



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
NÚCLEO DE CONTROLE DE QUALIDADE E CORRELATOS (NCQMC)**

CAIO FELIPE GUSMÃO ROCHA GALINDO

**DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS DE CLOFAZIMINA: PREPARO,
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*.**

RECIFE

2023

CAIO FELIPE GUSMÃO ROCHA GALINDO

**DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS DE CLOFAZIMINA: PREPARO,
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca, parte da disciplina TCC 2 do curso de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof^o. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho.

Coorientador: Dr. Lucas José de Alencar Danda.

RECIFE
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Galindo, Caio Felipe Gusmão Rocha.

Dispersões sólidas amorfas de clofazimina: Preparo, caracterização e estudo de liberação in vitro / Caio Felipe Gusmão Rocha Galindo. - Recife, 2023.

36 p.

Orientador(a): José Lamartine Soares Sobrinho

Cooorientador(a): Lucas José de Alencar Danda

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

1. Clofazimina. 2. Dispersão Sólida. 3. Amorfo. 4. Polímero. I. Sobrinho, José Lamartine Soares. (Orientação). II. Danda, Lucas José de Alencar. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

CAIO FELIPE GUSMÃO ROCHA GALINDO

**DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS DE CLOFAZIMINA: PREPARO,
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca, parte da disciplina TCC 2 do curso de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 02/05/2023

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Dra. Luíse Lopes de Chaves

M.Sc. Kayque Almeida dos Santos

RECIFE

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe e meu padrasto que sempre me deram forças para continuar, mesmo com tantas dificuldades da graduação e mudança para uma nova cidade. Não seria quem sou e nem teria conseguido o que consegui sem eles.

Ao meu pai, madrasta e irmão, pelo carinho e apoio constante, sempre confiando em mim e torcendo pelo meu sucesso profissional.

À minha irmã e ao meu cunhado, por terem me acolhido no meu primeiro ano em Recife e desde então me acompanharam com boas energias e momentos durante todo o percurso.

Um dos maiores agradecimentos à minha avó Nadja, pelo exemplo de força, trabalho e amor, minha maior felicidade é poder estar dividindo esse momento com ela.

Aos meus amigos da graduação, por terem estado comigo em todos os momentos, em especial Gabriel V., Roberto, Mellina, Wesley e Jonathan. Também, aos meus amigos fora da faculdade, por terem me ajudado a segurar a barra na vida, principalmente Eduarda e Gabriel G.

Aos meus professores, por terem me formado como profissional. Um agradecimento carinhoso às professoras Jane e Danielle, por terem sido tão amorosas e compreensivas em meio ao caos da universidade.

Ao laboratório que faço parte, NCQMC, por terem sido tão receptivos, proporcionando um ambiente agradável e estimulante, o que fez com que me apaixonasse pela pesquisa. Meu orientador Dr. José Lamartine e a Prof^a Dra. Mônica Felts tiveram papel fundamental nesse meu crescimento.

Ao meu coorientador Dr. Lucas Danda e a mestranda Alane Rafaela por terem me acompanhado durante toda a parte experimental, não teria conseguido concluir boa parte desse projeto sem a ajuda deles. Além de tudo, foram bons amigos que sempre me ofereceram conforto e conselhos.

Por último, quero agradecer à minha porquinha-da-índia, Café, por ter me ensinado a ter mais responsabilidade na vida.

RESUMO

No Brasil, a incidência de hanseníase e tuberculose continua alarmante. Um fármaco que atua no tratamento dessas duas bactérias é a clofazimina, responsável por atuar em fagócitos e otimizar sua resposta inflamatória, porém, a baixa solubilidade em água impede que alcance concentrações satisfatórias nos sítios de ação. Para incrementar a biodisponibilidade do fármaco, foi usada a técnica de dispersão sólida amorfa, para amorfizar a forma cristalina da clofazimina e aumentar sua capacidade de dissolução. Foram testados seis solventes orgânicos, confirmando a melhor solubilidade em clorofórmio, acetona e metanol:diclorometano (1:1,v/v) . Os solventes de escolha tiveram a eficácia de solubilidade testadas com PVPK-90, HPMC e Soluplus. A técnica para otimização do sistema ocorreu por evaporação giratória de solventes, com aquecimento na incubadora, foram obtidos os filmes. O melhor filme, com amorfização averiguada por microscopia óptica , foi o de Soluplus com clorofórmio. O filme foi triturado e obteve-se o pó com a dispersão fármaco-polímero Para testar seu potencial, o estado corporal teve mimetização *in vitro*, em condições *sink*, alcançando 88% de eficácia de dissolução, muito superior quando comparada à mistura física e clofazimina isolada. Tentativas de caracterizar a amorfização por calorimetria diferencial exploratória não tiveram resultados discriminatórios. Assim, o carreador teve boas prospecções iniciais, mas precisa de mais testes.

Palavras-chave: Clofazimina; Dispersão sólida; Amorfo; Polímero.

ABSTRACT

In Brazil, the incidence of hansen disease and tuberculosis remains alarming. A drug that acts in the treatment of these two bacteria is clofazimine, responsible for acting on phagocytes and optimizing their inflammatory response, however, the low solubility in water prevents it from reaching satisfactory concentrations at the sites of action. To increase the bioavailability of the drug, the solid amorphous dispersion technique was used to amorphize the crystalline form of clofazimine and increase its dissolution capacity. Six organic solvents were tested, confirming the best solubility in chloroform, acetone and methanol:dichloromethane (1:1, v/v). The solvents of choice were tested for solubility effectiveness with PVPK-90, HPMC and Soluplus. The technique for optimizing the system occurred by rotary evaporation of solvents, with heating in the incubator, the films were obtained. The best film, with amorphization verified by optical microscopy, was Soluplus with chloroform. The film was crushed and the powder with the drug-polymer dispersion was obtained. To test its potential, the body state was mimicked *in vitro*, under *sink* conditions, reaching 88% dissolution efficiency, much higher when compared to the physical mixture and clofazimine isolated. Attempts to characterize amorphization by differential exploratory calorimetry have not yielded discriminatory results. Thus, the carrier had good initial prospects, but needs further testing.

Keywords: Clofazimine; Solid dispersion; Amorphous; Polymer.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas relevantes de polímeros comumente utilizados em dispersões sólidas amorfas.....	18
Tabela 2 – Resumo das publicações feitas sobre dispersões sólidas amorfas de clofazimina.....	19
Tabela 3 – Descrição do ensaio experimental dos ensaios de dissolução sob condição sink... 22	
Tabela 4 – Perfil de cristalinidade apresentado em cada DSA após a técnica de evaporação rotatória de solventes.....	25
Tabela 5 – Dados obtidos ao final das 8h do ensaio de dissolução.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da clofazimina de peso molecular 473,40 g/mol.....	13
Figura 2 – Representação esquemática da energia como intercessão entre fases.....	16
Figura 3 – Reprodução de um sistema com fármacos em vermelho e polímeros como linhas azuis. “A” representa uma estrutura ideal, com o fármaco disperso na matriz polimérica. “B” mostra fármacos cristalinos, mesmo com a presença de polímero. “C” expressa os fármacos amorfos, mas poucos aderidos ao polímero.....	18
Figura 4 – 20 mg de CLZ solubilizada em 10 mL de solventes, organizados por gradiente de cor. Respectivamente da esquerda para direita: Acetona, acetonitrila, clorofórmio, etanol, metanol e metanol:diclorometano (1:1, v/v).....	24
Figura 5 – Presença de precipitação em metanol (esquerda) e acetonitrila (direita).....	24
Figura 6 – Grumos mais escuros de CLZ dispostos irregularmente em HPMC com metanol: diclorometano (A) e focos de cristais visíveis em PVP K-90 com acetona (B) e PVP K-90 em clorofórmio (C).....	26
Figura 7 – Aparência dos cristais nos filme de HPMC (A) , PVP K-90 com acetona (B) e PVP K-90 com clorofórmio (C) vistos em microscópio óptico com aumento de 10x.....	26
Figura 8 – Filme de soluplus com Clorofórmio (A) e Acetona (B).....	27
Figura 9 – Filmes de soluplus com Acetona (A) e Clorofórmio (B), observadas em microscopia de luz polarizada com aumento de 10x.....	28
Figura 10 – Comparação visual dos pós da DSA CLZ-SOL (esquerda) e MF (direita).....	28
Figura 11 – DSC do IFA, Soluplus, SOL-CLZ e MF em função da temperatura.....	29
Figura 12 – Perfil de dissolução do IFA, MF e DSA de 0 a 480 min.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1 CLOFAZIMINA.....	13
3.2 DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS.....	15
3.2.1 Perfil de dissolução das dispersões sólidas amorfas.....	16
3.2.2 Polímeros usados em dispersões sólidas amorfas.....	17
3.2.3 Dispersões sólidas amorfas de clofazimina.....	18
4 METODOLOGIA.....	20
4.1 MATERIAIS.....	20
4.2 ESCOLHA DO SOLVENTE.....	20
4.3 ESCOLHA DO POLÍMERO.....	20
4.4 OBTENÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS POR EVAPORAÇÃO ROTATIVA DE SOLVENTE.....	20
4.5 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS.....	21
4.5.1 Calorimetria exploratória diferencial.....	21
4.5.2 Microscopia de luz polarizada.....	21
4.6 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE EQUILÍBRIO.....	22
4.7 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO SINK.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 OBTENÇÃO DA DISPERSÃO SÓLIDA AMORFA.....	23
5.2 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	30
6 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

A clofazimina (CLZ) é um fármaco antibacteriano da classe das riminofenazinas (RFZ), indicada para o tratamento da hanseníase e coadjuvante na terapêutica para tuberculose resistente, causadas pela *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente (Reddy, 1999; Nascimento, 2020).

Essas morbidades são um preocupante problema de saúde pública, já que em escala mundial, o Brasil ocupa o posto de 2º com maior incidência de hanseníase e 20º entre os com alta carga de tuberculose (Santos et al., 2019; Cortez et al., 2021).

Em questão de mecanismo de ação, acredita-se que a lipofilicidade da CLZ permite que invada com facilidade células fagocitárias, potencializando sua atividade pró-inflamatória, além de ter um longo tempo de meia-vida, porém, maior parte da sua concentração acumula-se em tecidos adiposos e órgãos (Holdiness, 2012). Por conta disso, as concentrações séricas de fármaco são baixas, diminuindo sua eficácia terapêutica (Desikan, 1976), então é necessária a formulação de sistemas de liberação capazes de aumentar sua biodisponibilidade.

Dentre as formas de aprimoramento da solubilidade em água de fármacos no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) classe II, de baixa solubilidade e alta permeabilidade, encontram-se as dispersões sólidas amorfas (DSA). Esse sistema atua na desorganização da configuração cristalina do fármaco, deixando-o na forma amorfa, termodinamicamente instável, para que entre em estado de supersaturação, conseqüentemente elevando sua solubilidade quando ingerido por via oral (Miller, 2012).

A instabilidade dessa forma exige a adição de carreadores poliméricos, macromoléculas inertes responsáveis por impedir a nucleação na fase amorfa e sua volta ao estado cristalino. Para isso, são escolhidos polímeros baseados em suas características físico-químicas e estudada a capacidade de manter o fármaco supersaturado em sua matriz (Baghel, 2016).

Por isso, o presente projeto busca preparar uma estrutura ideal, com a CLZ dispersa na matriz polimérica, acompanhando o processo de liberação a partir de caracterizações físico-químicas, para que seja possível elucidar a possível efetividade da DSA no trato gastrointestinal (TGI), por meio de ensaios *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as propriedades da CLZ, visando realizar estudo de liberação *in vitro* de clofazimina a partir de dispersões sólidas amorfas ideais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

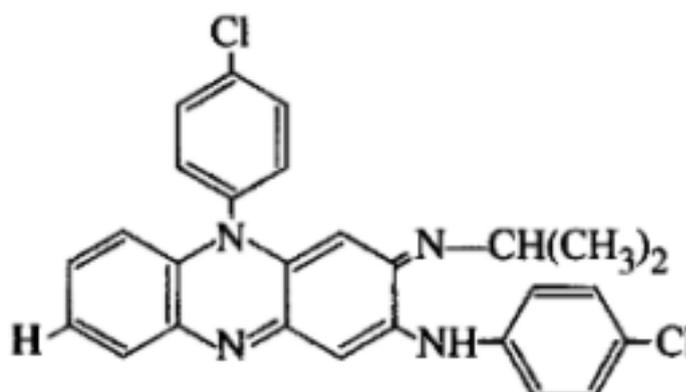
- Examinar a solubilidade da clofazimina em diferentes solventes;
- Preparar dispersões sólidas amorfas pelo método de evaporação rotativa de solventes;
- Estudar o comportamento da clofazimina em PVP K-90, HPMC e Soluplus quando submetida ao processo de amorfização;
- Realizar caracterizações do estado sólido por calorimetria diferencial exploratória;
- Realizar estudo de liberação *in vitro* sob condição *sink*;
- Comparar as eficiências de dissolução das amostras a partir dos dados da liberação *in vitro*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CLOFAZIMINA

A CLZ (Figura 1) ($C_{27}H_{22}Cl_2N_4$) é um antibacteriano que pertence ao grupo de compostos conhecido como riminofenazinas, originados de líquens (Reddy, 1999). Possui coloração vermelho-alaranjada, peso molecular de 473,40 g/mol, faixa de fusão 210-212 °C, solubilidade em água de 0,225 µg/mL, logP 7,66 e pKa 8,51 (DRUGBANK, 2022). Essas características conferem alta hidrofobicidade, o que a enquadrou na categoria II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apontando sua baixa solubilidade e alta permeabilidade.

Figura 1 – Estrutura química da clofazimina de peso molecular 473,40 g/mol.



Fonte: Extraído de VM Reddy et al. (1999).

Inicialmente, pouco era conhecido sobre as características físico-químicas das RFZ, mas estudos preliminares *in vitro* criaram a expectativa de que estas pudessem prevenir e combater a *Mycobacterium tuberculosis*, responsável pela tuberculose (Barry, 1974). Entre as RFZ, a CLZ foi a entidade com maior potencial de ação *in vitro*, mas posteriores pesquisas *in vivo* realizadas em símios indicaram pouco potencial farmacológico, fazendo com que seus estudos fossem abandonados por um tempo (Schmidt, 1955; Dey, 2012).

Novas pesquisas começaram a esclarecer sua falta de atividade, apontando a baixa biodisponibilidade quando ingerida por via oral, resultando em poucas concentrações séricas, enquanto os tecidos adiposos, fígado, baço e pulmão sofriam

com o depósito quase total do fármaco (Desikan, 1976). Entretanto, foi percebido que ratos, coelhos e hamsters apresentavam melhor absorção oral do fármaco quando comparados a humanos, porcos e símios, principalmente quando a ingestão era realizada com alimentos contendo gordura e proteínas, o que facilitou o desenvolvimento de mais estudos (Schaad-Lanyi, 1987). Em pesquisas com ratos, descobriu-se que os órgãos previamente citados apresentavam mudança de cor, dependendo da dose, começando com cores levemente alaranjadas e podendo chegar a preto (Swanson, 2015). Assim, o mecanismo de ação do fármaco começou a ser explorado, mesmo que atualmente ainda não se saiba a maneira exata do seu funcionamento. Especula-se que pela sua propriedade lipofílica, a entrada em macrófagos, neutrófilos e monócitos é facilitada, ativando efeitos pró-inflamatórios, como a liberação de peróxido de hidrogênio e fosfolipase A2 (Krajewska, 1993; Anderson 1998). Também foi visto que ela é capaz de se ligar às guaninas do DNA, inibindo a multiplicação de microrganismos (Morrison, 1976).

Esses achados puderam direcionar o uso da CLZ para o tratamento de micobactérias, como *Mycobacterium leprae*, a qual tem seu metabolismo inibido pelo fármaco. Por esta razão, o fármaco atua nos esquemas terapêuticos aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento da hanseníase, principalmente aquela causada por bactérias resistentes à dapsona (Reddy, 1999). Ainda, a CLZ também age na assistência da terapia contra *Mycobacterium tuberculosis*, como foi preconizado no início, combatendo cepas multirresistentes e diminuindo o surgimento de resistência à isoniazida (Nascimento, 2020).

Concomitantemente, estudos de toxicidade e estabilidade começaram a ser apresentados, demonstrando a fotossensibilidade da CLZ (Sahu, 1990). Também foi visto que seu tempo de meia-vida, dependendo da dose, poderia variar de 10 a 70 dias, já que a lipofilicidade retarda sua eliminação (Arbiser, 1995), que é feita majoritariamente por via biliar, renal, glândulas sebáceas, sudoríparas e mamárias, estando presente nas fezes, urina, lágrimas, escarro e leite (Venkatesan, 1997). Apesar de tudo, efeitos colaterais graves da CLZ são raros, normalmente com pacientes apresentando pigmentações marrons ou vermelhas na pele, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos, mas, em aspectos gerais, é segura e a adesão ao tratamento é satisfatória (Martiniano, 2017).

3.2 DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS

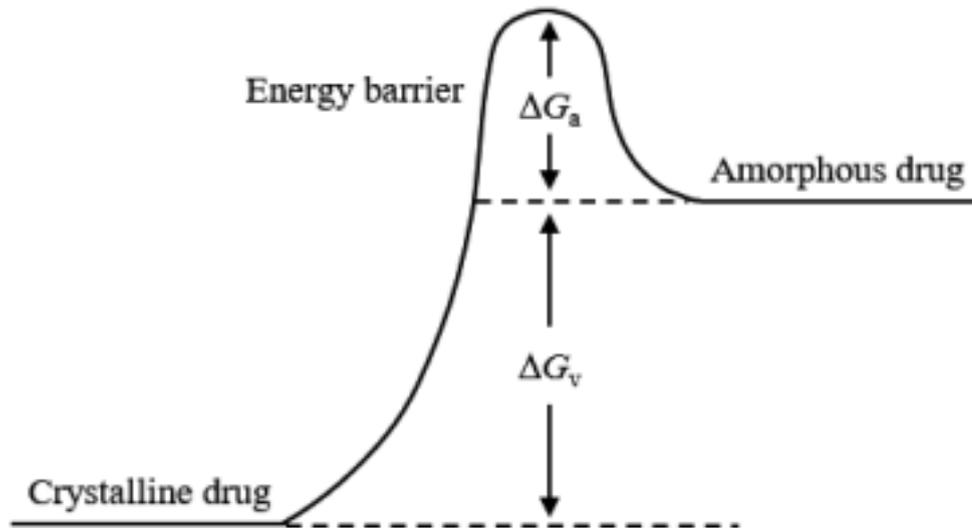
Com o advento da triagem de alto rendimento de potenciais agentes terapêuticos, ficou cada vez mais comum o aparecimento de fármacos classificados como SCB II, de baixa solubilidade em água. Consequentemente, a absorção pela via oral dos fármacos contidos nesses medicamentos acaba sendo prejudicada, de forma que pesquisadores da biofarmacotécnica precisaram criar estratégias para melhorar a biodisponibilidade dessas formulações (Nikghalb, 2012).

Dentre as muitas técnicas disponíveis para melhoramento da solubilidade e taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis, os estudiosos optam principalmente por redução do tamanho de partícula (Kipp, 2004) e obtenção de sais (Serajuddin, 2007). Porém, estas estratégias agem, principalmente, na taxa de dissolução (i.e., a velocidade na qual o fármaco se dissolve), não sendo aplicáveis aos diversos fármacos diretamente limitados pela solubilidade. Por outro lado, dispersões sólidas amorfas (DSA) são sistemas de liberação capazes de melhorar a biodisponibilidade desses fármacos, gerando aumento da solubilidade cinética através da supersaturação (Miller, 2012).

As DSAs consistem em sistemas que desfazem a rede cristalina do fármaco, reduzindo-o ao estado amorfo. Essa desorganização confere maior força termodinâmica e cinética, como pode ser visto na Figura 2, onde a maior amorfização, confere energia superior, o que a leva a um estado de supersaturação em solução (Vo, 2013). Se essa nova forma for mantida, ela é capaz de aperfeiçoar a biodisponibilidade do fármaco na região gastrointestinal, já que ultrapassará o limite em que ele é normalmente dissolvido e absorvido (Newman, 2015).

Dessa forma, são necessárias técnicas específicas para a formulação de uma DSA ideal, dentre os métodos mais presentes na literatura, estão a evaporação de solventes, co-precipitação, fusão, co-moagem, aprisionamento de gel, secagem por pulverização, liofilização, eletrofiação, gotejamento, extrusão por fusão e aglomeração por fusão (Nikghalb, 2012).

Figura 2 – Representação esquemática da energia como intercessão entre fases.



Fonte: Extraído de M. Luo (2021).

Essa energia livre, entretanto, é termodinamicamente instável e irá tender a voltar ao seu estado cristalino mais estável (Lapuk, 2019). Como normalmente são necessários o uso de meios aquosos para testes de dissolução e solubilidade, a velocidade de recristalização seria impulsionada (Han; Lee, 2017). Para retardar esse processo e estabilizar o sistema, outro componente é adicionado junto ao fármaco, geralmente uma macromolécula polimérica, formando uma mistura à nível molecular (solução sólida) ou com o fármaco sólido disperso na matriz polimérica (dispersão sólida).

3.2.1 Perfil de dissolução das dispersões sólidas amorfas

Ensaio de dissolução são realizados quando se precisa avaliar o perfil de solubilidade cinética e a taxa de dissolução de um fármaco, tanto no estado cristalino quanto amorfo. Esse método *in vitro* permite simular a solubilização do fármaco e, até certo ponto, prever sua absorção, quando em um medicamento supersaturado no trato gastrointestinal, atingindo a circulação sistêmica quando ele for administrado por via oral (Rosa, 2012).

Para a avaliação comum dos meios de dissolução, é usada a condição *sink*, em que o fármaco se encontra no meio de dissolução com concentrações equivalentes a 1/3 da concentração em que iria ser saturado, ou seja, visa elevar a taxa de dissolução aumentando a área de superfície efetiva disponível para dissolução, diminuindo o tamanho das partículas dos sólidos e melhorando a solubilidade cinética do fármaco sob condições fisiologicamente relevantes, em temperatura, agitação e pH constantes (Marcolongo, 2013). Porém, quando se fala em dispersões sólidas amorfas ou co-amorfas, a condição ideal é a *non-sink*, já que avalia melhor o comportamento do sistema em uma solução supersaturada, usando volumes limitados de meio de dissolução e mimetizando o TGI, para concluir se existe aumento na supersaturação do fármaco (Bevernager, 2013).

Por fim, pela fórmula $SI = C_s \times V / \text{dose}$, (C_s = solubilidade do fármaco cristalino em meio de dissolução; V = volume do meio de dissolução e “dose” = total de fármaco na amostra), será possível traçar o estado de supersaturação e a capacidade que o sistema tem de manter suas concentrações estáveis durante o período de dissolução (SUN; JU; LEE, 2012).

3.2.2 Polímeros usados em dispersões sólidas amorfas

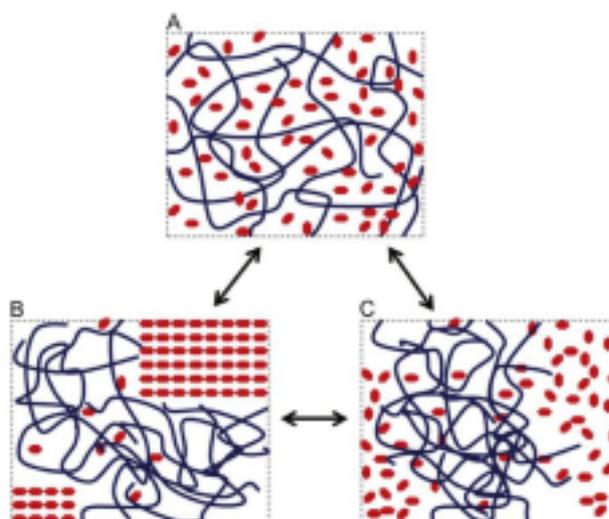
Para que uma dispersão sólida amorfa mantenha sua solubilidade e supersaturação, são utilizados polímeros, macromoléculas inertes responsáveis por dificultar a recristalização dos fármacos amorfas. Os polímeros possuem propriedades tensoativas, formando micelas, o que impossibilita a motilidade e consequente nucleação. Alcançar a interação ideal (Figura 3), requer ao pesquisador escolher com cuidado o carreador polimérico, dando enfoque às suas solubilidades, estado físico, tamanho, carga e potencial de ionização (Huang, 2013).

Um dos primeiros fatores para escolha do carreador polimérico é a organização estrutural em que ele se apresenta, já que os polímeros na forma cristalina apresentam menor hidrofobicidade, diminuindo a quantidade de fármaco que pode ser molecularmente dissolvida por ele. Enquanto os amorfos suportam maiores quantidades de fármaco, também apresentando elevadas taxas de dissolução e solubilidade, porém não são tão estáveis, principalmente em temperatura ambiente (Nair, 2020). Por conta disso, é preferível que o pesquisador tenha ciência de outras características, como alta temperatura de transição vítrea e interações

intermoleculares adesivas, intermediadas por aceptores de ligações de hidrogênio, pois assim garante maior estabilidade do sistema (Baghel, 2016). Os mais comumente usados em dispersões sólidas foram reunidos na Tabela 1.

Figura 3 – Reprodução de um sistema com fármacos em vermelho e polímeros como linhas azuis.

“A” representa uma estrutura ideal, com o fármaco disperso na matriz polimérica. “B” mostra fármacos cristalinos, mesmo com a presença de polímero. “C” expressa os fármacos amorfos, mas poucos aderidos ao polímero.



Fonte: Extraído de Y. Huang (2013).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas relevantes de polímeros comumente utilizados em dispersões sólidas amorfas.

Polímero	Solubilidade em água	Forma física
PVP K-90	Solúvel	Amorfo
HPMC	Solúvel	Amorfo
Soluplus	Anfifílico	Amorfo

Fonte: Adaptado de Nair (2020).

3.2.3 Dispersões sólidas amorfas de clofazimina

Atualmente, na literatura, só existem 5 publicações relatando o uso de dispersões sólidas amorfas em clofazimina, datadas de 1991 até 2021.

Tabela 2 – Resumo das publicações feitas sobre dispersões sólidas amorfas de clofazimina.

ANO / AUTOR	TÉCNICA	SOLVENTE	POLÍMERO
1991 / KRISHNAN	Evaporação de solventes	Acetona	GAN-119
2002 / NARANG	Evaporação rotativa e fusão	Clorofórmio	PEG: 1500, 400, 6000 E 9000 PVP: 14000 e 44000
2015 / NIE	Evaporação rotativa	Clorofórmio	HPMCP, HPMC, PVP/VA e Ácido acético
2016 / NIE	Evaporação rotativa	Diclorometano + etanol	HPMCP
2021 / GUI	Formação de sal e fusão	Etanol	PVPK-15 e PVP/VA

Fonte: Autoria própria (2023).

Dentre eles, o estudo mais completo foi de Narang et al. (2002) já que testou uma maior quantidade de polímeros, técnicas e proporções. Seus resultados demonstraram que os polímeros PEG não tinham tanta eficácia quanto os de PVP e que o método de fusão foi superior à evaporação de solvente, além disso, todas as formulações apresentaram um aumento de solubilidade. Entretanto, como o artigo cita apenas a “diminuição” da cristalinidade, não “ausência”, não se sabe se as dispersões eram realmente amorfas ou se eram semi-cristalinas.

Quanto à Nie et al. (2015 / 2016), um grande potencial do HPMCP como matriz polimérica pôde ser observado em diferentes solventes, enquanto o HPMC, PVP e ácido acético não tiveram bons resultados em clorofórmio. Krishnan (1991), por sua vez, também atingiu o incremento da solubilidade com o uso de acetona e Gui et al. (2021) com etanol, solventes não usados nos outros estudos, porém, Gui fez uso de uma técnica diferente das DSA convencionais, transformando a CLZ em sal antes de partir para a dispersão.

A falta de mais estudos pode ser atribuída ao fato da Hanseníase ser uma doença negligenciada e/ou a clofazimina ter a comercialização proibida nos Estados

Unidos atualmente, mas esses poucos resultados mostram boas prospecções quanto ao seu uso em DSAs.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

O polivinil-caprolactama-polivinil-acetato-polietileno-glicol (Soluplus) e Polivinilpirrolidona (PVP K-90) foram doados pela BASF. Hidroxipropilmetilcelulose foi doada pela Shin-Etsu Chemical Co (Tóquio, Japão). A Clofazimina foi doada pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE; L: E/1233/G22001). Todos os demais reagentes foram de grau analítico e usados assim que recebidos.

4.2 ESCOLHA DO SOLVENTE

Devido à falta de informação na literatura, soluções contendo 20 mg CLZ de acetona, acetonitrila, clorofórmio, etanol, metanol e metanol:diclorometano foram preparadas em balões de 10 mL. Após 15 minutos de sonicação, observou-se a solubilização do fármaco.

4.3 ESCOLHA DO POLÍMERO

Os polímeros PVP K-90, HPMC e Soluplus foram selecionados por serem polímeros solúveis, de liberação imediata e conhecidos na literatura como bons carreadores para DSA. Além disso, todos estes apresentam estrutura amorfa, sendo, portanto, uma vantagem para o carregamento de fármaco na rede polimérica. O uso desses polímeros como carreadores de DSA contendo CLZ mostra-se uma alternativa atual frente aos carreadores já relatados na literatura.

4.4 OBTENÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS POR EVAPORAÇÃO ROTATIVA DE SOLVENTE

Para fazer a investigação inicial das características da CLZ em dispersão com PVP, HPMC e Soluplus, DSAs foram obtidas solubilizando 270 mg dos polímeros e 30 mg CLZ (10% de *drug loading*). O polímero e o fármaco foram solubilizados separadamente em 10 mL de solvente cada e colocados em agitação magnética por cerca de 30 minutos, visando garantir a homogeneidade do filme. Ao final, os dois foram misturados e deixados em agitação por mais 30 minutos, seguidos de secagem em incubadora *shaker* a 40 °C, com agitação constante de 75 rpm, por 24h. Após uma verificação prévia da amorfização dos filmes obtidos por microscopia, novos filmes de 1,8 g de polímero, 0,2 g de CLZ (10% de *drug loading*) foram preparados utilizando 60 mL de clorofórmio para solubilização.

Em seguida, os filmes foram triturados em gral e pistilo com o auxílio de pequena quantidade de nitrogênio líquido para evitar a recristalização no estado sólido. O pó resultante foi padronizado para o mesmo tamanho de partículas (150-300 µm) e acondicionado em dessecador à temperatura ambiente.

4.5 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

4.5.1 Calorimetria exploratória diferencial

Termoanálises de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas com amostras de peso entre 3–4 mg. As amostras foram colocadas em porta amostras de alumínio, e aquecidas entre 30–600 °C nas razão de 10 °C.min⁻¹ utilizando um módulo de temperatura DSC-60 (Shimadzu Corporation). Foi utilizado nitrogênio como gás de purga, com fluxo de 50 mL.min⁻¹.

4.5.2 Microscopia de luz polarizada

Verificações dos sistemas foram realizadas em microscópio óptico Nikon Alphashot 2 YS2, adaptado para luz polarizada, no Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC). A adaptação foi realizada utilizando filtros de luz polarizada de câmera fotográfica digital, acoplados à ocular e diafragma de campo do microscópio óptico. O foco foi ajustado com a objetiva de 10x para verificação de presença de estruturas cristalinas e confirmação de amorfização do fármaco durante o preparo das dispersões sólidas.

4.6 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE EQUILÍBRIO

A solubilidade aquosa da CLZ foi determinada no meio de dissolução (tampão HCl pH 1,6 / 5% Tween 80) através do método *shake-flask*. Para tanto, frascos foram preenchidos com 10 mL de meio de dissolução e, em seguida, saturados com CLZ e agitados em vórtex durante 5 minutos. As suspensões foram postas sob agitação orbital constante a 150 RPM em incubadora *shaker* por 3 dias à 37 °C. Após este tempo, as amostras foram retiradas e centrifugadas a 15000 RCF e o sobrenadante lido em espectrofotômetro Varian Cary® 50 Bio UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) a 493 nm. As absorbâncias foram coletadas e comparadas a curvas de calibração de CLZ preparadas na faixa de 2–20 µg/mL em meio de dissolução.

4.7 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO *SINK*

Testes de dissolução na condição *sink* foram realizados para avaliar o perfil de dissolução do fármaco puro, da mistura física (MF) e da DSA. Os ensaios foram realizados utilizando uma dose equivalente a 50 mg de CLZ em 900 mL de meio de dissolução tampão HCl pH 1,6 + Tween 80 5% (v/v) a 37 ± 0,5 °C em um dissolutor Varian VanKel 7100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), equipado com aparato USP II a 100 RPM. Todos os testes foram realizados em triplicata. O desenho experimental da dissolução sob condição *sink* está descrito na Tabela 3.

Para garantir a condição *sink*, a solubilidade da CLZ foi determinada no meio de dissolução (76,6 ± 1,16 µg/ml) , e um *sink index* (SI) adimensional de 1,38 foi determinado, de acordo com a fórmula:

$$SI = C_s \times V / dose \quad (1)$$

Onde C_s é a solubilidade de equilíbrio do fármaco cristalino, V é o volume do meio de dissolução e “dose” é o total de fármaco na amostra (SUN; JU; LEE, 2012). Desta forma, sendo $SI > 1$, a condição da dissolução foi caracterizada como *sink*.

Tabela 3 – Descrição do ensaio experimental dos ensaios de dissolução sob condição *sink*.

Teste	Fármaco / Sistema	Massa do fármaco	Massa do polímero	Volume do meio
1	Clofazimina	50 mg	-	900 mL
2	[DSA] CLZ-SOL	50 mg	450 mg	900 mL
3	Mistura Física	50 mg	450 mg	900 mL

Fonte: Autoria própria (2023).

Após o início do teste, alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 minutos, seguidas de centrifugação a 10000 RPM por 5 minutos. Ao final, todas as amostras foram lidas em espectrofotômetro, em varreduras de 800 a 200 nm. Amostras que não conseguiram ser lidas, foram diluídas aplicando um fator de diluição (FD) igual a 5.

Os dados das dissoluções foram analisados em termos de área sob a curva (ASC), concentração máxima (C_{max}) e eficiência de dissolução (ED%), dado pela fórmula:

$$ED\% = ASC/ASC_{máx} \quad (2)$$

onde $ASC_{máx}$ representa a área sob a curva máxima teórica de qualquer dissolução, obtida a partir da área total do gráfico.

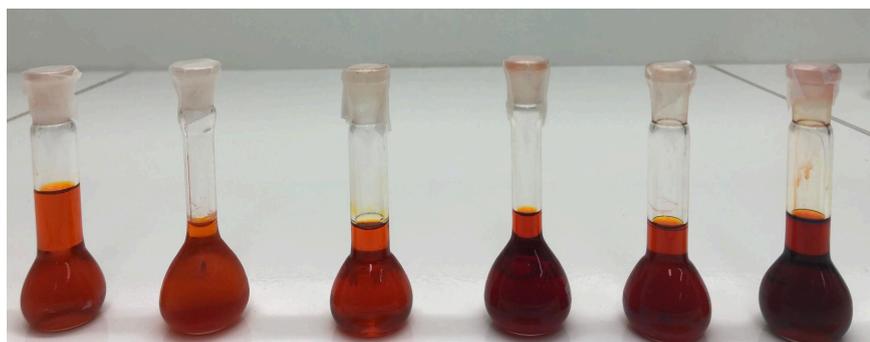
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA DISPERSÃO SÓLIDA AMORFA

A CLZ mostrou-se solúvel em acetona, clorofórmio, etanol e metanol:diclorometano (1:1, v/v) (Figura 4), enquanto os balões com metanol e acetonitrila evidenciaram precipitação abundante do fármaco (Figura 5). Uma diferença de cores pôde ser observada, mas não é possível atribuir à solubilidade do fármaco, já que a acetonitrila estava com uma cor mais clara, enquanto o metanol foi uma das soluções com a cor mais escura. Uma das possíveis causas para isso é o fenômeno de empilhamento (*pi stacking*), normalmente visto em moléculas aromáticas, como a CLZ.

A partir desses achados, optou-se por seguir os experimentos com o uso de clorofórmio, acetona e metanol:diclorometano (1:1, v/v) para a produção das DSA's.

Figura 4 – 20 mg de CLZ solubilizada em 10 mL de solventes, organizados por gradiente de cor. Respectivamente da esquerda para direita: Acetona, acetonitrila, clorofórmio, etanol, metanol e metanol:diclorometano (1:1, v/v).



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 5 – Presença de precipitação em metanol (esquerda) e acetonitrila (direita).



Fonte: Autoria própria (2023).

Com esses solventes escolhidos, partiu-se para a tentativa de dispersões sólidas amorfas. O PVP K-90 e o Soluplus foram solubilizados em acetona e clorofórmio, enquanto o HPMC foi usado apenas em metanol:diclorometano (1:1, v/v), pela sua maior solubilidade nesta mistura de solventes.

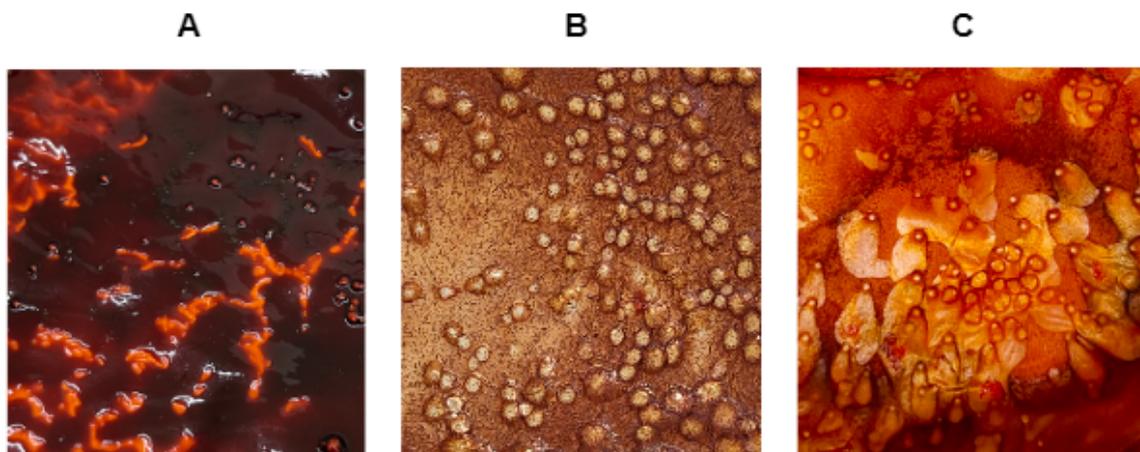
Tabela 4 – Perfil de cristalinidade apresentado em cada DSA após a técnica de evaporação rotatória de solventes.

Polímero	Solvente	Resultado
PVP K-90	Acetona	Alta recristalização
PVP K-90	Clorofórmio	Baixa recristalização
HPMC	metanol:diclorometano (1:1, v/v)	Alta recristalização
Soluplus	Acetona	Baixa recristalização
Soluplus	Clorofórmio	Amorfização

Fonte: Autoria própria (2023).

Os filmes preparados com PVP K-90, tanto em acetona quanto em clorofórmio, exibiram cristais visíveis e não apresentaram uniformidade ao final da evaporação rotativa (Figura 6), indicando dificuldade do fármaco de aderir à matriz polimérica. O mesmo comportamento foi observado para o filme preparado com HPMC, exibindo, ainda, concentrações mais grosseiras de CLZ dispostas em todo o filme. Já os preparados com PVP K-90, ainda que apresentassem cristais observáveis a olho nu, a distribuição do fármaco no filme foi mais heterogênea.

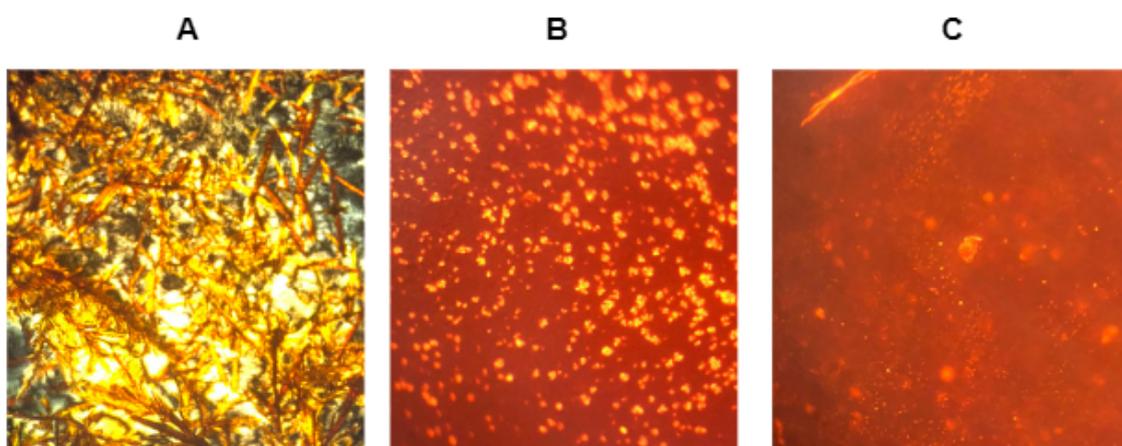
Figura 6 – Grupos mais escuros de CLZ dispostos irregularmente em HPMC com metanol: diclorometano (A) e focos de cristais visíveis em PVP K-90 com acetona (B) e PVP K-90 em clorofórmio (C).



Fonte: Autoria própria (2023).

Além disso, a visualização da formação desses cristais, observada em microscopia de luz polarizada, corrobora com a elucidação das características dos filmes obtidos com CLZ e o seu grau de recristalização em diferentes polímeros (Figura 7).

Figura 7 – Aparência dos cristais nos filme de HPMC (A) , PVP K-90 com acetona (B) e PVP K-90 com clorofórmio (C) vistos em microscópio óptico com aumento de 10x.

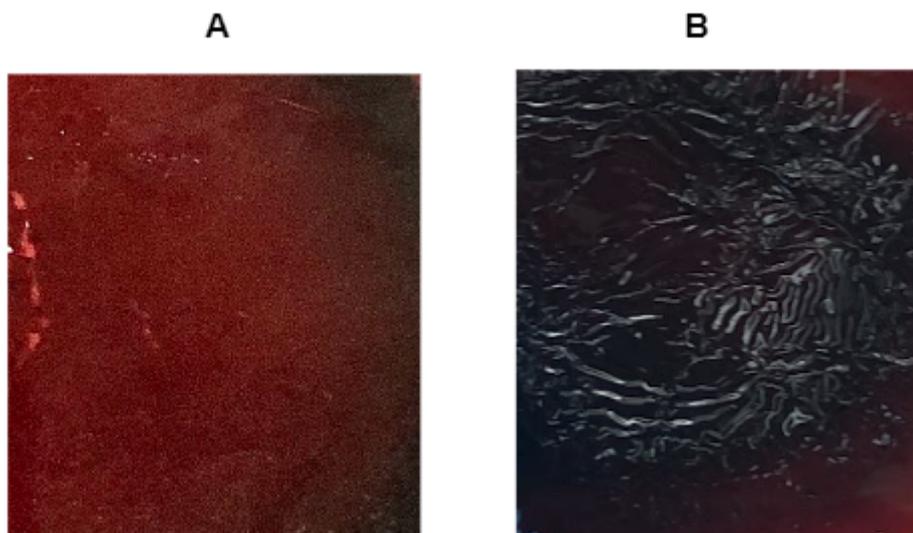


Fonte: Autoria própria (2023).

Como observado na Figura 7 (A), o filme de HPMC-CLZ aparece com o maior grau de recristalização. Quanto aos cristais de CLZ em PVP K-90, mesmo que presentes, são menos abundantes, também diferenciando-se no formato, inferindo que o polímero foi capaz, em pequena escala, de manter uma maior quantidade do fármaco amorfo. Entretanto, ambos os polímeros não formaram DSAs ideais.

Nesse sentido, o polímero anfifílico, Soluplus, foi usado para a formulação da DSA, tendo resultados mais promissores. O filme feito com clorofórmio estava visualmente ideal, com distribuição regular da CLZ. Já o de acetona, mesmo que aparentemente homogêneo, apresentou grumos espessos em algumas áreas (Figura 8).

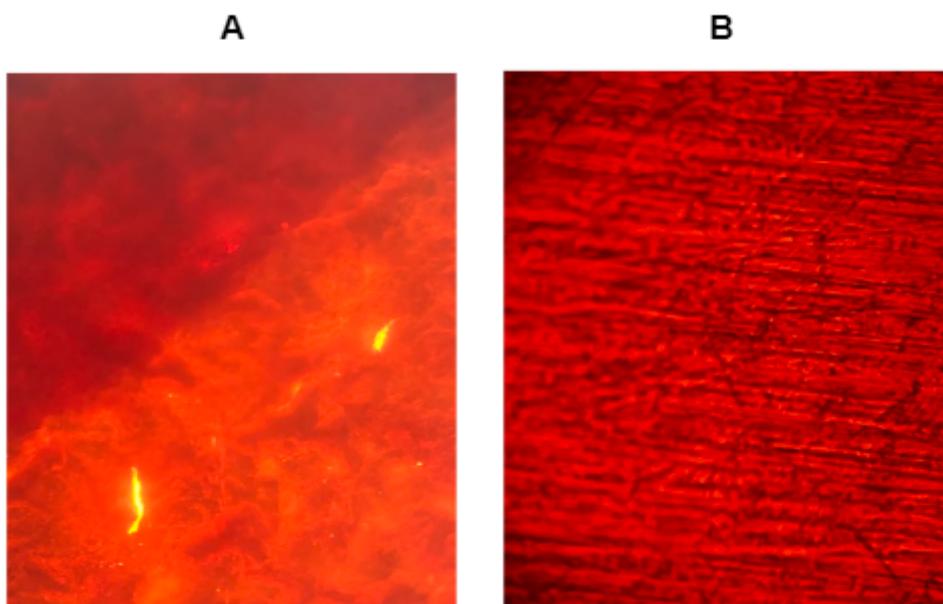
Figura 8 – Filme de soluplus com Clorofórmio (A) e Acetona (B).



Fonte: Autoria própria (2023).

Ao serem observados no microscópio de luz polarizada, o filme feito com acetona apresentou recristalização discreta, enquanto o de clorofórmio estava aparentemente amorfo (Figura 9). Toda a superfície foi analisada durante a microscopia e o teste foi replicado. Devido ao bom resultado da DSA SOL-CLZ, apresentando capacidade de amorfização satisfatória do fármaco, este sistema foi escolhido para a análise de performance *in vitro* através dos ensaios de dissolução *sink*.

Figura 9 – Filmes de soluplus com Acetona (A) e Clorofórmio (B), observadas em microscopia de luz polarizada com aumento de 10x.



Fonte: Autoria própria (2023).

Por conseguinte, ocorreu a trituração e tamização do filme de DSAs de Soluplus e CLZ, padronizando o tamanho de partículas para 150-300 μm . O produto final apresentava uma coloração de vermelho escuro quase preto, diferindo do vermelho mais suave da mistura física, sendo um indício de interação química entre os componentes. Para melhor análise, faz-se necessário caracterização por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

Figura 10 – Comparação visual dos pós da DSA CLZ-SOL (esquerda) e MF (direita).

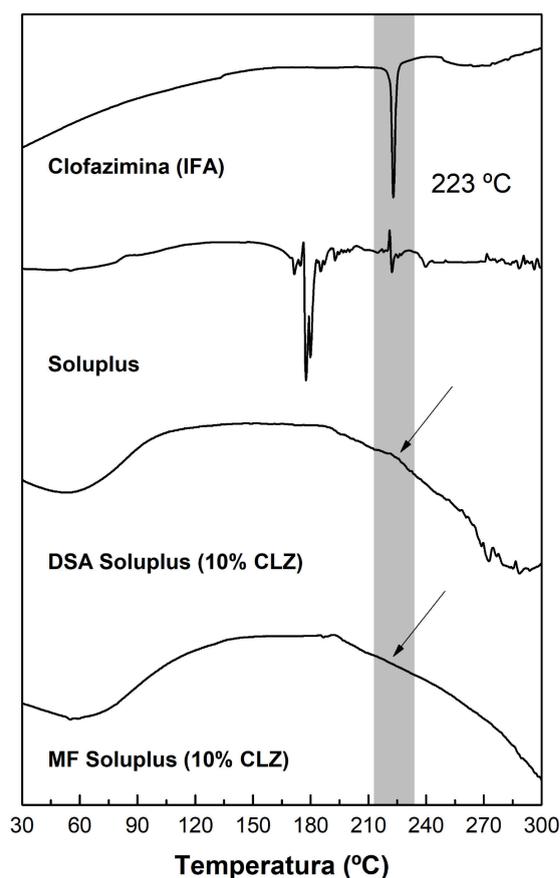


Fonte: Autoria própria (2023).

Em seguida, o pó da DSA foi levado ao calorímetro exploratório de varredura e os termogramas foram comparados com a MF e CLZ cristalina (Figura 11). O resultado não evidenciou nenhum evento endotérmico de fusão de CLZ nas DSAs a 223 °C., inferindo que o sistema estava amorfo. Porém, como a mesma evidência foi observada na MF, sugere-se que a técnica pode não ter sensibilidade para evidenciar a fusão de possíveis cristais do fármaco presentes na DSA ou o processo de maceração na produção da MF foi suficiente para amorfização da CLZ.

Por conta disso, outras técnicas de referência, como a difração de raios-X, devem ser utilizadas para melhor caracterizar o estado sólido do material.

Figura 11 – DSC do IFA, Soluplus, SOL-CLZ e MF em função da temperatura.



Fonte: Autoria própria (2023).

5.2 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

Os resultados obtidos apontaram rápida dissolução do sistema SOL-CLZ quando comparada à CLZ isolada e à MF, demonstrando que o sistema apresentou maior taxa de dissolução devido à possível amorfização do fármaco. Cerca de 81% da CLZ presente na dispersão foi dissolvida em 45 min, seguida por um aumento gradual nas concentrações até 96%. Em contrapartida, no mesmo tempo (45 min), a CLZ e MF demonstraram apenas 20 e 40% de dissolução cumulativa, alcançando cerca de 60% de dissolução ao final dos 480 minutos (8 h). Mesmo com a MF mostrando uma dissolução inicial melhor que a CLZ isolada, sua capacidade ainda é inferior ao sistema SOL-CLZ, devido a ausência do processo de obtenção. Os resultados estão expressos na Tabela 5.

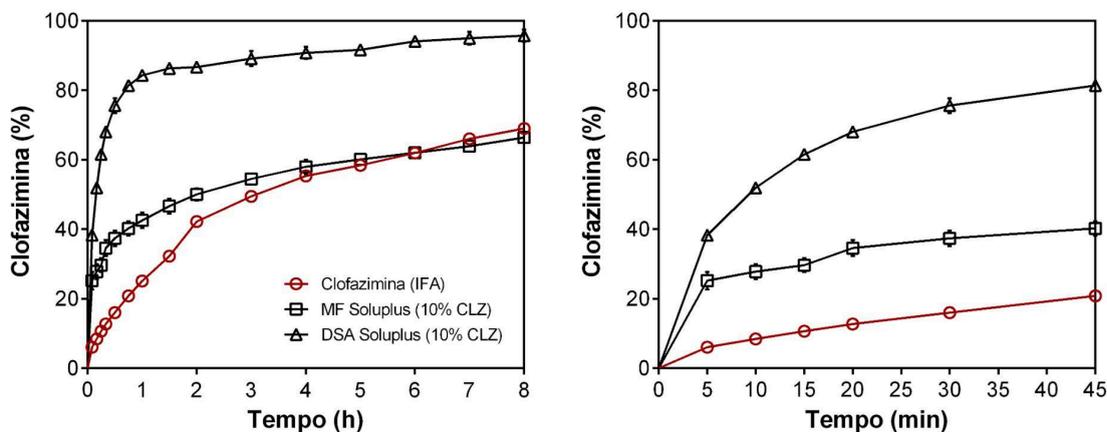
Tabela 5 – Dados obtidos ao final das 8h do ensaio de dissolução.

Teste	Área sob a curva	Eficiência de dissolução
CLZ	23,7%.min	46,36%
MF	26,2%.min	54,57%
SOL-CLZ	42,2%.min	88%

Fonte: Autoria própria (2023).

Ao final, a eficiência de dissolução de SOL-CLZ foi cerca de 1,3-1,6 vezes maior que a MF e CLZ cristalina, respectivamente. Estes dados indicam que o sistema SOL-CLZ apresenta elevado potencial de incremento de biodisponibilidade do fármaco pouco solúvel, uma vez que aumentou significativamente a velocidade de dissolução de CLZ amorfa.

Figura 12 – Perfil de dissolução do IFA, MF e DSA de 0 a 480 min.



Fonte: Autoria própria (2023).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os nossos levantamentos, neste trabalho foram relatados os esforços iniciais para o desenvolvimento de uma DSA de CLZ, utilizando o Soluplus como carreador. A dispersão sólida amorfa feita com 10% de CLZ presa à matriz polimérica do Soluplus teve resultados satisfatórios.

Faz-se necessária uma análise de Difractometria de Raios-X para a caracterização mais precisa da DSA SOL-CLZ. Além de estudos de variação do *drug loading*, uso de novos polímeros e análise da dissolução em outros valores de pH, a fim de ampliar o estudo de formulação de um possível sistema para incremento de solubilidade da CLZ.

A CLZ carece de fontes bibliográficas atuais, principalmente relacionadas ao seu uso em DSAs. Desse modo, estudos para a compreensão do comportamento deste fármaco em sistemas de liberação, como as DSAs, são importantes para o avanço dos esforços envolvendo o endereçamento da Hanseníase como doença negligenciada.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, R. Clofazimine and B669 inhibit the proliferative responses and NA, K adenosine triphosphatase activity of human lymphocytes by a lysophospholipase dependent mechanism. **Biochemical Pharmacology**, [S.I.], p 2029–2038, 1993.
- ARBISER, J.L. Clofazimine: A review of its medical uses and mechanisms of action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. I.], v. 32, p. 241-247, jan. 1995.
- BAGHEL, S. Polymeric amorphous solid dispersions: a review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilization of biopharmaceutical classification system class II drugs. **J Pharm Sci**, [S.I.], p. 2527-2544, 2016.
- BARRY, V. C. The development of chemotherapeutic agent for tuberculosis. **Chemotherapy of Tuberculosis**, [S.I.], p. 46-64, 1974.
- BEYERS, A. R. et al. Apparent involvement of phospholipase A2, but not protein kinase C, in the pro-oxidative interactions of clofazimine with human phagocytes. **Biochem Pharmacol**, [S.I.], p. 35-41, 1988.
- BEVERNAGE, J. et al. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. **International Journal of Pharmaceutics**, 2013.
- CORTEZ, A.O. et al. Tuberculose no Brasil: um país, múltiplas realidades. **Jornal brasileiro de pneumologia**, [S. I.], v. 47, n. 2, p. 01-19, abr. 2021.
- DESIKAN, K. V. Tissue levels of clofazimine in a case of leprosy. **Leprosy Reviews** [S.I.] v. 47, p. 107–113, 1976.
- DEY, T. et al. Outcomes of clofazimine for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. I.], v. 68, n. 2, p. 284-293, 2013.
- DRUGBANK. **Drugbank database**. Disponível em: < www.go.drugbank.com >. Acesso em: 10 de maio de 2022.

GARRELTS, J. C. Clofazimine: a review of its use in leprosy and mycobacterium avium complex infection. **Ann Pharmacother**, [S.I.], p. 525-531, 1991.

GIRDHAR A.V. et al. Red discoloration of the sputum by clofazimine simulating hemoptysis: a case report. **Lepr Rev** [S.I.], p. 47-50, 1992.

GUI, Y. et al. Amorphous Drug–Polymer Salt with High Stability under Tropical. **Molecular Pharmaceutics** [S.I.], 18 (3), p. 1364-1372, 2021.

HAN, Y. R.; LEE, P. I. Effect of Extent of Supersaturation on the Evolution of Kinetic Solubility Profiles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 206–220, 3 jan. 2017.

HOLDINESS, M.R. Clinical Pharmacokinetics of Clofazimine. **Clinical Pharmacokinetics**, [S. I.], v. 16, n. 2, p. 74-85, jan. 2012.

HUANG, Y. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.I.], p. 18-25, 15. out. 2013.

KIPP, J. E. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 2004.

KRAJEWSKA, M.M. Clofazimine analogues and tumor necrosis factor a individually and in combination on human polymorphonuclear leukocyte functions in vitro. **Int J Immunopharmacol**. [S.I.], p. 99-111, 1993.

KRISHNNAN, T.R. IMPROVED AQUEOUS DISSOLUTION OF CLOFAZIMINE FROM COEVAPORATES USING POLYVINYLMETHYL ETHER / MALEIC ANHYDRIDE COPOLYMER. **Drug development and industrial pharmacy**, [S.I.] 17(13), p. 1823-1842, 1991.

LAPUK, S. et al. Kinetic stability of amorphous dipyridamole: a fast scanning calorimetry investigation. **Int. J. Pharm**, [S.I.], p. 188-190, 2019.

LAPUK, S. et al. Kinetic stability of amorphous solid dispersions with high content of the drug: a fast scanning calorimetry investigation. **Int. J. Pharm**, [S.I.], p. 113–123, 2019.

LUO, M. Crystallization of Amorphous Drugs and Inhibiting Strategies. **Progress in Chemistry**, [S.I.], p. 2116-2127, 2021.

MARCOLONGO, R. Dissolução de Medicamentos: Fundamentos, Aplicações, Aspectos regulatórios e Perspectivas na Área Farmacêutica [**dissertation**]. São Paulo: Universidade de São Paulo/USP. 127p. 2013.

MARTINIANO, S. Safety and Effectiveness of Clofazimine for Primary and Refractory Nontuberculous Mycobacterial Infection. *Chest*, [S.I.], v. 152, n. 4, p. 800-809, 2017

MORRISON, N. E. The mode of action of clofazimine DNA binding studies. **International Journal of Leprosy**, [S.I.], p. 133-134, 1976.

MILLER, J.M. et al. A win-win solution in oral delivery of lipophilic drugs: supersaturation via amorphous solid dispersions increases apparent solubility without sacrifice of intestinal membrane permeability. **Mol. Pharm**, [S.I.], p. 2009-20016, 2012.

NAIR, A. Overview of Extensively Employed Polymeric Carriers in Solid Dispersion Technology. **AAPS PharmSciTech**, [S.I.], v. 2020, n. 8, p 1-20, 2020.

NARANG, A.S. Evaluation of Solid Dispersions of Clofazimine. **DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY**. v. 28, n.. 8, p 1001–1013, 2002

NASCIMENTO, D.C. Clofazimine: what can tuberculosis to teach for leprosy?. **Hansen Int.**, [S. I.], p. 1-4, 2020.

NEWMAN, A. et al. Amorphous solid dispersions: a robust platform to address bioavailability challenges. **Therapeut Delivery**, [S.I.], p. 247–261, 2015.

NIE, H. Investigating the Interaction Pattern and Structural Elements of a Drug–Polymer Complex at the Molecular Level. **Molecular Pharmaceutics** [S.I.]. 2015.

NIE, H. Solid-State Spectroscopic Investigation of Molecular Interactions between Clofazimine and Hypromellose Phthalate in Amorphous Solid Dispersions. **Molecular Pharmaceutics** [S.I.]. 2016.

NIKGHALB, L. Solid Dispersion: Methods and Polymers to increase the solubility of poorly soluble drugs. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [S.I.], v. 2, n. 10, p. 170-175, 2012.

- REDDY, V.M. Antimycobacterial activities of riminophenazines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. I.], v. 43, n. 5, p. 615-623, jan. 1999.
- ROSA, M. F. INTRINSIC DISSOLUTION: CONCEPTS AND APLICATIONS ON PHARMACEUTICAL INDUSTRY. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S.I.], v. 9, p. 49 - 61, 2012.
- SWANSON, R.V. et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clofazimine in a Mouse Model of Tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v. 59, n. 6, p. 3042-3051, 2015.
- SAHU, A. Effect of anti-leprosy drugs on superoxide anion product by rat peritoneal macrophage with special reference to light exposed clozamine. **Int. J. Immunopharmac.**, Vol. 13, n. 4, p. 419-428, 1991.
- SANTOS, K.C.B. et al. Estratégias de controle e vigilância de contatos de hanseníase: revisão integrativa. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 121, p. 576-591, jun. 2019.
- SCHAAD-LANYI, Z. Pharmacokinetics of clofazimine in healthy volunteers. **International Journal of Chemistry.**, [S.I.] p. 9–15, 1987.
- SCHMIDT, L. H. Induced pulmonary tuberculosis in the rhesus monkey: its usefulness in evaluating chemotherapeutic agents. **Proceedings of 14th Conference V.A-A.F. Tuberculosis**, p. 226–231, 1955.
- SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2007.
- SHAKER, M.A. Improved solubility, dissolution, and oral bioavailability for atorvastatin Pluronic® solid dispersions. **Int. J. Pharm.** [S.I.], p. 188-191, 2019.
- SUN, D. D.; JU, T. C. R.; LEE, P. I. Enhanced kinetic solubility profiles of indomethacin amorphous solid dispersions in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 149–158, maio 2012.
- VENKATESAN K. Excretion of clofazimine in human milk in leprosy patients. **Lepr Ver**, [S. I.], v. 68, p. 242-246, set. 1997.

VO, C.L. et al. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly watersoluble drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, [S.I], v. 85, p. 799–813,