



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA  
MICROEMULSIONADO CONTENDO ANFOTERICINA B PARA USO  
OFTALMOLÓGICO**

**Walteçá Louis Lima da Silveira**

Natal

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA  
MICROEMULSIONADO CONTENDO ANFOTERICINA B PARA USO  
OFTALMOLÓGICO**

**Walteçá Louis Lima da Silveira**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde à Universidade Federal do Rio Grande do Norte

**Orientador:** Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

Natal

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação:**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Técia Maria de Oliveira Maranhão

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA  
MICROEMULSIONADO CONTENDO ANFOTERICINA B PARA USO  
OFTALMOLÓGICO**

BANCA EXAMINADORA

**Presidente da banca:** Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

**Membro Titulares:**

Prof. Dr. Toshiyuki Nagashima Júnior (Universidade Federal de Campina Grande - UFCG)

---

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior (Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN)

---

## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que de uma forma, direta ou indireta, contribuem para o desenvolvimento do ensino, da pesquisa e da extensão neste país, promovendo e compartilhando o conhecimento a todas as pessoas, sem distinção de classe social, idade ou sexo com a simples e pura finalidade de educar e de querer transformar a dura realidade existente neste país em educação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar forças para seguir este caminho bastante árduo; aos meus orientadores, Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito e Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivonete Batista de Araújo, que com sua paciência, firmeza, dedicação e ensinamentos, acreditaram e me incentivaram durante todo o desenvolvimento deste trabalho, por me confiarem a competência para que eu pudesse realizá-lo com ética e responsabilidade; aos meus pais e ao meu irmão, que com muito apoio foram a base para a minha sustentação durante toda a minha vida; a minha namorada e futura esposa, Nadja Maryelly de Oliveira Gomes, por todo amor, carinho e compreensão que foi me dado durante todo esse período de estudos e por ter me proporcionado o grande privilégio de elaborar e desenvolver todo este trabalho; e a todos que fazem parte da família LASID, em especial aos amigos, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Miguel Adelino da Silva Filho, Fernanda do Couto Brasil e Airanuédida Silva Soares pela grande e importante ajuda demonstrada no dia-a-dia dos trabalho e estudos.

## LISTA DE ABREVIATURAS

LASID	Laboratório de Sistemas Dispersos
AmB	Anfotericina B
ME	Microemulsão
DFPT	Diagrama de Fases Pseudo-Ternário
AmB ME	Anfotericina B incorporada na Microemulsão
PPGCSA	Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Olho acometido por uma ceratomicose
- Figura 2 Fórmula estrutural da Anfotericina B
- Figura 3 Mecanismo de ação da Anfotericina B
- Figura 4 Emulsão x Microemulsão
- Figura 5 Classificação proposta por Winsor para sistemas dispersos (1948)
- Figura 6 Microemulsão branca e Microemulsão com Anfotericina B



## RESUMO

As infecções fúngicas oculares estão sendo reconhecidas em todo o mundo como uma importante causa de morbidade e cegueira. A baixa biodisponibilidade dos fármacos como a anfotericina B, antifúngico bastante utilizado no tratamento destas infecções, nos tecidos posteriores dos olhos aliada às barreiras anatômicas oculares, que são capazes de limitar a sua absorção e associado ao grave risco de desenvolvimento de reações adversas levam, geralmente, a um insucesso no tratamento desejado e a sérias conseqüências para os pacientes acometidos. Pesquisadores em todo o mundo estão buscando novas alternativas para contornar esta problemática e uma das principais linhas de pesquisa estabelecidas consiste no desenvolvimento de novas formulações que visam melhorar a biodisponibilidade e reduzir a toxicidade associada à aplicação da anfotericina B. As microemulsões surgem como novos sistemas capazes de carrear este fármaco para uso oftalmológico. O presente estudo objetivou a obtenção de uma microemulsão biocompatível com a via de administração ocular contendo anfotericina B a fim de se estabelecer uma nova forma farmacêutica viável para a administração tópica nos olhos. O sistema obtido demonstrou, por meio dos estudos de caracterização realizados, biocompatibilidade com a via de administração pretendida e surge, portanto, como uma nova e interessante apresentação farmacêutica contendo anfotericina B para ser utilizada, no futuro, no tratamento de infecções fúngicas oculares.

**Descritores:** Anfotericina B; Soluções Oftálmicas; Carreadores de Fármacos; Preparações Farmacêuticas; Microemulsões

## SUMÁRIO

Dedicatória _____	iv
Agradecimentos _____	v
Lista de Abreviaturas _____	vi
Lista de Figuras _____	vii
Resumo _____	viii
<b>1. INTRODUÇÃO _____</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA _____</b>	<b>13</b>
<b>3. ANEXAÇÃO DO ARTIGO _____</b>	<b>21</b>
3.1. Título do Artigo _____	21
<b>4. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES _____</b>	<b>54</b>
<b>5. APENDICE _____</b>	<b>58</b>
5.1. Apêndice I _____	58
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Vancouver) _____</b>	<b>62</b>
Abstract _____	65

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças oculares são principalmente tratadas topicamente pela aplicação de soluções (gotas oftálmicas) contendo fármacos administrados por meio de colírios. Estas formas farmacêuticas convencionais correspondem a 90% das formulações oftalmológicas disponíveis, entretanto, a rápida perda pré corneana causada pela drenagem nasolacrimal e pela presença das lágrimas tornam este fato um dos maiores problemas associados à absorção dos fármacos nos olhos. Somente 5% da dose administrada são capazes de penetrar através da córnea e alcançar os tecidos intra-oculares, sendo os outros 95% eliminados através da absorção pela conjuntiva ou via ducto nasolacrimal <sup>(1)</sup>.

As infecções fúngicas oculares estão sendo cada vez mais reconhecidas como uma importante causa de morbidade e cegueira em todo o mundo e o tratamento destas infecções não foge ao contexto apresentado. As infecções graves supurativas que levam a ulcerações nos tecidos envolvidos possuem um prognóstico geralmente severo e o seu tratamento depende de um diagnóstico rápido e eficiente. Entretanto, além dos desafios gerados pela natureza do olho, o tratamento dessas patologias ainda gera incertezas quanto aos protocolos clínicos que trazem, como fármaco de escolha, a anfotericina B (AmB) <sup>(2-7)</sup>.

A AmB tópica corresponde ao tratamento de escolha para as infecções fúngicas superficiais que acometem o olho causadas por *Candida* e em locais onde a natamicina (5%) não está aprovada para o uso. Sua formulação atual (Fungizone<sup>®</sup>) contém desoxicolato de sódio (agente emulsificante necessário para promover a micelização da AmB), que provoca durante a instilação

bastante irritação, o que leva a uma não adesão ao tratamento por parte do paciente e, conseqüentemente, ao agravamento dos sintomas <sup>(8)</sup>.

Entretanto, quando as lesões se mostram mais profundamente localizadas nos tecidos oculares, este fármaco deve ser então administrado através das vias intravenosa, intravitreal ou intracameral, devido a incapacidade que a AmB tem em atravessar a córnea intacta, submetendo o paciente aos desconfortos proporcionados por estas formas de administração e aos efeitos adversos relacionados <sup>(9)</sup>.

Diante de todos estes problemas associados ao uso da AmB no controle de infecções fúngicas oculares, percebe-se que o desenvolvimento de novos sistemas capazes de carrear este fármaco com a finalidade de melhorar sua biodisponibilidade, estabilidade e diminuir sua toxicidade são, portanto, necessários.

As microemulsões (MEs) correspondem a uma alternativa promissora para melhorar a biodisponibilidade e diminuir os efeitos adversos causados pelo uso da AmB. Estes veículos possuem propriedades que favorecem a sua administração através desta via e consistem em sistemas transparentes (isotropicamente translúcidos) e estáveis termodinamicamente de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um filme interfacial de compostos tensoativos que se localizam na interface óleo/água, podendo ser facilmente preparadas e esterilizadas. Estes sistemas oferecem ainda vantagens adicionais como: maior capacidade de incorporar tanto fármacos hidrofílicos como lipofílicos, pequeno tamanho de gotículas da fase interna e viscosidade adequada para a liberação de fármacos nos olhos <sup>(10-13)</sup>.

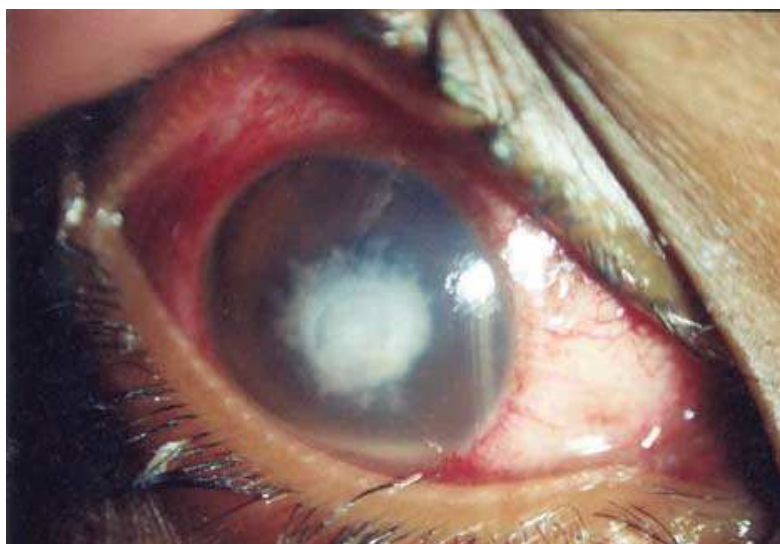
A idéia de utilizar tais sistemas como carreadores para a AmB com o objetivo de diminuir a toxicidade deste fármaco, aumentar a sua estabilidade na preparação farmacêutica e biodisponibilidade vem reforçar o objetivo de muitos pesquisadores no mundo <sup>(14-16)</sup>. O objetivo do presente trabalho visou, portanto, desenvolver e caracterizar um sistema microemulsionado contendo AmB pretendido para a administração tópica ocular por meio de colírios, forma farmacêutica líquida e destinada a aplicação sobre as mucosas oculares.

O sistema foi, portanto, desenvolvido por meio de uma metodologia de construção de diagramas de fase pseudo-ternário (DFPT) e caracterizado físico-quimicamente segundo os ensaios referidos na literatura como importantes, sendo suas características delineadas e avaliadas com a finalidade de atender as particularidades da via de administração tópica ocular.

Com esta pesquisa, espera-se que a discussão sobre o tema seja mais enfatizada sobre os aspectos clínicos, epidemiológicos, microbiológicos e tecnológicos, fortalecendo a hipótese de que o tratamento sobre o ponto de vista multidisciplinar é mais eficaz e seguro para o paciente no que diz respeito à melhora de sua qualidade de vida. Com isso, o desenvolvimento desta nova formulação poderá trazer, para o futuro, uma nova apresentação farmacêutica para a AmB, mais eficaz, estável e com menos risco de proporcionar as reações adversas referidas com o uso da formulação convencional.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

As infecções causadas por fungos na córnea, denominadas de ceratomicoses e endoftalmítes estão entre as mais freqüentemente encontradas apresentando-se como lesões supurativas que se desenvolvem, geralmente, por meio de úlceras. Estas infecções já são consideradas as responsáveis por mais de 50% de todos os casos de infecções oculares registrados, especialmente nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, tendo como um dos principais agentes etiológicos, fungos leveduriformes do gênero *Candida* e filamentosos do gênero *Fusarium*<sup>(5)</sup> (Figura 1).



**Figura 1: Olho acometido por uma ceratomicose** (Thomas, PA. 2003)

A córnea corresponde a uma importante barreira mecânica e química, pela qual limita o acesso de substâncias exógenas para o interior do olho, protegendo, assim, os tecidos intra-oculares. Esta barreira consiste em uma estrutura transparente e avascular com um diâmetro e uma espessura em torno de 12 mm e 520 µm, respectivamente. Localiza-se no segmento anterior do olho e a sua superfície consiste na principal rota de absorção de fármacos por

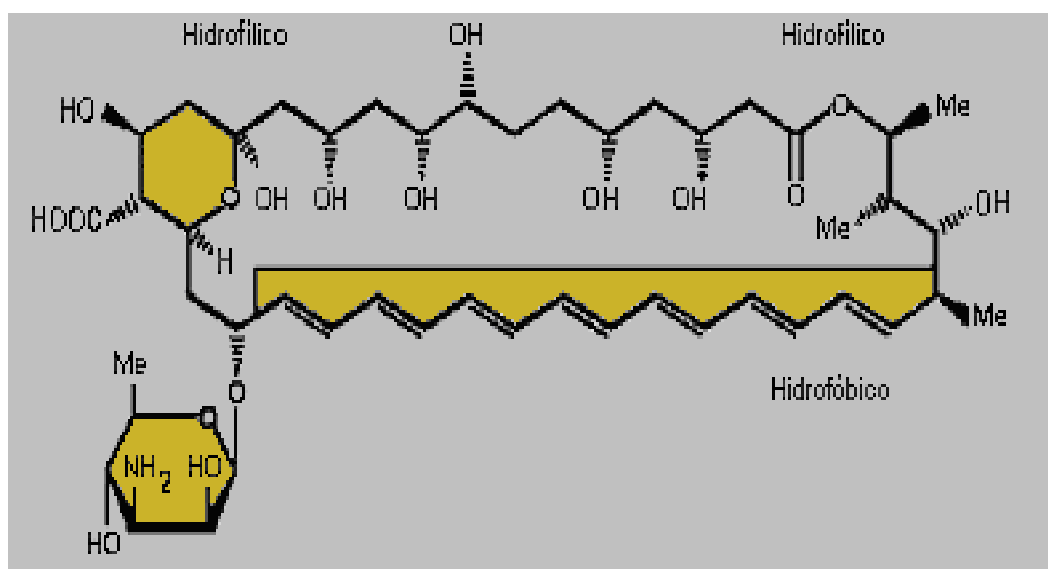
meio da via ocular, entretanto esta absorção é ineficiente e gera uma baixa biodisponibilidade dos fármacos que são administrados topicamente <sup>(17)</sup>.

Dois fatores rendem a córnea uma efetiva barreira de absorção dos fármacos: O primeiro é a sua pequena área de superfície e a segunda é que ela é relativamente impermeável. Outro fator bastante importante capaz de reduzir a biodisponibilidade dos fármacos administrados reside na rápida perda pré corneana ocasionada pela ação do sistema lacrimal e pela presença das lágrimas <sup>(1, 18)</sup>.

A eficácia clínica de agentes antifúngicos em micoses oftálmicas depende, em grande parte, da concentração do fármaco e da sua capacidade em alcançar o tecido ocular alvo. Isto depende, ainda, de um grande número de fatores que incluem a massa molecular e a rota utilizada para a sua administração, assim como a duração do tempo de contato do fármaco com o tecido ocular alvo e a sua habilidade de penetração através da córnea. Fármacos que apresentam grande massa molecular, como a AmB (924,10 Da), excedendo 500 Da raramente são capazes de penetrar a estrutura intacta da córnea <sup>(19)</sup>.

A AmB é um antibiótico poliênico macrocíclico com uma potente ação fungicida e fungistática contra uma grande faixa de espécies fúngicas oportunistas e desde 1956 é considerada um dos fármacos mais eficazes contra sérias infecções fúngicas sistêmicas tais como candidiases, histoplasmoses e aspergiloses. Em oftalmologia, seu uso também é importante e está relacionada, principalmente, ao tratamento de infecções causadas por *Candida* desde 1959 <sup>(15, 20, 21)</sup>.

Este fármaco foi primeiramente isolado em 1955 a partir de colônias de *Streptomyces nodosus* coletados na Venezuela e consiste em um pó amarelo-alaranjado que apresenta duas propriedades físico-químicas: comportamento anfifílico devido aos grupos polares e apolares do anel lactônico e anfotérico devido à presença de grupos aminas e carboxílicos ionizáveis. Sua molécula é, ainda, pouco solúvel em solventes aquosos e em muitos solventes orgânicos, sendo sua solubilidade em água, no pH fisiológico (pH 6-7), menor do que 1 mg/mL<sup>(22)</sup> (Figura 2).



**Figura 2: Fórmula estrutural da AmB**

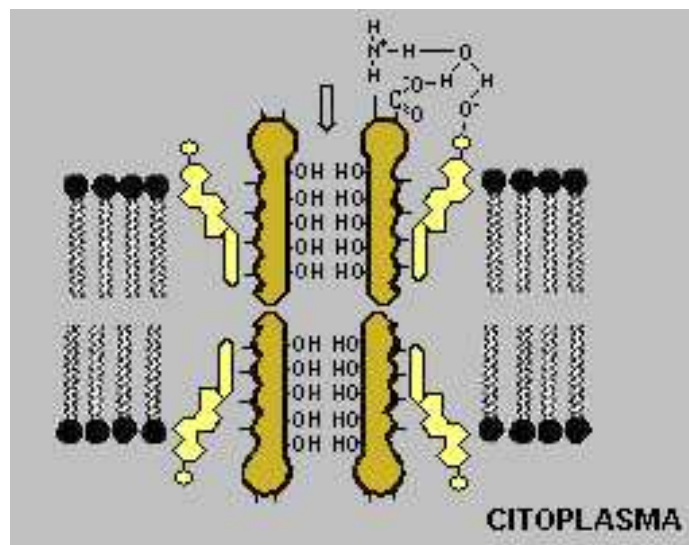
Massa molar (C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>17</sub>) – 924,10 Da (Patrick, 1995)

A formulação comercial atual da AmB, Fungizone<sup>®</sup>, comercializado pela Bristol-Myers Squibb, consiste em um sistema micelar que contém 41 mg de desoxicolato de sódio e 50 mg de AmB. Para a administração tópica ocular, uma solução extemporânea (0,15 a 0,3%) pode ser preparada diluindo-se esta apresentação comercial em água esterilizada e posteriormente administrando o medicamento a cada 30 a 60 minutos. Durante este intervalo, essa solução



deve ser armazenada sobre refrigeração e protegida da luz, por onde se reduz, assim, a velocidade de degradação deste fármaco em solução <sup>(5, 23)</sup>.

O principal mecanismo de ação da AmB consiste na habilidade que sua molécula possui em interagir com os esteróis da membrana, colesterol das membranas plasmáticas das células humanas e o ergosterol das membranas celulares fúngicas, e formar, com isso, canais (poros), na qual há a liberação de constituintes internos, tais como potássio, cálcio, magnésio e fosfato. Esta liberação, seguida de um desequilíbrio na atividade enzimática das membranas afeta, conseqüentemente, a vida celular, sendo esta, a razão para a sua atividade fungicida <sup>(23)</sup> (Figura 3).



**Figura 3: Mecanismo de ação da AmB**

\* Formação de poros pela AmB na bicamada lipídica das membranas celulares

Fonte: Prof<sup>a</sup> Dra Ivonete Batista de Araújo

Dois persistentes problemas relacionados à aplicação tópica da AmB consistem na grande possibilidade de toxicidade na córnea (ceratites), pela

qual poderia originar a uma não adesão ao tratamento por parte do paciente e levar, com isso, a uma interpretação errônea de que o microorganismo não é susceptível a terapia, assim como a sua baixa estabilidade quando em solução. Essa toxicidade, que pode ainda se desenvolver por meio de blefarites e irites, está associada ao desoxicolato de sódio e pode ser bastante reduzida quando formulações lipídicas são usadas como veículos para a incorporação deste fármaco sem o uso deste componente emulsificante <sup>(21, 24)</sup>.

O uso de carreadores lipídicos, tais como as microemulsões (MEs), utilizadas para incorporar a AmB, já vem sendo descrito por diversos estudiosos, porém nenhum deles atribuiu o emprego deste sistema à via ocular <sup>(14-16)</sup>. As MEs aparecem como uma importante alternativa para a liberação tópica ocular da AmB a ser estudada devido as suas propriedades intrínsecas e estruturas específicas. Estes sistemas podem ser facilmente preparados por emulsificação e esterilizados por filtração, possui viscosidade adequada e alta capacidade para solubilizar tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos. Sua capacidade em prolongar a liberação dos fármacos, diminuindo a frequência de administração das doses consiste na principal vantagem para a administração ocular <sup>(10, 12, 13)</sup>.

Além disso, devido a sua consistência aquosa, transparência, estabilidade termodinâmica e sua capacidade em não influenciar na visibilidade, quando comparada com as pomadas oftálmicas, podem levar uma maior adesão ao tratamento por parte do paciente <sup>(10, 12, 13)</sup>.

O conceito de ME foi introduzido nos anos quarenta por Hoar e Schulman que geraram uma solução transparente, de única fase, por titulação de uma emulsão de aspecto leitoso com hexanol. Posteriormente, seus

colaboradores definiram o sistema formado como sendo microemulsionado, definição esta ampliada, segundo novos pontos de referência, por Danielson e Lindman em 1981 que descreveu estes sistemas como sendo soluções líquidas, opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis compostas por água, óleo e tensoativos (Figura 4). Pela classificação proposta por Winsor em 1948, devido a presença de uma única fase, este sistema pode ser classificado como do tipo Winsor IV, classificação esta, considerada ideal para os novos sistemas carreadores de fármacos <sup>(25-27)</sup> (Figura 5).

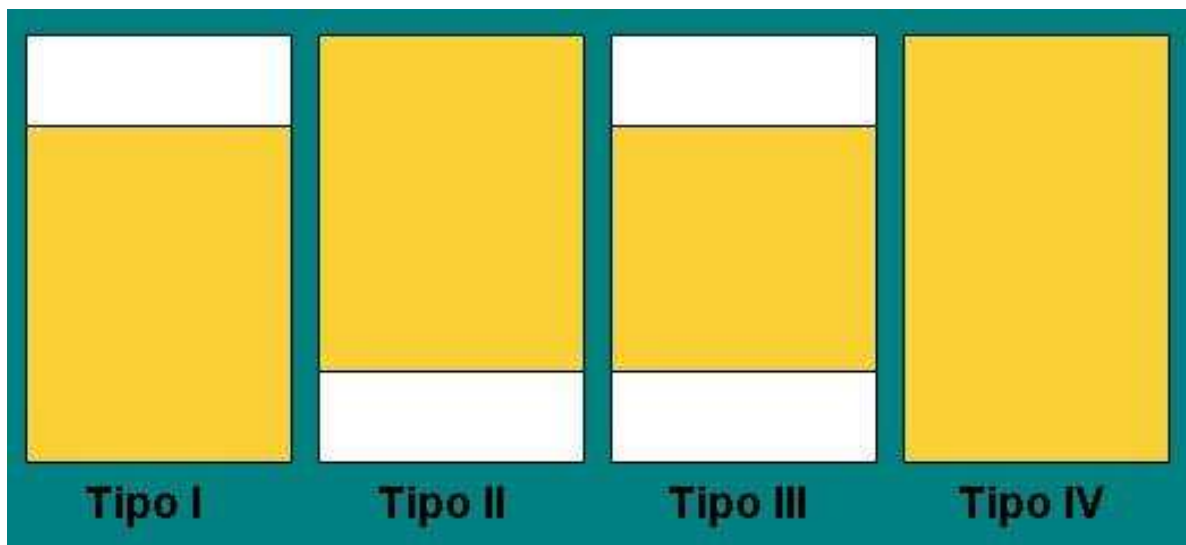


**Figura 4: Emulsão x Microemulsão**

Fonte: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira - UNESP - Araraquara/SP

No desenvolvimento de novos sistemas para uso ocular, o formulador deve considerar várias perspectivas. Além das barreiras fisiológicas impostas pelo olho e das deficiências das formas farmacêuticas convencionais em promover uma adequada absorção, vários fármacos também não possuem características favoráveis ao uso através desta via e devido a sua importância clínica no tratamento de diversas patologias, eles continuam sendo

administrados por meio de condições adversas ao paciente. Sendo assim, após a escolha dos prováveis sistemas microemulsionados a partir do DFPT, há a necessidade de se caracterizar estes sistemas com e sem o fármaco incorporado a fim de se obter a formulação em que abranja todos os requisitos da via de administração ocular e que favoreçam os aspectos clínicos e tecnológicos necessários <sup>(10, 12, 19, 28)</sup>.



**Figura 5: Classificação para sistemas dispersos proposta por Winsor (Winsor, PA. 1948)**

Portanto, os estudos de caracterização de uma ME desenvolvida com a finalidade de se tornar um carreador para a AmB e com o objetivo de se diminuir a toxicidade deste fármaco e aumentar a sua estabilidade vem reforçar o objetivo de muitos pesquisadores no mundo, no entanto, a partir da grande possibilidade desse sistema em possuir as características necessárias para a administração tópica ocular, um novo foco de aplicação para este se torna possível uma vez que, com o advento no número de casos de pacientes acometidos por infecções fúngicas oculares no mundo e pela ausência de formulações convencionais que contenham antifúngicos existentes no

mercado, o seu uso poderia contribuir com um tratamento mais eficaz e seguro, permitindo uma melhora na qualidade de vida destes pacientes.

### **3. ANEXAÇÃO DE ARTIGO**

**3.1. Título do Artigo:** Development and characterization of a microemulsion system containing amphotericin B for ophthalmic use

**REVISTA:** Clinical and Experimental Ophthalmology – Fator de Impacto: 1,347

Original Article – Laboratory Science

# Development and characterization of a microemulsion system containing amphotericin B with potential ophthalmic applications

Walteçá Louis Lima da Silveira<sup>1</sup>, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno<sup>1,2</sup>, Nadja Maryelly de Oliveira Gomes<sup>1</sup>, Fernanda do Couto Brasil<sup>1</sup>, Airanuédida Silva Soares<sup>1</sup>, Aldo da Cunha Medeiros<sup>1</sup>, Anselmo Gomes de Oliveira<sup>3</sup>, Ivonete Batista de Araújo<sup>1</sup> and Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCSA) – Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) – 59.010-180, Natal-RN-Brazil

<sup>2</sup> Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – CCBSA – Campus V – 58.020-540, João Pessoa-PB-Brazil

<sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Departamento de Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – 14.801-902, Araraquara-SP-Brazil

Correspondence: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito, Faculty of Pharmacy of the Federal University of Rio Grande do Norte, Avenida Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n Petrópolis, CEP 59010-180, Natal, RN, Brazil.  
E-mail: [socrates@ufrnet.br](mailto:socrates@ufrnet.br) or [socrates@digicom.br](mailto:socrates@digicom.br). Phone: 55 84 94 31 88 16;

Fax: 55 84 3342 **9817** or **9808**

AmB-microemulsion for ophthalmic use

## **ABSTRACT**

**Aim:** The development of new ophthalmic drug delivery systems containing antifungal agents has received considerable attention because of all drawbacks presented with the use of conventional dosage forms. Topical amphotericin B eye drops is the standard treatment for ocular infections caused by *Candida*. However, its toxicity and poor bioavailability leads to no patient compliance and aggravation of symptoms. The present work describes the development and characterization of one microemulsion system containing amphotericin B, aiming, in a long term, its use for ophthalmic applications.

**Methods:** The microemulsion was developed and prepared by the titration technique. The physicochemical characteristics and stability were determined, both in the absence and in the presence of amphotericin B. Its content was investigated by spectrophotometric studies, which evaluated the influence of sterilization process by filtration and the characterization of aggregation form into the system.

**Results:** The performed studies showed that the presence of amphotericin B incorporated into the system did not induce serious changes in its physicochemical properties, which were, in general, maintained when compared to the blank microemulsion. The spectrophotometric studies showed, however, that not only the amphotericin B concentration decreased with the sterilization process by filtration, but also an increase of amplitude of the band at 322 nm, assigned to amphotericin B self-associated species, was revealed.

**Conclusions:** The characterization of these systems demonstrated that they have compatible characteristics with the ophthalmic route, and could be eligible



as a new and interesting amphotericin B delivery dosage form to be used by eye drops.

**Key words:** Amphotericin B; Eye drops; Drug carriers; Pharmaceutical nanotechnology; Microemulsion

## INTRODUCTION

Ocular fungal infections are being increasingly recognized as an important cause of morbidity and blindness. The clinical efficacy of antifungal agents on the treatment of these diseases depends to a great extent on the concentration achieved in the target ocular tissue. A number of factors, including the molecular mass, concentration of the drug and the route by which it was administered, the duration of contact with the target ocular tissue and the ability of the compound to penetrate the eye, moreover, the effects of corneal resistance and the nasolachrymal drainage, lead for a poor bioavailability of these drugs <sup>(1, 2)</sup>.

Amphotericin B (AmB) is a broad spectrum antifungal agent mainly used to treat invasive fungal infections <sup>(3)</sup>. For ophthalmic applications, this drug has been administered by intravenous, topical, intravitreal and intracameral routes, however, many drawbacks can be described with its use by these several routes <sup>(4)</sup>. Topical AmB (1.5 – 3.0 mg/mL) is the standard treatment for ocular infections due to *Candida* and related fungi and in the regions where natamycin is not available <sup>(2, 5)</sup>. The current formulation of AmB eye drops (micelle system, Fungizone<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb, USA) contains deoxycholate (AmB-M), which renders their instillation painful and leads to poor compliance and aggravation of symptoms <sup>(5)</sup>. Moreover, the corneal penetration of AmB, in the presence of an intact corneal epithelium, is, also, reduced and one persistent concern is the possibility of corneal toxicity. Indeed, its solution is prepared freshly with sterile water and must be refrigerated in a dark bottle to reduce the speed of disintegration <sup>(2, 6-8)</sup>. Because of all drawbacks related, the

development of stable and safe new pharmaceutical formulations for the topical ocular administration of AmB might, therefore, be desirable.

Various systems as carriers to new drug delivery vehicles have been developed to increase ocular absorption and reduce the toxicity related of drugs<sup>(9)</sup>. Microemulsions (MEs) are an interesting alternative to topical ocular delivery, because of their intrinsic properties and specific structures<sup>(9)</sup>. A ME is a system which contains water and oil coexisting in thermodynamic equilibrium due to the presence of a surfactant film at the oil-water interface<sup>(10)</sup>. They can be easily prepared through emulsification process and sterilized by filtration. They all can have their viscosity adapted and possess a higher ability for dissolving drugs<sup>(9)</sup>. Their capacity of prolonged release of drugs, decreasing the frequency of application of eye drops, per day, consists in an important characteristic for ocular administration<sup>(9)</sup>.

The aim of the present work was the development and characterization of a ME system intended for topical ocular administration of AmB by eye drops. The physicochemical characteristics were evaluated for attempted the physicochemical particularities of the topical ophthalmic route.

## **METHODS**

### **Materials**

Monobasic and dibasic sodium phosphate, sodium hydroxide and hydrochloric acid were purchased from Vetec Fine Chemicals (Brazil). Soy phosphatidylcholine, Lipoid<sup>®</sup> S100, was a gift sample from Lipoid, Germany. Tween<sup>®</sup> 80 and AmB were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Miglyol<sup>®</sup> 812N was a gift sample from Sasol, Germany. Methanol was purchased from Tedia

Company (USA). The micelle dosage form, AmB-M, was a gift sample from UNICAT (Natal/RN, Brazil).

### **Pseudo-ternary phase diagram (PTPD)**

For preparation of the PTPD, an adequate surfactant [(Lipoid<sup>®</sup> S100)/co-surfactant (Tween<sup>®</sup> 80) (3:7)] and oil (Miglyol<sup>®</sup> 812N) weight ratios was used in the range from 1:9 to 9:1, respectively, to obtain the phase diagram. To the mixture, the aqueous phase (phosphate buffer 7.4) was titrated with an automatic pipette, stirred with a sonicator for 1.5 min, and placed in an ultrasound bath for 3 min. The transition from separated phase to optically clear ME was observed and analyzed by naked eye.

### **Preparation of microemulsion**

For preparation of the ME (Table 1), one point from the PTPD was chosen in term of homogeneity, transparency and optical isotropy. This choice show a formulation that has as first phase a phosphate buffer pH 7.4 solution containing Lipoid<sup>®</sup> S100, and as the second phase Miglyol<sup>®</sup> 812N and Tween<sup>®</sup> 80. Both first and second phases were magnetically stirred, separately, for 20 and 3 min, respectively. The final production of the ME was concluded by addition of the first phase in the second phase following by a sonication process (1.5 min) and ultrasound bath (3 min). Three cycles in sonicator and ultrasound bath were realized to form a true ME.

### **Amphotericin B loading process**

AmB was incorporated at maximum concentration of 5 mg/mL<sup>(11)</sup> into ME. Briefly, appropriated amounts of AmB were weight and added directly into the ME previously prepared, under continuous magnetic stirring. After 1 min, the AmB was dissolved by addition of sodium hydroxide (NaOH) solution (1 N) and

after solubilization, the pH of the preparation was neutralized to 7.0-7.5 with a hydrochloric acid (HCl) solution (1 N). Finally, the AmB-loaded-microemulsion (AmB-ME) was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filters to remove the suspended particles and, then, sterilized through a sterile filter of porous size of 0.22  $\mu\text{m}$  (Sartorius Minisart<sup>®</sup> filters, Germany).

### **Physicochemical characteristics of ME and AmB-ME**

Both the ME and AmB-ME were characterized in terms of macroscopic aspects, pH, rheological behavior and viscosity, refractive index, conductivity, particle size, surface tension and zeta potential. All parameters were determined at  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and the analyses were carried out in triplicate.

The macroscopic parameters observed by naked eye were the color, the consistency and the homogeneity. The transparent appearance was evaluated by percentage of transmittance. The pH values were performed by digital pH meter PG2000 (Gehaka, Brazil) equipped with a glass electrode, which was previously calibrated with 4.0 and 7.0 pH standard solution. The electrode was placed directly in the ME and AmB-ME samples, which were stored in a scintillation flask (15 mL).

The rheological analyses (RA) of ME (10mL) and AmB-ME (10mL) were performed using a controlled stress rheometer fitted with concentric cylinder geometry (DC-41), connected with a hake K20-DC50 thermostatic bath. The experiments were recorded with a shear rate in the range of 1 to 100 1/s and performed for both up and down curves.

With an Abbé refractometer (Analytik, Jena, AG, Germany), the refractive index (RI) was determined. The equipment was calibrated with distilled water,

and 30  $\mu\text{L}$  of the samples were placed on the refractometer prism for RI evaluation.

The conductivity values were measured by a conductimeter MC 226 (Toledo/Mettler, Brazil), equipped with an Inlab 730 electrode (TTLER/Toledo, Brazil). The electrode was placed directly in the ME and AmB-ME stored in the scintillation flask (15 mL).

Particle size analyses of samples were measured by photon correlation spectroscopy using a Particle Sizing System by *Dynamic Light Scattering* (DLS) – Brookhaven Instruments Corporation, EMI 9863 model (Holtville, NY, USA) with laser source He-Ne 10 mW, 532 nm-HUGHES, and self correlator with 64 channels. Before of the analysis, the samples were diluted in phosphate buffer (pH 7.4) to yield a 1:32 solution and after were filtered with a membrane of 0.8  $\mu\text{m}$  to remove eventual impurities. The size measurements were carried out at fixed angle of  $90^\circ$  and the correlator was operated in parallel mode. The cumulate method of analysis was used to calculate the droplet size according to the intensity of scattered light. The RI was in accordance with the index of each analyzed sample needed to perform these analyses.

The surface tension of the samples was measured using a Sensadyne QC-6000 tensiometer by Chem-Dyne Research Corp. This parameter was carried out through the bubble shape method using azotes atmosphere. Its value was measured when the tension reached a constant value.

The electrophoretic mobility was measured determining the mobility of particles by zetasizer nano equipment (Microtrac Zetatrac, USA). The samples were placed directly into a cell where a potential difference (150 V) at a modulation frequency of 1000 Hz was applied. Therefore, the movement of the

charged particles to electrode of opposite polarity and the speed of the charged particle were observed.

### **Quantitative analyses and characterization of the aggregation state of AmB**

AmB content, before and after of the filtration process through 0.45 and 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filters, respectively, was determined using the Libra S32 UV-visible spectrophotometer (Biochrom, Brazil). The values were recorded over the wavelength of 405 nm, which is the maximum absorption to AmB monomeric form <sup>(12)</sup>. Prior to the determination of AmB into the AmB-ME, the systems were diluted in methanol to yield concentrations of  $5 \times 10^{-6}$  mg/mL.

To evaluate the aggregation form, the AmB-ME samples were diluted in phosphate buffer pH 7.4 and in the blank ME to yield a  $5 \times 10^{-6}$  mg/mL solution. The spectrum of these solutions was recorded at the wavelength from 300 to 450 nm and compared to the ones obtained for the AmB-M in phosphate buffer (pH 7.4) and pure AmB in methanol at the same concentration ( $5 \times 10^{-6}$  mg/mL).

### **AmB entrapment efficiency for the MEs**

The entrapment efficiency was assessed after centrifugation ( $11000 \text{ g} \approx 14000 \text{ rpm}$ ) of 1 mL of each formulation for 10 min. The aim of this procedure was not to settle ME droplets, but to settle both metastable systems and AmB crystals not incorporated in the ME droplets. At the end of the centrifugation cycle, the presence of crystals or AmB charged droplets was evaluated.

### **Stress testing**

The samples were submitted, to a total of six freeze-thaw cycles. Each cycle consisted of 24 h at  $45^{\circ}\text{C}$  followed by 24 h at  $8^{\circ}\text{C}$  during 12 days. These cycles were important to determine the chemical stability of the dispersed

system and were examined for macroscopic aspects, pH, refractive index, conductivity and AmB content as described earlier.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Pseudo-ternary phase diagram (PTPD)**

The phase behavior of simple ME containing oil, water and surfactants can be studied with the aid of a PTPD in which each corner of the diagram represents 100% of that particular component. The PTPD describes the experimental conditions in which these components must be combined to form clear preparations, important characteristic to their application in the eye <sup>(10, 13)</sup>.

The area of existence of oil-in-water (O/W) ME containing Miglioyol<sup>®</sup> 812N, phosphate buffer (pH 7.4) and an adequate combination of Lipoid<sup>®</sup> S100 and Tween<sup>®</sup> 80 (3:7) was denoted by Figure 1. The point chosen corresponds an O/W ME, presenting homogeneity; transparency, and optical isotropy, characteristics of one true ME (Table 1). This diagram describes, yet, the wide range of possibilities to obtain areas of clear ME where O/W systems will prevail.

All the ME components were chosen based in their biocompatibility characteristics to the eye (Table 1). The surfactant and co-surfactant concentrations are usually high due the necessity to decrease the interfacial tension and providing the thermodynamic stability of these systems. For ophthalmic applications, this fact can be very important because it guarantees a good spreading effect on the cornea and mixing with the precorneal film constituents, thus possibly improving the contact between the drug and the corneal epithelium <sup>(14)</sup>. However, this high concentration can lead to ocular toxicity <sup>(15)</sup>. Therefore, the ionic surfactants, which are generally toxic, shall be



avoided and amphoteric and non-ionic surfactants, like soy phosphatidylcholine and Tween<sup>®</sup> 80 are indicated for this use because they exhibit excellent biocompatibility. The oil and the aqueous phases shall be chosen by its conditions to form clear ME and their capacity of solubilization of drugs. They also should be well tolerated by the eye. The most often oil phase used are the triesters of glycerol, capric and caprylic acids (Miglyol<sup>®</sup> 812N) and phosphate buffer for the aqueous phase <sup>(15)</sup>.

### **Preparation of microemulsion**

To prepare this ME, the proportion and addition order of components, and the mechanical stirring and the heating process promoted by sonication method were of utmost importance. In fact, the control of these parameters speeds up the process of microemulsification. The sonication method is often used, particularly in systems which contain non-ionic surfactants and was very important for the process, allowing the formation of transparent system and assisting in reducing of the size of dispersed droplet <sup>(16)</sup>.

The resulting system was easily prepared and presented a yellow color, a homogeneity aspect, a transparent appearance (Table 2) and the absence of precipitates. Such characteristics is typical for a Winsor IV system, and, therefore, it could be used as a drug delivery systems for ophthalmic use <sup>(17)</sup>.

### **Amphotericin B loading process**

The attraction of O/W ME is in their ability to incorporate drugs into the oil phase, thereby, enhancing their solubility <sup>(18)</sup>. Because of their high solubilization capacity, these systems can be used as carriers for drugs which having poor water solubility. The AmB molecule has one ring structure comprising of a hydrophobic heptane chain and a hydroxyl rich hydrophilic

chain that imparts an amphoteric nature to the molecule. Because of this intrinsic characteristic, the incorporation of this drug into the system is a challenge since it has poor aqueous as well as oil solubility. However, many works described the use of alkaline pH to solubilize this drug into the ME <sup>(12, 19)</sup>.

The presence of AmB into the ME showed, after the addition of NaOH solution (1 N), a complete incorporation of the drug into the system, maintained, therefore, the characteristics of homogeneity and transparency of the blank ME. Once the drug was dissolved, the system was neutralized to pH between 7.0-7.5 with HCl solution (1 N) and this adjustment decreased the transparency (Table 2) observed earlier, probably because of some interference on the interfacial tension. This fact can be explained by the own chemical property of AmB molecule characterized by its amphiphilic and amphoteric behavior. However, the maintenance of the Winsor IV system aspect indicates that the physicochemical stability of the ME was not perturbed <sup>(10, 17)</sup>.

### **Physicochemical characteristics of ME and AmB-ME**

The physicochemical characteristics of ME and AmB-ME (Table 2) revealed a great compatibility with the characteristics ascribed for dosage forms used for ophthalmic route <sup>(20)</sup>. The blank ME appears as a promising carrier system for the incorporation of drugs necessary to many ophthalmic diseases. On the other hand, the incorporation of AmB did not induce important changes in these parameters.

The adjustment of the initial pH at 7-8 is very important in order to minimize the hydrolysis of the phospholipids presents, which can decrease the pH of the ME. Indeed, the solubility, stability and corneal permeability of the drugs are, also, quite dependent of this parameter. The physiological pH values

presented by the blank ME and the AmB-ME predicts the maximum comfort and absence of eye irritation when this preparation would be instilled in the eye <sup>(9, 15, 21)</sup>.

The ophthalmic solution of the conventional dosage form, represents 90% of the available ophthalmic formulations in the market. However, the rapid pre-corneal loss and high tear fluid induce a low bioavailability of the drug into the ocular structures. Developing new topical ocular delivery systems that improve the ocular retention and increase the corneal drug absorption consist on a big challenge <sup>(22)</sup>. The AmB addition to the obtained blank ME did not have an effect on the rheology. However a slight decrease in the viscosity value of AmB-ME was observed. Despite of that both systems presented a viscosity value that allows sterile filtration. This viscosity value can still increase the ocular residence time of AmB without the occurrence of discomfort, blurred vision or foreign body sensation with the cornea surface, favoring, thereafter, a better penetration of this drug into the eye. Indeed, on the beginning, the system presented an initial deformation tension which after started to flow as a Newtonian behavior, which ensures that blinking should not have effect on the viscosity <sup>(9, 14)</sup> (Figure 2).

The presence of AmB into the ME decreased the transparency observed in a blank ME as can be observed with the values obtained from percent of transmittance. However, do not expected that these systems cause impairment of vision and discomfort to the patient after instillation because of the proximity of the RI values obtained with the water (1,33) and the cornea and lachrymal fluid (1,34 – 1,36). The RI and percent of transmittance data prove the transparence of the system <sup>(9, 14, 23)</sup>.

The high value of conductivity found for the system allows us to classify them as oil-in-water type. This characteristic was maintained after the incorporation of the AmB, showing that this drug is not able to cause changes in the intrinsic properties of the developed ME. This type of ME (O/W) is preferred to use in the eye because of the droplet structure can be often retained during the dilution process by the lachrymal fluid. Its administration could be advantageous, because increases membrane permeability and facilitates the corneal drug delivery, achieving prolonged release and higher penetration into the deeper layers of the ocular structure and the aqueous humor than the native drug <sup>(15, 16)</sup>. Moreover, the increase in the value of conductivity after the incorporation of the AmB can be explained by the addition of ionic solutions (NaOH and HCl) necessary to incorporate this drug into the system.

The small droplet size of the ME system, presented in the range of nanometers, is due to the interaction between the co-surfactant molecules with the surfactant film which decrease the radius of curvature of the microdroplets, forming transparent systems <sup>(13)</sup>. The results of the droplet size of the MEs were reported as  $X_{10}$ ,  $X_{50}$  and  $X_{90}$ , being the droplet diameter for the 10<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> cumulative volume percentiles <sup>(24)</sup>. They showed that the presence of AmB increased slightly the droplet size. This increase can be explained because, under the experimental conditions (pH 7.4), the AmB is amphoteric and very slightly water soluble and then can be favorably partitioned into the oil phase, increasing the droplet volume. Because of its amphiphilic characteristics, a fraction of AmB molecules can, yet, be placed at the interface between the two phases leading, also, to an increase in the droplet size <sup>(10)</sup>. However, this fact

was not able to cause changes on the isotropic characteristic of the blank ME (Figure 3).

Originally, several research groups suggested that for the ME formation, a negative free energy is necessary. This can be obtained when large reductions in surface tension are accompanied by significant favorable entropic change <sup>(16)</sup>. Therefore, the microemulsification is spontaneous and the resulting dispersion has high concentration of surfactants that can lead to ocular toxicity <sup>(15)</sup>. Qualitatively, due the high concentration of aqueous phase which allows the formation of oil-in-water (O/W) dispersion, the proportions of the components on formulation and the nature of the surfactants used (amphoterics for Lipoid<sup>®</sup> S100 and non-ionic for Tween<sup>®</sup> 80), the spontaneous microemulsification was not possible and a non-spontaneous preparation method (sonication) was needed. Thus, because of this fact the results indicated high surface tension, both for blank ME and for AmB-ME which suggests that there are not surfactant and co-surfactant molecules free into the system and that all of them find out in the interfacial area <sup>(15, 16)</sup>.

The corneal surface is negatively charged. Therefore, the charges of the droplets, which constitute the internal phase (oil) could influence their absorption in the ophthalmic route. The studies showed that positively charged ME are appropriate for this route. The electrostatic attraction between the positively charged ME surface and negatively charged cell surface generate bioadherence because of the opposite surface charges and provide enhancement of drug absorption. So, the developed ME presented a positive zeta potential value ( $+ 122.73 \pm 2.25$ ) which is appropriate for the ophthalmic route because this is necessary to increase the contact time of the AmB with

the cornea surface. Moreover, the AmB changed the nature of the surface charge without change the mean droplet size <sup>(25, 26)</sup>.

### **Quantitative analyses and characterization of the aggregation state of AmB**

The sterility of the systems was achieved by filtration through 0.22  $\mu\text{m}$  sterile filters. Microbiological tests have shown that this process was able to sterilize the samples (data do not shown). UV-visible procedures were used to determine the final amount of the drug incorporated into the ME. The results suggest that there is a loss of AmB. The Table 3 shows the decrease in the AmB concentration with the use of these filters, based in a nominal content of 5 mg/mL. The first filtration at 0.45  $\mu\text{m}$  deleted the AmB suspended and the probable drug excess of the dispersed system. Nevertheless, a small loss of drug was also observed with the sterile filtration. This fact can be probably ascribed to the adsorption entrapment on the filter considering the colloidal nature of the disperse phase caused under this drug <sup>(19)</sup>. Loss of AmB on filtration of AmB formulations such as AmB colloidal dispersion for parenteral use and from AmB-ME has been previously reported by several research groups <sup>(12, 27-29)</sup>.

As described earlier, AmB is an amphiphilic molecule. Its hydrophobic pole consists of a series of seven double bands in *trans* configuration, which leads to an intense absorption spectra around 400 nm. The shape of the spectra will depend on the state of aggregation of molecules and the relative proportion of such different forms depends on concentration. The different behavior was measured by the variation on the absorption spectra calculated by the molar extinction coefficients ( $\epsilon$ ) and revealed that, in phosphate buffer, the

AmB-M presented four characteristics absorption bands, observed at 329, 364, 385 and 408 nm. In methanol, four bands with decreasing intensities at 406, 383, 363 and 345 nm can be seen. These spectral bands indicate the existence of aggregates states and monomers, respectively. All of these results are in agreement with the literature <sup>(30-32)</sup>.

A comparison of UV-visible absorption spectra of AmB-M in phosphate buffer, pure AmB in methanol and AmB-ME diluted in phosphate buffer and in blank ME is presented in Figure 4. As it can be clearly seen on the spectra of AmB-ME diluted in phosphate buffer, the presence of one intense band at 329 nm indicates the formation of self-associated AmB structure. However, the shift of such band from 323 to 329 indicated that the complex between AmB and ME is different of the complex formed by AmB and micelles. Indeed, when these spectra were compared with the AmB-ME diluted in blank ME, it can be seen that only the monomeric species is present <sup>(31, 32)</sup>.

Clinically, the aggregation state of AmB is directly related to its mechanism of action and toxicity <sup>(33, 34)</sup>. The water soluble monomer is usually related as a low toxic form to AmB while water-soluble oligomers have been defined as the most toxic. The efficacy and toxicity of a lipidic based emulsion for parenteral use containing AmB were showed by Araújo *et al.* Their assays, using Red Blood Cells and *Candida tropicalis* as model cells, demonstrated that their system was effective against these fungal cells maintaining the efficacy and decreasing the toxicity presented by AmB-M. So, depending on its aggregational state, AmB may present several patterns of activity against fungal cells compared to the toxicity of mammalian cells, showing that a lipid carrier as

ME can modify the equilibrium between monomeric and oligomeric forms of this drug in the aqueous media and change its overall activity and toxicity <sup>(35)</sup>.

### **AmB entrapment efficiency for the MEs**

After the centrifugation process, some drug precipitation was observed which demonstrate that AmB was not properly incorporated to the disperse system. The average entrapment efficiency value in the formulation was, therefore, 70.2% (Table 3).

### **Stress testing**

The freeze-thaw cycles consists of one stability test which designed to determine the behavior of the samples under adverse condition of packaging. The results obtained showed that the systems did not suffer any significant changes on evaluated parameters maintaining the characteristics observed earlier as can be seen through the table 4.

### **Conclusion**

The results show that AmB-ME presents optimal characteristics to be administered by the ophthalmic route <sup>(20)</sup> and this system could be used, in a long term, has a probable new ophthalmic delivery system for AmB to treat ocular fungal infections by eye drops. Their favorable characteristics and huge potential to decrease the toxicity at the cornea caused by Fungizone<sup>®</sup> suggest its therapeutic application. The blank ME appears, also, as an interesting system for incorporation of both lipophilic and hydrophilic drugs needed to control many ophthalmic diseases.



## **Acknowledgements**

The authors wish to thank BNB and CNPq (Brasília, Brazil) for financial support in the development in this work. They also acknowledge Glenn Hawes from the American Language Program of the University of Georgia for editing this manuscript.

## References

1. Manzouri B, Vafidis GC, Wyse RK. Pharmacotherapy of fungal eye infections. *Expert Opin Pharmacother* 2001; 2(11): 1849-57.
2. Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(4): 730-97.
3. Esposito E, Bortolotti F, Menegatti E, Cortesi R. Amphiphilic association systems for Amphotericin B delivery. *Int J Pharm* 2003; 260(2): 249-60.
4. Kaur IP, Rana C, Singh H. Development of effective ocular preparations of antifungal agents. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008; 24(5): 481-93.
5. Morand K, Bartoletti AC, Bochot A, Barratt G, Brandely ML, Chast F. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physico-chemical and formulation stability. *Int J Pharm* 2007; 344(1-2): 150-3.
6. O'Day DM, Head WS, Robinson RD, Clanton JA. Corneal penetration of topical amphotericin B and natamycin. *Curr Eye Res* 1986; 5(11): 877-82.
7. O'Day DM, Ray WA, Head WS, Robinson RD. Influence of the corneal epithelium on the efficacy of topical antifungal agents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25(7): 855-9.
8. Foster CS, Lass JH, Moran-Wallace K, Giovanoni R. Ocular toxicity of topical antifungal agents. *Arch Ophthalmol* 1981; 99(6): 1081-4.
9. Fialho SL, da Silva-Cunha A. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clin Experiment Ophthalmol* 2004; 32(6): 626-32.
10. Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM, Sarmiento VH, Chiavacci LA, Scarpa MV, et al. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential

delivery system for amphotericin B. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008; 66(2): 253-9.

11. Wood TO, Tuberville AW, Monnett R. Keratomycosis and amphotericin B. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1985; 83: 397-409.

12. Moreno MA, Frutos P, Ballesteros MP. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. *Pharm Res* 2001; 18(3): 344-51.

13. Tenjarla S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1999; 16(5): 461-521.

14. Hasse A, Keipert S. Development and characterization of microemulsions for ocular application. *Eur J Pharm Biopharm* 1997; 43(2): 179-83.

15. Vandamme TF. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21(1): 15-34.

16. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45(1): 89-121.

17. Winsor PA. Hydrotrophy, Solubilisation and Related Emulsification Processes .1. to .4. *Trans Faraday Soc* 1948; 44(6): 376-98.

18. Karasulu HY. Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; 5(1): 119-35.

19. Darole PS, Hegde DD, Nair HA. Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9(1): 122-8.

20. Kaur IP, Kanwar M. Ocular preparations: the formulation approach. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28(5): 473-93.

21. Ali Y, Lehmuusaari K. Industrial perspective in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(11): 1258-68.
22. Chan J, Maghraby GM, Craig JP, Alany RG. Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm* 2007; 328(1): 65-71.
23. Ghosh PK, Majithiya RJ, Umrethia ML, Murthy RS. Design and development of microemulsion drug delivery system of acyclovir for improvement of oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech* 2006; 7(3): 77.
24. Formiga FR, Fonseca IAA, Souza KB, Silva AKA, Macedo JPF, Araújo IB, et al. Influence of a lipophilic drug on the stability of emulsions: an important approach on the development of lipidic carriers. *Int J Pharm* 2007; 344(1-2): 158-60.
25. Tamilvanan S, Khoury K, Gilhar D, Benita S. Ocular delivery of cyclosporin A I. Design and characterization of cyclosporin A-loaded positively-charged submicron emulsion. *Stp Pharm Sci* 2001; 11(6): 421-6.
26. Abdulrazik M, Tamilvanan S, Khoury K, Benita S. Ocular delivery of cyclosporin A II. Effect of submicron emulsion's surface charge on ocular distribution of topical cyclosporin A. *Stp Pharm Sci* 2001; 11(6): 427-32.
27. Tripple M, Shadomy S, Espinel-Ingroff A. Availability of active amphotericin B after filtration through membrane filters. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115(5): 879-81.
28. Huber RC, Riffkin C. In line final filters for removing particles from amphotericin B infusions. *Am J Hosp Pharm* 1975; 32(2): 173-6.

29. Brime B, Moreno MA, Frutos G, Ballesteros MP, Frutos P. Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation. *J Pharm Sci* 2002; 91(4): 1178-85.
30. Egito LC, de Medeiros SR, Medeiros MG, Price JC, Egito EST. Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential. *J Pharm Sci* 2004; 93(6): 1557-65.
31. Egito EST, Araujo IB, Damasceno BP, Price JC. Amphotericin B/emulsion admixture interactions: an approach concerning the reduction of amphotericin B toxicity. *J Pharm Sci* 2002; 91(11): 2354-66.
32. Egito EST, Fessi H, Appel M, Puisieux F, Bolard J, Devissaguet JP. New Techniques for Preparing Submicronic Emulsions - Application to Amphotericin-B. *Stp Pharm Sci* 1994; 4(2): 155-62.
33. Bolard J, Legrand P, Heitz F, Cybulska B. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry* 1991; 30(23): 5707-15.
34. Lamy-Freund MT, Ferreira VF, Faljoni-Alario A, Schreier S. Effect of aggregation on the kinetics of autoxidation of the polyene antibiotic amphotericin B. *J Pharm Sci* 1993; 82(2): 162-6.
35. Araujo IB, Damasceno BP, de Medeiros TM, Soares LA, do Egito EST. Decrease in Fungizone toxicity induced by the use of Lipofundin as a diluent: an in vitro study. *Curr Drug Deliv* 2005; 2(2): 199-205.

## Figure legends

Figure 1. Pseudo-ternary phase diagrams of the system containing Miglyol<sup>®</sup> 812N (oil phase), phosphate buffer pH 7.4 (aqueous phase), Lipoid<sup>®</sup> S100 (surfactant) and Tween<sup>®</sup> 80 (co-surfactant), showing the area of existence of microemulsions and the point chosen for characterization.

Figure 2: Particle size frequency and accumulative frequency of the microemulsion (ME) (A) and amphotericin B-loaded-microemulsion (AmB-ME) (B).

Figure 3: Viscosity (A and B) and rheological behavior (A' and B') of the microemulsion (ME) (A and A') and amphotericin B-loaded-microemulsion (AmB-ME) (B and B').

Figure 4: UV-visible absorption spectra of pure Amphotericin B (AmB) in methanol (A), the micelle dosage form Amphotericin B (AmB-M) in phosphate buffer (pH 7.4) (B) and AmB into the microemulsion diluted at phosphate buffer (pH 7.4) (C) and in microemulsion (AmB-ME) (D).

Table 1

## Composition of blank ME

Product	Technical name	Function	% (w/w)
Lipoid <sup>®</sup> S100	Soya hydrogenated phosphatidylcholine	Surfactant	6.3
Tween <sup>®</sup> 80	Polysorbate 80	Co-surfactant	14.7
Miglyol <sup>®</sup> 812N	Caprylic/capric triglyceride	Oil phase	11.0
Phosphate buffer solution pH 7.4	-----	Aqueous phase	68.0

Table 2

Evaluated parameters of ME and AmB-ME (Mean  $\pm$  SD)

Parameter	Blank ME	AmB-ME
Percent transmittance (%)	98.0	60.0
pH	7.40 $\pm$ 0.04	7.16 $\pm$ 0.31
Viscosity (mPa.s)	48.28 $\pm$ 0.36	47.20 $\pm$ 0.31
Refractive index	1.373 $\pm$ 0.00	1.374 $\pm$ 0.00
Conductivity ( $\mu$ S)	733.00 $\pm$ 3.46	1820.00 $\pm$ 712.43
Particle size (nm)		
X <sub>10</sub>	7.22 $\pm$ 0.41	7.39 $\pm$ 0.52
X <sub>50</sub>	9.79 $\pm$ 0.42	9.87 $\pm$ 0.64
X <sub>90</sub>	13.96 $\pm$ 0.49	14.15 $\pm$ 0.59
Surface tension (dyn/cm)	71.40 $\pm$ 0.57	71.10 $\pm$ 1.06
Zeta potential (mV)	+ 67.52 $\pm$ 0.59	+ 122.73 $\pm$ 2.25



Table 3

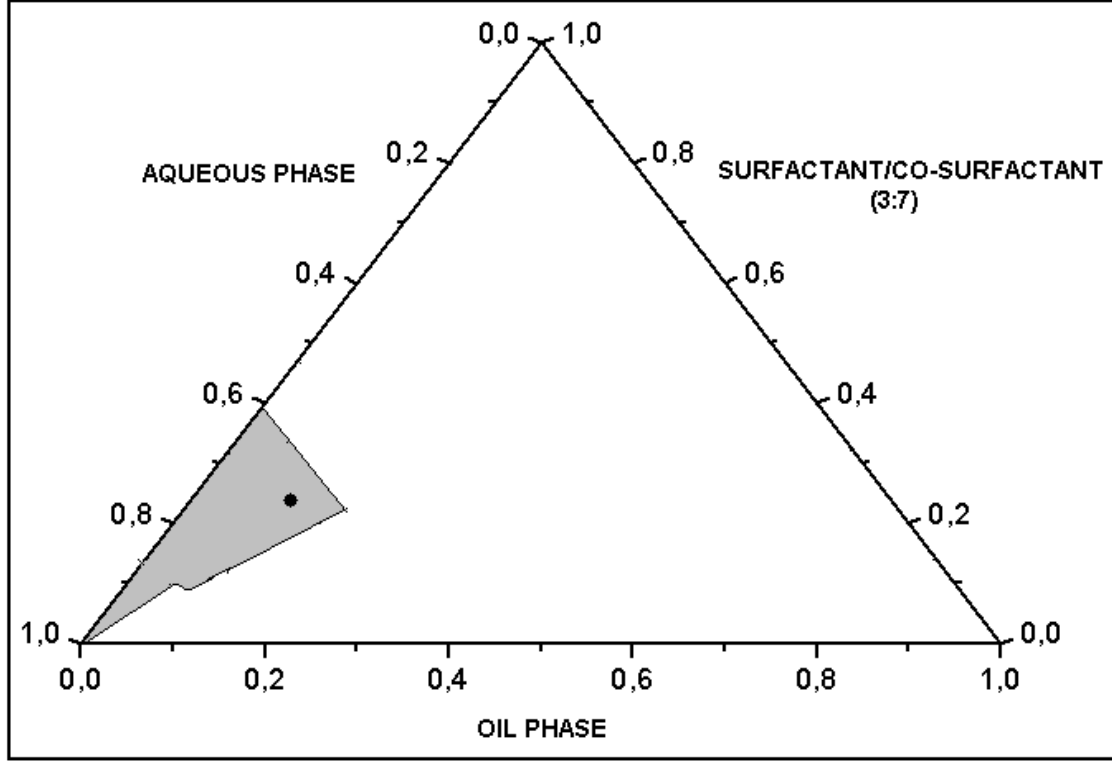
AmB content (Mean  $\pm$  SD)

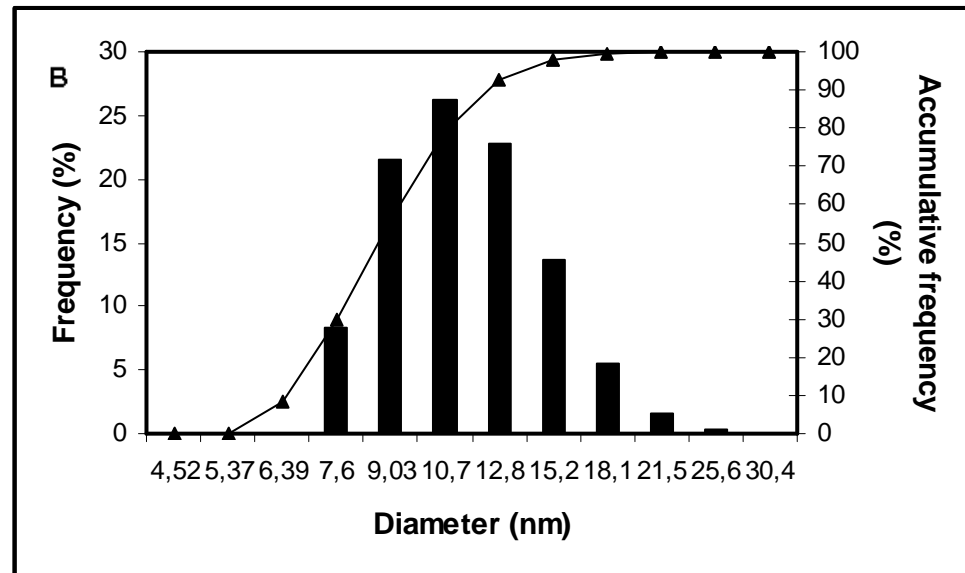
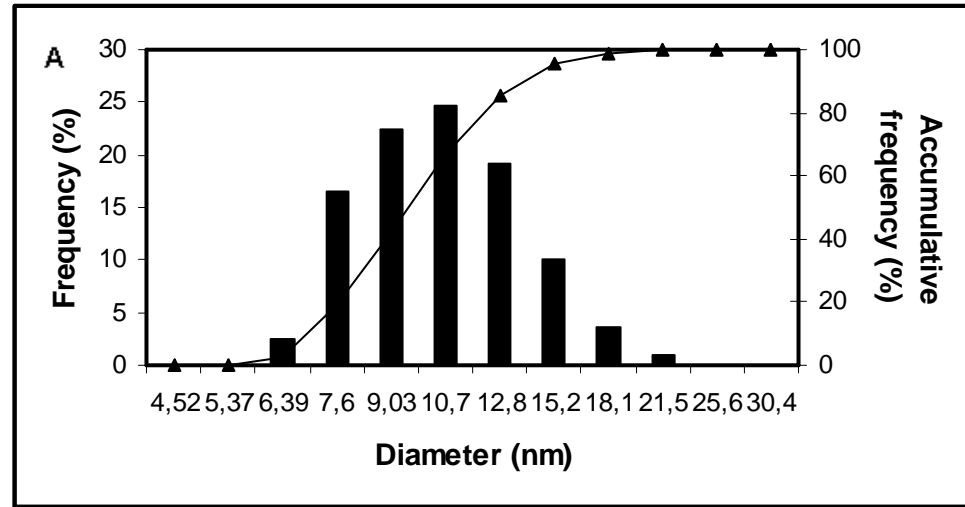
Parameters	AmB Content (mg/mL)	AmB Content (%)
Without filtration	3.51 $\pm$ 0.35	70.20
After 0.45 $\mu$ m	2.98 $\pm$ 0.33	59.60
After 0.22 $\mu$ m	2.50 $\pm$ 0.16	50.00

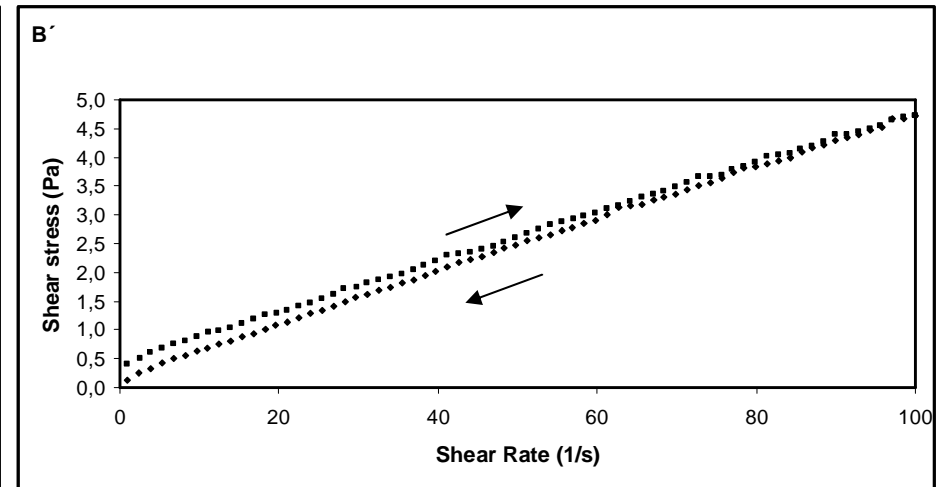
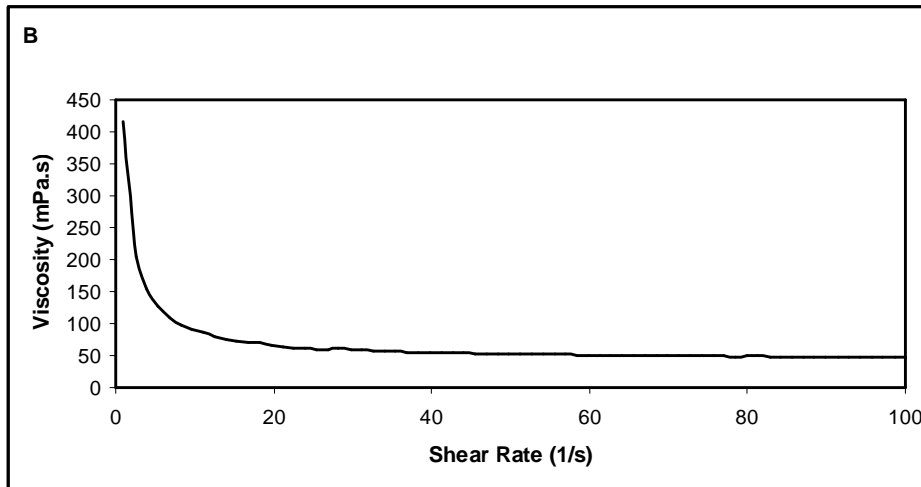
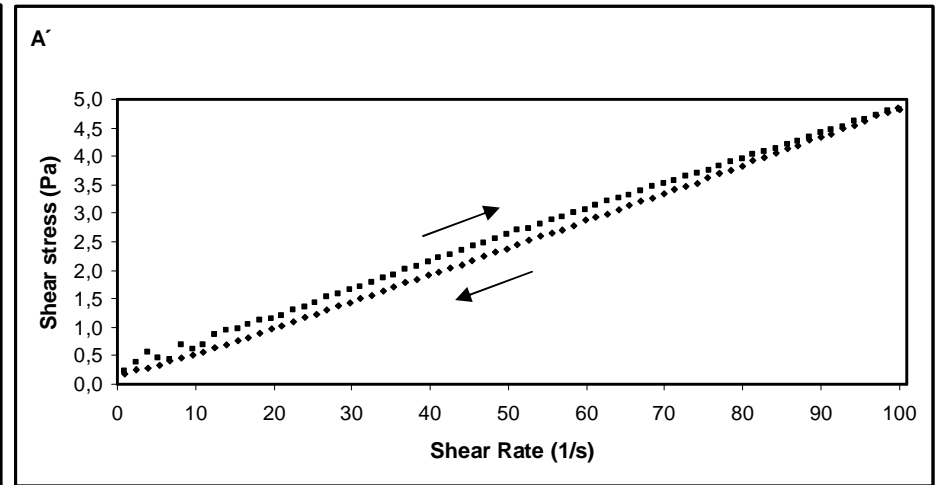
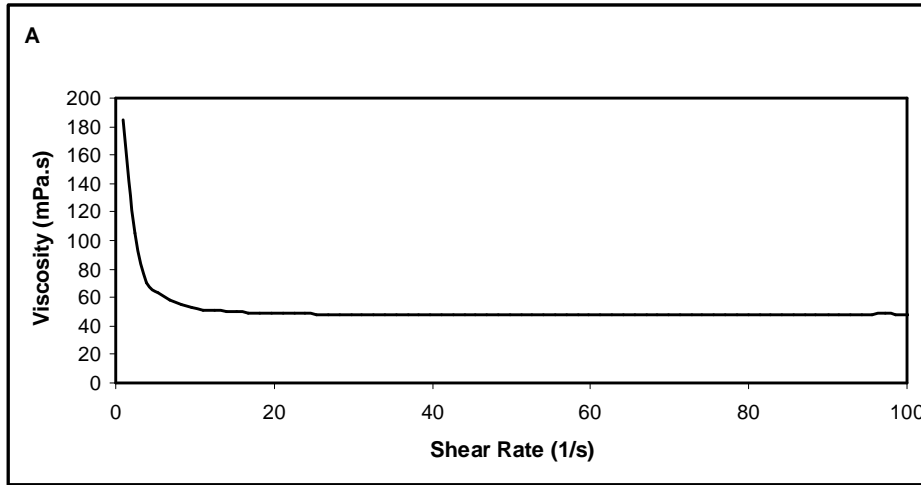
Table 4

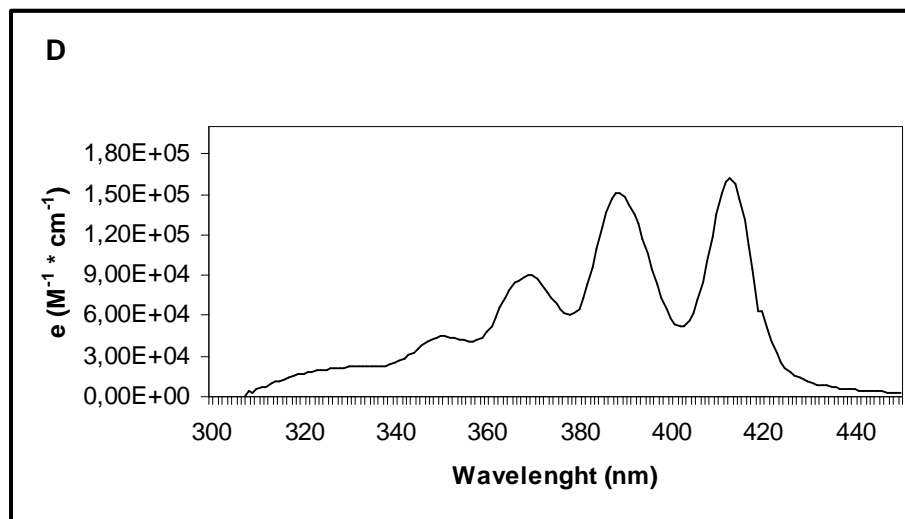
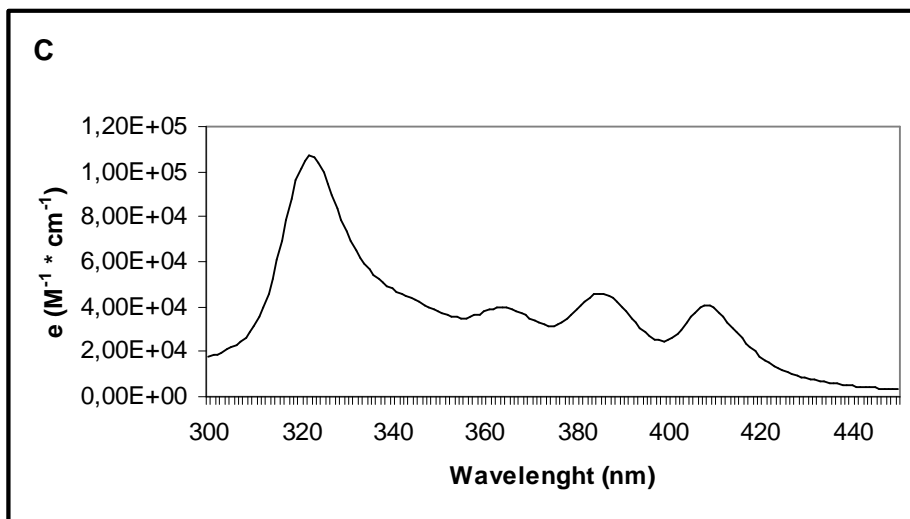
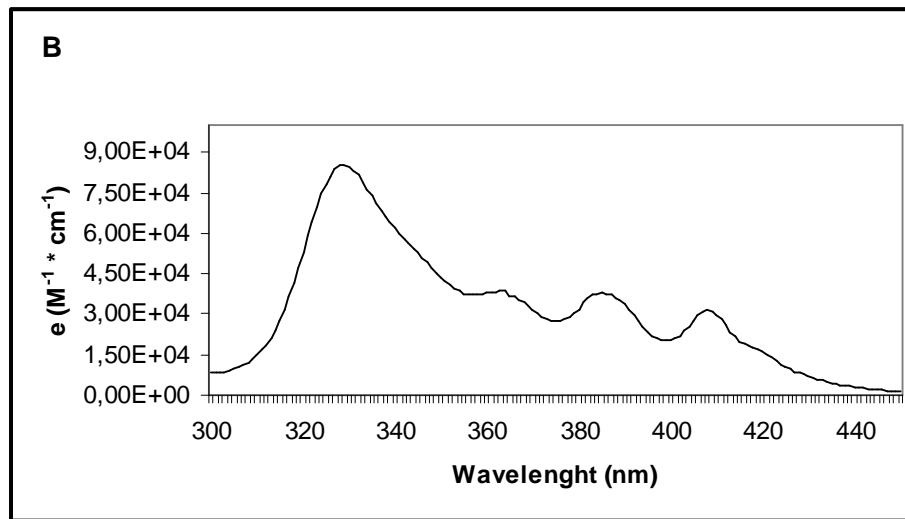
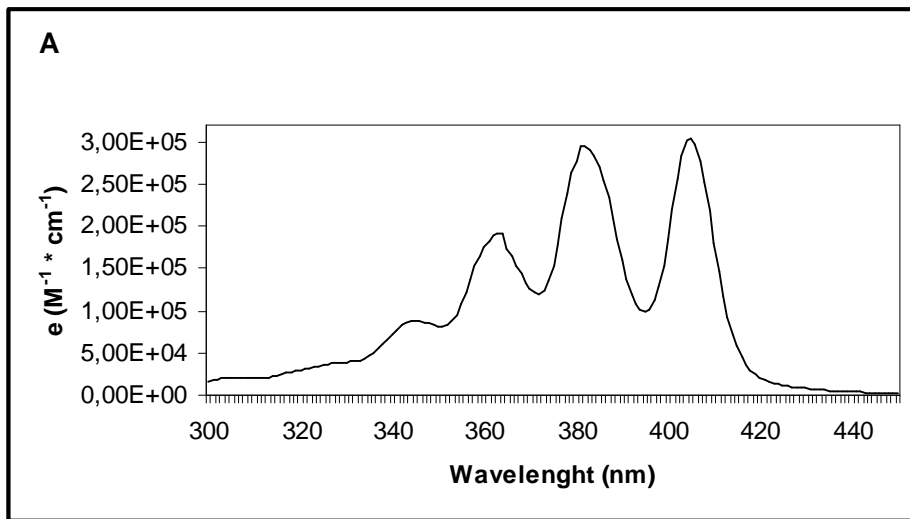
Results of stability of ME and AmB-ME after the freeze-thaw cycles (Mean  $\pm$  SD)

Parameter	Blank ME	AmB-ME
pH	7.48 $\pm$ 0.00	7.91 $\pm$ 0.10
Refractive index	1.378 $\pm$ 0.00	1.377 $\pm$ 0.00
Conductivity ( $\mu$ S)	829.03 $\pm$ 10.33	1692.3 $\pm$ 109.20
AmB content (mg/mL)	-----	3.34 $\pm$ 0.54



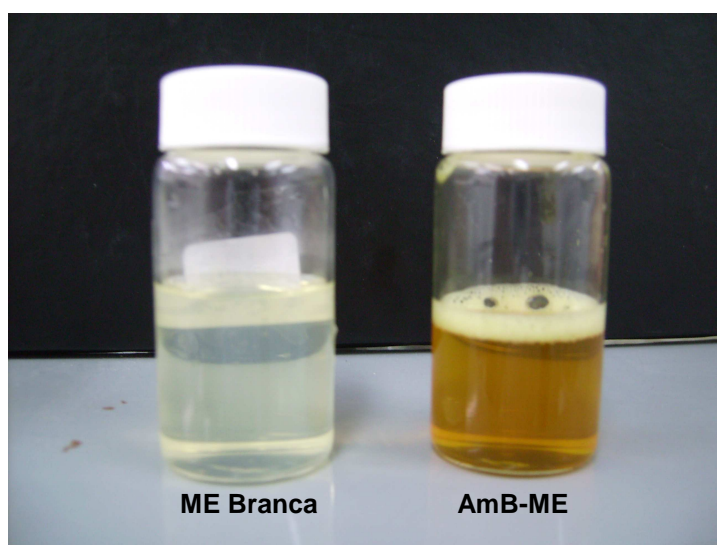






#### 4. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES

Com o desenvolvimento deste projeto esperou-se obter uma nova formulação denominada ME, capaz de incorporar a AmB, com características próprias que favorecessem a sua administração por meio da aplicação tópica ocular, além de proporcionar à comunidade científica o entendimento de uma tecnologia até então pouco explorada por nossos pesquisadores (Figura 6).



**Figura 6: ME branca e com a AmB incorporada**

Fonte: Arquivo pessoal do autor

O cronograma de execução, anteriormente determinado com a construção do projeto, foi cumprido em sua totalidade e durante toda a execução das atividades realizadas, um enorme crescimento intelectual e científico foi sendo percebido devido à necessidade de se interpretar os resultados obtidos, levando-os sempre a um entendimento que fosse voltado à idéia da multidisciplinaridade. Com o cumprimento do cronograma, todas as metas foram alcançadas e diversos alunos de iniciação científica puderam se envolver direta e indiretamente com os estudos realizados.

Conforme pode ser verificado nos resultados gerados, a metodologia utilizada foi capaz de atender a necessidade do desenvolvimento do projeto e os sistemas desenvolvidos apresentaram resultados que nos permitem afirmar que os mesmos podem ser, portanto, do ponto de vista tecnológico, aptos a serem utilizados através da via de administração tópica ocular. Para a sua realização, além dos nossos equipamentos, foram estabelecidos diversos contatos bastante importantes com vários outros laboratórios da UFRN e da UFPE, que gentilmente cederam seus equipamentos e instalações, dando um suporte imprescindível à parte experimental do projeto e a quem eu devo enormes agradecimentos.

A realização destes estudos mostrou ainda que foi possível a obtenção de uma forma farmacêutica líquida e de fácil preparação, estéril, contendo um fármaco bastante importante para a terapêutica antifúngica ocular e que a ME branca pode servir para a incorporação de outros fármacos pouco solúveis em água, ou ainda, que não possuam uma formulação oftalmológica em particular necessários ao tratamento das mais diversas patologias oculares de forma mais eficaz para a sociedade. Sendo assim, durante toda a fase experimental e devido à esta grande diversidade de ensaios realizados, vários trabalhos puderam ser apresentados em congressos locais, regionais, nacionais e internacionais até o momento, incluindo a confecção de mais um artigo científico que já está apto a ser submetido, além deste apresentado nesta dissertação.

A publicação acima reforça a importância do tema para a comunidade científica, pois a pobre biodisponibilidade da AmB gerada a partir das barreiras anatômicas e fisiológicas do olho associados a grande possibilidade de



toxicidade ocular, além da baixa estabilidade da preparação extemporânea utilizada para a aplicação tópica, faz com que se torne necessário o desenvolvimento de um novo sistema carreador para a AmB, sistema este, possibilitado devido ao enorme crescimento, recentemente, do uso das MEs relacionadas para o uso farmacêutico.

Em decorrência disso, o objetivo de reduzir o potencial risco de reações adversas gerado com o uso da AmB convencional, cuja formulação é mais apropriada para a administração intravenosa, no tratamento de infecções fúngicas oculares, além de proporcionar a chance de se ter uma forma farmacêutica própria para aplicação tópica nos olhos para a AmB, ainda inexistente no mercado, torna o referido artigo como uma referência básica e primordial de orientação para o desenvolvimento de novas formulações para uso oftalmológico somando-se àquelas poucas referências que são encontradas hoje nos principais indexadores que trazem o assunto sobre a utilização desses sistema para uso oftalmológico.

Entretanto, é evidente a necessidade ilimitada de desenvolver novas alternativas terapêuticas para melhorar a qualidade da assistência à saúde e acompanhar os avanços tecnológicos e científicos do dia-a-dia. Portanto, são necessários que novos estudos sejam realizados com as formulações desenvolvidas para que o entendimento seja claro e que atinja o equilíbrio entre todas as áreas da saúde. Sendo assim, ensaios de eficácia clínica da AmB-ME, farmacocinéticos, estudos de citotoxicidade e de toxicidade, epidemiológicos, microbiológicos, entre outros, seriam de grande valia para a complementaridade da idéia desenvolvida por meio deste trabalho, tornando o tema aberto para a comunidade científica explorar, por meio de outros

projetos, dissertações ou teses. Em 2010, pretendo dar continuidade à vários destes estudos por meio do curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Por fim, consideramos que o desenvolvimento desta pesquisa de Mestrado bem como a pós-graduação foram fatores importantes que contribuíram enormemente para a construção, execução, discussão e divulgação desse tema que a cada ano torna-se mais importante para a oftalmologia e que os objetivos estabelecidos da multidisciplinaridade enfatizados pelo PPGCSA puderam ser alcançados com sucesso quando os assuntos envolvidos no trabalho foram interdisciplinarizados.

## 5. APENDICE

### 5.1. APENDICE I

#### **Resumos publicados em anais de congresso**

1. MEDEIROS, Maria Izabel Priscila de Araújo, SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, BRASIL, Fernanda do Couto, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do

Caracterização macroscópica de microemulsões em gel para uso oftalmológico In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2007, Natal/RN.

**XVIII Congresso de Iniciação Científica.** Natal/RN: 2007.

2. SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, BRASIL, Fernanda do Couto, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do

Desenvolvimento de microemulsões O/A para uso ocular In: IX Congresso Científico da UNP, 2007, Natal/RN.

**IX Congresso Científico da UNP.** Natal/RN: 2007.

3. SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, DAMASCENO, Bolívar Ponciano Goulart de Lima, BRASIL, Fernanda do Couto, SOARES, Airanuédida Silva, ARAÚJO, Ivonete Batista de, OLIVEIRA, Anselmo Gomes, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do

Rheological behaviour of microemulsions intended for ophthalmic use In: I International Symposium in Pharmaceutical Sciences of Northeast Brazil, 2008, Natal/RN.

**I International Symposium in Pharmaceutical Sciences of Northeast Brazil,** Natal/RN: 2008.

4. SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, SOARES, Airanuédida Silva, BRASIL, Fernanda do Couto, ARAÚJO, Ivonete Batista de, OLIVEIRA, Anselmo Gomes, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do  
Characterization of Oil-in-water microemulsion intended for ophthalmic use  
In: I International Symposium in Pharmaceutical Sciences of Northeast Brazil, 2008, Natal/RN.

**I International Symposium in Pharmaceutical Sciences of Northeast Brazil**, Natal/RN: 2008.

5. SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, BRASIL, Fernanda do Couto, SOARES, Airanuédida Silva, FREIRE, Larissa Bandeira, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do  
Evaluation of the autoclavation processo on the stability of oil-in-water microemulsion intended for ophthalmic use In: III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência bacteriana, II Workshop Sul-Americano de Ciência e Tecnologias Farmacêuticas, I Fórum de Microbiologia Aplicada ao Controle de Infecções em Serviços de Saúde e I Fórum Norte-Nordeste dos LACEN's, 2008, Olinda/PE.

**III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência bacteriana**. Olinda/PE: 2008.

6. SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, BRASIL, Fernanda do Couto, SOARES, Airanuédida Silva, CARVALHO, Juliana Fernandes, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do  
Evaluation of the fungal contamination in microemulsion after the sterilization process by filtration In: III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência bacteriana, II Workshop Sul-Americano de Ciência e Tecnologias

Farmacêuticas, I Fórum de Microbiologia Aplicada ao Controle de Infecções em Serviços de Saúde e I Fórum Norte-Nordeste dos LACEN's, 2008, Olinda/PE.

**III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência bacteriana.**

Olinda/PE: 2008.

7. BRASIL, Fernanda do Couto, SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, SILVA, Maria Clara de Araújo, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do

Caracterização macroscópica de microemulsões contendo anfotericina B para uso ocular In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2008, Natal/RN.

**XIX Congresso de Iniciação Científica.** Natal/RN: 2008.

8. FERREIRA, Laura da Fonseca, SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, DAMASCENO, Bolívar, Ponciano Goulart de Lima, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do

Comportamento reológico de microemulsões contendo anfotericina B destinados ao uso oftalmológico In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2008, Natal/RN.

**XIX Congresso de Iniciação Científica.** Natal/RN: 2008.

9. SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, DAMASCENO, Bolívar, Ponciano Goulart de Lima, BRASIL, Fernanda do Couto, SOARES, Airanuédida Silva, FERREIRA, Laura da Fonseca, SILVA, Maria Clara de Araújo, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do

Characterization of the aggregation form of amphotericin B in a microemulsion intended for ophthalmic use In: Meeting on Nanotechnology, Liposome and Health, 2009, Itaparica/BA.

**Meeting on Nanotechnology, Liposome and Health.** Itaparica/BA: 2009.

10. SOARES, Airanuédida Silva, SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, BRASIL, Fernanda do Couto, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do

Estudos de caracterização físico-química de uma microemulsão contendo anfotericina B para a aplicação tópica ocular In: XX Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2009, Natal/RN.

**XX Congresso de Iniciação Científica.** Natal/RN: 2009.

11. SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da, DAMASCENO, Bolívar, Ponciano Goulart de Lima, BRASIL, Fernanda do Couto, SOARES, Airanuédida Silva, ARAÚJO, Ivonete Batista de, EGITO, Eryvaldo Sócrates Tabosa do

Avaliação granulométrica de microemulsões contendo anfotericina B visando o uso oftalmológico In: I Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas, 2009, Natal/RN

**I Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas.**

Natal/RN: 2009.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carlfors J, Edsman K, Petersson R, Jornving K. Rheological evaluation of Gelrite in situ gels for ophthalmic use. *Eur J Pharm Sci.* 1998; 6(2):113-9.
2. Chaumeil C, Bourcier T, Rostane H, Goldschmidt P, Nourry H, Zamfir O, et al. Diagnosis and treatment of keratomycosis and fungal endophthalmitis. *J Mycol Med.* 2007; 17:89-108.
3. Kaushik S, Ram J, Brar GS, Jain AK, Chakraborti A, Gupta A. Intracameral amphotericin B: initial experience in severe keratomycosis. *Cornea.* 2001; 20(7):715-9.
4. Kuriakose T, Kothari M, Paul P, Jacob P, Thomas R. Intracameral amphotericin B injection in the management of deep keratomycosis. *Cornea.* 2002; 21(7):653-6.
5. Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(4):730-97.
6. Yilmaz S, Ture M, Maden A. Efficacy of intracameral amphotericin B injection in the management of refractory keratomycosis and endophthalmitis. *Cornea.* 2007; 26(4):398-402.
7. Yoon KC, Jeong IY, Im SK, Chae HJ, Yang SY. Therapeutic effect of intracameral amphotericin B injection in the treatment of fungal keratitis. *Cornea.* 2007; 26(7):814-8.
8. Morand K, Bartoletti AC, Bochot A, Barratt G, Brandely ML, Chast F. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physico-chemical and formulation stability. *Int J Pharm.* 2007; 344(1-2):150-3.
9. Kaur IP, Rana C, Singh H. Development of effective ocular preparations of antifungal agents. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2008; 24(5):481-93.

10. Fialho SL, da Silva-Cunha A. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2004; 32(6):626-32.
11. Gasco MR, Gallarate M, Trotta M, Bauchiero L, Gremmo E, Chiappero O. Microemulsions as topical delivery vehicles: ocular administration of timolol. *J Pharm Biomed Anal.* 1989; 7(4):433-9.
12. Hasse A, Keipert S. Development and characterization of microemulsions for ocular application. *Eur J Pharm Biopharm.* 1997; 43(2):179-83.
13. Vandamme TF. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog Retin Eye Res.* 2002; 21(1):15-34.
14. Brime B, Moreno MA, Frutos G, Ballesteros MP, Frutos P. Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation. *J Pharm Sci.* 2002; 91(4):1178-85.
15. Esposito E, Bortolotti F, Menegatti E, Cortesi R. Amphiphilic association systems for Amphotericin B delivery. *Int J Pharm.* 2003; 260(2):249-60.
16. Moreno MA, Frutos P, Ballesteros MP. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. *Pharm Res.* 2001; 18(3):344-51.
17. Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; 60(2):207-25.
18. Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000; 27(7):558-62.
19. Manzouri B, Vafidis GC, Wyse RK. Pharmacotherapy of fungal eye infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2001; 2(11):1849-57.



20. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis.* 1990; 12(2):308-29.
21. Wood TO, Tuberville AW, Monnett R. Keratomycosis and amphotericin B. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1985; 83:397-409.
22. Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci.* 2008; 97(7):2405-25.
23. Araujo IB, Damasceno BP, de Medeiros TM, Soares LA, do Egito ES. Decrease in Fungizone toxicity induced by the use of Lipofundin as a diluent: an in vitro study. *Curr Drug Deliv.* 2005; 2(2):199-205.
24. Kaji Y, Yamamoto E, Hiraoka T, Oshika T. Toxicities and pharmacokinetics of subconjunctival injection of liposomal amphotericin B. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009; 247(4):549-53.
25. Danielsson I, Lindman B. The definition of microemulsion. *Colloides surf.* 1981; 3:391-5.
26. Hoar TP, Schulman JH. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. *Nature.* 1943; 152:102-05.
27. Winsor PA. Hydrotrophy, Solubilisation and Related Emulsification Processes .1. to .4. *Transactions of the Faraday Soc.* 1948; 44(6):376-98.
28. Kaur IP, Kanwar M. Ocular preparations: the formulation approach. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002; 28(5):473-93.

## **ABSTRACT**

Ocular fungal infections are being increasingly recognized as an important cause of morbidity and blindness of the world. The poor bioavailability of drugs, like amphotericin B, antifungal enough used in the treatment of these infections, in the posterior tissues of the eye combined with the anatomical ocular barriers, which are able to limit their absorption, and associated with serious risks of adverse reactions, generally, carry a treatment failure and serious consequences for affected patients. Researchers around the world are looking for new alternatives to overcome this problem and one great possibility is the researches which involve the development of new formulations to improve the bioavailability and reduce the toxicity associated with the application of amphotericin B. Microemulsions appear as new systems capable of loading this drug for ophthalmic use. This study aimed to obtain a biocompatible microemulsion with the topical ocular route of administration containing amphotericin B in order to establish a new and stable pharmaceutical dosage form for topical administration in the eye. The system obtained demonstrated through the characterization studies carried out biocompatibility with the route of administration desired and, therefore, appears as an interesting and novel dosage form containing amphotericin B for use, in future, in the treatment of fungal eye infections.

**Descriptors:** Amphotericin B; Ophthalmic Solutions; Drug carriers; Pharmaceutical preparations; Microemulsions.