosfatidilcolina), DMPG (dimeristoilfosfatidilglicerol), PC de ovo (fosfaticolina de ovo), DPPC (dipalmitoilfosfatilcolina), PE (fosfatiletanolamina), DOPC (dideoilfosfatidilcolina), DEPC (dielaidilfosfatidilcolina) e Col (colesterol), nas proporções molares: DMPC:DMPG:Col (6:3:1), DMPC:Col (9:1), PC de ovo:Col (9:1), DPPC:Col (9:1), DPPC:PE:Col (6,5:2,5:1), DOPC:Col (9:1), DOPC:PE:Col (6:3:1), DEPC:Col (9:1) e DEPC:PE:Col (6,5:2,5:1). Já a patente US 4812312 empregou formulação compostos de DMPC e DMPG na proporção mássica de (7:3), respectivamente. A nossa proposta emprega os lipídios e proporções molares: HSPC:Col:DSPG (7:2:1).

Uma formulação lipossomal de Nistatina (NYOTRAN[®]) foi preparada pela Aronex

Pharmaceuticals, provavelmente ligada a patente US 5032404. A referida formulação, que se encontra em fase clínica III, é composta dos lipídios Dimiristoilfosfatidilcolina (“DMPC”) e Dimiristoilfosfatidilglicerol (“DMPG”) em uma razão mássica de 7:3 de Nistatina (F). A formulação apresenta tamanho de partículas que variam de 0,1 a 3 μM e as propriedades físicas da formulação ainda não estão bem compreendidas. O presente invento propõe a formulação lipossomal com Nistatina na razão mássica de HSPC:Col:DSPG:F (8,398:1,161:1,200:0,926), tamanho de partícula de cerca de 60 nm.

O presente invento, devido ao reduzido tamanho das vesículas lipossomais, tem como vantagem em relação à formulação do NYOTRAN[®] um maior tempo de circulação na corrente sanguínea, após a administração parenteral da formulação, garantindo uma liberação sustentada do fármaco encapsulado.

Funcionamento e aplicação do invento

O invento consiste de forma farmacêutica parenteral do fármaco Nistatina lipossomada, que lançada no mercado industrial, promoverá a liberação sustentada do fármaco, que se apresenta, atualmente, nas formas farmacêuticas orais (suspensões e drágeas) e tópicas (cremes e pomadas). O presente invento poderá ser aplicado na área de saúde, tendo com alvo o tratamento de micoses sistêmicas.

Após a administração intravenosa da Nistatina lipossomada, os lipossomas funcionam como corpos estranhos, sendo rapidamente atacados pelos macrófagos. Os antifúngicos, desta forma, penetram nas células do sistema mononuclear fagocitário onde microrganismos patogênicos residem, causando a morte do agente microbiano, sendo este um exemplo de direcionamento passivo de compostos para células do sistema imune. A literatura contém muitos exemplos de aplicações com sucesso de lipossomas convencionais, tendo como alvo macrófagos infectados, como na vetorização de agentes antimicrobianos e de imunomoduladores que vão aumentar a capacidade dos macrófagos em destruir células neoplásicas e aumentar a resistência contra microrganismos infecciosos.

O invento é um produto que poderá ser explorado pelo mercado industrial farmacêutico. A Nistatina lipossomada para aplicação parenteral, representa uma inovação na liberação sustentada do fármaco que se apresenta, atualmente, em formas farmacêuticas orais e tópicas.

Descrição detalhada do invento

A presente invenção consiste em sistema lipossomal convencional, unilamelar capaz de

carrear o antifúngico Nistatina e promover uma liberação sustentada do referido fármaco. O invento envolve o preparo de formulação lipossomal com uma composição em percentagem molar de: 70% de Fosfatidilcolina hidrogenada (HSPC); 20% de Colesterol; 10% de Diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), 1,3% de 2,6 - bis (1,1-dimetil) - 4 - metil fenol (BHT) e 7% de Nistatina. Para a avaliação da formulação foi realizada uma caracterização físico-química do sistema e a investigação da atividade biológica, pelo teste de susceptibilidade. As preparações foram desafiadas contra leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

A preparação da formulação lipossomal foi obtida pelo método do filme seco. A Nistatina e os lipídios HSPC, colesterol e DSPG foram dissolvidos em clorofórmio:metanol (1:1; v:v), numa razão molar entre os lipídios de 7:2:1, numa concentração de 15 mM e 1 mM de fármaco. Empregamos como conservante o BHT numa concentração de 1,3% em relação à massa de fármaco utilizado na formulação. Os solventes foram evaporados em rotaevaporador à pressão reduzida, em temperatura de 55°C. O filme seco obtido foi mantido por pelo menos 1 hora sob vácuo, para eliminação de resíduos de solventes orgânicos. O filme foi hidratado nas temperaturas 55°C a 60°C, no qual foi empregado o tampão succinato (0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6) em salina. No final da hidratação foram preparadas suspensões lipossomais multilamelares. Obtivemos também outras formulações empregando HSPC, colesterol e DSPG com concentração de 15 mM e 1 mM de fármaco e 1,3% de BHT, nas seguintes proporções molares: HSPC/Colesterol (12:3) e HSPC/DSPG (10,5:4,5). Foram utilizadas as mesmas condições de preparo descritas na primeira formulação.

A formulação com HSPC, Colesterol e DSPG, nas proporções molares (7:2:1), foi tratada objetivando obter-se vesículas menores ou unilamelares. As suspensões lipossomais foram ultracentrifugadas e sonicadas para a diminuição do tamanho das vesículas. As amostras foram ultracentrifugadas a 112.240,71 x g a 20 °C/2 h. A sonicação foi realizada em sonificador de ponte durante 10 min (3, 3 e 4 min com pausas de 1 min), mantendo as amostras em banho de gelo. A potência foi de 40 W. As soluções coloidais sonicadas foram centrifugadas a 9438,65 x g/10min/10°C para retirada das partículas de titânio e fármaco livre. O sobrenadante, contendo os lipossomas de diâmetro pequeno (unilamelares) e com fármaco encapsulado, foi recolhido e passou por recozimento 60°C/20 min. Em seguida a suspensão lipossomal unilamelar foi caracterizada por análises do teor de Nistatina encapsulada (eficiência de encapsulação), teor de fosfolípido total, determinação do tamanho e carga superficial das vesículas lipossomais, investigação da encapsulação pela análise do

grau de anisotropia de fluorescência e avaliação da atividade antifúngica.

A suspensão lipossomal unilamelar obtida (HSPC:colesterol:DSPG (7:2:1)) foi hidratada a 55°C e 60°C e denominadas L1 e L2, respectivamente. As preparações L1 e L2 foram caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação (análise por CLAE), determinação do teor (%) de fosfolípidios totais, raio hidrodinâmico, potencial zeta das partículas, grau de anisotropia da Nistatina e avaliação da atividade antifúngica de suspensões lipossomais.

O teor de Nistatina encapsulada foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As soluções metanólicas de Nistatina (10 µg/mL) foram analisadas em sistemas cromatográficos semelhantes aos descritos por Coutinho e Prieto, (1995), nos quais foi utilizado como fase móvel metanol:tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹; pH 5,6 (70:30; v:v; fluxo: 1 mL/min); coluna C18 250x4,6 mmx1/4", termostaticada a 35 °C, detector de UV/V em 304 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Foram obtidas curvas de calibração para avaliar a correlação linear das áreas em relação ao intervalo de concentração empregado. Na Tabela 2 apresentamos os teores percentuais de Nistatina encapsulada em preparações lipossomais, hidratadas a 55°C (L1) e 60°C (L2).

Tabela 2 – Teores de encapsulação de NIS em preparações lipossomais L1 e L2.

Suspensões Lipossomais	Eficiência de encapsulação - EE (%)
L1	28,9 ± 1,0%
L2	37,3 ± 1,7%

EE (%) = Massa de NIS encapsulada/massa de NIS total adicionada X 100

A determinação do teor (%) de fosfato ou fosfolípidios totais, presente em formulações lipossomais quantifica os fosfolípidios constituintes através da determinação do fósforo inorgânico. O método, segundo Bartlett prepara uma curva de calibração a partir de uma solução estoque de fosfato ácido de sódio heptahidratado (3,06 mM). Foram tomadas alíquotas dessa solução, diluídas, sendo obtidas novas soluções com concentrações de 0,25 a 1,51 mM. Amostras de suspensões lipossomais foram diluídas à concentração 1,00 mM.

Todas as soluções foram preparadas em tampão succinato 0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6 em salina em duplicata e todos os materiais e reagentes estavam livres de fosfato.

O rendimento médio das preparações lipossomais, L1 e L2 foi, respectivamente: 63,3 ± 0,1% e 57,7 ± 0,1. Os teores encontrados para as duas formulações fornecem massas de lípidios totais (massas de HSPC e DSPG) de 9,5 mM e 8,7 mM para L1 e L2.

A determinação do raio hidrodinâmico ou tamanho das vesículas lipossomais foi

obtido pelo método por espalhamento quase elástico da luz. As amostras foram diluídas em água deionizada e lidas a 25°C; com λ : 675,0 nm e ângulo de análise 90°. O tamanho das vesículas nas preparações lipossomais L1 e L2 foram determinandos 13 dias após o preparo das vesículas, obtendo-se os diâmetros médios de 64,3 nm para L1 e 68,1 nm para L2.

5 O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, sendo influenciado pelo meio dispersante, devido à dissociação de espécies iônicas presentes e constituintes das partículas. Na determinação do potencial zeta, as amostras de lipossomas foram diluídas, com solução de KCl 1×10^{-4} mol.L⁻¹, à concentração de 1 mg/mL. As amostras foram colocadas em
10 cuvetas de acrílico de 1,0 cm de caminho ótico, sendo obtidos os raios hidrodinâmicos e, depois, o potencial zeta. As formulações L1 e L2 tiveram os seguintes potenciais zeta médios: 35,31 \pm 1,54 mV e 42,50 \pm 0,8 mV.

A análise do grau de anisotropia se realizou da seguinte forma: solução estoque de Nistatina em metanol a 0,51 mM e suspensões lipossomais foram diluídas com tampão succinato 0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6 em salina, para se obter de soluções de concentrações 1,0 e 9,9
15 μ M. As medidas do grau de anisotropia de fluorescência em estado fixo foram determinadas por espectrofotometria de fluorescência, empregando um λ de excitação de 304 nm, de emissão de 416 nm e caminho ótico de 1,00 cm. A Nistatina na concentração de até 3 μ M em meio aquoso está na forma monomérica e, acima da referida concentração, na forma agregada. Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram os graus de anisotropia obtidos à
20 temperatura ambiente, para Nistatina em tampão succinato 0,02 mol.L⁻¹; pH 5,6 em salina, nas concentrações 1 e 9,9 μ M, ou seja, acima e abaixo de 3 μ M e ainda na presença das preparações L1 e L2.

Tabela 3. Grau de anisotropia de fluorescência (r) da Nistatina livre e encapsulada em lipossomas em tampão succinato (0,02mol.L⁻¹), isotônico, pH 5,6 a 25 °C.

25	Amostra	r
	NIS em tampão(1,0 μ M)	0,07
	NIS em tampão (9,9 μ M)	0,24
	NIS em lipossoma L1 (1,0 μ M)	0,40
	NIS em lipossoma L1 (9,9 μ M)	0,39
30	NIS em lipossoma L2 (1,0 μ M)	0,30
	NIS em lipossoma L2 (9,9 μ M)	0,26

Verifica-se um aumento do valor da anisotropia quando o composto passa do estado

monomérico ($r = 0,07$) para o estado agregado ($r = 0,24$), indicando maior impedimento estérico do estado agregado e, assim, menor liberdade rotacional da molécula do fármaco. Valores ainda maiores do grau de anisotropia foram observados quando a Nistatina foi incorporada nas formulações lipossomais L1 e L2 nas concentrações 1,0 (Nistatina no estado monomérico) e 9,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Nistatina agregada). Estes resultados indicam que o fato das moléculas estarem na forma monomérica ou agregada não interfere nos graus de anisotropia do fármaco em lipossomas. Entretanto, maiores valores do grau de anisotropia da Nistatina nas formulações lipossomais indicam restrições aos movimentos rotacionais das moléculas, causadas pela sua incorporação na bicamada lipídica, ou seja, o método pode estar confirmando a encapsulação do fármaco.

A análise da atividade antifúngica, também chamada “teste de susceptibilidade”, foi realizada com base nos procedimentos do método de microdiluição do NCCLS M27 - A (“National Committee for Clinical Laboratory Standards”). Foram testadas amostras comerciais, grau farmacêutico, de Nistatina pura (Lotes NT/C 645743, título 6636 UI/mg e 04102:2004, título: 6372,0 UI/mg) e amostras de lipossomas hidratados a 55 °C (L1) e a 60°C (L2) e lipossomas vazios em cada temperatura de hidratação. As Nistatinas puras foram dissolvidas em DMSO (1,3 mg/mL) e posteriormente submetidas à microdiluições empregando-se como diluente solução salina e obtendo-se as concentrações: 64,0; 32,0; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 $\mu\text{g/mL}$. As amostras lipossomais sonicadas foram previamente esterilizadas em membranas com poros de 0,22 μm e diluídas com salina nas concentrações: L1 (amostra hidratada a 55 °C) 270,0; 135,0; 67,5; 33,75; 16,88; 8,44; 4,22; 2,11; 1,05 e 0,53 $\mu\text{g/mL}$ e L2 (amostra hidratada a 60°C) 360,0; 180,0; 90,0; 45,0; 22,5; 11,25; 5,62; 2,81; 1,41 e 0,70 $\mu\text{g/mL}$. Os microrganismos empregados foram leveduras dos gêneros: *Candida* e *Cryptococcus*. Do gênero *Candida* foram *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 76615; *C. krusei* ATCC 6258; *C. parapsilosis* ATCC 22019. As do gênero *Cryptococcus* foram: *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. neoformans* LIF 217 (levedura isolada de licor de paciente do HC/UNICAMP). As leituras das placas de ELISA para análise da CIM (Concentração Inibitória Mínima, ou “MIC”) para as leveduras foram realizadas após 24/48 h (gêneros *Candida*) e 48/72 h para os *Cryptococcus* por leitura visual do crescimento do microrganismo testado (presença de turvação) após incubação a 35 °C. A determinação da CFM (Concentração Fungicida Mínima) foi feita da seguinte forma: após a determinação da MIC, foi retirada uma alíquota de 100 μl da diluição que apresentou o resultado do CIM (a

menor concentração que não apresentou crescimento visível) e a mesma foi plaqueada em ASD (Agar Saboraud Dextrose), por 48 h a 35 °C. A CFM foi tida como a concentração que não mostrou UFC (Unidade Formadora de Colônia) crescida na placa.

Nas Tabelas 4 e 5, há os resultados de “MIC” e CFM, sendo os resultados obtidos após um mês de preparo das formulações (L1 e L2). Foram testadas leveduras padrão dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Ainda testamos levedura isolada de licor de paciente do HC/UNICAMP, que foi identificada como LIF 217. A mesma pertence ao gênero *Cryptococcus* e foi resistente a Anfotericina B (Tabela 4).

Tabela 4 - “MIC”(µg/mL) e CFM (µg/mL) para dois lotes de NIS livre (NT/C 645743 e 04102/200a) e preparações lipossomais L1 e L2, empregando as espécies *albicans* e *krusei*.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	
	ATCC 90028		ATCC 76615		ATCC 6258	
	“MIC”	CFM	“MIC”	CFM	“MIC”	CFM
NIS 1 - livre	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0-8,0	4,0 - 16
NIS 3 - livre	2,0	2,0	1,0-2,0	1,0-2,0	4,0	4,0
Lipossomal - L1(55°C)	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69
Lipossomal - L2 (60°C)	1,13- 2,25	1,13-2,25	1,13	1,13	4,5	4,5

Tabela 5. “MIC”(µg/mL) e CFM (µg/mL) para dois lotes de NIS livre (NT/C 645743 e 04102/2004) e preparações lipossomais L1 e L2, empregando os gêneros *Candida* (*parapsilosis*) e *Cryptococcus*(*neoformans*).

	<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. neoformans</i>		<i>C. neoformans</i>	
	ATCC 22019		ATCC 90112		LIF217	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
NIS 1 - livre	4,0-8,0	4,0-8,0	2,0	2,0	2,0	4,0
NIS 3 - livre	4,0	4,0	2,0	2,0	4,0	4,0
Lipossomal L1(55°C)	1,69	1,69	0,84	0,84	1,69	3,38
Lipossomal L2 (60°C)	4,5	4,5	1,13	1,13	2,25	4,5

Os resultados indicam que a atividade biológica das formulações lipossomais é

superior à das formulações com NIS livre. No entanto, a formulação L1 apresentou maior atividade biológica do que L2. Os resultados de CIM e CFM para L1 indicam que a referida preparação é mais fungistática e fungicida do que L2 para os microrganismos padrões testados e *C. neoformans* LIF217.

5 Esses resultados são bastante satisfatórios e evidenciam o sucesso da NIS lipossomal frente ao fármaco livre para a ação antifúngica. Verifica-se também uma estabilidade das formulações lipossomais obtidas, pois mesmo após um mês de preparo elas ainda mostram atividade biológica maior do que a NIS livre.

Conclusão

10 A Nistatina é membro de grupo classificado como antibiótico antifúngico poliênico, que na prática clínica, é utilizada no tratamento de candidíases superficiais de pele e mucosas. O antibiótico praticamente não é absorvido por via oral, entretanto, devido a sua ação superficial local, é administrado oralmente em casos de candidíase bucal e intestinal. Quando o referido fármaco é administrado por via intramuscular e intravenosa é muito tóxico, sendo capaz de
15 causar hemólise, necrose e abscessos frios nos locais de injeção. Em muitos casos, a eficácia do antibiótico pode ser melhorada, e os efeitos colaterais reduzidos, encapsulando-o em algum tipo de transportador ou carreador, como os lipossomas. Idealmente, este deverá vetorizar o fármaco em concentração adequada e apenas no local onde o mesmo é necessário, evitando a sua perda, degradação e a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis.

20 Os sistemas lipossomais têm sido empregados para reduzir a toxicidade clínica sistêmica de fármacos aumentando, assim, a eficácia terapêutica de agentes antimicrobianos, antineoplásicos e outros compostos. A utilidade de formulações lipossomais em clínica médica é comprovada pela aprovação da agência controladora norte-americana, "Food and Drug Administration" (FDA), de formulações lipossomais para entrega de algumas
25 substâncias com atividade antineoplásica (DOXIL[®] com doxorubicina e DAUNOSOME[®] com daunorrubicina) e antifúngica (AMBISOME[®] com Anfotericina B), já comercializadas em várias partes do mundo. Da mesma forma, a FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA traz grande impacto no mercado farmacêutico, proporcionando
30 melhor qualidade de vida a indivíduos portadores de micoses sistêmicas, tais como: os imunodeprimidos.

REIVINDICAÇÕES

1. **FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA** caracterizada por ser composta em percentagem molar de 70% de Fosfatidilcolina hidrogenada (HSPC); 20% de Colesterol; 10% de Diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), 1,3% de 2,6 - bis (1,1-dimetil) - 4
5 - metil fenol (BHT) em relação à massa de fármaco na formulação e 7% de Nistatina em relação à concentração de lipídio, em tampão succinato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 5,6 em salina.
2. **FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA**, de acordo com a reivindicação 1, deu origem a preparação designadas L1, caracterizada por ser hidratada com
10 tampão succinato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 5,6 em salina a 55°C , apresentando uma eficiência de encapsulação de Nistatina de $28,9 \pm 1,0\%$, teor (%) fosfolipídios totais de: $63,3 \pm 0,1\%$, diâmetro médio das vesículas lipossomais de 64,3 nm e potencial zeta médio de $35,31 \pm 1,54$ mV.
3. **FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA**, de acordo com a reivindicação 1, deu origem a preparação designadas L2, caracterizada por ser hidratada com
15 tampão succinato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 5,6 em salina a 60°C , apresentando uma eficiência de encapsulação de Nistatina de $37,3 \pm 1,7\%$, teor (%) fosfolipídios totais de $57,7 \pm 0,1$, diâmetro médio das vesículas lipossomais de 68,1 nm e potencial zeta médio de $42,50 \pm 0,8$ mV.
4. **FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA**, de acordo com as
20 reivindicações 1, 2 e 3, obtida pelo método do filme seco, caracterizada por ser a Nistatina e os lipídios HSPC, colesterol e DSPG dissolvidos em clorofórmio:metanol (1:1; v:v), numa razão molar entre os lipídios de 7:2:1, numa concentração de 15 mM e 1 mM de fármaco; com a utilização do conservante BHT, numa concentração de 1,3% em relação à massa de fármaco utilizado na formulação e os solventes evaporados em rotaevaporador à pressão
25 reduzida, em temperatura de 55°C .
5. **FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA**, sendo o processo para obtenção dos lipossomas multilamelares caracterizado por ser o filme seco obtido na
reivindicação 4, mantido por pelo menos 1 hora sob vácuo, para eliminação de resíduos de solventes orgânicos e hidratado nas temperaturas 55°C a 60°C , sendo empregado o tampão
30 succinato ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 5,6) em salina como meio de hidratação. O referido meio de hidratação é adicionado no filme seco em três etapas, com velocidade de agitação designadas: lenta (20rpm), média (160rpm) e rápida (280rpm), cada uma com uma duração de 20 minutos.

6. **FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA**, de acordo com as reivindicações 4 e 5, os lipossomas multilamelares tratados para obtenção de lipossomas de menores tamanhos ou unilamelares caracterizado pelo processo descritos pelos itens abaixo:

- 5 - ultracentrifugação a 112.240,71 x g (quando usados 5ml) a 20°C/2h, para eliminação de eventuais compostos de degradação do fármaco (sobrenadante);
- em seguida, o pélete resultante é ressuspenso a 5ml;
- a suspensão lipossomal é sonicada em sonicadore de ponte por 10 minutos (3, 3 e 4 min, com pausa de 1min) a uma potência de 40W, mantendo as amostras em banho de gelo, obtendo-se a suspensão lipossomal unilamelar;
- 10 - os lipossomas unilamelares são centrifugados a 9438,65 x g/10min/10°C para retirada das partículas de titânio e fármaco livre;
- o sobrenadante contendo a suspensão de lipossomas de diâmetro pequeno, com o fármaco encapsulado passa por recozimento a 60°C/20 min.

7. **FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM O FÁRMACO NISTATINA**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6, caracterizada pelo uso da Nistatina lipossomada, aplicada na forma parenteral, aos indivíduos portadores de micoses sistêmicas.

19