

Marta Viegas Aguiar de Almeida

Anfotericina B e suas Formulações Lipídicas

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013



Marta Viegas Aguiar de Almeida

Anfotericina B e suas Formulações Lipídicas

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Marta Viegas Aguiar de Almeida

Anfotericina B e suas Formulações Lipídicas

Atesto à originalidade do trabalho:

---

Trabalho apresentado à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção  
do grau de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Professora Doutora Maria de Fátima Araújo Magalhães Cerqueira

Porto, 2013

## Sumário:

A Anfotericina B (AmB) apresenta-se como um agente antifúngico, cujo uso, está indicado em casos clínicos de carácter grave, como no caso de infeções fúngicas invasivas. Isto deve-se ao facto de, apesar da sua grande eficácia cientificamente testada, esta apresentar um certo grau de toxicidade, apresentando alguns efeitos adversos sérios, como é o caso da nefrotoxicidade.

Como modo de ultrapassar a desvantagem acima descrita para a molécula em questão, foram desenvolvidas, com recurso aos novos sistemas terapêuticos, formulações lipídicas que veiculassem a AmB, sendo os lipossomas, os complexos lipídicos e as dispersões coloidais, as formulações lipídicas mais frequentemente usadas e referidas na literatura. Estas formulações, tal como dito anteriormente, levam ao desenvolvimento de menos efeitos adversos, diminuindo sobretudo o grau de nefrotoxicidade, comparativamente à AmB convencional, bem como, a obtenção de um melhor perfil farmacocinético. No entanto, têm a desvantagem de serem demasiado dispendiosas.

Deste modo, pretende-se com esta monografia caraterizar e comparar a AmB convencional e as suas formulações lipídicas, analisando-se o ponto de vista molecular, o mecanismo de ação, aplicações, administração, farmacocinética, efeitos adversos, interações e resistências das preparações que aqui serão abordadas.

## Abstract:

AmB is presented as an antifungal agent whose use is indicated in clinical cases of serious nature as in the case of invasive fungal infections. This is due to the fact that, despite its high efficacy scientifically tested, it has a certain degree of toxicity, with some serious adverse effects, such as nephrotoxicity.

As a way of overcoming the disadvantage described above for the molecule in question, it was developed, with use of new therapeutic systems, lipid formulations that incorporate AmB, like, liposomes, lipid complexes and colloidal dispersions, as the lipid formulations most commonly used and reported in the literature. These formulations, as stated previously develop fewer side effects, especially the reduced level of nephrotoxicity, when compared the conventional one, as well as obtaining a better pharmacokinetic profile. However, as a disadvantage, they prove to be more expensive.

Thus, it is intended with this monograph, realize the characterization and comparison of conventional AmB and its lipid formulations, as well as, analyze the molecular point of view, the mechanism of action, applications, management, pharmacokinetics, adverse effects, interactions and resistance of the preparations that will be addressed here.

## Dedicatórias

Aos meus Pais, por todo o esforço feito por mim, neste meu percurso de longa data, por acreditarem em mim dando-me a oportunidade de adquirir outra formação académica, mas sobretudo pelo amor eterno, afeto e educação que sempre me inculcaram e continuam a inculcar, vocês são tudo para mim.

Aos meus avós, aos que graças a Deus ainda estão cá presentes e aos que Deus já levou. Dedico à minha Avó Mariazinha, por todo o amor que me tem, dado que cresci também contigo ao meu lado, por tudo o que me ensinaste e por me teres ajudado, para assim tirar esta formação. Ao meu Avô António, pelo amor que me deu enquanto em vida, e também pela doutrina que me passou para me tornar numa boa aluna, deixando-me tantas saudades. Ao meu Avô Artur, pelo carinho e pela atenção que tem para comigo ainda hoje. À minha falecida Avó Maria, por todos os momentos enquanto foi viva, me ter transmitido o seu afeto e os seus valores.

Dedico como é óbvio à minha Grande Irmã Tânia, pelo cuidado e por tudo que me ensina, mas mais do que isso, pelo amor que temos uma pela outra e por sempre nos apoiarmos, eu sei que posso contar contigo e tu comigo para sempre. Ao meu Fantástico Cunhado Nando, por ser tão especial na minha vida, e como não poderia deixar de ser, dedico ao orgulho da minha vida, ao meu Sobrinho e Afilhado, o meu Afonsinho!

Dedico sobretudo especial importância a alguém que iniciou esta etapa de vida comigo, e a finalizou também ao meu lado. Juntos passamos por este ciclo, juntos ficamos e juntos para sempre havemos de ficar, por isso dedico-te a ti Valdemar Leal, por seres tudo aquilo o que é mais importante na minha vida, por me ajudares tanto e estares sempre ao meu lado quando eu mais preciso. Sem ti nada seria igual!

Dedico à Natacha, por ter sido, e para sempre ser, a grande companheira de uma vida repleta de afeto!

## Agradecimentos:

Agradeço aos meus Pais e à minha Avó Mariazinha, pela dupla oportunidade que me foi dada, sem vocês não seria possível, obrigado pelo vosso carinho em todos os momentos.

Agradeço ao Valdemar, por todo o amor e pelo teu grande apoio na faculdade e na vida pessoal, que contribuiu sem dúvida para o meu sucesso escolar.

Ao longo deste meu magnífico percurso académico, que começou inicialmente por uma primeira passagem para a obtenção da licenciatura de Análises Clínicas e Saúde Pública, e mais tarde posterior retorno, à Universidade Fernando Pessoa, para obtenção deste último ciclo, posso dizer que desfrutei de uma espetacular experiência enquanto aluna, da qual só tenho boas recordações e deixo tantas saudades. Agradeço assim a toda a Instituição, pois sempre foram incansáveis comigo e me proporcionaram um ensino de grande nível, adorei estudar aqui!

Agradeço especialmente à minha Orientadora a Professora Doutora Fátima Cerqueira, que modéstia e à parte, foi sempre mais do que isso. Ao longo destes anos todos, recebia como Professora de várias cadeiras, Orientadora do Projeto e Orientadora de estágio do curso de Análises Clínicas, Orientadora ainda dos projetos de investigação elaborados na Universidade Fernando Pessoa e Orientadora do trabalho em questão. Será sempre uma pessoa especial de quem sempre me orgulharei de ter trabalhado em conjunto, e recordarei para sempre. Obrigado Professora Fátima, espero que não seja uma despedida mas um “até já”, pois é um prazer trabalhar consigo, por todas as suas qualidades!

Obrigado Ana Viegas, minha grande amiga e colega de curso ao longo de todos estes anos, juntas nos apoiamos e tudo superamos!

Agradeço à Zeza e ao Valdemar Leal, por todo o apoio e carinho durante esta minha etapa.

Agradeço à Maria Emília Leal, do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia e amiga, por me ter disponibilizado alguma informação que foi necessária para a redação desta monografia, com tanta prestabilidade.

## Lista de Abreviaturas:

ALT – Alanina transaminase;  
AmB – Anfotericina B;  
AmB–Doc–IL – Anfotericina B desoxicolato veiculada em nutrição parental Intralipid® 20%;  
APO C–II – Apolipoproteína C-II;  
APO – E – Apolipoproteína E;  
AST – Aspartato aminotransferase;  
AUC – *Area Under the Curve*;  
ATCC- *American Type Culture Collection*;  
A/O – Água/Óleo;  
BUN – *Blood Urea Nitrogen*;  
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*;  
CFU – *Colony Forming Units*;  
DMPG – Diesteroilfosfatidilglicerol;  
DMPC – Diesteroilfosfatidilcolina;  
FDA – *Food and Drug Administration*;  
 $\gamma$ -GT – Gamaglutamiltranspeptidase;  
H-CHE – H-éter hexadecilo colesterol;  
HDL – *High Density Lipoprotein*;  
IDSA – *Infectious Disease Society of America*;  
IFI's – Infecções Fúngicas Invasivas;  
I.M. – Intramuscular;  
I.V. – Intravenoso;  
IVA – Imposto de Valor Acrescido;  
LDH – Lactatodesidrogenase;  
LDL – *Low Density Lipoprotein*;  
LPL – Lipoproteína lipase;  
LUV – Vesículas Unilamelares;  
MEP – Potencial Eletrostático Molecular;  
ML – Microesferas lipídicas;  
MLV – Vesículas Multilamelares;  
NHI – *National Institutes of Health*;  
O/A – Óleo/Água;  
PG's – Prostaglandinas;  
PPI – Própria para Injectáveis;  
SLN – Nanopartículas sólidas;  
SRE – Sistema Reticulo Endotelial;  
SUV – Vesículas Unilamelares pequenas;  
TFG – Taxa de Filtração Glomerular;  
 $t_{1/2}$  – Tempo de semi-vida;  
 $V_D$  – Volume de Distribuição;  
VIH – Vírus de Imunodeficiência Humana.

## Índice:

I. Introdução .....	1
II. Desenvolvimento.....	6
1. Anfotericina.....	6
i. Caracterização Molecular.....	6
ii. Mecanismo de Ação .....	7
iii. Aplicações.....	10
iv. Administração.....	16
v. Farmacocinética.....	16
vi. Toxicidade.....	17
a) Reações adversas imediatas .....	18
b) Nefrotoxicidade.....	18
c) Efeitos hematológicos.....	20
d) Reações de sensibilidade e cardiopulmonares .....	21
e) Efeitos gastrointestinais .....	21
f) Efeitos a nível do sistema nervoso.....	21
g) Outros efeitos adversos.....	21
vii. Interações .....	22
a) Interações que afetam a função renal.....	22
b) Interações que conduzem à depleção de $K^+$ .....	23
c) Antimicrobianos .....	23
d) Agentes antineoplásicos.....	24
e) Corticosteróides.....	24
f) Transfusões leucocitárias.....	25
viii. Resistências .....	25
2. Formulações Lipídicas .....	27
i. Caracterização Molecular.....	27
a) AmBisome <sup>®</sup> .....	30
b) Abelcet <sup>®</sup> .....	32
c) Amphocil <sup>®</sup> ou Amphotec <sup>®</sup> .....	33
d) Outras formulações.....	34
ii. Farmacocinética.....	35
iii. Administração .....	38

a) AmBisome® .....	38
b) Abelcet® .....	38
c) Amphotec® .....	39
iv. Aplicações .....	39
a) AmBisome® .....	39
b) Abelcet® .....	40
c) Amphotec® .....	41
v. Toxicidade .....	41
vi. Mecanismos propostos para a diminuição da toxicidade .....	43
vii. Resistências .....	44
viii. Interações .....	44
ix. Novos Estudos .....	45
x. Opinião Geral dos Autores e Curiosidades .....	51
III. Conclusão .....	53
IV. Bibliografia.....	55

## Índice de Figuras:

Figura Nº 1: Estrutura da célula fúngica (levedura) [a] e da célula parasitária [b] (adaptado de <a href="http://water.me.vccs.edu/courses/env108/Lesson6_print.htm">http://water.me.vccs.edu/courses/env108/Lesson6_print.htm</a> ).....	2
Figura Nº 2: Estrutura química da AmB (adaptado de Filippin e Souza, 2006) .....	7
Figura Nº 3: Interação da AmB com os esteróis membranares da célula fúngica (adaptado de Ghannoum e Rice, 1999).....	8
Figura Nº 4: AmBisome <sup>®</sup> (adaptado de <a href="http://www.rxlist.com/ambisome-drug.htm">http://www.rxlist.com/ambisome-drug.htm</a> ) ...	28
Figura Nº 5: Abelcet <sup>®</sup> (adaptado de <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1461534798000078">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1461534798000078</a> ).....	29
Figura Nº 6: Amphotec <sup>®</sup> (adaptado de <a href="http://www.medscape.org/viewarticle/463953_4">http://www.medscape.org/viewarticle/463953_4</a> ) .....	29
Figura Nº 7: Fluorescência obtida a azul (parede celular) e a verde (lipossoma) demonstrando a ligação veículo lipossomal da AmB em 3 horas de incubação a 4° C e a 35° C (A) e em 24 horas a 4° C e a 35° C (B) (adaptado de Shimizu et al., 2010) .....	32
Figura Nº 8: Imagem das SLN obtidas por micrografia electrónica (adaptado de Fukui et al., 2003).....	46

## Índice de Tabelas:

Tabela Nº 1: Espectro de atividade de alguns agentes antifúngicos. (adaptado de Klepser, 2011) .....	4
Tabela Nº 2: Aplicações da AmB. (Bodey e Vartivarian, 1989) (Martínez e Tovar, 2012); (Ito e Rad, 2005); (Welsh et al. 2012); (Negroni, 2012); (Conces, 1996); (Marques, 2012); (Yanamandra et al., 2011); (Mercado et al., 2012); (Brown, 2005); (Davidson, 2005); (Zepeda et al., 2005); (American Society of Health – System Pharmacists, 2012).....	11
Tabela Nº 3: Aplicações aprovadas para a AmBisome <sup>®</sup> , com respectivas dosagens e algumas observações. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012) .....	39
Tabela Nº 4: Aplicações aprovadas para a Abelcet <sup>®</sup> , com respectivas dosagens e algumas observações. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012) .....	40
Tabela Nº 5: Aplicações aprovadas para a Amphotec <sup>®</sup> , com respectivas dosagens e algumas observações. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012) .....	41
Tabela Nº 6: Descrição dos efeitos adversos possíveis relatados com a utilização de AmBisome <sup>®</sup> , Abelcet <sup>®</sup> e Amphotec <sup>®</sup> . (American Society of Health-System Pharmacists, 2012) .....	41
Tabela Nº 7: Composição das estruturas analisadas. (Fukui et al., 2003) .....	46
Tabela Nº 8: Parâmetros farmacocinéticos obtidos por análise plasmática de AmB após administração de SLN ou Fungizona <sup>®</sup> em ratos, ratinhos, cães e macacos. (Fukui et al., 2003) .....	49

## Índice de Gráficos:

Gráfico N° 1: Fungos responsáveis pelo aparecimento de IFI's. (adaptado de Klepser, 2011) .....	1
Gráfico N° 2: Concentração plasmática de AmB convencional ao longo do tempo após a administração (a). (Bellmann et al., 2003) .....	37
Gráfico N° 3 e Gráfico N° 4: Concentração plasmática de AmB ligada a lipoproteínas e de AmB incorporada em formulações lipídicas, com utilização de AmB lipossomal (b) e dispersão coloidal (c). (Bellmann et al., 2003).....	37
Gráfico N° 5: Radioatividade plasmática, círculos preenchidos a preto representam as SLN e os círculos sem preenchimento, as ML. (Fukui et al., 2003).....	47
Gráfico N° 6: Concentrações plasmáticas de AmB após administração IV de SLN ou Fungizona® numa dosagem de 1 mg/Kg em ratos, ratinhos, cães e macacos, os círculos preenchidos a preto representam as SLN e os círculos sem preenchimento a Fungizona®. (adaptado de Fukui et al., 2003) .....	48
Gráfico N° 7: Concentrações plasmáticas de AmB após infusão intravenosa de SLN e Fungizona® em cães com uma dose 1 mg/Kg os círculos preenchidos a preto representam as SLN e os círculos sem preenchimento a Fungizona®. (adaptado de fukui et al., 2003).....	48

## I. Introdução:

Nos últimos anos tem sido observado um aumento do uso de agentes antifúngicos, devido mais concretamente ao facto de ter aumentado o número total de infeções fúngicas invasivas (IFI's). Este tipo de infeções é causado na maioria dos casos por espécies de *Candida sp* e *Aspergillus sp*, mas também, de modo menos comum, por agentes patogénicos raros, cuja incidência tem aumentado, (Gráfico N° 1). (Klepser, 2011) (Kathiravan, 2012)

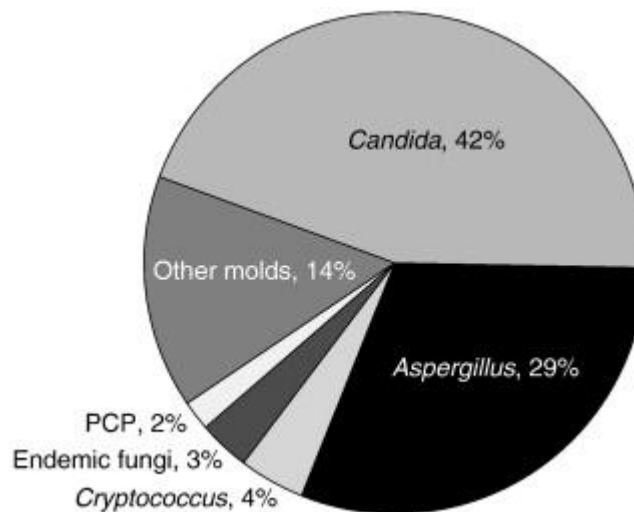


Gráfico N° 1: Fungos responsáveis pelo aparecimento de IFI's. (PCP, *Pneumocystis jiroveci* (*carinii*)).  
(adaptado de Klepser, 2011)

As IFI's são por sua vez resultantes do constante crescimento da população de imunodeprimidos que contribui correntemente para o risco acrescido do desenvolvimento deste tipo de infeções. (Klepser, 2011) (Kathiravan, 2012)

O uso contínuo de agentes antifúngicos resultou então, no desenvolvimento de resistências que comprometem a sua ação. Por outro lado, algumas vezes, a limitação do uso destes agentes também está relacionada com a toxicidade e a falta de eficácia que se evidencia em alguns tratamentos com estes agentes. (Kathiravan, 2012)

Para o tratamento das IFI's (em particular no caso das infeções sistémicas) recorre-se na maioria dos casos a três classes de antifúngicos, polienos, azóis e equinocandinas. Os polienos foram a primeira classe a ser desenvolvida. Neste grupo apresenta-se a AmB e a Nistatina. Quanto aos resultados clínicos do primeiro agente,

estes são de elevada relevância dada a sua eficácia, no entanto os seus efeitos tóxicos levaram a que se produzissem mais tarde as formulações lipídicas de AmB, contribuindo assim para a diminuição destes efeitos. (Klepser, 2011)

O objetivo desta monografia é então a realização de uma revisão bibliográfica sobre a AmB convencional e as suas formulações lipídicas, avaliando-se todos os aspetos relevantes acerca destes fármacos, onde se irá focar, a caracterização molecular, o mecanismo de ação, as aplicações, a administração, a farmacocinética, a toxicidade, as interações, as resistências, os novos estudos realizados e a opinião geral dos autores quanto a estas moléculas.

Esta abordagem tem ainda como objetivo, avaliar as diferenças e as semelhanças entre a AmB convencional e as suas formulações lipídicas de acordo com os dados presentes na literatura encontrada, para assim evidenciar os aspetos positivos e negativos de cada uma.

A AmB apresenta atividade contra uma vasta variedade de leveduras e fungos filamentosos, mas também contra alguns parasitas, atuando a nível da membrana celular, presente nestes microrganismos, (Figura N° 1).

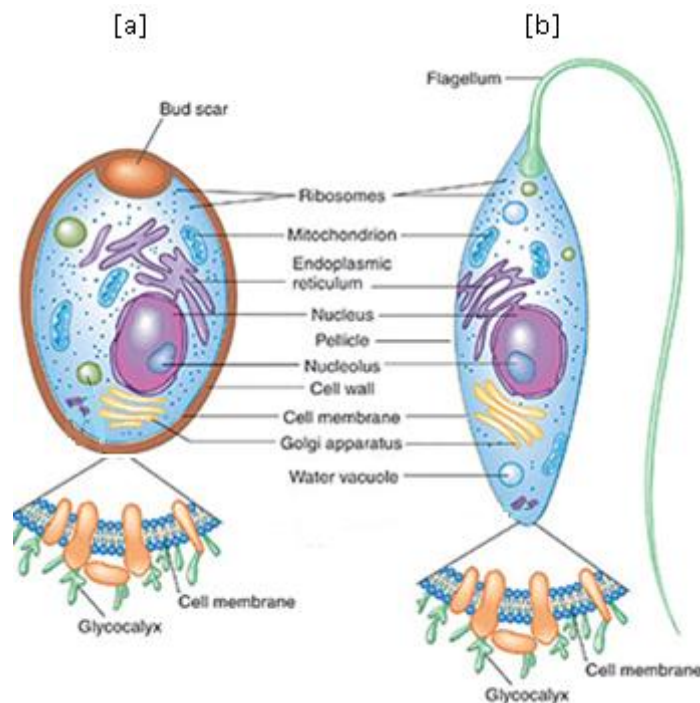


Figura N° 1: Estrutura da célula fúngica (levedura) [a] e da célula parasitária [b]. (adaptado de [http://water.me.vccs.edu/courses/env108/Lesson6\\_print.htm](http://water.me.vccs.edu/courses/env108/Lesson6_print.htm))

Os fungos caracterizam-se como células eucariotas que se reproduzem por esporos. Podem ser encontrados sob a forma leveduriforme (leveduras, fungos unicelulares), ou sob a forma filamentosa, (bolors, fungos pluricelulares). (Ferreira e Sousa, 2000). A membrana citoplasmática dos fungos é composta por uma dupla camada de fosfolípidos, um arranjo de proteínas de superfície e uma pequena quantidade de hidratos de carbono. Como esterol nas células fúngicas, temos o ergosterol, que difere das eucariotas que em vez de ergosterol apresenta colesterol. (Leite et al., 2006)

No caso dos parasitas, uma vez que os protozoários são eucariotas, a sua estrutura celular é semelhante à das células animais. A nível membranar pode-se observar uma dupla camada de fosfolípidos, onde também existem proteínas e alguns hidratos de carbono, mas no caso específico do parasita *Leishmania*, a sua membrana citoplasmática contém ergosterol como esterol, podendo-se compreender a atividade da AmB neste microrganismo, como se poderá ver mais à frente. (Mortimer et al., 2011) (Ministério da Saúde, 2005)

Como referido anteriormente, são também utilizados outras classes de antifúngicos no tratamento deste tipo de infeções.

Relativamente aos azóis, mais concretamente, aos triazóis como o fluconazol, itraconazol e outras moléculas ainda mais recentes, como o variconazol e o posaconazol, apresentam-se bastante úteis no combate às infeções fúngicas sistémicas. Estes antifúngicos são na maioria dos casos, de ação fungistática contra leveduras e fungicida contra fungos filamentosos. (Klepser, 2011)

Devido ao fato de interagirem com o citocromo P450 levam a que haja uma elevada possibilidade de interações medicamentosas, logo em alguns casos é necessária a monitorização terapêutica em determinados pacientes. A hepatotoxicidade é um efeito adverso comum, sendo menos prevalente no posaconazol. A atividade dos agentes antifúngicos desta classe encontra-se comparada à da AmB na Tabela Nº 1. (Klepser, 2011).

Tabela Nº 1: Espectro de atividade de alguns agentes antifúngicos\*.

Organism	Antifungal agent							
	AmB <sup>a</sup>	Flu	Itr	Vor	Pos	Anidulafungin	Caspofungin	Micafungin
<i>Candida</i> species	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	±	±	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	±	-	±	+	+	+	+	+
<i>C. lusitaniae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	±	±	±
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus</i> species	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>A. flavus</i>	±	-	+	+	+	+	+	+
<i>A. fumigatus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>A. niger</i>	+	-	±	+	+	+	+	+
<i>A. terreus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium</i> species	±	-	-	+	+	-	-	-
<i>Scedosporium apiospermum</i>	±	-	±	+	+	-	-	-
<i>Scedosporium prolificans</i>	-	-	-	±	±	-	-	-
Zygomycetes	±	-	-	-	+	-	-	-
<i>Coccidioides</i> species	+	+	+	+	+	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>
<i>Blastomyces</i>	+	+	+	+	+	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>
<i>Histoplasma</i> species	+	+	+	+	+	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>	± <sup>b</sup>

Adapted with permission [24], 2008 Infectious Diseases Society of America.  
AmB, amphotericin B; Flu, fluconazole; Itr, itraconazole; Vor, voriconazole; Pos, posaconazole.  
<sup>a</sup> Includes lipid formulations.  
<sup>b</sup> In vitro data show that the echinocandins (specifically, micafungin) may have variable activity against the dimorphic fungi, depending on whether they are in the mycelial or yeast-like form.

\*(adaptado de Klepser, 2011)

As equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) são das classes mais recentes de antifúngicos. Caracterizam-se pela sua atividade fungicida perante a maioria das leveduras e fungistática perante fungos filamentosos. A toxicidade é relativamente baixa, sendo mais comum o aparecimento de reações alérgicas, mas também, o aparecimento de febre, alguma hemólise ou até alterações nos parâmetros do perfil hepático. Como não sofrem metabolização pelo citocromo P450 as interações medicamentosas são menos frequentes, comparativamente aos azóis. Quanto à sua atividade frente a algumas espécies fúngicas pode-se observar a sua eficácia na Tabela Nº 1 e realizar uma sucinta comparação entre equinocandinas, triazóis e AmB, frente a algumas espécies fúngicas. (Klepser, 2011) A Tabela Nº 1 evidencia então diferenças entre as classes estudadas e também entre agentes da mesma classe. No caso da AmB pode-se observar que, possui atividade em quase todas as espécies testadas, sendo no entanto a sensibilidade de *Fusarium* e *Scedosporium* variável e nula para a *C. lusitaniae* e *A. Terreus*. A atividade contra *Zygomycetes*, *Fusarium* e *Scedosporium* é diferente consoante o triazol, e no caso das equinocandinas, observa-se igualmente o mesmo feito frente aos fungos dimórficos (*Coccidioides* sp., *Histoplasma* sp. e *Blastomyces* sp.). (Klepser, 2011)

Uma das maiores vantagens da AmB frente aos azóis e às equinocandinas é de fato, a diminuída taxa de resistência que os organismos patogênicos exibem para a AmB, quando comparada com a desenvolvida para outros agentes antifúngicos disponíveis no mercado. (Klepser, 2011)

Como metodologia utilizada na pesquisa para a elaboração do presente trabalho, foi realizada uma pesquisa bibliográfica em livros científicos e também em fontes de pesquisa disponíveis na internet, que foram: HighWire, B-on, Pubmed, Science Direct e American Society of Health – System Pharmacists. As palavras-chave utilizadas foram “Amphotericin B”, “lipid formulations of amphotericin B”, “Resistance e “Pharmacokinetics”, tendo sido a pesquisa majoritariamente feita em inglês, com acesso aos artigos de modo integral e realizada entre 28/10/2012 e 30/05/2013.

## I. Desenvolvimento:

### 1. Anfotericina B

#### i) Caracterização molecular

A AmB pertence ao grupo dos fármacos antifúngicos poliênicos (Baginsky et al., 2005).

A principal atividade da AmB é o seu uso no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas como histoplamose, aspergilose, blastomicose, infecções por *Candida spp.*, coccidioidomicose, criptococose, paracoccidioidomicose, esporotricose e zigomicose. Para além disso a AmB faz parte da terapêutica antifúngica aquando da suspeita de infecções fúngicas na neutropenia febril ou como terapia de prevenção em doentes imunodeprimidos. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Collette et al., 1989)

Apesar de ser utilizada como antifúngico, apresenta ainda atividade terapêutica contra algumas infecções parasitárias, estando descrita e aprovada para o tratamento da leishmaniose e na meningoencefalite amebiana primária causada pela ameba *Naegleria fowleri* [3]. No entanto, é necessário salientar, que no caso desta última infecção, o uso de AmB não se encontra aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Foi isolada em 1955 a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosus*, tendo sido aprovada em 1965, pela FDA, como o primeiro agente anti-fúngico. (Filippin e Souza, 2006)

As principais razões para a sua utilização prendem-se principalmente com o fato de apresentar um grande espectro de atividade antifúngica e um baixo índice de resistências. (Baginski et al., 2005)

Em relação à sua estrutura química (Figura N° 2), a AmB apresenta 37 átomos de carbono formando um anel macrocíclico fechado por lactonização. Possui uma cadeia de hidratos de carbono ligados por ligações duplas conjugadas não substituída, bem como, uma outra oposta com 7 grupos hidroxilo livres, conferindo-lhe carácter

anfipático. A lactona presente com um grupo amino livre forma a cadeia lateral. (Filippin e Souza, 2006)

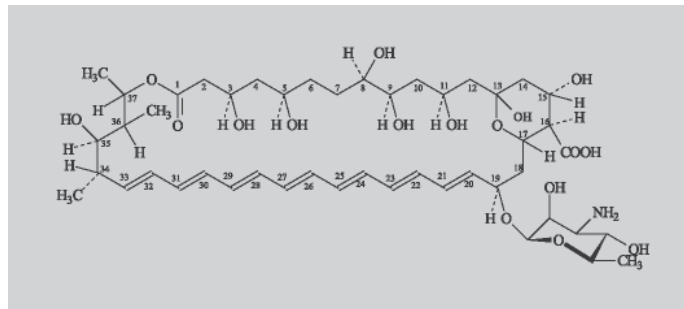


Figura Nº 2: Estrutura química da AmB. (adaptado de Filippin e Souza, 2006)

O fármaco caracteriza-se por ter caráter anfotérico. A AmB é um pó cuja coloração pode ser amarela ou laranja, é inodora ou praticamente inodora. A AmB convencional encontra-se comercialmente sob a forma de liofilizado de cor amarela ou laranja para reconstituição e posterior injeção intravenosa (IV). Em relação à pureza, cada mg de AmB contém pelo menos 750 µg de fármaco anidro e por vezes anfotericina A, que se aponta como contaminante da AmB, em concentração inferior a 5%. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Normalmente, as preparações possuem 50 mg de AmB, 41 mg de desoxicolato de sódio e 20, 2 mg de tampão fosfato de sódio. Pode ainda ser comercializada como forma de emulsão lipídica para preparações extemporâneas, onde se dilui o fármaco numa emulsão hidrofóbica, de modo a veicular o fármaco numa preparação que diminua os efeitos nefrotóxicos. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) No entanto, como neste último tipo de formulação a eficácia e a segurança não se encontram bem estudadas (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) e dado que, o uso das formulações lipídicas é mais frequente e está aprovado para tratamento, a AmB convencional sob a forma de emulsão não é tão comum como o liofilizado. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

## ii. Mecanismo de ação

A AmB interage com os componentes da membrana celular levando à formação de canais transmembranares, que levam a um distúrbio membranar, pois induzem a migração de cátions, em especial de potássio pelo canal formado, conduzindo assim à morte celular (Figura Nº 3). Estes canais são formados pelos grupos carboxilo e amina

da AmB formando uma cadeia intermolecular (conformação “aberta”) composta por ligações por pontes de hidrogénio entre as moléculas de AmB (ligações AmB-AmB), que conferem estabilidade ao canal. A existência de ligações intramoleculares com presença de moléculas de água confere a conformação “fechada”, sendo que esta é menos estável que a “aberta”. (Baginski et al., 2005).

O mecanismo de entrada da molécula na membrana pode ser explicado por duas teorias: pelo chamado “Mecanismo de Sequenciação” ou pelo “Mecanismo *One-Step*”. O primeiro consiste na presença de monómeros de AmB que por intermédio da formação de complexos binários com as moléculas lipídicas, concretizam a formação dos canais. O segundo pressupõe a presença de AmB na superfície membranar que induz uma grande reorganização celular e a consequente formação de canais. (Baginski et al., 2005)

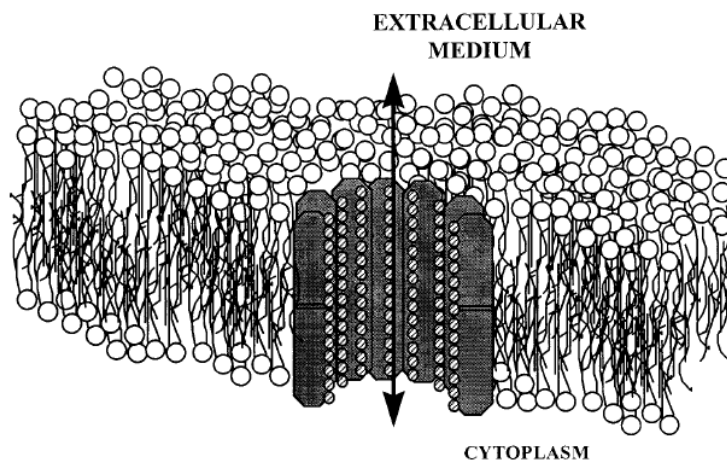


Figura Nº 3: Interação da AmB com os esteróis membranares da célula fúngica. (adaptado de Ghannoum e Rice, 1999)

Assim, a interação da molécula com a membrana ocorre com os esteróis, mais especificamente com o ergosterol mas podendo em alguns casos interagir com o colesterol. (Filippin e Souza, 2006) (Brajtburg et al., 1990)

O ergosterol exhibe uma conformação das suas cadeias laterais que proporciona maior afinidade para o antifúngico, ou seja, comparativamente ao colesterol, o ergosterol apresenta um potencial electrostático molecular (MEP) mais negativo, devido à presença de ligações duplas entre átomos de carbono, facilitando assim a ação da AmB. Para além disso, os canais transmembranares formados entre o ergosterol e a molécula são mais estáveis. Esta constatação levou a que se descobrisse que de um

modo mais específico, a ligação do grupo alquil do ergosterol com o C-22 da molécula leva a uma maior afinidade da AmB com o ergosterol, em comparação ao colesterol. Para além disso a conformação achatada da cadeia de ergosterol, facilita ainda mais as ligações intermoleculares com a AmB. (Brajtburg et al., 1990)

Existem descritos na literatura dois mecanismos de ação diferentes para a AmB, após a sua entrada na membrana. Se houver presença de moléculas de água, formam-se pontes de hidrogénio. Estas ligações ocorrem entre o grupo hidroxilo do esterol (3- $\beta$ -hidroxilo) e o carboxilo do C-18 da AmB, com partição do grupo amina da desoxiamino hexose (Brajtburg et al., 1990). O segundo tipo de interação pode ocorrer entre a cadeia hidrocarbonada polinsaturada da AmB e toda a estrutura do ergosterol através de forças van der Waals. (Brajtburg et al., 1990)

Um estudo realizado por Bernaudin et al. (1987) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) demonstra que a AmB pode exercer ainda efeitos moduladores em leucócitos, desencadeando-se inibição de processos imunológicos como a quimiotaxia. Outros processos moduladores do sistema imunitário estudados são o caso da inibição na produção de anticorpos (Boggs et al., 1991, *cit. in* Filippin e Souza 2006), alteração das propriedades funcionais dos leucócitos polimorfonucleares (Jullien et al., 1991, *cit. in* Filippin e Souza 2006) e diminuição da capacidade de fagocitose e destruição do agente *Candida albicans* (Pallister e Warnock, 1989, *cit. in* Filippin e Souza 2006). Estes fatos foram analisados e curiosamente constatou-se que aquando de administração da AmB associada ao desoxicolato de sódio havia um aumento da inibição do metabolismo oxidativo dos leucócitos, que poderia ser a causa da inibição da quimiotaxia consequente. Para além disso, Wilson et al. (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) sugeriram que a AmB ativaria por si as células via efeito direto na membrana plasmática, aumentando a produção do ião superóxido, ou segundo outros autores por acumulação intracelular do antifúngico no leucócito através do agente patogénico fagocitado. (Filippin e Souza, 2006)

A AmB apresenta atividade fungicida e fungistática consoante a susceptibilidade do agente patogénico e a concentração utilizada. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Collette et al., 1989) (Delucia e Oliveira, 2004) (Klepser, 2011) (Bahmed et al., 2005)

Os fungos mais sensíveis ao antifúngico são *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *B. brasiliensis* bem como algumas espécies de *Candida* e *Aspergillus*. (Delúcia e Oliveira, 2004)

Um estudo efetuado por Collette e colaboradores (1989) avaliou a atividade fungistática e fungicida de AmB com recurso a tecidos recolhidos de autópsias, efectuadas em doentes com cancro que foram tratados com AmB – desoxicolato, tendo estes tecidos sido testados contra três espécies de *Candida albicans* e uma de *Aspergillus fumigatus*. Os tecidos previamente homegeneizados em solventes específicos originaram uma solução que foi posteriormente diluída em série, tendo sido posta em contacto com um inóculo de  $1,5 * 10^5$  colony forming units (CFU) de esporos por mL. O título de tecido com actividade fungistática foi atribuído à maior diluição de solução que inibiu o crescimento das espécies testadas. Por sua vez, o título de tecido com atividade fungicida foi atribuído à maior diluição que mostrou 99% de ausência de crescimento, observado pela inoculação da mistura solução com o agente em placas de meio agar Sabouraud. (Collette et al., 1989)

### iii. Aplicações

A dose de AmB deve ser individualizada e ajustada de acordo com a tolerância individual de cada paciente, bem como, o seu estado clínico. Antes de qualquer indicação ao tratamento com AmB convencional deve ser efetuado um teste de tolerância frente a uma pequena dose (1 mg em 20 mL de 5% de dextrose) administrada via IV durante 20-30 minutos e com monitorização do paciente, sendo que as dosagens aqui referidas são decretadas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), *National Institutes of Health* (NHI) e *Infectious Disease Society of America* (IDSA). (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) No caso de pacientes cuja função cardiovascular e renal se apresenta normal, tendo tolerado bem este teste, a dose é ajustada inicialmente para os 0,25 mg/Kg/dia. Já nos casos em que a função cardiovascular e renal está alterada ou que reagiram mal ao teste prévio, a dose inicial é mais pequena, ajustada conforme os parâmetros analíticos dos pacientes (American Society of Health – System Pharmacists, 2012).

A AmB é utilizada no tratamento de muitas infeções fúngicas e algumas parasitárias como a aspergilose (Tabela Nº 2), blastomicose, candidose,

coccidioidomicose, criptococose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, penicilose, esporotricose, zigomicose, no tratamento empírico de pacientes febris neutropénicos, na prevenção de infeções fúngicas em doentes com cancro, transplantados ou considerados de alto risco, na meningoencefalite amebiana primária e em infeções parasitárias como a leishmaniose. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Tabela Nº 2: Aplicações da AmB\*

Patologia	Agente Etiológico	Complicações resultantes	Dose usada no tratamento com AmB
Aspergilose	<i>Aspergillus spp.</i>	Reações alérgicas (asma ou até aspergilose alérgica bronco-pulmonar); Infeções da pele; Indivíduos Imunodeprimidos podem desenvolver: aspergilose invasiva.	Imunocompetentes: 0,5-1,5 mg/Kg numa dose única diária; No caso de aspergilose invasiva/Imunodeprimidos: 1-1,5 mg/Kg.
Blastomicose	Forma assexuada: <i>Blastomyces dermatidis</i> Forma sexuada: <i>Ajellomyces dermatidis</i>	Pneumonia; A infeção pode disseminar-se para a pele, ossos e sistema nervoso central.	Infeção moderada a severa: 0,7-1 mg/Kg numa dose única diária, durante uma a duas semanas. Segue-se terapia oral com itraconazol.

<p>Candidose</p>	<p><i>Candida spp.</i></p>	<p>Infeções da pele, do sistema nervoso central e cardiovascular.</p>	<p>Dose habitual em infeções invasivas:</p> <p>0,5-1 mg/Kg numa dose única diária, durante duas semanas.</p> <p>Doentes em estado crítico:</p> <p>0,5-0,7 mg/Kg, diariamente durante uma a duas semanas acompanhada de fluconazol.</p>
<p>Coccidioidomicose</p>	<p><i>Coccidioides immitis;</i> <i>Coccidioides posadasii.</i></p>	<p>Assintomatologia na maior parte dos casos. No entanto, os órgãos mais afetados: pulmões, pele, baço e fígado.</p>	<p>0,5-1,5 mg/Kg diariamente, acompanhada por um <i>follow-up</i> inicial com fluconazol ou itraconazol durante um ano.</p> <p>Doentes pediátricos infetados com vírus da imunodeficiência humana (VIH):</p> <p>0,5-1 mg/Kg numa dose única diária e seguida por igual <i>follow-up</i>.</p>
<p>Criptocose</p>	<p><i>Cryptococcus neoformans;</i> <i>Cryptococcus gatti</i></p>	<p>Gravidade em imunodeprimidos pois a infeção pode disseminar-se e levar a doença pulmonar aguda, subaguda ou crónica, meningite, infeções oculares e cutâneas.</p>	<p>0,3-1 mg/Kg diariamente.</p> <p>Doentes infetados com VIH:</p> <p>0,7-1 mg/Kg diariamente.</p>

Anfotericina B e suas Formulações Lipídicas

Histoplamose	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<p>Imunocompetentes: Assintomatologia, acompanhada de pequenos nódulos visíveis em radiografias ao tórax;</p> <p>Imunodeprimidos: Maior gravidade com possibilidade de histoplamose pulmonar aguda ou crónica, granuloma mediastinal e broncolitíase.</p>	<p>0,7-1 mg/Kg em dose única diária durante uma a duas semanas seguido de terapia oral com itraconazol.</p> <p>Em casos mais agudos o tratamento pode durar doze semanas, e nos casos de infecção disseminada, doze meses.</p>
Paracoccidioidomicose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Infecção pulmonar, oral e ao nível cutâneo.	<p>0,4-0,5 mg/Kg diariamente.</p> <p>Infeções rapidamente progressivas: Até aos 1,5 mg/Kg numa dose única diária.</p>
Penicilose	<i>Penicillium marneffei</i>	Imunodeprimidos desenvolvem eritemas, erupções e ulcerações orais.	<p>Imunodeprimidos: 0,6 mg/Kg diariamente durante duas semanas, seguido de itraconazol durante dez semanas.</p>
Esporotricose	Complexo <i>Sporothrix schenckii</i> ( <i>S. schenckii sensu stricto</i> , <i>S. brasiliensis</i> , <i>S. globosa</i> , <i>S. mexicana</i> e <i>S. albicans</i> ).	Infecção ao nível cutâneo, osteoarticular, pulmonar, bem como, nas mucosas.	0,7-1 mg/Kg numa dose única diária, acompanhada de itraconazol durante doze meses.

<p>Zigomicose</p>	<p>Agentes etiológicos da família <i>Mucoraceae</i> (<i>Rhizopus<sup>a</sup></i> e <i>Entomophthoraceae<sup>b</sup></i>)</p>	<p>Angioinvasão e destruição tecidual em imunodeprimidos.<sup>a</sup></p> <p>Danos subcutâneos e infecção do trato respiratório superior em imunocompetentes.<sup>b</sup></p>	<p>1-1,5 mg/Kg diariamente durante dois a três meses.</p>
<p>Doentes febris com quadro de neutropenia</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>0,5-1 mg/Kg todos os dias até ao desaparecimento do quadro clínico. No caso de persistência da neutropenia, permanecer com igual dose durante duas semanas.</p>
<p>Prevenção em pacientes com cancro, transplantados e de alto risco</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Pacientes com cancro e transplantados: 0,1 mg/Kg diariamente.</p> <p>Pacientes de alto risco: 0,3-0,6 mg/Kg (a durabilidade depende da situação clínica).</p>

<p>Leishmaniose</p>	<p><i>Leishmania spp.</i></p> <p>Forma cutânea:</p> <p><i>L. tropica, L. major, L. crethiopica, L. mexicana,</i> complexo <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum.</i></p> <p>Forma visceral:</p> <p><i>L. donovani, L. infantum</i> e <i>L. chagasi.</i></p> <p>Forma mucocutânea:</p> <p>Complexo <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i></p>	<p>Infeção ao nível cutâneo, mucocutâneo e visceral.</p>	<p>Manifestação cutânea:</p> <p>0,25-0,5 mg/Kg numa dose única diária, sendo mais tarde aumentada para 0,5-1 mg/Kg durante três a doze semanas.</p> <p>Manifestação mucocutânea:</p> <p>0,5-1 mg/Kg diariamente ou de 2 em 2 dias durante oito semanas.</p> <p>Manifestação visceral:</p> <p>0,5-1 mg/Kg em dias alternados por cerca de 14-20 doses.</p> <p>Pacientes infetados por VIH:</p> <p>0,5-1 mg/Kg diariamente até um total de 1,5-2 g de fármaco.</p>
<p>Meningo encefalite amebiana primária</p>	<p><i>Naegleria fowleri</i></p>	<p>Infeção do sistema nervoso central, com destruição do tecido cerebral, geralmente fatal.</p>	<p>1,5 mg/Kg divididos em duas doses administradas diariamente durante três dias. Seguido de 1 mg/Kg durante e seis dias, passando para 1,5 mg via intra-tecal diariamente por dois dias e finalmente 1 mg durante oito dias alternados.</p>

\*(Bodey e Vartivarian, 1989); (Martínez e Tovar, 2012); (Ito e Rad, 2005); (Welsh et al. 2012); (Negróni, 2012); (Conces, 1996); (Marques, 2012); (Yanamandra et al., 2011); (Mercado et al., 2012); (Brown, 2005); (Davidson, 2005); (Zepeda et al., 2005); (American Society of Health – System Pharmacists, 2012).

#### iv. Administração

A AmB é usualmente administrada via infusão IV. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Walker e Whittlesea, 2007) (Page et al., 2002) No entanto, e apesar de ainda não ter sido aprovado pela FDA, existem registos de administração via intra-articular, intra-pleural, intra-tecal, instilação nasal ou nebulização e por irrigação da bexiga. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Na preparação da formulação da AmB é comum existir 5% de dextrose, para evitar a sua precipitação, uma vez que na presença de electrólitos precipita. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Walker e Whittlesea, 2007)

Dada a sua fraca solubilidade em água, é também adicionado um agente emulsivo que na maioria dos casos é o desoxicolato de sódio, para permitir a sua solubilização. No entanto de modo a evitar que a solução de dextrose possa também ela levar a precipitação da AmB, deve ser incorporado uma solução tampão, já que a dextrose apresenta um valor de pH baixo. (Walker e Whittlesea, 2007) O liofilizado apresentado (50 mg de AmB) deve ser reconstituído em água esterilizada própria para injetáveis (PPI) resultando numa dispersão coloidal (5 mg/mL), e posteriormente diluída numa solução de 500 mL com 5% de dextrose finalizando a infusão numa concentração de 0,1 mg/mL. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Walker e Whittlesea, 2007) A sua preparação deve ser obviamente realizada em condições assépticas. A administração deve ser realizada lentamente durante um período entre 2-6 horas, que irá depender da dose administrada, uma vez que se realizada num período mais curto poderá resultar em efeitos adversos, como hipocalémia, hipotensão, ou arritmia. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

#### v. Farmacocinética

De acordo com o tipo de preparação, são obtidos diferentes valores do ponto de vista farmacocinético. Assim, é importante caracterizar separadamente as diferentes etapas da sua actividade no organismo.

Em relação à absorção, a AmB não é bem absorvida a nível do trato gastrointestinal (TGI) e portanto a melhor via para a sua administração é a parental. Em

relação a dados farmacocinéticos, é do conhecimento que, após administração completa de uma dose de infusão via IV de 30 mg de AmB convencional durante um período de 7 horas o pico de concentração plasmática é aproximadamente de 1 µg/mL. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Quanto à sua distribuição, após absorção a molécula atinge altas concentrações em órgãos como fígado e baço, e não tão elevadas nos rins, pulmões e coração. (Collette et al., 1989)

Torna-se importante referir que a AmB distribui-se também pela pleura, pericárdio, peritoneu e fluido sinovial, enquanto que a sua distribuição pelo humor vítreo e pelo líquido cefalo-raquidiano é baixa. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Walker e Whittlesea, 2007) Nas grávidas, pode ocorrer o risco de existir passagem para a placenta, sendo que nestes casos, a sua concentração no fluido amniótico é baixa, mas é desconhecido o risco de passagem para o leite materno. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) Apresenta elevada percentagem de ligação às proteínas plasmáticas, 90% ou mais, ligando-se maioritariamente às lipoproteínas. O volume de distribuição do fármaco é apontado como 4 L/Kg. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

A metabolização de AmB em humanos ainda não foi totalmente estudada.

Relativamente ao mecanismo de eliminação, a AmB apresenta um tempo de semi-vida de 24 horas, mas que após finalização deste período, a taxa de eliminação diminui e o tempo de semi-vida pode alcançar os 15 dias, sendo assim eliminada lentamente. Nos rins é apenas atingido um valor de 3% de AmB inalterada, para ser eliminada na urina. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Walker e Whittlesea, 2007)

## vi. Toxicidade

A AmB apresenta elevada incidência de efeitos adversos, englobando reações adversas imediatas, nefrotoxicidade, efeitos hematológicos, reacções de sensibilidade e cardiopulmonares, efeitos gastrointestinais, efeitos a nível do sistema nervoso, entre outros. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

a. Reações adversas imediatas

Inicialmente, imediatamente após a infusão podem-se desenvolver reacções imediatas como, cefaleias, náuseas, hipotensão, vômitos ou até anorexia. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Walker e Whittlesea, 2007)

Este tipo de reacções pode-se instalar durante um período de tempo entre 1 e 3 horas após a infusão. A maioria dos pacientes (cerca de 50-90%) pode desenvolver uma certa intolerância às doses iniciais não desaparecendo com a administração de doses baixas. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

De acordo com um estudo efetuado pelo CDC, 71% dos pacientes apresentaram pelo menos uma reacção adversa durante os primeiros 7 dias de tratamento, como febre e arrepios (28-51%) ou náuseas e cefaleias (9-18%). (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

A explicação para estes episódios ainda não se encontra totalmente estabelecida, no entanto, crê-se que a molécula de AmB induza o aumento da produção de prostaglandinas (PG's). (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Para diminuir estes efeitos adversos imediatos resultantes da acção do fármaco, é frequente o acompanhamento do tratamento com anti-inflamatórios, antipiréticos, antieméticos, anti-histamínicos e corticosteróides. O uso de corticosteroides deve ser realizado em pequenas doses imediatamente antes ou durante a infusão via IV da AmB. (Walker e Whittlesea, 2007) (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

b. Nefrotoxicidade

A nefrotoxicidade é considerada o efeito adverso mais frequente e prejudicial do uso de AmB convencional. (Baginski et al., 2005) (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Sawaya et al. 1995) (Klepser, 2011) (Kathiravan et al., 2012)

Os efeitos tóxicos a nível renal incluem diminuição da função renal, desenvolvimento de azotémia, hipocalémia, hipomagnesémia, aumento da excreção de ácido úrico, hipostenúria, acidose tubular renal, nefrocalcinose, aumento do parâmetro *blood urea nitrogen* (BUN), aumento dos níveis de creatinina sérica, alteração da

clearance da creatinina e diminuição da taxa de filtração glomerular. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Um dos principais mecanismos que explicam a nefrotoxicidade relaciona-se com o seu próprio mecanismo de ação. (Sawaya et al., 1995) A possibilidade de a AmB se ligar também ao colesterol propicia não só à sua ligação aos esteróis em células do agente patogénico mas também às do hospedeiro, como algumas células presentes no sistema renal e os próprios eritrócitos. (Sawaya et al., 1995)

No caso da acidose tubular renal, o seu desenvolvimento foi estudado por Steinmetz e Lawson (1970) (*cit. in* Sawaya et al. 1995) que se concentrou no efeito da AmB na secreção de iões  $H^+$  numa tartaruga. Os autores demonstraram que a secreção deste ião contra um gradiente encontra-se comprometida com a acção do fármaco, mas que se a força electroquímica passiva no epitélio permanecesse diminuída, esta secreção permaneceria normal. Ou seja, a acidose tubular renal é causada pelo aumento da permeabilidade passiva para o lúmen e pelo aumento de difusão de  $H^+$ , induzida pela AmB. (Sawaya et al., 1995) Em relação à capacidade dos rins efectuarem a concentração da urina, sabe-se que esta encontra-se comprometida havendo assim hipostenúria acompanhada de poliúria. A hipostenúria resulta principalmente do desenvolvimento de hipocalémia e hipomagnesiémia. Devido à formação de poros resultante do mecanismo de acção da molécula na membrana, há expulsão de catiões monovalentes, mais frequentemente de potássio ( $K^+$ ). Esta libertação de  $K^+$  é maior no período de administração da infusão, tendo ainda a molécula capacidade de aumentar a permeabilidade das células tubulares distais, aumentando assim o fluxo passivo deste catião e levando conseqüentemente à hipocalémia. A AmB pode também conduzir à excreção de magnésio, embora não tão comum, mas gerando a hipomagnesiémia. Apesar de não ser tão observado, pode ainda desenvolver-se hipercalémia, como resultado do aumento da permeabilidade da membrana ao  $K^+$  e do seu conseqüente efluxo, neste caso para o sangue. (Sawaya et al., 1995)

Foi ainda reportado pelos autores deste estudo que a AmB possui efeito vasoconstritor na circulação renal, diminuindo o fluxo sanguíneo e conseqüentemente a taxa de filtração glomerular (TFG). Este fármaco apresenta uma acção semelhante à presença de um aumento de fluxo ou à presença de um aumento de cloreto de sódio (NaCl) na mácula densa do túbulo distal. Estes dois fenómenos desencadeiam um

mecanismo preventivo, que diminui a quantidade desregulada de NaCl e a perda de água pela diminuição do processo de filtração. (Sawaya et al., 1995)

Para além dos fenómenos anteriormente descritos, é importante salientar o papel dos metabolitos derivados do ácido araquidónico. A AmB é considerada responsável pela indução da síntese destes metabolitos. Um estudo realizado, desta vez em ratinhos, demonstrou um aumento da síntese de PG's a nível renal. Para além disso, a AmB cria uma despolarização a nível vascular próximo ao tecido muscular, ativando-se a voltagem dependente dos canais de cálcio. A concentração de cálcio intracelular resultante leva a activação da fosfolipase A2, enzima reguladora da libertação do ácido araquidónico. (Sawaya et al., 1995)

A AmB pode ainda induzir a apoptose em células tubulares renais e em células intersticiais, numa quantidade proporcional à sua concentração. (Filippin e Souza, 2006)

Por fim, a AmB ao alterar a permeabilidade iónica, leva a um aumento da quantidade de O<sub>2</sub> consumida no transporte activo destes electrólitos, gerando falta de O<sub>2</sub>, e conseqüentemente alguma vasoconstrição. (Sawaya et al., 1995)

Em terapias longas ou com doses elevadas deve ser realizada a monitorização da função renal todos os dias, e se o valor de creatinina sérica for superior a 250 µmol/L, o tratamento deve ser suspenso, até este valor baixar para valores de referência. (Walker e Whittlesea, 2007)

### c. Efeitos Hematológicos

A AmB convencional via IV induz frequentemente o aparecimento de anemia normocítica normocrómica. Este processo ocorre lentamente e apesar de um dos mecanismos de toxicidade da AmB ser a possibilidade de esta também se ligar aos esteróis das células do hospedeiro, a anemia não é derivada da hemólise de eritrócitos que já sofrerem maturação. Este fenómeno está relacionado com a inibição da produção de eritropoietina e conseqüentemente de eritrócitos, bem como da lise de células eritropoéticas em maturação ou ainda relacionada com a instalação de toxicidade renal. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Laboratorialmente, podem ser detetados não tão usualmente alteração de certos parâmetros como os valores de hematócrito abaixo de 20-25%, agranulocitose,

leucopenia, eosinofilia, leucocitose e problemas de coagulação como trombocitopenia. A maioria destes efeitos tendem a desaparecer e os valores alterados a voltar aos de referência após paragem de tratamento. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

d. Reações de sensibilidade e cardiopulmonares

Com o uso de AmB convencional podem surgir episódios a nível cardiopulmonar como, taquipneia, paragem cardíaca, cardiomiopatia, edema pulmonar, arritmia, dispneia, hipertensão, hipotensão, broncospasmo, hipoxia, reação anafilatóide e anafilática e angioedma. Neste último tipo de reação a terapia deve ser cancelada e ao paciente devem ser administrados corticosteroides, epinefrina e suporte ventilatório de oxigénio. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

e. Efeitos gastrointestinais

Como efeitos a nível gastrointestinal realçam-se, náuseas, vômitos, anorexia, perda de peso, diarreia, xerostomia, dispepsia, hemorragia, dor epigástrica e cólicas. Neste caso o tratamento deve ser efetuado em dias alternados para diminuir estes efeitos. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

f. Efeitos a nível do sistema nervoso

Alguns dos efeitos a nível do sistema nervoso registados são, depressão, confusão, tonturas, insónia, sonolência, coma, ansiedade, agitação, nervosismo, alucinações, tremores, perda de audição, *tinnitus*, acidente cardiovascular ou até síndrome extrapiramidal. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

g. Outros efeitos adversos

Para além dos efeitos adversos aqui descritos podem ainda desencadear-se outros como, *rash* (incluindo maculopapular e o vesículobuloso), urticária, transpiração, síndrome de *Stevens-Johnson*, pele seca, descoloração da pele e úlceras. Laboratorialmente, são apontados aumento da aspartato aminotransferase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina, bilirrubina, gamaglutamiltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) e lactatodesidrogenase (LDH). Foram ainda apontados casos de falência hepática, hepatotoxicidade, hiperglicemia e hipoglicémia. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

## vii. Interações

Visto que, a AmB é apontada como sendo um fármaco dotado de efeitos nefrotóxicos, é desaconselhado o uso concomitante de AmB e outros fármacos com efeitos semelhantes, pois pode haver um efeito nefrótico sinérgico. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Como fármacos a evitar durante a administração de AmB existem, aminoglicosídeos, capreomicina, colistina, cisplatina, ciclosporina, metoxiflurano, pentamidina, polimixina B e vancomicina. Caso seja impossível controlar esta interação deverá ser feita a monitorização da função renal. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

Existe ainda outro tipo de interações que podem ter efeitos variados como a diminuição de  $K^+$  ou alterações noutros sistemas fisiológicos. De seguida, encontram-se referenciados alguns fármacos que foram alvo de estudo quanto à interação com a AmB, da qual são reportados com efeitos nefastos. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

### a. Interações que afetam a função renal

#### Ciclosporina

Num estudo duplo-cego foi avaliado o uso de AmB convencional em doentes neutropénicos e febris, com concentrações de creatinina dentro dos valores de referência, em tratamento conjunto com ciclosporina ou tacrolimus. A incidência de toxicidade renal (é grave quando se obtém o dobro do valor ou um aumento de 1 mg/dL ou mais dos valores de referência para a creatinina, ou até uma diminuição de 50% da clearance de creatinina) foi de 68%, ao passo que, o uso isolado de AmB deduziu-se num valor de incidência de 35%, sendo que é de salientar o sinergismo com efeito aditivo na nefrotoxicidade presente. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

#### Pentamidina

No caso de administração simultânea de AmB IV e de Pentamidina IV ou intramuscular (IM), pode levar a falha renal aguda e reversível, tendo já sido descrito em

pelo menos 4 pacientes com VIH. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

b. Interações que conduzem à depleção de  $K^+$

Sabendo que um dos efeitos adversos da AmB é a hipocalémia, ao combinar este fármaco com glicosídeos cardíacos, pode-se gerar toxicidade cardíaca e aumentar os efeitos dos relaxantes musculares (como a tubocurarina). Nestes casos deve ser monitorizada a concentração de  $K^+$ . (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

c. Agentes antimicrobianos

### Flucitosina

Em alguns estudos efetuados *in vitro* a combinação de flucitosina e de AmB gerou um efeito sinérgico na inibição das espécies de *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. O mecanismo que explica este sinergismo relaciona-se com a ligação de AmB aos esteróis da membrana que aumentam a sua permeabilidade permitindo maior penetração da flucitosina à célula fúngica, e para além disso também existem relatos de aumento de toxicidade da flucitosina devido não só ao aumento do *uptake*, mas também devido à diminuição da excreção renal. No entanto, este efeito não é obtido noutros estudos com *Candida albicans* do fármaco. Sendo assim, o uso simultâneo deve ser realizado com cuidado, ou seja, aumentar gradualmente a concentração de flucitosina a administrar. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

### Imidazóis e Triazóis

Estudos *in vitro* realizados com o clotrimazol, fluconazol, itraconazol e cetoconazol concomitantemente com a AmB contra a *Candida albicans*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata* ou *Aspergillus fumigatus* dão indicação de que pode ser gerado um antagonismo. Visto que, a AmB liga-se aos esteróis membranares e os azóis alteram a membrana celular, o antagonismo é então possível, sendo que, ainda incerto. Em coelhos, ratos e ratinhos infetados por *Aspergillus fumigatus* foi já apontado um certo antagonismo derivado da interação das duas classes, ao passo que, noutros estudos com *C. albicans* e *C. neoformans* em ratos e coelhos não houve alteração ou houve até

um ligeiro efeito aditivo, logo nestes casos a administração destes agentes antifúngicos deve ser realizada com cuidado. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

#### Quinolonas

Ainda não existem estudos concretos sobre esta interação, mas existem alguns investigadores que acreditam num aumento de atividade antifúngica aquando da interação das quinolonas com a AmB. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

#### Rifabutina

Estudos *in vitro* realizados às espécies *Aspergillus fumigatus*, *A. Flavus*, *Fusarium solani*, *F. moniliforme*, *F. pollidoroseum* e *F. proliferatum* indicam a existência de um efeito aditivo aquando do uso deste antibiótico com a AmB contra estes agentes, uma vez que, a rifabutina *in vitro* não apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus* e *Fusarium*, e com AmB essa atividade já é evidente. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

#### Zidovudina

O uso de AmB em simultâneo com a zidovudina em cães durante 30 dias levou a mielotoxicidade e nefrotoxicidade. No entanto, este estudo em cães ainda não foi dotado de grande importância no uso clínico em humanos, mas sabe-se que este tipo de interação entre estes dois fármacos é possível. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

#### d. Agentes antineoplásicos

O uso deste tipo de fármacos como por exemplo, a mecloretamina, pode aumentar a nefrotoxicidade, bem como causar broncoespasmo e hipotensão se forem administrados conjuntamente com a AmB. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

#### e. Corticosteróides

Os corticosteróides causam depleção de  $K^+$  quando em simultâneo com a AmB, no entanto, a concomitância pode ser necessária quando se deseja controlar os efeitos

adversos da AmB. Nestes casos, deve ser realizada a monitorização cardíaca, bem como do nível de eletrólitos. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

f. Transfusões leucocitárias

A infusão IV de AmB durante ou rapidamente a seguir a uma transfusão de leucócitos pode trazer, embora raramente, reações agudas pulmonares como dispneia, taquipneia, hipoxémia, hemoptise e difusão de infiltrados intersticiais. Os casos mais graves dão-se quando a administração de AmB é realizada nas primeiras quatro horas após a transfusão, e que no caso de uma deterioração a nível da função respiratória pode levar à morte. Sendo então importante, o uso cauteloso de AmB, sempre que se realizar uma transfusão, especialmente se houver existência de *sepsis* causada por bactérias Gram-negativo. Nestes casos, deve então ser efetuado um espaçamento entre a transfusão e a administração de AmB o mais possível e monitorizar a função renal (American Society of Health – System Pharmacists, 2012)

viii. Resistências

A resistência à AmB foi analisada e obtida *in vitro* por algumas espécies na presença de elevadas concentrações de fármacos, como é o caso de algumas espécies de *Candida spp.*, que foram isoladas de pacientes que receberam durante demasiado tempo tratamento com AmB. Mais concretamente as espécies reportadas foram *Candida lusitaniae* e *C. guilliermondii*. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012). Mas, também existem casos de resistência com *C. glabrata*. (Ghannoum e Rice, 1999).

Acrescenta-se ainda o caso de espécies resistentes ao fluconazol que demonstraram resistência cruzada à AmB e que foram isoladas de indivíduos imunodeprimidos, sendo o caso de *Cryptococcus neoformans* e de *Candida albicans*, tornando-se este caso preocupante devido à ubiquidade desta última espécie. (American Society of Health – System Pharmacists, 2012) (Kumar e Shukla, 2009)

Fryberg (1974) (*cit. in* Ghannoum e Rice 1999) sugeriu que o desenvolvimento da resistência em questão pode ocorrer por aparecimento de células resistentes que ocorrem de modo natural pela mudança dos esteróis, devido possivelmente, na maior

parte dos casos a mutações, e menos frequentemente, devido ao fenômeno de seleção natural. (Ghannoum e Rice, 1999)

Segundo Kumar e Shukla (2009), durante a infecção fúngica por *Candida albicans* são secretadas para o meio extracelular substâncias como a proteinase aspártica, fosfolipase, bem como se realiza a formação do tubo germinativo. Estes fatores são alvo de estudo quanto à ação e resistência a antibióticos. No estudo efetuado por estes autores, foi realizada uma análise à espécie de *Candida albicans* ATCC10231 e a uma espécie de *Candida albicans* à qual foi induzida resistência à AmB laboratorialmente, de forma a analisar o mecanismo de resistência desta espécie ao antifúngico. (Kumar e Shukla, 2009)

A resistência natural ou adquirida é considerada um processo evolutivo que permite que um agente patogénico sobreviva e se reproduza na presença de um determinado fármaco. (Samaranayake et. al., 1984, *cit. in* Kumar e Shukla 2009) Portanto, a resistência a um antifúngico pode ser definida como a ausência de inibição no crescimento ou um grande aumento de crescimento na presença de um antifúngico. (Kumar e Shukla, 2009)

No estudo de Kumar e Shukla (2009) foi analisado que o tubo germinativo, que corresponde a um teste efetuado para analisar a transição de levedura para hifa em *C. albicans*, sofreu alterações. Assim, foi averiguada a biossíntese de glucano, já que, a sua produção está relacionada com o conseqüente tubo germinativo formado. Tendo os autores se deparado com uma maior biossíntese de glucano na espécie ATCC 10231 do que na espécie resistente. Pelo que se observou assim, menor formação do tubo germinativo nesta última. O glucano pertence à parede celular e pode então interagir de certo modo com o antifúngico e inibir a sua penetração, portanto os autores concluíram que, apesar de a espécie resistente obter um valor mais baixo de glucano, contrariando o que seria de esperar, a razão que explica este fato é que é possível que durante a indução laboratorial de resistência o fármaco tenha alterado de certo modo, a biossíntese de glucano. (Kumar e Shukla, 2009)

Outro fator relaciona-se com a diminuição de ergosterol. As mutações podem conduzir à produção de um tipo de esterol diferente e assim diminuir a afinidade para a AmB se ligar e diminuir deste modo, a sua eficácia. (Hamilton e Miller, 1973, *cit. in* Kumar e Shukla 2009) Esta mutação pode ocorrer nos genes ERG5, ERG 6, ERG11 e

ERG25, que codificam enzimas fulcrais para a biossíntese do ergosterol. Neste estudo, foi observado também a quantidade de ergosterol, tendo sido menor na espécie resistente. Foi também já referido que os derivados azólicos tiveram um papel preponderante na resistência inculida desta espécie à AmB pela mudança ocorrida na composição da membrana, alvo da AmB, modificando-se a morfologia celular. (Kumar e Shukla, 2009)

Como fatores virulentos nomeiam-se a proteinase aspártica e a fosfolipase. No caso da primeira o aumento da sua atividade está associado a um aumento na resistência ao antifúngico (Costa et. al., 2009, *cit. in* Kumar e Shukla, 2009) podendo dever-se este aumento à presença de bombas de efluxo aqui desenvolvidas. Neste estudo, os resultados indicam um aumento de atividade da proteinase aspártica na espécie resistente comparativamente à ATCC10231, tal como seria de esperar. (Kumar e Shukla, 2009)

Por sua vez, as fosfolipases caracterizam-se pela sua função fundamental na predominância da patogénese, no sentido em que facilitam o processo da adesão do agente etiológico, a invasão no hospedeiro e favorecem também o aumento do tubo germinativo. Neste estudo, a atividade da fosfolipase foi classificada como fortemente elevada na espécie resistente e relativamente forte na ATCC 10231. (Kumar e Shukla, 2009)

Deste modo, culmina-se assim numa série de fatores que levam certamente a uma espécie com um grande poder de resistência e que traz obviamente desvantagens clínicas, no uso de AmB como terapêutica antifúngica.

## 2. Formulações Lipídicas

### i. Caracterização molecular

Devido ao crescente número de micoses sistémicas invasivas, foi crescendo a necessidade de se introduzir tratamentos farmacológicos derivados da AmB mais agressivos, com doses mais elevadas, com menor toxicidade, e melhorando também os mecanismos farmacocinéticos. Este fato motivou o desenvolvimento de diferentes veículos para administração do fármaco em questão. Assim, foram-se desenvolvendo

novos sistemas de distribuição, tais como, os lipossomas, complexos lipídicos e dispersões coloidais, como forma de aperfeiçoar os objetivos anteriormente referidos. (Filippin e Souza, 2006) (Walker e Whittlesea, 2007)

A primeira tentativa de combinação dos lipossomas foi derivada da necessidade de aumentar a atividade terapêutica contra a leishmaniose, e pelo conhecimento de que, tanto os parasitas como os lipossomas sofriam fagocitose e a AmB no interior dos lipossomas adquiria maior proximidade ao parasita, pois era mais facilmente internalizada no interior do macrófago. (Brajtburg et al., 1990)

Os lipossomas apresentam-se como vesículas esféricas constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas, sendo que no seu interior possuem compartimentos aquosos (Figura N° 4). Deste modo, dada a sua estrutura existe a possibilidade destes incorporarem fármacos lipo e hidrossolúveis, ficando os primeiros inseridos ou adsorvidos à membrana e os segundos no compartimento aquoso. Possuem também a capacidade de se tornarem em formas de liberação prolongada, levando a um maior tempo de permanência do fármaco, bem como, protegê-lo de ações internas ou externas como enzimas do TGI ou ação da luz, respetivamente. Os lipossomas cujo diâmetro varia entre 500-5000 nm são denominados como vesículas multilamelares (MLV), por sua vez, os lipossomas com só uma camada e com um diâmetro entre os 100-500 são denominados de vesículas unilamelares (LUV). Também podem existir vesículas unilamelares pequenas (SUV) com diâmetro entre 20-100 nm. (Souto e Lopes, 2011)

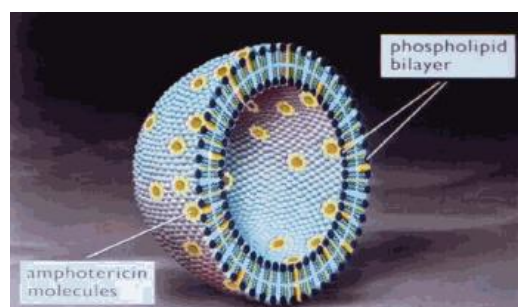


Figura N° 4: AmBisome® (adaptado de <http://www.rxlist.com/ambisome-drug.htm>).

De acordo com um estudo feito por Brajtburg et al. (1990), as preparações lipossômicas apresentam menor toxicidade e maior capacidade de liberação do fármaco, comparativamente à convencional e deste modo, maiores doses podiam ser administradas. Segundo os autores, um dos mecanismos que explica este fenómeno

relaciona-se com o facto de se ter descoberto que a AmB livre induz a libertação de cationes pelos eritrócitos e pelas estruturas lipossomais presentes nas membranas eritrocitárias. São estas estruturas que são responsáveis pela diferença de sensibilidade existente face à AmB convencional e à AmB lipossómica. Assim, foi estudada a possibilidade de seleccionar o tipo de vector lipossomal a partir dos lípidos membranares específicos, para que o lipossoma atue num alvo específico, similar à sua constituição e não em locais indesejáveis como no caso da AmB livre que se mostra inespecífica. (Brajtburg et al., 1990)

O complexo lipídico farmacológico é a formação, tal como o nome diz, de um complexo entre a substância ativa e um lípido, como fosfolípidos, formando-se assim estruturas lamelares (Figura Nº 5). (Filippin e Souza, 2006)

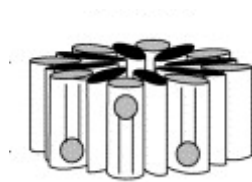


Figura Nº 5: Abelcet® (adaptado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1461534798000078>).

As dispersões coloidais são misturas heterogéneas compostas por uma fase dispersante e uma dispersa, sendo a primeira o solvente da formulação e o segundo, o soluto. ([www.educar.sc.usp.br/quimapoio/coloides](http://www.educar.sc.usp.br/quimapoio/coloides)) As partículas que se encontram dispersas não sedimentam, sendo denominadas de coloides e apresentam um diâmetro entre os 1-100 nm. Alguns tipos de dispersões coloidais são o caso das espumas, aerossóis ou até emulsões (Figura Nº 6). ([educar.sc.usp.br/quimapoio/coloides/html](http://educar.sc.usp.br/quimapoio/coloides/html))

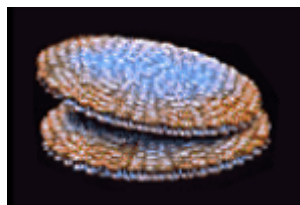


Figura Nº 6: Amphotec®[39] (adaptado de [http://www.medscape.org/viewarticle/463953\\_4](http://www.medscape.org/viewarticle/463953_4)).

Já as emulsões são sistemas heterogéneos constituídos por duas fases imiscíveis em que uma se encontra finamente dividida (fase dispersa, descontínua ou interna) noutra que é a dispersante (contínua ou externa), podendo ser A/O ou O/A, consoante a

fase interna seja água e a externa óleo ou contrário, respetivamente. (Souto e Lopes, 2011) São dotadas de um sistema emulsivo que lhe confere estabilidade, sendo esse sistema composto por um agente emulsivo e pela energia necessária durante a preparação, essencial para a sua formulação. (Souto e Lopes, 2011)

Em resumo, as formulações lipídicas utilizadas para veicular a AmB encontradas são, os lipossomas, complexos lipídicos, dispersões coloidais e emulsões. Este tipo de formulações apresentam uma preparação mais complexa e portanto, industrialmente foram fabricadas as seguintes formulações:

- Lipossomal AmB (AmBisome<sup>®</sup>). (Filippin e Souza, 2006) (Walker e Whittlesea, 2007);
- AmB Lipid Complex (Abelcet<sup>®</sup>). (Filippin e Souza, 2006) (Walker e Whittlesea, 2007);
- AmB Colloidal Dispersion (Amphocil<sup>®</sup>) ou Amphotec<sup>®</sup> (Filippin e Souza, 2006) (Walker e Whittlesea, 2007);

De um modo geral, estas formulações diferem na estrutura lipídica, forma, tamanho, composição lipídica e conteúdo de AmB. (Filippin e Souza, 2006) (Walker e Whittlesea, 2007) Todas as formulações, tal como a AmB convencional, são metabolizadas pelos órgãos do sistema reticuloendotelial (SRE), no entanto, as formas lipossómicas, são acumuladas preferencialmente no fígado e nos pulmões que pode explicar a diminuição da incidência da nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, e pelo contrário em algumas ocasiões, um aumento da hepatotoxicidade, após repetidas administrações desta forma lipossomal. (Filippin e Souza, 2006)

#### a. AmBisome<sup>®</sup>

O AmBisome<sup>®</sup> (Fujisawa Healthcare, Inc. and Gilead Sciences, Inc.) consiste na preparação lipossómica de vesículas unilamelares pequenas, constituídas por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e AmB numa razão molecular de 2:1:0,8:0,4. Foi aprovada pela FDA em 1997. (Filippin e Souza, 2006) (Walker e Whittlesea, 2007) A estrutura lipossómica do AmBisome<sup>®</sup> permite uma distribuição de maiores doses (3 – 10 mg/kg) acompanhada de uma

diminuição de efeitos tóxicos, atingindo assim, maiores níveis plasmáticos (Walker e Whittlesea, 2007)

Num estudo realizado por Emminger et al. (1994) (*cit. in* Filippin e Souza 2006), esta formulação foi utilizada para tratamento empírico de infecções fúngicas em 16 crianças com diagnóstico de cancro. Em nenhuma criança foram detetadas quaisquer reações agudas com o uso desta preparação. (Filippin e Souza, 2006)

Noutros estudos em que se administrou esta forma lipossômica em indivíduos que não toleraram ou não responderam à ação terapêutica da AmB convencional (Coker et al., 1991, *cit. in* Filippin e Souza 2006) (Hudson et al., 1991, *cit. in* Filippin e Souza 2006) (Ringdén et al., 1991, *cit. in* Filippin e Souza 2006) (Miils et al., 1994, *cit. in* Filippin e Souza 2006), observou-se que a AmBisome<sup>®</sup> apresentou resultados favoráveis no tratamento de candidose hepática num paciente leucémico, (Hudson et al., 1991, *cit. in* Filippin e Souza 2006) de criptococose disseminada em três pacientes infetados com VIH (Schürmann et al., 1991, *cit. in* Filippin e Souza 2006), de aspergilose pulmonar em 13 pacientes neutropénicos (Miils et al., 1994, *cit. in* Filippin e Souza 2006) e infecções fúngicas invasivas por *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* em 37 pacientes imunodeprimidos (Ringdén et al., 1991, *cit. in* Filippin e Souza 2006). No entanto, quando usada no tratamento de três indivíduos infetados por VIH e com meningite criptocócica, não se obteve resposta clínica favorável e apenas um dos pacientes sobreviveu (Filippin e Souza, 2006)

De um modo geral, a formulação foi bem tolerada e o aparecimento de fenómenos de toxicidade ocorreu num número reduzido de pacientes e nos casos em que se desenvolveram, não se analisou ao certo se tal se devia à preparação farmacêutica ou a outras doenças graves. Os efeitos tóxicos relatados foram: aumento de creatinina sérica, náusea persistente, febre, calafrios, tremores e algumas reações anafiláticas, que segundo Lampo et al. (2003) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) poderá dever-se nalguns casos a uma reação aos componentes lipídicos da formulação. (Filippin e Souza, 2006)

Foi analisado ainda o comportamento da AmBisome<sup>®</sup> a diferentes temperaturas, demonstrando-se que a temperatura afeta a ligação da formulação ao ergosterol. Ao incubar AmBisome<sup>®</sup> com *S. cerevisiae* a 4° C e a 35°C, nas primeiras 3 horas não se observou qualquer efeito da preparação (Figura N° 7 (A)). No entanto, passadas 24

horas de incubação e a 35° C, havia entrada do lipossoma para o citoplasma, dada a morte celular que se dava após este longo período de incubação, havendo erradicação do fungo (Figura nº 7 (B)). Ainda no presente estudo foi observado que quando o lipossoma era constituído por ergosterol o fármaco apresentava mais afinidade para este lípido e mais dificilmente era libertado. (Shimizu et al., 2010)

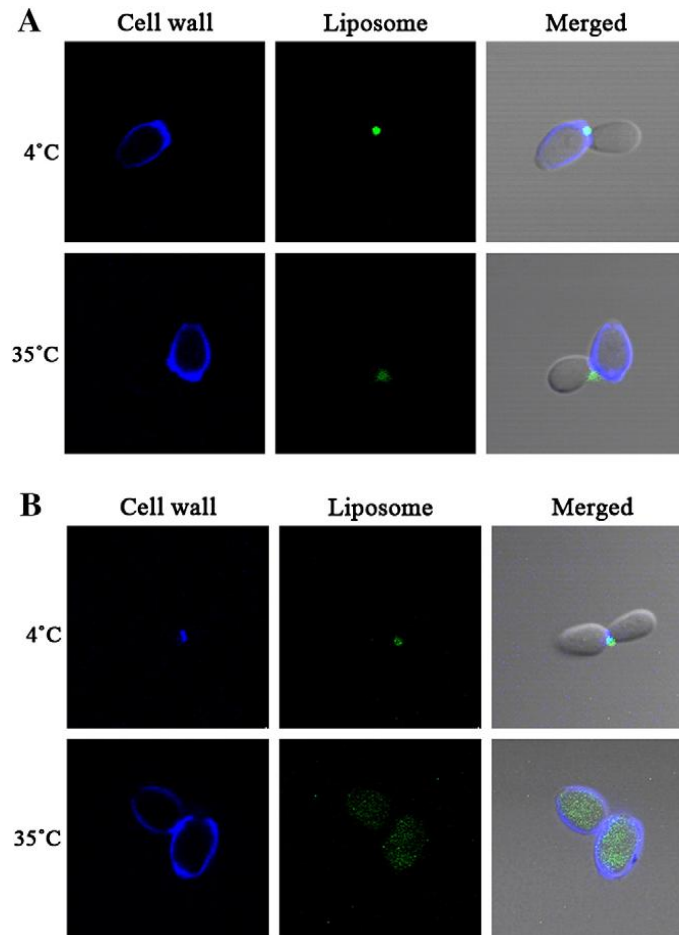


Figura Nº 7: Fluorescência obtida a azul (parede celular) e a verde (lipossoma) demonstrando a ligação veículo lipossomal da AmB em 3 horas de incubação a 4°C e 35°C (A) e em 24 horas a 4°C e a 35°C (B).

(adaptado de Shimizu et al., 2010)

#### b. Abelcet<sup>®</sup>

O Abelcet<sup>®</sup> (Sigma-Tau Pharmaceuticals Inc.) caracteriza-se por formar um complexo lipídico juntamente com o fármaco, cuja estrutura é multilamelar, constituída por diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e DMPG numa razão molar de 7:3, com 36 mol de fármaco. Foi aprovado pela FDA em 1995. (Filippin e Souza, 2006) (Walker e Whittlesea, 2007)

Este complexo lipídico que veicula a AmB resulta num menor pico plasmático comparado ao obtido com a AmB convencional, pois é rapidamente capturado pelos macrófagos. No entanto, a sua concentração a nível hepático e pulmonar é maior. Os efeitos adversos e laterais podem ser mais graves que os presentes na AmBisome<sup>®</sup>. (Walker e Whittlesea, 2007)

Num estudo efetuado por Kan et al. (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) em que se administrou esta formulação com as seguintes concentrações: 0,1; 0,25 e 0,5 mg/Kg durante três dias consecutivos a indivíduos saudáveis, 75% manifestaram sonolência e 37% tiveram um aumento transitório das transaminases [2]. Já em pacientes leucémicos com infeções fúngicas invasivas (candidose disseminada e aspergilose pulmonar), a utilização de Abelcet<sup>®</sup> (5 mg/Kg/dia) para substituição da AmB convencional após o desenvolvimento de nefrotoxicidade, levou à recuperação em relação à nefrotoxicidade e a uma melhor resposta ao tratamento. (Martino et al., 1999, *cit. in* Filippin e Souza 2006)

### c. Amphocil<sup>®</sup> ou Amphotec<sup>®</sup>

O Amphocil<sup>®</sup> (Sequus-Pharmaceuticals Inc.) ou o Amphotec<sup>®</sup> (Alkopharma) caracterizam-se por ser dispersões coloidais de AmB em colesterilsulfato numa razão molar 1:1, formulada em partículas discoides. A dispersão coloidal foi aprovada pela FDA em 1996. (Filippin e Souza, 2006) (Walker e Whittlesea, 2007) (American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

Esta formulação caracteriza-se por apresentar baixos picos plasmáticos mas maiores concentrações atingidas no fígado comparativamente à convencional. Pelo fato de apresentar por vezes mais efeitos adversos que a convencional é menos utilizada que esta última e que a AmBisome<sup>®</sup>. (Walker e Whittlesea, 2007)

Forster et al. (1988) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) realizaram os primeiros estudos *in vitro* com esta formulação, visando avaliar a sua toxicidade. Os resultados demonstraram que os eritrócitos sofriam lise em maior tempo e em menor taxa quando incubados com a AmB em dispersão coloidal, comparativamente à convencional. Hanson e Stevens avaliaram por sua vez, o seu efeito terapêutico *in vitro* contra 15 espécies patogénicas de fungos e obtiveram-se valores quatro vezes inferiores de actividade da Amphotec<sup>®</sup> em relação à convencional. (Filippin e Souza, 2006)

Em humanos, estudos realizados em voluntários saudáveis por Sanders et al. (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006), descreveu uma boa tolerância a esta formulação. Mas com o aumento progressivo da dose, foram relatados alguns efeitos colaterais como vômitos, náuseas e calafrios em 50% dos pacientes pelo que em dois deles ainda existia febre e taquicardia. (Filippin e Souza, 2006)

O tratamento de infecção fúngica com esta formulação (4 mg/Kg/dia a uma taxa de 1 mg/Kg/h) em 133 pacientes com insuficiência renal, proporcionou o aparecimento de efeitos adversos entre eles: febre (18%) e tremores (41%), como acompanhamento do decréscimo na concentração sérica de creatinina, o que suscitou interesse em relação a esta formulação. (Filippin e Souza, 2006)

#### d. Outras formulações

A nível não industrial para além da AmBisome<sup>®</sup> têm sido elaboradas outras formulações lipossômicas diferenciando-se desta pelo tamanho e composição lipídica. No entanto, algumas não passaram sequer por ensaios clínicos. Ralph et al., (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) efetuaram um estudo em 4 pacientes para tratamento de candidose instalada no trato urinário, com AmB lipossômica constituída por 50 mg de AmB em vesículas multilamelares compostas por DMPC e DMPG numa proporção 7:3. Os pacientes apresentaram boa tolerância ao fármaco, sem ser necessário acompanhamento de medicação prévia, não apresentando efeitos adversos e as culturas tornaram-se negativas após 1 a 4 dias realçando-se o fato de se conseguir atingir na urina níveis de AmB com atividade terapêutica através do uso de doses convencionais, ao contrário do que acontece com a convencional, em que a molécula é excretada numa percentagem de apenas 3% [2] (Filippin e Souza, 2006).

Para além dos tipos de formulações apresentados até aqui, a AmB desoxicolato também pode ser veiculada em emulsões para nutrição parental Anfotericina B desoxicolato veiculada em nutrição parental Intralipid<sup>®</sup> 20% (AmB-DOC-IL). Em 1990 foram publicados estudos com referência à utilização de AmB-DOC-IL em pacientes com infecções fúngicas graves. Segundo Macedo et al. (1994) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) a terapia revelou sucesso em três pacientes com quadro de sepsis fúngica acompanhada de profunda granulocitopenia. Para além disso, também em doentes pediátricos foi relatado o seu uso, com recurso a doses totais que iam dos 10 a 12

mg/Kg. Os efeitos tóxicos não foram graves, detetou-se uma redução transitória da depuração de creatinina, azotémia, e aumento da excreção de  $K^+$  tendo regredido no final do tratamento. De um modo geral, Caillot et al. (1994) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) verificou uma incidência 10 vezes menor desses efeitos comparado com iguais doses da convencional. (Filippin e Souza, 2006)

No entanto, a terapia de 0,75 mg/Kg/dia de AmB veiculada em emulsão lipídica, não foi recomendada pelos autores devido a um aumento de efeitos tóxicos, apesar de se apresentar mais económica, relativamente às outras formulações lipídicas. Também se constatou desenvolver alterações na estabilidade físico-química, pois passadas 5 horas de armazenagem pode haver formação de precipitados de AmB, (Ranchère et al., 1996, *cit. in* Filippin e Souza 2006) precipitação essa que, era revertida com adição de 5% de dextrose. (Filippin e Souza, 2006)

## ii. Farmacocinética

O perfil farmacocinético de cada formulação lipídica apresenta alguma variação pelo que, para a sua análise alguns autores recorreram a estudos laboratoriais.

O primeiro estudo com intenção de análise farmacocinética foi realizado por Collette et al. (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006), em que se realizou uma distribuição tecidual de AmB em humanos através de SUV (lecitina de ovo: colesterol: estearilamina 4:3:1) denominando-se de anfopossomas, e no qual, a distribuição tecidual de AmB não foi significativamente modificada em relação à convencional. Devido ao facto de se ter administrado uma maior dose de anfopossomas levou a uma maior concentração sérica. A excreção biliar foi analisada tendo sido estimada em 0,8-14,6% após injeção diária de AmB convencional e em 0,4-8,2% após anfopossomas. (Filippin e Souza, 2006)

As formulações de AmB atingiam maior concentração a nível do fígado e baço para AmBisome<sup>®</sup> e por sua vez, Van Etten et al. (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) observou menor concentração nos rins e pulmões, o que pode explicar também a menor eficácia em certos casos para esta formulação. (Filippin e Souza, 2006)

Segundo Walsh et al. (1998) (*cit. in* Filippin e Souza 2006), a AmBisome<sup>®</sup> revela uma cinética não linear, ou seja, as concentrações plasmáticas e a *area under the*

*curve* (AUC) aumentam desproporcionalmente em relação às infusões, isto pode-se dever, à captação acentuada pelos órgãos que fazem parte do SRE. Com utilização repetida pode haver saturação deste sistema, levando assim, a picos maiores de concentração plasmática para esta formulação. O seu tempo de semivida ( $t_{1/2}$ ) é de 152 horas, acompanhado de uma diminuição do volume de distribuição ( $V_D$ ). Do ponto de vista da eliminação a excreção urinária e fecal foi 10 vezes inferior para a AmBisome<sup>®</sup> comparativamente à AmB convencional (Bekersky et al., 2002, *cit. in* Filippin e Souza 2006).

Em relação à Abelcet<sup>®</sup>, um estudo efetuado em voluntários saudáveis com as concentrações 0,1; 0,25 e 0,5 mg/Kg em três dias alternados, levou a um  $V_D$  e a uma depuração de AmB maiores em relação à convencional e portanto menor concentração sérica de AmB. (Filippin e Souza, 2006)

A Amphotec<sup>®</sup> administrada em dose única em voluntários saudáveis, apresenta um  $V_D$  maior, com referência a variações na concentração plasmática durante curtos períodos de tempo. (Filippin e Souza, 2006)

Foram já realizados vários estudos sobre a avaliação farmacocinética da AmB em lipossomas e em dispersões coloidais tanto em animais como em humanos, mas poucos distinguem a AmB que se dissocia da formulação lipídica da que permanece incorporada. (Bellmann et al., 2003)

Num estudo efetuado por Bellmann et al. (2013), através da técnica cromatográfica, mediu-se mediram-se separadamente os níveis de AmB ligados às lipoproteínas (uma vez que é insolúvel em água) e a que permaneceu na formulação lipídica. Para além disso, averiguou-se a sua atividade em pacientes que estavam sob hemodiálise e outros que não estavam, (Gráficos N° 2 a N° 4). (Bellmann et al., 2003)

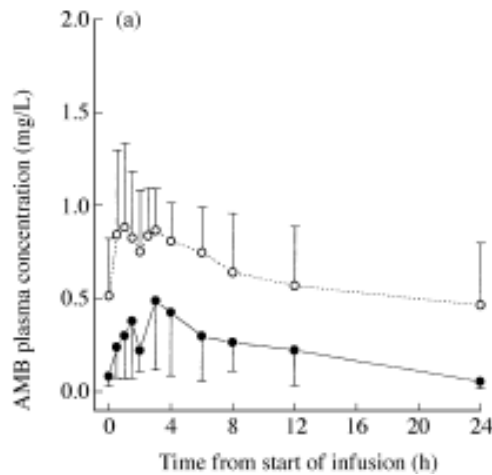


Gráfico N° 2 (a): Concentração plasmática de AmB convencional ao longo da administração. (adaptado de Bellmann et al., 2003)

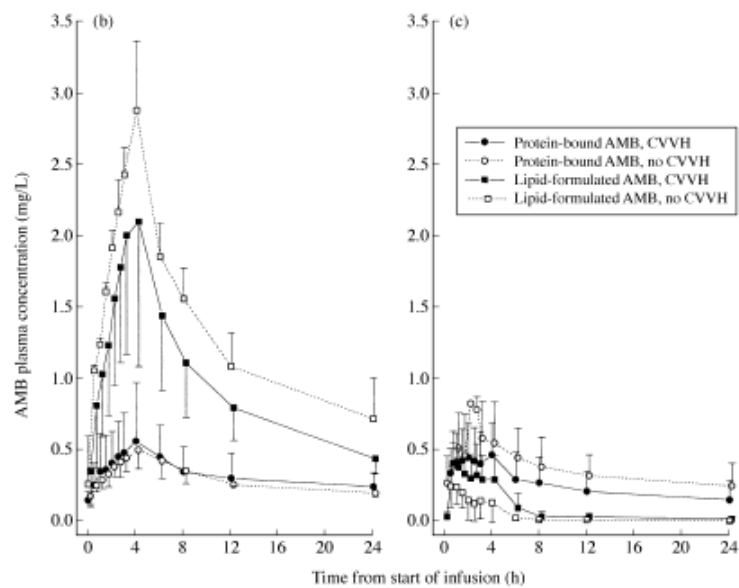


Gráfico N° 3 (b) e Gráfico N° 4 (c): Concentração plasmática de AmB ligada a lipoproteínas e de AmB incorporada em formulações lipídicas, com utilização de AmB lipossomal (b) e dispersão coloidal (c). (adaptado de Bellmann et al., 2003)

Neste estudo os pacientes que estavam quer em tratamento, quer sem receber tratamento renal, ao utilizar a AmB lipossomal apresentavam maior concentração plasmática e maior AUC para a AmB veiculada do que para a ligada às lipoproteínas. Relativamente à dispersão coloidal que veicula a AmB, os pacientes que estavam sob tratamento, mais concretamente sobre hemofiltração, revelam diferenças na taxa de eliminação de AmB total. O autor descreve o fato de a dispersão coloidal ser mais

facilmente removida pelo SRE, por serem maior tamanho que as lipossomais. (Bellmann et al., 2003) Do ponto de vista toxicológico, o autor conclui que apesar ambas as formulações lipídicas testadas revelarem menor toxicidade, em relação à convencional, a dispersão coloidal de AmB apresentou maior toxicidade. Um dos pacientes teve inclusive que trocar de grupo, passando da administração de dispersão coloidal de AmB para a formulação lipossomal devido ao desenvolvimento de febre e arrepios. Isto deve-se possivelmente ao facto de a forma lipossómica atingir níveis plasmáticos de AmB livre e não ligado à formulação mais baixos que a AmB em dispersão coloidal. Como conclusão, a AmB parece não ter grande acumulação no organismo quando administrada via lipossoma e via dispersão coloidal, e portanto a administração de 3-4 mg/Kg é recomendada nestes grupos de pacientes. (Bellmann et al., 2003)

### iii. Administração

#### a. AmBisome<sup>®</sup>

A administração desta preparação pode ser efetuada via infusão IV mas também por inalação ou nebulização, (sendo estas duas últimas não aprovadas pela FDA). Deve ser reconstituída adicionando 12 mL de água PPI a 50 mg de AmB, resultando numa concentração de 4 mg/mL, diluída em 5% de dextrose para obter uma concentração final de 1-2 mg/mL. A administração deve respeitar uma duração de 1-2 horas ou poderá ser ainda maior se os pacientes revelarem desconforto à infusão. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

#### b. Abelcet<sup>®</sup>

Esta formulação lipídica é administrada via infusão IV. A suspensão é diluída em 5% de dextrose adquirindo-se uma concentração final de 1 mg/mL, sendo agitada até completa redispersão e durante a infusão deve ser agitada a cada 2 horas. A taxa de administração deve respeitar os 2,5 mg/Kg/h. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

c. Amphotec<sup>®</sup>

A formulação é usualmente administrada sob a forma de infusão IV. Apresentada sob a forma de liofilizado, devendo possuir cerca de 50 ou 100 mg de AmB reconstituída em 10 ou 20 mL de água PPI, respetivamente, atingindo-se assim uma concentração de 5 mg/mL. Pode-se ainda diluir a dispersão coloidal em 5% de dextrose obtendo-se uma concentração final de 0,6 mg/mL. A taxa de administração é de 1 mg/Kg/h. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

## iv. Aplicações

As aplicações abaixo referenciadas nas tabelas N° 3, 4 e 5, são aprovadas pelo CDC. É de salientar, que no caso de doentes imunodeprimidos as doses aplicadas são frequentemente maiores. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

a. AmBisome<sup>®</sup>

Tabela N° 3: Aplicações aprovadas para a AmBisome<sup>®</sup> com respectivas dosagens e algumas observações\*.

Patologia	Dosagem	Observações
Aspergilose	3-5 mg/Kg 1 vez por dia durante 15-29 dias	-
Blastomicose	3-5 mg/Kg 1 vez por dia durante 1-2 semanas	Seguido de itraconazol oral durante 6-12 meses
Candidose	3-5 mg/Kg 1 vez por dia durante 15-29 dias	-
Coccidioidomicose	3-5 mg/Kg 1 vez por dia até melhorias observadas	Terapia oral com fluconazol ou itraconazol durante 1 ano
Criptococose	3-5 mg/Kg 1 vez por dia	-
Histoplasmose	3-5 mg/Kg 1 vez por dia durante 1-2 semanas	Acompanhado de itraconazol oral durante 12 semanas.
Doentes com neutropenia	3 mg/Kg 1 vez por dia durante 10,8 dias	-

Leishmaniose	3 mg/Kg 1 vez por dia durante 1-5 dias, depois passar para igual dose mas apenas no 14º e 21º dia	-
Prevenção de Infecções fúngicas em doentes transplantados, doentes com cancro ou de alto risco	1-2 mg/Kg 1 vez por dia durante 7-14 dias.	-

\*(American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

### b. Abelcet®

Tabela Nº 4: Aplicações aprovadas para Abelcet®, com respectivas dosagens e algumas observações\*.

Patologia	Dosagem	Observações
Aspergilose	5 mg/Kg (em caso de doença pulmonar invasiva) 1 vez por dia durante 6-12 semanas	-
Candidose	3-5 mg/Kg 1 vez por dia	-
Coccidioidomicose	Normalmente utilizada em doentes com VIH, no caso de doentes pediátricos: 5 mg/Kg diariamente. Se adultos ou adolescentes também infetados: 4-6 mg/Kg diariamente.	Terapia oral com fluconazol ou itraconazol
Criptococose	5 mg/Kg 1 vez por dia durante 6 semanas	Seguido de follow-up com fluconazol oral durante 12 semanas
Histoplasmose	5 mg/Kg 1 vez por dia durante 2 semanas ou até resposta favorável	Acompanhado de itraconazol oral durante 1 ano
Doentes com neutropenia	3 mg/Kg 1 vez por dia durante 10,8 dias	-
Leishmaniose	3-5 mg/Kg 1 vez por dia	-

\*(American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

c. Amphotec<sup>®</sup>Tabela Nº 5: Aplicações aprovadas para Amphotec<sup>®</sup>, com respectivas dosagens e algumas observações\*.

Patologia	Dosagem	Observações
Aspergilose	3-4 mg/Kg 1 vez por dia durante 6-12 semanas	-
Candidose	3-6 mg/Kg 1 vez por dia	Efetuada em pacientes que não respondem à AmB convencional
Criptococose	3-6 mg/Kg 1 vez por dia	-
Doentes com neutropenia	4 mg/Kg 1 vez por dia durante 8 dias	-
Leishmaniose	2 mg/Kg 1 vez por dia durante 7-10 dias	-

\*(American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

## v. Toxicidade

As formulações lipídicas são de um modo geral, caracterizadas por apresentarem uma baixa incidência de efeitos adversos, comparativamente à AmB convencional. A diminuição deste tipo de efeitos a nível renal e a existência de um episódio anafilático surgem como os efeitos adversos mais discrepantes. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012) Na Tabela Nº 6, estão descritos os principais efeitos para as diferentes formulações.

Tabela Nº 6: Descrição dos efeitos adversos possíveis relatados com a utilização de AmBisome<sup>®</sup>, Abelcet<sup>®</sup> e Amphotec<sup>®</sup>.\*

	AmBisome <sup>®</sup>	Abelcet <sup>®</sup>	Amphotec <sup>®</sup>
Reacções adversas imediatas	Febre, Arrepios, Vômitos e Náuseas  (4-20%)	Febre, Arrepios, Vômitos e Náuseas  (8- 18 %)	Febre e Arrepios (35%)
Nefrotoxicidade	Aumento do nível sérico de ureia e de creatinina, hipocalémia,	Aumento do nível sérico de ureia e de creatinina, hipocalémia,	Aumento do nível sérico de ureia e de creatinina, hipocalémia,

	e hipocalcémia e hipomagnesiémia	e hipocalcémia e hipomagnesiémia	e hipocalcémia e hipomagnesiémia
Hematológicos	Anemia, Agranulocitose e trombocitopenia	Anemia, Agranulocitose e trombocitopenia	Anemia, Agranulocitose e trombocitopenia
Cardiopulmonares	Brocospasmo, hipóxia e angioedema.	Brocospasmo, hipóxia e angioedema	Brocospasmo, hipóxia e angioedema Dificuldade respiratória e dificuldade na movimentação do lado esquerdo do corpo, após 50 mg desta formulação, com inicial administração de Abelcet <sup>®</sup> , e que também revelou episódio de choque anafilático.
Ao nível do tracto gastro intestinal	Anorexia, diminuição de peso, diarreia, xerostomia, estomatite, dispepsia, dor epigástrica e hemorragia	Anorexia, diminuição de peso, diarreia, xerostomia, estomatite, dispepsia, dor epigástrica e hemorragia	Anorexia, diminuição de peso, diarreia, xerostomia, estomatite, dispepsia, dor epigástrica e hemorragia
Reacções locais	Eritema, dor, inflamação	Eritema, dor, inflamação	Eritema, dor, inflamação
Sistema Nervoso	Depressão, confusão, insónia, sonolência, coma, ansiedade, agitação e alucinações.	Depressão, confusão, insónia, sonolência, coma, ansiedade, agitação e alucinações.	Depressão, confusão, insónia, sonolência, coma, ansiedade, agitação e alucinações.
Outros efeitos	Aumento das transaminases, da fosfatase alcalina, bilirrubina, $\gamma$ -GT e LDH.	Aumento das transaminases, da fosfatase alcalina, bilirrubina, $\gamma$ -GT e LDH.	Aumento das transaminases, da fosfatase alcalina, bilirrubina, $\gamma$ -GT e LDH.

\*(American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

## vi. Mecanismos propostos para a diminuição da toxicidade

O fato de estas formulações lipídicas apresentarem menor toxicidade, tem sido alvo de inúmeros estudos.

Como já referido anteriormente, a AmB tem maior afinidade para o ergosterol que para o colesterol.

Através de estudos efetuados para determinar a distribuição tecidual e a depuração plasmática, observaram-se diferenças na distribuição entre as formulações lipídicas. No caso da Abelcet<sup>®</sup>, Olsen et al. (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) observaram que a AmB atinge uma maior concentração ao nível do fígado, baço e pulmões em animais testados e conseqüentemente com valores plasmáticos mais baixos. Já para a Amphotec<sup>®</sup>, Fielding et al. (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) salientaram que esta preparação atinha baixas concentrações a nível esplênico, pulmonar e renal ao passo que, a nível hepático atinha valores 2 a 3 vezes maiores e cerca de 100% da AmB foi recuperada no fígado após 30 minutos da injeção. No caso da AmBisome<sup>®</sup>, Longuet et al. (1991) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) averiguaram que o veículo lipossomal atingiu resultados semelhantes à AmB convencional quanto à sua concentração a nível renal. Assim foi posto em causa, o facto de haver uma possível alteração na disposição da AmB quando internalizada nas formulação, sendo que, não deve ser associado ao fator de proteção que estes lipossomas efetuam, mas relacionando-se com a íntima interação da AmB com as membranas das células aquando da sua incorporação em formulações lipídicas como a lipossómica. (Filippin e Souza, 2006)

Para além disso, foi também proposta a possível ocorrência de atividade antifúngica em macrófagos infetados por interação direta da AmB com o microrganismo fagocitado. Segundo Legrand et al. (1996), a diminuição de toxicidade das formulações lipídicas com AmB pode ocorrer devido à possibilidade do antifúngico ser internalizado sob a forma de formulação lipídica e não na forma livre. Esta acumulação de AmB intracelular é seguida de uma libertação do fármaco para o meio extracelular na forma agora livre, que conforme a formulação diferentes níveis de acumulação se desencadeiam, funcionando aqui os macrófagos como possíveis reservatórios. (Filippin e Souza, 2006)

Para além disso, tanto a Abelcet<sup>®</sup> como a Amphotec<sup>®</sup>, sofrem maior *up-take* pelo fígado, atuando este órgão também como um reservatório de fármaco, de onde a AmB é lentamente libertada, de forma intacta. (Filippin e Souza, 2006)

Existe ainda, a interação entre a AmB com as lipoproteínas que se demonstra importante neste sentido. Foi demonstrado que a alteração no perfil lipídico vascular leva a um menor efeito tóxico de AmB convencional, pois com a presença de lipoproteínas a concentração da forma livre do fármaco diminui, devido à interação lipoproteína-AmB, e se essas lipoproteínas forem obtidas do soro pós-prandial, a sua concentração diminui ainda mais, assumindo-se ainda que a dieta influencia a quantidade de fármaco livre tóxico. Deste modo, constata-se que a associação de AmB com diferentes frações do plasma pode ser um fator responsável pela diminuição da toxicidade do antifúngico. Ou seja, segundo Wasan et al. (1994) (*cit. in* Filippin e Souza 2006), modificações na temperatura e na composição lipídica do lipossoma implicam distribuições diferentes da AmB entre HDL e LDL e conseqüentemente diferentes valores de fármaco livre, tendo-se o fármaco distribuído predominantemente pelas HDL neste estudo. O autor também concluiu que a diminuição da toxicidade ao nível das células renais de porco LLC PK1 se devia a uma diminuição da expressão de recetores HDL presentes nestas células. (Filippin e Souza, 2006)

## vii. Resistências

As resistências previstas para a AmB convencional são igualmente existentes para as formulações lipídicas. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

## viii. Interações

Os estudos efetuados sobre as interações que ocorrem entre as formulações lipídicas e outros fármacos ainda não foram efetuados, e portanto, a probabilidade de interação de determinadas substâncias ativas que usualmente reagem com a AmB convencional, à partida, pode também existir com estas formulações. Deve-se então ter em conta, as interações já mencionadas para a AmB convencional antes da administração. (American Society of Health-System Pharmacists, 2012)

## ix. Novos Estudos

Ao longo do tempo várias têm sido as tentativas para criar formulações que veiculem a AmB e que permitam diminuir a toxicidade da AmB convencional. De todos os estudos efetuados, as formulações AmBisome<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup> e Abelcet<sup>®</sup> são as únicas aprovadas para comercialização. No entanto, devido ao facto de a sua ação terapêutica em determinados casos ainda não se encontrar superior comparativamente à convencional, foram efetuados estudos com objetivo de incorporar a AmB em Nanopartículas sólidas (SLN). (Fukui et al., 2003)

As SLN são partículas compostas por uma matriz lipídica sólida, revestidas por uma camada de moléculas de tensoativo e cujas dimensões são normalmente inferiores a 1 µm. Surgiram no início da década de 90, com o objetivo de ultrapassar as limitações apresentadas pelos sistemas tradicionais como os lipossomas, nanopartículas poliméricas, micro e nanoemulsões, pois a grande desvantagem dos lipossomas e das emulsões é a incapacidade de proteção dos fármacos quimicamente lábeis, sendo que as SLN para além de ultrapassarem essa desvantagem, também não necessitam de utilizar solventes orgânicos tóxicos como as nanopartículas poliméricas. Por possuírem uma matriz sólida permite-lhes obter ainda um controlo da libertação do fármaco. (Souto e Lopes, 2011)

O estudo efetuado por Fukui et al. (2003) pretendeu desenvolver um sistema de distribuição de baixa dose para diminuir efeitos adversos e manter a ação terapêutica, com recurso às SLN. (Fukui et al., 2003) Estas nanopartículas são uma ótima maneira de veicular fármacos pois propiciam um aumento do tempo de semivida, aumentam ainda a concentração plasmática e apresentam uma boa distribuição para locais que evidenciam inflamação, devido às suas boas características de permeação. (Fukui et al., 2003)

Fukui et al. (2003), preparou as SLN misturando lecitina de ovo e óleo de soja com a AmB enquanto que, noutras SLN, misturou estes mesmos constituintes com um composto radioativo (H-éter hexadecilo colesterol) (H-CHE), numa solução de clorofórmio e metanol (2:1, v/v). As SLN foram observadas por micrografia eletrónica, como ilustrado na Figura N° 8. Para além das SLN foram também preparadas microsferas lipídicas (ML) sendo mais concretamente emulsões lipídicas convencionais,

que também possuem na sua composição iguais constituintes mas em diferentes proporções, composições essas descritas na Tabela N° 7 abaixo representada. Como comparação das SLN à AmB convencional utilizou-se a Fungizona®. (Fukui et al., 2003)

Assim, o objetivo inicial foi comparar as ML com as SLN de modo a determinar qual delas seria mais eficaz, para efetuar o estudo de comparação à Fungizona®. Uma vez que, não existiam estudos farmacocinéticos efetuados, o autor realizou esta comparação entre estes dois sistemas, com recurso ao composto H-CHE, medindo-se a radioatividade como objetivo de análise, comparando-se assim os resultados.

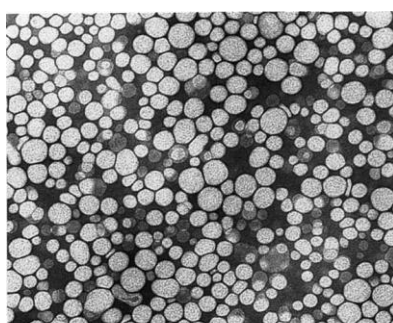


Figura N° 8: Imagem das SLN obtidas por micrografia eletrônica. (adaptado de Fukui et al., 2003)

Tabela N° 7: Composição das estruturas analisadas\*.

	SLN (AmB)	SLN (H-CHE)	ML (AmB)	ML (H-CHE)	Fungizona® (Já preparada)
Lecitina de ovo	50 mg		12 mg		-
Óleo de soja	50 mg		100 mg		-
AmB	0,5 mg/mL	-	0,5 mg/mL	-	0,5 mg/mL
H-CHE	-	37 kBq/mL	-	37 KBq/mL	-
Volume total de dispersão final	1 mL				

\*(Fukui et al., 2003).

O procedimento que se seguiu à obtenção da dispersão final das SLN e das ML foi a dissolução destas na mistura de clorofórmio-metanol, subsequente remoção do solvente, adição de 5% de dextrose, sonificação num banho de gelo, e por fim filtração, que no caso das SLN realizou-se num filtro de 0,2 µm e nas ML de 0,45 µm. (Fukui et al., 2003).

Foi efetuada uma medição da radioatividade do H-CHE no plasma e nos tecidos, após injeção IV das SLN e das ML em ratos, medindo-se também a concentração plasmática de AmB obtida pela Fungizona<sup>®</sup> e pelas SLN após injeção IV e também por infusão destas em ratinhos, ratos, cães e macacos. (Fukui et al., 2003)

Os resultados deste estudo em relação à administração de ML e SLN com H-CHE revelam como se pode observar pelo Gráfico N° 5 uma AUC maior para SLN do que para ML, 15,93% e 2,325, respetivamente. Bem como, um  $t_{1/2}$  de 0,82h para as SLN e de 0,15h para as ML. (Fukui et al., 2003)

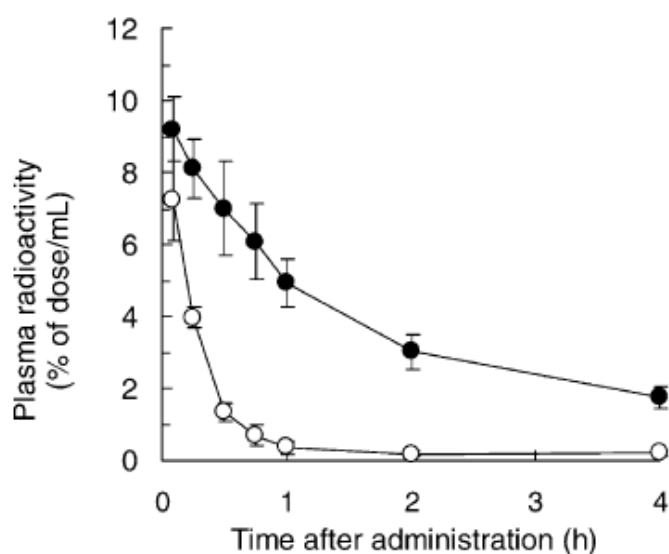


Gráfico N° 5: Radioatividade plasmática, círculos preenchidos a preto representam as SLN e os círculos sem preenchimento representam as ML. (adaptado de Fukui et al., 2003)

Já em relação à concentração plasmática de AmB para as SLN e Fungizona<sup>®</sup> (via IV) as SLN apresentaram uma maior concentração plasmática, sendo este resultado verificado em todas as espécies analisadas referidas anteriormente, sendo que nos macacos obteve-se sempre uma maior concentração para as duas estruturas. (Fukui et al., 2003)

A AUC para as SLN foi duas a seis vezes maior que para a Fungizona<sup>®</sup>. No caso das infusões, as concentrações plasmáticas e a AUC foram maiores nas SLN. Tal como descrito nos Gráficos N° 6 e 7 abaixo apresentados. (Fukui et al., 2003)

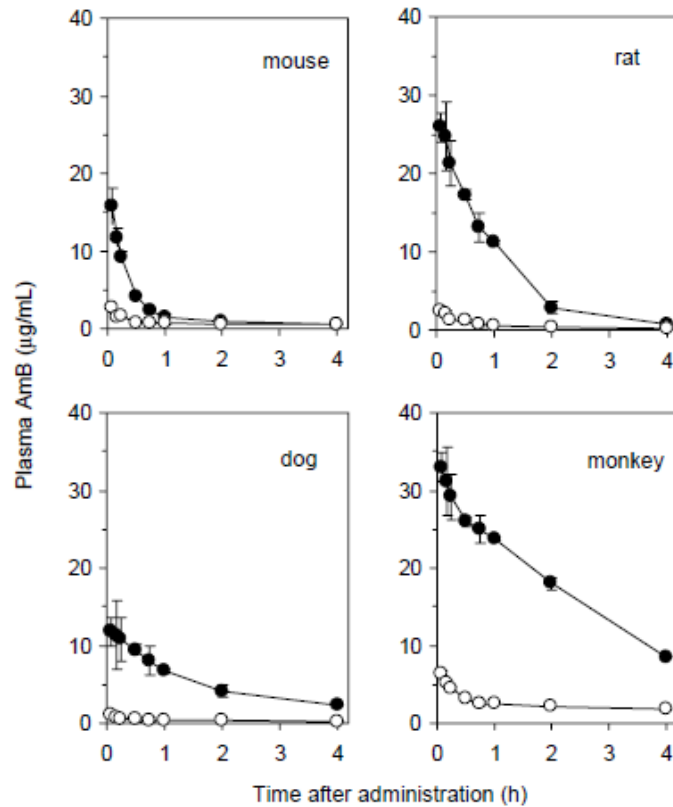


Gráfico N° 6: Concentrações plasmáticas de AmB após administração IV de SLN ou Fungizona<sup>®</sup> numa dosagem de 1 mg/Kg em ratos, ratinhos, cães e macacos, os círculos preenchidos a preto representam as SLN e os círculos sem preenchimento a Fungizona<sup>®</sup>. (adaptado de Fukui et al., 2003)

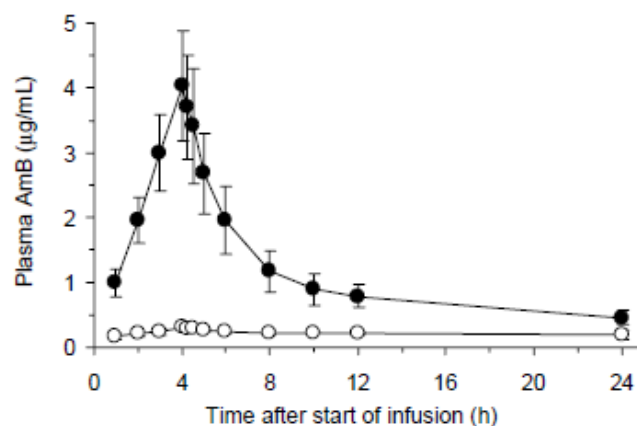


Gráfico N° 7: Concentrações plasmáticas de AmB após infusão intravenosa de SLN e Fungizona<sup>®</sup> em cães com uma dose 1 mg/Kg os círculos preenchidos a preto representam as SLN e os círculos sem preenchimento a Fungizona<sup>®</sup>. (adaptado de fukui et al., 2003)

Os valores farmacocinéticos detalhados deste estudo ajudam a analisar estas formulações, encontrando-se representados na Tabela N° 8 abaixo encontrada.

Tabela N° 8: Parâmetros farmacocinéticos obtidos por análise plasmática de AmB após administração de SLN ou Fungizona® em ratos, ratinhos, cães e macacos\*.

Animal	$C_{5\text{min}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		$t_{1/2, \alpha}$ (h)		$t_{1/2, \beta}$ (h)		$AUC_{0-24\text{h}}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )		
	LNS-AmB	Fungizone	LNS-AmB	Fungizone	LNS-AmB	Fungizone	LNS-AmB	Fungizone	Ratio
Mouse	15.71	2.72	0.20	0.17	21.43	15.17	15.40	8.31	1.9
Rat	25.93	2.52	0.68	0.16	12.53	66.92	33.94	5.96	5.7
Dog	11.82	1.10	1.07	0.09	15.24	25.85	40.17	6.95	5.8
Monkey	32.96	6.32	0.68	0.20	8.29	24.12	144.30	36.86	3.9

\*(adaptado de Fukui et al., 2003).

Como discussão dos resultados obtidos, os autores referem que apesar dos lipossomas se apresentarem como atuais veículos lipídicos para a AmB, existe do ponto de vista físico-químico alguma controvérsia. Pois apesar de se caracterizarem como incorporadores de substâncias hidro e lipofílicas a capacidade para drogas lipofílicas é geralmente menor, e esta é a razão pela qual estes nem sempre obterem sucesso no desenvolvimento uma ação terapêutica com doses mais baixas. (Fukui et al., 2003)

Ao observar os valores obtidos, as SLN originaram uma maior AUC, apresentando-se menos capturadas pelo SRE. Como explicação para este fenómeno, foi descoberto que pode existir uma diferença na afinidade de ligação entre as SLN e as ML à apolipoproteína C-II (Apo C-II). Uma vez que, imediatamente após a injeção das ML a apolipoproteína E (Apo-E) e Apo-CII ligam-se às partículas ML, estas últimas são degradadas pela lipoproteína lípase, e às quais é feito o *uptake* para o fígado. Esta reação não se estabelece tão frequentemente para as SLN devido a serem mais pequenas e a sua captação pelo SRE não ser tão rápida e conseqüentemente mantém-se mais tempo em circulação. Assim foram escolhidas as SLN para prosseguir o estudo. Como apresentado nos resultados, as SLN proporcionaram uma maior concentração plasmática de AmB comparativamente à Fungizona®, podendo-se dever isto ao facto de as SLN circularem então mais tempo evitando a hidrólise das lipoproteínas lipases (LPL) e o grande *uptake* pelo SRE. Foi também efetuado um estudo comparativo da concentração plasmática de AmB de outras formas lipídicas em simultâneo e o autor demonstrou que os níveis plasmáticos da AmB obtidos pela administração de Abelcet® e Amphocil® em

ratos foi três vezes menor aos obtidos com Fungizona<sup>®</sup> e com AmBisome<sup>®</sup>, e que as SLN aqui também estudadas apresentam um perfil plasmático semelhante ao obtido pela AmBisome<sup>®</sup>. Apesar de se ter demonstrado uma maior concentração plasmática de AmB para AmBisome<sup>®</sup> que para a Fungizona<sup>®</sup>, o autor refere que no tratamento de infecções fúngicas a AmBisome<sup>®</sup> deve ser administrada em três vezes maior quantidade do que a dose de Fungizona<sup>®</sup> requerida usualmente, devido à libertação lenta desenvolvida pelo veículo lipossômico AmBisome<sup>®</sup>. (Fukui et al., 2003)

Em relação às infusões administradas, os resultados são semelhantes aos perfis do bólus IV e portanto, o facto de o método de administração ser diferente, este fator não influenciou os resultados no estudo realizado. Mas salienta-se que, contrariamente à AUC de SLN a AUC de Fungizona<sup>®</sup> não aumentou proporcionalmente com a dose, pois deve-se ao facto desta última formar um precipitado aquando da sua reconstituição e com o aumento da dose é expectável que aumente o tamanho das partículas e consequentemente aumente o *uptake* pelo SRE. (Fukui et al., 2003)

Assim este estudo demonstrou-se como uma ótima fonte de análise e propícia ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos de baixa dose de AmB no tratamento de infeções, devido ao elevado potencial veiculatório demonstrado pelas SLN. (Fukui et al., 2003)

Outra tentativa cujo objetivo centrava-se na redução de toxicidade e manutenção de atividade terapêutica foi efetuada por Souza et al. (1993), e mais tarde Souza e Campa (1999). Os autores veicularam a AmB numa emulsão lipídica rica em triglicerídeos que possuía colesterol e era estabilizada por fosfatidilcolina de ovo (emulsão-AmB). (Filippin e Souza, 2006) Foi efetuado então, um ensaio *in vitro*, onde houve uma incubação com células polimorfonucleares e eritrócitos com a emulsão em estudo e à parte outra mas com AmB convencional. Efetuou-se ainda um estudo *in vivo* onde se administrou tanto a emulsão alvo como a AmB convencional em ratos e ratinhos, observando-se do ponto de vista histológico e farmacológico os efeitos tóxicos da AmB nos dois casos. (Filippin e Souza, 2006)

Daqui foi concluído que tanto *in vitro* como *in vivo* observou-se uma redução dos efeitos tóxicos mantendo-se a atividade terapêutica contra a estirpe estudada (*Candida albicans*) quando a AmB foi veiculada em emulsão, mais concretamente uma diminuição da nefrotoxicidade. (Filippin e Souza, 2006)

## x. Opinião geral dos autores e curiosidades

Devido às diversas características, no que se refere à aplicação, administração, efeitos adversos, farmacocinéticos, resistências e interações aqui documentadas, todas as formulações desde a convencional, às lipídicas, apresentam vantagens e desvantagens, tornando-se pouco clara e difícil a comparação entre as três formulações lipídicas e entre as três e a formulação convencional. No entanto, a AmBisome<sup>®</sup> tem sido apontada como a que evidencia melhor experiência clínica, face aos reduzidos efeitos adversos e melhores resultados clínicos apresentados. Não obstante, de um modo geral, o esquema terapêutico usual utiliza a AmB convencional e caso os pacientes não consigam tolerar os efeitos secundários desta formulação de AmB é efetuada a alteração para uma das formulações lipídicas. (Walker e Whittlesea, 2007)

Apesar das formulações lipídicas apresentarem, em alguns casos, menor atividade, o fato de apresentarem menor toxicidade permitiu a administração de doses mais elevadas conseguindo-se assim nos últimos anos resultados mais favoráveis à sua ação terapêutica. (Filippin e Souza, 2006)

Wingard et al. (2000) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) elaborou um estudo randomizado, onde comparou a eficácia e segurança de duas formulações lipídicas AmBisome<sup>®</sup> (5 mg/Kg/dia) e Abelcet<sup>®</sup> (5 mg/Kg/dia) em 244 pacientes neutropênicos e febris. O tratamento teve sucesso em todos os grupos, mas os que se encontravam sob tratamento pela AmBisome<sup>®</sup> demonstraram menos efeitos adversos nomeadamente nas reações imediatamente decorrentes da infusão como febre, tremores, arrepios e também menor nefrotoxicidade. (Filippin e Souza, 2006)

Já na tentativa de possibilitar uma escolha sobre a melhor formulação existente, Linder et al. (2003) (*cit. in* Filippin e Souza 2006) compararam a efetividade e tolerabilidade de AmB convencional com a AmBisome<sup>®</sup> no tratamento de infecções sistêmicas por espécies de *Candida spp.* em pacientes neonatos prematuros. Os pacientes que apresentavam uma creatinina sérica menor ou igual a 1,2 mg/dL foram tratados com AmB convencional e os que possuíam um nível maior que 1,2 mg/dL eram tratados com AmBisome<sup>®</sup>. O índice de cura foi de 67,6% para a AmB convencional e 83,3% para a formulação lipídica. Mais uma vez, a AmB convencional e a AmBisome<sup>®</sup> são referidas como as preparações que melhores resultados obtêm, sendo que as outras

formulações lipídicas existentes, apesar de usualmente utilizadas, são apontadas como as que apresentam menor efeito terapêutico, relativamente às testadas no presente estudo. (Filippin e Souza, 2006)

Apesar das formulações lipídicas representarem uma alternativa, o seu uso tem geralmente sido limitado a pacientes intolerantes à terapia convencional ou até resistentes, sendo que outra razão para que a sua escolha não seja tão usual, seja devido ao alto custo que estas representam. Cagnoni et al. (2000) (*cit. in* Filippin e Souza 2006), elaboraram uma avaliação farmacoeconómica em que refere que os custos hospitalares foram maiores aquando da utilização de AmBisome<sup>®</sup> como escolha para tratamento, mais concretamente, um tratamento de 50 mg de AmB convencional tem o custo de 12,73€, já para a AmBisome<sup>®</sup> para 50 mg são necessários 144,53€. (Filippin e Souza, 2006) Para além disso, em Portugal no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia a AmB é adquirida sob a forma convencional (50 mg em pó para solução injectável pela Idis Managing World Medicines), lipossómica (50 mg em pó para solução injectável pela Gilead Sciences Lda.) e lipídica (5 mg/mL suspensão injectável em frasco de 20 mL pela Teva Pharma – Produtos Farmacêuticos), sendo os seus preços unitários sem IVA 7,97€, 182,90€, 134,10€, respetivamente. Deste modo, pode-se assim observar a discrepância entre o preço da AmB convencional e das formulações lipídicas, sendo estas últimas mais dispendiosas.

### III. Conclusão

Ao acompanhar todos os estudos e evidências aqui referenciadas, quer sobre a AmB convencional, quer sobre as suas formulações lipídicas também correntemente utilizadas, torna-se difícil elaborar uma escolha clara e com certeza absoluta sobre a que se apresenta como a melhor opção para o tratamento das infecções fúngicas e parasitárias às quais estas se aplicam.

Segundo Vasconcellos et al. (2004), a taxa de infecções fúngicas nosocomiais aumentou na última década. (Cornistein et al., 2012)

Por outro lado, a terapêutica antifúngica das micoses sistêmicas ainda não se tornou num tratamento com uma cura comparável à realizada com os antibióticos em agentes bacterianos, e para além disso a elevada prevalência destas infecções em indivíduos imunodeprimidos acaba por dificultar a eficácia terapêutica. (Filippin e Souza, 2006)

De um modo geral, o arsenal de agentes antifúngicos tem aumentado, estando o grupo dos polienos na mira como tratamento de escolha das infecções fúngicas mais graves. Este facto deve-se não só, ao crescente desenvolvimento feito sobre as formulações lipídicas de AmB, como também, ao aumento da percentagem de resistências que tem havido aos agentes antifúngicos do grupo dos azóis e das equinocandinas. (Klepser, 2011)

As infecções invasivas são as mais preocupantes, uma vez que estão associadas a uma elevada mortalidade e ao aumento dos custos na saúde. Perante a evidência deste tipo de infecções, na maior parte dos casos é indispensável o recurso aos polienos, dados os seus ótimos resultados clínicos e à conquista do baixo grau de toxicidade apresentado por parte das formulações lipídicas de AmB. (Klepser, 2011)

De acordo com os dados publicados e investigações feitas a estes agentes terapêuticos, o próximo passo a tomar, será então elaborar uma molécula juntando a eficácia terapêutica da AmB convencional, que apresenta uma baixa taxa de resistências e elevado sucesso nos seus resultados clínicos, ao excelente perfil das formulações lipídicas de AmB a nível dos raros efeitos adversos graves observados, bem como, a nível do foro farmacocinético e farmacodinâmico. Assim, tornar-se-ia possível realizar

uma aproximação no que toca ao aperfeiçoamento das formulações lipídicas, como moléculas de distinta qualidade, segurança e eficácia, usadas sem receio ou consternações no tratamento das respetivas infeções a tratar.

#### IV. Bibliografia

Abelcet<sup>®</sup>. [Em Linha]. Disponível em < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1461534798000078.htm> >.

[Consultado em 16/12/2013]

Ambisome<sup>®</sup>. [Em Linha]. Disponível em < <http://www.rxlist.com/ambisome-drug.htm> >. [Consultado em 16/12/2013]

American Society of Health-System Pharmacists, Inc. (2012). Amphotericin B. [Em linha]. Disponível em < <http://www.ashp.org/> >. [Consultado em 28/10/2012]. (A)

American Society of Health-System Pharmacists, Inc. (2012). Amphotericin B (Systemic). [Em linha]. Disponível em < <http://www.ashp.org/> >. [Consultado em 28/10/2012]. (B)

Amphotec<sup>®</sup>. [Em Linha][Em Linha]. Disponível em < [http://www.medscape.org/viewarticle/463953\\_4.htm](http://www.medscape.org/viewarticle/463953_4.htm) >. [Consultado em 16/12/2013]

Baginski, M. et al. (2005). Molecular Modeling of Membrane Activity of Amphotericin B, a Polyene Macrolide Antifungal Antibiotic. *Acta Biochimica Polonica*, 52 (3), pp. 655-658.

Bahmed, K. et al. (2005). Effect of Sub-inhibitory Concentrations of Amphotericin B on the Yeast Surface and Phagocytic Killing Activity. *Process Biochemistry*, 40, pp. 759-765.

Bellman, R. et al. (2003). Amphotericin B lipid formulations in critically ill patients on Continuous Veno-Venous Haemofiltration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51, pp. 671-681.

Bodey, G. e Vartivarian, S. (1989). Aspergillosis. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease*, pp. 413-437.

Brajtburg, J. et al. (1990). Amphotericin B: Current Understanding of Mechanisms of Action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(2), pp. 183-188.

Brajtburg, J. et al. (1990). Amphotericin B: Delivery Systems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(3), pp. 381-384.

Brown, J. (2005). Zygomycosis: An Emerging Fungal Infection. *American Journal of Health-System Pharmacists*, 62, pp. 2593-2596.

Célula Fúngica e Parasitária. [Em Linha]. Disponível em < [http://water.me.vccs.edu/courses/env108/lesson6\\_print.htm](http://water.me.vccs.edu/courses/env108/lesson6_print.htm) >. [Consultado em 03/03/2013].

Colombo, A., McGough, D. e Rinaldi, M. et al. (1994). Discrepancies Between MIC and MLC Values of Amphotericin B Against Isolates of *Aspergillus* species. *Mycopathologia*, 128, pp. 129-133.

Conces, D. (1996). *Seminars in Roentgenology*, 31 (1), pp. 14-27.

Cornistein, W. et al. (2012). Candida: Epidemiology and risk factors for non-albicans species. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 12, pp. 322-331.

Davidson, R. (2005). Leishmaniasis. *The Medicine Publishing Company Ltd*, 33(8), pp. 43-46.

Delucia, R. e Oliveira, R. (2004). *Farmacologia Integrada*. Rio de Janeiro, Livraria e Editora Revinter, Ltda.

Dispersão Coloidal. [Em Linha]. Disponível em < <http://educar.sc.usp.br/quimapoio/coloides> >. [Consultado em 20/12/21012].

Ferreira, W. e Sousa, J. (2000). *Microbiologia* volume 2. Lousã, LIDEL.

Filippin, F. e Souza, L. (2006). Eficiência Terapêutica das Formulações Lipídicas de Anfotericina B. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42 (2), pp. 167-183.

Fukui, H. et al. (2003). A Novel Delivery System for Amphotericin B with Lipid Nanosphere (LNS<sup>®</sup>). *International Journal of Pharmaceutics*, 265, pp. 37-45.

Ghannoum, M. e Rice, L. (1999). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), pp. 501-517.

Ito, J. e Rad, R. (2008). Treatment of *Candida* Infections with Amphotericin B Lipid Complex, *The Infectious Diseases Society of America*, 40, pp. 384-391.

- Kathiravan, M. et al. (2012). The Biology and Chemistry of Antifungal Agents: A Review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20, pp. 5678-5698.
- Klepser, M. (2011). The Value of Amphotericin B in the Treatment of Invasive Fungal Infections. *Journal of Critical Care*, 26, pp. 225-235.
- Kumar, R. e Shukla, P. (2010). Amphotericin B Resistance Leads to Enhanced Proteinase and Phospholipase Activity and Reduced Germ Tube Formation in *Candida albicans*. *Fungal Biology*, 114, pp. 189-197.
- Leite, C. et al. (2006). A Particularidade de ser um Fungo – I. Constituintes Celulares. *Biotemas*, 19 (2), pp. 17-27.
- Mercado, E. (2012). Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*, 30, pp. 437-443.
- Marques, S. (2012). Paracoccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology*, 30, 610–615.
- Martínez, R. e Tovar, L. (2012). Blastomycosis. *Clinics in Dermatology*, 30, pp. 565-572.
- Ministério da Saúde (2005). Guia de Vigilância Epidemiológica. [Em linha]. Disponível em < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf) >. [Consultado em 05/03/2013].
- Mortimer, M. et al. (2011). Exposure to CuO Nanoparticles Changes the Fatty Acid Composition of Protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Environmental Science and Technology*, 45, pp. 6617–6624.
- Negroni, R. (2012). Cryptococcosis. *Clinics in Dermatology*, 30, pp. 599-609.
- Nucci, M. et al. (1999). Comparison of the Toxicity of Amphotericin B in 5% Dextrose with that of Amphotericin B in Fat Emulsion in a Randomized Trial with Cancer Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), pp. 1445-1448.
- Oliveira, T. (2008). Caracterização Estrutural de Agregados Formados pelos Antifúngico Anfotericina B e Lípidos Catiônicos: Uma Possível Formulação Farmacológica. [Em Linha] Disponível em < [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/.../Mestrado\\_Tiago\\_2008.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/.../Mestrado_Tiago_2008.pdf) >. [Consultado em 02/11/2012].

- Page, C. et al. (2002). *Integrated Pharmacology*. Michael Walker Mosby.
- Sawaya, P., Briggs, J. e Schnermann, J. (1995). Amphotericin B Nephrotoxicity: The Adverse Consequences of Altered Membrane Properties. *Journal of the American Society of Nephrology*, 6, pp. 154-164.
- Shimizu, K. et al. (2010). Temperature-dependent Transfer of Amphotericin B from Liposomal Membrane of AmBisome to Fungal Cell Membrane. *Journal of Controlled Released*, 141, pp. 208-215.
- Souto, E. e Lopes, C. (2011). *Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa.
- Walker, R. e Whittlesea, C. (2007). *Clinical Pharmacy and Therapeutics*. Churchill Livingston Elsevier.
- Welsh, O. et al. (2012). Coccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology*, 30, pp. 573-591.
- Yanamandra, U. (2011). Penicilliosis Presenting as Fungating Skin Lesion. *Journal of Infectious Chemother*, 17, pp. 700-702.
- Zepeda, J. et al. (2005). Successful Treatment of *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis by Using Intravenous Amphotericin B, Fluconazole and Rifampicin. *Archives of Medical Research*, 36, pp. 83-86.