UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e avaliação de nova preparação de anfotericina B e/ou cetoconazol em dispersão de bixina, pullulan e trealose

Gustavo Muneo Takata

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profª Drª Irene Satiko Kikuchi

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e avaliação de nova preparação de anfotericina B e/ou cetoconazol em dispersão de bixina, pullulan e trealose

Gustavo Muneo Takata

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profª Drª Irene Satiko Kikuchi

São Paulo
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Takata, Gustavo Muneo
T136d Desenvolvimento e avaliação de nova preparação de anfotericina B e/ou cetoconazol em dispersão de bixina, pullulan e trealose / Gustavo Muneo Takata. - São Paulo, 2019.
81 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kikuchi, Irene Satiko

1. bixina. 2. nanodispersão. 3. pullulan. 4. trealose. 5. carreador. I. T. II. Kikuchi, Irene Satiko, orientador.

Gustavo Muneo Takata

Desenvolvimento e avaliação de nova preparação de anfotericina B e/ou cetoconazol em dispersão de bixina, pullulan e trealose

Comissão Julgadora

Profª Drª Irene Satiko Kikuchi
Orientador/Presidente

_____

Profª Drª Kazuko Uchikawa Graziano - 1º examinador

_____

Profª Drª. Célia Hitomi Yamamoto - 2º examinador

_____

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho - 3º examinador

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Irene Satiko Kikuchi por aceitar a me orientar no mestrado, pelos essenciais ensinamentos e por compartilhar suas preciosas experiências.

À Profª Drª Nádia Araci Bou-Chacra e à mestranda Aline de Souza por contribuir na execução dos experimentos cedendo equipamentos, tempo e orientação ao longo desse projeto.

Aos companheiros de laboratório João Victor Mendes, Fabiana Hirata Bae e Nathalia Tercila Silva, pela ajuda nos experimentos, convívio e boas conversas.

Aos membros do Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários e Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas – CONFAR, pela solicitude e auxílio ao longo de todo o projeto.

À CORANTEC Corantes Naturais Ltda. pela gentil doação dos extratos de sementes de urucum

À Nagase & Company Ltda. pela gentil doação de pullulan e trealose em pó.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo, pela colaboração e atenção.

RESUMO

TAKATA, G. M. **Desenvolvimento e avaliação de nova preparação de anfotericina B e/ou cetozonazol em dispersão de bixina, pullulan e trealose.** 2019. 81 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Muitos pacientes acometidos por infecções fúngicas sucumbem devido a não eficácia dos antibióticos ou por toxicidade dos mesmos. Anfotericina B é um dos antifúngicos mais eficientes do mercado apesar de sua alta toxicidade, tem estrutura poliênica e é um composto insolúvel em água, sendo necessário o uso de adjuvantes e novas tecnologias para preparo de formulações eficazes. Cetoconazol é um composto imidazólico, também com ação antifúngica de grande espectro de ação e difícil solubilização em meio aquouso, porém solúvel somente em baixos valores de pH. Estudos têm demonstrado a utilização de bixina na preparação de dispersões aquosas de compostos insolúveis ou pouco solúveis em água. Bixina é o principal composto das cascas de semente de *Bixa orellana* (urucum), sendo um carotenoide insolúvel em água, porém, permite preparações na forma de nanodispersões aquosas com incorporação de fármacos apolares ou lipofílicos. O objetivo deste trabalho foi preparar anfotericina B e cetoconazol na forma de nanodispersões a partir de bixina, utilizando pullulan e trealose como adjuvantes e avaliar estabilidade e eficácia antimicrobiana por ensaios físico-químicos e microbiológicos. Pullulan é um polissacarídeo constituído por unidades de maltotriose, com propriedades adesivas e capacidade de formar biofilmes, enquanto trealose é um composto com duas unidades de glicose, com boa estabilidade em faixas de pH de 3 a 10 e capaz de suportar altas temperaturas, como processos de esterilização por calor úmido. Ensaios físico-químicos demonstraram boa manutenção das características das preparações propostas neste projeto, como, por exemplo, diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das estruturas das nanodispersões de bixina e antifúngicos e também eficácia antimicrobiana frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Os resultados apresentam perspectivas para aprimoramentos de formulações com fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, pesquisa de novos biomateriais e outras aplicações nas áreas farmacêutica e cosmética.

Palavras-chave: bixina, nanodispersão, pullulan, trealose, carreador, antifúngico.

ABSTRACT

TAKATA, G. M. **Development and evaluation of novel preparation of amphotericin B and/or ketoconazole in dispersion of bixin, pullulan and trehalose.** 2019. 81 p. Thesis (Masters) **–** Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Many patients with fungal infections succumb due to ineffectiveness or toxicity of antibiotics. Amphotericin B is one of the most efficient antifungals on the market despite its high toxicity. It presents polyenic structure and is a water-insoluble compound. In this case, it is necessary to use adjuvants and new technologies to prepare effective formulations. Ketoconazole is an imidazolic compound, also with broad spectrum antifungal action and difficult solubilization in aqueous medium but it is soluble at low pH values. Studies have demonstrated the use of bixin in the preparation of aqueous dispersions of insoluble or poorly soluble compounds in water. Bixin is the main compound of *Bixa orellana* (annatto) seed husks, being a water-insoluble carotenoid, but it allows preparations in the form of aqueous nanodispersions with incorporation of apolar or lipophilic drugs. The objective of this work was to prepare amphotericin B and ketoconazole as nanodispersions from bixin, using pullulan and trehalose as adjuvants and to evaluate them under aspects of stability and efficacy by physicochemical and microbiological assays. Pullulan is a polysaccharide consisting of maltotriose units with adhesive properties and ability to form biofilms, while trehalose is a compound with two glucose units with good stability at pH ranges from 3 to 10 and capable of withstanding high temperatures such as processes of sterilization by moist heat. Physicochemical tests demonstrated good maintenance of the characteristics of the preparations proposed in this project, such as hydrodynamic diameter and zeta potential of bixin and antifungal nanodispersions and also antimicrobial efficacy against *Candida albicans* ATCC 10231. The results present prospects for improvement. of poorly soluble or water-insoluble drug formulations, research on new biomaterials and other applications in the pharmaceutical and cosmetic fields.

Keywords: bixin, nanodispersion, pullulan, trehalose, drug carrier, antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Moléculas de bixina (A), anfotericina B (B), cetoconazol (C), trealose (D) e pullulan (E)....4
Figura 2 - Estrutura química da anfotericina B....6
Figura 3 - Estrutura química do cetoconazol....10
Figura 4 - Estrutura química de bixina e norbixina....13
Figura 5 - Estrutura química do pullulan....19
Figura 6 - Estrutura química da trealose....22
Figura 7 - Biossíntese da trealose....22
Figura 8 - Método de incorporação de pullulan ou trealose nas preparações a partir de bixina....26
Figura 9 - Fluxograma de preparação de amostras para contagem de micro-organismos por plaqueamento *pour plate*....32
Figura 10 - Efeitos da autoclavação ou filtração em amostras de bixina ou bixina + anfotericina B....35
Figura 11 - Efeito do pullulan ou trealose em amostras de bixina ou bixina + anfotericina B submetidas a diferentes processos de esterilização....36
Figura 12 - Influência de procedimentos de incorporação de pullulan à dispersão de bixina após processo de esterilização por autoclavação....38
Figura 13 - Influência de procedimentos de incorporação de trealose à dispersão de bixina após processo de esterilização por autoclavação....38
Figura 14 - Estabilidade de amostras autoclavadas e não-autoclavadas no período de 2 meses....41
Figura 15 - Caracterização de dispersões aquosas de cetoconazol, bixina e mistura por método espectrofotométrico....43
Figura 16 - Cinética de agregação de preparações aquosas de cetoconazol e bixina no comprimento de onda de 400 nm....44
Figura 17 - Efeito do cetoconazol, pullulan e trealose nas preparações de bixina....47
Figura 18 - Curva padrão de cetoconazol em HCl 0,1 M....48
Figura 19 - Curva padrão de cetoconazol em etanol....49
Figura 20 - Caracterização de dispersão aquosa de bixina, anfotericina B ou sua mistura, e solução etanólica de anfotericina B por método espectrofotométrico....50

Figura 21 - Efeito do pullulan na dispersão de bixina e anfotericina B 51
Figura 22 - Esquema de distribuição de amostras (anfotericina B) em placas.....53
Figura 23 - Efeito antifúngico de preparações contendo anfotericina B por método de plaqueamento *pour plate*. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras totais para contagem de micro-organismos viáveis por plaqueamento *pour plate*: 31
Tabela 2 - Efeito do modo de preparo das nanodispersões de bixina nas suas características físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta).....33
Tabela 3 - Estudo de estabilidade de bixina (15 µM) no período de 24 horas.....34
Tabela 4 – Efeito dos processos de esterilização (filtração ou autoclavação) nas nanodispersões de bixina, considerando diferentes métodos dessas preparações (com ou sem pullulan ou trealose). 39
Tabela 5 - Estudo de estabilidade de nanodispersões de bixina e pullulan no período de 2 meses 40
Tabela 6 - Caracterização físico-química (diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta) de preparações de cetoconazol (KT) e bixina (BX).....44
Tabela 7 - Efeito de pullulan ou trealose nas características físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta) em preparações de bixina e cetoconazol 46
Tabela 8 - Caracterização físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta) de preparações de bixina contendo anfotericina B e pullulan 52
Tabela 9 - Efeito antifúngico de preparações contendo anfotericina B por método de difusão em ágar 53

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BX	Bixina
AnB	Anfotericina B
KT	Cetoconazol
PL	Pullulan
TR	Trealose
KOH	Hidróxido de potássio
HCl	Ácido Clorídrico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ATCC	American Type Culture Collection
UFC	Unidade Formadora de Colônia
LPS	Lipopolissacarídeo
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
TGO	Aspartato Aminotransferase
TGP	Alanina Aminotransferase
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
SG	Soro glicosado

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO 1

1.1. – Revisão da literatura 3

1.2. – Anfotericina B 6

1.2.1. – Formulações de Anfotericina B 6

1.2.2. – Toxicidade 7

1.2.3. – Efeito antifúngico 8

1.2.4. – Efeito anti-leishmaniose 8

1.2.5. – Efeitos Adversos 9

1.3. – Cetoconazol 9

1.3.1 – Propriedades físico-químicas e a dificuldade no desenvolvimento de novas formulações 10

1.3.2. – Efeitos adversos 11

1.4. – Bixina 12

1.4.1. – Atividade antioxidante 14

1.4.2. – Toxicidade 15

1.4.3. – Efeitos em síndromes metabólicas 15

1.4.4. – Outros efeitos biológicos 17

1.5. – Pullulan 18

1.6. – Trealose 21

2 – OBJETIVOS 24

2.1. – Objetivos específicos 24

3 – MATERIAL 24

4 – MÉTODOS 25

4.1. – Determinação de teor de bixina 25

4.2. – Preparo de dispersões de bixina 25

4.3. – Influência de pullulan (PL) nas características físico-químicas de dispersões de bixina (BX) contendo anfotericina B (AnB) 25

4.4. – Influência do procedimento de incorporação de pullulan às dispersões de bixina segundo tempo de estabilização de partículas 26

4.5. – Efeito do pullulan ou trealose e seu procedimento de incorporação em preparações submetidas a processos de esterilização 27

4.6. – Influência da concentração de pullulan na estabilidade de preparações de bixina submetidas ou não a estresse térmico 27

4.7. – Avaliação físico-química de preparações de bixina (BX) com cetoconazol (KT) 28

4.8. – Avaliação físico-química de preparações de bixina (BX) e cetoconazol (KT) com pullulan (PL) ou trealose (TR) 28

4.9. – Determinação de cetoconazol em preparações de bixina com pullulan 29

4.10. – Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras sob forma de dispersões de bixina 30

4.10.1 – Avaliação da inibição da proliferação de *C. albicans* pelo método de difusão em ágar 30

4.10.2. – Avaliação da inibição da proliferação de *C. albicans* pelo método de contagem de micro-organismos viáveis por plaqueamento *pour plate* 30

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 33

5.1. – Influência do procedimento de incorporação de pullulan às dispersões de bixina segundo o tempo de estabilização de partículas 33

5.2. – Efeito do pullulan ou trealose em preparações submetidas a processos de esterilização 34

5.3. – Influência da concentração de pullulan na estabilidade de preparações de bixina submetidas ou não a estresse térmico 39

5.4. – Avaliação físico-química de preparações de bixina (BX) com cetoconazol (KT) 42

5.5. – Avaliação físico-química de preparações de bixina e cetoconazol com pullulan ou trealose 45

5.6. – Análise de metodologia de doseamento de cetoconazol em preparações de bixina com pullulan 48

5.7. – Influência do pullulan (PL) nas características físico-químicas de dispersões de bixina (BX) contendo anfotericina B (AnB) 49

5.8 – Ensaios microbiológicos 52

6 - CONCLUSÕES 56

7 - PERSPECTIVAS 57

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

9 - Apêndice 77

1 – INTRODUÇÃO

Muitos pacientes acometidos por infecções como as fúngicas, sucumbem devido à não eficácia das antibioticoterapias ou por toxicidade dos próprios medicamentos. Medicamentos a base de anfotericina B tem sido a escolha para estes pacientes, porém, muitos acabam morrendo devido a alta toxicidade, principalmente, afetando sistema renal.

A anfotericina B é um antifúngico poliênico capaz de se ligar ao ergosterol e formar poros que alteram a permeabilidade e a estabilidade da membrana celular, e consequentemente afetam a viabilidade celular (GOLAN et al., 2008, 585). A insolubilidade em água também é uma característica da anfotericina B, de modo que se adiciona ou lauril sulfato de sódio ou desoxicolato de sódio à formulação para facilitar a solubilização do fármaco em água (FILIPPIN e SOUZA, 2006). A toxicidade da anfotericina B também é um aspecto limitante, podendo ser subdividida em sistêmica, renal ou hematológica, tal que a toxicidade renal é um evento adverso grave e determinante no grau de resposta terapêutica. Formulações de anfotericina B em lipossomos foram desenvolvidas para diminuir a exposição ao túbulo renal proximal ou a outros sistemas que possam gerar indesejados efeitos adversos (GOLAN et al., 2008). Comparativamente, a toxicidade da anfotericina B lipossomal é menor do que da anfotericina B convencional, de modo que a dose letal 50% (LD50) em camundongos foi 76 vezes maior para a formulação lipossomal do que para a formulação convencional, além da farmacocinética, farmacodinâmica e tolerabilidade também serem melhores (COUKEL e BROGDEN, 1998). Além desses aspectos, as formulações lipossomais de anfotericina B também apresentam um maior tempo de prateleira do que dispersões ou pó de formulações convencionais (MANOSROI et al., 2004).

Cetoconazol também é outro agente antifúngico de amplo espectro, porém, apresenta dificuldade em solubilização em preparações aquosas, sendo mais frequente apresentações comerciais nas formas de cremes, pomadas e suspensões.

A proposta deste projeto foi aprimorar estas preparações, principalmente em formulações aquosas, utilizando bixina para formar nanodispersões com incorporação destes antifúngicos insolúveis em água, utilizando polissacarídeos pullulan e trealose para melhorar características de dispersão e estabilidade.

O pullulan é um biopolissacarídeo linear produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, apresentando ligações glicosídicas 1,6 conectando os monômeros de maltotriose. Esse polímero apresenta propriedades físico-químicas como a adesividade e a capacidade de formar fibras e filmes biodegradáveis (CHENG et al., 2011). Por ser não tóxico, não-mutagênico, inodoro, insípido e comestível, as principais aplicações deste polissacarídeo se encontram na área alimentícia, como formadores de filme que pode ser aplicado diretamente em alimentos, aditivo alimentar (agente de massa em bebidas e molhos, estabilizante em maionese e estabilizante e/ou melhorador de farinha em alimentos de massa), substituto de amido e prébiótico.

O pullulan também pode ser aplicado na área farmacêutica como carreador de fármacos, substituto de plasma, agente de encapsulação (desenvolvimento de formulações de liberação contínua), além de que suas propriedades reológicas podem ser aproveitadas no desenvolvimento de cosméticos e composições para cicatrização de feridas (CHENG et al., 2011; LEATHERS, 2003; SINGH et al., 2008). Outra aplicação do pullulan está na área de vacinas como conjugado atóxico e capaz de aumentar a produção de imunoglobulina G e M e reduzir imunoglobulina E (SINGH et al., 2008). Prajati e colaboradores (2013) enumeraram uma série de aplicações biomédicas e farmacêuticas do pullulan, sendo destacados o carreamento de fármacose e genes; expansor de plasma; conjugado com atividade insulinotrópica; formador de filmes orais finos; modificador de superfície. Todas essas aplicações são possíveis, em grande parte, devido à capacidade de modificação química do pullulan, como sulfonação, carboximetilação, adição de siloxano, adição de derivados colesteril e palmitoil, adição de nitroalquil, metacrilação, adição de cinamatos, conjugação com heparina, carbonação etc. (PRAJATI et al., 2013; CHENG et al., 2011)

A bixina é uma molécula poli-insaturada da classe dos carotenóides, sendo caracterizada por um grupo carboxílico numa extremidade da cadeia poli-insaturada e um grupo metil-ester na outra. Essa molécula é um dos principais componentes da *Bixa orellana*, comumente conhecida como urucum. Em estudos anteriores, Kikuchi e colaboradores (2016) demonstraram possibilidade de carrear anfotericina B e eficácia sobre microrganismos em ensaios *in vitro*.

Candida albicans é um fungo dimórfico, normalmente encontrado na microbiota humana e a espécie de maior importância médica dentro do gênero *Candida*, sendo particularmente importante em pacientes imunocomprometidos, como portadores de HIV ou recém-transplantados, uma vez que pode causar infecções fatais nesses pacientes (MCCULLOUGH et al., 1996). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) refere-se à menor concentração de um antibiótico onde não se observa crescimento microbiológico, tal que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda a técnica de macrodiluição em tubo para a determinação do CIM, onde tubos de ensaio contendo diluições seriadas e logarítmicas de antimicrobianos são preparadas e inoculadas com uma suspensão padronizada de micro-organismo, sendo que a concentração referente ao tubo onde não foi observado crescimento microbiano será definida como CIM (ANVISA, 2019). Em um estudo realizado por Coelho e colaboradores (2012), determinou-se que a CIM da cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 é de 1 µg/ml de anfotericina B.

Assim, este trabalho teve com objetivos principais o preparo de uma nova nanodispersão de bixina e pullulan contendo anfotericina B, e avaliar a sua eficácia em testes microbiológicos *in vitro* e estudar a estabilidade das preparações.

1.1. – Revisão da literatura

A bixina (BX) é uma molécula da classe dos carotenóides presentes predominantemente na superfície de sementes de *Bixa orellana L.*, comumente conhecido como urucum. Bixina apresenta coloração que vai de laranja-amarelada a púrpura, é correntemente conhecida como colorau ou colorífico e amplamente utilizada na culinária brasileira e nas indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentícia (CAMARGO, 1985), sobretudo como corante alimentar em manteiga, queijos, salsichas, margarina, sorvete, cereais e outros produtos (MERCK INDEX, 2013; HALLAGAN et al., 1995). Bixina é uma molécula poli-insaturada com um grupo carboxílico numa extremidade e metilester na outra, sendo naturalmente encontrada na sua forma cis, enquanto que a sua forma all-trans pode ser obtida após aquecimento, processamento químico (MERCK INDEX, 2013) ou incidência de luz (SCOTTER, 2009). Como apresentado por Kikuchi e colaboradores (2016), foi possível obter nanodispersões de bixina capazes de carrear anfotericina B, observando-se um efeito fungicida contra *Candida albicans* nas primeiras 2 horas de

interação, enquanto que formulações comerciais não demonstraram a mesma intensidade de efeito mesmo após 24 horas.

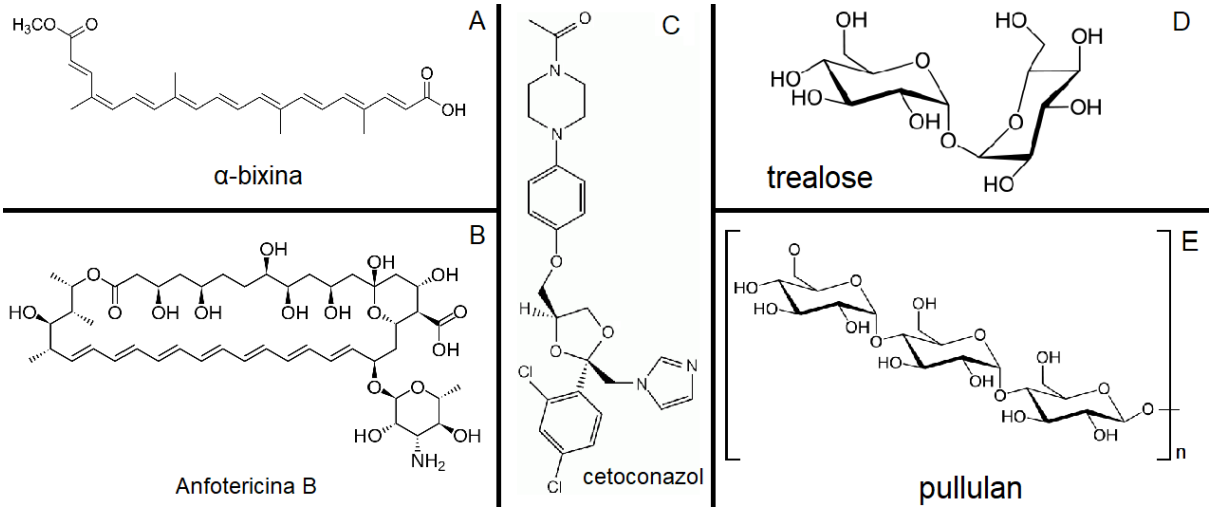

Figura 1 - Moléculas de bixina (A), anfotericina B (B), cetoconazol (C), trealose (D) e pullulan (E)

A Anfotericina B (AnB) é um antifúngico da classe dos polienos, usada contra infecções fúngicas (como aspergilose, criptococose, blastomicose, candidíase sistêmica etc), especialmente em pacientes imunocomprometidos, e contra leishmaniose visceral. O mecanismo de ação está relacionado com a formação de canais na membrana plasmática pela interação entre antibiótico e ergosterol, alterando a permeabilidade celular. O composto é insolúvel em água, tanto que são preparados como um colóide tamponado ou uma suspensão lipossomal. Devido a sua baixa absorção gastrointestinal, sua administração geralmente é por via intravenosa. As reações adversas são principalmente efeitos sistêmicos agudos (por exemplo, descargas de citocinas), renais e hematológicos, contudo as formulações lipossomais atenuam essas reações em comparação com as formulações convencionais (GOLAN et al., 2008).

O cetoconazol (KT) é um antifúngico imidazólico inibidor da enzima 14α-esterol desmetilase, responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol (GOLAN et al., 2008), consequentemente, altera a permeabilidade celular. De uma forma geral, o cetoconazol é um antifúngico de amplo espectro, podendo ser utilizado em infecções sistêmicas, superficiais e cutâneas, mas ineficaz contra onicomicoses. No Brasil, é possível encontrar o fármaco na forma de creme,

pomada, comprimido ou xampu. Devido à sua característica de base fraca (pKa de 6,5 e 2,9), só se observa dissolução do cetoconazol em água em baixos valores de pH, o que torna o desenvolvimento de formulações orais particularmente complicado (LUBACH et al., 2013; HASHEMZADEH e JOUYBAN, 2015). O cetoconazol é capaz de afetar o sistema citocromo P450, podendo alterar as funções hepáticas e a síntese de hormônios esteroides, levando a distúrbios endócrinos (Bula do cetoconazol; GOLAN et al., 2008).

A trealose (TR) é um dissacarídeo composto por duas moléculas de D-glicose unidas por uma ligação glicosídica α,α-1,1. No organismo humano, ela é clivada pela enzima trealase em duas moléculas de glicose. Em estudos realizados por Richards e colaboradores (2002), ela não apresentou mutagenicidade, genotoxicidade, teratogenicidade ou outro efeito tóxico. Os efeitos adversos mais relevantes são sintomas gastrointestinais (vômito, náusea, desconforto, flatulência, distensão abdominal, borborigmo, tenesmo, dor abdominal) relacionados com sua alta ingestão (limiar laxativo de 0,65 g/kg de peso corpóreo) (OKU e OKAZAKI, 1998). A trealose apresenta uma alta solubilidade em água, boa taxa de dissolução e boa compatibilidade com reagentes, podendo ser aplicado no desenvolvimento de medicamentos, cosméticos, alimentos e produtos médico-veterinário (BOLLIN e FLETCHER, 1988). Duas propriedades que tornam a trealose interessante é a sua capacidade de estabilizar estruturas protéicas e lipídicas em condições de baixa atividade de água (CROWE et al., 1984; CROWE et al., 1998) e a sua atividade antioxidante (HIGASHIYAMA, 2002; ČEJKOVÁ et al., 2010).

Pullulan (PL) é um exopolissacarídeo sintetizado por fungos, atóxico, não-mutagênico, inodoro, insípido, comestível, biodegradável, altamente solúvel em água e insolúvel em álcool. Seu peso molecular pode variar de 45 a 600 kDa e sua estrutura é passível de modificações químicas (PRAJATI et al., 2013), pode formar filmes finos impermeáveis (CHENG et al., 2011).

Kikuchi e colaboradores (2016) estudaram preparações de anfotericina B sob forma de dispersões a partir de bixina, observando boa eficácia nas novas formulações e também frente a ensaios microbiológicos *in vitro* com *Candida albicans* ATCC 10231. Como continuação deste trabalho, o presente projeto teve como objetivo utilizar os polissacarídeos pullulan e trealose para aprimoramento

destas preparações a partir de bixina, avaliando aspectos físico-químicos e eficácia antimicrobiana frente à *Candida albicans*.

1.2. – Anfotericina B

A Anfotericina B (figura 2) é um antifúngico da classe dos polienos, utilizada contra infecções fúngicas (como asperligiose, criptococose, blastomicose, candidíase sistêmica etc), especialmente em pacientes imunocomprometidos, e contra leishmaniose visceral. O mecanismo de ação está relacionado com a formação de canais pela interação entre antibiótico e ergosterol, alterando a permeabilidade celular. O composto é insolúvel em água, tal que a sua formulação ou é um colóide tamponado ou uma suspensão lipossomal. Devido a baixa absorção gastrointestinal, a sua administração geralmente é feita via intravenosa (GOLAN et al., 2008).

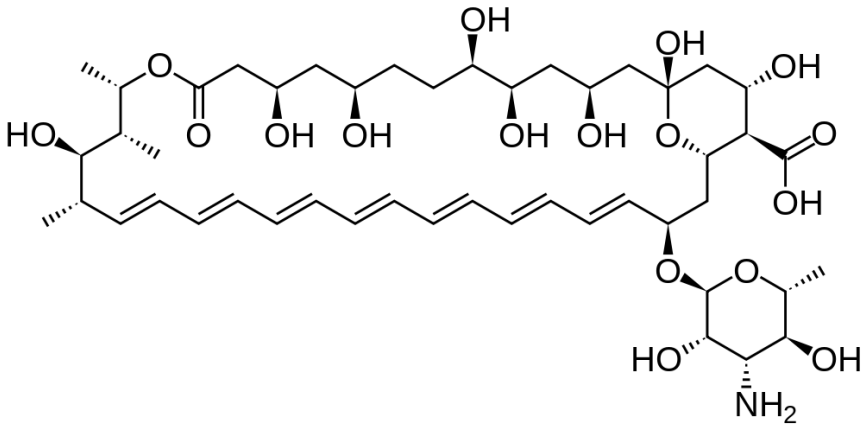

Figura 2 - Estrutura química da anfotericina B

1.2.1. – Formulações de Anfotericina B

As formulações que utilizam tensoativos para a dispersão da anfotericina B promovem a formação de micelas capazes de carrear o fármaco, gerando assim suspensões coloidais (BRAJTBURG e BOLARD, 1996). Atualmente no Brasil, os medicamentos que representam esse tipo de formulação são Anforicin®, um pó liófilo injetável que tem como excipientes desoxicolato de sódio e tampão fosfato (bula do Anforicin®), e Abelcet®, uma suspensão de complexo lipídico injetável que apresenta como principais excipientes o dimiristil fosfatidilcolina (DMPC) e o dimiristil fosfatidilglicerol (DMPG) (bula do Abelcet®).

Formulações que utilizam fosfolipídios podem gerar lipossomos capazes de carrear o antifúngico dentro da bicamada lipídica. As propriedades físico-químicas dependem da composição lipídica e da estrutura formada pelos lipídios como os tipos de camadas (unilamelar, multilamelar e forma de fita), assim como a razão entre o antibiótico e os lipídeos (BRAJTBURG e BOLARD, 1996). No Brasil, o medicamento Ambisome® é o representante de anfotericina B lipossomal, apresentando-se na forma de pó liofilizado estéril para reconstituição e administração na forma de infusão (bula do Ambisome®). Os lipossomos desse medicamento são unilamelares, pequenos e compostos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, DMPG e anfotericina B na proporção 2:1:0,8:0,4 (BRAJTBURG e BOLARD, 1996; FILLIPIN e SOUZA, 2006).

Outro sistema de carreamento de anfotericina B foi descrita por Vieira e Carmona-Ribeiro (2001), onde fragmentos de bicamada lipídica acomodavam o antifúngico na sua região lipofílica. Os fragmentos solubilizaram o antibiótico mais eficientemente do que lipossomos inteiros, uma vez que o espectro óptico da anfotericina B em fragmentos de bicamada se aproximou mais do espectro do fármaco em solvente ideal do que do espectro em água, onde se encontrava na forma de agregado.

1.2.2. – Toxicidade

Barwicz e colaboradores (1992) avaliaram a toxicidade *in vivo* de preparações contendo anfotericina B (AnB). O medicamento Fungizone ® é uma formulação na forma de AnB-agregada, porém, não mais comercializada e avaliada nessa pesquisa. Verificou-se que o fármaco na forma de agregado era mais tóxico do que na forma monomérica.

Foram realizadas comparações entre várias preparações contendo anfotericina B, dentre as quais AnB-lipossomal (Ambisome®), AnB-lipídeo (Abelcet® e Amphotec®) e AnB-desoxicolato (Anforicin® ou o seu predecessor, o Fungizone®). De modo geral, as preparações lipídicas, tanto lipossomais quanto não-lipossomais, são mais bem toleradas e menos tóxicas do que as preparações não-lipídicas, no caso, o AnB-desoxicolato, permitindo a administração de maiores doses, por períodos mais longos e de maneira mais segura e eficaz (BRAJTBURG e BOLARD, 1996; BOSWELL et al., 1998). A incidência de efeitos adversos com 4 e 6

mg/kg/dia de Amphotec® é comparável com a incidência de efeitos adversos com 0,8 e 1,0 mg/kg/dia de AnB-desoxicolato. A porcentagem de ocorrência de certos efeitos adversos são significativamente menores para AnB-lipossomal em comparação com AnB-desoxicolato. A concentração plasmática máxima de AnB-lipossomal é de 25 a 200 vezes maior do que a de AnB-desoxicolato ou de AnB-lipídio entre diferentes espécies animais estudadas. A eficácia e a duração do efeito antifúngico é maior para AnB-lipossomal do que para AnB-desoxicolato, mesmo administrando doses iguais (BOSWELL et al., 1998). A Dose Letal 50% de AnB-desoxicolato em camundongos foi 76 vezes maior para a formulação de AnB-lipossomal, além da farmacocinética, farmacodinâmica e tolerabilidade também se mostrarem piores em comparação com AnB-lipossomal (COUKEL e BROGDEN, 1998).

1.2.3. – Efeito antifúngico

O uso profilático de Ambisome® em pacientes transplantados resultou na redução da incidência de infecções fúngicas em comparação com pacientes que receberam placebo (TOLLEMAR et al., 1993). Numa compilação de resultados obtidos a partir de diferentes artigos, foi observado que a administração de AnB-lipossomal em pacientes com suspeita de infecção resultou ou na total resolução de sintomas ou na melhora clínica em 50 a 87% dos casos (COUKEL e BROGDEN, 1998). Esse tipo de preparação apresentou eficácia terapêutica em cerca de 61% dos casos de aspergiloses e 84% contra candidíase invasiva (RINGDÉN et al., 1991). Também é bem tolerado em pacientes acometidos por outra doença, por exemplo, neutropênicos (WALSH et al., 1998), pacientes HIV-positivo (COUKEL e BROGDEN, 1998) ou crianças com câncer (EMMINGER et al., 1994).

1.2.4. – Efeito anti-leishmaniose

Davidson e colaboradores (1991) relataram o tratamento com AnB-lipossomal de um paciente enfermo por leishmaniose visceral resistente a antimoniato de meglumina, pentamidina e paromomicina. A utilização desse medicamento resultou na melhora das funções hepáticas e renal após 4 dias do início do tratamento, reversão total do quadro clínico após 14 dias, parada do tratamento após 21 dias, nenhuma observação de reação adversa à anfotericina B, alta hospitalar 2 dias após

parada do tratamento e sem reincidiva da infecção fúngica após 2 meses da alta hospitalar.

Ainda nesse artigo (DAVIDSON et al., 1991), para verificar a veracidade do efeito observado no estudo de caso, foram realizados estudos em camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *Leishmania donovani* para determinar a dose efetiva 50% (ED50) e 90% (ED90) de formulações intravenosa de AnB-desoxicolato/ convencional e AnB-lipossomal. A formulação convencional apresentou ED50 = 4,9 mg/kg e ED90 = 178,3 mg/kg, enquanto que a formulação lipossomal apresentou ED50 = 0,15 mg/kg e ED90 = 2,65 mg/kg. Observou-se toxicidade com a administração de 1 mg/kg de anfotericina B. Portanto, a utilização de AnB-lipossomal gerou o melhor efeito terapêutico contra leishmaniose. Esse estudo abriu espaço para outros, onde se avaliaram o efeito da formulação lipossomal em diferentes perfis de paciente acometidos por leishmaniose e o efeito de diferentes posologias (DAVIDSON et al., 1994; DAVIDSON et al., 1996; DI MARTINO et al., 1997; RUSSO et al., 1996; SEAMAN et al., 1995; THAKUR et al., 1996).

1.2.5. – Efeitos Adversos

As reações adversas da anfotericina B são limitantes do seu uso nos tratamentos, pois estão relacionados a efeitos agudos sistêmicos (por exemplo, tempestade de citocinas), renais e hematológicos, sendo que os renais são considerados eventos adversos graves e determinantes na parada do tratamento. As formulações lipossomais foram desenvolvidas para reduzir esses efeitos adversos, tal que, como dito anteriormente, elas também são mais bem toleradas do que as formulações convencionais (GOLAN et al., 2008). Mesmo assim elas apresentam reações adversas que podem restringir o seu uso, piorar a morbidade do paciente e reduzir a adesão ao tratamento, como, por exemplo, náusea, vômito, calafrio, pirexia, hipocalemia, hiponatremia, hipocalcemia, hipomagnesemia, hiperglicemia, dor de cabeça, taquicardia, hipotensão, dispnéia, alterações de função hepática, tais quais aumento na concentração de creatinina e de ureia, etc (bula de Ambisome ®).

1.3. – Cetoconazol

O cetoconazol é um antifúngico imidazólico cujo mecanismo de ação consiste na inibição da enzima 14α-esterol desmetilase, que por sua vez é responsável pela

conversão de lanosterol em ergosterol (GOLAN et al., 2008). É uma alternativa à anfotericina B para casos menos graves, isto é, quando o paciente não é imunocomprometido. Pode ser usado em blastomicoses, histoplasmose e paracoccidioidomicoses (MAERTENS, 2004; RESTREPO, 1983), é ineficaz contra aspergilose e mucormicose, e nunca se avaliou adequadamente em pacientes acamados e sofrendo de candidíase ou criptococose (MAERTENS, 2004). De uma forma geral, o cetoconazol é um antifúngico de amplo espectro de ação, podendo ser utilizado em infecções sistêmicas, superficiais e cutâneas, mas ineficaz contra onicomicoses.

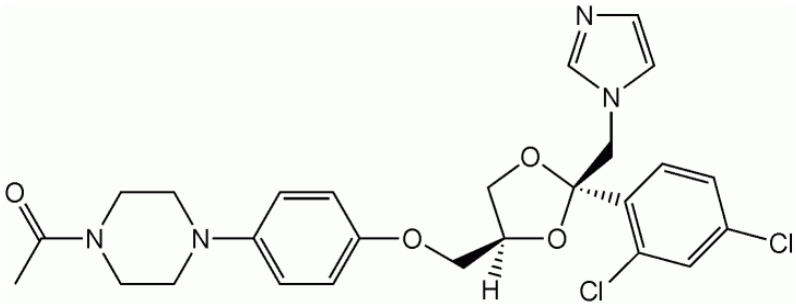

Figura 3 - Estrutura química do cetoconazol

1.3.1 – Propriedades físico-químicas e a dificuldade no desenvolvimento de novas formulações

No Brasil, o cetoconazol pode ser encontrado na forma de creme, pomada, comprimido ou xampu, portanto pode ser administrado por via oral ou tópica para tratar infecções fúngicas sistêmicas e cutâneas, respectivamente. Contudo a preparação de formulações e a biodisponibilidade do cetoconazol são dependentes de suas características físico-químicas, uma vez que ele é uma base fraca com valores de pKa de 6,5 e 2,9 (LUBACH et al., 2013) e apresenta uma baixa solubilidade em água em meio neutro (HASHEMZADEH e JOUYBAN, 2015). Tais características tornam o desenvolvimento de formulações complicado, especialmente as orais. Muitas estratégias foram estudadas para melhorar a solubilidade e dissolução, como o uso de modificadores de pH (ADACHI et al., 2015), lipossomos (PATEL et al., 2009), cocristais (SHAYANFAR e JOUYBAN, 2014) etc.

Lubach e colaboradores (2013) demonstraram *in vitro* uma alta dissolução do cetoconazol em baixos valores de pH, enquanto que em valores de pH ≥ 4 a concentração do antibiótico não atinge 1 mg/mL. Reproduzindo o experimento *in*

vivo, também se observou o efeito do pH na solubilidade, onde ratos pré-tratados com famotidina (inibidor de secreção gástrica) apresentaram menor concentração plasmática de cetoconazol, enquanto que ratos pré-tratados com pentagastrina (estimulador de secreção gástrica) apresentaram maior concentração plasmática do fármaco, ambos comparados com ratos controle. Adachi e colaboradores (2015) encontraram resultados semelhantes, onde adição de modificadores de pH à formulação melhorou a dissolução e a biodisponibilidade do cetoconazol. Galia e colaboradores (1998) mostraram *in vitro* que num ambiente gástrico (pH = 1,2) há uma maior dissolução do antibiótico do que num ambiente intestinal (pH = 6,5 e 0,75 mM de lecitina), contudo num ambiente intestinal alimentado (pH = 5,0 e 3.75 mM de lecitina), quando há uma maior concentração de tensoativos, observou-se maior solubilização do fármaco. Portanto, além da acidez do meio, a presença de sais biliares influencia na dissolução do cetoconazol no trato gastrointestinal.

A estabilidade das formulações é um parâmetro considerado durante o desenvolvimento de formulações. No estudo de Skiba e colaboradores (1999), avaliou-se a estabilidade de formulações aquosas de cetoconazol em diferentes concentrações, valores de pHs e concentração de antioxidante em temperaturas de 25 ou 50 °C. Encontrou-se que a concentração de cetoconazol decai mais rapidamente em baixos valores de pH, sugerindo uma degradação por catálise ácida. A concentração de cetoconazol manteve-se 99% da inicial em 25ºC, mas essa porcentagem caiu para 85% em 50 °C (ambos em pH 7, após período de 6 meses). O uso de antioxidante aumentou a estabilidade do antibiótico, mas reduziu o tempo de prateleira das preparações.

1.3.2. – Efeitos adversos

As reações adversas mais comuns do cetoconazol são dor abdominal, diarréia, náusea, dor de cabeça e função hepática anormal (Bula do cetoconazol), sendo que a última reação está relacionada com o efeito inibitório do antibiótico no sistema P450. Consequentemente, outro efeito adverso é a ocorrência de distúrbios endócrinos relacionados com a redução da síntese de hormônios esteróides (GOLAN et al., 2008), podendo causar ginecomastia, fogacho (ondas de calor), distúrbios menstruais, disfunção erétil, azoospermiaetc (Bula do cetoconazol). Na análise de casos feita por Lewis e colaboradores (1984), observou-se uma

associação entre a administração de cetoconazol e a ocorrência de hepatotoxicidade, apesar da ocorrência de dano hepático ser baixo (cerca de 1 em 10.000 casos). Também se observaram casos de reaparecimento de reação adversa com a readministração do antibiótico, recuperação dos sintomas com a descontinuação ou redução de dose, indícios de lesão hepática segundo avaliação de parâmetros bioquímicos e ocorrência de necrose hepática em alguns casos. O monitoramento dos parâmetros bioquímicos hepáticos é clinicamente aconselhável e, caso não se observe melhora, redução da dose ou parada imediata do tratamento são preferíveis para garantir a segurança do paciente.

Tanto o perfil farmacocinético quanto os efeitos adversos são limitantes do uso clínico do cetoconazol. Outro aspecto observado no uso do antifúngico é a ocorrência de interações medicamentosas, uma vez que o antifúngico inibe a família de enzimas hepáticas P450, que por sua vez é responsável pela metabolização de diversos outros fármacos (GOLAN et al., 2008).

1.4. – Bixina

A bixina é uma molécula da classe dos carotenoides e presente predominantemente na superfície de sementes de *Bixa orellana L.*, comumente conhecido como urucum. Ela tem coloração laranja-amarelado e é correntemente conhecida como “colorau” ou “colorífico”. Essa substância é amplamente utilizada na culinária brasileira e nas indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentícia (CAMARGO, 1985), sobretudo como corante alimentar em manteiga, queijos, salsichas, margarina, sorvete, cereais e outros produtos (MERCK INDEX, 2013; HALLAGAN et al., 1995). Na medicina popular brasileira, as sementes de *B. orellana* são usadas no preparo de poções “afrodisíacas” e “tratamento” de febres, inflamações, doenças parasitárias e diabete *mellitus* (CAMARGO, 1985).

A substância é uma molécula poli-insaturada caracterizada por um grupo carboxílico numa extremidade e um grupo metilester na outra, sendo naturalmente encontrada na sua forma *cis* (Figura 4-A), enquanto que a sua forma *all-trans* (Figura 4-C) pode ser obtida após aquecimento ou processamento químico (MERCK INDEX, 2013). A bixina é fotosensível, tal que a incidência de luz pode provocar mudança de isomeria (SCOTTER et al., 2009) e é um dos principais fatores relacionados com a sua degradação (NAJAR et al., 1988). Normalmente a forma *cis* também é

denominada de α-bixina ou bixina lábil, enquanto que a forma *trans* é denominada β-bixina, bixina estável ou isobixina (ZECHMEISTER e ESCUE, 1944). A norbixina é um derivado da hidrólise da região metil-éster, também podendo se apresentar na forma *cis* (Figura 4-B) ou *trans* (Figura 4-D), denominada de α-norbixina ou β-norbixina, respectivamente. Diferentemente da bixina, a nobixina é solúvel em água (MERCK INDEX, 2013).

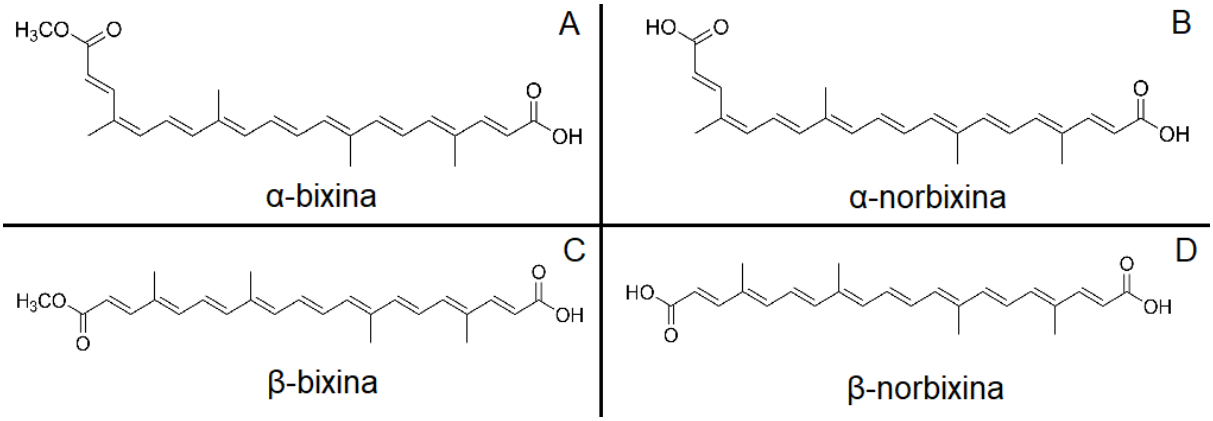

Figura 4 - Estrutura química de bixina e norbixina

Estudos da atividade antimicrobiana usando extratos de folhas (IROBI et al., 2008) ou de sementes (GALINDO-CUSPINERA et al., 2003; GALINDO-CUSPINERA e RANKIN, 2005) da *B. orellana* indicaram a inibição no crescimento de diversos micro-organismos, dentre os quais *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* etc, contudo pouca ou nenhuma atividade contra fungos.

A bixina é capaz de gerar sistemas carreadores micelares devido às suas características estruturais (uma longa cadeia poli-insaturada com uma região hidrofílica numa extremidade). Como apresentado por Kikuchi e colaboradores (2016), foi possível obter nanodispersões de bixina capazes de carrear anfotericina B. Essas dispersões apresentaram um efeito fungicida contra *C. albicans* nas primeiras 2 horas de interação, enquanto que formulações comerciais não demonstraram a mesma intensidade de efeito mesmo após 24 horas. No estudo desenvolvido por Takamoto e colaboradores (2015), nanodispersão de bixina apresentou boa estabilidade numa ampla faixa de pH e de concentração de cloreto de sódio. Ainda nesse estudo foram determinadas algumas propriedades físico-químicas da bixina e algumas características da sua nanopartícula, como diâmetro hidrodinâmico (73 a 103 nm) e potencial zeta (cerca de -24 mV).

1.4.1. – Atividade antioxidante

Estudos sobre a atividade antioxidante de bixina e norbixina foram realizados por serem moléculas poli-insaturadas. Kiokias e Gordon (2003) observaram que a norbixina é capaz de retardar a deterioração oxidativa de óleos ou de emulsões óleo em água, sendo que, em emulsões, ela é mais efetiva do que palmitato ascórbico, α-tocoferol, ácido ascórbico e outros carotenóides (bixina e β-caroteno).

Silva e colaboradores (2001) confirmaram o efeito antioxidante da bixina frente à cisplatina, substância capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica (OZKOK e EDELSTEIN, 2014), em ratos *Wistar*. Observou-se que a bixina reduziu o número de aberrações cromossômicas e de metáfases anormais e restaurou a concentração de glutationa reduzida ao nível próximo do controle. Em posteriores estudos *in vitro*, também utilizando bixina na presença de cisplatina, observaram-se menores taxas de ocorrência de aberrações cromossômicas (ANTUNES et al., 2005) e de genotoxicidade (DOS SANTOS et al., 2012).

Em outro estudo realizado em ratos *Wistar* (DE OLIVEIRA et al., 2014), tratados com 1,2-dimetilhidrazona para induzir estresse oxidativo, observou-se que a administração de bixina reduziu a genotoxicidade em hepatócitos, mas não em células do cólon. Realizando análise histopatológica do cólon, constatou-se que a bixina não conseguiu afetar esse tecido, detectando criptas aberrantes tanto em ratos tratados com bixina quanto em não-tratados. Concluiu-se que essa diferença de efeitos era devida á diferença de absorção, distribuição e metabolização entre os tecidos.

Moreira e colaboradores (2014) realizaram um estudo mais aprofundado sobre o efeito antioxidante da bixina. Ratos *Wistar* foram tratados com tetracloreto de carbono, causando estresse oxidativo principalmente no fígado. Consequentemente, observou-se aumento sérico de TGO e TGP e na concentração de malondialdeído, e redução na atividade de glutationaredutase e nas concentrações de NADPH e glutationa reduzida. O pré-tratamento com bixina conseguiu restaurar esses parâmetros para valores mais próximos ao controle. No estudo histopatológico, observou-se que o tetracloreto de carbono causou inflamação, necrose e degeneração hidrópica de hepatócitos, mas o pré-tratamento

com bixina preveniu parcialmente lesões severas. Moreira e colaboradores apontaram que o efeito protetor da bixina deve-se à sua atividade antioxidante.

1.4.2. – Toxicidade

Bautista e colaboradores realizaram dois estudos em ratos sobre a toxicidade da bixina. O primeiro estudo avaliou a toxicidade subaguda, administrando bixina por gavagem durante 28 dias (BAUTISTA et al., 2004a), e o segundo avaliou a toxicidade subcrônica, com administração de bixina por gavagem durante 90 dias (BAUTISTA et al., 2004b). Em ambos os casos os parâmetros bioquímicos, hematológicos, histopatológicos e anatômicos não apresentaram alterações que indicassem toxicidade.

Paumgartten e colaboradores (2002) apontam que o consumo de brasileiro de bixina é cerca de 150% maior do que o limite de consumo estipulado pela Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (0,065 mg/Kg de peso corpóreo). Nessa pesquisa administrou-se a maior quantidade possível de bixina em ratas grávidas, avaliando concomitantemente o efeito de superingestão e a teratogenicidade. As cobaias foram alimentadas com 500 mg de bixina/kg de peso corpóreo via gavagem entre os dias 6 a 15 da gestação. Não se observaram quaisquer sinais de toxicidade, perda de peso e anomalias anatômicas nas ratas ao longo da gestação. Os fetos não apresentaram anomalias anatômicas ou retardo no crescimento. Os resultados apontaram que o consumo de bixina é seguro durante a gestação, tanto para a gestante quanto para o feto. A alta ingestão de bixina também não gerou efeitos tóxicos. Ainda assim, estudos em outras espécies animais de maior porte são necessários para definir um limite de consumo.

1.4.3. – Efeitos em síndromes metabólicas

Buscando conhecer os efeitos da bixina contra a obesidade, Lima e colaboradores (2003) avaliaram o efeito da incorporação de bixina na dieta hiperlipidêmica de coelhos durante 28 dias. Encontrou-se que a bixina foi capaz de reduzir a concentração sérica de colesterol total, colesterol HDL, triacilglicerídeos, ácido úrico, TGO e TGP. Ureia, proteínas totais e cálcio não demonstraram variações significativas nas suas concentrações em comparação com controle.

Roehrs e colaboradores (2014) realizaram estudos para avaliar o efeito da bixina em ratos diabéticos durante 30 dias. Observou-se redução da glicemia e na concentração de frutosaminas (produtos da glicação de proteínas) com a administração de bixina. Observaram-se também aumento na concentração de HDL e prevenção do aumento sérico de triacilglicerídeos e de LDL. Interessantemente o efeito da bixina foi melhor do que a metformina, que não afetou o HDL, ou da insulina, que não agiu sob o LDL. Também se observou redução na concentração de EROs e aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase, glutationa redutase e tioredoxina redutase.

Pesquisando sobre o mecanismo de ação da bixina, Takahashi e colaboradores (2009) encontraram que essa substância ativava o receptor PPARγ em adipócitos 3T3-L1. Esses receptores nucleares são ativados por pequenos ligantes hidrofóbicos e estão presentes em tecidos com alta taxa de oxidação de ácidos graxos e de metabolismo peroxissomal. Sua ativação em adipócitos resulta na diferenciação dessas células, consequentemente aumentando o número de pequenos adipócitos, expressão de adiponectina e captação de glicose. Para expandir o conhecimento sobre esse mecanismo de ação, Goto e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da bixina em outras culturas celulares e em camundongos KK-Ay obesos e diabéticos. As culturas utilizadas foram células renais de macacos CV1 e células de hepatocarcinoma humano HepG2 modificadas para expressarem PPARα. No estudo *in vitro*, descobriu-se que a bixina ativava somente o receptor PPARα e não interferia na viabilidade celular. Em camundongos, a administração de bixina não afetou o peso corporal, tecido adiposo branco, fígado, baço e rins em comparação com o controle. Referente a efeitos no metabolismo de lipídeos, observou-se redução na concentração sérica e no acúmulo hepático de triacilgliceróis e aumento da expressão de mRNAs relacionados com PPARα no fígado. Referente a efeitos no metabolismo de carboidratos, observou-se redução na glicemia e na concentração de insulina e aumento na concentração de adiponectina. Em teste de tolerância à glicose, os camundongos alimentados com bixina apresentaram uma redução mais rápida da glicemia. Portanto a bixina foi capaz de mitigar sinais relacionados com a diabetes e obesidade mediante ativação do receptor PPARα.

1.4.4. – Outros efeitos biológicos

Jewell e colaboradores (1999) avaliaram o efeito de suplementação dietética por 16 dias de diferentes carotenoides, dentre eles a bixina, em sistemas metabolizadores de xenobióticos (glutationa-S-Transferase e citocromo P450) em diferentes tecidos. Relacionado com bixina, observou-se que ela não alterou a atividade da glutationa-S-transferase ou a concentração de glutationa reduzida, mas aumentou a atividade do sistema P450 no fígado, rins e, principalmente, pulmões, apesar de ter se acumulado principalmente no intestino delgado. A suplementação com carotenoides não alterou o peso corporal dos ratos ou de órgãos específicos. Os efeitos nos sistemas metabolizadores foram concentração dependente, apesar de sua intensidade variar dependendo do tecido ou órgão afetado. Os pesquisadores frisaram que a ativação do sistema P450 pode ser deletéria, que há diferenças metabólicas entre diferentes espécies e, portanto, mais estudos utilizando células humanas são necessários para avaliar o real efeito metabólico.

Um dos efeitos da dislipidemia é o aumento do risco de dano cardíaco. Com essa premissa, Xu e Kong (2017) avaliaram o efeito da bixina em células cardíacas *in vitro*, utilizando células cardíacas humanas tratadas com LPS para induzir fibrose, e *in vivo*, utilizando camundongos. Análises bioquímicas em camundongos demonstraram que a administração de bixina reduziu a concentração sérica de LDL colesterol, colesterol total, triacilgliceróis e malondialdeído, e aumentou a concentração de HDL colesterol e de superóxido dismutase de forma concentração dependente. Analisando o tecido cardíaco dos camundongos, observou-se que a bixina suprimiu a fibrose, evidenciado pela redução de seus marcadores. O mesmo foi observado na cultura de células cardíacas, além de não se observar citotoxicidade causada pela bixina. Realizando *western blot* e PCR de transcrição reversa, mostrou-se que a bixina estaria reduzindo a formação de EROs por ativação da via NRF2 e inibindo a inflamação por inativação da via NF-κB.

Semelhantemente, Tao e colaboradores (2016) notaram que a ativação da via NRF2 pela bixina apresentava efeitos benéficos em cobaias submetidas à ventilação mecânica, dado que esse procedimento causa distensão mecânica das vias aéreas e, consequentemente, inflamação. Testes foram realizados inicialmente em linhagens celulares, observando inocuidade da bixina nas culturas e a ativação da via NRF2. Realizou-se injeção intraperitoneal de 200 mg de bixina/kg de peso

corpóreo em camundongos, 72h antes de submetê-los à ventilação mecânica. Análises bioquímicas constataram ativação da via NRF2 e a inativação da via NF-κB. A análise histológica demonstrou que o pré-tratamento com bixina amenizou a resposta inflamatória e restaurou a morfologia normal do tecido pulmonar.

Matuo e colaboradores (2013) encontraram que a bixina estimulava a expressão dos citocromos (CYP) 1A1 e 1A2 pela ativação do sistema P450, mas não afetava CYP 2B6, 2C9, 2E1 e 3A4. A ação das CYPs 1A1 e 1A2 está relacionada com a resposta a xenobióticos carcinogênicos. Ensaio de viabilidade celular em células HepG2, demonstrou que a bixina afetava significativamente a viabilidade celular dessa linhagem, indicando efeitos anticancerígenos pela ativação desses citocromos. Em contrapartida, a norbixina não apresentou esse efeito indutor.

1.5. – Pullulan

O pullulan é um exopolissacarídeo que pode se apresentar na forma sólida como pó branco e quando em solução possui baixa viscosidade, não sendo afetado por calor, pH ou presença de íons metálicos. Este composto é considerado atóxico, não-mutagênico, inodoro, insípido, comestível e biodegradável. A estrutura química do pullulan consiste em monômeros de maltotriose (moléculas de glicose unidas por ligações α-1,4) unidos por ligações α-1,6 glicosídicas, possui peso molecular que varia de 45 a 600 kDa (Figura 5). Pullulan é uma base fraca, altamente solúvel em água, porém, insolúvel em álcool e outros solventes orgânicos, sofre decomposição a 250°C e carbonização a 280°C (SUTHERLAND, 1998; CATLEY et al., 1986; PRAJATI et al., 2013).

Pullulan é produzido principalmente pela espécie *Aureobasidium pullulans*, apesar de outras espécies também serem capazes de produzi-lo, como a *Tremalla mesenterica*, *Cyttaria hariotii* e *Rhodotorula bacarum* (SINGH et al., 2008). O *A. pullulans* é classificado como não patogênico, apesar de algumas cepas causarem problemas à saúde humana ou serem patogênico a plantas (CHENG et al., 2011).

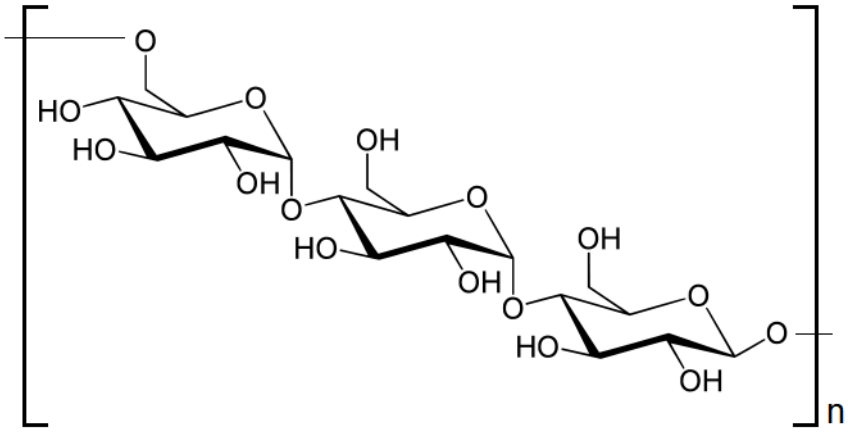

Figura 5 - Estrutura química do pullulan

O pullulan tem a capacidade de formar filmes finos impermeáveis a oxigênio e com propriedades adesivas (CHENG et al., 2011; SINGH et al., 2008). O composto é passível de modificações químicas que o tornam interessante para diversas aplicações, principalmente em áreas alimentícia, biomédica e farmacêutica (PRAJATI et al., 2013).

Devido a suas características atóxicas, não-irritante, boa solubilidade e viscosidade em água, capacidade de formação de filme e boa adesividade, o pullulan é muito interessante para ser utilizado em formulações cosméticas e farmacêuticas (NAKASHIO et al., 1976). O uso como agente mucoadesivo em formulações orais (NAGAR et al., 2011) ou oftálmicas (LUDWIG, 2005) consegue promover e/ou intensificar efeitos desejáveis.

Há estudos com aplicação de pullulan como carreador de fármacos (FUNDUEANU et al., 2008; GUPTA e GUPTA, 2004; MORIMOTO et al., 2005; KIM et al., 2003), vacinas (SUGINOSHITA et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 1985; SINGH et al., 2017) ou genes (HOSSEIKHANI et al., 2002; SAN JUAN et al., 2009) por meio de ligações covalentes ou interações intermoleculares, sendo possível regular sua hidrofobicidade e hidrofilicidade. Outra aplicação foi o carreamento de semicondutores nanométricos para geração de imagem e monitoramento de células ou tecidos (HASEGAWA et al., 2005). As modificações químicas permitem o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármaco, que podem ser dependentes de pH, temperatura ou características particulares do tecido ou órgão que se deseja atingir (FUNDUEANU et al., 2008). Também é possível utilizar o pullulan como excipiente de medicamentos, cosméticos e alimentos, com a função

de, por exemplo, estabilizante de emulsões (YAMAGUCHI e SUNAMOTO, 1991; HIJIYA e SHIOSAKA, 1974).

A capacidade de formação de filme pode ser utilizada para proteger alimentos contra oxidação, e em medicamentos e formulações, reduzir mudança de coloração, aumentar resistência a impactos e, assim, prolongar o tempo de prateleira (MIYAMOTO et al., 1986; HAYAKAWA et al., 2011).

Na área alimentícia, o pullulan é muito utilizado como aditivo alimentar, apresentando funções variadas e diversificadas. Ele pode agir como agente de massa em bebidas e molhos, estabilizante de maionese e melhorador de farinha (CHENG et al., 2011; SINGH et al., 2008), além de poder substituir amido e ter ação prebiótica em bifidobactérias (MITSUHASHI et al., 1990). Particularmente, o pullulan pode ser utilizado no desenvolvimento de alimentos dietéticos para pessoas diabéticas ou para pacientes com baixa tolerância à glicose, dado que as enzimas humanas gradualmente o convertem em glicose (WOLF et al., 2005; HIJIYA e SHIOSAKA, 1975).

Existem ainda outras possíveis aplicações para pullulan:

-Substituto do plasma: frações de pullulan entre 30 e 90 kDa podem ser utilizadas como substituto de plasma. Frações maiores que 150 kDa aumentam a pressão venosa do paciente, enquanto que frações de baixo peso molecular são rapidamente depuradas do organismo. Modificações com grupos carbonila ou carboxila aumentam a resistência a enzimas de degradação (PRAJATI et al., 2013; CHENG et al., 2011; IGARASHI et al., 1983; KULICKE e HEIZE, 2005);

- Área ambiental: o pullulan tem a capacidade de remover metais pesados, devido a sua adesividade (BREIEROVA et al., 2002; RADULOVIC et al., 2008), ou atuar como um agente de floculação, devido a suas propriedades poliméricas (ZAJIC e LEDUY, 1979);

-Cromatografia: o pullulan pode ser modificado quimicamente e apresentar diferentes tamanhos, viabilizando a elaboração de géis com diferentes propriedades cromatográficas (MOTOZATO et al., 1986). As diferentes frações de pullulan podem ser usadas como padrões de cromatografia (KAWAHARA et al., 1984);

Uma recente aplicação do pullulan tem sido na química verde, na produção de nanopartículas. O uso de pullulan puro ou de pullulan modificado com grupos funcionais se mostrou promissor como agente redutor, estabilizante e de

revestimento para a produção de nanopartículas sólidas (LAKSEE et al., 2018; GANESHKUMAR et al., 2014; COSERI et al., 2015, LAKSEE et al., 2017; NEOSUWAN et al., 2018; KRULL et al., 2016; KANAMANI e LIM, 2013). Alguns desses sistemas nanoparticulados foram capazes de carrear fármacos e aprimorar o efeito dos mesmos (LAKSEE et al., 2018; GANESHKUMAR et al., 2014; LAKSEE et al., 2017; NEOSUWAN et al., 2018).

Na pesquisa de Ferreira e colaboradores (2015), pullulan foi utilizado na preparação de nanoemulsões contendo óleo de semente de romã e cetoprofeno. Foi realizada comparação com nanopartículas sólidas e a presença de pullulan não afetou a atividade antitumoral do fármaco contra células malignas de glioma nem a viabilidade de fibroblastos normais. Ainda nessa pesquisa, as nanoemulsões se mostraram compatíveis com administração intravenosa, segundo o teste de hemólise realizado. Krull e colaboradores (2016), além de utilizarem pullulan como estabilizante na produção de nanopartículas, também o utilizaram com glicerina e goma xantana para a produção de filmes hidrossolúveis de nanopartículas de griseofulvina.

1.6. – Trealose

A trealose é um dissacarídeo composto por duas moléculas de D-glicose unidas por uma ligação α,α-1,1 (RICHARDS et al., 2002; HIGASHIYAMA, 2002; ELBEIN et al., 2003; GODDIJN e VAN DUN, 1999; ROSER, 1991), apresenta estabilidade em uma ampla faixa de pH (3,5 a 10) e em altas temperaturas (solução 4% de trealose não foi degradada quando aquecida a 100 °C durante 24 horas) (HIGASHIYAMA, 2002). O composto apresenta dois pontos de fusão, sendo que a 97 °C ocorre a primeira fusão e com aquecimento adicional, a água de cristalização é expulsa da estrutura, seguida de ressolidificação a 130 °C e então, na forma anidra, trealose sofre segunda fusão a 203 °C (RICHARDS et al., 2002).

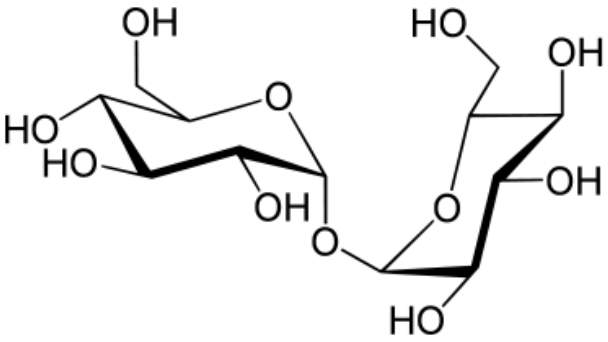

Figura 6 - Estrutura química da trealose

Trealose pode ser encontrada em plantas, bactérias, fungos e insetos, sendo produzido constitutivamente ou somente em certas etapas do desenvolvimento (RICHARDS et al., 2002; HIGASHIYAMA, 2002; ELBEIN et al., 2003; GODDJIN e VAN DUN, 1999; ROSER, 1991). Sua biossíntese geralmente ocorre pela ação de duas enzimas: a trealose-6-fosfato sintetase e a trealose-6-fosfato fosfatase (Figura 7-A) (CABIB e LELOR, 1958). No estudo realizado por Lapp e colaboradores (1971), observou-se que trealose-6-fosfato sintetase altamente purificada de *Mycobacterium smegmatis* conseguia usar outros substratos (GDP-glicose, ADP-glicose, CDP-glicose e TDP-glicose) como doadores de glicose. O substrato consumido na biossíntese de trealose depende do organismo que a produz, dado que outros organismos normalmente utilizam um número limitado de nucleotídeos glicosados (ELBEIN et al., 2003). Existem sínteses alternativas de trealose, como a via da trealose sintetase (Figura 7-B) (NISHIMOTO et al., 1996) ou a via da malto-oligotrealose sintetase e trealohidrolase (Figura 7-C) (MARUTA et al., 1996).

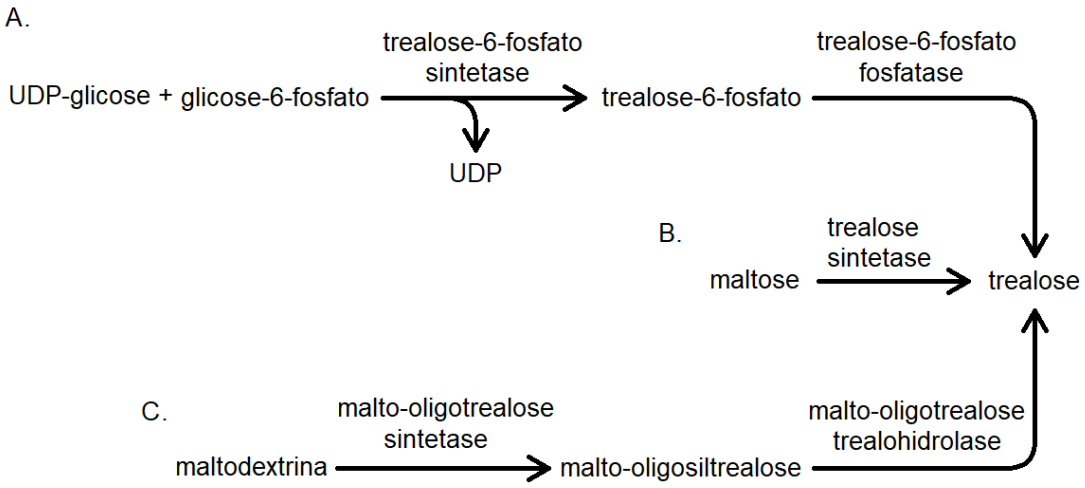

Figura 7 - Biossíntese da trealose

A metabolização da trealose pode ocorrer por diferentes enzimas, sendo que a mais relevante é a trealase, uma enzima encontrada no túbulo proximal renal e no intestino de humanos, e capaz de hidrolisar a trealose em duas moléculas de glicose (RICHARDS et al., 2002; ELBEIN et al., 2003). Murray e colaboradores (2000) reportaram que a atividade enzimática normal desta enzima varia entre 4,8 a 37,1 U/g a partir de biopsias do duodeno inferior de 400 pacientes, onde 369 apresentavam uma histologia normal.

Segundo Richards e colaboradores (2002), a trealose não apresentou efeitos mutagênicos ou genotóxicos pelo teste de Ames ou por ensaios clastogênicos (busca por alteraçõs cromossômicas ou formação de micronúcleo). Eles também apontaram que a ingestão de trealose como macronutriente não provocou efeitos tóxicos, embriotóxicos, teratogênicos ou relacionados com a reprodução em ratos, camundongos e coelhos. Nos testes realizados por Oku e Okazaki (1998), onde voluntárias ingeriram doses de 30, 40, 50 e 60 g de trealose, calculou-se que seu limiar laxativo seria de 0,65 g/kg de peso corpóreo (menor do que o limiar da lactose, de 0,28 g/kg de peso corpóreo). A administração crescente de doses de trealose causou um consequente aumento na ocorrência de sintomas gastrointestinais (vômito, náusea, desconforto, flatulência, distensão abdominal, borborigmo, tenesmo, dor abdominal superior e/ou inferior), de modo que o voluntariado foi dispensado da dose seguinte com o aparecimento de diarréia. Tais sintomas foram mitigados dividindo-se as doses ao longo do dia, permitindo uma maior ingestão diária do dissacarídeo.

As aplicações da trealose abrangem desde o desenvolvimento de medicamentos, cosméticos e produtos alimentícios até uso médico-veterinário. A trealose pode ser usada como excipiente de medicamentos, dado sua alta solubilidade e boa taxa de dissolução em água, compatibilidade com diversos reagentes e capacidade de estabilizar os mesmos, reprodutibilidade na produção de comprimidos e ser passível de liofilização (BOLLIN e FLETCHER, 1988). Ela tem a capacidade de manter a estabilidade de estruturas protéicas e lipídicas em condições de baixa atividade de água, isto é, essa substância mantém a estabilidade de moléculas que são submetidas a processos de congelamento-descongelamento ou desidratação-reidratação (CROWE et al., 1984; CROWE et al., 1998). Portanto,

apresenta aplicabilidade na criopreservação (AHMAD e AKSOY, 2012), liofilização (CARPENTER et al., 1997) e desenvolvimento de alimentos desidratados (ROSER, 1991). Outra propriedade interessante é o seu efeito antioxidante, útil para inibir a formação de aldeídos que podem promover cheiros indesejados (HIGASHIYAMA, 2002), proteção contra raios UVB (ČEJKOVÁ et al., 2010) e preservação de biomoléculas (BENAROUDJ et al., 2001).

Tendo em vista a versatilidade do pullulan e da trealose, este projeto teve como objetivo utilizar esses compostos para desenvolver e aprimorar preparações de bixina com os antifúngicos anteriormente citados, avaliando aspectos físico-químicos e sua eficácia antimicrobiana frente a *Candida albicans*.

2 – OBJETIVOS

Desenvolver e avaliar preparações de anfotericina B e/ou cetoconazol em nanodispersões de bixina, na presença de pullulan e /ou trealose.

2.1. – Objetivos específicos

-Desenvolver preparações de anfotericina B e/ou cetoconazol em bixina com pullulan e/ou trealose;

-Avaliar a eficácia antimicrobiana de cada preparação utilizando *Candida albicans* ATCC 10231 como micro-organismo teste;

-Realizar estudos de estabilidade de cada preparação e avaliar por ensaios físico-químicos.

3 – MATERIAL

Bixina utilizada no trabalho foi gentilmente cedida pela empresa CORANTEC Corantes Naturais Ltda. na forma de matéria-prima pó. Pullulan e trealose foram cedidos na forma de matéria-prima, grau cosmético pela Nagase & Company Ltda. Os antifúngicos anfotericina B e cetoconazol sob forma de matéria-prima foram doados pela Cristália Produtos Quimicos e Farmacêuticos.

Todas as análises espectrofotométricas foram realizadas no equipamento Evolution™201 UV-Visible Spectrophotometer da marca Thermo Scientific.. Análises de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano (Malvern).

Reagentes e solventes foram todos de grau analítico. A água utilizada nas preparações foi obtida por sistema de filtração por osmose reversa e por ultrafiltração.

Utilizou-se a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 como micro-organismo teste para os ensaios microbiológicos. O meio de cultura utilizado foi o Sabourand Dextrose Agar, marca Difco (Detroit, USA).

4 – MÉTODOS

4.1. – Determinação de teor de bixina

O teor de bixina foi determinado por método espectrofotométrico conforme Yabiku e Takahashi (1992). Resumidamente, amostras de bixina reagiram com solução de KOH 5% na proporção de 1:10, promovendo a conversão da bixina em norbixina. Essa solução foi diluída em água na proporção 1:10 e sua absorbância foi determinada em 453 nm pelo espectrofotômetro Evolution 201 UV-Vis, utilizando solução de KOH 0,5% como branco. Para cálculo de norbixina foi utilizado E1% = 2850 (FERREIRA et al., 1999) e depois, realizada conversão para massa de bixina.

4.2. – Preparo de dispersões de bixina

O preparo das dispersões de bixina é baseada na técnica de Batzri e Korn (1973). Solução etanólica contendo bixina foi adicionada gota a gota em água, sob agitação, na proporção 1:10 e à temperatura ambiente. Amostras que continham antibiótico (anfotericina B ou cetoconazol) foram preparadas misturando solução etanólica de bixina com solução do fármaco em DMSO:etanol (a proporção de DMSO e etanol variou dependendo da concentração de antifúngico que se desejava alcançar nas amostras), seguido de adição gota a gota em água, sob agitação, na proporção 1:10 e à temperatura ambiente.

4.3. – Influência de pullulan (PL) nas características físico-químicas de dispersões de bixina (BX) contendo anfotericina B (AnB)

Foram preparadas soluções etanólicas de AnB 400 µg/mL e de BX 2,0 mM, e a partir destas, foram obtidas as amostras a seguir:

- BX, 0,1 mM em água;
- AnB 10 µg/mL (10,8 µM) em água;

- AnB 10 µg/mL em etanol;
- AnB 10 µg/mL + BX 0,1 mM em água;
- AnB 10 µg/mL + PL 2,5% + BX 0,1 mM em água.

O pullulan foi incorporado às preparações, solubilizando-se a devida massa às dispersões. Realizou-se avaliação espectrofotométrica na faixa de comprimento de onde de 300 a 600 nm para todas as amostras citadas, utilizando água ou etanol como branco, conforme as amostras. Também foram realizadas medições do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) e carga (potencial zeta) destas amostras.

4.4. – Influência do procedimento de incorporação de pullulan às dispersões de bixina segundo tempo de estabilização de partículas

Foram preparadas 6 amostras:

- dispersão de BX em repouso por período de 12-18 horas (overnight);
- dispersão de BX preparada 2 horas antes da análise;
- PL solubilizado em dispersão de BX overnight;
- PL solubilizado em dispersão de BX preparada 2 horas antes da análise;
- BX dispersa em solução de PL e overnight;
- BX dispersa em solução de PL preparada 2 horas antes da análise.

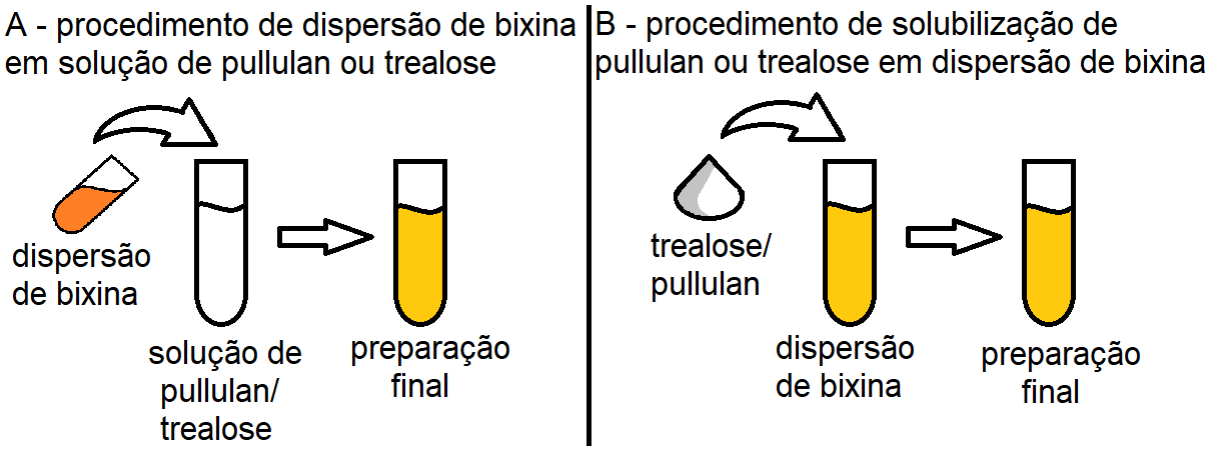

Figura 8 - Método de incorporação de pullulan ou trealose nas preparações a partir de bixina

Primeiramente, as 6 amostras foram preparadas com concentração de BX 10 µM e PL 2,5% e submetidas a determinação de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.

Posteriormente, as 6 amostras foram preparadas com concentração de BX 15 µM e PL 2,5%, determinando-se também o diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta. Após 24 horas os mesmos parâmetros foram reavaliados.

4.5. – Efeito do pullulan ou trealose e seu procedimento de incorporação em preparações submetidas a processos de esterilização

Amostras de BX 0,02 mM e AnB 10 µg/mL (10,8 µM), contendo ou não PL 2,5% ou TR 2,5%, foram elaboradas para avaliar se os processos de autoclavação ou filtração afetariam a estabilidade das mesmas.

A incorporação de pullulan ou de tralose seguiu o procedimento das figuras 8-A ou 8-B, uma vez que a metodologia poderia afetar o comportamento das amostras perante os processos de esterilização.

Todas as amostras foram submetidas à análise de seus espectros e teor por método espectrofotométrico com varredura na faixa de 300 a 600 nm, utilizando água como branco. Os resultados foram comparados e analisados segundo o processo de esterilização, presença de pullulan ou trealose e metodologia de incorporação de pullulan ou trealose.

O teor de bixina foi determinado em todas as amostras para avaliar como cada variável influenciou na sua concentração.

4.6. – Influência da concentração de pullulan na estabilidade de preparações de bixina submetidas ou não a estresse térmico

Foram preparadas as seguintes amostras:

- PL 0,5% (1),
- PL 1,0% (2),
- PL 2,5% (3),
- BX 0,2 mM (4),
- BX 0,2 mM + PL 0,5% (5),
- BX 0,2 mM + PL 1,0% (6),
- BX 0,2 mM + PL 2,5% (7).

Triplicatas de cada amostra foram submetidas a 121ºC, pressão de 1 atm por 20 minutos (AC) e comparadas com amostras controle que não foram submetidas a estresse térmico (NE).

Foi determinado teor de bixina em todas as amostras submetidas ou não à autoclavação, utilizando método espectrofotométrico. Estas mesmas amostras foram armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz e depois de 2 meses, reavaliadas.

4.7. – Avaliação físico-química de preparações de bixina (BX) com cetoconazol (KT)

Prepararam-se soluções-mãe de KT 400 μM e BX 2 mM, para obtenção das seguintes dispersões aquosas:

- KT 10 μM;
- BX 0,1 mM;
- KT 10 μM + BX 0,1 mM.

Realizou-se espectrofotometria de varredura na faixa de 200 a 600 nm para a amostra KT 10 μM e de 300 a 600 nm para as demais amostras, utilizando água como branco. Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta foram mensurados para todas as amostras.

Estudo de cinética de agregação foi realizada por método espectrofotométrico, com medições de absorbância em 400 nm e num período de 0 a 30 minutos, em intervalos de 30 segundos e utilizando água como branco.

4.8. – Avaliação físico-química de preparações de bixina (BX) e cetoconazol (KT) com pullulan (PL) ou trealose (TR)

A partir de soluções-mãe de BX 400 μM em etanol e KT 200 μM em DMSO:etanol (1:3), foram preparadas as seguintes amostras:

- BX 20 μM (1),
- KT 10 μM (2),
- KT 10 μM + PL 2,5% (3),
- KT 10 μM + TR 2,5% (4),
- KT 10 μM + BX 20 μM(5),
- KT 10 μM + BX 20 μM + TR 2,5% (6)
- KT 10 μM + Bx 20 μM + PL 2,5% (7).

Trealose ou pullulan foram incorporados às preparações, dispersando-se as devidas concentrações de BX, KT ou BX + KT em soluções de PL 2,5% ou de TR 2,5%.

Cada amostra foi submetida à determinação de diâmetro hidrodinâmicoe potencial zeta, e espectrofotometria de varredura de 300 a 600 nm, utilizando água como branco.

4.9. – Determinação de cetoconazol em preparações de bixina com pullulan

Realizaram-se testes para avaliar a aplicabilidade da metodologia de doseamento de cetoconazol desenvolvida por Rubim e colaboradores (2012) nas preparações contendo o fármaco.

Prepararam-se soluções-mãe de KT 100 µg/mL em HCl 0,1 M ou em etanol para obter soluções padrões nas concentrações de 2, 4, 6 e 10 µg/mL (3,8 µM, 7,5 µM, 11,3 µM e 18,8 µM, respectivamente), diluindo-os nos seus respectivos solventes (HCl 0,1 M ou etanol). Foi realizada espectrofotometria de varredura de 200 a 300 nm para as solução com concentração de 6 µg/mL. Determinaram-se os melhores comprimentos de onda para mensurar a absorbância de cetoconazol das amostras e das soluções padrões, dependendo do solvente utilizado. Mediu-se a absorbância das soluções padrões e construíram-se as curvas padrões.

A partir das soluções-mãe de KT 100 µg/mL em DMSO: etanol (1:1) e de BX 0,8 mM em etanol preparam-se as amostras de KT 5 µg/mL (9,4 µM) (1), KT 5 µg/mL + PL 1% (2), KT 5 µg/mL + BX 40 µM (3) e KT 5 µg/mL + BX 40 µM + PL 1% (4). O pullulan foi incorporado às preparações dispersando cetoconazol ou mistura de bixina e cetoconazol em solução de PL 1%.

Diluiu-se 1 mL de cada amostra em 9 mL de HCl 0,1 M ou em etanol para realizar a resolubilização do cetoconazol. As amostras resolubilizadas foram submetidas à espectrofotometria de varredura de 200 a 300 nm, utilizando os respectivos solventes de solubilização como branco. Determinou-se a absorbância no comprimento de onda de 222 nm para amostras em HCl 0,1 M, ou no comprimento de onda de 243 nm para amostras em etanol. Devido à insolubilidade do pullulan em etanol, as amostras que o continham passaram por filtração antes de serem analisadas.

4.10. – Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras sob forma de dispersões de bixina

4.10.1 – Avaliação da inibição da proliferação de *C. albicans* pelo método de difusão em ágar

Para avaliar a atividade antimicrobiana, prepararam-se amostras sob forma de nanodispersões de bixina (6,6 µM) contendo 10 µg/mL de cetoconazol ou anfotericina B (18,8 µM ou 10,8 µM, respectivamente) em glicose 5%, pullulan 1% ou trealose 1%. Diluiu-se suspensão de *Candida albicans* ATCC 10231 em meio SDA estéril na proporção 1:100 e 12 mL do meio inoculado foram distribuídos em placas de Petri. Templates antimicrobianos de inox com 6 poços (diâmetro de 6 mm e capacidade para volume até 100 µL) foram transferidos para a superfície dos meios inoculados solidificados. Volumes de 50 µL de cada amostra foram transferidos para cada um dos poços em 11 réplicas (n = 11) e a seguir, submetidos a pré-difusão por 2 horas. Após este período, as amostras foram incubadas em estufa a 30 ºC por 24 horas. Diâmetros dos halos de inibição formados foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Todos os materiais passaram por esterilização previamente ao experimento e os procedimentos ocorreram em condições assépticas.

4.10.2. – Avaliação da inibição da proliferação de *C. albicans* pelo método de contagem de micro-organismos viáveis por plaqueamento *pour plate*

Todos os ensaios foram realizados com materiais previamente esterilizados e em condições assépticas.

As amostras da Tabela 1 foram preparadas conforme esquema constante na Figura 9 e o protocolo do Apêndice.

Tabela 1 - Amostras para contagem de microrganismos viáveis por plaqueamento *pour plate*

Amostras	BX em água	BX em pullulan	água
DMSO 0,5%	**+**	-	-
AnB 5,0 µg/mL	**+**	-	-
AnB 2,5 µg/mL	**+**	-	-
AnB 1,0 µg/mL	**+**	-	-
KT 20,0 µg/mL	**+**	-	-
KT 10,0 µg/mL	**+**	-	-
DMSO 0,5%	-	**+**	-
AnB 5,0 µg/mL	-	**+**	-
AnB 2,5 µg/mL	-	**+**	-
AnB 1,0 µg/mL	-	**+**	-
KT 20,0 µg/mL	-	**+**	-
KT 10,0 µg/mL	-	**+**	-
DMSO 0,5%	-	-	**+**
AnB 5,0 µg/mL	-	-	**+**
AnB 2,5 µg/mL	-	-	**+**
AnB 1,0 µg/mL	-	-	**+**
KT 20,0 µg/mL	-	-	**+**
KT 10,0 µg/mL	-	-	**+**

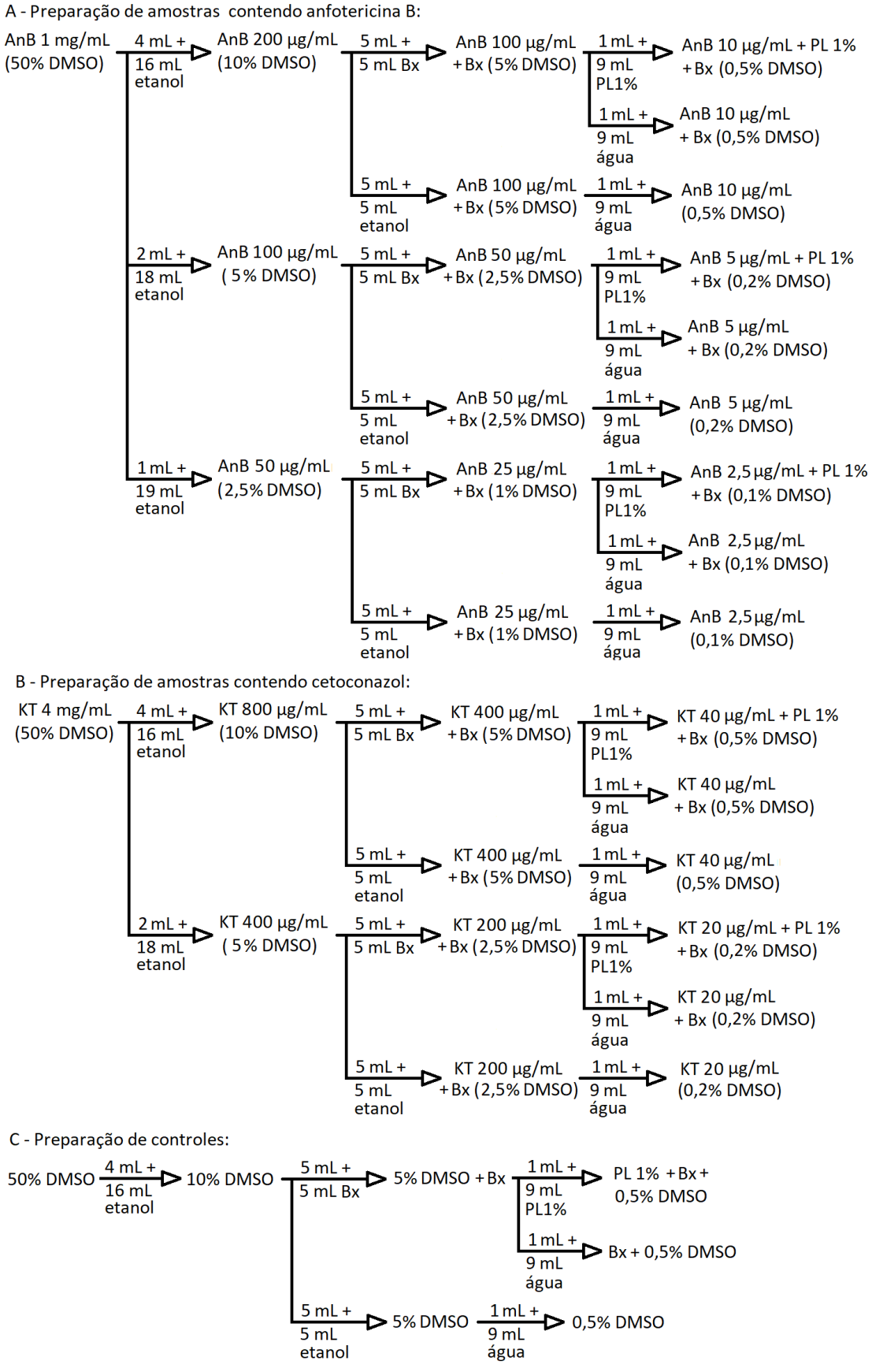

Figura 9 - Fluxograma de preparação de amostras para contagem de micro-organismos por plaqueamento *pour plate*

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. – Influência do procedimento de incorporação de pullulan às dispersões de bixina segundo o tempo de estabilização de partículas

Para avaliar o efeito do método de incorporação de pullulan nas preparações, foram realizados ensaios com variação nas etapas de incorporação deste polissacarídeo, concentrações e tempos para estabilização das amostras. Para esta avaliação, foram realizadas medições de diâmetro hidrodinâmico e de potencial zeta.

Observa-se nas Tabelas 2 e 3, que a presença de pullulan aumentou o diâmetro hidrodinâmico e tornou menos negativa a carga líquida (potencial zeta) das preparações. Também em ambas as tabelas, observou-se que o tempo de estabilização das partículas (2h ou overnight) não influiu significativamente nesses parâmetros.

Nas Tabelas 2 e 3, para BX 10 e 15 μM, o potencial zeta de preparações sem pullulan ficaram em torno de -16 a -23 mV, enquanto, na presença do polissacarídeo, esse valor passou para -7,0 a -10,0 mV.

Tabela 2 - Efeito do modo de preparo das nanodispersões de bixina nas suas características físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta)

	BX 10 μM		BX 15 μM	
Parâmetros / Amostras	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial zeta (mV)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial zeta (mV)
BX em água (overnight)	116,0 ± 6,5	-23,4 ± 1,8	181,1 ± 9,2	-16,3 ± 1,6
BX em água (2h)	109,2 ± 6,4	-26,1 ± 1,9	173,8 ± 5,3	-19,7 ± 2,5
BX em água (overnight) + PL 2,5% (2h)	410,3 ±12,6	-7,8 ± 0,7	677,6 ± 15,8	-7,4 ± 0,8
BX em solução de PL 2,5% (overnight)	519,2 ± 90,3	-9,2 ± 2,1	602,5 ± 89,9	-7,9 ± 0,8
BX em água (2h) + PL 2,5% (2h)	445,1 ± 125,9	-10,4 ± 0,6	684,2 ± 27,0	-7,7 ± 0,4
BX em solução de PL 2,5% (2h)	506,3 ± 88,6	-10,1 ± 1,7	561,5 ± 39,6	-8,4 ± 1,2

Pela Tabela 3, observa-se que tanto o diâmetro hidrodinâmico quanto o potencial zeta se mantiveram no período de 24h, demonstrando estabilidade das preparações.

Tabela 3 - Estudo de estabilidade de bixina (15 µM) no período de 24 horas

	T = 0		T = 24h	
Parâmetros / Amostras	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial zeta (mV)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial zeta (mV)
BX em água (overnight)	181,1 ± 9,2	-16,3 ± 1,6	176,7 ± 3,9	-14,8 ± 0,8
BX em água (overnight) + PL 2,5% (2h)	677,6 ± 15,8	-7,4 ± 0,8	658,7 ± 7,0	-8,6 ± 0,8
BX em solução de PL 2,5% (overnight)	602,5 ± 89,9	-7,9 ± 0,8	580,8 ± 33,8	-7,8 ± 0,6
BX em água (2h)	173,8 ± 5,3	-19,7 ± 2,5	177,3 ± 3,3	-20,1 ± 0,6
BX em água (2h) + PL 2,5% (2h)	684,2 ± 27,0	-7,7 ± 0,4	713,7 ± 39,2	-8,1 ± 0,3
BX em solução de PL 2,5% (2h)	561,5 ± 39,6	-8,4 ± 1,2	576,0 ± 66,3	-8,8 ± 0,7

5.2. – Efeito do pullulan ou trealose em preparações submetidas a processos de esterilização

Conforme Figura 10, o processo de autoclavação resultou em alterações mais significativas que a filtração esterilizante quando os espectros na região do visível das amostras submetidas a estes processos foram comparadas. A alteração que a autoclavação provocou foi mais intensa para a amostra de BX 20 µM + PL 2,5%, enquanto preparação filtrada manteve o mesmo aspecto que a não-esterilizada (controle).

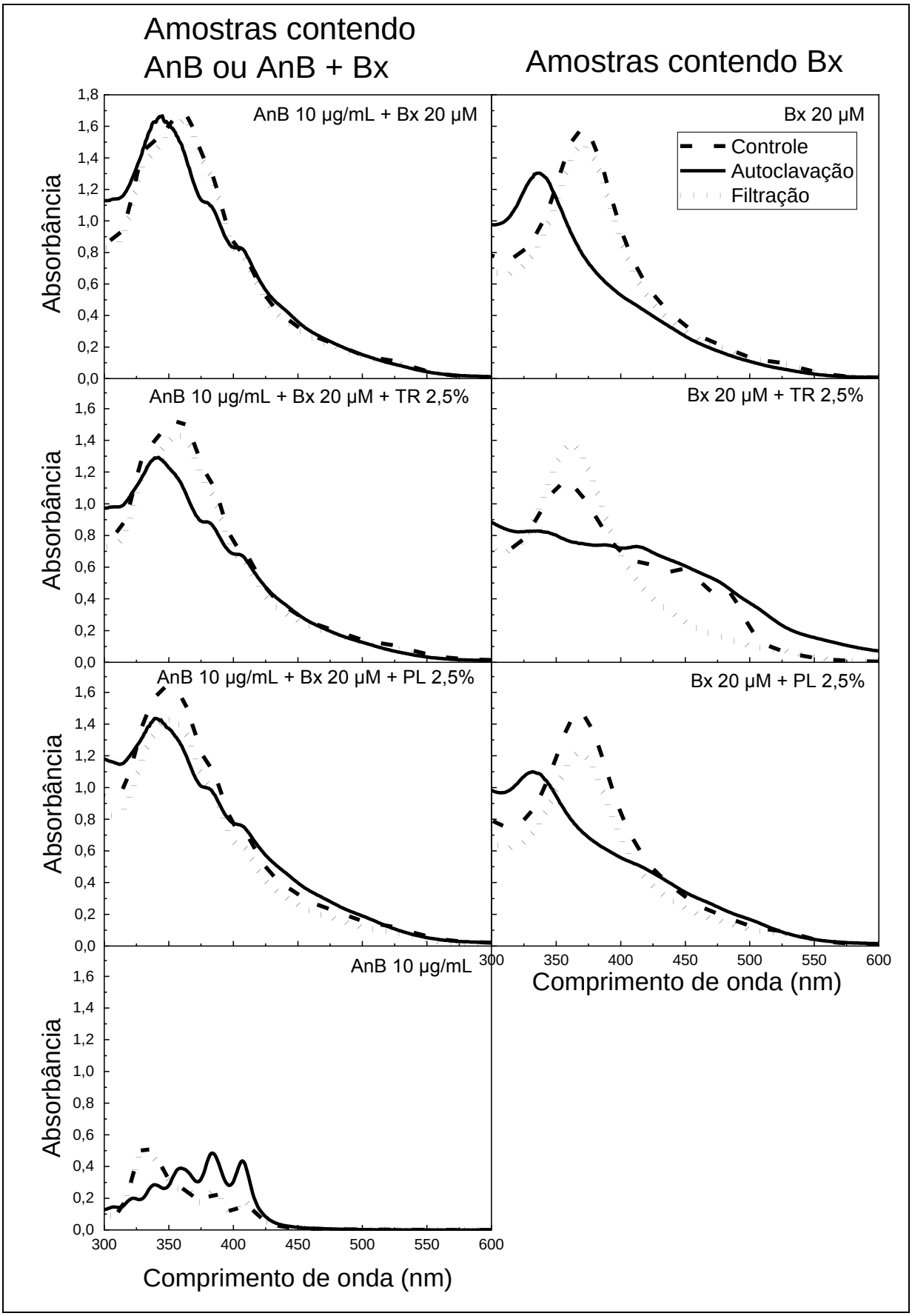

Figura 10 - Efeitos da autoclavação ou filtração em amostras de bixina ou bixina + anfotericina B

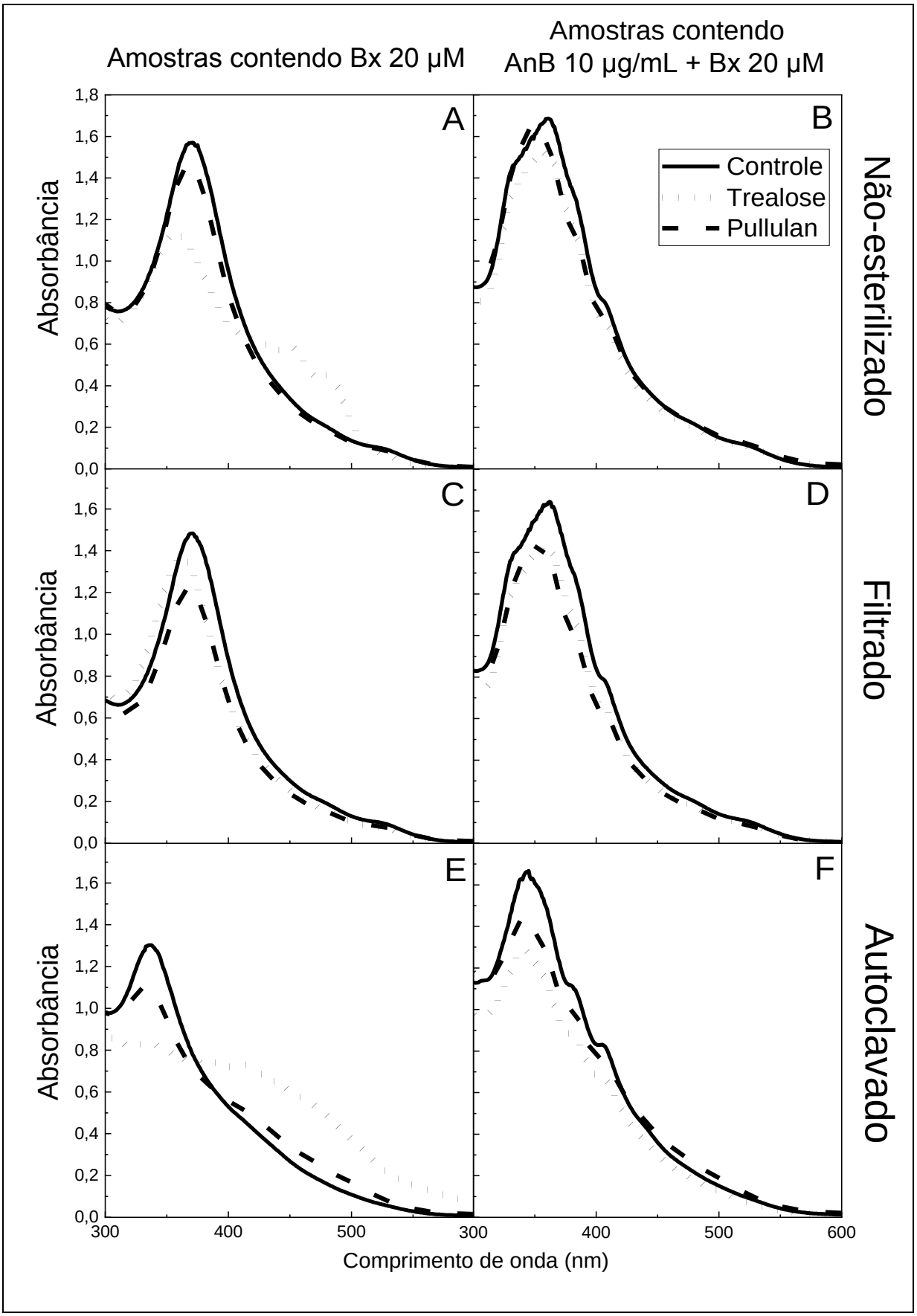

Figura 11 - Efeito do pullulan ou trealose em amostras de bixina ou bixina + anfotericina B submetidas a diferentes processos de esterilização

Pela Figura 11, pode-se observar uma redução nos valores de absorbância para amostras contendo pullulan ou trealose nas dispersões de bixina. Quando estas amostras foram filtradas, parece ter havido retenção de BX e anfotericina B na membrana, apesar não ter sido perceptível. O tamanho do poro da membrana de celulose foi de 0,20 µm e eventuais partículas podem ter sido retidas, apesar de não perceptíveis a olho nu. Nesta mesma figura, também foi possível observar que amostras com pullulan foram mais estáveis que aquelas com trealose quando autoclavadas, indicando que trealose parece sofrer alteração com calor úmido.

Pelas Figuras 12 e 13, podem ser verificadas diferenças nas preparações em que bixina foi dispersa em soluções de polissacarídeos (método A) ou quando estes foram posteriormente adicionados em preparações aquosas de bixina (método B). Essas diferenças podem ser atribuídas a estruturas de bixina que se formam, isto é, quando previamente preparadas em água, moléculas de bixina se auto-associam como novas partículas e acomodam água em seu interior. Quando solução etanólica de BX é adicionada a soluções aquosas de pullulan ou trealose, o conteúdo interno também será polissacarídeo. Quando partícula de BX estiver formada e pullulan ou trealose são adicionados depois, o que se esperava era a entrada de água para equilíbrio osmótico, ocasionando aumento no tamanho das partículas, como observado ao medir tamanho (diâmetro hidrodinâmico). Quando as preparações são submetidas à autoclavação, todos os elementos são passíveis de degradação por calor, podendo ocasionar a redução em seus teores.

Por outro lado, o aumento de valores de absorbância (Tabela 4) durante determinação de BX em presença de trealose ou pullulan, pode ser atribuído a reação de Maillard durante processo de autoclavação e devido a amarelecimento dos polissacarídeos, apesar da bixina sozinha torna-se mais clara. Portanto, cuidado é necessário durante as análises dos componentes e novos estudos devem ser realizados para desenvolvimento de métodos mais precisos.

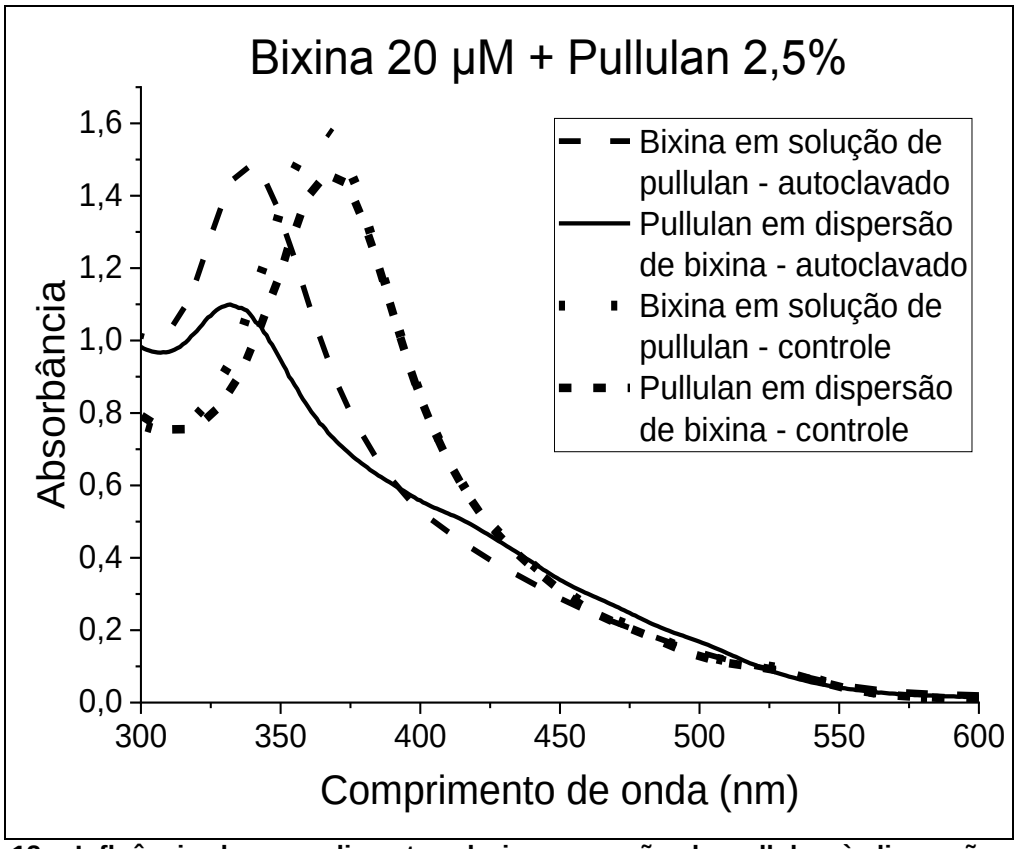

Figura 12 - Influência de procedimentos de incorporação de pullulan à dispersão de bixina após processo de esterilização por autoclavação

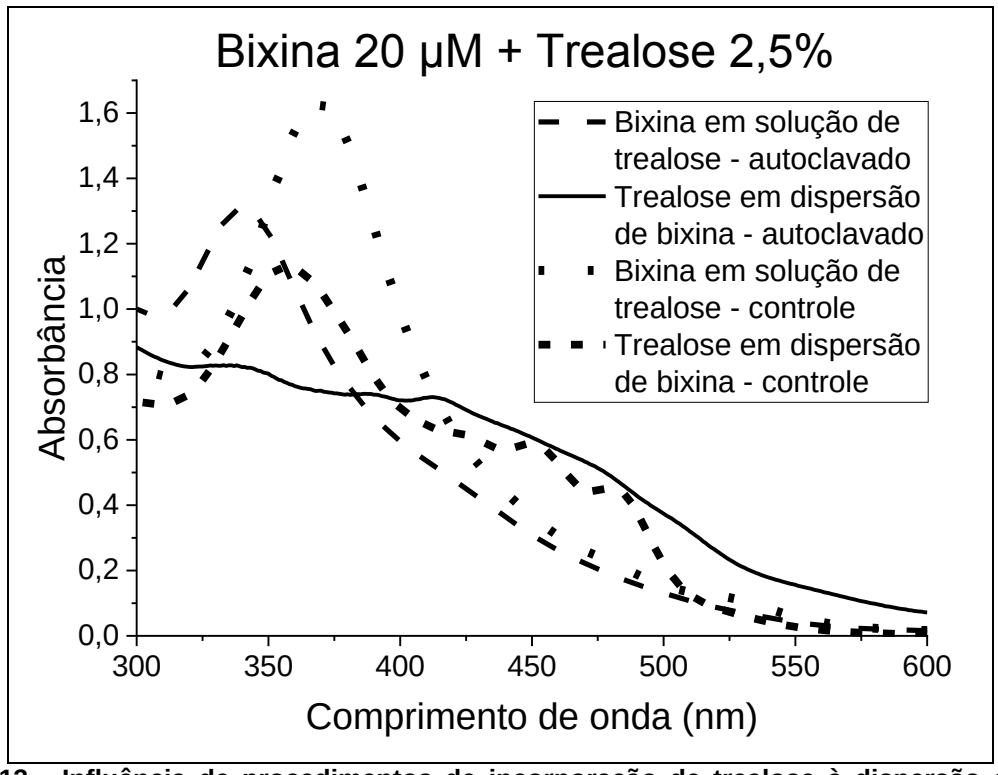

Figura 13 - Influência de procedimentos de incorporação de trealose à dispersão de bixina após processo de esterilização por autoclavação

Tabela 4 – Efeito dos processos de esterilização (filtração ou autoclavação) nas nanodispersões de bixina, considerando diferentes métodos dessas preparações (com ou sem pullulan ou trealose).

	Concentração de Bixina nas amostras (%)	
Amostras	2,5 % de trealose ou pullulan solubilizado em dispersão de bixina	Bixina dispersa em solução 2,5% de trealose ou pullulan
Bixina	100% (0,017 mM)	100% (0,026 mM)
Bixina filtrada	100%	n.d.
Bixina autoclavada	88,2%	57,7%
Bixina + 2,5% trealose	100% (0,013 mM)	100% (0,019 mM)
Bixina + 2,5% trealose filtrada	115%	n.d.
Bixina + 2,5% trealose autoclavada	184%	215,8%
Bixina + 2,5% pullulan	100% (0,017 mM)	100% (0,021 mM)
Bixina + 2,5% pullulan filtrada	100%	n.d.
Bixina + 2,5% pullulan autoclavada	80,0%	214,3%

*n.d. – não determinado.

Segundo os resultados, a autoclavação foi o procedimento que provocou as maiores mudanças nas características fisico-químicas das preparações, e esse efeito variou dependendo da presença de pullulan ou trealose. O pullulan se apresentou com maior capacidade estabilizante do que a trealose nessas condições experimentais. O método A mostrou-se mais interessante para incorporação de pullulan ou trealose para manter a estabilidade das preparações. Contudo, estudos para entender a influênciada trealose e do pullulan e como eles interferem na quantificação de bixina ainda precisam ser melhor investigados.

5.3. – Influência da concentração de pullulan na estabilidade de preparações de bixina submetidas ou não a estresse térmico

Para entender se a concentração de pullulan influi na estabilidade das preparações, foram preparadas amostras com diferentes concentrações de pullulan e submetidas a processo de autoclavação a 121 °C por 20 minutos e a seguir, armazenadas em condições normais de ambiente por um período de 2 meses. Amostras foram analisadas quanto ao teor de bixina pelo método de Yabiku e Takahashi (1992) e os resultados podem ser vistos na Tabela 5.

Análise de variância foi realizada entre todas as amostras. Em T = 0, as amostras tratadas ou não por autoclavação apresentaram concentrações muito

próximas e as diferenças não foram significativas (p>0,05), assim como, não variou com a concentração de pullulan.

Em T = 2 meses, foi observada diferença significativa (p=0,02) entre amostras não autoclavadas de nanodispersões sem pullulan e aquelas com PL 2,5% (BX + PL 2,5%), indicando que pullulan pode auxiliar na estabilidade da amostra.

Comparando as amostras entre os tempos 0 e 2 meses, o grupo submetido ao estresse térmico não apresentou mudanças significativas entre si, demonstrando que o efeito da autoclavação afetou igualmente todas as amostras testadas e não houve alteração ao longo de 2 meses.

Tabela 5 - Estudo de estabilidade de nanodispersões de bixina e pullulan no período de 2 meses

	Amostra	Concentração média de bixina em T = 0 (mM)	Concentração média de bixina em T = 2 meses (mM)
Tratadas por autoclavação	Bx	0,014 ± 0,000	0,012 ± 0,000
	Bx + PL 0,5%	0,016 ± 0,002	0,014 ± 0,001
	Bx + PL 1,0%	0,017 ± 0,002	0,015 ± 0,001
	Bx + PL 2,5%	0,016 ± 0,003	0,017 ± 0,002*
Não tratadas	Bx	0,016 ± 0,000	0,012 ± 0,001**
	Bx + PL 0,5%	0,016 ± 0,000	0,013 ± 0,000**
	Bx + PL 1,0%	0,017 ± 0,001	0,015 ± 0,001
	Bx + PL 2,5%	0,017 ± 0,000	0,017 ± 0,002*

* Por teste de Tukey, entre amostras Bx / Bx + PL 2,5%, p = 0,02 para amostras não-estressadas e p = 0,012 para amostras estressadas.

**Por teste de Tukey, entre os períodos de T = 0 e T = 2 meses, p = 0,001 para Bx e p = 0,013 para amostra de Bx + PL 0,5%.

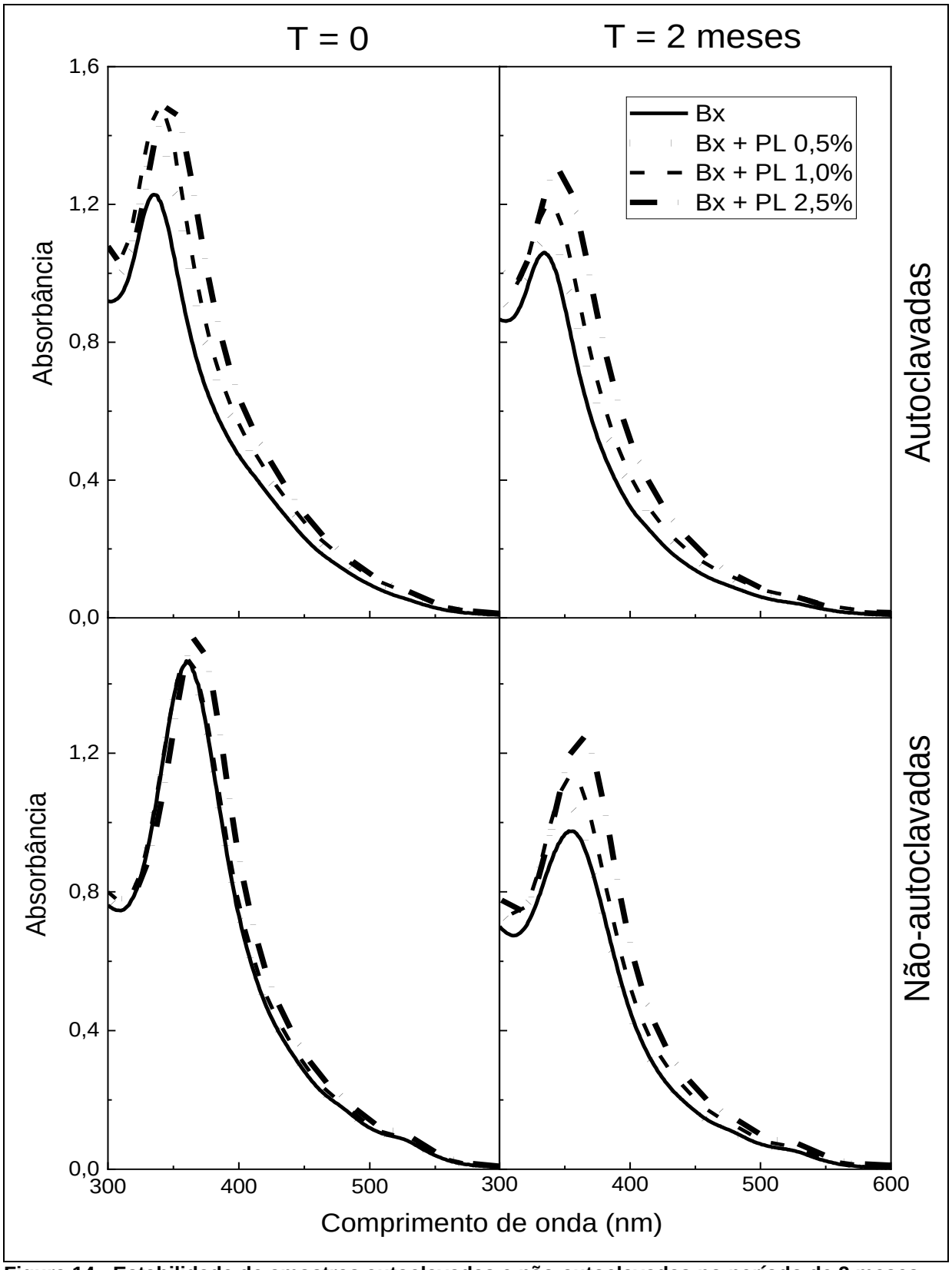

Figura 14 - Estabilidade de amostras autoclavadas e não-autoclavadas no período de 2 meses

Na Figura 14, as amostras autoclavadas apresentam picos menores do que suas contrapartes não-esterilizadas, e as amostras no tempo 0 apresentam picos

maiores do que após 2 meses. Ambos resultados indicam que tanto o processo de esterilização quanto as condições de armazenagem e o tempo reduziram a concentração de bixina das amostras. Também pela figura 13, observa-se que a utilização de 2,5% de pullulan gerou uma curva levemente deslocada à direita, se comparado com as demais, apontando que nessa concentração há uma interação diferente entre pullulan e as partículas de bixina. Entre os comprimentos de onda 300 e 600 nm, os valores de absorbância das diferentes concentrações de pullulan permaneceram abaixo do valor 0,1 em todas as situações (dados não apresentados).

5.4. – Avaliação físico-química de preparações de bixina (BX) com cetoconazol (KT)

O cetoconazol foi preliminarmente avaliado em nanodispersões de bixina e sob aspectos físico-químicos como espectrofotometria de varredura na região do visível e ultravioleta, cinética de agreagação, diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.

Na Figura 15, a espectrofotometria de varredura mostra o pico característico da bixina por volta do comprimento de onda de 360 a 370 nm, região do visível. Contudo, não foi possível observar um pico característico do cetoconazol, visto que o comprimento de onda de maior absorbância é em 240 nm (NAVEED e JAWEED, 2014), região ultravioleta. Realizando a espectrofotometria de varredura de 200 a 300 nm, para a amostra de cetoconazol, ainda não é possível observar um pico característico devido à insolubilidade desse fármaco em meio aquoso neutro. Contudo, a adição de cetoconazol alterou significativamente o perfil da bixina, indicando, portanto, que o antifúngico interage com a mesma.

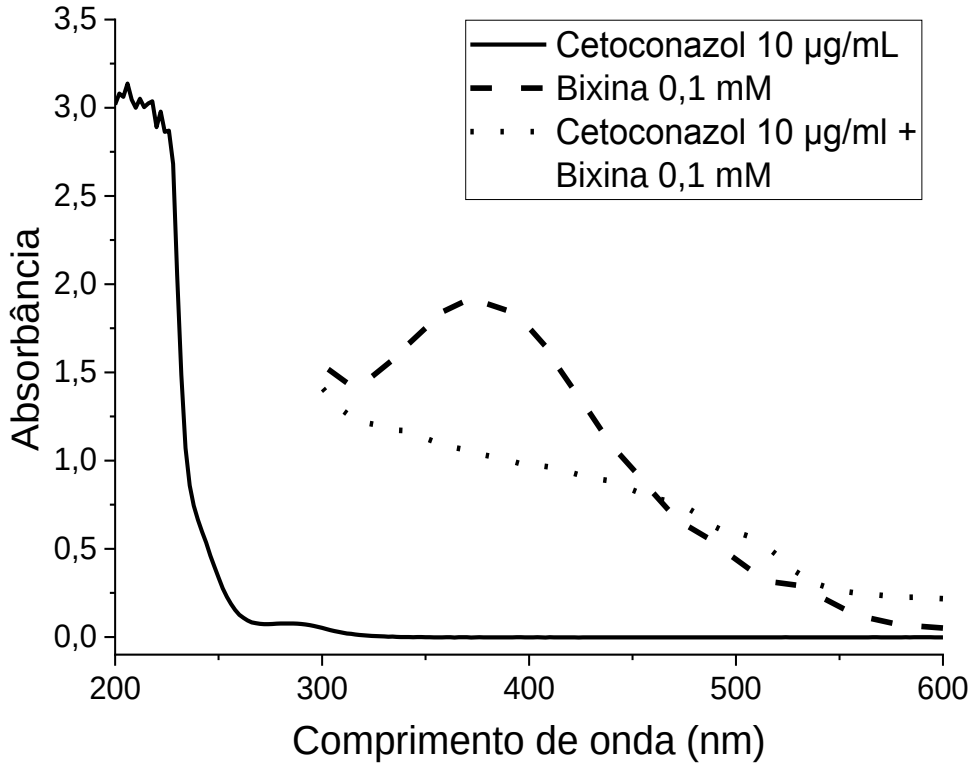

Figura 15 - Caracterização de dispersões aquosas de cetoconazol, bixina e mistura por método espectrofotométrico

Na Figura 16, observa-se que a amostra de cetoconazol não gerou uma variação significativa na absorbância ao longo de 30 minutos. Em contrapartida, as amostras de BX e BX + KT geraram uma maior variação na absorbância durante esse período. A amostra de BX apresentou um vale próximo de 300 segundos e a maior absorbância ao longo do tempo. Para a amostra de BX + KT, a presença de cetoconazol suavizou o vale gerado pela bixina e atrasou levemente a formação da base do vale. A intensidade de absorbância durante todo o período de medição também foi levemente menor em comparação com a amostra de BX. Ambas as amostras começaram a se estabilizar por volta dos 600 segundos.

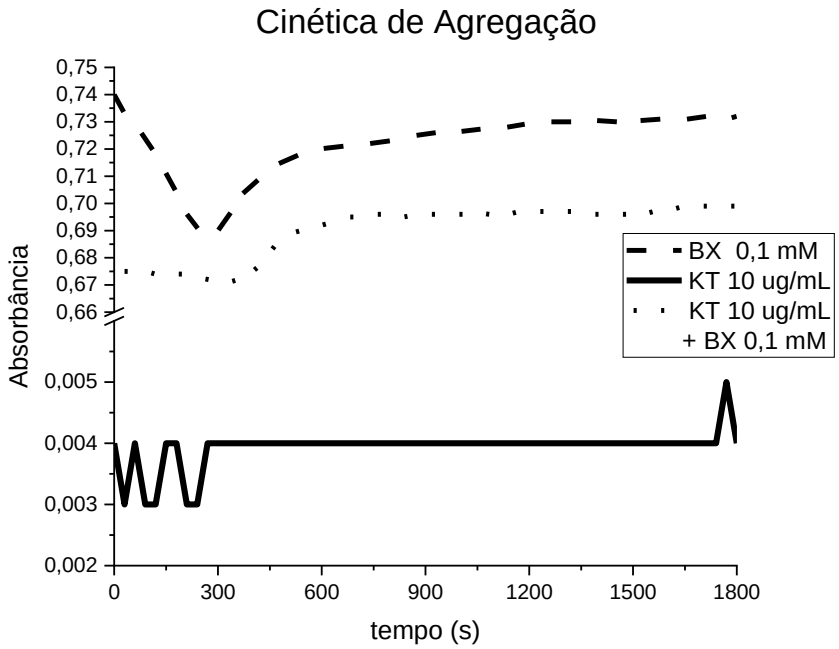

Figura 16 - Cinética de agregação de preparações aquosas de cetoconazol e bixina no comprimento de onda de 400 nm

Pela Tabela 6, o potencial zeta do cetoconazol não se alterou muito com a adição de bixina, permanecendo por volta de -17,0 mV, sugerindo que o cetoconazol não influiria significativamente esse parâmetro. É possível que a amostra de KT 10 µg/mL (18,8 µM) esteja na forma de solução, dado que a solubilidade do cetoconazol em etanol 10% a 25 ºC é de 3,3 µM/g de solvente (HASHEMZADEH e JOUYBAN, 2015).

Tabela 6 - Caracterização físico-química (diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta) de preparações de cetoconazol (KT) e bixina (BX)

Amostras	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial zeta (mV)
KT 10 µg/mL	187,4	-17,0
KT 10 µg/mL + BX 0,1 mM	145,4	-17,9

Pelas figuras 15 e 16 e tabela 6, pode-se supor que o cetoconazol interagiu com bixina, alterando características espectrofotométricas das nanodispersões e formação de partículas, mas não alterou o potencial zeta.

5.5. – Avaliação físico-química de preparações de bixina e cetoconazol com pullulan ou trealose

Uma vez analisado o efeito do cetoconazol com a bixina, foi necessário avaliar os efeitos do pullulan e da trealose nessas nanodispersões. Para isso foram realizadas análises por espectrofotometria de varredura e medição de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.

Pela Tabela 7, o diâmetro hidrodinâmico de 48,20 nm da amostra 1 (Bx 20 μM) foi menor do que o esperado de 73 a 103 nm (TAKAMOTO, 2015), porém, o potencial zeta de -24 mV foi praticamente igual ao obtido por Takamoto (2015) que foi de -23 mV.

A solubilidade do cetoconazol é de 3,3 μM em etanol 10% a 25 ºC (HASHEMZADEH e JOUYBAN, 2015), enquanto que a trealose é altamente solúvel em água. Como observado no item 5.3 e também ao se comparar as amostras 5 e 7 (KT 10 μM + Bx 20 μM e KT 10 μM + Bx 20 μM + PL 2,5%, respectivamente) da Tabela 7, o pullulan tende a aumentar o diâmetro hidrodinâmico. Portanto, na amostra 3 (KT 10 μM + PL 2,5%), o pullulan pode ter envolvido agregados de cetoconazol e aumentado o diâmetro hidrodinâmico. O mesmo efeito também foi observado entre as amostras 5 e 7.

O diâmetro hidrodinâmico das amostras 5 (KT 10 μM + Bx 20 μM), 6 (KT 10 μM + Bx 20 μM + PL 2,5%) e 7 (KT 10 μM + Bx 20 μM + TR 2,5%) apresentaram uma distribuição bimodal centrado em torno de 40 e de 300 nm (dados não apresentados). Ao se comparar o diâmetro hidrodinâmico da amostra 1 com a amostra 5, observou-se aumento desse parâmetro com adição de cetoconazol (48,20 nm e 68,70 nm, respectivamente). Por outro lado, comparando as amostras 5 e 6, a presença de trealose não alterou significativamente o diâmetro hidrodinâmico. O potencial zeta das amostras 1, 5 e 6 não se contrastam entre si, indicando que a presença tanto de cetoconazol quanto de trealose não alterou o potencial zeta das partículas de bixina.

Tabela 7 - Efeito de pullulan ou trealose nas características físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta) em preparações de bixina e cetoconazol

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial zeta (mV)
(1) Bx 20 µM	48,20 ± 1,85	-21,8 ± 4,1
(2) KT 10 µM	97,51 ± 1,14	-13,1 ± 1,0
(3) KT 10 µM + PL 2,5%	36,21 ± 0,52	-5,4 ± 0,8
(4) KT 10 µM + TR 2,5%	159,1 ± 9,1	-15,0 ± 2,2
(5) KT 10 µM + Bx 20 µM	68,70 ± 2,16	-21,5 ± 0,2
(6) KT 10 µM + Bx 20 µM + TR 2,5%	70,78 ± 2,16	-22,4 ±1,9
(7) KT 10 µM + Bx 20 µM + PL 2,5%	59,08 ± 1,77	-8,2 ± 2,4

Os espectros de varredura de 300 a 600 nm das amostras 1, 5, 6 e 7 apresentaram um pico por volta de 360 nm, característico da bixina (Figura 17). As amostras 2, 3 e 4 só apresentaram ruído (dado não apresentado), dado que o pico referente ao cetoconazol é por volta de 240 nm, e a trealose e o pullulan não geram picos característicos na faixa de comprimento de onda analisada. Pela figura 17, a presença de cetoconazol, trealose e/ou pullulan não alterou significativamente o espectro da bixina, tal que é difícil distinguir cada espectro quando sobrepostos (Figura 17 E – sobreposição dos gráficos anteriores).

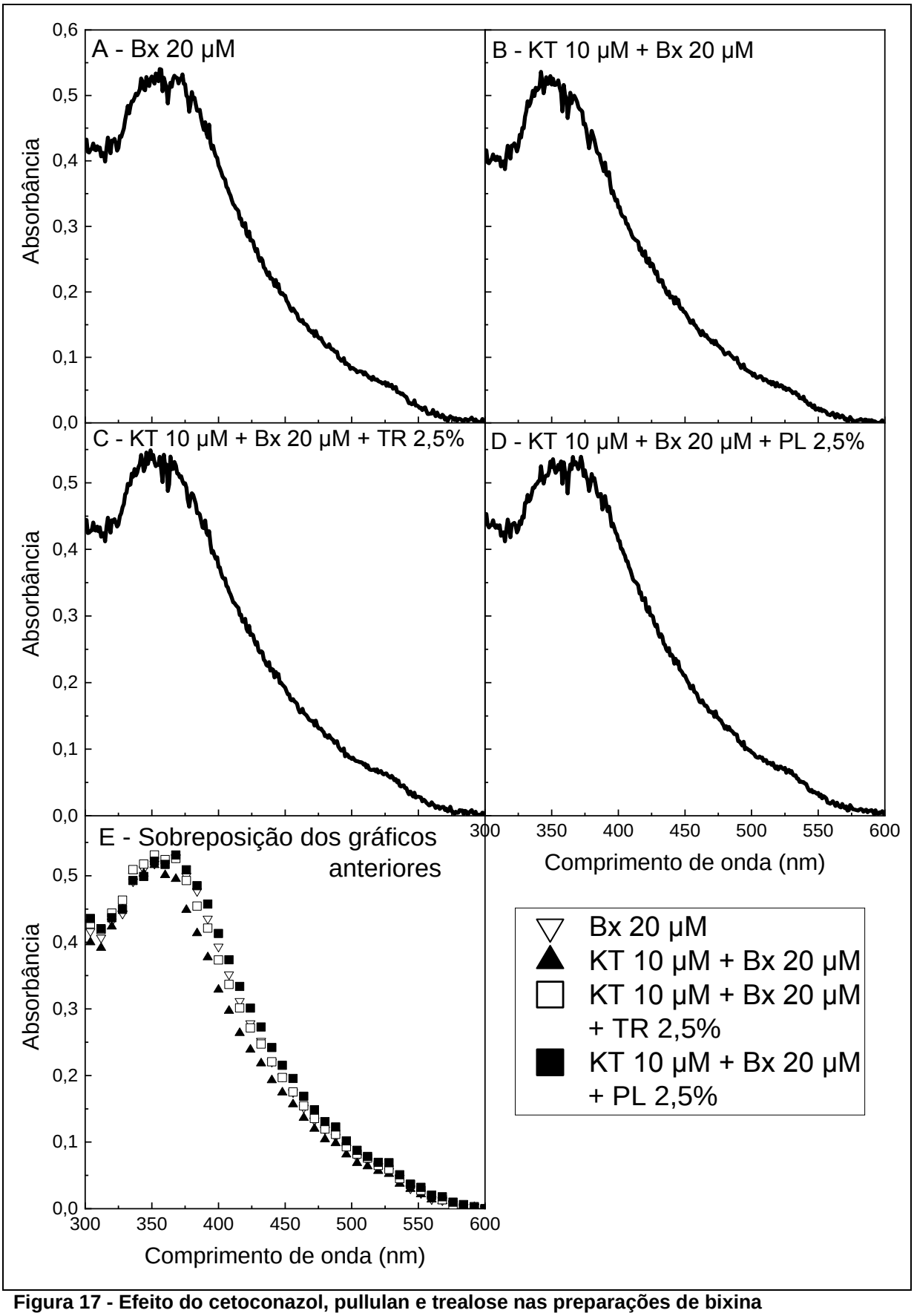

Figura 17 - Efeito do cetoconazol, pullulan e trealose nas preparações de bixina

5.6. – Análise de metodologia de doseamento de cetoconazol em preparações de bixina com pullulan

Buscando um método validado de quantificação de cetoconazol por espectrofotometria, encontrou-se o artigo de Rubim e colaboradores (2012). Buscou-se reproduzir as metodologias descritas no artigo para quantificar o cetoconazol das preparações de bixina.

Realizou-se espectrofotometria de varredura de 200 a 300 nm de soluções de cetoconazol 6 µg/mL (11,3 µM) em HCl 0,1 M ou em etanol (dados não apresentados). Decidiu-se que as absorbâncias seriam mensuradas no comprimento de onda de 222 nm, em HCL 0,1 M, e 243 nm, em etanol. A partir da medição de absorbância das soluções padrões, construíram-se as seguintes curvas padrão:

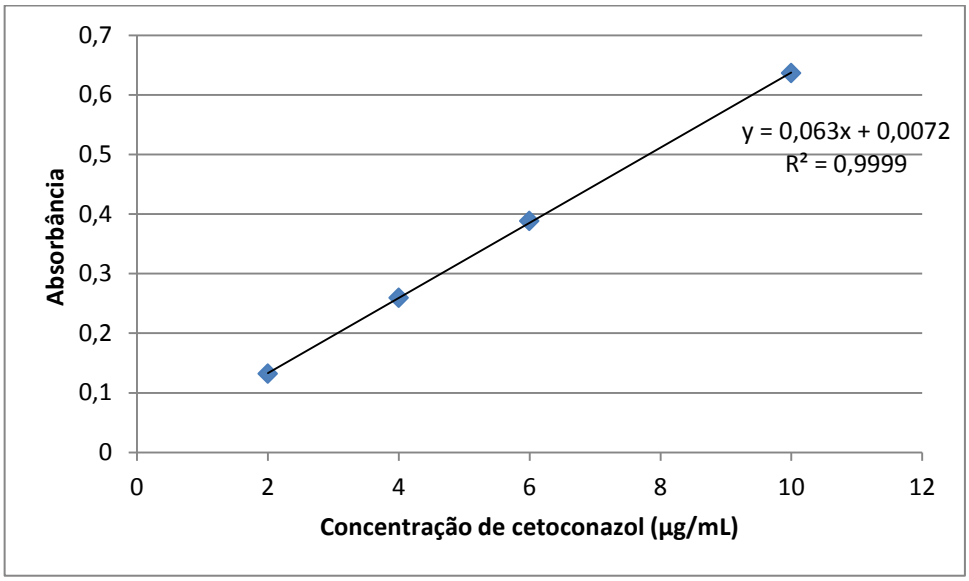

Figura 18 - Curva padrão de cetoconazol em HCl 0,1 M

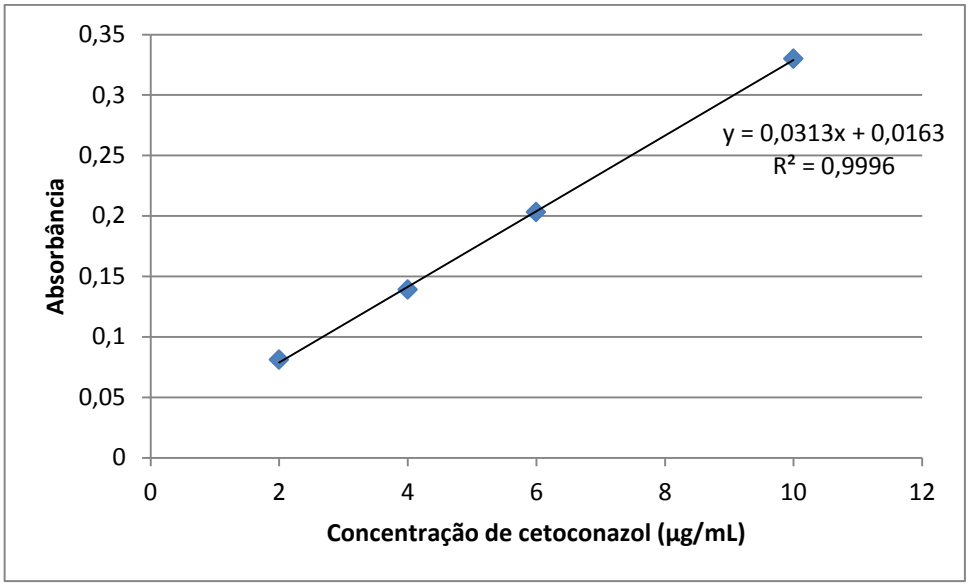

Figura 19 - Curva padrão de cetoconazol em etanol

Como ambas as curvas padrão se mostraram adequadas, a utilização de etanol é preferível, pois esse consegue solubilizar a bixina e cetoconazol, consequentemente, desestruturando as partículas e liberando o cetoconazol para quantificação.

Espectrofotometria de varredura de 200 a 300 nm nas amostras apontaram que os meios eram complexos e que seus componentes interferiam na determinação correta da absorbância (dados não apresentados). Dessa forma, seria necessário aperfeiçoar o procedimento de ressolubilização e doseamento de cetoconazol ou utilizar outra metodologia para determinar a concentração do antifúngico.

5.7. – Influência do pullulan (PL) nas características físico-químicas de dispersões de bixina (BX) contendo anfotericina B (AnB)

Este estudo consistiu em análises espectrofotométricas de preparações de bixina com e sem presença de pululan seguidos por amostras contendo anfotericina B. Estes ensaios são devidos a estudos prévios (KIKUCHI et al., 2016) que demonstraram eficácia na preparação de dispersões de anfotericina B com bixina. Também foram consideradas as avaliações físico-químicas por medições de tamanho (diâmetro hidrodinâmico) e carga (potencial zeta) destas preparações.

Pelas Figuras 20 e 21, observou-se que houve interação entre anfotericina B e bixina devido à alteração dos espectros individuais. A presença de bixina na dispersão aquosa de anfotericina B promoveu o aparecimento de picos semelhantes

à anfotericina B em etanol. Pelo resultado, pode-se supor que a presença de bixina aumentou a solubilidade da anfotericina B em água.

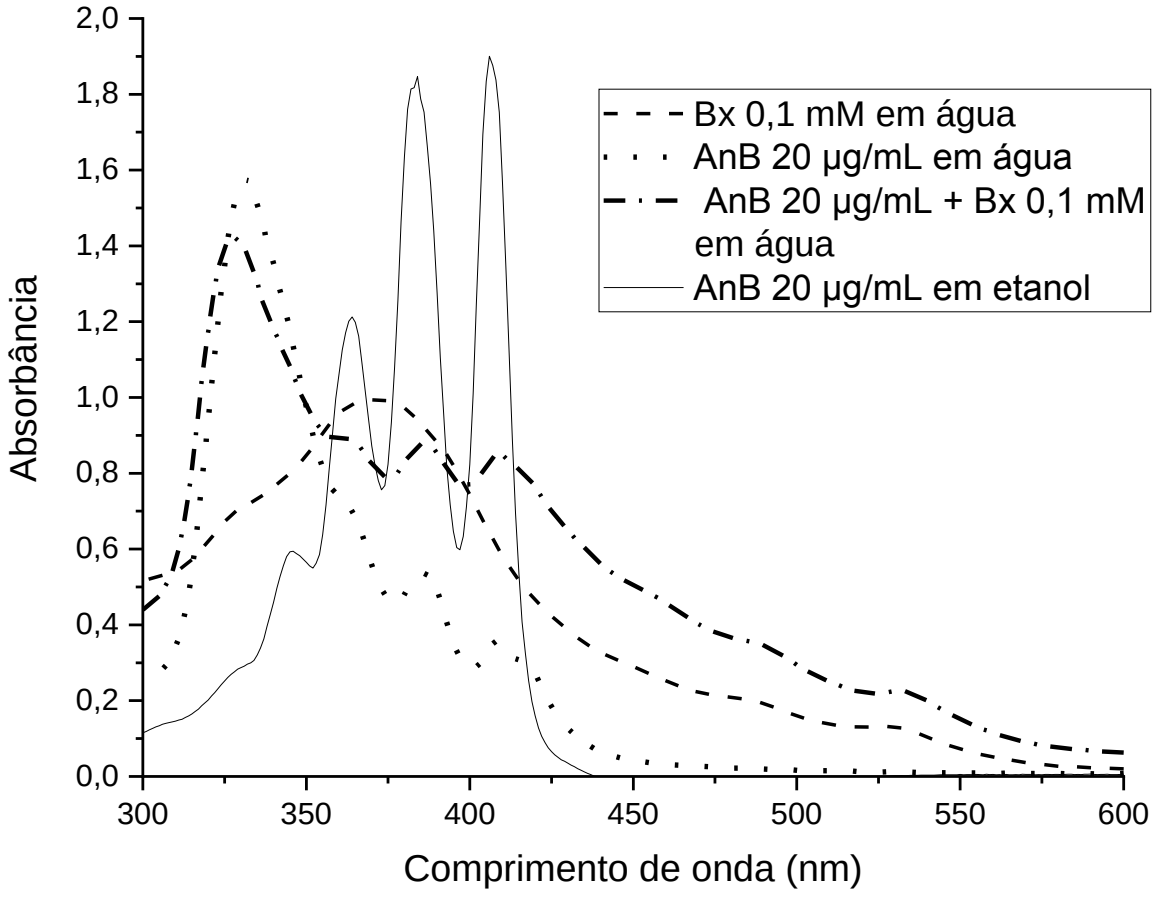

Figura 20 - Caracterização de dispersão aquosa de bixina, anfotericina B ou sua mistura, e solução etanólica de anfotericina B por método espectrofotométrico

Na Figura 21, a adição de pullulan à nanodispersão de bixina contendo anfotericina B não gerou alterações no perfil, indicando que o polissacarídeo não interagiu com a preparação.

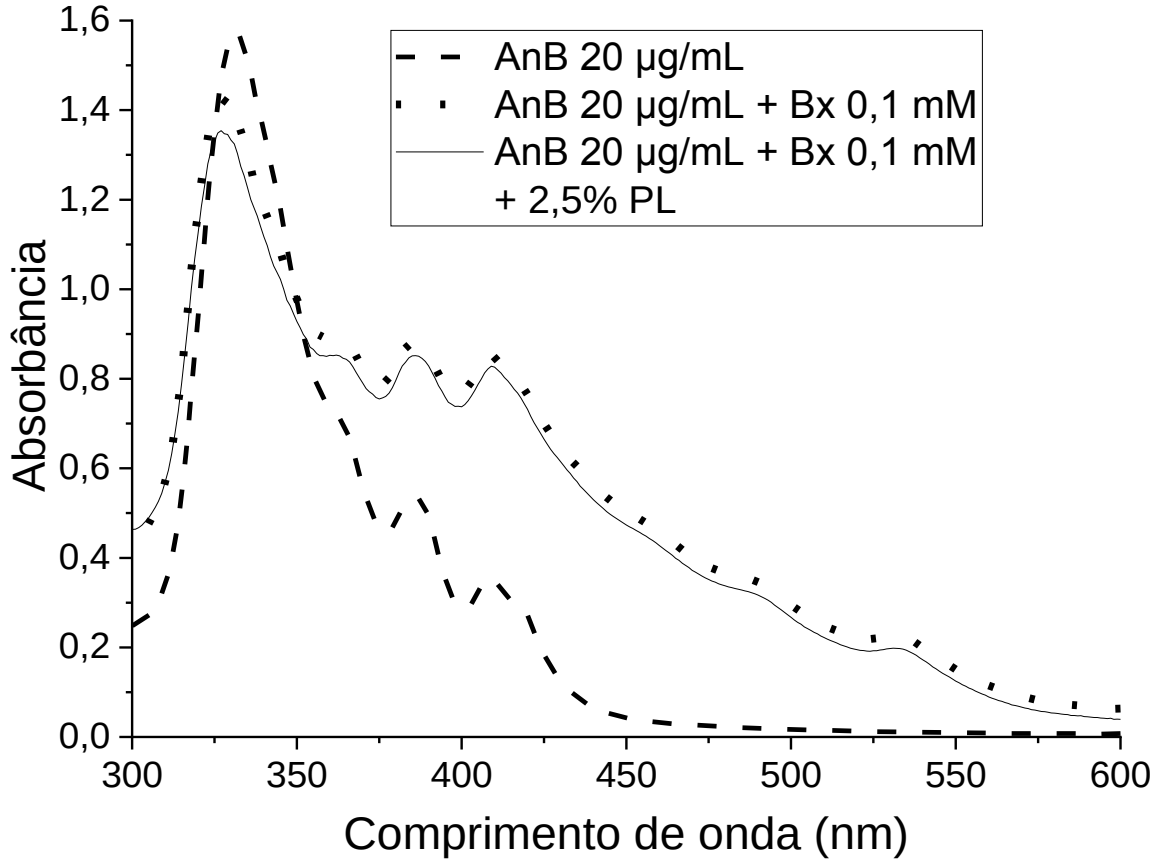

Figura 21 - Efeito do pullulan na dispersão de bixina e anfotericina B

Pela Tabela 8, pode-se observar que a adição de pullulan promoveu aumento no diâmetro hidrodinâmico de nanodispersões de bixina, porém, uma diminuição no valor absoluto do potencial zeta, sem tornar a carga positiva. Quando anfotericina B foi preparada em presença de bixina em água, houve diminuição no tamanho das partículas a partir de bixina e também valores menos negativos à carga líquida. Quando 1% de pullulan estava presente, os valores do potencial zeta tornaram-se menos neutros que apenas em água em todas as preparações. Em resumo, a presença de antifúngico aumentou o diâmetro hidrodinâmico e reduziu os valores de potencial zeta das preparações, tornando-se menos negativo, e a presença de 1% de pullulan provocou as mesmas mudanças, mas mais intensamente.

Tabela 8 - Caracterização físico-química (diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta) de preparações de bixina (BX) contendo anfotericina B e pullulan (PL)

Amostras	Diâmetro (nm)	Potencial zeta (mV)
BX 0,1 mM	40,13 ± 0,60	-23,33 ± 1,75
BX0,1 mM + PL 1%	52,05 ± 0,98	-12,93 ± 1,51
AnB 2 µg + BX 0,1 mM	50,93 ± 1,47	-17,07 ± 0,60
AnB 5 µg + BX 0,1 mM	71,40 ± 1,42	-16,50 ± 0,72
AnB 10 µg + BX 0,1 mM	58,13 ± 1,20	-15,50 ± 0,53
AnB 2 µg + BX 0,1 mM + PL 1%	60,15 ± 2,59	-16,36 ± 0,06
AnB 5 µg + BX 0,1 mM + PL 1%	63,23 ± 4,53	-10,37 ± 0,21
AnB 10 µg + BX 0,1 mM +PL 1%	60,50 ± 0,47	-13,57 ± 1,27

5.8 – Ensaios microbiológicos

Para avaliar se o pullulan ou a trealose influenciavam na difusão e na atividade antimicrobiana das preparações, foram realizados ensaios microbiológicos como teste de difusão em ágar e contagem de micro-organismos viáveis.

Os controles negativos (BX 40 µM + DMSO 0,5% em SG 5%, BX 40 µM + DMSO 0,5% em PL 1% e DMSO 0,5% em PL1%) e as placas que continham KT 10 µg/mL (18,8 µM) não geraram halos de inibição (dados não apresentados). Todas as amostras finais continham DMSO 0,5%, dado que a solubilização inicial dos antifúngicos foi realizada com solução 1:1 de DMSO:etanol, seguido por diluições em etanol e água com concentração alcoólica final de 10%. Os resultados do controle negativo indicaram que DMSO 0,5% não interferiu na viabilidade do micro-organismo.

Pela Tabela 9 e Figura 22, foi observado que a presença de trealose ou de pullulan não interferiu na difusão ou atividade antimicrobiana do antifúngico, dado que o diâmetro médio foi semelhante a sua contraparte sem pullulan ou trealose. A presença de bixina causou uma leve redução no diâmetro dos halos, muito provavelmente porque a interação entre bixina e anfotericina B estaria dificultando a liberação do antifúngico para o meio, uma característica interessante para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármaco. Ao analisar as placas, observou-se que a bixina se manteve no local de administração das amostras (dado não apresentado), indicando que ela não se difunde pelo ágar e que a presença de pullulan ou trealose não afetou essa propriedade.

Tabela 9 - Efeito antifúngico de preparações contendo anfotericina B por método de difusão em ágar

Amostras	Halo de inibição formado (mm)
AnB 10 µg/mL + SG 5%	10,73 ± 0,54
AnB 10 µg/mL + PL 1%	10,78 ± 0,43
AnB 10 µg/mL + TR 1%	10,90 ± 0,32
AnB 10 µg/mL + Bx 6,6 µM + SG 5%	9,61 ± 0,50
AnB 10 µg/mL + Bx 6,6 µM + PL 1%	9,74 ± 0,52
AnB 10 µg/mL + Bx 6,6 µM + TR 1%	9,88 ± 0,36

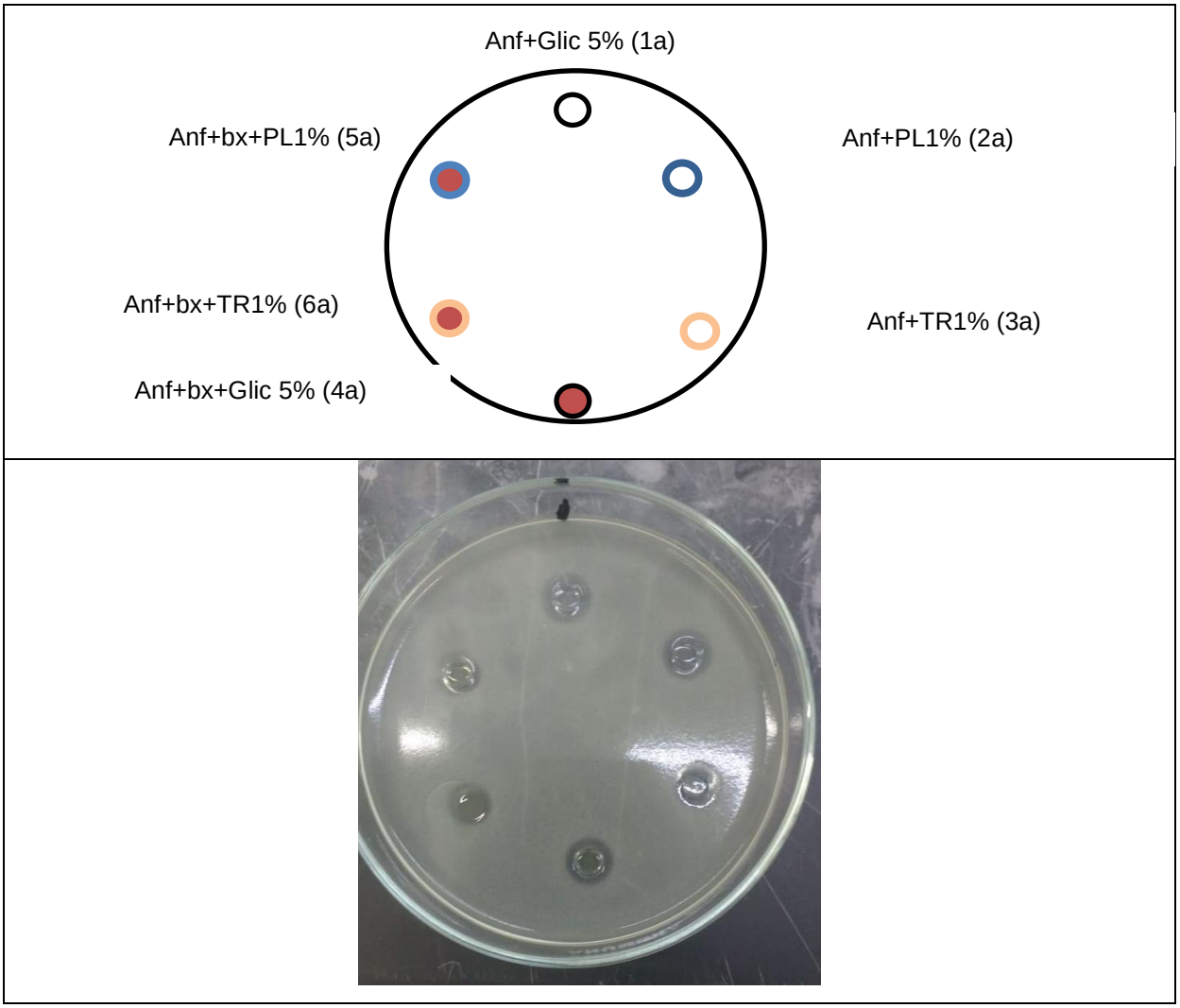

Figura 22 – Esquema de distribuição de amostras (anfotericina B) em placas.

Obs: *Anf = Anfotericina B, *bx = Nanodispersão de bixina, *Glic 5% = glicose 5%, *PL 1% = Pullulan 1%, *TR 1% = Trealose 1%.

Inicialmente, acreditava-se que com a concentração de 10 µg/mL de cetoconazol se observaria efeito antimicrobiano contra a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Ao realizar revisão na literatura sobre o assunto, foi verificado que a atividade antifúngica varia por diversos fatores como meio de cultura, método de determinação da CIM, cepa teste, concentração de micro-organismo no inóculo, temperatura de crescimento etc (Heel e colaboradores, 1982). Pesquisas que utilizaram turbidimetria encontraram baixos valores de Concentração Mínima Inibitória, desde menos que 0,1 µg/mL até 10 µg/mL (NIMURA et al., 2001; ST-GERMAIN, 1990; MOODY et al., 1980; BLANCO et al., 1992; HAWSER et al., 1996; HUGHES et al., 1988; ROGERS e GALGIANI, 1986; ADWAN et al., 2016). Pesquisas que utilizaram método de diluição em caldo ou contagem de UFCs encontraram valores acima de 50 µg/mL (UNO et al., 1982; HUGHES et al., 1987; SHIGEMATSU, 1981). Algumas pesquisas utilizaram o teste de difusão em ágar para avaliar a atividade de cetoconazol, contudo não observaram a formação de halos de inibição (NADAS et al., 2011; SHIN e PYUN, 2004).

Desta forma, as concentrações de cetoconazol utilizadas neste projeto, que foram até 50 µg/mL, não foram suficientes para inibir a proliferação de *C. albicans* ATCC 10231 e não foi possível visualizar halos de inibição, estando de acordo com dados citados anteriormente. O plaqueamento das amostras que continham cetoconazol ficou semelhante aos controles, contendo mais de 10^5 UFC/mL (dados não apresentados).

Por outro lado, as contagens de UFCs para o plaqueamentos de amostras que continham anfotericina B apresentam-se na Figura 23.

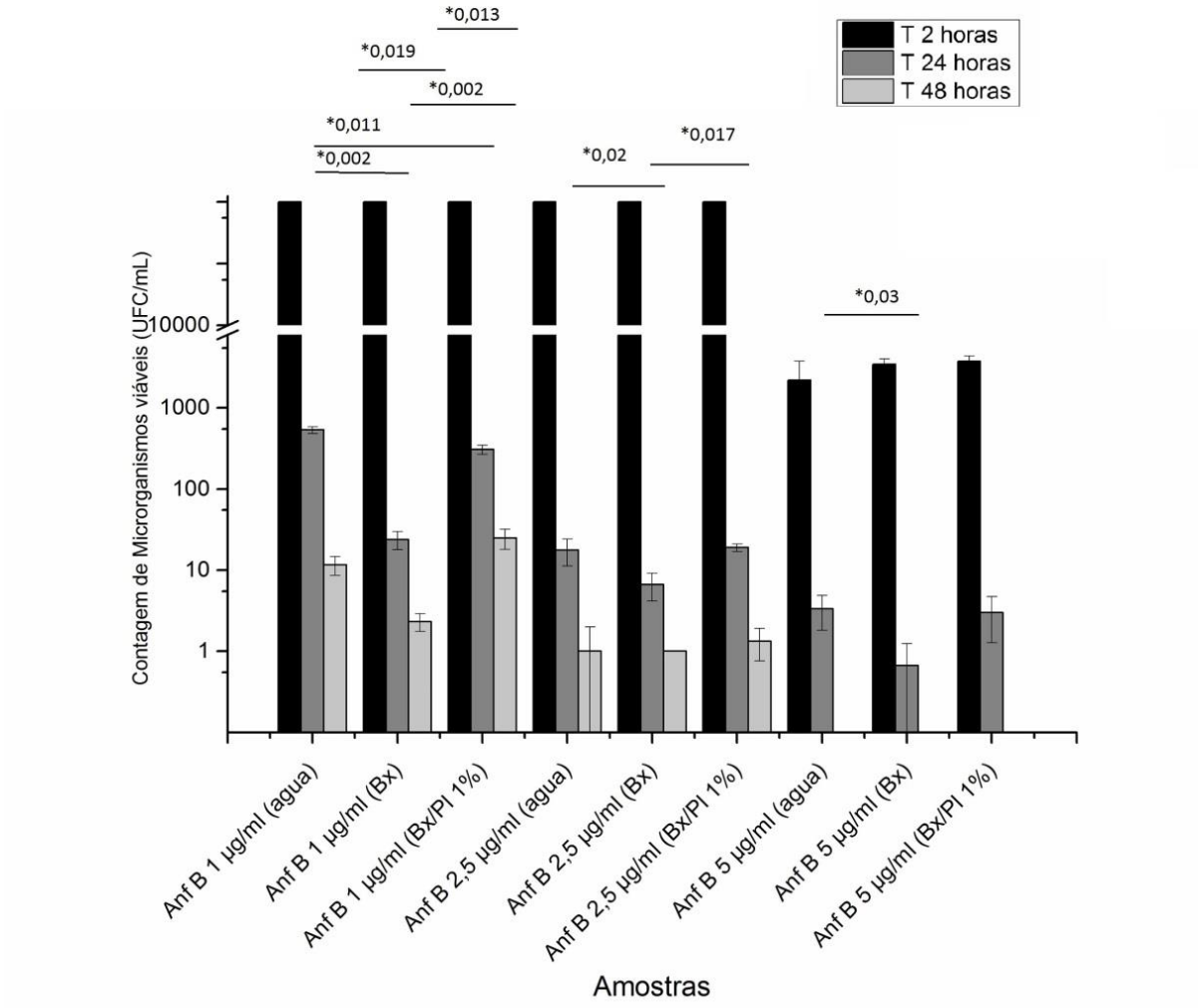

Figura 23 - Efeito antifúngico de preparações contendo anfotericina B por método de plaqueamento *pour plate*. Legenda: *valor de *p* pelo teste-t.

Obs.: concentração final de BX nos tubos de interação amostra/microrganismos foi de cerca de 0,020 mM).

Pela Figura 23, foi constatada a eficácia de anfotericina B nas concentrações testadas e diminuição de 6 logs de *C. albicans* nos tempos de interação de até 48 horas. Porém, efeito antifúngico imediato foi observado a partir de 2 horas em todas as amostras contendo 5 µg/mL de anfotericina B. Após interação por 24 horas, foi possível obter contagens de viáveis entre 1 e 1000 UFC/mL nas amostras testadas. Neste período, por análise estatística pelo teste-t foi constatado que a presença de BX promoveu melhor efeito antimicrobiano que anfotericina preparado somente em água. Também foram observadas diferenças entre amostras com BX e (BX +

Pullulan 1%). Em suma, as amostras sem o polissacarídeo, isto é, anfotericina B em bixina em água demonstrou agir mais rapidamente no controle de proliferação de microrganismos, em todas as concentrações de antifúngico testadas, isto é, 1 – 2,5 - 5,0 µg/mL. Pullulan não prejudicou o efeito de anfotericina B, demonstrando ser interessante para estabilidade da suspensão, sem ocorrer sedimentação dos sólidos das preparações.

A escolha de 1% de concentração para pullulan foi devido à fluidez, melhor manipulação e preço da matéria-prima. O fornecedor recomenda uso de 2,5% para formação de filmes para preparo de medicamentos, cosméticos e produtos alimentícios.

Experimentos utilizando maiores concentrações de cetoconazol precisam ser realizados para avaliar a atividade antimicrobiana das nanodispersões contendo o antifúngico e concomitantemente, novas avaliações físico-químicas.

Segundo os resultados obtidos, pullulan ou trealose não interferem na atividade antimicrobiana de preparações contendo anfotericina B ou cetoconazol.

6 - CONCLUSÕES

Pelos resultados dos ensaios, foram constatados alguns novos pontos em relação à utilização de bixina:

- Pullulan promoveu aumento no diâmetro hidrodinâmico das partículas das nanodispersões de bixina (de 100 para 400 nm) e promoveu alteração no potencial zeta (de -19 para -8 mV) , tornando-o menos negativo sem passar a valores positivos (exemplos da Tabela 6);
- Trealose não promoveu alterações nem de tamanho nem carga das nanodispersões devido sua não ionização, indicando não interferir nas interações entre os componentes das preparações e também, ser um bom adjuvante para processos de liofilização;
- Pullulan e trealose não interferiram nas interações entre bixina e os antifúngicos, sendo demonstrados pelas avaliações de tamanho e carga, análises espectrofotométricas e ensaios microbiológicos.
- Preparo de dispersão de bixina com ou sem antifúngicos pela adição de bixina em soluções de pullulan ou trealose mostrou-se o método mais prático, sem alterações de suas características físico-químicas com o tempo.

- Ensaios microbiológicos demonstraram que bixina não se difundiu pelo ágar sólido mas permitiu liberação de anfotericina B de sua estrutura e promover inibição da proliferação de *Candida albicans* ATCC 10231.
- Pullulan (1%) não interferiu no efeito antimicrobiano de anfotericina B (1 – 2,5 – 5,0 µg/mL) e bixina (0,020 mM) .
- Preparações de anfotericina B e bixina demonstraram bom efeito antimicrobiano em comparação com amostras por simples dispersão do antifúngico com solvente ideal (DMSO e etanol 1:1) em meio aquoso.

7 - PERSPECTIVAS

- Mais estudos precisam ser realizados para verificar eficácia antifúngica de cetoconazol em bixina, pullulan e trealose.
- Os resultados demonstraram que preparações a partir de bixina, pullulan e trealosepodem ser aprimorados para dispersão de fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, formação de filmes que podem ser utilizados sobre biomateriais, novas formulações farmacêuticas e cosméticas.
- Os polissacarídeos estudados podem ser úteis no preparo de materiais para liofilização, permitindo armazenamento por períodos mais longos sem alterar as características dos produtos.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELCET: complexo lipídico de AnB. Carolina Mantovani Gomes Forti. São Paulo: Teva Farmacêutica Ltda. Bula de remédio.

ADACHI, M.; HINATSU, Y.; KUSAMORI, K.; KATSUMI, H.; SAKANE, T.; NAKATANI, M.; WADA, K.; YAMAMOTO, A. Improved dissolution and absorption of ketoconazole in the presence of organic acids as pH-modifiers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 76, p. 225 – 230, 2015.

ADWAN, G. M.; SALAMEH, Y.; ADWAN, K. Susceptibility of *Candida albicans* isolates to terbinafine and ketoconazole. *IUG Journal of Natural Studies*, v. 20, n. 2, 2016.

AHMAD, E.; AKSOY, M. Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: A Mini Review. *Animal Health, Production and Hygiene*, v. 1, n. 2, p. 123 – 129, 2012.

AMBISOME: AnB liposomal. Gilson Hirata Kobori. São Paulo: United Medical Ltda., 2017. Bula de remédio.

ANFORICIN B. José Carlos Módolo. Itapira: CRISTÁLIA – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., 2017. Bula de remédio.

ANTUNES, L. M. G.; PASCOAL, L. M.; BIANCHI, M. L. P.; DIAS, F. L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 585, n. 1-2, p. 113 – 119, 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 5ª ed. Brasília, 2019.

BARWICZ, J.; CHRISTIAN, S.; GRUDA, I. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 10, p. 2310 – 2315, 1992.

BATZRI, S.; KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 298, n. 4, p. 1015-1019, 1973.

BAUTISTA, A. R. P. L.; MOREIRA, E. L. T.; BATISTA, M. S.; MIRANDA, M. S.; GOMES, I. C. S. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 625 – 629, 2004a.

BAUTISTA, A. R. P. L.; MIRANDA, M. S.; BATISTA, M. S.; MOREIRA, E. L. T.; DA SILVA, I. M.; GOMES, I. C. S. Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina

para ratos. *Revista Brasileira e Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 2, p. 229 – 233, 2004b.

BENAROUDJ, N.; LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 26, p. 24261 – 24267, 2001.

BLANCO, M. T.; PÉREZ-GIRALDO, C.; BLANCO, J.; MORÁN, F. J.; HURTADO, C.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C. *In vitro* studies of activities of some antifungal agents against *Candida albicans* ATCC 10231 by the turbidimetric method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 4, p. 898 – 901, 1992.

BOLLIN JR, E.; FLETCHER, M. G. Trehalose stabilizer and tableting excipient. Depositante: E. I. Du Pont de Nemours and Company. U.S. Patent n. 4,762,857. Depósito: 23 abril 1987. Concessão: 9 ago. 1988.

BOSWELL, G. W.; BUELL, D.; BEKERSKY, I. AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 38, n. 7, p. 583 – 592, 1998.

BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, n. 4, p. 512 – 531, 1996.

BREIEROVA, E.; VAJCZIKOVA, I.; SASINKOVA, V.; STRATILOVA, E.; FISERA, M.; GREGOR, T.; SAJBIDOR, J. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, v. 57, n. 7 - 8, p. 634 – 639, 2002.

CABIB, E.; LELOIR, L. F. The biosynthesis of trehalose-phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, v. 231, n. 1, p. 259 – 275, 1958.

CAMARGO, M. T. L. A. Medicina popular: aspectos metodológicos para pesquisa: garrafada: objeto de pesquisa: componentes medicinais de origem vegetal, animal e mineral. São Paulo: Almed, 1985.

CARPENTER, J. F.; PIKAL, M. J.; CHANG, B. S.; RANDOLPH, T. W. Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 8, p. 969 – 975, 1997.

CATLEY, B. J.; RAMSAY, A.; SERVIS, C. Observations on the structure of the fungal extracellular polysaccharide. *Carbohydrate Research*, v. 153, n. 1, p. 79 – 86, 1986.

ČEJKOVÁ, J.; ČEJKA, Č.; ARDAN, T.; ŠIRC, J.; MICHÁLEK, J.; LUYCKX, J. Reduced UVB-induced corneal damage caused by reactive oxygen and nitrogen species and decreased changes in corneal optics after trehalose treatment. *Histology and Histopathology*, v. 25, n. 10, p. 1403, 2010.

CETOCONAZOL: comprimido 200 mg. Marco Aurélio Limirio G. Filho. Anápolis: Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S. A., 2016. Bula de remédio.

CHENG, K.-C.; DEMICRI, A.; CATCHMARK, J. M. Pullulan: Biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, n. 1, p. 29 - 44, 2011.

COELHO, I. M.; CLAUDINO, A. L. R.; CHAVASCO, J. M.; BRIMAN, E. G.; GAMBALE, W.; ALEVA, N. A.; CHAVASCO, J. K. Antifungal susceptibility evaluation of *Candida albicans* isolated from buccal lesions of hiv-positive and HIV-negative patients. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 10, n. 1, p. 156 – 166, 2012.

COSERI, S.; SPARATAREANU, A.; SACARESCU, L.; RIMBU, C.; SUTEU, D.; SPIRK, S.; HARABAGIU, V. Green synthesis of the silver nanoparticles mediated by pullulan and 6-carboxypullulan. *Carbohydrate Polymers*, v. 116, p. 9 – 17, 2015.

COUKELL, A. J.; BROGDEN, R. N. Liposomal Amphotericin B. *Drugs*, v. 55, n. 4, p. 585 – 612, 1998.

CROWE, J. H.; CARPETER, J. F.; CROWE, L. M.The role of vitrification in anihydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, v. 60, n. 1, p. 73 – 103, 1998.

CROWE, L. M.; MOURADIAN, R.; CROWE, J. H.; JACKSON, S. A.; WOMERSLEY, C. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 769, n. 1, p. 141 – 150, 1984.

DAVIDSON, R. N.; CROFT, S. L.; SCOTT, A.; MAINI, M.; MOODY, A. H.; BRYCESON, A. D. M. Liposomal amphotericin B in drug resistant visceral leishmaniasis. *The Lancet*, v. 337, n. 8749, p. 1061 – 1062, 1991.

DAVIDSON, R. N.; DI MARTINO, L.; GRADONI, L.; GIACCHINO, R.; RUSSO, R.; GAETA, G. B.; PEMPINELLO, R.; SCOTT, S.; RAIMONDI, F.; PRESTILEO, A. C. T.; CALDEIRA, L.; WILKINSON, R. J.; BRYCESON, A. D. M. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *QJM: An International Journal of Medicine*, v. 87, n. 2, p. 75 – 81, 1994.

DAVIDSON, R. N.; DI MARTINO, L.; GRADONI, L.; GIACCHINO, R.; GAETA, G. B.; PEMPINELLO, R.; SCOTTI, S.; CASCIO, A.; CASTAGNOLA, E.; MAISTO, A.; GRAMICCIA, M.; DI CAPRIO, D.;WILKINSON, R. J.; BRYCESON, A. D. M. Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clinical Infectious Diseases*, v. 22, n. 6, p. 938 – 943, 1996.

DE OLIVEIRA, P. F.; DE ANDRADE, K. J. B.; PAULA, M. C. F.; ACÉSIO, N. O.; MORAES, T. D. S.; BORGES, P. S. F.; BARCELOS, G. R. M.; TAVARES, D. C. Bixin protects hepatocytes against 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity but does not supress DNA damage and pre-neoplasic lesion in the colon of *Wistar* rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 759, p. 37 – 42, 2014.

DI MARTINO, L.; DAVIDSON, R. N.; GIACCHINO, R.; SCOTTI, S.; RAIMONDI, F.; CASTAGNOLA, E.; TASSO, L.; CASCIO, A.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; PETTOELLO-MANTOVANI, M.; BRYCESON, A. D. M. Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin B. *The Journal of Pediatrics*, v. 131, n. 2, p. 271 – 277, 1997.

DOS SANTOS, G. C.; MENDONÇA, L. M.; ANTONUCCI, G. A.; DOS SANTOS, A. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 2, p. 335-340, 2012.

ELBEIN, A. D.; PAN, Y. T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, v. 13, n. 4, p. 17R – 27R, 2003.

EMMINGER, W.; GRANINGER, W.; EMMINGER-SCHMINEIER, W.; ZOUBEK, A.; PILWEIN, K.; SUSANI, M.; WASSERER, A.; GADNER, H. Tolerance of high doses of amphotericin B by infusion of a liposomal formulation in children with cancer. *Annals of Hematology*, v. 68, n. 1, p. 27 – 31, 1994.

FERREIRA, V. L. P.; NETO, R. O. T.; MOURA, S. C. S. R.; SILVA, M. S. Cinética da degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetida a tratamentos térmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 1, p. 37 – 42, 1999.

FERREIRA, L. M.; CERVI, V. F.; GEHRCKE, M.; DA SILVEIRA, E. F.; AZAMBUJA, J. H.; BRAGANHOL, E.; SARI, M. H. M.; ZBOROWSKI, V. A.; NOGUEIRA, C. W.; CRUZ, L. Ketoprofen-loaded pomegranate seed oil nanoemulsion stabilized by pullulan: Selective antiglioma formulation for intravenous administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 130, p. 272 – 277, 2015.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 167 – 194, 2006.

FUNDUEANU, G.; CONSTANTIN, M.; ASCENZI, P. Preparation and characterization of pH- and temperature-sensitive pullulan microspheres for controlled release of drugs. *Biomaterials*, v. 29, n. 18, p. 2767 – 2775, 2008.

GALIA, E.; NICOLAIDES, E.; HORTER, D.; LOBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and II drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 5, p. 698 – 705, 1998.

GALINDO-CUSPINERA, V.; RANKIN, S. A. Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound(s) in commercial water-soluble annatto extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 2524 – 2529, 2005.

GALINDO-CUSPINERA, V.; WESTHOFF, D. C.; RANKIN, S. A. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microrganisms. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 6, p. 1074-1078, 2003.

GANESHKUMAR, M.; PONRASU, T.; RAJA, M. D.; SUBAMEKALA, M. K.; SUGUNA, L. Green synthesis of pullulan stabilized gold nanoparticles for cancer targeted drug delivery. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomoleculer Spectroscopy*, v. 130, p. 64 – 71, 2014.

GODDIJN, O. J. M.; VAN DUN, K. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science*, v. 4, n. 8, p. 315 – 319, 1999.

GOLAN, D. E. et al. *Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia*. Revisão técnica de Sergio Ulhoa Dani e tradução de Cláudia L. C. de Araújo e Patricia L. Voeux. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; KIM, Y.-I.; KUSUDO, T.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K.; KANG, M.-S.; HIRAMATSU, T.; SAKAMOTO, T.; UEMURA, T.; HIRAI, S.; KOBAYASHI, M.; HORIO, F.; KAWADA, T. Bixin activates PPAR α and improves obesity-induced abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 48, p. 11952 – 11958, 2012.

GUPTA, M.; GUPTA, A. K. Hydrogel pullulan nanoparticles encapsulating pBUDLacZ plasmid as an efficient gene delivery Carrier. *Journal of Controlled Release*, v. 99, n. 1, p. 157 – 166, 2004.

HALLAGAN, J. B.; ALLEN, D. C.; BORZELLECA, J. F. The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics colour additives exempt from certification. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 6, p. 515 – 528, 1995.

HASEGAWA, U.; NOMURA, S.-I.M.; KAUL, S. C.; HIRANO, T.; AKIYOSHI, K. Nanogel-quantum dot hybrid nanoparticle for live cell imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 331, n. 4, p. 917 – 921, 2005.

HASHEMZADEH, N.; JOUYBAN, A. Solubility of ketoconazole in ethanol + water mixtures at various temperatures. *Chemical Engineering Communications*, v. 202, n. 9, p. 1211 – 1215, 2015.

HAWSER, S.; FRANCOLINI, M.; ISLAM, K.The effects of antifungal agents on the morphogenetic transformation by *Candida albicans in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 38, n. 4, p. 579 – 587, 1996.

HAYAKAWA, K.; MARUYAMA, N.; FUKASAWA, M. Capsule comprising low-substituted cellulose ether and method for preparing the same. Depositante: Shin-Estu Chemical Co. Ltd. U.S. Patent n. 8,029,821 B2. Depósisto: 20 dec. 2004. Concesão: 4 out. 2011.

HEEL, R. C.; BROGDEN, R. N.; CARMINE, A.; MORLEY, P. A.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Ketoconazole: a review of its therapeutic efficacy in superficial and systemic fungal infections. *Drugs*, v. 23, n. 1 – 2, p. 1 – 36, 1982.

HIGASHIYAMA, T. Novel functions and application of trehalose. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n., 7, p. 1263 – 1269, 2002.

HIJIYA, H.; SHIOSAKA, M. Shaped bodies of pullulan and their use. Depositante: Hayashibara Biochemical Laboratories, Incorporated. U.S. Patent n. 3,784,390. Depósito: 13 jul. 1972. Concessão: 8 jan. 1974.

HIJIYA, H.; SHIOSAKA, M. Process for the preparation of food containing pullulan and amylose. Depositante: Hayashibara Biochemical Laboratories, Incorporated. U.S. Patent n. 3,872,228. Depósito: 14 jan. 1974. Concessão: 18 mar. 1975.

HOSSEIKHANI, H.; AOYAMA, T.; OGAWA, O.; TABATA, Y. Liver targeting of plasmid DNA by pullulan conjugation based on metal coordination. *Journal of Controlled Release*, v. 83, p. 287 – 302, 2002.

HUGHES, C. E.; BENNETT, R. L.; BEGGS, W. H. Broth dilution testing of *Candida albicans* susceptibility to ketoconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 31, n. 4, p. 643 – 646, 1987.

HUGHES, C. E.; BENNETT, R. L.; TUNA, I. C.; BEGGS, W. H. Activities of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against ketoconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 32, n. 2, p. 209 – 212, 1988.

IGARASHI, T.; NOMURA, K.; NAITO, K.; YOSHIDA, M. Plasma expander. Depositante: Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. U.S. Patent n. 4,370,472. Depósito: 21 mar. 1980. Concessão: 25 jan. 1983.

IROBI, O. N.; MOO-YOUNG, M.; ANDERSON, W. A. Antimicrobial activity of annatto (*Bixa orellana* L) extract. *Pharmaceutical Biology*, v. 34, p. 87 – 90, 1996.

JEWELL, C.; O'BRIEN, N. M. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. *British Journal of Nutrition*, v. 81, n. 3, p. 235 – 242, 1999.

KANMANI, P.; LIM, S. T. Synthesis and characterization of pullulan-mediated silver nanoparticles and its antimicrobial activities. *Carbohydrates Polymers*, v. 97, p. 421 – 428, 2013.

KAWAHARA, K.; OHTA, K.; MIYAMOTO, H.; NAKAMURA, S. Preparation and solution properties of pullulan fractions as standard samples for water soluble polymers*. Carbohydrate Polymers*, v. 4, n. 5, p. 335 – 356, 1984.

KIOKIAS, S.; GORDON, M. H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chemistry*, v. 83, n. 4, p. 523 – 529, 2003.

KIKUCHI, I. S.; TAKAMOTO, R. T. O.; YSHICO, P. K.; MATUO, M. C. S.; PINTO, T. J. A. Effects of amphotericin B prepared by using novel nanodispersion of bixin and commercial formulations on *Candida albicans in vitro* assays. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 35, n. 4, p. 705-711, 2016.

KIM, S.; CHAE, S. Y.; NA, K.; KIM, S. W.; BAE, Y. H. Insulinotropic activity of sufonylurea/pullulan conjugate in rat islet microcapsule. *Biomaterials*, v. 24, n. 26, p. 4843 – 4851, 2003.

KRULL, S. M.; MA, Z.; LI, M.; DAVÉ, R. N.; BILGIRI, E. Preparation and characterization of fast dissolving pullulan films containing BCS class II drug nanoparticles for bioavailability enhancement. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 42, n. 7, p. 1073 – 1085, 2016.

KULICKE, W.–M.; HEIZE, T. Improvements in polysaccharides for use as blood plasma expanders. In: Macromolecular Symposia, 231, 2005, Weiheim. Weiheim: WILEY-VCH Verlag, 2005, p. 47 – 59.

LAKSEE, S.; PUTHONG, S.; TEERAWATANANOND, T.; PALAGA, T.; MUANGSIN, N. Highly efficient and facile fabrication of monodispersed Au nanoparticles using pullulan and their application as anticancer drug carriers. *Carbohydrate Polymers*, v. 173, p. 178 – 191, 2017.

LAKSEE, S.; PUTHONG, S.; KONGKAVITOON, P.; PALAGA, T.; MUANGSIN, N. Facile and green synthesis of pullulan derivative-stabilized Au nanoparticles as drug carriers for enhancing anticancer activity. *Carbohydrate Polymers*, v. 198, p. 495 – 508, 2018.

LAPP, D.; PATTERSON, B. W.; ELBEIN, A. D. Properties of a trehalose phosphate synthetase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 246, n. 14, p. 4567 – 4579, 1971.

LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 62, n. 5-6, p. 468 – 473, 2003.

LEWIS, J. H.; ZIMMERMAN, H. J.; BENSON, G. D.; ISHAK, K. G. Hepatic injury associated with ketoconazole therapy: Analysis of 33 cases. *Gastroenterology*, v. 86, n. 3, p. 503 – 513, 1984.

LIMA, L. R. P.; DE OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. *Revista de Nutrição*, v. 16, n. 3, p. 305 – 314, 2003.

LUBACH, J. W.; CHEN, J. Z.; HAU, J.; IMPERIO, J.; CORAGGIO, M.; LIU, L.; WONG, H. Investigation of the rat model for preclinical evaluation of pH-dependent oral absorption in humans. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 11, p. 3997 – 4004, 2013.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 11, p. 1595 – 1639, 2005.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, n. s1, p. 1 – 10, 2004.

MANOSROI, A.; KONGKANERANMIT, L.; MANOSROI, J. Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. *International Journal of Pharmaceutical*, v. 270, n. 1-2, p. 279 – 289, 2004.

MARUTA, K.; HATTORI, K.; NAKADA, T.; KUBOTA, M.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1289, n. 1, p. 10 – 13, 1996.

MATUO, M. C. S.; TAKAMOTO, R. T. O.; KIKUCHI, I. S.; PINTO, T. J. A. Effect of bixin and norbixin on the expression of cytochrome P450 in HepG2 cell line. *Cell Biology International*, v. 37, n. 8, p. 843 – 848, 2013.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, v. 25, n. 2, p. 136 – 144, 1996.

MERCK INDEX: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 15thed. The Royal Society of Chemistry, p. 1314, 2013.

MITSUHASHI, M.; YONEYAMA, M; SAKAI, S. Growth promoting agent for bifid bacteria. Depositante: Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo. EP0382355A2. Depósito: 18 jan. 1990. Concessão: 16 ago. 1990.

MIYAMOTO, Y.; GOTO, H.; SATO, H.; OKANO, H.; IIJIMA, M. Process for sugar-coating solid preparation. Depositante: Zeria Shinyaku Kogyo Kabushiki Kaisha. U. S. Patent n. 4,610,891. Depósito: 25 nov. 1985. Concessão: 9 set. 1986.

MOODY, M. R.; YOUNG, V. M.; MORRIS, M. J.; SHIMPFF, S. C. *In vitro* activities of miconazole, miconazole nitrate, and ketoconazole alone and combined with rifampin against *Candida* spp. and Torulopsis glabrata recovered from cancer patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 17, n. 5, p. 871 – 875, 1980.

MOREIRA, P. R.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C. D.; GUELFI, M.; PEREIRA, F. T. F.; MINGATTO, F. E. Protective effect of bixin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Biological Research*, v. 47, n.1, p. 49, 2014.

MORIMOTO, N.; ENDO, T.; OHTOMI, M.; IWASAKI, Y.; AKIYOSHI, K. Hybrid nanogels with physical and chemical cross-linking structures as nanocarriers.*Macromolecular Bioscience*, v. 5, n. 8, p. 710 – 716, 2005.

MOTOZATO, Y.; IHARA, H.; TOMODA, T.; HARAYAMA, C. Preparation and gel permeation chromatographic properties of pullulan spheres.*Journal of Chromatography A*, v. 355, p. 434 – 437, 1986.

MURRAY, I. A.; COUPLAND, K.; SMITH, J. A.; ANSELL, I. D.; LONG, R. G. Intestinal trehalose activity in a UK population: establishing a normal range and the effect of disease. *British Journal of Nutrition*, v. 83, n. 3, p. 241 – 245, 2000.

NADAS, G. C.; NICODIM, F. I. T.; RAPUNTEAN, G.; CHIRILA, F.; RAPUNTEAN, S.; BOLFA, P.; BOUARI, C. The sensibility to antimycotics of some *Candida* spp. strains isolated from humans and animals. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca.Veterinary Medicine*, v. 1, n. 68, 2011.

NAGAR, P.; CHAUHAN, I.; YASIR, M. Insights into polymers: film formers in mouth dissolving films. *Drug Invention Today*, v. 3, n. 12, p. 280 – 2889, 2011.

NAJAR, S. V.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). *Food Chemistry*, v. 29, n. 4, p. 283 – 289, 1988.

NAKASHIO, S.; TSUJI, K.; TOYOTA, N.; FUJITA, F. Novel cosmetic containing pullulan. Depositante: Sumitomo Chemical Company, Limited e Hayashibara Biochemical Laboratories, Incorporated. U. S. Patent n. 3,972,997. Depósito: 3 out. 1974. Concessão: 3 ago. 1976.

NAVEED, S.; JAWEED, L. UV spectrophotometric assay of Ketoconazole oral formulation. *American Journal of Biology and Life Sciences*, v. 2, n. 5, p. 108 – 11, 2014.

NIMURA, K.; NIWANO, Y.; ISHIDUKA, S.; FUKUMOTO, R. Comparison of *in vitro* antifungal activities of topical antimycotics launched in 1990s in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 18, n. 2, p. 173 – 178, 2001.

NISHIMOTO, T.; NAKANO, M.; NAKADA, T.; CHAEN, H.; FUKUDA, S.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; TSUJISAKA, Y. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 60, n. 4, p. 640 – 644, 1996.

NONSUWAN, P.; PUTHONG, S.; PALAGA, T.; MUANGSIN, N. Novel organic/inorganic hybrid flower-like structure of selenium nanoparticles stabilized by pullulan derivatives. *Carbohydrates Polymers*, v. 184, p. 9 – 19, 2018.

OKU, T.; OKAZAKI, M. Transitory laxative threshold of trehalose and lactulose in healthy women.*Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 44, n. 6, p. 787 – 798, 1998.

OZKOK, A.; EDELSTEIN, C. L. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury.*BioMed Research International*, v. 2014, 2014.

PATEL, R. P.; PATEL, H.; BARIA, A. H. Formulation and evaluation of liposomes of ketoconazole.*International Journal of Drug Delivery Technology*, v. 1, n. 1, p. 16 – 23, 2009.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; DE-CARVALHO, R. R.; ARAUJO, I. B.; PINTO, F. M.; BORGES, O. O.; SOUZA, C. A. M.; KURIYAMA, S. N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, n. 11, p. 1595 – 1601, 2002.

PRAJATI, V. D.; JANI, G. K.; KHANDA, S. M. Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers*, v.95, n. 1, p. 540-549, 2013.

RADULOVIC, M. D.; CVETKOVIC, O. G.; NIKOLIC, S. D.; DORDEVIC, D. S.; MAKOVLJEVIC, J. D.; VRVIC, M. Simultaneous production of pullulan and biosorption of metals by *Aureobasidium pullulans* strain CH-1 on peat hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 14, p. 6673 – 6677, 2008.

RESTREPO, A.; GÓMEZ, I.; CANO, L. E.; ARANGO, M. D.; GUTIÉRRES, F.; SANIN, A.; ROBLEDO, M. A. Treatment of paracoccidioidomycosis with ketoconazole: a three-year experience. *The American Journal of Medicine*, v. 74, n. 1, p. 48 – 52, 1983.

RICHARDS, A. B.; KRAKOWKA, S.; DEXTER, L. B.; SCHMID, H.; WOLTERBEEK, A. P. M.; WAALKENS-BERENDSEN, D. H.; SHIGOYUKI, A.; KURIMOTO, M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, n. 7, p. 871 – 898, 2002.

RINGDÉN, O.; MEUNIER, F.; TOLLEMAR, J.; RICCI, P.; TURA, S.; KUSE, E.; VIVIANI, M. A.; GORIN, N. C.; KLASTERSKY, .J; FENAUX, P.; PRENTICE, H. G.; KSIONSKI, G. Efficacy of amphotericin B encapsulated in liposomes (AmBisome)

in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 28, p. 73 – 82, 1991.

ROEHRS, M.; FIGUEIREDO, C. G.; ZANCHI, M. M.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; QUATRIN, A.; SOMACAL, S.; CONTE, L.; EMANUELLI, T. Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Endocrinology*, v. 2014, 2014.

ROGERS, T. E.; GALGIANI, J. N. Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against *Candida albicans in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 30, n. 3, p. 418 – 422, 1986.

ROSER, B. Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science & Tehcnology*, v. 2, p. 166 – 169, 1991.

RUBIM, A. M.; DOS SANTOS, M. R.; LAPORTA, L. V.; BANDEIRA, J. Validação de metodologia por UV/VIS para quantificação de cetoconazol em comprimidos. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 93, n. 4, p. 510- 514, 2012.

RUSSO, R.; NIGRO, L. C.; MINNITI, S.; MONTINERI, A.; GRANDONI, L.; CALDEIRA, L.; DAVIDSON, R. N. Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *Journal of Infection*, v. 32, n. 2, p. 133 – 137, 1996.

SAN JUAN, A.; BALA, M.; HLAWATY, H.; PORTES, P.; VRANCKX, R.; FELDMAN, L. J.; LETOURNEUR, D. Development of a functionalized polymer for stent coating in the arterial delivery of small interfering RNA. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 11, p. 3074 – 3080, 2009.

SCOTTER, M. J. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 26, p. 1123 – 1145, 2009.

SEAMAN, J.; BOER, C.; WILKINSON, R.; JONG, J. D.; DE WILDE, E.; SONDORP, E.; DAVIDSON, R. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. *Clinical Infectious Diseases*, v. 21, n. 1, p. 188 – 193, 1995.

SHAYANFAR, A.; JOUYBAN, A. Physicochemical characterization of a new cocrystal of ketoconazole. *Powder Technology*, v. 262, p. 242 – 248, 2014.

SHIGEMATSU, M. L.; UNO, J.; ARAI, T. Correlative studies on in vivo and *in vitro* effectiveness of ketoconazole (R41400) against *Candida albicans* infection. *Japanese Journal of Medical Mycology*, v. 22, n. 2, p. 195 – 201, 1981.

SHIN, S.; PYUN, M.-S. Anti-Candida effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 18, n. 10, p. 827 – 830, 2004.

SILVA, C. R.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological Research*, v. 43, n. 6, p. 561 – 566, 2001.

SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, n. 4, p. 515- 531, 2008.

SINGH, R. S.; KAUR, N.; RANA, V.; KENNEDY, J. F. Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 171, p. 102 – 121, 2017.

SKIBA, M.; SKIBA-LAHIANI, M.; MARCHAIS, H.; DUCLOS, R.; ARNAUD, P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 198, n. 1, p. 1 – 6, 2000.

ST-GERMAIN, G. Effects of pentamidine alone and in combination with ketoconazole or itraconazole on the growth of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, n. 12, p. 2304 – 2306, 1990.

SUGINOSHITA, Y.; TABATA, Y.; MATSUMURA, T.; TODA, Y.; NABESHIMA, M.; MORIYASU, F.; IKADA, Y.; CHIBA, T. Liver targeting of human interferon-II with pullulan based on metal coordination. *Journal of Controlled Release*, v. 83, n. 1, p. 75 – 88, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharide. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 1, p. 41- 46, 1998.

TAKAHASHI, N.; GOTO, T.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K.; KATO, S.; KUSUDO, T.; SAKAMOTO, T.; OHYANE, C.; LEE, J.-Y.; KIM, Y.-I.; UEMURA, T.; HIRAI, S.; KAWADA, T. Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPARγ activation. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 390, n. 4, p. 1372 – 1376, 2009.

TAKAMOTO, R. T. O. Caracterização e aplicação de nanodispersão de bixina. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, São Paulo.

TAO, S.; DE LA VEGA, M. R.; QUIJADA, H.; WONDRAK, G. T.; WANG, T.; GARCIA, J. G. N.; ZHANG, D. D. Bixin protects mice against ventilation-induced lung injury in an NRF2-dependent manner. *Scientific Reports*, v. 6, p. 18760, 2016.

THAKUR, C. P.; PANDEY, A. K.; SINHA, G. P.; ROY, S.; BEHBEHANI, K.; OLLIARO, P. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome ®) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, n. 3, p. 319 – 322, 1996.

TOLLEMAR, J.; RINGDÉN, O.; ANDERSSON, S.; SUNDBERG, B.; LJUNGMAN, P.; TYDÉN, G. Randomized double-blind study of liposomal amphotericin B (Ambisome) prophylaxis of invasive fungal infections on bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*, v. 12, n. 6, p. 577 – 582, 1993.

UNO, J.; SHIGEMATSU, M. L.; ARAI, T. Primary site of action of ketoconazole on *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 21, n. 6, p. 912 – 918, 1982.

VIEIRA, D. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Synthetic bilayer fragments for solubilization os amphotericin B. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 244, n. 2, p. 427 – 431, 2001.

WALSH, T. J.; YELDANDI, V.; MCEVOY, M.; GONZALEZ, C.; CHANOCK, S.; FREIFELD, A.; SEIBEL, N. I.; WHITCOMB, P. O.; JAROSINSKI, P.; BOSWELL, G.; BEKERSKY, I.; ALAK, A.; BUELL, D.; BARRET, J.; WILSON, W. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 9, p. 2391 – 2398, 1998.

WOLF, B. W. Use of pullulan as a slowly digested carbohydrate. Depositante: Abbott Laboratories. U.S. Patent n. 6,916,796 B2. Depósito: 12 jul. 2002. Concessão: 12 jul. 2005.

XU, Z.; KONG, X.-Q. Bixin ameliorates high fat diet-induced cardiac injury in mice through inflammation and oxidative stress suppression. *Biomedicine & Phamacotherapy*, v. 89, p. 991 – 1004, 2017.

YABIKU, H. Y.; TAKAHASHI, M. Y. Determinação de bixina em semntes de urucum: estudo colaborativo. *Revista do Instituto Adolf Lutz*, v. 52, p. 31 – 36, 1992.

YAMAGUCHI, R.; IWAI, H.; OTSUKA, Y.; YAMAMOTO, S.; UEDA, K.; USUI, M.; TANIGUCHI, Y.; MATUHASI, T. Conjugation of Sendai virus with pullulan and

immunopotency of the conjugated virus. *Microbiology and Immunology*, v. 29, n. 2, p. 163 – 168, 1985.

YAMAGUCHI, S.; SUNAMOTO, J. Fatty emulsion stabilized by a polysaccharide derivative. Depositante: Nippon Oil & Fats Co., Ltd. U.S. Patent n. 4,997,819. Depósito: 21 nov. 1989. Concessão: 5 mar. 1991.

ZAJIC, J. E.; LeDUY, A. Flocculant and chemical properties of a polysaccharide from *Pullularia pullulans*. *Applied Microbiology*, v. 25, p. 628 – 635, 1979.

ZECHMEISTER, L.; ESCUE, R.A stereochemical study of methylbixin. *Journal of the American Chemical Society*, v. 66, n. 3, 1944.

Apêndice

Protocolo do ensaio microbiológico

Determinação de microrganismos viáveis pela técnica de interação em meio líquido e detecção por plaqueamento *pour plate*

A – Preparação do Inóculo

Foi realizada subcultura de *Candida albicans* ATCC 10231 em meio SDA e incubação por 48 horas a 30 °C. A seguir, foi preparada suspensão de micro-organismos com 5 mL de água destilada estéril e desta, volume de 1 mL foi transferido para cada 50 mL de água estéril.

B – Peparação das amostras

Foram avaliadas as amostras conforme Tabela 1 e Figura 9.

Tabela 10 - Amostras para contagem de microrganismos viáveis por plaqueamento *pour plate*

Amostra	Concentração final	BX em água	BX em pullulan	água
CC	DMSO 0,5%	**+**	-	-
1C	AnB 5,0 µg/mL	**+**	-	-
2C	AnB 2,5 µg/mL	**+**	-	-
3C	AnB 1,0 µg/mL	**+**	-	-
4C	KT 20,0 µg/mL	**+**	-	-
5C	KT 10,0 µg/mL	**+**	-	-
CD	DMSO 0,5%	-	**+**	-
1D	AnB 5,0 µg/mL	-	**+**	-
2D	AnB 2,5 µg/mL	-	**+**	-
3D	AnB 1,0 µg/mL	-	**+**	-
4D	KT 20,0 µg/mL	-	**+**	-
5D	KT 10,0 µg/mL	-	**+**	-
CE	DMSO 0,5%	-	-	**+**
1E	AnB 5,0 µg/mL	-	-	**+**
2E	AnB 2,5 µg/mL	-	-	**+**
3E	AnB 1,0 µg/mL	-	-	**+**
4E	KT 20,0 µg/mL	-	-	**+**
5E	KT 10,0 µg/mL	-	-	**+**

Foi preparada solução de BX com concentração de pelo menos 0,80 mM em etanol e o seu teor real foi determinado por espectrofotometria pelo método de Yabiku & Takahashi (1992).

Foram preparadas soluções de anfotericina B (solução A) e cetoconazol (solução B), pesando 10,0 mg (A) e 40 mg (B), respectivamente, e dissolvendo os antifúngicos em 5 mL de DMSO p.a. e depois, adicionando 5 mL de etanol e homogeneizando as soluções.

A partir destas soluções (A) e (B), foram preparadas as amostras da Tabela A.

Tabela A – Preparação inicial de antifúngicos em etanol

Amostra	Concentração final	Solução A (mL)	Solução B (mL)	Etanol (mL)
CA	DMSO 10%	4	-	16
1A	AnB 200 µg/mL	4	-	16
2A	AnB 100 µg/mL	2	-	18
3A	AnB 40 µg/mL	1	-	19
4A	KT 800 µg/mL	-	4	16
5A	KT 400 µg/mL	-	2	18

A partir de cada uma das preparações de CA até 5A, foram preparadas as próximas amostras (Tabela B).

Tabela B – Preparação de amostras em solução etanólica

Amostra	Concentração final	Preparações (5 mL)	Solução BX etanólica (5 mL)	Etanol (5 mL)
CB	DMSO 5%	**CA**	+	-
1B	AnB 100 µg/mL	**1A**	+	-
2B	AnB 50 µg/mL	**2A**	+	-
3B	AnB 20 µg/mL	**3A**	+	-
4B	KT 400 µg/mL	**4A**	+	-
5B	KT 200 µg/mL	**5A**	+	-
CBA	DMSO 5%	**CA**	-	+
1BA	AnB 100 µg/mL	**1A**	-	+
2BA	AnB 50 µg/mL	**2A**	-	+
3BA	AnB 20 µg/mL	**3A**	-	+
4BA	KT400 µg/mL	**4A**	-	+
5BA	KT 200 µg/mL	**5A**	-	+

A partir das preparações da Tabela B, foram preparadas as amostras da Tabela C.

Tabela C – Preparação de amostras em soluções de pullulan 1%

Amostras	Concentração final	Preparações (1 mL)	Água (9 mL)	Pullulan 1% (9 mL)
CC	DMSO 0,5%	**CB**	+	-
1C	AnB 10,0 µg/mL	**1B**	+	-
2C	AnB 5,0 µg/mL	**2B**	+	-
3C	AnB 2,0 µg/mL	**3B**	+	-
4C	KT 40,0 µg/mL	**4B**	+	-
5C	KT 20,0 µg/mL	**5B**	+	-
CD	DMSO 0,5%	**CB**	-	+
1D	AnB 10,0 µg/mL	**1B**	-	+
2D	AnB 5,0 µg/mL	**2B**	-	+
3D	AnB 2,0 µg/mL	**3B**	-	+
4D	KT 40,0 µg/mL	**4B**	-	+
5D	KT 20,0 µg/mL	**5B**	-	+
CE	DMSO 0,5%	**CBA**	+	-
1E	AnB 10,0 µg/mL	**1BA**	+	-
2E	AnB 5,0 µg/mL	**2BA**	+	-
3E	AnB 2,0 µg/mL	**3BA**	+	-
4E	KT 40,0 µg/mL	**4BA**	+	-
5E	KT 20,0 µg/mL	**5BA**	+	-

Para a interação com *C. albicans*, foram realizadas as misturas conforme Tabela D, utilizando a última diluição de inóculo recém-preparada.

Todas as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 2 horas para interação e a seguir, transferidos volumes de 1,0 mL de cada uma das preparaçõespara placas de Petri estéreis e em triplicata. A seguir, foram transferidos volumes de cerca de 12 mL de meio SDA fundido entre 50 - 55 °C, homogeneizados cuidadosamente e deixados para solidificar. Amostras foram Incubadas a 30 ± 2,0 °C e realizadas contagens dos microrganismos viáveis. Como controle, foram plaqueados inóculos sem amostras nas mesmas concentrações celulares das mesmas.

Tabela D – Interação entre micro-organismos e amostras de antifúngicos

Inoculados	Concentração final	Preparações (10,0 mL)	Inóculo (10,0 mL)
CCi	DMSO 0,2%	**CC**	+
1Ci	AnB 5,0 µg/mL	**1C**	+
2Ci	AnB 2,5 µg/mL	**2C**	+
3Ci	AnB 1,0 µg/mL	**3C**	+
4Ci	KT 20,0 µg/mL	**4C**	+
5Ci	KT 10,0 µg/mL	**5C**	+
CDi	DMSO 0,2%	**CD**	+
1Di	AnB 5,0 µg/mL	**1D**	+
2Di	AnB 2,5 µg/mL	**2D**	+
3Di	AnB 1,0 µg/mL	**3D**	+
4Di	KT 20,0 µg/mL	**4D**	+
5Di	KT 10,0 µg/mL	**5D**	+
CEi	DMSO 0,2%	**CE**	+
1Ei	AnB 5,0 µg/mL	**1E**	+
2Ei	AnB 2,5 µg/mL	**2E**	+
3Ei	AnB 1,0 µg/mL	**3E**	+
4Ei	KT 20,0 µg/mL	**4E**	+
5Ei	KT 10,0 µg/mL	**5E**	+
Inóculo*	Referência do Tempo zero	**Água estéril**	+

*inóculo – antes de plaquear o inóculo, foi realizada diluição seriada até 10^{-7} e plaqueadas em duplicata, as 3 últimas diluições.

Amostras foram mantidas em ambiente limpo sob proteção da luz e à temperatura ambiente. Repetições das contagens foram realizadas nos tempos 24 e 48 horas, conforme descrito anteriormente. Foram plaqueados os controles do inóculo sem amostras nas mesmas concentrações celulares e condições de armazenamento.