

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**FERRAMENTAS DE QUALIDADE POR DESIGN NO
DESENVOLVIMENTO DO PRODUTO AMBISOME®: ESTUDO DE
CASO.**

Felipe Romano Seixo

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo.

Orientadora:

Profa Dra. Fernanda Isadora Boni

São Paulo

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço à força criadora do Universo por todas as oportunidades de aprendizado.

Agradeço à minha orientadora, a Professora Dra. Fernanda Isadora Boni, pela mentoria, paciência e apoio. Suas sugestões e críticas construtivas foram essenciais para a finalização deste trabalho.

Expresso à professora Dra. Nádia Araci Bou Chacra a minha profunda gratidão por toda ajuda, pelas valiosas ideias e pelas discussões enriquecedoras que contribuíram para esta construção.

À minha mãe, Eliana Lima Romano, sou eternamente grato por sempre acreditar nos meus sonhos. Sua confiança me inspira a seguir em frente.

À querida amiga, Marise Ferreira, sou imensamente grato por toda ajuda. Sua presença foi como uma luz nos momentos em que eu mais precisei, e seu apoio fez toda a diferença na minha jornada. Jamais esquecerei a sua generosidade e amizade.

Ao professor Dr. Bruno Nicolau Paulino, agradeço profundamente por ter sido o primeiro a estimular minha paixão pelas Ciências Farmacêuticas. Sua confiança em mim, especialmente quando compartilhei a ideia de mudar de cidade, foi fundamental para meu crescimento e desenvolvimento. Obrigado por sempre acreditar em meu potencial.

Aos meus amigos, com quem convivi ao longo desses anos de curso, agradeço pelo incentivo e pelo impacto significativo que tiveram na minha formação acadêmica.

“Never be ashamed of trying. Effortlessness is a myth”

Taylor Alison Swift

RESUMO

SEIXO, R. F. **Ferramentas de qualidade por design no desenvolvimento do produto AmBisome®: estudo de caso.** 2024. Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Palavras-chave: AmBisome; qualidade por design; lipossoma; anfotericina lipossomal

INTRODUÇÃO: A Qualidade por Design (QpD) refere-se ao conjunto de estratégias sistemáticas que se inicia com metas predefinidas, evidenciando o entendimento e a regulação de processos e de produtos. Essas estratégias são fundamentadas em base racional-científica e na gestão eficaz de risco de qualidade. Na indústria farmacêutica essa abordagem promove a otimização de processos e do desenvolvimento de novos medicamentos, visando garantir sua qualidade, eficácia e segurança. O AmBisome® foi desenvolvido em 1997, pela NeXstar Pharmaceuticals. Sua formulação é baseada em lipossomas de anfotericina B, um antifúngico extensivamente utilizado na terapia medicamentosa contra infecções graves e sistêmicas. Na época do seu desenvolvimento e lançamento, a abordagem de QpD ainda não era amplamente empregada na indústria farmacêutica e, portanto, a gestão de risco e o design de processos de qualidade não estavam tão sistematicamente integrados como atualmente. **OBJETIVO:** O objetivo do presente trabalho foi a avaliação crítica da formulação e do processo produtivo do AmBisome®, considerando os conceitos de QpD. **MATERIAL E MÉTODOS:** O trabalho foi realizado por meio de uma revisão integrativa utilizando bancos de dados da literatura em português e inglês, publicados de 1997 a 2024. Foram utilizados os termos “Qualidade por Design” e “AmBisome”, combinados com operadores booleanos. **RESULTADO e DISCUSSÃO:** Os diversos elementos da abordagem QpD, suas justificativas, assim como a avaliação de risco e definição do delineamento experimental e espaço do desenho puderam ser analisados e discutidos, permitindo um entendimento crítico no que tange a obtenção do produto de interesse. **CONCLUSÃO:** A aplicação da Qualidade por Design ampliou o entendimento do processo de fabricação do AmBisome®, identificando fatores críticos que afetam sua eficácia, segurança e estabilidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral da aplicação da abordagem QpD.	12
Figura 2. Diagrama esquemático das interações entre os elementos de QpD.	13
Figura 3. Representação da anfotericina B (AmB).	15
Figura 4. Representação da vesícula lipossomal.	17
Figura 5. Representação gráfica do mecanismo de ação teorizado para AmBisome®.	19
Figura 6. Produto AmBisome®.	20
Figura 7. Fluxograma do processo produtivo da obtenção de lipossomas.	31
Figura 8. Diagrama de Ishikawa para o produto AmBisome®.	34
Figura 9. Gráficos de superfície de resposta.	40
Figura 10. Espaço do Desenho considerando os PCPs avaliados.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de Qualidade Alvo do Produto para AmBisome [®] , 50 mg.	22
Tabela 2. Atributos Críticos da Qualidade para AmBisome [®] , 50 mg.	25
Tabela 3. Atributos Críticos do Material para AmBisome [®] , 50 mg.	29
Tabela 4. Informações químicas sobre conteúdo lipídico para o AmBisome [®] , 50 mg.	30
Tabela 5. Parâmetros Críticos do Processo para AmBisome [®] , 50 mg.	32
Tabela 6. Resultados da matriz de risco ilustrando os efeitos dos ACQs no perfil de qualidade alvo do produto AmBisome [®]	37
Tabela 7. Resultados da matriz de risco ilustrando os efeitos dos ACMs e dos PCPs nos ACQs para o AmBisome [®]	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AmB	Anfotericina B
ACM	Atributo Crítico de Material
ACQ	Atributo Crítico de Qualidade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC ₀₋₂₄	Área sobre a curva
Cl	Clearence
C _{máx}	Concentração máxima
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSPG	Distearoil fosfatidilglicerol
EE%	Eficiência de encapsulamento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMEA	<i>Failure Mode and Effect Analysis</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HSPC	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
IFA	Ingrediente farmacêutico ativo
IN	Instrução Normativa
L-AmB	AmBisome [®]
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
NPR	Número de Prioridade de Risco
QbT	<i>Quality by Testing</i>
QpD	Qualidade por Design
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCP	Parâmetro Crítico de Processo
PQAP	Perfil de qualidade alvo do produto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
T _½	Tempo de meia-vida
V _{eq}	Volume de distribuição em estado de equilíbrio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO(S).....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
4.1 Qualidade por design (QpD): Fundamentos e Princípios Básicos	11
4.2 Anfotericina B: Propriedades e Aplicações	14
4.3 AmBisome®: Aspectos gerais	16
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	21
5.1 Perfil de Qualidade Alvo do Produto – PQAP	21
5.2 Atributos Críticos da Qualidade – ACQ.....	24
5.3 Atributos Críticos do Material – ACM	28
5.4 Parâmetros Críticos do Processo – PCP	30
5.5 Avaliação de Risco – AR	34
5.6 Delineamento Experimental (DE) e Espaço de Desenho (ED)	38
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

A busca da excelência na indústria farmacêutica é incansavelmente estimulada mediante a necessidade de garantir a segurança, a qualidade e a eficácia dos medicamentos. Para alcançar esses objetivos são adotadas estratégias que visam minimizar os riscos, otimizar os processos e reduzir os custos, além de prevenir problemas graves e indesejados associados ao produto final. Neste contexto, a qualidade por design (QpD) emerge como uma abordagem atrativa e potencialmente eficaz. O conceito de QpD refere-se ao conjunto de estratégias sistemáticas aplicadas ao desenvolvimento de produtos e processos, fundamentado em base racional-científica e na gestão eficaz de risco de qualidade. Essa abordagem teve seu início na década de 50, a partir dos conceitos propostos por Joseh Moses Juran, engenheiro da Takeda Pharma. Juran defendeu que a qualidade, a segurança e a eficácia de produtos deveriam ser asseguradas desde a sua concepção, empregando planejamento estatístico, e que o controle e gestão de riscos permitiria auxiliar no alcance dos atributos de qualidade pré-definidos^{1,2,3,4}.

Os conceitos, elementos e ferramentas do QpD foram introduzidos no setor farmacêutico nos anos 2000, principalmente, por meio do guia *Pharmaceutical Development (Q8)*, que estabeleceu a base para a aplicação dessa abordagem no desenvolvimento de medicamentos. Os principais elementos que compõem o QpD são: Perfil de Qualidade Alvo do Produto – PQAP (*Quality target product profile – QTPP*), Atributos Críticos da Qualidade – ACQ (*Critical quality attributes – CQA*), Atributos Críticos do Material – ACM (*Critical material attributes – CMA*), Parâmetros Críticos do Processo – PCP (*Critical Process Parameters – CPP*) e o Espaço de Desenho – ED (*Design Space – DS*)^{5,6,7,20}.

Até a inserção formal do QpD na indústria farmacêutica, muitos medicamentos inovadores, incluindo aqueles baseados em tecnologias avançadas como a nanotecnologia, foram desenvolvidos e lançados sem uma abordagem estruturada de controle de qualidade. Dentre estes, o AmBisome[®] desenvolvido pela NeXstar Pharmaceuticals, em 1997. Esse medicamento baseia-se na formulação lipossomal da anfotericina B, um antifúngico extensivamente utilizado na terapia medicamentosa contra infecções graves e sistêmicas. Além de sua indicação convencional, o AmBisome[®] demonstra potencial aplicação na terapia antitumoral e no tratamento das leishmanioses. A formulação inovadora conferiu maior estabilidade à anfotericina, e mitigou os efeitos adversos inerentes e associados à terapia não lipossomal. Nesse

sentido, a aplicação desse novo medicamento, na prática clínica, permitiu maior perfil de segurança, quando comparado às formulações convencionais^{8,9,10,11}.

O AmBisome[®] foi delineado aplicando os conceitos de obtenção de lipossomas, que são estruturas esféricas constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas, capazes de encapsular uma fase aquosa em seu interior. Essas vesículas possuem elevada semelhança com as membranas celulares e têm a capacidade única de transportar substâncias hidrofílicas e lipofílicas, atuando como veículos para a liberação modificada de fármacos^{12,13}.

Considerando a exigência regulatória da aplicação do QpD no desenvolvimento de preparações farmacêuticas, o presente estudo busca apresentar e aplicar as ferramentas dessa abordagem sistemática no produto AmBisome[®].

2. OBJETIVO(S)

O objetivo do presente trabalho foi a avaliação crítica da formulação e do processo produtivo do produto AmBisome[®] considerando os conceitos da qualidade por design.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido por meio de uma revisão integrativa, baseada nos bancos de dados da literatura, tais como: Google Scholar, Google Patents, PubMed/Medline, Scielo e Scopus. A estratégia de busca esteve centralizada na obtenção de artigos e patentes no idioma português e inglês, publicados a partir de 1997, ano em que o produto farmacêutico foi aceito pela FDA (*Food and Drug Administration*), até 2024.

Foram utilizados os seguintes termos para pesquisa: “Qualidade por Design”, “Quality by Design”; “AmBisome”, “liposomal amphotericin B”, combinados por meio de operadores booleanos. Os dados coletados incluíram: os componentes do medicamento, propriedades físico-químicas e biológicas, atributos microbiológicos, processo de fabricação, entre outros parâmetros necessários para aplicação das ferramentas de QpD. O documento ICH Q8, versão R2 foi utilizado como modelo orientativo dos princípios da aplicação do QpD no desenvolvimento do produto farmacêutico de interesse, assim como o documento intitulado de *Pharmaceutical Development Report Example QbD for IR Generic Drugs* e o *Liposome Drug Products: Guidance for Industry*.

Como critérios de exclusão, foram considerados não aptos ao estudo as teses e dissertações. Também não foram incorporados os documentos em idiomas diferentes dos previamente fixados, e literatura científica que não apresentasse as informações referentes à composição, caracterização e método de obtenção da anfotericina lipossomal.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Qualidade por design (QpD): Fundamentos e Princípios Básicos

A QpD, conceito extensivamente discutido, foi introduzido à nível mundial, a partir dos trabalhos do Dr. Joseph M. Juran, na década de 50. Essa abordagem pode ser descrita como uma metodologia sistemática para o desenvolvimento de produtos, que se inicia com objetivos claramente estabelecidos e foca na compreensão detalhada do processo produtivo, baseando-se em ciência sólida e gestão de risco de qualidade^{5,7,14}.

No âmbito farmacêutico, essa abordagem obteve sua consolidação por meio da FDA (*Food and Drug Administration*), mediante a publicação (2004) de dois documentos: o *Pharmaceutical Control Good Manufacturing Practices (cGMPs) for the 21st Century* e o *Guidance for Industry Process Analytical Technology (PAT)*^{15,16}. Além disso, a abordagem de QpD, foi amplamente aprimorada e difundida por intermédio da ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), após a publicação do guia ICH Q8 (R2), em 2009¹⁷.

No Brasil, a adoção da QpD é estimulada desde 2016, ano em que o país passou a ser signatário do ICH. A partir desse momento, iniciou-se uma série de adequações para atender às novas diretrizes internacionais. Um exemplo dessas ações, foi a concepção da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 301, que discute as diretrizes gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Em adição, à RDC, houve também a criação da Instrução Normativa (IN) nº 47, que aborda as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de qualificação e validação. Ambos os documentos destacam princípios referentes tanto ao gerenciamento de risco da qualidade quanto à QpD^{18,19}.

O objetivo principal da QpD, é proporcionar maior flexibilidade durante o processo de fabricação, alcançando desenvolvimento rápido e aprimorado do produto. Comparada ao método convencional de análise, como a Qualidade por Testagem (*Quality by Testing – QbT*), a QpD oferece diversos benefícios, incluindo a abordagem sistemática do processo, possibilidade de verificação contínua e o uso de métodos

estatísticos de controle de processo. Baseada em ações preventivas e na análise de riscos, a QpD resulta em processos mais robustos, produtos de qualidade superior, maior eficiência operacional e, por fim, na maior probabilidade de que o produto final alcance seus atributos de qualidade e especificações²⁰.

Um estudo de QpD compreende a aplicação de seus elementos e ferramentas. Os elementos dessa abordagem são divididos em: Perfil de Qualidade Alvo do Produto – PQAP (*Quality target product profile* – QTPP), Atributos Críticos da Qualidade – ACQ (*Critical quality attributes* – CQA), Atributos Críticos do Material – ACM (*Critical material attributes* – CMA), Parâmetros Críticos do Processo – PCP (*Critical Process Parameters* – CPP) e o Espaço de Desenho – ED (*Design Space* – DS). Já as ferramentas são divididas em: Delineamento Experimental – DE (*Design of Experiments* – DoE) e a Avaliação de Risco – AR (*Risk Assessment* – RA).

A Figura 1 apresenta os passos para o desenvolvimento de um produto farmacêutico baseado em QpD.

Figura 1. Fluxograma geral da aplicação da abordagem QpD.



Fonte: MINETO, 2021²². ADAPTADO

O PQAP é o ponto de partida para a aplicação da abordagem de QbD no desenvolvimento de um medicamento. Esse elemento resume as características esperadas do produto final, semelhantes às suas especificações. O PQAP direciona a coleta de informações para assegurar a eficácia e segurança terapêutica, abrangendo aspectos como indicação, dose, forma farmacêutica, mecanismo de liberação, via de administração, perfil farmacocinético, especificações de qualidade (pureza, estabilidade, esterilidade), material de acondicionamento, dentre outros atributos específicos da tecnologia do medicamento^{6,7,14,23,24,109}.

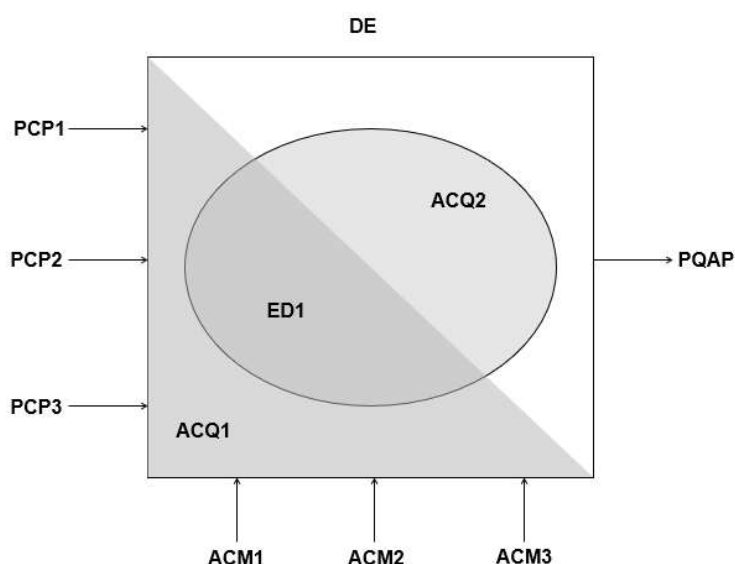
Os ACQs referem-se às características físicas, químicas ou biológicas

esperadas do produto que devem estar dentro de uma faixa específica para garantir sua qualidade, isto é, informações referentes à saída do produto. Segundo o ICH⁵, esses atributos estão associados ao insumo farmacologicamente ativo (IFA), aos excipientes, produtos intermediários e final. Zhang e Mao (2017)²⁵ sugerem que os ACQs também podem incluir informações a respeito da identidade, teor, conteúdo, liberação e dissolução.

Em contrapartida, os ACMs indicam as propriedade ou característica física, química, biológica ou microbiológica de determinado material de entrada e que necessariamente deve estar dentro de um limite adequado para garantir a qualidade desejada, seja da substância, excipiente ou material em processo⁵. Por fim, os PCPs são aqueles parâmetros relacionados ao processo de obtenção do medicamento, assim como os ACMs, sua variabilidade impacta significativamente em algum ACQ. Dessa forma, precisam ser monitorados ou controlados para assegurar a produção de um medicamento com a qualidade desejada^{5,6}.

Os elementos ACQ, ACM e PCP da abordagem QpD, são fundamentais para estruturar o processo produtivo, facilitando seu desenvolvimento e aprimoramento¹⁰⁹. A Figura 2 demonstra como esses elementos podem estar relacionados, além de expor interações com outros elementos da QpD.

Figura 2. Diagrama esquemático das interações entre os elementos de QpD.



Legenda: PCP = Parâmetro Crítico de Processo, ACM = Atributo Crítico de Material, ACQ = Atributo Crítico de Qualidade, ED = Espaço de Design, PQAP = Perfil de Qualidade do Produto, ED = Delineamento experimental. **Fonte:** FUKUDA *et al.*, 2018, ADAPTADO¹⁰⁹.

O último elemento, denominado Espaço de Desenho – ED, avalia a interação entre

as informações coletadas anteriormente, e define o conjunto de condições e intervalos de confiança que garantem a qualidade do produto final^{5,6,7}. Yu e colaboradores, em 2008¹ estabeleceram que esse elemento é definido pela combinação e interação de fatores de entrada, como ACM e PCP e que mediante a análise é capaz de garantir qualidade, segurança e eficácia. Ajustes em processo e material, dentro das regiões seguras do ED, não são consideradas modificações sujeitas a notificação, proporcionando flexibilidade regulatória, pois garantem a manutenção dos atributos de qualidade do produto.

Dentre as ferramentas fundamentais do QpD, destaca-se o Delineamento experimental – DE, uma abordagem que utiliza modelos matemáticos e base estatística para realizar testes de maneira sistemática e identificar as relações entre as variáveis independentes (fatores de entrada), e as variáveis dependentes (fatores de saída). As variações nos fatores de entrada de forma sistematizada, são realizadas para avaliar os efeitos nas variáveis de saída, auxiliando na identificação dos fatores mais relevantes, na compreensão das interações entre as variáveis independentes e na determinação das condições ideais para alcançar a qualidade preestabelecida. O planejamento de DE é dividido em exploratório e de otimização. Para a execução dessa etapa, podem ser utilizados diversos softwares, incluindo Design Expert e MATLAB^{5,7,26}.

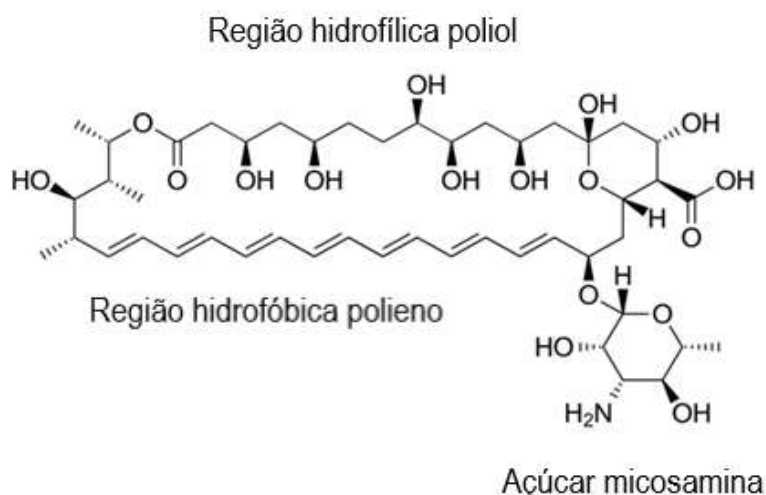
A distinção das fontes que causam variação significativa em um sistema/processo/produto e sua consequente priorização é conhecida como avaliação de risco. Essa ferramenta é um componente do gerenciamento de risco da qualidade e é composta por três elementos principais: a identificação de riscos, a análise de risco e a estimativa de risco. Modelos como Diagrama de Iskawa, e a análise de modos de falha e seus efeitos são sugeridas pelo ICH Q9 para o desenvolvimento dessa ferramenta na QpD^{5,7}.

4.2 Anfotericina B: Propriedades e Aplicações

A anfotericina B (AmB) é um antibiótico de amplo espectro, produzido pelo microorganismo *Streptomyces nodosus*, muito empregada no combate às infecções fúngicas sistêmicas, potencialmente fatais⁴⁷. Trata-se de uma lactona macrocíclica com características anfifáticas, apresentando sete ligações duplas na porção hidrofóbica do anel e numerosos grupos hidroxila na porção hidrofílica. Possui ainda em sua estrutura um grupamento ionizável (ácido carboxílico, pKa = 5,7) localizado no carbono 16 (C16) e um resíduo de micosamina básico (pKa = 10) no carbono 19 (C19). Ambos os grupamentos ionizam-se em valores de pH próximos à neutralidade^{29,30,31}.

Sabe-se que a AmB é insolúvel em água em valores de pH entre 6 e 7, mas é ligeiramente solúvel ($\sim 0,1$ mg/mL) em valores de pH extremos, como 2 ou 11. Outrossim, a AmB é solúvel em DMF, DMSO e propilenoglicol, e ligeiramente solúvel em álcool metílico²⁷. A representação da molécula de AmB está apresentada na Figura 3.

Figura 3. Representação da anfotericina B (AmB).



Fonte: FAUSTINO; PINHEIRO, 2020, ADAPTADO³¹.

Em relação ao efeito biológico, consta que a AmB forma complexos com o ergosterol nas membranas celulares dos fungos e com o lanosterol em algumas espécies de *Leishmania spp.*, criando canais que causam extravasamento de componentes celulares. Além disso, a AmB estimula a produção de radicais de oxigênio nos fungos e modula a atividade dos macrófagos, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias, intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico^{32,33,34}. Dependendo da suscetibilidade do micro-organismo, concentração e pH, a AmB pode ser fungistática ou fungicida, e sua atividade máxima é obtida em uma faixa de pH de 6,0 à 7,5. Adicionalmente, esse fármaco é instável em meio ácido e possui instabilidade frente a radiação UV e temperatura, exigindo armazenamento entre 2 à 8 °C, em recipientes herméticos e protegido da luz. A elevada massa molecular (MM = 924,08), a baixa solubilidade em água e a permeabilidade reduzida contribuem para seu variável perfil farmacocinético e baixa biodisponibilidade por via oral^{31,35,36,37,38}.

A AmB, em solução aquosa, possui a propriedade de se autoassociar, resultando na formação de dímeros e oligômeros solúveis, essas espécies podem ainda se reorganizar dando origem a poliagregados de baixa solubilidade aquosa³¹. Sabe-se que a proporção de formação desses agregados, depende da concentração total do ativo,

temperatura, tipo de formulação e composição da membrana do agente infeccioso, e podem resultar em problemas de eficácia e toxicidade do fármaco^{39,40,41}.

A formulação convencional de anfotericina B (D-AmB) usada clinicamente é uma suspensão micelar de AmB com desoxicolato de sódio, conhecida como Fungizone^{®42}. Essa apresentação pode induzir a liberação rápida do princípio ativo e os tensoativos utilizados podem induzir toxicidade. Apesar de sua eficácia, a forma convencional de AmB possui uma janela terapêutica estreita, o que pode levar a diversos efeitos colaterais, especialmente nefrotoxicidade. Isso ocorre porque a AmB tem afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), resultando na captação dos complexos LDL-AmB por endocitose mediada por receptores nas células tubulares renais, que possuem baixa expressão de receptores para lipoproteínas de alta densidade (HDL)^{29,31,43,44}.

Atualmente, o mercado oferece diversas formulações de AmB que ampliam o índice terapêutico e reduzem os efeitos tóxicos, sendo que as formulações lipídicas contribuem em grande parte para essa melhoria. Três formulações lipídicas de AmB estão disponíveis atualmente: AmBisome[®] (L-AmB, anfotericina B lipossomal; Gilead Sciences Inc., Foster City, CA, EUA), na qual o fármaco é internalizado na bicamada lipídica de lipossomas, Abelcet[®] (ABLC, complexo lipídico de anfotericina B; Enzon Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ, EUA; Cephalon Limited, Welwyn Garden City, Reino Unido), em que essas estruturas lipídicas microscópicas estão dispostas em forma de fita e Amphocil/Amphotec[®] (ABCD, dispersão coloidal de anfotericina B; Three River Pharmaceuticals Inc., Cranberry Township, PA, EUA), no qual a AmB forma uma estrutura lipídica, em forma de disco, com colesterilsulfato de sódio^{31,45}.

4.3 AmBisome[®]: Aspectos gerais

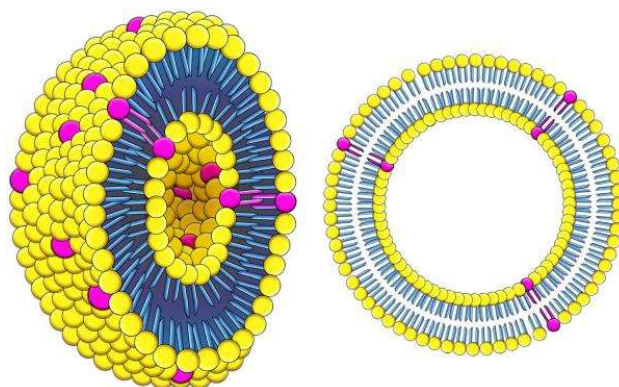
O AmBisome[®] (L-AmB), é a apresentação lipossomal unilamelar da AmB. O delineamento dessa formulação teve como objetivo superar os desafios referentes aos efeitos tóxicos inerentes ao fármaco e à sua baixa solubilidade em água. Tais desafios puderam ser minimizados a partir da obtenção da formulação lipossomal^{34,46}.

Patrocinada pela Fujisawa Healthcare Inc., IL, atual Astellas Pharma Inc. e desenvolvida pela NeXstar Pharmaceuticals, a formulação obteve sua aprovação pela FDA (*Food and Drug Administration*), em 1997⁹⁰, baseada em estudos clínicos que demonstraram sua eficácia no tratamento de infecções fúngicas invasivas, como candidíase sistêmica e aspergilose e no tratamento de leishmaniose visceral. Em 1999, a farmacêutica NeXstar foi adquirida pela Gilead Sciences Inc., que passou a deter a produção e comercialização do medicamento. No Brasil, sua distribuição é de

responsabilidade da United Medical Ltda^{47,48}.

A composição do AmBisome[®], consiste em fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), distearoil fosfatidilglicerol (DSPG), colesterol e AmB em uma proporção molar de 2:0,8:1:0,4, respectivamente. Adicionalmente, quantidades de 0,64 mg de α -tocoferol, 900 mg de sacarose e 27 mg de succinato dissódico hexaidratado são adicionados como excipientes na formulação⁸⁸. Dentre os componentes do lipossoma, o HSPC está presente na maior parte da bicamada lipídica, seu ponto de transição da fase gel para líquido-cristal é maior que 37°C, reduzindo o risco de sofrer hidrólise na temperatura corporal e, portanto, conferindo integridade à vesícula. O DSPG, é carregado negativamente, e interage com o grupo amina da micossamina pertencente a AmB, formando um complexo estável. Já o colesterol, por meio de interações hidrofóbicas, permite a encapsulação do fármaco na parte interna da bicamada lipídica, estabilizando-o. O α -tocoferol, um agente antioxidante, é utilizado para prevenir a oxidação lipídica da formulação. Os lipossomas presentes no AmBisome[®] possuem tamanho médio de 80 nm e massa molecular de 924,08 g/mol⁵⁰. A representação esquemática da estruturação do lipossoma está apresentada na Figura 4^{49,50,51,82}.

Figura 4. Representação da vesícula lipossomal.



Legenda: Em coloração magenta, Anfotericina B. Em amarelo e azul, fosfolípidos.

Fonte: CAVASSIN *et al.*, 2021⁵¹.

A obtenção da vesícula lipídica de AmB é descrita detalhadamente na patente US5965156A⁵², a qual revela as etapas para a produção, em escala comercial, do medicamento. O processo produtivo do AmBisome[®] emprega técnicas amplamente utilizadas, a exemplo da hidratação de filme lipídicos produzidos a partir da evaporação do solvente e uso de força de cisalhamento para formação dos lipossomas nanométricos. Esse processo é responsável pela definição da estrutura física da formulação, e erros atrelados a esta etapa podem resultar em alterações de

biodisponibilidade do fármaco associado, bem como no aumento da toxicidade⁵².

Diferentes formulações genéricas foram aprovadas fora dos Estados Unidos, entretanto muitos destes produtos tiveram sua comercialização suspensa por apresentarem níveis de toxicidade superiores ao do referência, mesmo possuindo composição idênticas^{53,54}.

De acordo com a bula do AmBisome[®], a formulação lipossomal consiste em um pó liofilizado estéril para ser administrado após a reconstituição, por infusão endovenosa em um período de 30 à 60 minutos. Cada frasco contém uma dose de 50 mg de fármaco. Para manter a estabilidade e a eficácia do produto, são adicionados succinato dissódico hexahidratado e sacarose como agentes tamponantes. Além disso, o pH da dispersão coloidal é ajustado para ficar entre 5 e 6 após o processo de reconstituição com água estéril para injeção⁵⁵, utilizando ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio.

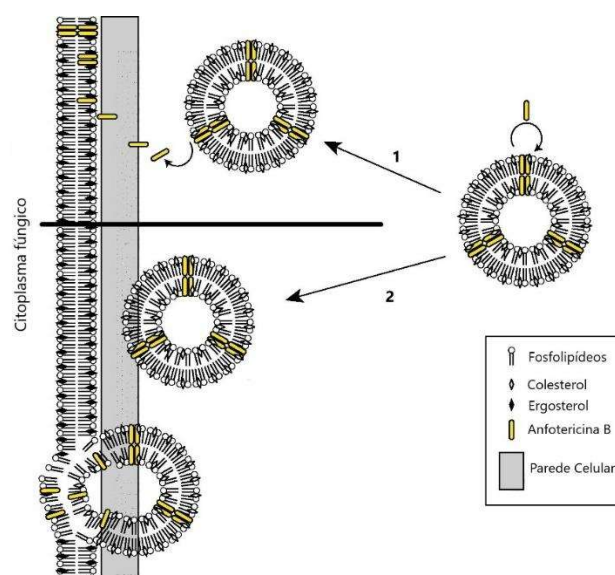
As características da vesícula lipídica conferem reduzida toxicidade e adequada estabilidade quando comparadas à formulação convencional de AmB, o Fungizone[®], e Abelcet[®], permitindo que os lipossomas alcancem de forma eficiente os locais de infecção fúngica. Sabe-se, ainda, que as propriedades de carga elétrica, comprimento da cadeia, número de insaturações e à razão fosfolípido/AmB, contribuem efetivamente para esse efeito. Tais características proporcionam melhora na eficácia terapêutica e ao mesmo tempo minimizam os efeitos adversos nos tecidos saudáveis^{31,56}.

O mecanismo de ação do AmBisome[®] pode estar relacionado à sua capacidade de interagir com componentes específicos presentes em patógenos. Após a administração, a vesícula lipídica circula intacta na corrente sanguínea e se fixa preferencialmente à parede celular dos fungos e à membrana citoplasmática dos parasitas, permitindo a liberação direcionada da AmB nas estruturas dos agentes infecciosos. Este contato favorece um estado de perturbação do lipossoma, e nesta etapa, sugere-se diferentes possíveis mecanismos: 1. a AmB é liberada após o primeiro contato do lipossoma com a célula do agente infeccioso e 2. o lipossoma atravessa a célula do agente infeccioso facilitando a transferência do princípio ativo. Ambos os mecanismos propostos corroboram para que o agente poliênico possa exercer sua atividade, formando poros e levando ao vazamento de íons e à morte celular^{50,57,58,59,60}.

Em 2006, Takemoto e colaboradores⁵⁷ observaram, em modelo murino, que os lipossomas se acumulavam em locais infectados por *Aspergillus fumigatus* ou *Candida albicans*, com ou sem AmB. Essa alta concentração de lipossomas nas áreas de infecção sugerem uma afinidade do sistema pelo ergosterol presente nos

microrganismos. Em 2010, Shimizu e colaboradores⁵⁹ mostraram que a temperatura corporal influenciava a transição da bicamada lipossomal de gel para cristal líquido, o que ajuda a entender melhor a liberação de AmB associada ao lipossoma. A Figura 5 demonstra os processos associados ao mecanismo de ação do AmBisome®.

Figura 5. Representação gráfica do mecanismo de ação teorizado para AmBisome®.



Fonte: SOO HOO, 2017, ADAPTADO⁶⁰.

O tamanho das partículas e a composição lipossomal são outros fatores críticos que influenciam diferentes propriedades farmacocinéticas específicas do AmBisome®. O entendimento do perfil farmacocinético geral desse produto tem avançado significativamente ao longo dos anos em função de sua extensa caracterização em modelos pré-clínicos^{49,60,61,62}.

Diversos estudos demonstraram que a concentração total de AmB nos tecidos, após o tratamento, segue consistentemente uma ordem, com baço, fígado, rins e pulmões exibindo as maiores concentrações. O acúmulo do fármaco no fígado e baço pode ser justificado mediante ao sistema retículo-endotelial, pelo grande número de macrófagos residentes nesses órgãos, os quais prontamente fagocitam os lipossomas, um mecanismo vantajoso no tratamento de fungos residentes nessas células, como o *Cryptococcus neoformans*. Por outro lado, é sabido que o tamanho reduzido das vesículas lipídicas presentes no AmBisome® é capaz, em parte, de contornar esse processo, prolongando sua permanência na circulação sanguínea, o que presumivelmente resulta num efeito terapêutico potencialmente maior^{50,63,64,65,66}.

Apesar dos numerosos estudos a respeito da sua farmacocinética, lacunas de

conhecimento persistem, especialmente em populações como neonatos, crianças, mulheres grávidas e pacientes obesos. Adicionalmente, ainda há desafios relacionados à compreensão detalhada da distribuição do fármaco dentro de subcompartimentos. Ainda que melhorias oferecidas por essas formulações lipossomais sejam observadas, o alto custo de produção representa uma preocupação^{50,67,68,69}.

De acordo com a Gilead Sciences, Inc., o mercado global de vendas de AmBisome[®], em 2023⁷⁰, foi avaliado em US\$ 496 milhões e perspectivas apresentadas pela 360 Market Updates⁷¹, preveem que esse valor deverá atingir US\$ 740,5 milhões até 2030, portanto, uma taxa de crescimento anual de 6,0% durante o período de previsão 2024-2030. Tal fato evidencia a demanda e prescrição crescente dessa formulação.

Devido à alta procura do produto, a Gilead firmou um acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) para apoiar o programa de controle da leishmaniose, que desde 1992⁷² oferece a formulação para países de baixa e média renda, por meio de seu programa de acesso a preços de custos. Entretanto, apesar da patente do produto ter expirado nos EUA em 2016, tornando o AmBisome[®] alvo principal para a produção de genéricos, até o momento, a FDA ainda não aprovou nenhuma versão genérica de AmB lipossomal¹¹. A apresentação do produto AmBisome[®] é mostrada na Figura 6.

Figura 6. Produto AmBisome[®].



Fonte: MIMS, 2024⁹¹.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Perfil de Qualidade Alvo do Produto – PQAP

O PQAP sintetiza as informações sobre a qualidade do medicamento, assegurando que atendam aos padrões esperados e garantindo tanto a eficácia quanto a segurança do produto⁹³. Ele é definido com base em propriedades cientificamente fundamentadas, selecionadas por sua relevância para o desempenho *in vivo*¹¹⁰.

Neste estudo, os critérios estabelecidos para o PQAP foram baseados nas características do produto AmBisome®, utilizando principalmente dados da bula profissional e da patente, além de literatura relacionada ao tema, devido à escassez de informações sobre a construção deste elemento da QpD para o produto avaliado.

O ICH8 R2⁵ orienta que informações como a via de administração, forma de dosagem, biodisponibilidade, peso e estabilidade são essenciais para a construção do PQAP. No entanto, optou-se por desenvolver um PQAP mais detalhado para garantir uma compreensão mais aprofundada em relação ao produto avaliado.

Dias e colaboradores em 2021¹¹¹ apresentaram uma síntese do PQAP para o produto AmBisome®, os resultados abrangeram apenas a descrição do produto, suas indicações, uso, toxicidade, eficácia e tecnologia. Os autores, contudo, enfatizam que o exemplo fornecido pode ser ajustado à medida que melhorias são feitas, incluindo informações desde as fases iniciais do desenvolvimento do produto até o uso final pelo paciente.

Gurumukhi e Bari, em 2020¹¹³ aplicaram a abordagem de QpD para produzir um PQAP voltado à fabricação de um transportador lipídico nanoestruturado, encapsulando o fármaco efavirenz (EF). Neste estudo, foram considerados perfis de qualidade alvo como forma e tipo de dosagem, via de administração, conteúdo do fármaco, liberação do fármaco, farmacocinética, estabilidade, e a possibilidade de métodos alternativos de administração. Com base nesse estudo, tais perfis também foram incluídos na avaliação atual. Em adição, foram considerados os perfis descritos por Németh *et al.*, 2020¹²¹ e Pallagi *et al.*, 2021¹⁰⁰, que aplicaram o PQAP no desenvolvimento de uma formulação nasal lipossomal com alvo cerebral, e por Dhoble & Patravale, 2019¹¹⁴, que utilizaram o PQAP para criar uma formulação lipossomal antiangiogênica de erlotinibe para tratamento da hipertensão pulmonar.

Os diversos elementos do PQAP e suas justificativas, considerados para o produto AmBisome®, estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de Qualidade Alvo do Produto para AmBisome®, 50 mg.

PQAP	Alvo	Justificativa(s)
Indicação de uso	Micoses sistêmicas; Infecções fúngicas invasivas; Criptococose disseminada associada ao HIV; Leishmaniose visceral; febre de origem indeterminada (FOI) em pacientes neutropênicos ⁵⁵	A anfotericina B possui afinidade pelo ergosterol presente na parede celular dos fungos e pelo lanosterol encontrado nos parasitas. Essa afinidade favorece o rompimento dessas estruturas, levando à morte celular dos microrganismos ⁵⁵
Mecanismo de liberação do fármaco	A vesícula lipídica fixa-se à parede celular do fungo e à membrana do parasita, perturbando o lipossoma e liberando a anfotericina B ou atravessando a célula para transferir o fármaco ativo ^{50,57,58,59,60}	Disponibilidade do fármaco para terapia
Perfil farmacocinético ^a	Bioequivalente ao Medicamento de referência ⁵ . C _{máx} : 7,3 µg/mL (±3,8) a 83,7 µg/mL (±43,0); T _½ : 6,3 h (±2,0) a 10,7 h (±6,4); AUC ₀₋₂₄ : 27 µg.h/mL (±14) a 555 µg.h/mL (±311); Cl: 11 mL/h/kg (±6) a 51 mL/h/kg (±44); Veq: 0,10 l/kg (±0,07) a 0,44 l/kg (±0,27) ⁵⁵	Determinam o desempenho da formulação, favorecendo maior entendimento sobre dados de segurança e eficácia.
Dose do fármaco	3-5 mg/kg/dia ⁵⁵	Eficácia no tratamento de infecções fúngicas invasivas ⁵⁵
Tipo de dosagem	Liberação modificada ⁵⁵	Auxilia na eficácia terapêutica, redução de efeitos colaterais, estabilidade e maior especificidade ⁷⁹
Forma de dosagem	Pó liofilizado estéril ⁵⁵	Aumento da meia-vida da formulação, favorecido por meio da estabilidade em estado seco. Permitindo a reconstituição ^{73,74}
Via de administração	Infusão intravenosa ⁵⁵	Principal via de administração para lipossomas, favorece a integridade da formulação ^{75,76}
Concentração do fármaco	50 mg (50.000 unidades) / frasco ⁵⁵	Conteúdo para obter 4 mg/ml de anfotericina B, após reconstituição e garantir eficácia terapêutica ⁵⁵
Estrutura	Lipossomas unilamelares ⁵⁵	Melhoria na toxicidade e estabilidade do fármaco ^{34,35}

PQAP	Alvo	Justificativa(s)
Tamanho de partícula	80 nm ⁵⁵	Auxilia no tempo de permanência, aumentando o efeito terapêutico ⁵⁰
Tecnologia	Tecnologia convencional: Obtenção das vesículas lipossomais mediante o uso de HSPC, DSPG, colesterol, α -tocoferol ⁵⁵	Método aprimorado para a produção de lipossomas de maneira economicamente viável ⁵²
Toxicidade	Moderado ⁷⁹ LD murino $50 \geq 175$ mg/kg; Dosagem múltipla em ratos: 20 mg/kg = nefrotoxicidade mínima ^{80,81}	Diminuição da toxicidade quando comparado à formulação convencional ³⁵
Estabilidade	36 meses ⁵⁵	Garantia do potencial terapêutico ao longo do período de armazenamento. Suportada por dados de registros regulatórios globais ⁷⁷
Esterilidade	Ausência de micro-organismos, endotoxinas e impurezas. Filtração por 0,2 micra ^{77,102}	Método comum para garantir qualidade asséptica ⁷⁷
Armazenamento	Temperaturas de até 25°C ⁵⁵	Os aspectos químicos e físicos do produto liofilizado atendem às especificações de estabilidade nessas condições ⁷⁷
Material de acondicionamento	Frascos-ampolas de vidro tipo I, estéreis, de 20 ml, com rolha de liofilização de elastômero halobutílico, lacre de alumínio e tampa de plástico removível. ^{55,77}	Favorável para acondicionamento de produtos que necessitam um alto grau de proteção, não é alcalino, possui alta resistência térmica, mecânica e hidrolítica. Elastômetro possui durabilidade e resistência superior ^{78,83}
Métodos alternativos de administração	Não ⁵⁵	Informação não consta na bula.

Legenda: C_{máx}: Concentração máxima, T_½: Tempo de meia-vida, AUC₀₋₂₄: Área sobre a curva, Cl: Clearance, V_{eq}: Volume de distribuição em estado de equilíbrio. ^a Dados obtidos em pacientes com câncer e neutropenia febril ou recipientes de transplante de medula óssea que receberam AmBisome® 1,0 a 7,5 mg/kg/dia (infusão de 1 hora) durante 3 a 20 dias. **Fonte:** Elaboração própria a partir de banco de dados da literatura.

A partir das informações apresentadas na Tabela 1, observa-se que o produto avaliado apresenta uma série de fatores relevantes que contribuem para seu elevado perfil de qualidade, garantindo a eficácia e a eficiência da terapia medicamentosa. Esses dados formam a base do design para o desenvolvimento da formulação fazendo

com que seja estabelecida uma maior compreensão do produto, e auxiliam a tomada de decisão no que tange aos atributos críticos de qualidade e consequentemente o estudo de qualidade por design⁶.

As informações sobre o alvo do perfil farmacocinético, mecanismo de ação e dados relativos à toxicidade foram adicionados ao PQAP para um melhor entendimento desses parâmetros, que são extensivamente avaliados por diversos estudos, apesar de não estarem incluídos nos trabalhos selecionados previamente. Adicionalmente, as informações disponíveis fornecem uma ideia sobre o custo atrelado ao desenvolvimento e obtenção do produto. Para o AmBisome®, o Preço Máximo ao Governo (PMVG) brasileiro, conforme a alíquota de 18% da CMED para 2024¹¹⁵, foi de R\$ 2.649,63 para 50 mg de pó liofilizado em 1 frasco. Esse valor reflete o impacto dos fatores de qualidade descritos no PQAP do produto, que contribuem para justificar o custo elevado e assegurar a eficácia e a segurança da terapia medicamentosa.

5.2 Atributos Críticos da Qualidade – ACQ

Zagalo e colaboradores em 2021⁹³ avaliaram, por meio de uma revisão sistemática, o uso da abordagem de QpD no desenvolvimento de nanossistemas baseados em lipídios. Através desse trabalho percebeu-se que os ACQs mais frequentemente referidos eram: tamanho de partícula (n = 117, 99%), índice de polidispersão (PDI) (n = 87, 74%), eficiência de encapsulamento (n = 86, 73%), potencial zeta (n = 85, 72%), liberação do fármaco (n = 67, 57%) e morfologia (n = 56, 47%). Além dessa observação, o trabalho dispõe de uma ampla gama de sugestões sobre ACQs e suas justificativas, as quais serviram para a produção do ACQ para o AmBisome®, neste trabalho. Ademais, Németh e colaboradores em 2020⁸⁶ identificaram os potenciais ACQs para um processo de desenvolvimento de lipossomas baseado em avaliação de risco. O trabalho não apenas sintetiza uma lista de atributos críticos de qualidade, mas também apresenta o grau de severidade associado a cada um deles. Esta avaliação auxiliou na tomada de decisão sobre a importância de cada ACQ estabelecido e na avaliação de risco.

DIAS e colaboradores, 2021¹¹¹ abordaram os ACQs para o produto AmBisome®, em que os alvos incluem tamanho, morfologia, lamelaridade, composição, esterilidade, liberação, estabilidade, assim como características relacionadas a embalagem, presença de produtos de degradação, resíduos de solventes e presença de possíveis particulados. Outrossim, Liu e colaboradores, em 2020¹⁰⁴ avaliaram a otimização do processo de fabricação de uma formulação lipossomal complexa, baseada na

abordagem QpD. No estudo, foram elencados 5 ACQs: identidade do monômero do IFA, identidade de agregação do IFA, tamanho de partícula, toxicidade *in vitro* e qualidade do *cake* após a liofilização das vesículas lipídicas. Essas avaliações estão em concordância com o ICH8 R2⁵ e serviram de base para a elaboração do ACQ do produto avaliado.

Também serviram como fator orientativo os trabalhos desenvolvidos por Barbalata *et. al* 2021⁹⁴, Pallagi *et. al* 2019¹⁰⁰, Kapoor *et al* 2017⁹⁷ e por Giodani, *et al*, 2023⁸⁴. Os dados compilados como alvos referem-se em grande parte aos dados presentes na patente, na bula e nos respectivos trabalhos avaliados. Os elementos do ACQ estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Atributos Críticos da Qualidade para AmBisome[®], 50 mg.

ACQ	Alvo	Justificativa(s)
Composição química	(Fosfolipídios, esterol e antioxidante) HSPC, DSPG, Colesterol, α -tocoferol ⁵⁵	Influência na liberação, toxicidade e integridade da vesícula lipídica ^{96,102}
Morfologia e lamelaridade	Pequenos lipossomas esféricos unilamelares ⁵⁵	Contenção/Retenção do fármaco. Afeta taxa de liberação e capacidade de carga ^{97,102}
Tamanho de partículas após liofilização	80 nm ⁵⁵	Alterações afetam a biodisponibilidade ^{93,95,97,102}
Propriedade da superfície	Potencial Zeta: $-35 \pm 10\text{mV}$ ¹⁰⁷	Alterações impactam na estabilidade da suspensão. Afeta parâmetros <i>in vivo</i> , como Clearance, distribuição tecidual e absorção celular ^{93,97}
Sistema Monodisperso	PDI<0,3 ^{103,107}	Impacta na uniformidade das vesículas. PDI< de 0,3 são aceitáveis e são um indicador de uma população de vesículas homogêneas ^{86,99}
pH	5 a 6 ¹¹²	Alterações podem comprometer a segurança, causando irritação, vasculite, trombose e êmbolos, se o pH for diferente do fisiológico.

ACQ	Alvo	Justificativa(s)
Osmolalidade	280–309 mOsm/L ¹¹²	Alterações afetam a tolerabilidade da formulação, valores iguais a 300 ± 30 mOsm/L são ideais para esse tipo de administração ⁸⁶
Eficiência de encapsulamento	80 a 95% ¹¹⁴	Aumento da eficácia terapêutica mediante à alta eficiência de encapsulamento. Um EE% mais alto está associado a uma menor perda de fármacos durante o processo de fabricação e a um custo de produção reduzido ^{93,94}
Liberação de fármacos in vivo e in vitro	Liberação baixa à moderada. Em torno de $0,127 \pm 0,021 \text{ h}^{-1}$ para taxas de liberação in vitro e em torno de para taxas de liberação in vivo $0,025 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ ⁸⁵	Impactam na eficácia e no perfil de segurança do medicamento ^{93,97}
Estabilidade química e física	Química e fisicamente estável na faixa de temperatura de 2–25 °C por 48 meses ⁵⁵ e ausência de agregados.	Fatores impactam diretamente na instabilidade física dos lipossomas ⁸⁴

Legenda: HSPC: Fosfatidilcolina de soja hidrogenada, DSPG: Distearoil fosfatidilglicerol, EE%: Eficiência de encapsulamento, PDI: Índice de polidispersividade **Fonte:** Elaboração própria a partir de banco de dados da literatura.

Os diversos atributos escolhidos para a elaboração desta tabela, influenciam direta e indiretamente a eficácia e a segurança terapêutica. De acordo com Zagalo e colaboradores, 2022⁹³, mediante a revisão sistemática elaborada, o tamanho de partícula foi o ACQ mais estudado. Esse atributo impacta significativamente em diversos outros parâmetros de qualidade, sendo eles: estabilidade, eficiência de encapsulamento, perfil de liberação e biodisponibilidade, mucoadesão, captação celular e toxicidade⁹⁹. É relatado, na patente, que o tamanho das partículas após hidratação e liofilização apresenta um aumento de aproximadamente 20% do tamanho prévio, e que isso pode estar associado ao incremento na toxicidade do sistema⁵².

A composição química é outro atributo crítico da qualidade bastante avaliado, já que influencia diretamente no tamanho, capacidade de carga, liberação, toxicidade e integridade dos lipossomas desenvolvidos¹⁰². Modificações na composição lipídica das vesículas lipossomais são conhecidas por influenciar a captação por macrófagos. Estudos bem estabelecidos, como os de Johnson *et al.* 1975¹²⁴ e Payne *et al.* 1987¹²³, demonstraram que o aumento nos níveis de colesterol pode afetar significativamente

essa absorção. Adicionalmente, é comprovado que a presença de colesterol em lipossomas neutros reduz drasticamente a toxicidade dessas vesículas, contribuindo para uma melhor segurança no uso terapêutico¹²³.

O índice de polidispersividade (PDI), é outro parâmetro de extrema importância e um atributo crítico de qualidade presente em diversos estudos sobre QpD, já que fornece informações sobre a uniformidade e a distribuição do tamanho das partículas em formulações, influenciando diretamente a estabilidade e eficácia do produto. Como avaliado no estudo de Danaei *et al.*, 2018⁹⁹, valores de PDI em torno de 0,3 ou abaixo são aceitáveis e indicam que há uma distribuição homogênea das vesículas de fosfolípidios. Os dados gerados a partir dos trabalhos de IMAN *et al.* 2011¹⁰³ e SEIFY *et al.* 2023¹⁰⁷ auxiliam na confirmação desta observação.

Além da polidispersividade, a estabilidade das vesículas lipídicas é também relacionada à carga de superfície, denominada de potencial zeta. Conforme Kumar & Dixit, 2017¹¹⁷ a magnitude deste parâmetro é um indicador preditivo fundamental da estabilidade coloidal da solução. Nanopartículas com valores de potencial zeta em torno de ± 30 mV apresentam elevado grau de estabilidade física. Além disso, alterações nos valores deste atributo podem impactar no Clearance, na distribuição tecidual e na absorção celular^{93,97}. O dado referente ao potencial zeta do AmBisome® não está disponível na patente, entretanto, mediante aos estudos realizados por SEIFY *et al.* 2023¹⁰⁷, indica-se que o valor é de $20,39 \pm 3,2$, dessa forma, que a formulação final possui estabilidade física adequada.

A eficiência de encapsulamento (EE%) é notoriamente relevante, sendo também um dos atributos críticos de qualidade mais amplamente estudados. Sua relevância se dá através do impacto que possui na eficácia terapêutica e no perfil de segurança do produto. Valores mais altos de EE% estão associados a uma menor perda do IFA durante o processo de obtenção das vesículas lipídicas, o que de certa forma indicam menos custos na fabricação^{93,94}. De acordo com a patente, a eficiência de encapsulamento de AmB é praticamente 100%⁵².

Os pequenos lipossomas esféricos unilamelares são os alvos para a morfologia e lamelaridade do AmBisome®, esses parâmetros estão associados ao fator de retenção do fármaco e sua capacidade de liberação, e devem ser estritamente controlados no processo de obtenção, já que mediante a estas características estão atreladas diversas outras propriedades importantes que impactam na biodistribuição, eficácia e segurança do produto^{55,97,102}.

Sabe-se que o atributo de perfil de liberação é um fator chave no que tange a garantia da eficácia e reduções na toxicidade do princípio ativo. Alterações neste perfil podem impactar na biodisponibilidade e no perfil clínico do produto e, portanto, deve ter monitoramento. Resultados obtidos a partir dos estudos de SVIRKIN *et. al* 2022¹⁰⁸ sugerem que um aquecimento maior durante a fabricação das vesículas lipídicas de AmBisome® é crucial para que haja uma firme agregação de AmB na bicamada, retardando a liberação do princípio ativo e assim reduzindo a toxicidade.

O pH é outro atributo crítico que deve ser avaliado ao do longo processo de obtenção dos lipossomas. Sabe-se que a solubilização do componente lipídico é favorecida mediante à acidificação, e sem ela as etapas de encapsulamento não ocorrerem de forma satisfatória. Tal fato foi demonstrado no trabalho de Rivnay *et. al*, 2017⁸⁷. O pH e a osmolaridade final do produto também são importantes pois devem ser biocompatíveis auxiliando na tolerabilidade da formulação⁸⁶.

Por fim, a estabilidade química e física do produto deve ser considerada e analisada, já que alterações podem afetar a integridade das vesículas lipídicas e consequentemente a eficiência terapêutica. Problemas como agregação/fusão de partículas, degradação, hidrólise, oxidação deve ser evitados/eliminados se possível⁸⁴.

5.3 Atributos Críticos do Material – ACM

Os ACM são os elementos que impactam diretamente os ACQs. e constituem qualquer característica física, química, biológica ou microbiológica dos materiais que necessitam controle para que a segurança, eficácia, estabilidade e desempenho desejados sejam alcançados^{5,118}. Diversos ACMs já foram avaliados ao longo dos anos, na metodologia proposta por Németh e colaboradores em 2020⁸⁶ para o desenvolvimento de lipossomas com base na avaliação de risco, os atributos críticos do material que obtiveram os maiores resultados de severidade foram os fosfolipídios, o conteúdo do ingrediente farmacêutico ativo, as razões lipídicas e as concentrações de crioprotetor. Esses parâmetros, portanto, foram utilizados para compor o ACM do produto AmBisome®. A qualidade do material não foi avaliada, uma vez que se considerou que os materiais possuem grau farmacêutico. A Tabela 3 compila os atributos críticos do material avaliados.

Tabela 3. Atributos Críticos do Material para AmBisome®, 50 mg.

ACM	Alvo	Justificativa(s)
Identidade / Concentração IFA	Anfotericina B, 50 mg/frasco (50.000 unidades, 4 mg/mL) ^{54,55}	Influência no tamanho das partículas, capacidade de carga do fármaco e a eficiência de encapsulamento (%) ¹⁰⁰ O colesterol diminui a fluidez e a permeabilidade das bicamadas e aumenta o empacotamento de fosfolipídios, o que aumenta a retenção do fármaco e %EE ⁹³
Concentração de colesterol	52 mg/frasco (4,16 mg/mL) ⁵⁴	
Tipo de lipídio/Concentração lipídica	HSPC 213 mg/frasco (17,04 mg/mL); DSPG 84 mg/frasco (6,72 mg/ml) ⁵⁴	Impacta no tamanho da partícula, no índice de polidispersão, potencial zeta e no EE% ⁹³ Impactos sobre agregação e integridade de vesículas lipossomais, prevenção de vazamentos das vesículas ^{93,98,101}
Concentração do crioprotetor	Sacarose 900 mg/frasco ⁵⁴	
Razão molar lipídio: lipídio	2:0,8 ⁵⁵	Impacto no tamanho da partícula, na liberação do fármaco e, especialmente, no EE% ⁹³
Razão molar droga: lipídio	1:1 ¹⁰¹	Impactos no tamanho de partícula, PDI, %EE e liberação do fármaco ⁹³ .
Temperatura de transição de fases	≤ 65°C*	Impacto na liberação do fármaco e na estabilidade da vesícula ^{86,96,97}

Legenda: HSPC: Fosfatidilcolina de soja hidrogenada, DSPG: Distearoil fosfatidilglicerol, EE%: Eficiência de encapsulamento, PDI: índice de polidispersividade. *Temperatura de transição de fases de lipídios, em torno de 55°C⁸⁷. **Fonte:** Elaboração própria a partir de banco de dados da literatura.

O conhecimento sobre as características presentes nos fosfolipídios constituintes dos lipossomas é de extrema importância, já que permeiam diversos fatores dentro da formulação avaliada. Dessa forma, a temperatura de transição de fase, carga líquida, estabilidades e custo-benefício devem ser levados em consideração¹⁰¹. Sabe-se que insaturações presentes nos fosfolipídios são mais suscetíveis a reações de degradação, como oxidação e hidrólises. A escolha dos fosfolipídios HSPC, é relevante já que possui ácido graxo lateral saturado, com alta temperatura de transição (52°C) e elevado comprimento de cadeia. O mesmo acontece para o DSPG, que possui temperatura de transição de fase igual à 55°C. A concentração desses constituintes é um fator chave para a integridade e tamanho da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e EE%⁹³. A Tabela 4 compila as informações referentes ao conteúdo lipídico do AmBisome®.

Tabela 4. Informações químicas sobre conteúdo lipídico para o AmBisome®, 50 mg.

Componentes	Fórmula Molecular	Carga elétrica (pH=7,4)	Temperatura de fase de transição (°C)	MM (g/mol)	Distribuição de ácidos graxos
HSPC	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	0	52	762.1	18:0
DSPG	C ₄₂ H ₈₃ O ₁₀ P	-1	55	779,1	18:0
Colesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	0	-	386,65	-

Legenda: HSPC: Fosfatidilcolina de soja hidrogenada, DSPG: Distearoil fosfatidilglicerol, MM: Massa molecular.

Fonte: GOEL *et. al* 2022 ADAPTADO¹⁰¹

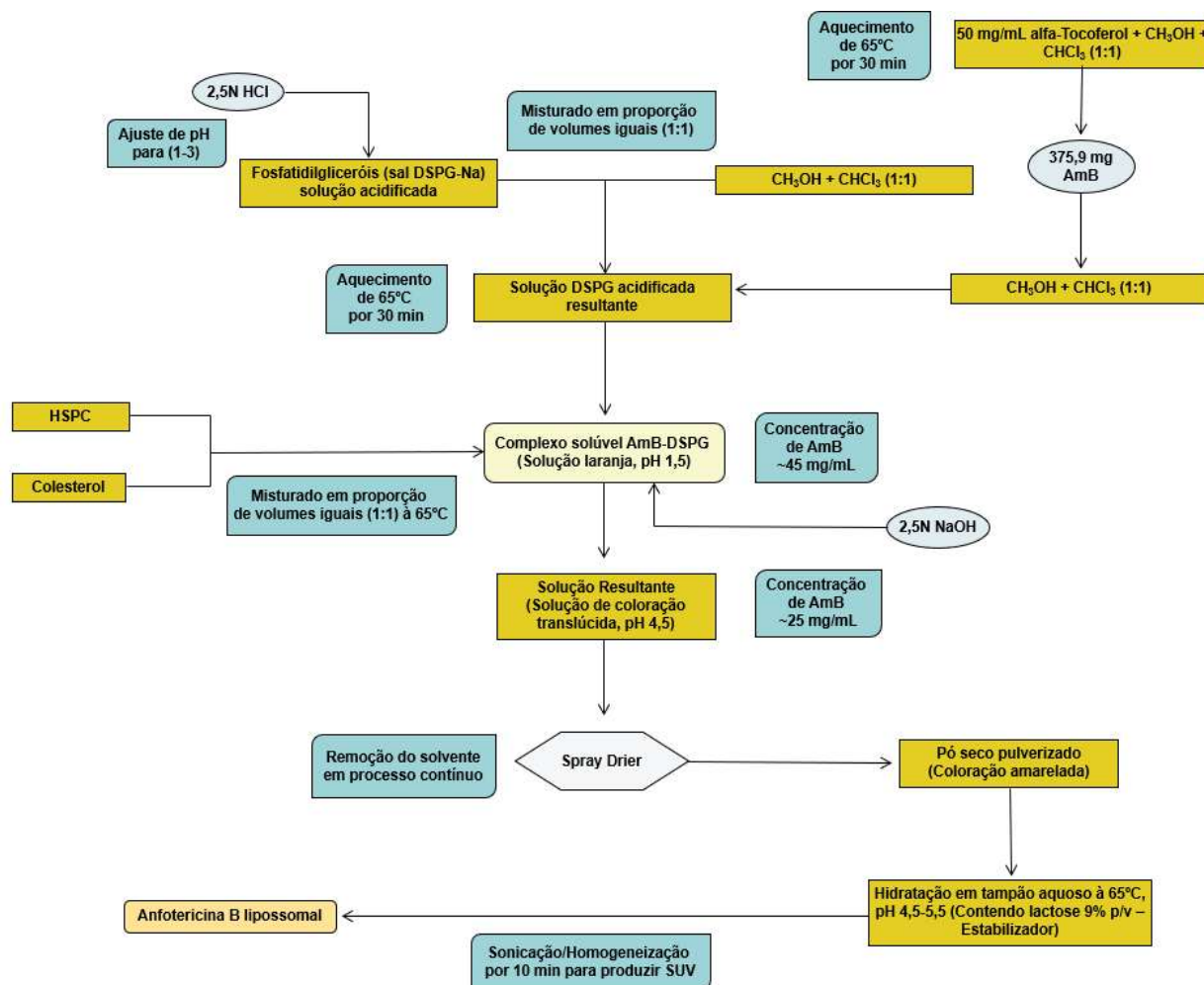
Grande parte da estabilidade da vesícula lipídica é garantida por meio da presença de colesterol. A ele também estão associados impactos na fluidez e ações preventivas na agregação das vesículas. Entretanto, sabe-se que valores utilizados na formulação não devem ultrapassar 50% já que, o colesterol, também possui influência na temperatura de transição de fases. Esses fatores podem impactar no grau de retenção do princípio ativo e na EE%⁹³

O efeito da relação lipídio: fármaco e lipídio: lipídio mostra-se relevante já que se relacionam ao aprisionamento do fármaco e sua consequente liberação, estão associados também a impactos no tamanho das vesículas lipídicas, uma vez que o aumento na proporção de lipídios favorece incremento no volume interno das vesículas. A concentração do crioprotetor também é um fator que deve ser analisado, pois pode acarretar impactos sobre agregação e integridade de vesículas lipossomais e na prevenção de vazamentos das vesículas^{93,98,101}

5.4 Parâmetros Críticos do Processo – PCP

A partir das informações contidas na patente US5965156A⁵² e nos estudos realizados por Rivnay *et al.* em 2019⁸⁷, Liu *et al.* em 2020¹¹¹ e GOEL, H. *et al.* 2022¹⁰¹ foi possível estabelecer o processo produtivo da obtenção da vesícula lipídica presente no produto AmBisome® o que permitiu compreender os parâmetros críticos do processo associados. O fluxograma da produção é demonstrado na Figura 7.

Figura 7. Fluxograma do processo produtivo da obtenção de lipossomas.



Legenda: DSPG: Distearoil fosfatidilglicerol, HSPC: Fosfatidilcolina de soja hidrogenada HCl: Ácido Clorídrico, NaOH: Hidróxido de Sódio, AmB: Anfotericina B, CH₃OH+CHCl₃: Metanol + Clorofórmio. **Fonte:** Elaboração própria a partir de GOEL, H. *et al.* 2022, ADAPTADO¹⁰¹, e informações contidas na patente US5965156A⁵² e nos estudos realizados por Rivnay *et al.* em 2019⁸⁷ e Liu *et al.* em 2020¹¹

A obtenção de L-AmB é dividida em 4 etapas. A primeira etapa diz respeito à adição de 632,7 mg de DSPG em 4 mL de uma mistura de clorofórmio-metanol 1:1 (v:v), denominada de solvente. Essa mistura é aquecida a 65°C e acidificada com 0,300 mL de HCl à 2,5 M. Adicionalmente, 375,9 mg de AmB em 4 mL de solvente é agregada à mistura inicial, formando uma solução opticamente translúcida. O tocoferol, embora mencionado na bula do produto, não consta nos protocolos originais. Entretanto, sabe-se que ele é aquecido a 65 °C em solvente e adicionado a uma concentração de 50 mg/mL a AmB sólida, no início da mistura orgânica, antes da preparação da suspensão de AmB. São adicionados a essa mistura resultante, soluções de HSPC (1598,4 mg) e colesterol (393 mg), cada uma em 4,5 mL de solvente, à 65°C. Após a combinação desses componentes, 0,175 mL de NaOH 2,5 M são adicionados, fazendo com que a

mistura final tenha um pH próximo a 4,5. A segunda etapa refere-se ao processo de secagem por pulverização, mediante o uso de sistema de secagem por aspersão, em que o solvente é removido e há a formação de um pó seco pulverizado amarelado. Na terceira etapa, o pó seco resultante é hidratado empregando-se tampão de lactose-succinato (LS) aquecido (9% (p/v), lactose, tampão succinato de sódio 10 mM (pH 5,5) a uma concentração de aproximadamente 33 mg de pó/mL. Posteriormente, esse material é submetido a um processo de sonicação, para que haja a formação das vesículas lipídicas, mediante ao uso de força de cisalhamento, visando alcançar a uniformidade de tamanho. Por fim, as vesículas são liofilizadas, aumentando a vida útil e possibilitando sua reconstituição em água pura, antes da administração. Essas informações foram utilizadas para a elaboração dos parâmetros críticos do processo para o AmBisome® que estão contidos na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros Críticos do Processo para AmBisome®, 50 mg.

Etapa	PCP	Alvo	Justificativa(s)
Mistura (Preparação da fase lipofílica)	Quantidade do solvente	4 mL ⁵²	Passo inicial na obtenção de lipossomas ¹⁰⁰
	Temperatura	65°C ⁵²	
	Temperatura	45°C à 60°C ^{2,104}	
Pulverização (Formação do filme lipídico)	Pressão	Não encontrado*	Processo simples com EE% adequada ⁹²
	Velocidade	Não encontrado*	
	Tempo	Não encontrado*	
	Taxa de alimentação	0,75 a -1,4	
Hidratação do filme lipídico	Quantidade do meio	750 mL ⁵²	Formação da bicamada lipídica, alterações impactam em na EE% e presença de agregados, ocasionando inconformidades no produto ⁹³
	Taxa de alimentação	Não encontrado*	
	Tempo	40 a 60 min ⁵²	
	pH	4,5 a 5,5 ⁵²	
	Frequência	Não encontrado*	
Sonicação / Homogeneização (Força de cisalhamento)	Temperatura	65°C ⁵²	Técnica adequada para obtenção de SUV (Pequenas vesículas unilamelares) e a produção em larga escala. Impacto no tamanho de partícula, índice de polidispersão+, %EE e capacidade de carga ^{87,92}
	Pressão	90 a 100 psi ¹⁰⁸	
	Tempo	4 min ⁵²	

Etapa	PCP	Alvo	Justificativa(s)
Filtração	Tamanho do poro	0,22 μm ⁵²	Garantia da esterilidade do produto final ⁹³
	Tipo	Filtros ⁵²	
Liofilização		-40°C	Técnica indicada para produtos farmacêuticos termolábeis ⁹² Alterações impactam na morfologia, teor de água residual e estabilidade ⁹⁸
	Temperaturas	(Congelamento); -20°C (Secagem primária); 40°C (Secagem secundária) ¹⁰⁸	
	Pressão	60 mTorr ¹⁰⁸	
	Quantidade crioprotetor	900 mg/mL	
	Tempo	2 horas ¹⁰⁸	
	Temperatura	2 à 25°C ⁷⁷	
Envase (Armazenamento)	Tempo	48 meses ⁷⁷	Garantia da estabilidade terapêutica do produto ^{105,106}
		Resistentes a	
	Qualidade do frasco	tensões térmicas e mecânicas ^{77,105}	

Fonte: Elaboração própria a partir de banco de dados da literatura considerando a faixa de trabalho. * Informação não disponibilizada pela patente ou em outros estudos.

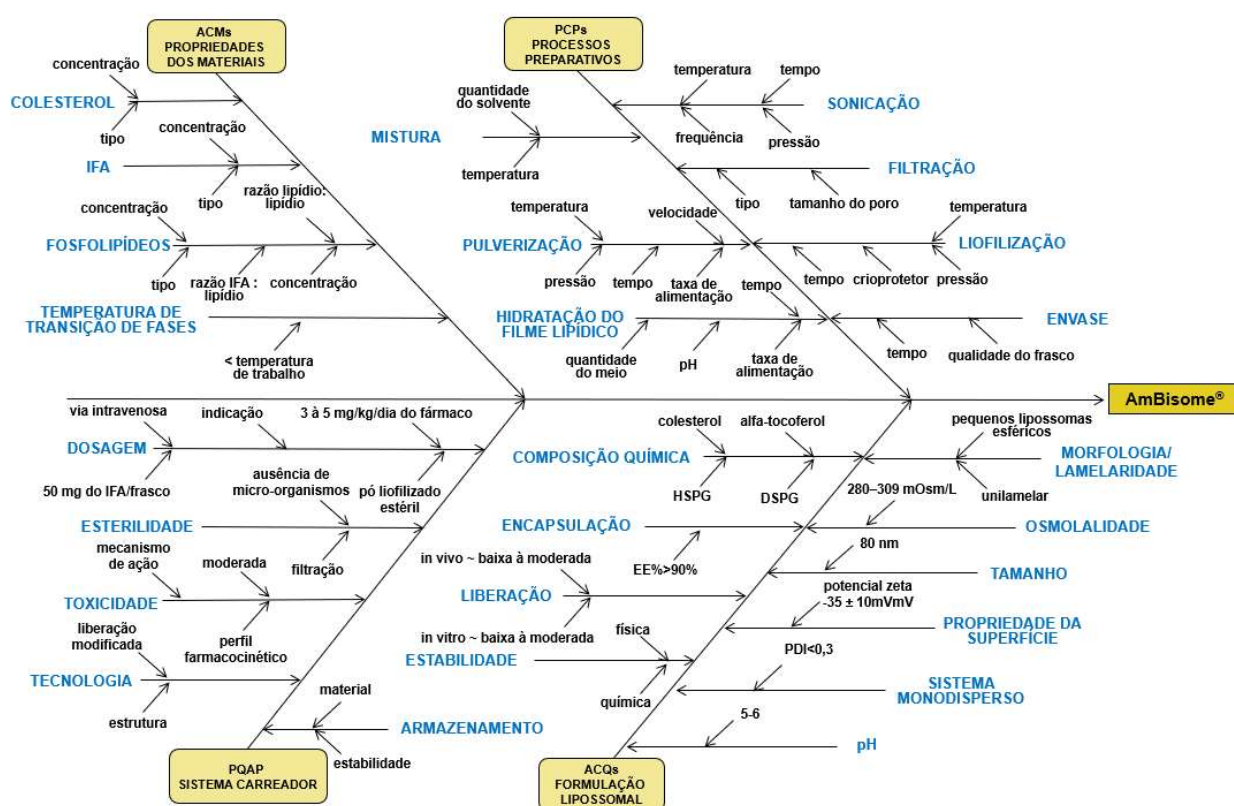
Rivnay e colaboradores, 2017⁸⁷ avaliaram os PCPs para uma formulação lipossômica contendo AmB e selecionaram três parâmetros críticos principais: a acidificação durante a formação do complexo farmaco-lípido, a cura térmica dos lipossomas após o dimensionamento das partículas e o congelamento rápido no início do ciclo de liofilização. Os autores demonstraram que a superacidificação facilitava a manipulação do fármaco, enquanto a subacidificação desfavorecia a formação do complexo farmaco-lípido e a solubilização do fármaco. A cura térmica de 65°C alterava consideravelmente a toxicidade, e o congelamento rápido na liofilização foi essencial para evitar agregação e manter o tamanho dos lipossomos (80–120 nm) após a reconstituição. Esses PCPs assim como os demais parâmetros selecionados na Tabela 5 são encontrados em inúmeros trabalhos para obtenção de vesículas lipossomais, corroborando para um entendimento mais abrangente sobre o processo produtivo desses sistemas.

5.5 Avaliação de Risco – AR

Como já relatado, a necessidade da implementação da análise de risco é fundamental, uma vez que auxilia na tomada de decisão dos parâmetros que possuem impacto potencial no perfil de qualidade alvo do produto. A AR pode ser desenvolvida através de classificações qualitativas, pelo uso de diagramas como o de Ishikawa, e quantitativas como com ferramentas de análise de modo e efeitos de falha (FMEA)^{109,116}. A AR auxilia, também, na determinação dos atributos de material e parâmetros de processo que possuem efeitos potenciais sobre os ACQs do produto selecionado e na escolha dos parâmetros de design fatorial dos experimentos¹⁷

Para este estudo, a AR foi baseada nas informações encontradas na literatura relacionada ao tema, com finalidade exploratória. Mediante a isso, foi obtido o diagrama de Ishikawa, apresentado na Figura 8, que reúne os principais critérios de qualidade, formulação, aspectos terapêuticos e características do produto, oferecendo uma relação de causa e efeito entre as variáveis significativas selecionadas²⁴.

Figura 8. Diagrama de Ishikawa para o produto AmBisome®.



Fonte: Elaboração própria a partir de banco de dados da literatura.

Ainda nesta análise, a matriz de risco, apresentada nas Figura 9 e 10, foi elaborada conforme as classificações de baixo, médio e alto, no que se refere a riscos amplamente aceitáveis, aceitáveis, podendo ou não afetar a qualidade do produto e inaceitáveis, possuindo um impacto significativo na qualidade do produto, respectivamente¹¹⁹.

Não foi possível estimar um Número de Prioridade de Risco (NPR) através da metodologia FMEA para o processo de produção do AmBisome® e, conseqüentemente, os gráficos de Pareto, resultantes desta avaliação não foram obtidos. Os trabalhos de: Barbalata *et. al* 2021⁹⁴, Pallagi *et. al* 2019¹⁰⁰, Dobó *et al.* 2022¹²⁰ serviram como fator orientativo para a elaboração da matriz de risco.

Ao se analisar a Figura 9, percebe-se que a maioria dos ACQs selecionados exercem influência significativa no perfil de qualidade alvo do produto. Entre os fatores avaliados a composição química, assim como a estabilidade química e física, possuem classificação de risco alta para todos os atributos considerados. A Figura 10, ao relacionar os ACMS e PCPs, no que tange a influência aos ACQs, expõe que a maioria dos ACMS selecionados, com exceção da temperatura de transição de fases, possui grande influência no atributo de estabilidade. Os PCPs ligados as etapas de hidratação, filtração, liofilização e enchimento exercem grande impacto neste atributo e devem ser avaliados de uma forma mais abrangente.

No estudo de Németh e colaboradores 2020⁸⁶, que avaliaram uma metodologia de análise de risco em formulações lipossomais, foi constatado que o atributo estabilidade apresentou o maior índice de severidade em comparação com os demais, alcançando aproximadamente 350 pontos. Isso indica que fatores capazes de alterar esse parâmetro tem um alto potencial de impactar significativamente a qualidade final do produto. Os demais ACQs selecionados também obtiveram pontuações elevadas, como perfil de liberação (± 305), potencial zeta (± 260), tamanho (± 240), EE% (± 230), morfologia (± 230) e PDI (± 225), com exceção da lamelaridade, que obteve 75 pontos. A avaliação não abrangeu, no entanto, os parâmetros da composição, pH e osmolaridade. Outrossim, os ACMS e PCPs também foram analisados no estudo de Németh e colaboradores, que demonstraram que os fosfolipídios (± 34750), o conteúdo do IFA (± 30000), colesterol (± 20000), temperatura de fase de transição (± 17500) e crioprotetor (± 125000) são considerados ACMS com alto *score* de severidade. Para os PCPs, a temperatura da sonicação (± 16500), temperatura da evaporação (± 16500), meio de hidratação (± 14550), tempo de sonicação (± 12700) e qualidade do frasco (± 6800), possuíram os maiores *score* dentre os atributos considerados nesta avaliação.

O estudo de Dobó e colaboradores de 2022¹²⁰, que avaliou o desenvolvimento farmacêutico e o design de lipossomas termossensíveis baseados em QpD mostrou que o tamanho de partícula e o potencial zeta possuíam alta gravidade de influência, assim como os constituintes lipídicos da formulação e a concentração do crioprotetor. No gráfico de gravidade relativa e ocorrência relativa, presente no estudo, esses últimos obtiveram os maiores valores para ocorrência, dando suporte as observações dos diagramas de Pareto. O tempo e temperatura de hidratação foram os PCPs com os maiores valores de severidade para os atributos considerados no estudo.

Em estudo de Pallagi e colaboradores, 2019¹⁰⁰ também foi demonstrado que o tamanho da vesícula (238) apresenta um impacto crítico significativo no produto lipossomal. Por outro lado, em relação aos PCPs, os autores identificaram que a temperatura no banho ultrassônico (6344) e o tipo de solvente (5020) exerceram grande influência no desenvolvimento do produto, considerando os parâmetros selecionados no estudo.

Liu e colaboradores, 2019¹⁰⁴, utilizaram a abordagem FMEA para a avaliação de risco atrelado a otimização do processo de fabricação de uma formulação lipossomal complexa, contendo AmB. Cinco dos 14 ACQs, foram selecionados para um estudo mais aprofundado, incluindo a identidade do monômero IFA, a agregação do IFA, tamanho de partícula, toxicidade *in vitro* e a qualidade do *cake*. Mediante as discussões, os autores puderam perceber que o risco médio e alto estavam atrelados aos parâmetros de processo como razão IFA para fosfolipídio (IFA:PL), razão DSPG para fosfolipídio (PG:PL), razão colesterol para fosfolipídio (Col:PL) da formulação de lipossomas, taxa de aspiração e taxa de alimentação de amostra da secagem por pulverização, pressão, temperatura de cura e passagens de microfluidização e temperatura de aquecimento da liofilização. Esses por sua vez, foram administradas por meio do DE de triagem de fatores. No que se refere aos parâmetros classificados como baixo risco, esses foram mantidos a nível constante.

Tabela 6. Resultados da matriz de risco ilustrando os efeitos dos ACQs no perfil de qualidade alvo do produto AmBisome®.

Indicadores	Perfil de Qualidade Alvo do Produto															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Atributos Críticos de Qualidade	Composição química	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Morfologia e lamelaridade	Alto	Alto	Alto	Médio	Alto	Alto	Médio	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Tamanho de partícula	Alto	Alto	Alto	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Potencial Zeta	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	PDI	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Médio	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	pH	Médio	Alto	Alto	Alto	Médio	Médio	Médio	Alto	Alto	Médio	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto
Atributos Críticos de Qualidade	EE%	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Osmolalidade	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Médio	Médio	Médio	Alto	Médio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Liberação	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Estabilidade química e física	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto

Legenda: 1= Indicação de uso; 2= Mecanismo de liberação do fármaco; 3= Perfil farmacocinético; 4= Dose do fármaco; 5= Tipo de dosagem; 6 = Forma de dosagem; 7= Via de administração; 8= Concentração do fármaco; 9= Estrutura; 10= Tecnologia; 11= Toxicidade; 12= Estabilidade;13= Esterilidade; 14= Armazenamento ; 15= Material de acondicionamento; 16= Métodos alternativos de administração. Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7. Resultados da matriz de risco ilustrando os efeitos dos ACMs e dos PCPs nos ACQs para o AmBisome®.

Indicadores	Atributos Críticos de Qualidade								Estabilidade química e física	
	Composição química	Morfologia e lamelaridade	Tamanho de partícula	Potencial Zeta	PDI	pH	EE%	Osmolalidade	Liberação	
Atributos Críticos do Material	Tipo e Concentração do IFA	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Alto	Médio	Alto	Alto
	Tipo e Concentração do esteryl	Médio	Alto	Alto	Alto	Médio	Alto	Médio	Alto	Alto
	Tipo e Concentração lipídica	Médio	Alto	Alto	Alto	Médio	Alto	Médio	Alto	Alto
	Razão lípidio : lípidio	Médio	Alto	Alto	Alto	Médio	Alto	Médio	Alto	Alto
	Razão IFA : lípidio	Alto	Médio	Médio	Médio	Médio	Alto	Médio	Alto	Alto
	Temperatura de transição de fases	Alto	Alto	Médio	Médio	Médio	Alto	Médio	Alto	Alto
	Mistura: Quantidade de solvente	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Mistura: Temperatura	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Pulverização: Pressão	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Pulverização: Temperatura	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Parâmetros Críticos do Processo	Pulverização: Velocidade	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Pulverização: Tempo	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Pulverização: Taxa de alimentação	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Hidratação: Quantidade do meio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Hidratação: Taxa de alimentação	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Hidratação: Tempo	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Hidratação: pH	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Sonicação: Temperatura	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Sonicação: Pressão	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Sonicação: Tempo	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Parâmetros Críticos do Processo	Sonicação: Frequência	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Filtração: Tamanho do poro	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Filtração: Tipo	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Liofilização: Temperatura	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Liofilização: Pressão	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Liofilização: Tempo	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Liofilização: Crioprotetor	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Enchimento: Tempo	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Enchimento: Qualidade do frasco	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
	Enchimento: Qualidade do frasco	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto

Fonte: Elaboração própria.

5.6 Delineamento Experimental (DE) e Espaço de Desenho (ED)

O DE, pode ser entendido como uma técnica para se obter resultados desejados em sistemas de administração de medicamentos, e é baseado nos parâmetros provenientes da análise de risco¹²⁷. O ED, por sua vez, é obtido através das análises do desenho experimental, oferecendo uma relação entre os ACMs/PCPs e ACQs. Operar dentro de faixas aceitáveis, que definem o espaço de design do processo, garante a qualidade do produto. Essas faixas são devidamente documentadas no registro regulatório, e qualquer mudança fora deste espaço imporá restrições, sendo necessário uma nova aprovação para o lançamento do produto^{128,129,130}.

A escolha do DE adequado deve ser criteriosa e enfrenta algumas dificuldades. Fatores como objetivo do estudo, recursos disponíveis, conhecimento prévio, experiência, sensibilidade do pesquisador e a própria complexidade do experimento contribuem para os desafios dessa etapa. Três principais aplicações de DE podem ocorrer de forma sequencial, o DE para triagem, nos quais são explorados um número significativo de variáveis independentes e consequentemente a avaliação de suas influências, e o DE para otimização, considerando as principais variáveis independentes da etapa anterior, determinando condições ótimas e prevendo valores de resposta. Por fim realiza-se o delineamento para robustez, que determina se o processo/produto é robusto a pequenas variações nos níveis das várias independentes^{93,131}.

Tanto o DE quanto o ED são frequentemente representados por meio de modelos de superfícies de resposta, analisados através de projetos experimentais específicos, como o projeto de composto central ou o projeto de Doehlert¹²⁸.

Como relatado, diversos tipos de delineamento experimentais estão disponíveis e podem ser utilizados para o processo de avaliação de formulações. Através da revisão de literatura realizada por Zagalo *et. al* 2023⁹³, identificou-se que o desenho experimental por Box-Berhnjen (n=33, 28%) foi o mais utilizado nos trabalhos avaliados, seguidos pelo delineamento fatorial completo (n = 30, 25%), projeto composto central (n = 29, 25%), delineamento fatorial fracionário (n = 16, 14%), delineamento Plackett-Burman (n = 13, 11%), projeto de mistura D-ótima (n = 10, 8%), delineamento Taguchi (n = 7, 6%) e projeto de mistura I-ótima (n = 3, 3%).

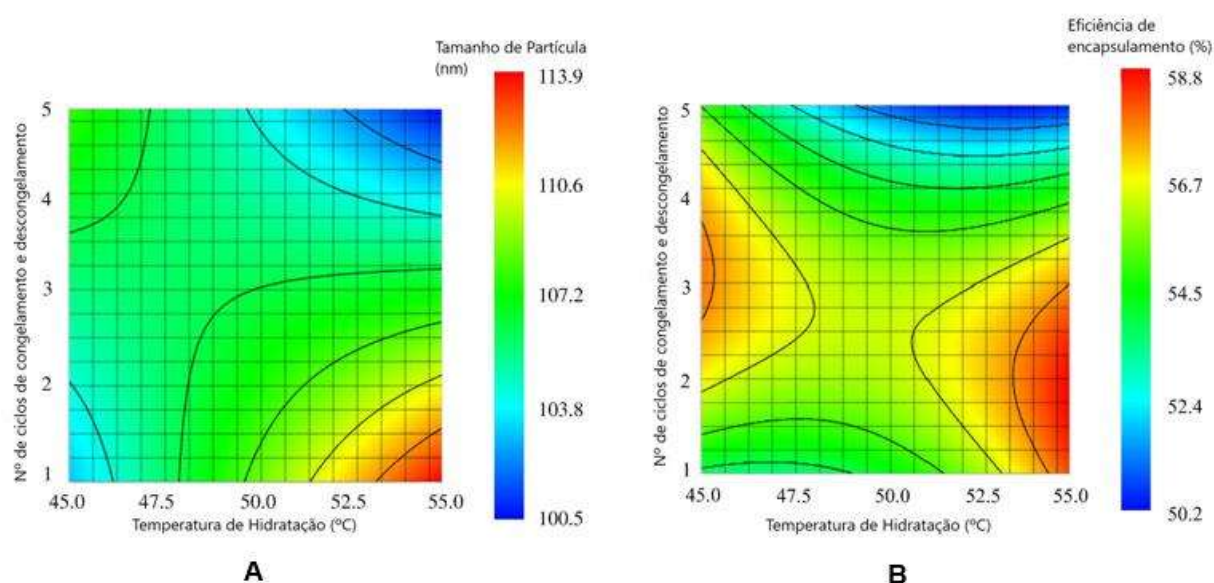
Não foi possível realizar um estudo do DE neste trabalho e consequentemente definir um espaço de desenho para avaliação do produto AmBisome®, devido à falta de dados brutos relacionados às variáveis dependentes e independentes. A escassez de informações, atrelada aos inúmeros parâmetros estabelecidos fazem com que a complexidade dessa operação seja alta, entretanto pode-se sugerir como modelo, a

adoção de um projeto fatorial fracionado para avaliação das numerosas variáveis de processo, rastreando com execuções experimentais relativamente limitadas. O impacto dos ACQs e PCPs nos ACQs poderia ser analisado e expresso por gráficos de contorno.

Barbalata e colaboradores, 2022¹²⁴ ao avaliar o uso da abordagem QpD para otimização do carregamento conjunto de sinvastatina e doxorrubicina em lipossomas para um efeito anticâncer sinérgico, utilizaram um DE do tipo face composta central, a partir de um modelo quadrático, com 17 experimentos, dos quais três eram réplicas. As concentrações de fosfolipídeos, doxorrubicina e sinvastatina foram consideradas como variáveis independentes, enquanto a concentração do fármaco encapsulado, EE%, tamanho do lipossoma, PDI e potencial zeta foram as variáveis dependentes. Dessa forma, foi otimizado a formulação de interesse, revelando que a concentração tanto de doxorrubicina quanto de sinvastatina apresentavam criticidade notória. Com base nessas observações, os autores definiram o espaço de desenho, e os resultados foram representados por um gráfico de contorno. O gráfico obtido, sugeriu que para a formulação atender aos PQAP deveria-se utilizar altas concentrações de sinvastatina e doxorrubicina.

Em outro estudo, mediante a grande variação de lote para lote no processo de fabricação de lipossomas a base de FK506, um imunossupressor, Toyota *et. al* 2017¹²⁵ avaliaram o uso de DE para otimizar efeitos dos parâmetros do processo e garantir a obtenção de um produto que atendesse qualidade desejadas. Eles utilizaram um desenho do tipo, Box-Benken, onde se pode observar que o processo de extrusão impactava nos tamanhos de partícula e a hidratação por película fina afetava significante a eficiência de encapsulação. As condições ótimas para a obtenção do produto foram encontradas através do espaço de desenho, dado pelo gráfico de superfície de resposta, nos quais o volume do tampão PBS foi de 4mL, com temperatura de hidratação de 52,5°C, 3 números de ciclos de congelamento e descongelamentos, dos quais puderam ser obtidos $\pm$ 56,4% de EE% e tamanho de partícula de 100 nm. A Figura 9 expõe as respostas obtidas pelos autores através dos gráficos de superfície de resposta.

Figura 9. Gráficos de superfície de resposta.

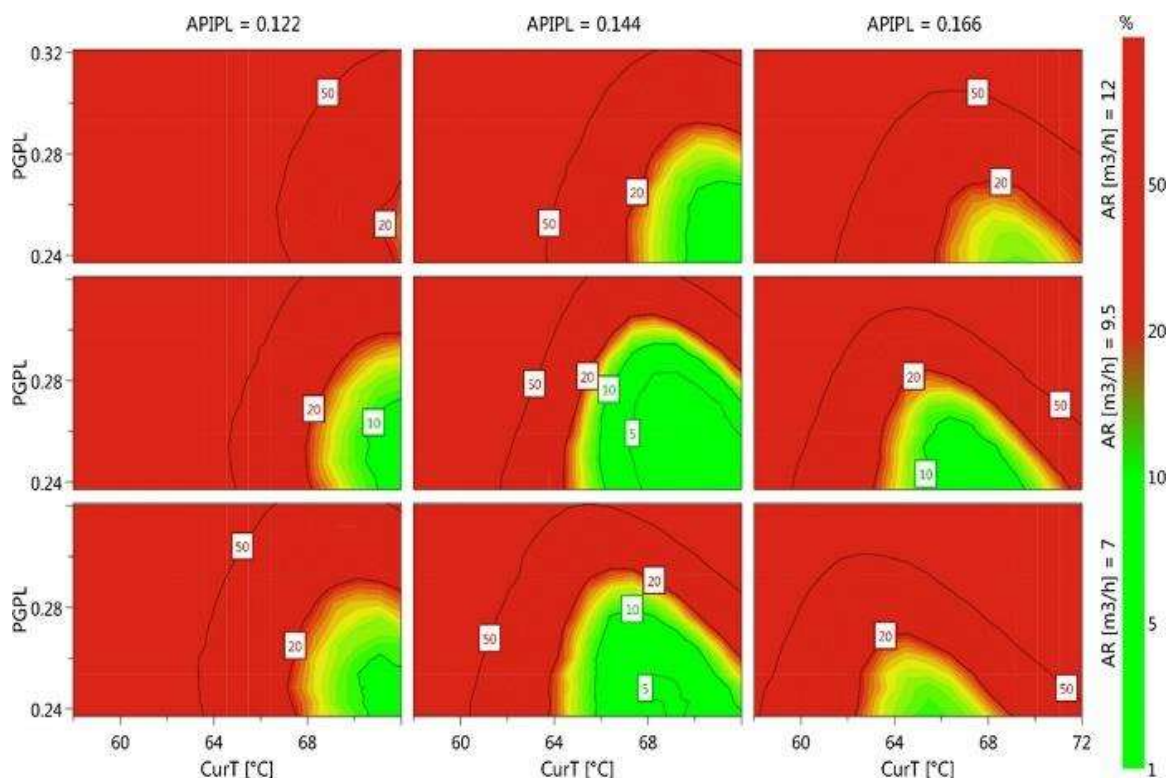


Legenda: **A.** Resposta do tamanho de partícula mostrando os efeitos da temperatura de hidratação e o número de ciclos de congelamento-descongelamento. **B.** Resposta da eficiência de encapsulamento mostrando os efeitos da temperatura de hidratação e o número de ciclos de congelamento-descongelamento. **Fonte:** Toyota et. al 2017¹²⁵, ADAPTADO.

Com o objetivo de desenvolver uma formulação lipossomal como carreador de grelina através da homogeneização de alta pressão e consequentemente obter sua otimização, Barros e colaboradores, 2021¹²⁶ lançaram mão do uso de um delineamento experimental fatorial, elaborado a partir de ACMs e PCPs pré-estabelecidos. Nos quais as respostas esperadas dada pelo projeto de otimização gráfico de contorno se deu mediante aos valores de 78,07; 0,28; 49,80; 53,40 para tamanho, PDI, Potencial Zeta e EE% respectivamente.

Liu *et al.* 2021¹⁰⁴ mediante ao uso de um DE fatorial fracionário avaliou a otimização do processo de fabricação de formulação lipossomal complexa para anfotericina B, no qual foram avaliados a criticidade de cada ACQ/PCP selecionado através dos gráficos de coeficiente e de contorno. Eles indicaram que a temperatura de cura durante a microfluidização, técnica de cominuição de tamanho utilizada, caracterizava-se como o PCP mais significativo. Os autores também extrapolaram o espaço de desenho, indicando as variações do PCPs para a obtenção da qualidade desejado do produto. A Figura 10 exemplifica o gráfico de respostas para o espaço de desenho obtidos mediante a avaliação do delineamento experimental.

Figura 10. Espaço do Desenho considerando os PCPs avaliados.



Legenda: PGPL= Razão DSPG para fosfolípidios totais; APIPL = Razão IFA para fosfolípidios totais; CurT [°C] = Temperatura de cura (°C); AR[m³/h] = Taxa de aspiração (m³/h). **Fonte:** Liu *et al.* 2021¹⁰⁴.

Ao se analisar o gráfico contido na Figura 10, pode-se perceber que o espaço de desenho máximo é obtido por meio de valores médios da razão IFA para fosfolípidios totais e taxa de aspiração e temperaturas de cura mais altas. Dessa forma a exploração do espaço de desenho deste estudo conseguiu demonstrar como os parâmetros críticos do processo podem ser variados para produzir consistentemente um produto com as características desejadas.

6. CONCLUSÃO

A abordagem QpD vem se tornando um elemento-chave na garantia de qualidade e segurança no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. A partir dela, um conhecimento mais aprofundado do processo e produto é obtido, ofertando uma melhoria contínua, facilitando a inovação, a supervisão regulatória mais eficaz e o incremento da confiabilidade do produto.

A aplicação das ferramentas de QpD demonstrou ser eficiente para ampliar o conhecimento frente aos mecanismos que permeiam as etapas de desenvolvimento e fabricação do AmBisome®, permitindo reconhecer os fatores críticos que impactam diretamente na eficácia, segurança e estabilidade do produto.

A identificação das variáveis críticas dependentes, como composição química, tamanho de partícula, potencial zeta e PDI, e das variáveis independentes, como o tipo e a razão entre lipídios, além dos parâmetros das etapas do processo, contribui para a minimização de potenciais riscos de não conformidade. Ademais a aplicação dos conceitos do delineamento experimental e espaço do desenho, que não foram possíveis de executar no presente estudo, devem assegurar que o produto atenda aos Perfis de Qualidade Alvo do Produto (PQAP), garantindo sua eficácia terapêutica e segurança ao paciente.

REFERÊNCIAS

- ¹ YU, L. X. **Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control.** *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 4, p. 781–791, 2008. Disponível: <<https://doi.org/10.1007/s11095-007-9511-1>>. Acesso em: 28 jan. 2024.
- ² PAIXAO, A. J. **Aplicação do princípio Quality by Design no processo de desenvolvimento analítico de métodos indicativos de estabilidade.** / Juliana Alvim Paixão Chaves. – Rio de Janeiro, 2017. Disponível: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/23047>>. Acesso em: 28 jan. 2024.
- ³ UBQ (UNIÃO BRASILEIRA PARA A QUALIDADE). **A qualidade no mundo – as histórias de deming e juran, 2019.** Disponível em: <<https://ubq.org.br/a-qualidade-no-mundo-deming-e-juran/>>. Acesso em: 28 jan. 2024.
- ⁴ SUGIMOTO, Y. P. UNIFESP. **Aspectos gerais de QBD – Quality by Design – em indústrias farmacêuticas nacionais.** repositorio.unifesp.br, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.unifesp.br/handle/11600/58941>>. Acesso em: 28 jan. 2024.
- ⁵ ICH. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development Q8(R2).** August 2009. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2024.
- ⁶ Yu L, Amidon G, Khan M, Hoag S, Polli J, Raju G, Woodcock J. **Understanding Pharmaceutical Quality by Design.** *AAPS J.* 2014; 16(4):771-783. Disponível em: <<https://doi.org/10.1208/s12248-014-9598-3>>. Acesso em: 28 jan. 2024.
- ⁷ BEZERRA, P.M ; RODRIGUES, C. N. L. **Quality by design (qbd) como ferramenta para otimização dos processos farmacêuticos.** *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 5-12, apr. 2017. ISSN 2318-9312. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v29.e1.a2017.pp5-12>> . Acesso em: 28 jan. 2024.
- ⁸ HAY, R. J. **Liposomal amphotericin B, AmBisome.** *Journal of Infection*, v. 28, p. 35–43, maio 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(94\)95956-0](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(94)95956-0)>. Acesso em: 28 jan. 2024.
- ⁹ HEINEMANN, V. *et al.* **Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (Ambisome) in critically ill patients.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, n. 6, p. 1275–1280, jun. 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aac.41.6.1275>> . Acesso em: 28 jan. 2024.
- ¹⁰ SCHLOSSBERG, D; SAMUEL, R. **Antibiotics Manual: A Guide to Commonly Used Antimicrobials, Second Edition.** © 2017 John Wiley & Sons Ltd. Published 2017 by John Wiley & Sons Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781119220787>> .ch4 Acesso em: 28 jan. 2024.
- ¹¹ LIU, Y. *et al.* **Analytical method development and comparability study for AmBisome® and generic Amphotericin B liposomal products.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 157, p. 241–249, 1 dez. 2020. Disponível

em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.008>> . Acesso em: 28 jan. 2024.

¹² ANDRA, V. V. S. N. L. *et al.* **A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents.** BioNanoScience, 26 jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12668-022-00941-x>> . Acesso em: 28 jan. 2024.

¹³ LIU, P.; CHEN, G.; ZHANG, J. **A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives**, v. 27, n. 4, 17 fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules27041372>> . Acesso em: 28 jan. 2024.

¹⁴ APONTE, G.O.F; DIAZ, V.B. M.; HUERTAS, M.C. E. (2015). **La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica.** Estudios Gerenciales, 31(134), 68–78. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.estger.2014.09.005>> . Acesso em: 28 fev. 2024.

¹⁵ **Good manufacturing practices (GMPs) for the 21st century for food processing (2004 study).** Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/current-good-manufacturing-practices-cgmps-food-and-dietary-supplements/good-manufacturing-practices-gmps-21st-century-food-processing-2004-study>>. Acesso em: 20 de mar. 2024.

¹⁶ **PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance.** 2004. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/pat-framework-innovative-pharmaceutical-development-manufacturing-and-quality-assurance>>. Acesso em: 20 de mar. 2024.

¹⁷ **ICH Official web site: ICH.** Disponível em: <<https://www.ich.org/page/quality-guidelines>>. Acesso em: 20 de mar. 2024.

¹⁸ **Resolução RDC nº 301, de 21 de agosto de 2019.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/pnpmf/orientacao-ao-prescritor/Publicacoes/resolucao-rdc-no-301-de-21-de-agosto-de-2019.pdf/view>>. Acesso em: 20 de mar. 2024.

¹⁹ **Instrução Normativa nº 47/2021.** Disponível em: <<https://www.gov.br/dnit/pt-br/central-de-conteudos/atos-normativos/tipo/instrucao-normativa/2021/instrucao-normativa-no-47-2021>>. Acesso em: 25 de mar. 2024.

²⁰ CHAROO, N. A. *et al.* **Quality by design approach for formulation development: A case study of dispersible tablets.** International journal of pharmaceutics, v. 423, n. 2, p. 167–178, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.024>> Acesso em: 25 de mar. 2024.

²¹ JETANI, J. M.; PAI, G. K. **A Comparative Review of the USFDA Guidelines on Process Validation Focusing on the Importance of Quality by Design (QbD).** v. 10, n. 4, p. 1257–1257, 1 jan. 2017. Disponível em: <[10.5958/0974-360X.2017.00223.2](https://doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00223.2)> Acesso em: 25 de mar. 2024.

²² MINETO, A. R. **A abordagem Quality by Design no desenvolvimento de produtos farmacêuticos: conceitos, elementos e exemplos de aplicação.** 2021. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/238408>> Acesso em: 25 de mar. 2024.

- ²³ SANGSHETTI J.N.; DESHPANDE M.; ZAHERR Z.; SHINDE D.B.; AROTE R. **Quality by design approach: regulatory need**. Arab J Chem. 2017;10(Suppl 2):S3412-S3425. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.01.025>>. Acesso em: 02 de abr. 2024.
- ²⁴ PALLAGI, E. *et al.* **Initial Risk Assessment as part of the Quality by Design in peptide drug containing formulation development**. European Journal of Pharmaceutical Sciences, Hungria, v. 122, p. 160-169, jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.003>> Acesso em: 02 de abr. 2024.
- ²⁵ ZHANG L.; MAO S. **Application of quality by design in the current drug development**. Asian J Pharm Sci. 2017;12(1):1-8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.006>> Acesso em: 02 de abr. 2024.
- ²⁶ Xu X, Al-Ghabeish M, Rahman Z, Krishnaiah YSR, Yerlikaya F, Yang Y, Manda P, Hunt RL, Khan MA. **Formulation and process factors influencing product quality and in vitro performance of ophthalmic ointments**: Int J Pharm. 2015; 493. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.066>> Acesso em: 03 de abr. 2024.
- ²⁷ WAUGH, C. D. **Amphotericin B**. Em: xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 1–5. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/b978-008055232-3.61226-7>> Acesso em: 03 de abr. 2024.
- ²⁸ MAZERSKI, J.; BOROWSKI, E. **Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water**. Biophysical Chemistry, v. 57, n. 2-3, p. 205–217, jan. 1996. Disponível em: <[10.1016/0301-4622\(95\)00062-7](https://doi.org/10.1016/0301-4622(95)00062-7)> Acesso em: 03 de abr. 2024.
- ²⁹ SUK HYUN JUNG *et al.* **Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics**. European journal of pharmaceutical sciences, v. 37, n. 3-4, p. 313–320, 1 jun. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.02.021>>. Acesso em: 03 de abr. 2024.
- ³⁰ SHIM, Y.-H. **Amphotericin B Aggregation Inhibition with Novel Nanoparticles Prepared with Poly(ε-caprolactone)/Poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) Diblock Copolymer**. Journal of microbiology and biotechnology, v. 21, n. 1, p. 28–36, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.4014/jmb.1007.07041>>. Acesso em: 03 de abr. 2024.
- ³¹ FAUSTINO; PINHEIRO. **Lipid Systems for the Delivery of Amphotericin B in Antifungal Therapy**. Pharmaceutics, v. 12, n. 1, p. 29, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010029>> . Acesso em: 08 de abr. 2024.
- ³² WILSON, E.; THORSON, L.; SPEERT, D. P. **Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 35, n. 5, p. 796–800, 1 maio 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aac.35.5.796>>. Acesso em: 08 de abr. 2024.
- ³³ MOZAFFARIAN, N.; BERMAN, J. W.; CASADEVALL, A. **Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B**. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 41, n. 8, p. 1825–1829, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aac.41.8.1825>>. Acesso em: 08

de abr. 2024.

- ³⁴ ADLER-MOORE, J. P.; GANGNEUX, J.-P.; PAPPAS, P. G. **Comparison between liposomal formulations of amphotericin B**. *Medical Mycology*, v. 54, n. 3, p. 223–231, 14 jan. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/mmy/myv111>>. Acesso em: 08 de abr. 2024.
- ³⁵ TORRADO, J. J. *et al.* **Amphotericin B Formulations and Drug Targeting**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 7, p. 2405–2425, 1 jul. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jps.21179>> . Acesso em: 08 de abr. 2024.
- ³⁶ SERRANO D.R., BALLESTEROS M.P., SCHÄTZLEIN A.G., TORRADO J.J., UCHEGBU I.F. **Amphotericin B formulations—the possibility of generic competition**. *Pharm. Nanotechnol.* 2013;1:250–258. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/2211738501999131118125018>> . Acesso em: 08 de abr. 2024.
- ³⁷ CUDDIHY G., WASAN E.K., DI Y., WASAN K.M. **The development of oral amphotericin B to treat systemic fungal and parasitic infections: Has the myth been finally realized?** *Pharmaceutics*. 2019;11:99. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030099>>. Acesso em: 08 de abr. 2024.
- ³⁸ LIU, M.; CHEN, M.; YANG, Z. **Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy**. *Drug Delivery*, v. 24, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1225852>> . Acesso em: 08 de abr. 2024.
- ³⁹ PIOTR WAŚKO *et al.* **Toward Understanding of Toxic Side Effects of a Polyene Antibiotic Amphotericin B: Fluorescence Spectroscopy Reveals Widespread Formation of the Specific Supramolecular Structures of the Drug**. *Molecular Pharmaceutics*, v. 9, n. 5, p. 1511–1520, 26 abr. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/mp300143n>> . Acesso em: 10 de abr. 2024.
- ⁴⁰ STARZYK, J. *et al.* **Self-Association of Amphotericin B: Spontaneous Formation of Molecular Structures Responsible for the Toxic Side Effects of the Antibiotic**. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 118, n. 48, p. 13821–13832, 21 nov. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp510245n>> . Acesso em: 10 de abr. 2024.
- ⁴¹ JEONG WON KANG *et al.* **Pharmacokinetics and Renal Toxicity of Monomeric Amphotericin B in Rats after a Multiple Dose Regimen**. v. 4, n. 1, p. 16–23, 29 fev. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/2211738504666160301233754>> . Acesso em: 10 de abr. 2024.
- ⁴² WONG-BERINGER, A.; JACOBS, R. A.; GUGLIELMO, B. J. **Lipid Formulations of Amphotericin B: Clinical Efficacy and Toxicities**. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, n. 3, p. 603–618, 1 set. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/514704>>. Acesso em: 10 de abr. 2024.
- ⁴³ YU, B. G. *et al.* **In vitro dissociation of antifungal efficacy and toxicity for amphotericin B-loaded poly(ethylene oxide)-block-poly(β -benzyl-L-aspartate) micelles**. *Journal of controlled release*, v. 56, n. 1-3, p. 285–291, 1 dez. 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00095-9)>. Acesso em: 10 de abr. 2024.

- ⁴⁴ LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. **Amphotericin B: side effects and toxicity**. Revista Iberoamericana de Micología, v. 26, n. 4, p. 223–227, out. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.06.003>>. Acesso em: 10 de abr. 2024.
- ⁴⁵ ADLER-MOORE, J. P.; PROFFITT, R. T. **Amphotericin B lipid preparations: what are the differences?** Clinical Microbiology and Infection, v. 14, p. 25–36, maio 2008. Disponível em: <[10.1111/j.1469-0691.2008.01979.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01979.x)>. Acesso em: 10 de abr. 2024.
- ⁴⁶ BOSWELL, G. W.; BUELL, D.; BEKERSKY, I. **AmBisome (liposomal amphotericin B): A comparative review**. Journal of clinical pharmacology, v. 38, n. 7, p. 583–592, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1998.tb04464.x>>. Acesso em: 10 de abr. 2024.
- ⁴⁷ KLEINBERG, M. **What is the current and future status of conventional amphotericin B?** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 27, p. 12–16, jun. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.03.013>>. Acesso em: 14 de abr. 2024.
- ⁴⁸ GILEAD, 1999. **Gilead Acquisition Of NeXstar Completed**. Disponível em: <<https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/1999/7/gilead-acquisition-of-nexstar-completed>>. Acesso em: 14 de abr. 2024.
- ⁴⁹ ADLER-MOORE, J.; PROFFITT, R. T. **AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 49, n. suppl_1, p. 21–30, 1 jan. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.21>. Acesso em: 14 de abr. 2024.
- ⁵⁰ STONE, N. R. *et al.* **Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions**. Drugs, v. 76, n. 4, p. 485–500, 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40265-016-0538-7>>. Acesso em: 14 de abr. 2024.
- ⁵¹ CAVASSIN, F. B. *et al.* **Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections**. Infectious Diseases and Therapy, v. 10, n. 1, p. 115–147, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40121-020-00382-7>>. Acesso em: 14 de abr. 2024.
- ⁵² PROFFITT, R. T.; ADLER-MOORE, J.; CHIANG, S.-M. **Amphotericin B liposome preparation**. US Patent, 12 Oct. 1999. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US5965156A/en>>. Acesso em: 14 de abr. 2024.
- ⁵³ OLSON, J. A. *et al.* **Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and Aspergillus fumigatus infected mice**. Medical Mycology, v. 53, n. 2, p. 107–118, 30 dez. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/mmy/myu070>>. Acesso em: 14 de abr. 2024.
- ⁵⁴ TANG, J. *et al.* **Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 134, p. 107–116, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.11.010>>. Acesso em: 17 abr. 2024.

- ⁵⁵ **AMBISOME®: Anfotericina lipossomal.** San Dimas, Califórnia, USA. Gilead, San Dimas, CA, EUA. 2024. Bula de remédio. Acesso em: 17 abr. 2024.
- ⁵⁶ WALKER, L. *et al.* **The Viscoelastic Properties of the Fungal Cell Wall Allow Traffic of AmBisome as Intact Liposome Vesicles.** *mBio*, v. 9, n. 1, 6 fev. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mbio.02383-17>>. Acesso em: 17 abr. 2024.
- ⁵⁷ TAKEMOTO, K.; YAMAMOTO, Y.; UEDA, Y. **Evaluation of Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of AmBisome against *Candida albicans*.** *Microbiology and Immunology*, v. 50, n. 8, p. 579–586, ago. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03832.x>>. Acesso em: 17 abr. 2024.
- ⁵⁸ LESTNER, J. M. *et al.* **Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Amphotericin B Deoxycholate, Liposomal Amphotericin B, and Amphotericin B Lipid Complex in an In Vitro Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 8, p. 3432–3441, ago. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aac.01586-09>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁵⁹ SHIMIZU, K. *et al.* **Temperature-dependent transfer of amphotericin B from liposomal membrane of AmBisome to fungal cell membrane.** *Journal of controlled release*, v. 141, n. 2, p. 208–215, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.09.019>>. Acesso: 18 abr. 2024.
- ⁶⁰ SOO HOO, L. **Fungal fatal attraction: a mechanistic review on targeting liposomal amphotericin B (AmBisome®) to the fungal membrane.** *Journal of Liposome Research*, v. 27, n. 3, p. 180–185, 3 jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1360345>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁶¹ ADLER-MOORE, J. P. *et al.* **Tissue pharmacokinetics and pharmacodynamics of AmBisome® (L-AmBis) in uninfected and infected animals and their effects on dosing regimens.** *Journal of liposome research*, v. 27, n. 3, p. 195–209, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1327543>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁶² ADLER-MOORE, J. *et al.* **Preclinical Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antifungal Activity of Liposomal Amphotericin B.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 68, n. Supplement_4, p. S244–S259, 2 maio 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/cid/ciz064>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁶³ GROLL, A.H., *et al.*, 2000. **Comparative efficacy and distribution of lipid formulations of amphotericin B in experimental candida albicans infection of the central nervous system.** *The Journal of Infectious Diseases*, 182, 274–282. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/315643>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁶⁴ OKU, N., *et al.*, 2000. **Evaluation of drug targeting strategies and liposomal trafficking.** *Current Pharmaceutical Design*, 6, 1669–1691. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1381612003398816>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁶⁵ SMITH, P. J. *et al.* **Effects of dosing regimen on accumulation, retention and prophylactic efficacy of liposomal amphotericin B.** *The journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 59, n. 5, p. 941–951, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkm077>>. Acesso em: 18 abr. 2024.

- ⁶⁶ E. ABDOLLAHIZAD *et al.* **Amphotericin B Pharmacokinetics: Inter-strain Differences in Rats Following Intravenous Administration of the Most Commonly Marketed Formulations of the Drug.** Deleted Journal, v. 22, n. 1, 23 mar. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.5812/ijpr-134772>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁶⁷ WURTZ R, ITOKAZU G, RODVOLD K. **Antimicrobial dosing in obese patients.** Clin Infect Dis. 1997 Jul;25(1):112–8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/514505>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁶⁸ NATH CE, MCLACHLAN AJ, SHAW PJ, COAKLEY JC, EARL JW. **Amphotericin B dose optimization in children with malignant diseases.** Chemotherapy. 2007;53(2):142–7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000100013>>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- ⁶⁹ MORIYAMA B, TORABI-PARIZI P, PRATT AK, HENNING SA, PENNICK G, SHEA YR, *et al.* **Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B in pleural fluid.** Antimicrob Agents Chemother. 2010 Apr;54(4):1633–5. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aac.01438-09>>. Acesso em: 20 abr. 2024.
- ⁷⁰ GILEAD, 2024. **Gilead Sciences Announces Fourth Quarter and Full Year 2022 Financial Results.** Disponível em: <<https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2023/2/gilead-sciences-announces-fourth-quarter-and-full-year-2022-financial-results>>. Acesso em: 20 abr. 2024.
- ⁷¹ MARKET 360. **AmBisome Market [Latest Report] With Future Demand and Growth Analysis to 2032.** Disponível em: <<https://www.linkedin.com/pulse/ambisome-market-latest-report-future-mvzjc/>>. Acesso em: 20 abr. 2024.
- ⁷² GILEAD, 2024. **Gilead Sciences and World Health Organization Establish New Five-Year Initiative to Prevent Deaths from visceral leishmaniasis.** Disponível em: <<https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2011/12/gilead-sciences-and-world-health-organization-establish-new-five-year--initiative-to-prevent-deaths-from-visceral-leishmaniasis>>. Acesso em: 20 abr. 2024.
- ⁷³ CACELA, C.; HINCHA, D. K. **Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes.** Biophys. J., Bethesda, v. 90, p.2831–2842, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.074427>>. Acesso em: 23 abr. 2024.
- ⁷⁴ SHARMA, A.; SHARMA, U. S. **Liposome in drug delivery: progress and limitations.** Int. J. Pharm, Amsterdam, v. 154, p.123-140, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X)>. Acesso em: 23 abr. 2024.
- ⁷⁵ Lasic, D. D. 1995. **Liposomes - From Physics to Applications.** Amsterdam, Elsevier. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1383-8121\(06\)80027-8](https://doi.org/10.1016/S1383-8121(06)80027-8)>. Acesso em: 23 abr. 2024.
- ⁷⁶ Lasic, D. D. 1998. **Novel applications of liposomes.** In: Tibtech, 16, pp. 307-320. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01220-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01220-7)>. Acesso em: 23 abr. 2024.

- ⁷⁷ JENSEN, G. M. **The care and feeding of a commercial liposomal product: liposomal amphotericin B (AmBisome®).** Journal of liposome research, v. 27, n. 3, p. 173–179, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1380664>>. Acesso em: 25 abr. 2024.
- ⁷⁸ ORTIZ, A.S. **Ampolas e frascos de vidro tipo 1 para produtos de uso parenteral.** Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens. ITAL. 1998. Disponível em: <https://ital.agricultura.sp.gov.br/arquivos/cetea/informativo/v10n3/v10n3_artigo1.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2024.
- ⁷⁹ Deng, W., *et al.* **Controlled gene and drug release from a liposomal delivery platform triggered by X-ray radiation.** Nat Commun 9, 2713 (2018). Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05118-3>>. Acesso em : 25 abr. 2024.
- ⁸⁰ PROFFITT, R. T. *et al.* **Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents.** The journal of antimicrobial chemotherapy, v. 28 Suppl B, p. 49–61, 1991. Disponível em <https://doi.org/10.1093/jac/28.suppl_B.49>. Acesso em : 25 abr. 2024.
- ⁸¹ BOSWELL, G. W. *et al.* **Toxicological profile and pharmacokinetics of a unilamellar liposomal vesicle formulation of amphotericin B in rats.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 42, n. 2, p. 263–268, 1998. <<https://doi.org/10.1128/aac.42.2.263>>. Acesso em : 25 abr. 2024.
- ⁸² KHAYATAN, D. *et al.* **Marketed antiparasitic nanotechnology-based products and drawbacks.** Em: Advances in Antiparasitic Therapies and Drug Delivery. [s.l.] Elsevier, 2024. p. 263–275. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15178-1.00015-8>>. Acesso em: 25 abr. 2024.
- ⁸³ BORRACHAS, L. **Borracha Butílica.** Disponível em: <<https://www.lborborrachas.com.br/artigo/borracha-butilica.html>>. Acesso em: 25 abr. 2024.
- ⁸⁴ GIORDANI, S. *et al.* **Liposomes characterization for market approval as pharmaceutical products: Analytical methods, guidelines and standardized protocols.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 236, n. 115751, p. 115751, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115751>>. Acesso em: 1 maio. 2024.
- ⁸⁵ DÍAZ DE LEÓN-ORTEGA, R. *et al.* **In vitro in vivo relations for the parenteral liposomal formulation of Amphotericin B: A biorelevant and clinically relevant approach.** European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, v. 159, p. 188–197, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.07.025>> Acesso em: 1 maio. 2024.
- ⁸⁶ NÉMETH, Z. *et al.* **A proposed methodology for a risk assessment-based liposome development process.** Pharmaceutics, v. 12, n. 12, p. 1164, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121164>>. Acesso em: 1 maio. 2024.

- ⁸⁷ RIVNAY, B. *et al.* **Critical process parameters in manufacturing of liposomal formulations of amphotericin B.** International journal of pharmaceutics, v. 565, p. 447–457, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.052>>. Acesso em: 1 maio. 2024.
- ⁸⁸ Jill P Adler-Moore, Jean-Pierre Gangneux, Peter G Pappas, **Comparison between liposomal formulations of amphotericin B**, Medical Mycology, Volume 54, Issue 3, March 2016, Pages 223–231, <<https://doi.org/10.1093/mmy/myv111>> . Acesso em: 1 maio. 2024.
- ⁸⁹ WALSH, T. J. *et al.* Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 10, p. 764–771, 1999..Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJM199903113401004>>. Acesso em: 1 maio. 2024.
- ⁹⁰ FDA, 1997. **Drug Approval Package: AmBisome (Amphotericin B) NDA# 050740.** Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/050740_ambisome_toc.cfm>. Acesso em: 1 maio. 2024.
- ⁹¹ **AmBisome Full Prescribing Information, Dosage & Side Effects.** MIMS Thailand, 2024. Disponível em: <<https://www.mims.com/>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ⁹² MAJA, L.; ŽELJKO, K.; MATEJA, P. **Sustainable technologies for liposome preparation.** The journal of supercritical fluids, v. 165, n. 104984, p. 104984, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ⁹³ ZAGALO, D. M. *et al.* **A quality by design (QbD) approach in pharmaceutical development of lipid-based nanosystems: A systematic review.** Journal of drug delivery science and technology, v. 70, n. 103207, p. 103207, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103207>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ⁹⁴ BARBĂLATĂ, C. I. *et al.* **Application of the QbD approach in the development of a liposomal formulation with EGCG.** Journal of pharmaceutical innovation, v. 17, n. 3, p. 867–880, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12247-021-09541-w>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ⁹⁵ LIU, P.; CHEN, G.; ZHANG, J. **A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives.** Molecules (Basel, Switzerland), v. 27, n. 4, p. 1372, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules27041372>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ⁹⁶ BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. **Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>> Acesso em: 19 jun. 2024.
- ⁹⁷ KAPOOR, M.; LEE, S. L.; TYNER, K. M. **Liposomal drug product development and quality: Current US experience and perspective.** The AAPS journal, v. 19, n. 3, p. 632–641, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1208/s12248-017-0049-9>>. Acesso em: 19 jun. 2024.

- ⁹⁸ CHEN, C. *et al.* **An overview of liposome lyophilization and its future potential.** *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, v. 142, n. 3, p. 299–311, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024>> Acesso em: 19 jun. 2024.
- ⁹⁹ DANAEI, M. *et al.* **Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems.** *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ¹⁰⁰ PALLAGI, E. *et al.* **Application of the QbD-based approach in the early development of liposomes for nasal administration.** *International journal of pharmaceutics*, v. 562, p. 11–22, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.021>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ¹⁰¹ GOEL, H. *et al.* **Fabrication design, process technologies, and convolutions in the scale-up of nanotherapeutic delivery systems.** Em: *Nanoparticle Therapeutics*. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 47–131. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820757-4.00017-X>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- ¹⁰² ELOY, J. O.; PALMA ABRIATA, J.; MALDONADO MARCHETTI, J. (EDS.). **Nanocarriers for drug delivery: Concepts and applications.** 1. ed. Cham, Switzerland: Springer Nature, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-030-63389-9>> . Acesso em: 1 ago. 2024.
- ¹⁰³ IMAN, M. *et al.* **Characterization of the colloidal properties, in vitro antifungal activity, antileishmanial activity and toxicity in mice of a distigmasterylhemisuccinoyl-glycero-phosphocholine liposome-intercalated amphotericin B.** *International journal of pharmaceutics*, v. 408, n. 1–2, p. 163–172, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.044>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- ¹⁰⁴ LIU, H. *et al.* **Optimization of the manufacturing process of a complex amphotericin B liposomal formulation using quality by design approach.** *International journal of pharmaceutics*, v. 585, n. 119473, p. 119473, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119473>> Acesso em: 1 ago. 2024.
- ¹⁰⁵ SAHNI, E. K. *et al.* **Vial breakage in lyophilization- case studies from commercial manufacturing and laboratory studies.** *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 112, n. 4, p. 1151–1159, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119473>> Acesso em: 1 ago. 2024.
- ¹⁰⁶ TEFAS, L. R. **Quality by design approach for the development of salinomycin and gemcitabine combination therapy liposomes for colorectal cancer.** *Pharmacia*, v. 70, n. 4, p. 596–606, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.31925/farmacia.2022.4.4>> Acesso em: 1 ago. 2024.
- ¹⁰⁷ SEIFY, R. *et al.* **Amphotericin B liposomal formulation: applicable preparation methods, challenges, and tips.** *Drug development and industrial pharmacy*, v. 49, n. 5, p. 367–376, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03639045.2023.2215006>> Acesso em: 1 ago. 2024.
- ¹⁰⁸ SVIRKIN, Y. *et al.* **Amphotericin B release rate is the link between drug status in the liposomal bilayer and toxicity.** *Asian journal of pharmaceutical sciences*, v. 17, n. 4, p. 544–556, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.04.007>> Acesso em: 1 ago. 2024.

- ¹⁰⁹ FUKUDA, I. M. *et al.* **Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD).** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 54, n. spe, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006>> Acesso em: 2 ago. 2024.
- ¹¹⁰ WANG, Y.; GRAINGER, D. W. **Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments.** Advanced drug delivery reviews, v. 151–152, p. 56–71, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.03.003>> . Acesso em: 2 ago. 2024.
- ¹¹¹ DIAS, A. L. *et al.* **Regulation of nanotechnology-based products subject to health regulations: Application of quality by design (QbD) and quality risk management (QRM).** Em: Nanomedicine and Nanotoxicology. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 319–347. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-63389-9_13> Acesso em: 2 ago. 2024.
- ¹¹² BORGONOVO, F. *et al.* **Physicochemical characteristics of antimicrobials and practical recommendations for intravenous administration: A systematic review.** Antibiotics (Basel, Switzerland), v. 12, n. 8, p. 1338, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics12081338>> . Acesso em: 2 ago. 2024.
- ¹¹³ GURUMUKHI, V. C.; BARI, S. B. **Fabrication of efavirenz loaded nano-formulation using quality by design (QbD) based approach: Exploring characterizations and in vivo safety.** Journal of drug delivery science and technology, v. 56, n. 101545, p. 101545, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101545>> Acesso em: 3 ago. 2024.
- ¹¹⁴ DHOBLE, S.; PATRAVALE, V. **Development of anti-angiogenic erlotinib liposomal formulation for pulmonary hypertension: a QbD approach.** Drug delivery and translational research, v. 9, n. 5, p. 980–996, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1208/s12248-014-9598-3>> . Acesso em: 3 ago. 2024.
- ¹¹⁵ **Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED)** [site da internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/cmed/precos>> . Acesso em: 3 ago. 2024.
- ¹¹⁶ ALSHAER, W. *et al.* **Quality by Design Approach in Liposomal Formulations: Robust Product Development.** Molecules, v. 28, n. 1, p. 10, 20 dez. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules28010010>> . Acesso em: 8 ago. 2024.
- ¹¹⁷ KUMAR, A.; DIXIT, C. K. **Methods for characterization of nanoparticles.** in: Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 43–58. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>> . Acesso em: 8 ago. 2024.
- ¹¹⁸ Mallikarjun PN, Kumari P, Kumar SM and Sowmya G: **An overview on quality by design in pharmaceutical product development.** Int J Pharm Sci & Res 2022; 13(6): 2283-93. Disponível em: <<https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232>> Acesso em: 8 ago. 2024.
- ¹¹⁹ KHAN, A. *et al.* **Quality by design- newer technique for pharmaceutical product development.** Intelligent Pharmacy, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ipha.2023.10.004>> Acesso em: 15 ago. 2024.
- ¹²⁰ DOBÓ, D. G. *et al.* **Pharmaceutical development and design of Thermosensitive liposomes based on the QbD approach.** Molecules (Basel,

Switzerland), v. 27, n. 5, p. 1536, 2022. Disponível em:

<<https://doi.org/10.3390/molecules27051536>> Acesso em: 15 ago. 2024.

¹²¹ NÉMETH, Z. *et al.* **How could QbD address the R&D challenges of ‘nose-to-brain’ liposomal resveratrol formulations?** The 1st International Electronic Conference on Pharmaceutics. Anais...Basel Switzerland: MDPI, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/IECP2020-08661>>. Acesso em: 15 ago. 2024.

¹²² PAYNE, N. I., COSGROVE, R. F., GREEN, A. P., & LIU, L. (1987). **In-vivo studies of amphotericin B liposomes derived from proliposomes: effect of formulation on toxicity and tissue disposition of the drug in mice.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, 39(1), 24–28. Disponível em : <<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1987.tb07156.x>> Acesso em : 15 ago. 2024.

¹²³ JOHNSON S.M. (1975) **The inability of macrophages to digest liposomes containing a high proportion of cholesterol.** Biochem. Soc. Trans. 3, 160. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/bst0030160>>. Acesso em: 18 ago. 2024.

¹²⁴ BARBALATA, C.-I. *et al.* **The use of the QbD approach to optimize the co-loading of simvastatin and doxorubicin in liposomes for a synergistic anticancer effect.** Pharmaceutics (Basel, Switzerland), v. 15, n. 10, p. 1211, 2022. Disponível em: Acesso em: <<https://doi.org/10.3390/ph15101211>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

¹²⁵ TOYOTA, H.; ASAI, T.; OKU, N. **Process optimization by use of design of experiments: Application for liposomalization of FK506.** European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, v. 102, p. 196–202, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.007>> Acesso em: 29 ago. 2024.

¹²⁶ BARROS, C. DE et al. **Quality by design approach for the development of liposome carrying ghrelin for intranasal administration.** Pharmaceutics, v. 13, n. 5, p. 686, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050686>>. Acesso em: 29 ago.2024.

¹²⁷ JAIN, A.; HURKAT, P.; JAIN, S. K. **Development of liposomes using formulation by design: Basics to recent advances.** Chemistry and physics of lipids, v. 224, n. 104764, p. 104764, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.017>>. Acesso em: 01 set.2024.

¹²⁸ BASTOGNE, T. **Quality-by-design of nanopharmaceuticals - a state of the art.** Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine, v. 13, n. 7, p. 2151–2157, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.05.014>> Acesso em: 01 set.2024.

¹²⁹ RATHORE, A. S.; WINKLE, H. **Quality by design for biopharmaceuticals.** Nature biotechnology, v. 27, n. 1, p. 26–34, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nbt0109-26>> Acesso em: 01 set.2024.

¹³⁰ SANTOS, C. P.; RATO, T. J.; REIS, M. S. **Design of Experiments: A comparison study from the non-expert user’s perspective: Design of Experiments: A Comparison Study from the User’s Perspective.** Journal of chemometrics, v. 33, n. 1, p. e3087, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cem.3087>>. Acesso em: 01 set.2024.