



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

AMANDA CARLA QUINTAS DE MEDEIROS VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E INCREMENTO DA CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO DO
PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA:
UMA ABORDAGEM FÍSICO-QUÍMICA**

Recife

2017

AMANDA CARLA QUINTAS DE MEDEIROS VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E INCREMENTO DA CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO DO
PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA: UMA ABORDAGEM FÍSICO-QUÍMICA**

Tese submetida ao Programa de Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mônica Felts de La Roca Soares

Co- Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Co-Orientador: Prof. Dr. Ping I. Lee

Recife

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Vieira, Amanda Carla Quintas de Medeiros

Caracterização e incremento da cinética de dissolução do Protótipo Epiisopiloturina: uma abordagem físico-química / Amanda Carla Quintas de Medeiros Vieira– Recife: O Autor, 2017.

145 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Soares, Mônica Felts de La Roca

Coorientador: Rolim Neto, Pedro José

Coorientador: Lee, Ping I.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2017.

Inclui bibliografia e anexos

1. Dispersões sólidas 2. Cinética de dissolução 3. Epiisopiloturina I. Soares, Pedro José (orientador) II. Título

615.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2018- 063

AMANDA CARLA QUINTAS DE MEDEIROS VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E INCREMENTO DA CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO DO
PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA:
UMA ABORDAGEM FÍSICO-QUÍMICA**

Tese submetida ao Programa de Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 22/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Mônica Felts de La Roca Soares (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Externo)
Universidade Católica de Pernambuco

Prof^o Dr. Leandro de Moura França (Examinador Externo)
Universidade Católica de Pernambuco

Prof^o Dr. Pablo Queiroz Lopes (Examinador Externo)
Universidade Católica de Pernambuco

Aos meus pais, Jaciara Quintas e Antônio Medeiros, com amor.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, por ter me dado o direito à vida;

Continuando, agradeço:

À minha família, Antônio José de Medeiros Vieira (pai), Jaciara Maria Quintas de Medeiros Vieira (mãe) e Caio César Quintas de Medeiros Vieira (irmão) por todo o carinho, amor, apoio moral e financeiro;

À minha orientadora, Profa. Dra. Mônica Felts de La Roca Soares, por subsidiar a execução deste trabalho, participar e promover todo o aprendizado adquirido;

Ao co-orientador Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, por todo o apoio técnico e emocional prestado durante os últimos 8 anos! Se não fosse o seu “sim” para iniciar o meu estágio acadêmico, talvez não tivesse descoberto a beleza da pesquisa e tampouco estivesse terminando o meu doutorado neste momento. Minha eterna gratidão por abrir essa porta que, de certo, mudou a minha vida!

Ao Prof. Dr. Ping I. Lee, da Universidade de Toronto, por toda a receptividade, paciência, humildade, horas e horas de discussão sobre os resultados, incentivo e inspiração. Dr. Lee contribuiu imensuravelmente na minha vida profissional e pessoal. Conviver 1 ano e 2 meses na presença dele foi um divisor de águas na minha vida. De certo, as palavras não cobrem o sentimento que fica de uma relação tão rica. Seguirei eternamente o seu conselho de sempre “*do your best and do what you love*” (dê o seu melhor e faça aquilo que ama). Sem sombra de dúvidas, Dr. Lee é um professor-modelo, que irei carregar comigo para o resto da minha vida;

Ao prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho, pela participação importante em diversos momentos na execução desse projeto, e pelo bom humor, trazendo leveza ao ambiente de trabalho;

A vegetação e a Universidade Federal do Piauí, pelo fornecimento da matéria-prima Epiisopiloturina, sobretudo na figura dos professores Drs. Leiz Vêras, José Roberto Leite e Lívio César Cunha Nunes;

À Giovanna Medeiros, por toda a receptividade e apoio incondicional durante todo o período de visita a Universidade de Toronto, e pela colaboração com sua experiência técnico-científica e apoio moral. Amplio este agradecimento a todos os integrantes do laboratório do Dr. Lee, pela excelente recepção e demonstração de um comportamento diferente na pesquisa científica, agregando bastante a minha experiência internacional;

À Cybelly Marques de Melo e André Luis Nascimento, como integrantes da primeira parte deste projeto, pelo apoio imensurável durante todo o período da execução deste trabalho, e como verdadeiros amigos, pelo apoio moral e momentos de alegria indescritíveis;

Ao Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC) e ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) pela oportunidade de realizar este trabalho e a todos os seus integrantes, com destaque para Camila Figueirêdo, Lariza Alves, Leslie Raphael, Magaly Lyra, Salvana Costa, Larissa Morgana, João Neto e Jaiciane Cardeal, que contribuíram de forma direta ou indireta na construção deste trabalho científico;

À profa. Dra. Larissa Rolim (UNIVASF), por todo o apoio técnico-científico e pelo gigante coração, que a torna um ser humano excepcional;

A todos que compõem o grupo PPGIT, pela união, força de vontade e determinação visualizada a cada dia, em especial a profa. Dra. Suely Lins Galdino (*in memorian*), por ter me dado a oportunidade de usar novas lentes para a pesquisa e para a vida, como ser humano;

Aos professores participantes desta banca de defesa, pela atenção dada ao trabalho e toda a contribuição científica dispensada;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste projeto na forma de bolsa de estudos, e por proporcionar minha experiência em pesquisa Internacional, através do projeto PVE.

Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali? (Fernando Pessoa)

RESUMO

A pilocarpina é um fitofármaco extratido do Jaborandi, utilizado no mundo inteiro. Toneladas de folhas de jaborandi são empregadas na extração da pilocarpina, que possui rendimento de 0,5 a 1%, gerando grandes volumes de biomassa. Desta biomassa, a epiisopiloturina (EPI) é o alcalóide de maior rendimento, e estudos recentes tem demonstrado sua promissora atividade anti-leishmaniose, anti-esquistossomose, anti-inflamatória e protetora gástrica. Entretanto, trabalhos reportam sua limitada solubilidade aquosa e suas características físico-químicas são pouco conhecidas. Assim, este trabalho objetivou elucidar essas características e desenvolver dispersões sólidas (DS) para incremento da sua cinética de dissolução. Para tal, foram investigadas suas características físico-químicas no estado sólido, quanto ao ponto de fusão (221,72-228,24°C) e de decomposição (224 °C), além dos parâmetros da cinética de termólise ($E_a = 88,95 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e ordem de reação 1), e ao perfil cristalino por DRX. EPI também foi caracterizada quando em solução, sendo caracterizada como muito pouco solúvel em água (pH 6,8), tanto pela solubilidade de equilíbrio (C_{eq}) quanto pela taxa de dissolução intrínseca, mesmo permanecendo majoritariamente ionizada durante todo o TGI ($pK_a = 7,46 \pm 0,29$). As DS, obtidas com os polímeros HPMCAS, Eudragit L100-55, PVP K-30 e HPMC, foram profundamente estudadas quanto a miscibilidade, aplicando-se os parâmetros de Hansen e Florry-Huggins, mas este trabalho demonstrou que a análise do tempo de indução trouxe resultados mais realísticos, podendo esse parâmetro ser aplicado em outros sistemas semelhantes. A caracterização das DS demonstraram a formação de solução sólida para todos os sistemas contendo 10% de EPI. A análise de IV mostrou interações em todos os sistemas, exceto para o HPMC. Os melhores sistemas obtidos foram a base de HPMCAS e PVP K-30, cujas AUC foram maiores que a EPI cristalina em 10,57; 4,3; 2,19 vezes para 10, 20 e 30% de EPI na DS com HPMCAS; e 12,04; 5,54; e 5,46 vezes para 10, 20 e 30% de EPI na DS com PVP K-30. Na estabilidade acelerada, chama-se atenção para higroscopicidade do PVP K-30, que inviabilizou as análises, embora tenha demonstrado ausência de cristais até 1 mês de avaliação por microscopia de polarização, evidenciada para a DS HPMCAS 10% no 12º dia. Estimou-se aqui uma perda média na ED% de 0,1347% e 0,23% por dia para as DS HPMCAS 10 e 30%, respectivamente. Assim, conclui-se que este trabalho contribuiu com o conhecimento sobre a EPI, fornecendo uma ideia do seu funcionamento no corpo, além de trazer contribuições aprofundadas a respeito da obtenção racional de dispersões sólidas e análise da miscibilidade, culminando na obtenção de dois sistemas com o mais alto grau de dispersão (nível molecular), com incremento da AUC de até 12 vezes. Acrescenta-se, ainda, que apesar de os achados

apresentados nesse trabalho contribuirão para acelerar a aplicação do protótipo na terapêutica, incentivando toda a cadeia produtiva e a economia nacional, eles não se limitam a este alcaloide, podendo também servir de suporte para diversos outros compostos farmacêuticos.

Palavras-chave: Dispersões sólidas. Cinética de dissolução. Miscibilidade. Epiisopiloturina.

ABSTRACT

Pilocarpine is a phytopharmaceutical extracted from Jaborandi, which has been used worldwide. Tons of jaborandi leaves are used in the extraction of pilocarpine, which yields from 0.5 to 1%, generating large volumes of biomass. From this, epiisopiloturine (EPI) is the alkaloid with the highest yield. Recent *in vivo* and *in vitro* studies have shown promising anti-leishmaniasis, anti-schistosomiasis, anti-inflammatory and gastric protective effects of EPI, however, studies have reported limited aqueous solubility and their physico-chemical characteristics are poorly understood. Thus, this work aimed to characterize the prototype and obtain solid dispersions (SD) to increase its dissolution kinetics. For this purpose, its physicochemical characteristics in the solid state were investigated, as well as the melting point (221.72-228.24°C) and decomposition temperature (224°C), in addition to the kinetic parameters of thermolysis ($E_a = 88.95 \text{ KJ.mol}^{-1}$ and order of reaction 1), and to the crystalline profile by XRD. EPI was also characterized as being very poorly soluble in water (pH 6.8), both by the equilibrium solubility (C_{eq}) and by the intrinsic dissolution rate, even though it remained mostly ionized throughout the TGI ($pK_a = 7.46 \pm 0.29$). The SD were obtained with the polymers HPMCAS, Eudragit L100-55, PVP K-30 and HPMC, were thoroughly studied for miscibility by applying the Hansen and Florry-Huggins parameters, but in this work it is demonstrated that the induction time has brought more realistic results, and this parameter can be applied in other similar systems. The characterization of SD demonstrated the formation of a solid solution for all systems containing 10% of EPI. The analysis of IR showed interactions in all systems, except for HPMC. The best systems obtained here were based on HPMCAS and PVP K-30, whose AUC were higher than the crystalline EPI in 10.57; 4.3; 2.19 times for 10, 20 and 30% of EPI on HPMCAS-based SD; and 12.04; 5.54; and 5.46 times for 10, 20 and 30% EPI on PVP K-30-based SD. Under accelerated stability, we call attention to hygroscopicity of PVP K-30, which impaired the analyzes, although it showed absence of crystals up to 1 month of evaluation by polarization microscopy, evidenced for the 10% HPMCAS-based SD on the 12th day. An average loss in DE% of 0.1367% and 0.23% per day for the 10 and 30% HPMCAS-based SD, respectively, was estimated here. Thus, it is concluded that this work contributed to the knowledge about EPI, providing some insights of its functioning into the body, as well as providing in-depth contributions on the rational obtaining of solid dispersions and miscibility analysis, which leads to the achievement of two systems with the highest degree of dispersion (molecular level), with AUC's increasement of up to 12 times. It is also added that although the findings presented in this work contribute to accelerate the application of the prototype in the

therapy, stimulating the entire production chain and the national economy, they are not limited to this alkaloid and can also serve as support for several others pharmaceutical compounds.

Key-words: Solid dispersion. Dissolution kinetic. Miscibility. Epiisopiloturine.

LISTA DE IMAGENS

Figura 1 – <i>Pilocarpus microphyllus</i>	26
Figura 2 – Estrutura dos alcalóides encontrados no gênero <i>pilocarpus</i>	27
Figura 3 – Estrutura química da epiisopiloturina.....	28
Figura 4 – Classificação de uma dispersão ou solução sólida de um fármaco em um carreador polimérico.....	37
Figura 5 – Comparação dos perfis de dissolução das quatro gerações de dispersão sólida em condições supersaturadas.....	38
Figura 6 – Evolução dos requerimentos dos testes de dissolução da FDA entre os anos de 1970 e 2006.....	50
Figura 7 – Perfis de dissolução hipotéticos que exemplificam o modelo " <i>spring and parachute</i> ".....	52
Figura 8 – Perfil de dissolução hipotético sob condição não sink, evidenciando as concentrações de equilíbrio e de supersaturação crítica, além da zona metaestável.....	55
Figura 9 – Perfis de dissolução hipotéticos obtidos para diferentes velocidades de liberação do fármaco, sob condição não sink.....	55
Figura 10 – Processos elementares e possíveis mecanismos de liberação de fármacos a partir de um comprimido obtido por um sistema disperso sólido, cujo polímero é intumescível na presença de água.....	57
Figura 11 – Esquema do processo de dissolução de fármacos a partir de uma dispersão sólida.	57
Figura 12 – Perfil teórico de concentração versus tempo durante a dissolução e precipitação de fármacos amorfos moderadamente solúveis em água.....	66
Figura 13 – Curva DSC da EPI, sob razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	74

Figura 14 – Curva TG, DTG e DTA da EPI, sob razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$	75
Figura 15 – Curvas TG da EPI nas diferentes razões de aquecimentos (2,5; 5; 10; 20 e 40°C), sob fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$	76
Figura 16 – a) gráfico $\log a$ vs. K^{-1} ; b) gráfico da função $g(x)$ vs. Inverso da temperatura de EPI.....	76
Figura 17 – Difrátograma de raios-X da EPI.....	77
Figura 18 – Espectro de UV-vis típico da EPI.....	78
Figura 19 – Influência do pH na absorvidade molar da EPI ($p < 0,05$) em 260 nm, para uma concentração fixa de EPI de $150 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$	79
Figura 20 – Gráfico TFA e curva de distribuição das espécies da EPI.....	82
Figura 21 – Perfil de dissolução intrínseca da EPI sob pH 6,8 e velocidade de 150 rpm.....	83
Figura 22 – Perfil de dissolução da EPI sob condição não-sink e pH 6,8.....	84
Figura 23 – a) Comportamento de supersaturação e cristalização da EPI, sob condições não sink ($SI = 0,3$), considerando uma fonte de protótipo amorfa; b) Relação entre AUC e taxa de infusão calculada pelos resultados do teste de infusão.....	85
Figura 24 – Perfil cinético da cristalização de EPI, durante o teste de infusão.....	87
Figura 25 – Aplicação do gráfico de Wilson para estimar a solubilidade da EPI quando no estado amorfo.....	88
Figura 26 – Estruturas moleculares dos polímeros HPMC (a), HPMCAS (b), Eudragit L100-55 (c), e PVP K-30 (d).....	89
Figura 27 – Aspecto macroscópico dos filmes transparentes.....	92
Figura 28 – Influência do volume de solução submetido à secagem na cristalização do protótipo.....	93
Figura 29 – Difrátograma de raios-X para o polímero HPMCAS-MF e suas dispersões sólidas contendo diferentes percentuais de epiisopiloturina.	94

Figura 30 – Difratoograma de raios-X para o polímero Eudragit L100-55 e suas dispersões sólidas contendo diferentes percentuais de epiisopiloturina.....	94
Figura 31 – Difratoograma de raios-X para o polímero HPMC 5E e suas dispersões sólidas contendo diferentes percentuais de epiisopiloturina.....	95
Figura 32 – Difratoograma de raios-X para o polímero PVP K-30 e suas dispersões sólidas contendo diferentes percentuais de epiisopiloturina.....	95
Figura 33 – Difratoograma de raios-X para as misturas físicas compostas por 10% (p/p) de epiisopiloturina e 90% de HPMCAS-MF ou Eudragit L100-55 ou HPMC 5E ou PVP K-30.	96
Figura 34 – Curvas DSC para a EPI, suas misturas físicas e sistemas dispersos contendo HPMCAS como carreador, em diferentes proporções.....	97
Figura 35 – Curvas DSC para a EPI, suas misturas físicas e sistemas dispersos contendo Eudragit L100-55 como carreador, em diferentes proporções.....	98
Figura 36 – Curvas DSC para a EPI, suas misturas físicas e sistemas dispersos contendo HPMC E5 como carreador, em diferentes proporções.	98
Figura 37 – Curvas DSC para a EPI, suas misturas físicas e sistemas dispersos contendo PVP K-30 como carreador, em diferentes proporções.....	99
Figura 38 – Microscopia de polarização para os sistemas obtidos à base de HPMCAS.....	101
Figura 39 – Microscopia de polarização para os sistemas obtidos à base de Eudragit L100-55.	101
Figura 40 – Microscopia de polarização para os sistemas obtidos à base de HPMC E5.....	102
Figura 41 – Microscopia de polarização para os sistemas obtidos à base de PVP K-30.....	102
Figura 42 – Espectrometria de infravermelho para: a) EPI, b) HPMCAS, c) DS 10%, d) DS 20% e e) DS 30%.....	103
Figura 43 – Espectrometria de infravermelho para: a) EPI, b) Eudragit L100-55, c) DS 10%, d) DS 20%, e) DS 30% e f) DS 40%.....	104

Figura 44 – Espectrometria de infravermelho para: a) EPI, b) HPMC E5, c) DS 10%, d) DS 20% e e) DS 30%.....	105
Figura 45 – Espectrometria de infravermelho para: a) EPI, b) PVP K-30, c) DS 10%, d) DS 20%, e) DS 30%, f) DS 40% e g) DS 50%.....	105
Figura 46 – Cálculo do fator χ para as misturas físicas EPI:HPMCAS (a); EPI:PVP k-30 (b); EPI: Eudragit L100-55 (c); e EPI:HPMC (d) sob diferentes concentrações de EPI.....	109
Figura 47 – Gráfico do fator χ versus temperatura para as misturas físicas com EPI	110
Figura 48 – Relação entre ΔG e o aporte de protótipo (p/p) sob várias temperaturas para as misturas físicas: EPI:HPMCAS (a), EPI:PVP K-30 (b), EPI:Eudragit L100-55 (c) e EPI:HPMC (d).....	111
Figura 49 – Aporte limítrofe à cristalização de EPI nos sistemas dispersos sólidos.....	113
Figura 50 – (a) Relação entre o aporte de EPI e o tempo requerido para iniciar os eventos de nucleação e cristalização; (b) fotomicrografias oriundas do microscópio de polarização em função do tempo (exemplo da amostra de Eudragit).....	115
Figura 51 – Percentual de EPI cristalina nas amostras de dispersões sólidas baseados nos resultados de DRX.....	116
Figura 52 – Concentração de equilíbrio da EPI em solução de água e polímero.....	118
Figura 53 – Perfil de dissolução das dispersões sólidas compostas por Eudragit L100-55 e epiisopiloturina, em diferentes proporções.	119
Figura 54 – Perfil de dissolução teórico das dispersões sólidas compostas por HPMC 5E e epiisopiloturina.....	121
Figura 55 – Perfil de dissolução das dispersões sólidas compostas por HPMCAS e epiisopiloturina, em diferentes proporções.....	122
Figura 56 – Perfil de dissolução das dispersões sólidas compostas por PVP K-30 e epiisopiloturina, em diferentes proporções.	123

Figura 57 – (a) Dissolução sob condição sink para DS HPMCAS (10% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, 2 e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR; (b) Difrátogramas de raios-X para DS HPMCAS (10% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR.....125

Figura 58 – (a) Dissolução sob condição sink para DS HPMCAS (20% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, 2 e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR; (b) Difrátogramas de raios-X para DS HPMCAS (20% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR.....126

Figura 59 – (a) Dissolução sob condição sink para DS HPMCAS (30% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, 2 e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR; (b) difratogramas de raios-X para DS HPMCAS (30% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR.....128

Figura 60 – Avaliação da estabilidade acelerada das dispersões sólidas a base de PVP K-30 através da microscopia de polarização.130

Figura 61 – Avaliação da estabilidade acelerada das dispersões sólidas a base de HPMCAS através da microscopia de polarização.130

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros obtidos a partir da determinação da cinética de degradação térmica de um composto.....	32
Quadro 2 – Classificação quanto ao grau de solubilidade de fármacos em qualquer solvente....	33
Quadro 3 – Metodologia de obtenção final dos sistemas dispersos sólidos.	92
Quadro 4 – Propriedades dos polímeros e protótipo.	106
Quadro 5 – Equações das regressões lineares e a solubilidade da EPI (Cs) no polímero para as misturas físicas de EPI com HPMCAS, PVP K-30, Eudragit L100-55 e HPMC.....	112
Quadro 6 – Resumo das abordagens para predição da miscibilidade.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores atribuídos para formação de forças dispersas (Fd), forças polares (Fp) e formação de ligações de hidrogênio (Uh) para diversos grupamentos químicos observados em moléculas orgânicas.....	42
Tabela 2 – Linearidade das diferentes ordens de reação da cinética de degradação da EPI.....	77
Tabela 3 – Coeficiente de variação (%) alçado a partir das curvas de calibração (interdias) e inclinação da reta (interdias).....	80
Tabela 4 – Influência da taxa de liberação da EPI na cinética de cristalização.....	87
Tabela 5 – Cálculo do parâmetro de solubilidade de Hansen para EPI.....	107
Tabela 6 – $\Delta\delta$ entre EPI e os polímeros pré-selecionados.	108
Tabela 7 – AUC da média de três perfis de dissolução, durante 24 h, da EPI isolada e dispersões sólidas obtidas com os polímeros HPMCAS e PVP K-30.....	124

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
3.1 EPIISOPILOTURINA.....	26
3.2 CARACTERIZAÇÃO DE FÁRMACOS.....	30
3.2.1 Análise Térmica.....	31
3.2.2 Caracterização da Substância Ativa em Solução.....	32
3.3 DISPERSÕES SÓLIDAS.....	35
3.3.1 Conceito e Particularidades.....	35
3.3.2 Seleção do Carreador.....	38
3.3.3 Avaliação da Miscibilidade Fármaco-Polímero.....	40
3.3.3.1 Parâmetro de solubilidade de Hansen.....	41
3.3.3.2 Parâmetro de interação de Flory-Huggins.....	43
3.3.3.3 Análise da temperatura de transição vítrea (T_g)	45
3.3.4 Obtenção de Dispersões Sólidas.....	46
3.3.5 Avaliação das Propriedades das Dispersões Sólidas.....	47
3.3.5.1 Cristalinidade e homogeneidade.....	47
3.3.5.2 Dissolução: histórico e aplicações atuais para sistemas amorfos – condições sink e não sink.....	48
3.3.5.3 Mecanismos de liberação de fármacos a partir de dispersões sólidas.....	56
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1 EPI.....	60
4.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	60
4.3. CARACTERIZAÇÃO DA EPI NO ESTADO SÓLIDO.....	60
4.3.1 Análise Térmica.....	60
4.3.2 Difração de Raios-X.....	61

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA EPI EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	61
4.4.1 Quantificação Espectrofotométrica na Região do Ultravioleta Visível.....	61
4.4.2 Determinação Espectrofotométrica do pKa.....	63
4.4.3 Determinação da Taxa de Dissolução Intrínseca da EPI.....	64
4.4.4 Determinação da Concentração de Equilíbrio da EPI.....	64
4.4.5 Teste de Infusão.....	65
4.4.6 Estimativa da Solubilidade da EPI no Estado Amorfo.....	66
4.5 OBTENÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS E MISTURAS FÍSICAS.....	67
4.6 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO FINAL DOS SISTEMAS DISPERSOS OBTIDOS.....	67
4.6.1 Difração de Raios-X.....	67
4.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	68
4.6.3 Microscopia de Polarização.....	68
4.6.4 Infravermelho.....	68
4.6.5 Avaliação da Miscibilidade e do Aporte de Solute Limítrofe à Cristalização.....	69
4.6.5.1 Parâmetro de solubilidade de Hansen.....	69
4.6.5.2 Parâmetro de interação de Flory-Huggins.....	69
4.6.5.3 Análise do aporte de soluto limítrofe à cristalização.....	71
4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS.....	71
4.8 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DOS SISTEMAS DISPERSOS SÓLIDOS OBTIDOS.....	72
4.8.1 Avaliação da Influência do Polímero na Concentração de Equilíbrio da EPI.....	72
4.8.2 Perfil de Dissolução sob Condição Não-sink.....	72
4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA EPIISOPILLOTURINA.....	74
5.1.1 Caracterização da EPI no Estado Sólido.....	74
5.1.1.1 Análise térmica.....	74
5.1.1.2 Difração de raios-X.....	77
5.1.2 Caracterização da EPI em Solução Aquosa.....	78
5.2 OBTENÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS.....	88

5.2.1 Seleção do Carreador.....	88
5.2.1.1 Seleção quanto à aplicabilidade no corpo.....	88
5.2.2 Seleção e discussão da metodologia de obtenção.....	91
5.2.3. Características Físico-químicas dos Carreadores e Sistemas Dispersos.....	93
5.2.3.1 Caracterização do estado sólido final dos sistemas.....	93
5.2.3. Características Químicas dos Carreadores e Sistemas Dispersos.....	102
5.2.3.1 Infravermelho.....	102
5.2.4 Avaliação da Miscibilidade e do Aporte de Solute Limítrofe à Cristalização.....	106
5.2.4.1 Seleção quanto a habilidade de formar ligações de hidrogênio.....	106
5.2.4.2 Parâmetro de solubilidade de Hansen.....	106
5.2.4.3 Parâmetro de interação de Flory-Huggins.....	108
5.2.4.4 Análise do aporte de soluto limítrofe à cristalização.....	112
5.3 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DOS SISTEMAS DISPERSOS SÓLIDOS OBTIDOS.....	117
5.3.1 Perfil de Dissolução sob Condição Não-sink.....	117
5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	124
6 CONCLUSÃO.....	132
7 PERSPECTIVAS.....	133
REFERÊNCIAS.....	134

1 INTRODUÇÃO

O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) encontra-se entre as espécies vegetais de maior interesse mundial devido ao alto nível de alcalóides presente em suas folhas (BERNABÉ, 2008; GUMIER-COSTA *et al.*, 2016). Neste grupo de metabólitos destaca-se a pilocarpina, fitofármaco bastante utilizado no tratamento do glaucoma, no combate a xerostomia e no estímulo a musculatura lisa gastrointestinal (MIURAS, 2009; VÉRAS *et al.*, 2013) no mundo inteiro, cuja extração e isolamento envolve a produção de toneladas de folhas de Jaborandi por ano. Entretanto, devido ao baixo rendimento de pilocarpina (0,5 a 1%) (GUMIER-COSTA *et al.*, 2016), gera-se grandes volumes de lixo orgânico (biomassa). Dentre os constituintes deste resíduo, a Epiisopiloturina (EPI) se apresenta em maior quantidade. O trabalho de Vêras e colaboradores (2013) mostra como o isolamento da EPI pode ocorrer a partir dessa biomassa e, desde então, esse mesmo grupo tem estudado o alcalóide quanto a suas propriedades biológicas, destacando-se as atividades anti-leishmaniose (MIURA, 2009), anti-esquistossomose (VÉRAS *et al.*, 2012), anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2013) e protetora gástrica (NICOLAU *et al.*, 2017).

Dentro do contexto das doenças negligenciadas, a EPI apresenta destaque pois sua obtenção representa baixo custo, uma vez que é originário de um processo de produção nacional e, majoritariamente nordestino, já muito bem estabelecido. Ainda, por ser de origem vegetal, os investimentos voltados à síntese de novos fármacos são reduzidos, o que é particularmente importante devido ao baixo interesse de investimento por parte da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de produtos destinados ao tratamento de doenças negligenciadas. Assim, este alcalóide, tratado neste trabalho como protótipo a fármaco, apresenta grande potencial terapêutico.

EPI foi primeiramente descrita em 1978 por Voightlander e colaboradores, por ser encarada como uma impureza no processo de extração e isolamento da pilocarpina, mas apenas em 2009 suas propriedades biológicas foram estudadas. Assim, informações importantes da molécula, como parâmetros físico-químicos, permanecem desconhecidos. Trabalhos na literatura alegam sua baixa solubilidade aquosa (GUIMARÃES *et al.*, 2014; LIMA, 2016), o que representa um risco à garantia da qualidade do produto, porém essa abordagem é apenas qualitativa. Alguns estudos apontam parâmetros físico-químicos pontuais da molécula (MELO *et al.*, 2015; NICOLAU *et al.*, 2017; PORTES *et al.*, 2016; VÉRAS *et al.*, 2013) que agregam conhecimento sobre o alcalóide, porém ainda são insuficientes para compreender seu possível funcionamento no corpo humano, quando administrado por via oral, já que esta é a principal

via de administração de medicamentos.

Devido a esse cenário promissor e a escassez de informações cruciais à produção de um produto farmacêutico a base de EPI, este trabalho destina-se a contribuir com informações-chave a seu respeito. Para tanto, técnicas de caracterização foram empregadas para elucidar seu comportamento no estado sólido e também em solução, a fim de se obter uma ideia sobre seu comportamento no corpo após a administração oral. Adicionalmente, aborda-se aqui o comportamento do alcalóide frente à quantificação por espectrofotometria na região do UV-visível, pouco explorado na literatura para alcalóides imidazolidínicos e nunca explorado para EPI. Esses aspectos de caracterização são de fundamental importância por permitir conhecer profundamente os candidatos à fármaco, direcionando a intervenção de tecnologias para seu melhoramento, quando necessário (COSTA *et al.*, 2013; DANIEL *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2011; SOVIZI; HOSSEINI, 2013; VIEIRA *et al.*, 2013).

Ainda, a constatação de sua pobre solubilidade aquosa levou à obtenção de dispersões sólidas (DS) nesse trabalho. Essa é uma das mais tradicionais abordagens para o incremento da dissolução de compostos (ALVES, 2010), caracterizada por uma ou mais substâncias ativas dispersas em um carreador ou matriz inerte, quando ambos encontram-se no estado sólido (ALVES *et al.*, 2012; SINHA *et al.*, 2010). Estes sistemas foram primeiramente obtidos na década de 60, e somente dez anos mais tarde polímeros amorfos ou semi-cristalinos passaram a ser utilizados como carreadores (HUANG; TONG, 2004; ALVES, 2012), permitindo a amorfização ou a dispersão molecular do fármaco na sua matriz. Deste modo, incrementos significativos nos perfis de dissolução tem sido alcançados (TRAN *et al.*, 2011; VO; PARK; LEE, 2013; HUANG; DAI, 2013; SUN; LEE, 2014). Aqui, aborda-se a técnica com enfoque físico-químico no incremento da cinética de dissolução e também na estabilidade física dos sistemas, uma vez que este é um dos maiores desafios encontrado na aplicação dessa tecnologia (GREENHALGH *et al.*, 1999; MANIRUZZAMAN *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2013).

Por fim, acrescenta-se que apesar de os achados apresentados nesse trabalho contribuírem para acelerar a aplicação do protótipo na terapêutica, incentivando toda a cadeia produtiva e a economia nacional, eles não se limitam a este alcaloide, podendo também servir de suporte para diversos outros compostos farmacêuticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para caracterização da Epiisopiloturina e incrementar sua cinética de dissolução através da obtenção de dispersões sólidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o protótipo no estado sólido e em solução;
- Estudar a miscibilidade do protótipo em carreadores poliméricos amorfos ou semi-cristalinos;
- Obter e caracterizar sistemas dispersos sólidos à base de Epiisopiloturina;
- Incrementar a cinética de dissolução da Epiisopiloturina;
- Avaliar a estabilidade física dos sistemas dispersos sólidos obtidos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 EPIISOPILOTURINA

O jaborandi legítimo (*Pilocarpus microphyllus*) (Figura 1) encontra-se entre as espécies de maior interesse mundial devido ao alto nível de alcalóides presente em suas folhas (SILVA *et al.*, 2013; VÉRAS *et al.*, 2013). Sua aplicação no tratamento de doenças foi primeiramente descrito após relatos do viajante naturalista Gabriel Soares de Souza, autor do livro *O Tratado Descritivo do Brasil*, onde destinava o uso da planta para o tratamento de feridas e na doença de chagas (ALVES, L. F., 2013). Atualmente, *P. microphyllus* é a principal matéria-prima para extração do fitofármaco pilocarpina, utilizado na medicina humana e veterinária desde 1874 com diversas finalidades terapêuticas, de onde se destacam a redução da pressão intraocular, o combate a xerostomia e o estímulo a musculatura lisa gastrointestinal (VERAS *et al.*, 2012; MIURAS, 2009). Assim, esta espécie é um exemplo de planta que fez a transição entre o conhecimento popular para sua produção em larga escala (MIURAS, 2009).

Figura 1 - *Pilocarpus microphyllus*



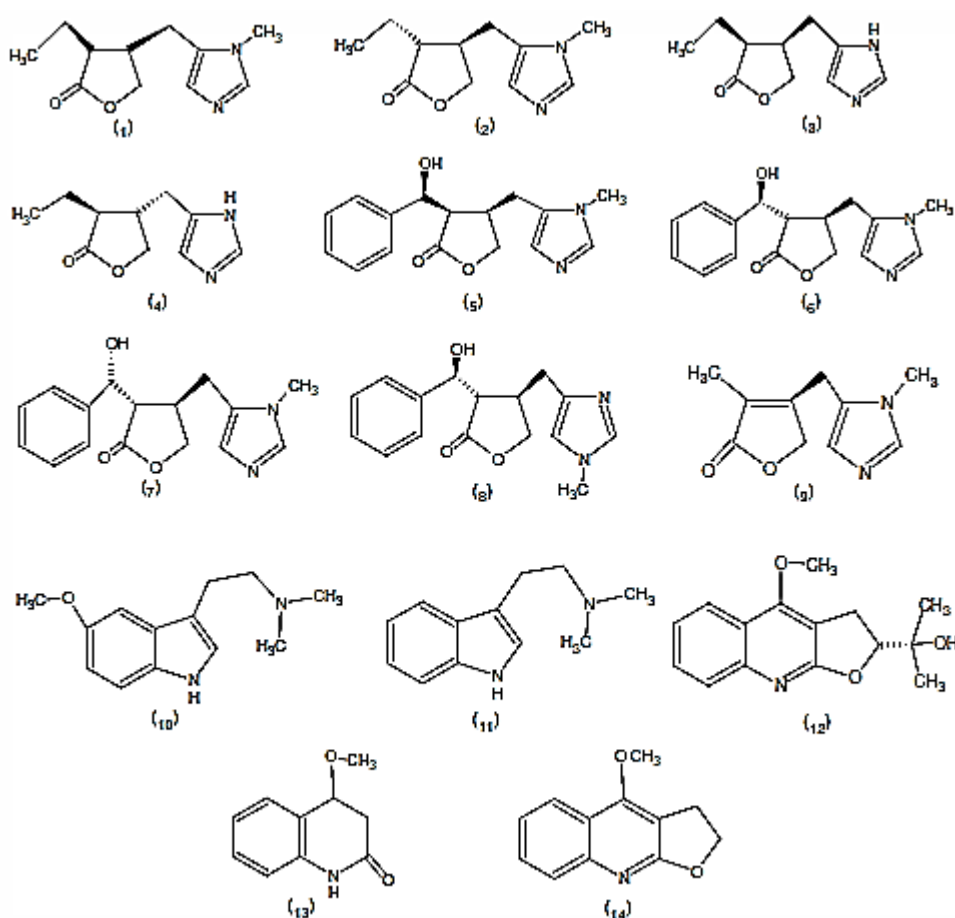
Fonte: www.wikiwand.com/em/Pilocarpus

A extração e o isolamento da pilocarpina ocorrem em parceria entre a empresa Anidro Extrações do Brasil S.A. – a Vegeflora® (Parnaíba, PI, Brasil) – e a companhia farmacêutica Merck® (Darmstadt, Alemanha) e envolve a produção de 5,2 t de folhas por ano (GUMIER-COSTA *et al.*, 2016). Segundo Gumier-Costa e colaboradores (2016), cultiva-se cerca de 3.000 kg/folhas/ha/ano, contra, aproximadamente, 120 kg/ha/ano no sistema extrativista. Em 2008, já com uma relação abalada entre a Vegeflora® e a Merck®, a empresa brasileira fornecia 520 t de

folhas ao valor de R\$ 7,50/kg, o que representava uma movimentação de 39 milhões de reais, sempre com os interesses voltados ao isolamento da Pilocarpina.

Com um rendimento médio de 0,5% quando fruto do extrativismo e de 1% quando nativo, o volume de resíduo (biomassa) é muito grande. Essa biomassa é composta por grande número de outras moléculas, a exemplo da isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina, apresentadas na Figura 2 (MELO *et al.*, 2015; NICOLAU *et al.*, 2017; VÉRAS *et al.*, 2013).

Figura 2- Estrutura dos alcalóides encontrados no gênero *Pilocarpus*

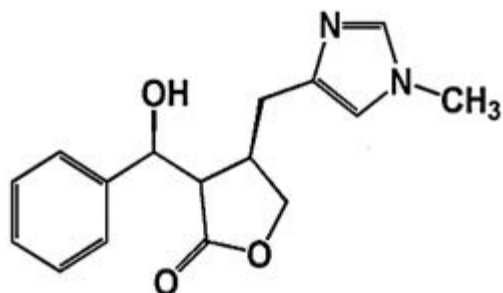


Legenda: (1) pilocarpina, (2) isopilocarpina, (3) pilocarpidina, (4) isopilocarpidina, (5) pilosina, (6) isopilosina, (7) epiisopilosina, (8) epiisopiloturina, (9) 13-nora-7(11)-dehidro-pilocarpina (10) *N,N*-dimetil-5-metoxi-triptamina, (11) *N,N*-dimetil-triptamina, (12) plastidesmina, (13) (1*H*)-4-metoxi-2-quinolona e (14) dictamina.
Fonte: (SANTOS; MORENO, 2004)

A epiisopiloturina (EPI) (Figura 3) é a molécula mais abundante dessa biomassa, com rendimento calculado em cerca de 2 kg de EPI para cada 1500 Kg das folhas de jaborandi (VÉRAS *et al.*, 2013). Trata-se de um alcaloide imidazólico que foi identificado desde 1978

por Voightlander e colaboradores, devido a ser considerada impureza no processo de isolamento da pilocarpina. Atualmente, com foco no seu isolamento, é possibilitada a avaliação de suas atividades biológicas.

Figura 3 - Estrutura química da Epiisopiloturina



Fonte: Adaptado de Veras e colaboradores (2013).

As atividades biológicas da EPI foram primeiramente exploradas em 2009 por Miuras (2009). Miuras (2009) demonstrou, em sua tese, promissora atividade da EPI contra a forma amastigota de *Leishmania amazonenses*, através de ensaios *in vitro*. Em 2012, o mesmo grupo publicou o seu primeiro trabalho sobre as atividades biológicas da EPI, em que foi demonstrada sua promissora atividade esquistossomicida quando avaliada em comparação ao tratamento de escolha atual, que faz uso do Praziquantel (PZQ) (VERAS *et al.*, 2012). Um ano mais tarde, Silva e colaboradores (2013) apresentaram significativa atividade anti-inflamatória, através de estudo *in vivo*, por via intra-peritoneal em ratos. O estudo mais recente, realizado por Nicolau e colaboradores (2017), evidenciaram sua função protetora gástrica, também através de estudos *in vivo*, em ratos.

Miuras (2009) demonstrou, através de ensaios *in vitro*, que a EPI apresentou significativa atividade contra a forma amastigota, fase parasitária real que causa a infecção em seres humanos e cães, de *Leishmania amazonenses* na concentração de 128 µg/mL. Em termos de eliminação dos parasitas, essa dose se aproximou da dose de PZQ 5 mg/mL. Entretanto, EPI merece destaque pois atua contra a forma amastigota, enquanto que os demais medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento desta doença atuam apenas na fase promastigota (BANETH; SHAW, 2002; ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

A atividade esquistossomicida da EPI é considerada promissora, mesmo o protótipo tendo apresentado dose e o período de tratamento superiores ao PZQ. As vantagens apresentadas para a EPI em relação ao PZQ é que protótipo apresenta maior extensão de atuação quanto as diferentes fases do ciclo de vida dos vermes de *S. Mansoni*, além de o protótipo exibir

inibição significativa e irreversível da aptidão reprodutiva dos vermes (ovoposição), ações não observadas para o PZQ. Adicionalmente, EPI demonstrou atividade contra os esquistossômulos em diferentes idades (3h, 1, 3, 5 e 7 dias), onde a concentração de 300 µg/mL foi capaz de eliminar todos eles em 120 h (VERAS *et al.*, 2012).

Em paralelo, Silva e colaboradores (2013) apresentaram significativa atividade anti-inflamatória da EPI. Neste estudo, observou-se que o pré-tratamento dos ratos com dose de 1 mg.Kg⁻¹ de EPI reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina ($p < 0,05$). A mesma dose também inibiu efetivamente os edemas induzidos por sulfato dextran, serotonina e bradicinina. Também se observou a redução da peritonite induzida por carragenina, a partir da inibição de neutrófilos e leucócitos liberarem citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e IL-1 β . Ainda, os autores demonstraram atividade antinociceptiva do protótipo. Todas as análises foram estatisticamente melhores do que o grupo controle, que recebeu indometacina 10 mg/Kg (SILVA *et al.*, 2013).

A ação protetora gástrica foi estudada por Nicolau e colaboradores (2017) pois o anel imidazólico, presente na EPI, é conhecido por possuir propriedades gastroprotetoras. Além disso, vários alcaloides que possuem este anel também têm demonstrado capacidade de melhorar o quadro de úlcera péptica. Assim, através da indução do dano gástrico pela administração de naproxeno, avaliou-se *in vivo* o poder curativo da EPI. Não diferente dos demais alcaloides imidazólicos, EPI apresentou efeito gastroprotetor contra o dano gástrico e intestinal induzido por naproxeno através de sua ação anti-inflamatória, com redução de citocinas pró-inflamatórias, redução do estresse oxidativo e aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (NICOLAU *et al.*, 2017).

Dentre as atuações biológicas da EPI, chama a atenção suas possíveis ações esquistossomíidas e anti-leishmaniose, uma vez que se tratam de doenças negligenciadas. As doenças negligenciadas representam um dos principais problemas de saúde pública em mais de 70 países tropicais e subtropicais (STEINMANN *et al.*, 2006), e mesmo representando 80% da população mundial, correspondem apenas a 20% das vendas globais de medicamentos. Os investimentos do governo brasileiro para pesquisa e desenvolvimento destinados a doenças negligenciadas giram em torno de 75 milhões de reais por ano (SANTOS *et al.*, 2012), porém o conhecimento produzido não é revertido em avanços terapêuticos (novos fármacos, métodos de diagnósticos e vacinas), devido ao baixo potencial de retorno lucrativo de seu público alvo (Ministério da saúde, 2010).

A bioprospecção de plantas para uso como protótipos de novos medicamentos ganha espaço no desenvolvimento de fármacos destinados ao tratamento das doenças negligenciadas.

Segundo Funari e Ferro (2005), a exploração ética da biodiversidade brasileira se faz de grande relevância, dado o conhecimento popular abundante do país, principalmente quando destinadas ao tratamento destes tipos de enfermidades, pois a opção de conduzir pesquisas a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades encurta o percurso do desenvolvimento de uma nova droga, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, de uma indicação de qual atividade biológica esta droga poderia apresentar (FUNARI; FERRO, 2005).

Entretanto, pouco se explorou sobre suas propriedades físico-químicas. Estudos pontuais foram realizados em alguns dos trabalhos publicados (GUIMARÃES *et al.*, 2014; NICOLAU *et al.*, 2017; VÉRAS *et al.*, 2013). A literatura existente afirma que o protótipo é insolúvel em água (GUIMARÃES *et al.*, 2014; LIMA, 2016), entretanto, essa fundamental característica não é aprofundada. Dessa forma, um dos objetivos desse trabalho é aprofundar os conhecimentos físico-químicos sobre a EPI de modo a verificar sua aptidão real na aplicação de medicamentos.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DE FÁRMACOS

O conhecimento das propriedades físico-químicas de fármacos é fator indispensável durante o desenvolvimento de medicamentos, pois variações na forma sólida de uma substância ativa podem provocar alterações significativas em propriedades físicas e químicas da mesma, gerando desvios de qualidade do produto final (DANIEL *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2013). Assim, esta etapa visa o acúmulo máximo de informações sobre o comportamento do fármaco, que será fundamental para a detecção antecipada de problemas de formulação e na identificação das intervenções tecnológicas cabíveis (DANIEL *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2013).

Esta abordagem se torna ainda mais essencial quando se trata de protótipos a fármacos, onde a literatura dispõe de pouca ou nenhuma informação a respeito das condições físico-químicas do insumo e, geralmente, estas substâncias ainda são passíveis de desvio de processo de síntese/isolamento, repercutindo em muitas variações inter-lotes, inclusive de pureza do material, pois não possuem padrão de qualidade definido (SOVIZI; HOSSEINI, 2013). Parâmetros como identificação molecular, determinação morfológica dos cristais, solubilidade aquosa, pKa e comportamento térmico, dentre outros, tem sido aplicados na literatura como

importantes direcionadores para o conhecimento destas características (COSTA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2013). Aqui serão discutidas as principais técnicas adotadas neste trabalho.

3.2.1 Análise Térmica

O emprego das técnicas de análise térmica na caracterização de materiais possui vasta aplicação. Esta é definida como um conjunto de técnicas que permite avaliar as propriedades físicas de uma amostra em função da temperatura ou tempo, enquanto esta amostra é submetida a um programa controlado de temperatura (MENDONÇA *et al.*, 2013; MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010). No contexto farmacêutico, os principais pontos de interesse são as variações de massa e de entalpia, mensuradas através da termogravimetria (TG) e da calorimetria exploratória diferencial (DSC), respectivamente. Estas técnicas em associação permitem elucidar uma série de eventos como fusão, ebulição, sublimação, vaporização, dessolvatação, transição de fase sólido-sólido, degradação química, cristalização e decomposição, que servirão tanto para determinação dos parâmetros de qualidade quanto para seu controle (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011). Entretanto, a literatura defende que a análise térmica deve ser realizada em associação com técnicas de caracterização complementares, tais como espectrometria de absorção na região do infravermelho (IV) e difração de raios-x (DRX), dentre outras, para evitar o estabelecimento de conclusões equivocadas (JÚLIO *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a determinação da cinética de degradação térmica (termólise) também se insere dentre as aplicações de destaque deste conjunto de análises. Uma vez que a ação do calor funciona como um catalisador para realização dos mecanismos naturais de degradação das substâncias, a obtenção da cinética de decomposição térmica fornece informações importantes sobre a estabilidade destes compostos em temperatura ambiente, seja isolado ou em associação com excipientes. Assim, a determinação desta cinética permite a determinação dos parâmetros da reação de decomposição da substância, tais como energia de ativação (E_a), ordem da reação e fator frequência (A) (Quadro 1) (COSTA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2013). Estas informações, por sua vez, auxiliam na predição da estabilidade e fornecem informações fundamentais a respeito do tempo e das condições de armazenamento dos fármacos e medicamentos, sendo uma alternativa rápida e/ou complementar para estimativa do prazo de validade (COSTA *et al.*, 2013; EL'TSOVA; GOLUBITSKII; BUDKO, 2014).

Quadro 1– Parâmetros obtidos a partir da determinação da cinética de degradação térmica de um composto

Parâmetro	Aplicação
Fator frequência (A)	Fornecer uma medida da frequência de ocorrência de uma situação da reação, em geral considerando como um fator intrínseco a frequência de vibração na coordenada de reação.
Energia de ativação (Ea)	é descrita como a barreira energética requerida para converter reagentes em produtos
Ordem da reação	É definida como a variação da velocidade da reação com a concentração dos reagentes

Fonte: Baseado no texto de LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001.

Dentre os parâmetros obtidos através desta abordagem, a Ea é o de maior interesse para avaliar a estabilidade de compostos farmacêuticos, podendo ser utilizada para o estabelecimento de um perfil comparativo de estabilidade entre vários fármacos e suas associações, onde quanto maior a Ea, maior a estabilidade térmica do composto. Esta comparação tem sido realizada por diversos autores na literatura (COSTA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2015; SALAMA; MOHAMMAD; FATTAH, 2015; SOARES *et al.*, 2011; SOVIZI; HOSSEINI, 2013; VIEIRA *et al.*, 2013).

3.2.2 Caracterização da Substância Ativa em Solução

A via de administração oral de fármacos é a rota mais frequentemente empregada devido a sua conveniência, segurança, grande acessibilidade, maior adesão dos pacientes ao tratamento e baixo custo (O'DRISCOLL; GRIFFIN, 2008; PRETORIUS; BOUIC, 2009). Em se tratando de medicamentos no estado sólido, as moléculas de fármaco necessitam ser liberadas da fase sólida e inseridas na fase de solução, processo este denominado de dissolução, para posteriormente serem absorvidas pela parede do trato gastrointestinal (TGI). Esta liberação depende das características de solubilidade do fármaco (DAHAN; MILLER; AMIDON, 2009; INCECAYIR; TSUME; AMIDON, 2013), pois o fluido do TGI é aquoso, e pode ser influenciada por diversas características físico-químicas do mesmo. Uma vez que em torno de 95% dos fármacos hoje disponíveis tratam-se de ácidos ou bases fracas, seu estado de ionização é controlado pelo pH da solução e pela constante de dissociação ácida (pKa) do fármaco, portanto, estes itens serão determinantes no processo de dissolução (ZRNCIC; BABIC; PAVLOVIC, 2015) e, consequentemente, de absorção.

O (s) valor (s) de pKa reflete (m) o grau de ionização das moléculas, e corresponde (m) ao (a) valor (es) de pH no qual 50% delas encontram-se na sua forma ionizada e 50% na sua forma molecular, quando em solução. A forma ionizada é usualmente mais solúvel em água,

enquanto que a forma neutra é mais lipofílica e, assim, possui maior permeabilidade nas membranas (VÖLGYI *et al.*, 2007). Portanto, o pKa pode ser utilizado para descrever a maioria das espécies de moléculas presentes em determinado ambiente, possuindo assim fundamental importância na verificação do comportamento de determinada molécula na vasta faixa de pH que o TGI apresenta. Sendo assim, esta é uma das várias propriedades cruciais utilizadas para estimar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de compostos em sistemas biológicos (ZRNCIC; BABIC; PAVLOVIC, 2015).

Em paralelo, o conhecimento sobre a quantidade máxima de massa capaz de se manter solúvel nos diferentes pH's do TGI também são fundamentais para compreensão do estado físico em que se encontrará o fármaco a cada estágio deste percurso. De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA) e o *European Medicines Agency* (EMA), esta informação deve ser obtida através dos métodos do equilíbrio (*shake-flask*) e métodos potenciométricos, onde seu emprego deve ser devidamente justificado. O método do equilíbrio consiste em adicionar quantidade suficiente do soluto em um meio pré-definido até atingir sua saturação, seguida de agitação e repouso por tempo prolongado até a obtenção do equilíbrio e quantificação do sobrenadante (FDA, 2000; EMA, 2008).

A solubilidade de substâncias pode ser classificada de várias maneiras. Para fins de controle de qualidade, esta é definida como a quantidade de partes do solvente necessária para solubilizar completamente uma parte do soluto, obtendo-se assim sete possíveis níveis de solubilidade (Quadro 2).

Quadro 2 – Classificação quanto ao grau de solubilidade de fármacos em qualquer solvente.

Termo descritivo	Volume apropriado de água (mL) por grama de soluto
Muito solúvel	Menos de 1 parte do solvente é necessário para dissolver 1 parte do soluto
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes do solvente são necessárias para dissolver 1 parte do soluto
Solúvel	De 10 a 30 partes do solvente são necessárias para dissolver 1 parte do soluto
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes do solvente são necessárias para dissolver 1 parte do soluto
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes do solvente são necessárias para dissolver 1 parte do soluto
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes do solvente são necessárias para dissolver 1 parte do soluto
Praticamente insolúvel	Mais de 10000 partes do solvente são necessárias para dissolver 1 parte do soluto

Fonte: Adaptado de: USP NF 37 e FB (2011).

Já para classificação quanto ao sistema de classificação biofarmacêutico (SCB), esta solubilidade é dose dependente, ou seja, uma substância é considerada altamente solúvel quando sua maior dose for solúvel em 250 mL ou menos de uma solução aquosa numa faixa de

pH entre 1,0 - 7,5, para o FDA, e entre 1,0 e 6,8, para o EMEA, ambos a 37°C. Este volume de líquido é derivado dos protocolos de estudo de bioequivalência convencionais, cuja administração do medicamento é considerada em indivíduos em jejum e com o suporte de um copo de água (PHAM-THE *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2002) (FDA, 2000; EMEA, 2008). Porém, em se tratando de substâncias sem dosagem definida (protótipos), este método apresenta-se limitado.

Neste sentido, a determinação da taxa de dissolução intrínseca (TDI) pode ser uma alternativa interessante e tem sido muito utilizada para caracterizar substâncias sólidas. A determinação da TDI pode ser muito importante durante o curso do desenvolvimento de novas entidades químicas, porque permite a predição de problemas de biodisponibilidade potenciais e pode também ser útil na caracterização destes componentes. Este também é um fenômeno de equilíbrio e, portanto, espera-se uma correlação mais estreita deste parâmetro com a dissolução do fármaco *in vivo* do que com a solubilidade propriamente dita. Segundo Nicklasson, Brodin e Sundelof (1983), a dissolução de uma superfície sólida tem sido descrita como um processo em que é principalmente controlado pela difusão, e vários modelos de liberação tem sido levado em consideração. A determinação da dissolução intrínseca pelo método dos discos giratórios é advinda da eletroquímica, onde estes discos tem sido aplicados para estudar o transporte de íons em um campo eletroquímico. A partir desta teoria básica, diversas outras aplicações tem sido dadas a estes sistemas, inclusive no ramo farmacêutico, pois permite a determinação experimental da taxa de dissolução direta de fármacos (NICKLASSON; BRODIN; SUNDELÖF, 1983).

Segundo a USP NF 37, a TDI discute a determinação da taxa de dissolução de um compacto não desintegrável exposto a uma área de superfície fixa em um dado meio de dissolução. A formação deste compacto é realizada pela compressão do material, sob pressão apropriada, utilizando uma prensa. Essa metodologia tem sido empregada para estudar biodisponibilidade e bioequivalência de fármacos solúveis em água desde agosto de 2000, entretanto, tem-se postulado que esse método é robusto e facilmente realizado, obtendo-se uma boa correlação da TDI com a solubilidade do SCB para 17 fármacos modelos (YU *et al.*, 2002).

Assim, Yu e colaboradores (2004) defendem que a TDI pode ser utilizada para a determinação da solubilidade e da classificação biofarmacêutica de fármacos (YU, LAWRENCE *et al.*, 2004). Sabe-se que a faixa de pH empregada no estudo de solubilidade deve variar entre 1,0-7,5, entretanto, os autores defendem que o parâmetro-chave é o pH no local de absorção, que para a maioria dos fármacos acontece no intestino, sendo empregado um pH de 6,8 (YU *et al.*, 2002). Baseando-se nos resultados alcançados pelos autores, fármacos

que possuem TDI maior que 0,1 mg/min/cm², na faixa de pH de 1,0 a 7,5 e, sobretudo, no pH de absorção do fármaco, podem ser classificados como facilmente solúveis (YU, LAWRENCE *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2002). Portanto, a determinação da TDI traz uma abordagem que não contempla a dose dos fármacos nos medicamentos, gerando resultados mais padronizados, e sendo então uma técnica muito importante para protótipos a fármacos cuja dose ainda não foi estabelecida.

3.3 DISPERSÕES SÓLIDAS

3.3.1 Conceito e Particularidades

As dispersões sólidas são sistemas compostos por uma ou mais substâncias ativas dispersas em um carreador ou matriz inerte, quando ambos encontram-se no estado sólido (ALVES *et al.*, 2012; HUANG; DAI, 2014), cuja preparação é alcançada através dos métodos de solvente, fusão ou fusão-solvente (CHIOU; RIEGELMAN, 1971). Estes sistemas dispersos tem sido vastamente empregados com a intensão de incrementar o perfil de dissolução de fármacos pobremente solúveis em água, e esta movimentação é decorrente dos avanços alcançados pela química combinatória e a triagem computacional prévia de candidatos a novas moléculas terapêuticas, que indicam moléculas potenciais com fortes tendências a uma boa permeação, entretanto falham na solubilidade aquosa (SARODE *et al.*, 2013; SUN; JU; LEE, 2012).

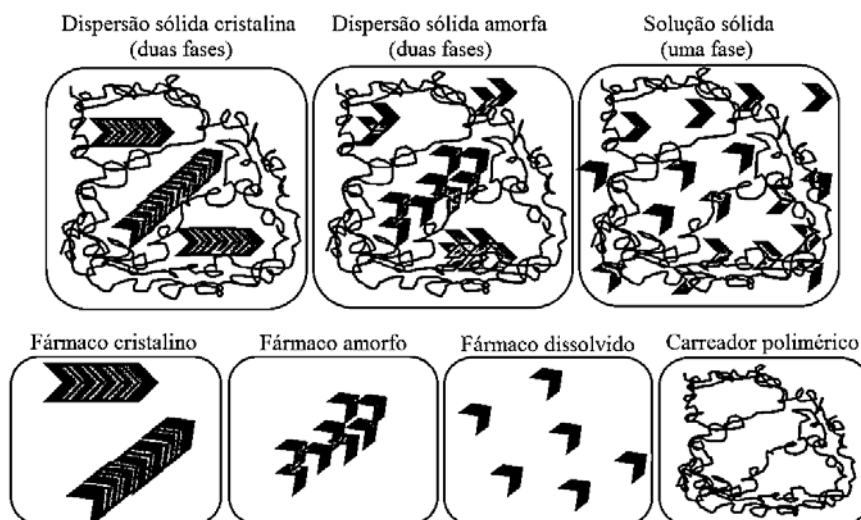
Os primeiros trabalhos envolvendo o emprego das dispersões sólidas foram publicados na década de 60 (CHIOU; RIEGELMAN, 1969, 1971), onde envolviam carreadores cristalinos em sua obtenção. Estes sistemas, denominados de dispersões sólidas cristalinas, compõem a primeira geração das dispersões sólidas, que são baseadas na obtenção de misturas eutéticas entre o fármaco e o carreador cristalino (ALVES *et al.*, 2012; LEUNER; DRESSMAN, 2000). Numa mistura eutética, o ponto de fusão da mistura é menor que o ponto de fusão do fármaco e carreador isolados, e são resultado de uma recristalização simultânea entre o fármaco e o carreador. Assim, a redução do tamanho de partícula do fármaco, o incremento da molhabilidade e a mudança polimórfica constituem as principais razões para o incremento da solubilidade aquosa e da taxa de dissolução dos fármacos nesta geração de dispersão sólida (VO; PARK; LEE, 2013). Um dos pontos críticos na obtenção destes sistemas é o de trabalhar

exatamente na composição eutética, caso contrário, um ou outro componente estará em fase separada (CRAIG, 2002). Além disso, a alta estabilidade termodinâmica decorrente do estado cristalino em que as substâncias se encontram tornam o incremento da taxa de dissolução pequeno quando comparado a dispersões sólidas no estado amorfo (CRAIG, 2002; VO; PARK; LEE, 2013).

A aplicação de polímeros hidrofílicos como carreadores de dispersões sólidas foi primeiramente realizada por Chiou e Riegelman, na década de 70 (CHIOU; RIEGELMAN, 1971). Estes sistemas constituem a segunda geração das dispersões sólidas, e possuem a capacidade de dispersar o fármaco na rede polimérica amorfa. Devido ao estado físico da fase dispersante, estes sistemas são denominados de dispersões sólidas amorfas. Aqui, o fármaco é disperso em um tamanho muito pequeno (molecular, partículas amorfas ou pequenos cristais) na malha polimérica. Na ausência do polímero, as moléculas de fármaco tenderiam rapidamente à recristalização, por ser o estado físico mais estável na natureza. Entretanto, o confinamento molecular das moléculas de fármaco na malha polimérica retarda o encontro entre duas ou mais moléculas de fármaco para formação de um cristal. Nesse cenário, se o fármaco for miscível no polímero e apresentar uma dispersão molecularmente dispersa, este sistema é denominado de solução sólida amorfa (ou solução vítrea), enquanto que se o fármaco for imiscível no polímero, sendo a dispersão composta por duas fases distintas, o sistema é denominado de suspensão sólida amorfa.

Os carreadores poliméricos podem incrementar a molhabilidade e a dispersibilidade de fármacos, além de inibir sua recristalização quando em contato com a água, repercutindo assim no incremento da sua taxa de dissolução (SUN; LEE, 2015b; TRAN *et al.*, 2011; VO; PARK; LEE, 2013) . Entretanto, a separação de fases e/ou a recristalização do fármaco durante o período de armazenamento constitui o principal problema a ser superado, sendo este um dos principais motivos para o baixo número de produtos no mercado que aplicam esta tecnologia (TIAN *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2013; TRAN *et al.*, 2011). A Figura 4 ilustra os diferentes tipos de dispersões sólidas aqui abordados.

Figura 4 - Classificação de uma dispersão ou solução sólida de um fármaco em um carreador polimérico



Fonte: Adaptado de Sun;Lee, 2015.

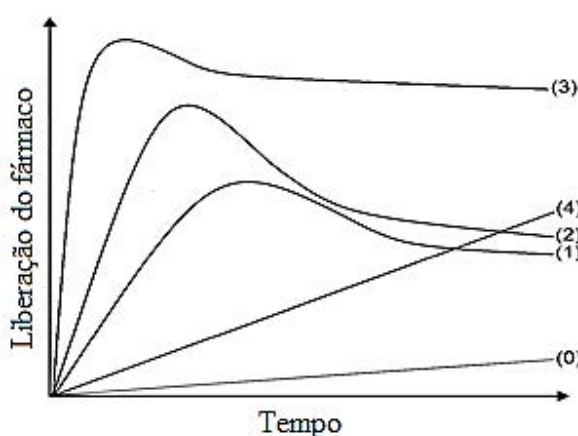
Ainda no contexto do incremento da solubilidade aquosa de fármacos surgiu a terceira geração das dispersões sólidas. Nela, são introduzidos agentes surfactantes ou agentes autoemulsionantes como carreadores ou aditivos, demonstrando assim um significativo incremento na solubilidade aquosa e na superação dos problemas relacionados a precipitação e recristalização do fármaco. O aumento da estabilidade do sistema disperso desta geração é definido pela natureza anfifílica do agente emulsionante ou surfactante empregado, uma vez que este pode incrementar a miscibilidade entre o fármaco e o carreador, e assim reduzir a taxa de recristalização do fármaco. Ainda, estes compostos possuem a propriedade bem conhecida de incrementar a molhabilidade de fármacos e prevenir a precipitação do mesmo durante a dissolução, uma vez que promovem sua supersaturação (VO; PARK; LEE, 2013).

Ao envolver os polímeros na obtenção dos sistemas dispersos um novo universo de possibilidades se abre no âmbito das diferentes formas de liberação de fármacos. Assim surgiu a quarta geração das dispersões sólidas, denominada de dispersões sólidas de liberação controlada (DSLCL). Nela, dois fatores-chave precisam ser alcançados: o aumento da solubilidade aquosa do fármaco e sua liberação estendida de forma controlada. Ou seja, fármacos pouco solúveis em água necessitam estar molecularmente dispersos em um polímero insolúvel ou intumescível em água, utilizados para retardar a liberação do fármaco no meio de dissolução. As DSLCL podem liberar quantidade adequada de fármaco em um período de tempo estendido e assim oferecer uma série de vantagens, tais como aumento da aderência ao tratamento por parte do paciente, devido a redução de administrações diárias, redução dos efeitos colaterais e efeito terapêutico mais constante ou prolongado de fármacos pouco solúveis.

em água, dentre outros (GIRI *et al.*, 2012; NGUYEN *et al.*, 2016; VO; PARK; LEE, 2013). Segundo Giri e colaboradores (2012), a liberação de fármacos a partir de DSLC é dependente do peso molecular e da concentração do carreador, do aporte de fármaco em relação ao polímero e do grau de reticulação do polímero.

A Figura 5 ilustra os diferentes perfis de liberação de acordo com a geração de dispersão sólida empregada.

Figura 5 - Comparação dos perfis de dissolução das quatro gerações de dispersão sólida em condições supersaturadas



Fonte: Adaptado de Vo; Park e Lee (2013). Legenda: (0) – fármaco puro; (1) – primeira geração de dispersão sólida; (2) – segunda geração de dispersão sólida; (3) – terceira geração de dispersão sólida; e (4) – quarta geração de dispersão sólida.

3.3.2 Seleção do Carreador

Uma vez que a redução da mobilidade molecular é crucial para retardar a nucleação e recristalização do fármaco durante o período de estocagem deste produto, os carreadores devem ser selecionados de acordo com sua propriedade de confinamento do fármaco amorfo. Esta propriedade está diretamente relacionada com fatores termodinâmicos; peso molecular e viscosidade do carreador; e interações entre o fármaco e o carreador. A exposição destes sistemas a condições de estresse, como alta umidade relativa do ar (UR) e altas temperaturas podem resultar na transição polimórfica do fármaco do estado metaestável amorfo para o estado cristalino estável (SUN; LEE, 2013).

Dentre os fatores termodinâmicos, tem-se a temperatura de transição vítrea (T_g) do carreador. Quanto maior a T_g de um polímero, maior a energia requerida para haver a mobilidade segmentar das suas cadeias, de modo que quão mais distante a T_g do polímero for da temperatura ambiente, maior é o tempo requerido para relaxação do polímero e, assim,

retarda-se a mobilidade molecular, bem como as taxas de nucleação e recristalização da molécula dispersa e aprisionada, resultando assim em um aumento na estabilidade destes sistemas (QIAN *et al.*, 2010; QIAN; HUANG; HUSSAIN, 2010; SUN; LEE, 2013; TIAN, Y. *et al.*, 2013). Abaixo da Tg, que representa o limite da cinética molecular, a estabilidade das dispersões sólidas depende fortemente da cinética de separação das fases e/ou da cristalização do fármaco do que da termodinâmica. Tem sido proposto que a uma temperatura 50°C mais baixa que o Tg do polímero a mobilidade molecular pode ser negligenciada e os sólidos amorfos são suficientemente estáveis ao longo do período de anos (TRAN *et al.*, 2011). Por isso, polímeros de alta Tg são mais aplicáveis na obtenção de dispersões sólidas. Quian e colaboradores (2010) acrescentam, ainda, outras características importantes para tornar esta afirmação verdadeira, tais como: o aporte de fármaco no sistema (que deve estar abaixo da solubilidade máxima do fármaco no polímero); o grau de higroscopicidade da dispersão sólida; a seleção de um polímero apropriado; e o armazenamento em condições apropriadas.

Em relação ao peso molecular e a viscosidade do carreador, estudos demonstram que quanto maior o peso molecular dos polímeros maior é sua viscosidade e, portanto, este polímero tem a tendência de retardar a liberação do fármaco (VO; PARK; LEE, 2013). Este fato foi observado no trabalho de Yuasa e colaboradores (1994), ao avaliar a taxa de liberação do flurbiprofeno em dispersões sólidas com diferentes pesos moleculares de hidroxipropilcelulose, onde quanto menor o seu peso molecular mais rapidamente o fármaco foi liberado. Ao mesmo tempo, estes fatores estão relacionados com o retardo da mobilidade molecular do fármaco, evitando assim a recristalização do mesmo (YUASA *et al.*, 1994). Com base nisso, polímeros de alto peso molecular são frequentemente empregados para alcançar a liberação controlada de fármacos, enquanto que polímeros de baixo peso molecular são frequentemente empregados em sistemas de liberação imediata (JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009).

As interações entre o fármaco e o polímero podem, sobretudo, ser o resultado de ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas (HUANG; DAI, 2014). Vários polímeros hidrofílicos possuem diversos sítios doadores e/ou aceptores de ligações de hidrogênio. Por exemplo, o HPMC, polímero amplamente utilizado na obtenção destes sistemas dispersos, é rico em sítios doadores de ligações de hidrogênio. É notado na literatura a avaliação prévia dos sítios de formação de ligação de hidrogênio dos polímeros em potencial e do fármaco em que se deseja obter uma dispersão sólida (SUN; JU; LEE, 2012). Estas interações podem ser fundamentais no confinamento molecular do fármaco quando no estado sólido (TIAN *et al.*, 2013) e também podem exercer papel fundamental na dissolução do fármaco no organismo,

pois atrapalham a precipitação do fármaco pobremente solúvel em água quando em solução aquosa supersaturada no TGI (HUANG; DAI, 2014; SUN; JU; LEE, 2012).

3.3.3 Avaliação da Miscibilidade Fármaco-Polímero

A solubilidade do fármaco amorfo pode ser significativamente maior do que quando no estado cristalino, entretanto, o estado amorfo é conhecidamente instável e tende a recrystalizar durante o período de prateleira e/ou teste de dissolução. Apesar de as dispersões sólidas serem um caminho relativamente comum para o incremento da solubilidade e, através do confinamento molecular, alcançar certo grau de estabilidade, esta ainda é insuficiente e permanece sendo um ponto a ser superado (GREENHALGH *et al.*, 1999; MANIRUZZAMAN *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2013).

Devido a isso, a obtenção de um sistema fármaco-polímero miscível pode ser mais efetivo em promover tal confinamento, e a interação entre pequenas moléculas de fármaco com o polímero na matriz polimérica desempenha um papel vital no comportamento durante o estudo de estabilidade a longo prazo do produto formulado (MANIRUZZAMAN *et al.*, 2015; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). Isso acontece porque a miscibilidade, ou a ausência dela, pode afetar dramaticamente a tendência de cristalização do fármaco, uma vez que os excipientes só podem ser efetivos como inibidores da cristalização quando presentes na mesma fase que o fármaco (BAIRD; TAYLOR, 2012).

De acordo com Baird e Taylor (2012), um sistema miscível fármaco-polímero significa “uma única e homogênea fase em que o fármaco e o polímero estão intimamente misturados a nível molecular, e o sistema tem propriedades físicas diferentes quando comparado aos componentes puros”. Nesse sentido, a seleção do carreador polimérico deve levar em consideração a habilidade desses dois componentes serem termodinamicamente miscíveis (TIAN, Y. *et al.*, 2013). Essa “miscibilidade” pode ser mensurada através de algumas opções disponíveis na literatura, tais como o parâmetro de solubilidade de Hansen, o parâmetro de interação de Flory-Huggins e a análise do comportamento da temperatura de transição vítrea (T_g) do sistema em relação ao fármaco e o polímero amorfos isolados, que serão discutidas a seguir. Apesar de todas essas técnicas apresentarem limitações (MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015), elas podem oferecer alguns caminhos sobre como esse processo acontece e funcionar como uma ferramenta importante para prever esse comportamento e evitar perda de recursos durante o processo de desenvolvimento de DS.

3.3.3.1 Parâmetro de solubilidade de Hansen

Uma abordagem útil para analisar qualitativamente a miscibilidade fármaco-polímero é o parâmetro de solubilidade de Hildebrand e Hansen (δ), também denominado de parâmetro de Hansen, mensurado através da determinação da densidade da energia de coesão dos componentes individuais, como demonstra a Equação 1 (MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015).

$$\delta = E/V \quad \text{Eq. 1}$$

Onde V é o volume molar do solvente puro e E é a energia de coesão ou energia de vaporização mensurável. A unidade internacional para o parâmetro de solubilidade é $\text{MPa}^{1/2}$ (HANSEN, 2004).

Sabe-se que para entender um processo de mistura como termodinamicamente favorável, a variação da energia livre de Gibbs deve ser igual ou menor que zero. Através da Equação 2, pode-se compreender como o valor da ΔG^M é definida para um determinado processo. Uma vez que o processo de mistura é quase sempre favorecido pela entropia (ΔS^M), o papel de ΔH^M na resultante ΔG^M torna-se decisivo. O valor de ΔH^M , por sua vez, é definido conforme Equação 3, demonstrando assim que o seu valor é diretamente proporcional à diferença dos parâmetros de Hansen calculados para cada um dos componentes da mistura, ao quadrado.

$$\Delta G^M = \Delta H^M - T\Delta S^M \quad \text{Eq. 2}$$

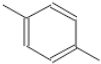
$$\Delta H^M = \phi_1\phi_2VM(\delta_1 - \delta_2)^2 \quad \text{Eq. 3}$$

Se o termo $(\delta_1 - \delta_2)^2$ tender a zero, o valor negativo da variação de energia entrópica governará o valor de ΔG^M , tornando-o também negativo, característico de misturas termodinamicamente favoráveis. Em outras palavras, quanto mais próximo for os valores de δ dos dois compostos a serem misturados, maior a tendência de o resultado final de ΔG^M ser negativo e, portanto, maior a tendência de o produto final ser um produto miscível.

Baseando-se nisso, o parâmetro de solubilidade tem sido frequentemente empregado para prever o comportamento de miscibilidade de uma mistura, e essa técnica é bem estabelecida nos estudos entre polímero-solvente/polímero-polímero. O parâmetro de

solubilidade de Hansen (δ) é específico de cada substância da mistura e é calculado a partir de equações pré-determinadas. O cálculo individual de δ leva em conta as contribuições de cada grupamento químico da molécula para formação de forças dispersas (F_d), forças polares (F_p) e formação de ligações de hidrogênio (U_h) (Tabela 1) (GREENHALGH *et al.*, 1999; HANSEN, 2004; TIAN *et al.*, 2013).

Tabela 1– Valores atribuídos para formação de forças dispersas (F_d), forças polares (F_p) e formação de ligações de hidrogênio (U_h) para diversos grupamentos químicos observados em moléculas orgânicas.

Grupo químico	${}^2F_d/J^{1/2}cm^{3/2}mol^{-1}$	${}^2F_p/KJ.mol^{-1}$	${}^2U_h/KJ.mol^{-1}$
-CH ₃	420	0	0
-CH ₂ -	270	0	0
>CH-	80	0	0
>C<	-70	0	0
=CH ₂	400	0	0
=CH-	200	0	0
=C<	70	0	0
	1620	0	0
	1430	12.1	0
 (o, m, p)	1270	12.1	0
-F	220	-	-
-Cl	450	302.5	0.4
-Br	550	-	-
-CN	430	1210	2.5
-OH	210	250	20
-O-	100	160	3
-COH	470	640	4.5
-CO-	290	592.9	2
-COOH	530	176.4	10
-COO-	390	152.1	7
HCOO-	530	-	-
-NH ₂	280	-	8.4
-NH-	160	44.1	3.1
-N<	20	640	5
-NO ₂	500	1144.9	1.5
Anel	190	-	-

Um plano de simetria	-	x 0.50	-
Dois planos de simetria	-	x 0.25	-
Mais planos de simetria	-	x 0	-

Fonte: Van Krevelen e Te Nijenhuis, 2009.

Essa abordagem tenta explicar o termo “semelhante dissolve semelhante”. Nesse contexto, considera-se um δ similar quando a diferença entre os dois compostos é de, aproximadamente, 7 $\text{Mpa}^{1/2}$ ou menor. Neste caso, entende-se que a mistura é mais inclinada para ser miscível. Por outro lado, quando a diferença é maior que 10 $\text{Mpa}^{1/2}$, é mais provável de ser imiscível (GREENHALGH *et al.*, 1999; HANSEN, 2004; TIAN *et al.*, 2013). A aplicação dessa teoria pode ser encontrada nas indústrias de polímeros e tintas (HANSEN, 2004) e, atualmente, tem sido usada para guiar a miscibilidade de sistemas fármaco-polímero.

A comparação dos valores de δ também pode ser indiretamente realizada através de estudos de solubilidade de materiais; por teste em solvente de conhecido parâmetro de solubilidade; a partir dos valores do número de refração; através da cromatografia gasosa inversa; ou a partir dos dados de calor de vaporização (não disponível para vários polímeros) (GREENHALGH *et al.*, 1999; HANSEN, 2004; TIAN *et al.*, 2013).

A aplicação deste método, entretanto, possui limitações uma vez que os modelos teóricos usados nessa abordagem são apenas aplicáveis a uma estrutura molecular simples, onde as forças de Van der Waals desempenham papel predominante. Para os sistemas fármaco-polímero, em que são conhecidos por formar interações altamente direcionadas (ex: ligações de hidrogênio), ou uma variação de interações (ex: interações eletroestáticas), essa abordagem pode ser errônea (GUPTA *et al.*, 2011; MARSAC; SHAMBLIN; TAYLOR, 2006; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). O trabalho de Li e Chiappetta (2008) concluiu que um δ similar pode não assegurar um sistema completamente miscível. Em outras palavras, esse método pode fornecer uma especulação sobre a miscibilidade fármaco-polímero, mas são necessários outros métodos em associação que concordem com o mesmo resultado (LI; CHIAPPETTA, 2008).

3.3.3.2 Parâmetro de interação de Flory-Huggins

O parâmetro de interação de Flory-Huggins (χ) é bem estabelecido na indústria farmacêutica para mensurar quantitativamente interações de uma cadeia polimérica com outra cadeia polimérica ou moléculas de solventes. Recentemente, χ foi desenvolvido para descrever

a termodinâmica da mistura de um sistema fármaco-excipiente, através da teoria reticular de Florry-Huggins (MARSAC; LI; TAYLOR, 2009; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). Para tanto, há dois métodos para mensurar o valor de χ : o método do parâmetro de solubilidade e o método de depressão do ponto de fusão.

No primeiro, o valor de χ pode ser calculado a partir da diferença entre os parâmetros de solubilidade (δ) do fármaco e do polímero (Equação 4), onde V_{site} é o volume hipotético da energia reticular, que pode fornecer uma estimativa quantitativa da miscibilidade dos sistemas fármaco-polímero. Entretanto, esse método traz consigo as limitações previstas no cálculo de δ , ou seja, é apenas aplicável a sistemas simples contendo, majoritariamente, interações do tipo forças Van der Waals, mas não para sistemas que possuam ligações de hidrogênio ou interações iônicas (MARSAC; SHAMBLIN; TAYLOR, 2006; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015).

$$\chi = \frac{V_{site}}{RT} (\delta_{drug} - \delta_{polymer})^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

No método de depressão do ponto de fusão, um estudo no DSC é realizado com misturas físicas do fármaco e do polímero, e o comportamento de fusão do fármaco na mistura é analisado em comparação ao fármaco isolado. Na verdade, a técnica DSC é considerada “padrão ouro” na análise de miscibilidade de sistemas amorfos (BAIRD; TAYLOR, 2012). Geralmente, se o fármaco e o polímero são miscíveis, uma significativa antecipação do ponto de fusão do fármaco é observada conforme é aumentada a quantidade de polímero em contato, devido ao processo exotérmico de mistura. Por outro lado, se o sistema é imiscível, a variação do ponto de fusão é negligente ou até mesmo ausente, uma vez que o processo de mistura é endotérmico (MARSAC; SHAMBLIN; TAYLOR, 2006; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015).

Termodinamicamente, as mudanças no comportamento da fusão acontecem porque como o polímero plástico se mistura com a fase líquida do fármaco espontaneamente, a energia livre da mistura é negativa, e o potencial químico do fármaco na mistura é reduzido em relação ao fármaco líquido puro (BAIRD; TAYLOR, 2012; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). Aqui é aplicada a temperatura de finalização da fusão (T_{endset}), uma vez que representa a solubilidade do fármaco cristalino no polímero supercongelado (vítreo) sob determinada temperatura. Assim, valores de χ positivos indicam que o sistema é imiscível, enquanto que valores negativos de χ geralmente sugerem miscibilidade (BIKIARIS *et al.*, 2005; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). Em outras palavras, um valor negativo de χ a uma certa temperatura indica que duas diferentes moléculas possuem uma interação mais favorável entre moléculas

diferentes do que entre moléculas semelhantes, e pode muito provavelmente existir em uma única fase. Valores de χ muito positivos indicam que as moléculas preferem interagir com moléculas semelhantes, e então é mais provável de ocorrer a separação de fases (TIAN, Y. *et al.*, 2013).

Uma observação importante é que os sistemas cujos polímeros possuem baixa Tg são cineticamente mais favoráveis à mistura, já que esses polímeros já estão em um estado plástico/borrachoso por um período relativamente longo antes do processo de fusão do fármaco. Assim, esses polímeros possuem tempo e mobilidade suficientes para interagir com o fármaco. Em contraste, polímeros com alta Tg podem não se comportar como um líquido durante o processo de fusão do fármaco, podendo levar a uma mobilidade molecular insuficiente e requerer maior tempo para interagir com o fármaco, resultando em uma cinética de mistura não favorável. Neste sentido, é importante notar que a temperatura de fusão do fármaco deve ser maior que a Tg do polímero, para que assim esse possa suficientemente interagir com o fármaco fundido. Ainda, interpretações equivocadas podem ser admitidas ao se empregar polímeros semi-cristalinos com um baixo valor de fusão, pois o fármaco pode se dissolver na matriz polimérica fundida durante o processo de aquecimento, resultando em uma antecipação do ponto de fusão do fármaco ainda mais expressiva, ou até mesmo na ausência do ponto de fusão, levando a uma interpretação errônea sobre a miscibilidade fármaco-polímero (BAIRD; TAYLOR, 2012; MARSAC; LI; TAYLOR, 2009; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015).

3.3.3.3 Análise da temperatura de transição vítrea (T_g)

Se um sistema fármaco-polímero é obtido no estado amorfo, a análise da Tg pode oferecer informações que ajudam a evidenciar sobre a miscibilidade. Tg é a temperatura de transição de um composto amorfo do estado vítreo (semelhante ao sólido) para o estado de líquido supercongelado (semelhante ao líquido) ou vice-versa (BAIRD; TAYLOR, 2012). Se o sistema é completamente miscível, tipicamente um único evento de Tg é observado, enquanto que se um sistema é totalmente ou parcialmente separado em duas fases amorfas individuais, dois ou mais eventos de Tg podem ser detectados (BAIRD; TAYLOR, 2012; FRIESEN *et al.*, 2008).

É importante notar que, no caso de imiscibilidade, os dois valores de Tg aparecerão nos entornos da Tg original de cada substância, enquanto que em caso de miscibilidade, o único evento de Tg deverá se encontrar em uma temperatura intermediária entre o fármaco amorfo puro e o polímero amorfo puro, como explica a equação de Gordon-Taylor, já que o fármaco e

o polímero tem formado uma única fase fármaco/polímero com propriedades diferentes daquelas observadas para as substâncias puras (FRIESEN *et al.*, 2008).

Entretanto, de acordo com Baird e Taylor (2012), é necessário estar atento que se houver mais de um evento de Tg, essa é uma forte evidência para presença de duas ou mais fases amorfas, porém, a presença de um único evento Tg não é um indicador infalível de miscibilidade. Isto se deve a algumas limitações que a técnica DSC envolve, tais como quantidade de amostra, razão de aquecimento e a distância (em termos de temperatura) da Tg de cada componente (apenas detectável se maior que 10°C) (BAIRD; TAYLOR, 2012; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). Assim, a miscibilidade somente poderá ser inferida em um contexto sem ambiguidades pautada em um conjunto de técnicas.

3.3.4 Obtenção de Dispersões Sólidas

Ao menos três métodos para preparação de DS vêm sendo utilizados com sucesso em produtos comerciais, que são o *hot melt extrusion* e o *spray drying*, além da co-precipitação, aplicável para fármacos que apresentam alto ponto de fusão e baixa solubilidade em solventes orgânicos comuns (HUANG; DAI, 2014). Estes métodos são adaptações de métodos de bancada para escala industrial, baseado na fusão e/ou solubilidade dos compostos.

Através da fusão do fármaco junto ao carreador até uma temperatura ligeiramente superior ao ponto de fusão daquele que apresentar o valor mais elevado, é possível estimular as interações entre os dois compostos e obter um sistema disperso sólido. Os materiais são mantidos em aquecimento até alcançar a formação de uma solução homogênea, macro e microscopicamente, seguido do resfriamento sob agitação constante. Este método apresenta maior probabilidade de quebra do estado cristalino do fármaco para o estado amorfo (KIM *et al.*, 2011), e a depender de sua solubilidade no carreador, pode gerar soluções sólidas (JUPPO; BOISSIER; KHOO, 2003). Por outro lado, o método demonstra-se inadequado para fármacos termolábeis e/ou quando ocorre polimorfismo, devido a potencial transição cristalina durante a fusão dos compostos (ZAJC *et al.*, 2005).

A obtenção de DS a partir da evaporação do solvente foi primeiramente descrita por Tachibana e Nakumara (1965), na qual utilizou o vácuo como método de secagem (TACHIBANA; NAKAMURA, 1965). Esta nova metodologia apresentou diversos benefícios em comparação a utilização da fusão, como a utilização de substâncias termolábeis e polímeros de alto ponto de fusão. Isto porque a técnica de evaporação do solvente emprega uma faixa de temperatura de 23-65°C e não necessita fundir o carreador para obtenção dos sistemas

(LEUNER; DRESSMAN, 2000). Em linhas gerais, a técnica baseia-se na solubilização simultânea do fármaco e do carreador em um determinado solvente, o qual é submetido a um processo de secagem. A depender da técnica de secagem escolhida pode haver modificações nas características físico-químicas do produto final (ALVES *et al.*, 2012). A literatura descreve, além da utilização do vácuo, o aquecimento da mistura, a evaporação lenta do solvente a baixas temperaturas e o uso de outros equipamentos de secagem tais como o rotaevaporador, a estufa e o *spray-drying*, dentre outros (GIRI *et al.*, 2012).

Na tentativa de unir os benefícios dos dois métodos base de obtenção de DS, em 1978 Francois e Jones desenvolveram a técnica fusão-solvente. Este método consiste na fusão do polímero e adição lenta do fármaco previamente solubilizado em solvente orgânico, com posterior resfriamento sob agitação e secagem. De fato, esta é uma alternativa para fármacos termolábeis, entretanto, é pouco relatado na literatura (ALVES, *et al.*, 2012).

A malaxagem, processo industrial bem compreendido na obtenção de grânulos por via úmida, também tem sido empregada na obtenção de dispersões sólidas (TRAN *et al.*, 2011). Neste método, o carreador e o fármaco são misturados por diluição geométrica e a mistura é malaxada com mínima adição de solvente (equivalente à 30% do peso dos pós), até alcançar consistência úmida. A mistura então é submetida a secagem para obtenção do produto final. A secagem do material pode ser feita em estufa ou diretamente na malaxadora acompanhada de pulverização para uniformizar o tamanho de partícula (ALVES *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2011). Devido à simplicidade, ao elevado rendimento e à facilidade de transposição de escala, este método é facilmente aplicável na indústria farmacêutica, entretanto, o método da evaporação do solvente apresenta resultados ainda superiores, sendo por isso, o mais utilizado e o mais descrito na literatura.

3.3.5 Avaliação das Propriedades das Dispersões Sólidas

3.3.5.1 Cristalinidade e homogeneidade

A caracterização de sistemas DS quanto à cristalinidade é um dos pontos críticos desse processo, que ajuda a explicar o ganho da cinética de dissolução e também a acompanhar a estabilidade física do sistema. Isso porque apesar da habilidade do polímero confinar o fármaco em sua rede polimérica, essa habilidade pode ser reduzida com o tempo, em decorrência de vários fatores (por exemplo, baixa afinidade polímero-fármaco, aumento da temperatura ambiente e umidade relativa do ar inadequada, dentre outros). Em virtude desse cenário, a

estabilidade física das dispersões sólidas tem sido considerada um dos maiores desafios da técnica (BAIRD; TAYLOR, 2012; GREENHALGH *et al.*, 1999; MANIRUZZAMAN *et al.*, 2015; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015; TIAN *et al.*, 2013).

A difração de raios-X (DRX) e a análise por DSC podem ser usadas para quantificar a presença de material cristalino em uma dispersão sólida. Para o DRX, a presença de cristais é detectável quando essa fração for presente em torno de 5%, dependendo do tamanho ou da forma geométrica do cristal (FRIESEN *et al.*, 2008). Alguns autores ainda afirmam que a presença de cristais compondo 5-10% da formulação pode não ser detectável (GILL; CARABALLO; BATAILLE, 2010). Entretanto, essa técnica proporciona a análise de maior aporte de amostra, avaliando também a homogeneidade da mesma.

Por outro lado, DSC é uma técnica mais sensível e consegue perceber frações ainda menores de cristal na amostra. Essa técnica emprega quantidades muito pequenas da amostra, não sendo capaz de avaliar a homogeneidade da mesma, a não ser que seja analisado vários pontos distintos. Ainda, na análise com polímeros, a curva DSC pode apresentar um falso resultado em virtude de interações que ocorrem entre o polímero e o fármaco, desestruturando sua rede cristalina apenas na presença de calor (resultado não verídico sob temperatura ambiente)(MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). Portanto, múltiplas análises devem ser realizadas e os resultados concordantes para afirmação de que o sistema é amorfo.

3.3.5.2 Dissolução: histórico e aplicações atuais para sistemas amorfos – condições sink e não sink

O teste de dissolução tem sido reconhecido como um importante elemento no desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos (SUN; LEE, 2015b). Trata-se de um processo heterogêneo clássico, uma vez que leva em consideração os limites de fase sólido-líquido. A dissolução de um sólido em uma solução aquosa é considerada por envolver duas etapas, em que são o transporte interfacial (a reação na interface sólido-líquido) e a transferência da matéria dissolvida para distante do sítio de reação, em que a etapa mais lenta exerce uma influência dominante sobre a taxa de dissolução (DOKOUMETZIDIS; PAPADOPOULOU; MACHERAS, 2006). Entretanto, foi apenas há aproximadamente 50 anos atrás que os cientistas perceberam a importância do processo de dissolução na avaliação fisiológica de fármacos (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006).

O primeiro modelo de dissolução foi proposto por Noyes e Whitney (NOYES; WHITNEY, 1897), onde estudaram a dissolução de dois fármacos moderadamente solúveis em

água (ácido benzóico e cloreto de chumbo). Nesse estudo evidenciou-se que a taxa de dissolução é uma função linear do gradiente de concentração, e o mecanismo foi atribuído a uma fina camada de difusão que é formada ao redor da superfície do sólido e através do qual as moléculas difundem para a fase aquosa. Em 1900, Brunner e Tolloczko demonstraram que a taxa de dissolução é dependente da superfície exposta, da velocidade de agitação, temperatura, estrutura de superfície e do arranjo do aparato. Quatro anos depois (1904), Brunner e Nernst lançaram o conceito da camada de difusão e a segunda lei de Fick, que é conhecida como a equação de Nerst-Brunner (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006; DOKOUMETZIDIS; PAPADOPOULOU; MACHERAS, 2006). E em 1931, Hixson e Crowell expressaram a área da superfície em respeito ao peso da amostra (HIXSON; CROWELL, 1931).

É importante destacar que todas as abordagens acima são utilizadas para descrever a dissolução quando a taxa de difusão da espécie através da camada que envolve a partícula de fármaco é mais lenta do que a reação na interface sólido-líquido, então, estas são expressões relacionadas ao modelo da camada de difusão (DOKOUMETZIDIS; PAPADOPOULOU; MACHERAS, 2006).

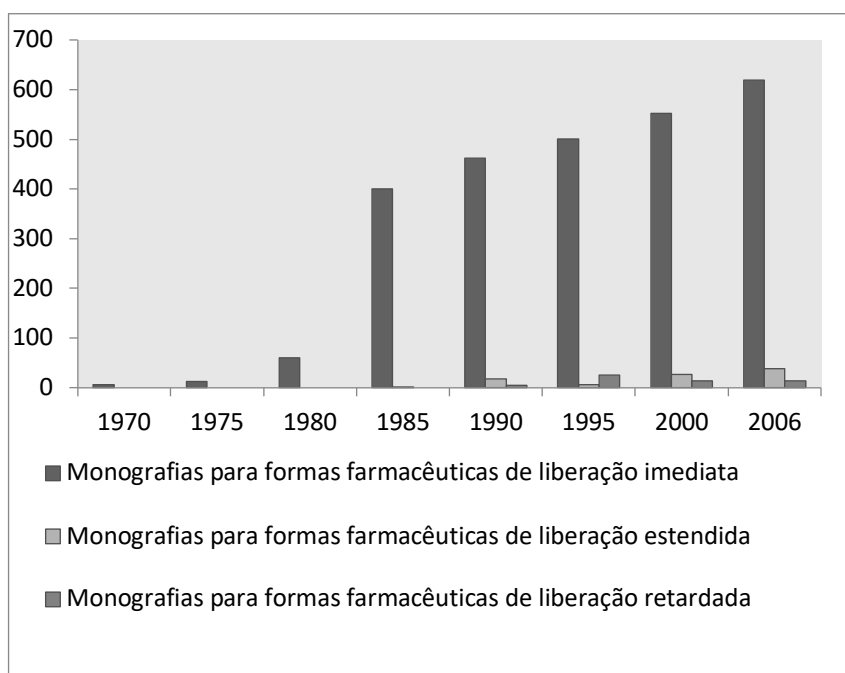
O segundo modelo de dissolução foi proposto por Wilderman (WILDERMAN, 1909). Este abrange o modelo da barreira interfacial, no qual considera o transporte interfacial ao invés da difusão do sólido através do filme como a etapa limitante, devido ao alto nível de energia de ativação para o primeiro. Entretanto, esse modelo não tem sido estudado em detalhes e uma descrição matemática explícita da cinética de dissolução não está disponível. Em seguida, o terceiro modelo, denominado de modelo de Danckwerts foi proposto em 1951, em que considera que uma constante fonte macroscópica de solvente alcança a superfície do sólido e absorve as moléculas de soluto, liberando-os na solução. Combinações desses modelos também tem sido considerada. O modelo teórico do experimento de dissolução surgiu após aperfeiçoamento realizado por Levich (1962), que incluiu os discos rotacionais, levando em consideração a força centrífuga na difusão.

Apesar de todas as vantagens da dissolução *in vitro*, até a década de 50 acreditou-se que a biodisponibilidade *in vivo* era completamente dependente do tempo de desintegração do comprimido, ignorando-se assim o processo de dissolução. Nesse sentido, os anos de 1950-1980 foram marcados pelo desenvolvimento de uma relação entre a dissolução e a biodisponibilidade (termo que surgiu no final dos anos 60). Esse processo foi iniciado por Edwards em 1951, que hipotetizou que o processo de absorção da dissolução de alguns fármacos acontece através de etapas que, quando controladas, também controlam o “aparecimento” do fármaco no corpo. Essa teoria foi também seguida por Nelson (1957), o

primeiro cientista a relacionar explicitamente os níveis sanguíneos do sal de teofilina administrado oralmente às taxas de dissolução obtidas *in vitro*. Assim, entre o meio da década de 60 até o início da década de 70, um número de estudos demonstrando o efeito da dissolução na biodisponibilidade de uma variedade de fármacos foram reportados na literatura, incluindo os achados de que as diferenças da formulação do produto poderiam levar a uma grande diferença na velocidade de início da dissolução, intensidade e duração da resposta do fármaco (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006; DOKOUMETZIDIS et al., 2007).

Provada sua importância, em 1970 o teste de dissolução foi reconhecido como uma ferramenta com imenso valor para o controle de qualidade e tornou o método de dissolução com o aparato cesta (aparato 1, USP) como oficial em seis monografias da farmacopéia Americana (USP) e do formulário nacional (NF). Desenvolvimentos subsequentes levaram a adoção de outros aparatos para a análise das mais variadas formas farmacêuticas (como o aparato pá, disco rotatório, células de fluxo, pá sobre o disco, cilindro rotatório e suportes recíprocos, denominados como aparatos II, III, IV, V, VI e VII, respectivamente) (PHILLIPS *et al.*, 2012), levando a um crescimento considerável de monografias durante os anos (Figura 6). Todas essas metodologias empregam a condição sink, que significa oferecer um volume infinito de meio de dissolução, a partir do emprego de uma dose cerca de dez vezes menor que a concentração de saturação (ou concentração de equilíbrio) do fármaco.

Figura 6 - Evolução dos requerimentos dos testes de dissolução da FDA entre os anos de 1970 e 2006.



Adaptado de: DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006.

De acordo com o FDA, a técnica de dissolução sob condição sink possui alguns objetivos-chave em que se incluem a avaliação da qualidade lote-a-lote, a confirmação contínua da qualidade do produto após certas mudanças (como de formulação ou manufatura), e a avaliação de novas formulações. Através de uma metodologia bem definida (por exemplo, com aparatos definidos, meio de dissolução e hidrodinâmica de agitação, etc), o teste de dissolução tem sido utilizado no controle de qualidade das indústrias de medicamentos do mundo inteiro, além de vários artigos estarem sendo publicados na literatura. Ao mesmo tempo, o guia da FDA diz que: “*a condição sink é desejável, porém não obrigatória*” (FDA, 1997), permitindo assim uma flexibilidade em selecionar as condições em que o teste de dissolução poderá ser realizado. Essa pode ser a resposta ao fato de que apesar de os experimentos serem frequentemente realizados sob condições sink para mimetizar a absorção corpórea, um número limitado de estudos provam que essa relação é, de fato, existente (SUN; LEE, 2015a).

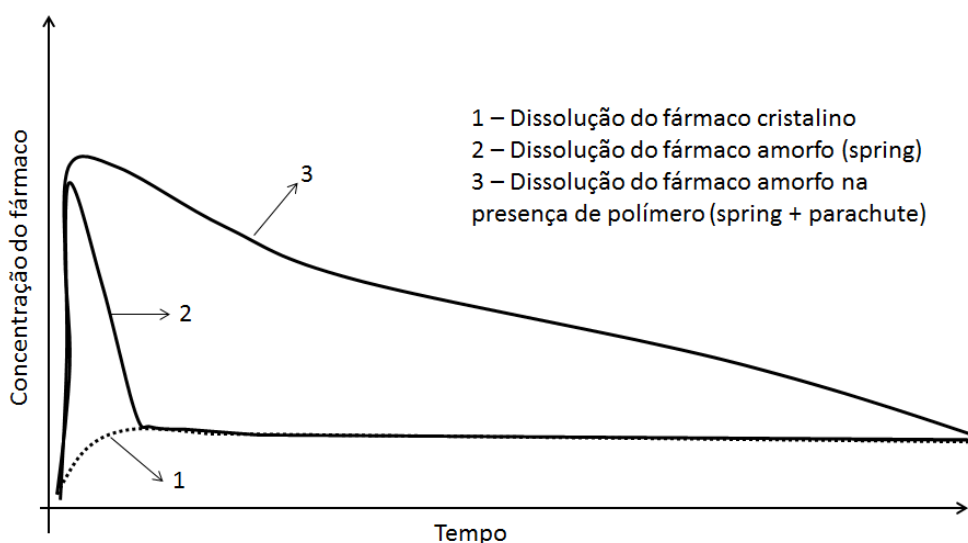
Na verdade, um dos maiores desafios aqui é a solubilidade aquosa da substância estudada, aspecto apontado por Levy e colaboradores desde 1965 quando afirmou que o método é limitado ao estudo das substâncias relativamente solúveis em água (GIBALDI; FELDMAN, 1967). Assim, esse é um ponto importante já que a maioria dos candidatos a fármaco apresentam, atualmente, baixa solubilidade aquosa.

Além disso, candidatos a fármacos cuja solubilidade aquosa é pobre tem sido estudados na tentativa de modular essa característica. Dentre as técnicas empregadas, o desenvolvimento de sistemas dispersos amorfos é bem requisitado devido ao sucesso em incrementar essa propriedade. Nesses sistemas, a precipitação no interior do lumen intestinal é um processo termodinamicamente favorecido, devido à natureza instável da molécula em solução supersaturada, que fornece a força motriz para nucleação e cristalização do composto. Para esses sistemas, como a concentração de saturação do fármaco no meio de dissolução é muito pequena, o volume do TGI não é infinito como previsto na condição sink, assim, vários estudos tem empregado a condição não-sink para melhor explorar esses fenômenos (SUN; LEE, 2015a).

As primeiras publicações sobre formulações farmacêuticas amorfas tiveram seus experimentos de dissolução conduzidos sob condição sink, e foi destacada a importância de uma taxa de dissolução rápida do fármaco amorfo a partir dos sistemas dispersos ou misturas eutéticas (CHIOU; RIEGELMAN, 1969; GOLDBERG; GIBALDI; KANIG, 1966; SIMONELLI; MEHTA; HIGUCHI, 1969; SIMONELLI; MEHTA; HIGUCHI, 1976). Assim, firmou-se o conceito de que quanto mais rápida fosse a taxa de dissolução promovida pelo polímero selecionado, mais rápida seria a taxa de absorção do fármaco pouco solúvel em água, o que levou ao emprego de polímeros solúveis em água como carreadores desses sistemas (por

exemplo, PVP e HPMC) (SUN; LEE, 2015a). Entretanto, em 2012 Augustijns e Brewster contrariaram essa teoria ao constatar que a dissolução rápida de formulações supersaturadas não produzem sempre uma melhor performance *in vivo*. Os autores compreenderam, então, que a liberação do fármaco a partir de sistemas amorfos seguia um comportamento diferente, e empregaram o modelo “*spring and parachute*” (Figura 7), em que descreve a liberação do fármaco a partir de sistemas amorfos (“*spring*”, do inglês, significa “brotar” e está relacionado a rápida dissolução de fármaco amorfo), e o amortecimento dos eventos de nucleação e cristalização do fármaco por parte do polímero (“*parachute*”, do inglês, significa “pára-quedas”). Neste trabalho foi evidenciado, portanto, que quanto mais rápida é a taxa e a extensão da supersaturação, maior é a instabilidade física do fármaco na solução devido ao aumento da tendência do fármaco solubilizado a cristalizar durante a dissolução (AUGUSTIJNS; BREWSTER, 2012) e, por isso, nem sempre repercutem na melhor performance *in vivo*.

Figura 7 - Perfis de dissolução hipotéticos que exemplificam o modelo “*spring and parachute*”.



Adaptado de (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016). O perfil 1 é característico da dissolução do fármaco cristalino sob condição não-sink, onde o mesmo dissolve até alcançar a concentração de equilíbrio, sem evento de supersaturação. O perfil 2 representa a oferta de fármaco amorfo sem a presença do polímero, assim, a concentração do fármaco aumenta e ultrapassa a concentração de equilíbrio (região metaestável) até que alcance a concentração de saturação crítica e os processos de nucleação e cristalização comecem a ocorrer desenfreadamente. Já o perfil 3 representa a oferta de fármaco amorfo com a presença do polímero (típico de dispersões sólidas), onde o polímero amortece os processos de nucleação e cristalização, aumentando a extensão da região metaestável.

Para poder visualizar os eventos observados *in vivo* e obter um panorama mais realista do comportamento do sistema no TGI, emprega-se a condição não-sink nos testes de dissolução. Uma condição não-sink é alcançada quando a dose empregada no teste de dissolução é maior que a concentração de equilíbrio do fármaco naquele meio. Usualmente, a literatura emprega

doses dez vezes maiores que a concentração de equilíbrio. Essa abordagem é empregada pois entende-se que, para um fármaco pobremente solúvel em água, o volume do TGI passa a ser finito e, portanto, a concentração teórica total do fármaco no TGI ultrapassa a sua concentração de saturação (SUN; LEE, 2015a). Os estudos de Van Speybroeck e colaboradores (2010) mostram claramente que a relação *in vitro-in vivo* de formulações supersaturadas respondem de maneira mais realística quando os estudos de dissolução são realizados em condição não sink. Essa relação pode ser ainda melhor ilustrada na Figura 2 do comentário de Sun e Lee (2015a), que adaptou os resultados obtidos por Van Speybroeck e colaboradores (2010).

Para melhor entender o quão distante o experimento está da condição sink, é aplicado o Índice sink (IS), introduzido por Sun, Ju e Lee (2012) em que é definido como $IS = C_s / (Dose / V)$, onde C_s é a solubilidade do fármaco cristalino, V é o volume do meio de dissolução, e *Dose* refere-se à quantidade total de fármaco empregado como amostra no experimento. Aqui, IS é essencialmente uma razão da solubilidade do fármaco cristalino meio de dissolução sobre a dose inteira dissolvida. Para soluções supersaturadas, IS é também equivalente ao inverso do grau máximo de supersaturação alcançável.

Com base nos resultados obtidos dos ensaios de dissolução sob condição não-sink, notou-se que as melhores performances *in vivo* não eram advindas dos perfis de dissolução *in vitro* cuja taxa de dissolução era mais rápida. Diversas observações expunham a ideia de que uma liberação mais gradual do fármaco alcançava um modelo de supersaturação sustentada e repercutia em melhores performances *in vivo* (HIRASAWA *et al.*, 2003; SUN; JU; LEE, 2012; TAKAHASHI; YAMAGUCHI, 1991; VAN SPEYBROECK *et al.*, 2010). Esses estudos independentes, quando juntos, forneceram fortes evidências de que a taxa de supersaturação gerada desempenha um importante papel na determinação do nível do incremento da solubilidade transiente, afetando assim todo o perfil da cinética de solubilidade sob condições não-sink (mais próxima do real).

A partir dessas abordagens, Sun e Lee (2013) estudaram a influência da taxa de liberação do fármaco na cinética de dissolução de sistemas supersaturados. Como mencionado, os estudos sob condição não sink contrariam o que se foi postulado no passado, onde a liberação mais rápida não apresenta a melhor área sob a curva (AUC). De acordo com os autores, há uma “razão ótima” de liberação em que AUC pode ser maximizada.

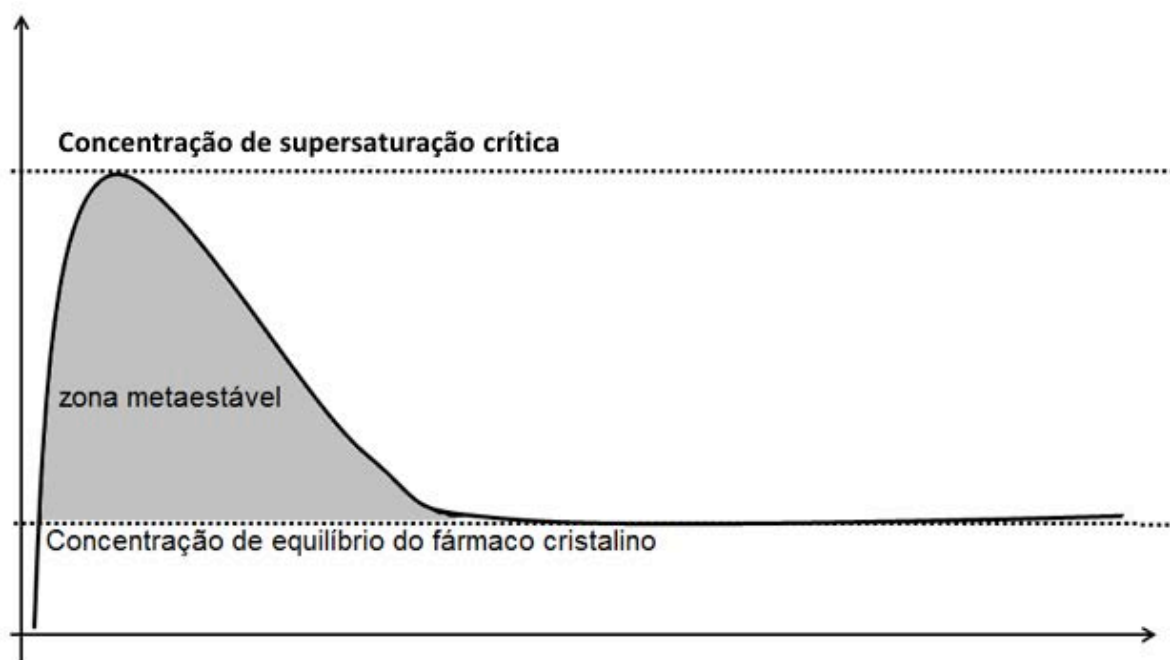
Mais recentemente, Han e Lee (2017) estudaram a influência da dose empregada na cinética de dissolução de sistemas supersaturados. Os autores também evidenciaram dependência da dose na geração dos perfis de dissolução, em que a maior dose testada levou a

uma queda na performance da dissolução, e também foi demonstrada uma dose ótima para obtenção dos melhores perfis de dissolução.

Ambas as abordagens (HAN; LEE, 2017; SUN; LEE, 2013) levam em conta o princípio básico de que, quando ocorre a dissolução de um sistema amorfo sob condição não sink, ocorre inicialmente uma solubilização rápida do fármaco amorfo. Essa solubilização ultrapassa a concentração de equilíbrio do fármaco cristalino, entrando assim na zona metaestável (condição de supersaturação). Entretanto, quando a concentração do fármaco alcança a concentração de supersaturação crítica, os eventos de nucleação e cristalização ocorrem desenfreadamente. Denomina-se aqui concentração de saturação crítica a concentração sob a qual os eventos de nucleação e cristalização são desprezíveis. Em outras palavras, se a concentração do fármaco se mantiver abaixo da concentração de saturação crítica, os eventos de nucleação e cristalização se mantêm desprezíveis, ainda que o fármaco esteja na zona metaestável. Por outro lado, ao alcançar essa concentração, a precipitação do fármaco acontece desenfreadamente e a AUC final é drasticamente reduzida.

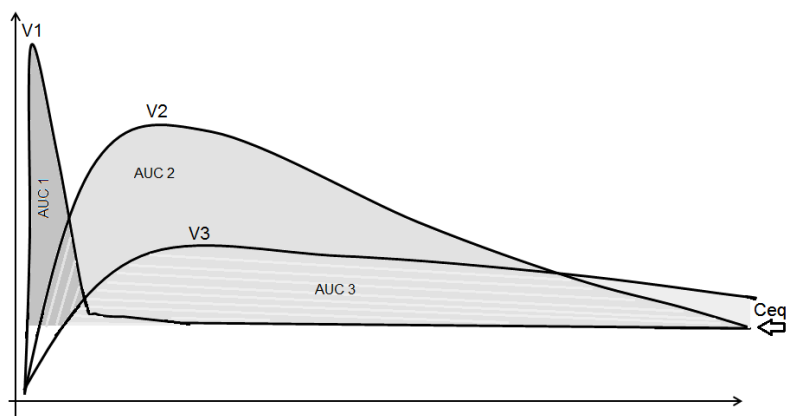
Han e Lee (2017) explicam que a taxa de nucleação é extremamente sensível a supersaturação. Nesse estudo, a maior dose testada provocou a taxa de nucleação mais rápida. O mesmo aconteceu na avaliação da taxa de liberação do fármaco (SUN; LEE, 2013), em que demonstrou que maior taxa de liberação não gerou a maior AUC, devido a alcançar mais rapidamente a concentração de saturação crítica. Assim, Han e Lee (2017) declaram ser evidente que, ao alcançar a concentração de saturação crítica, a taxa de nucleação passa a ser significativa, havendo a rápida formação de núcleos e crescimento dos cristais, caracterizado pela precipitação do fármaco. Da mesma forma, a taxa de crescimento dos cristais também é rápida quando altas concentrações de supersaturação são alcançadas, levando a uma precipitação ainda mais rápida. Entretanto, também se constatou que se a velocidade de liberação do fármaco é tal que a concentração de saturação crítica é evitada, ou se a dose empregada é tal que a concentração de saturação crítica é evitada, o fármaco estará na condição de supersaturação por mais tempo, repercutindo assim em uma AUC aumentada. As Figuras 8 e 9 ilustram a teoria apresentada.

Figura 8 - Perfil de dissolução hipotético sob condição não sink, evidenciando as concentrações de equilíbrio e de supersaturação crítica, além da zona metaestável.



Fonte: autoria própria.

Figura 9 - Perfis de dissolução hipotéticos obtidos para diferentes velocidades de liberação do fármaco, sob condição não sink



Fonte: autoria própria (2017). Inspirado nos resultados de (SUN; LEE, 2013). Legenda: V1, 2 e 3 representam, hipoteticamente, velocidades de liberação rápida, intermediária e lenta, respectivamente. AUC 1, 2 e 3 representam as áreas sob a curva da região supersaturada obtidas em decorrência da variação da velocidade de liberação. Ceq indica a concentração de equilíbrio do fármaco hipotético cristalino.

Assim, levando em consideração a relação *in vitro-in vivo* identificada pelos estudos disponíveis, nota-se que uma apropriada redução na taxa de dissolução das formulações

contendo dispersões sólidas amorfas pode, na realidade, incrementar a biodisponibilidade oral. Adicionalmente, tanto a taxa quanto a extensão da supersaturação gerada têm demonstrado profundo impacto na avaliação geral da supersaturação de produtos farmacêuticos amorfos em função do tempo.

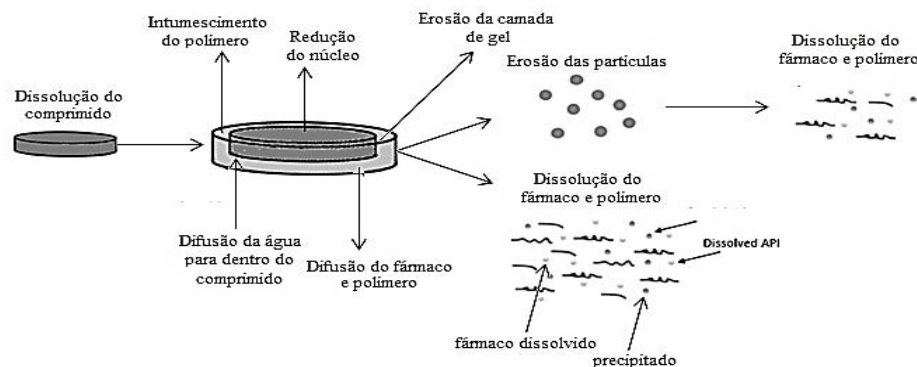
Todos esses achados só puderam ser alcançados quando o estudo de dissolução passou a ser realizado em condição não sink. A influência do polímero no amortecimento desses eventos de nucleação e cristalização também só serão acessados se trabalhados sob condição não sink. Por essas razões, acredita-se e emprega-se as dissoluções nessas condições durante todo esse trabalho, exceto quando o objetivo for a avaliação da estabilidade de compostos ou quando a condição não-sink não se apresentar como uma condição realista no corpo humano (para fármacos com relativa solubilidade em água).

3.3.5.3 Mecanismos de liberação de fármacos a partir de dispersões sólidas

Apesar de a literatura apresentar constantemente as vantagens da obtenção das dispersões sólidas, percebe-se uma grande lacuna na compreensão dos mecanismos pelo quais este incremento na taxa de dissolução ocorre e de como se dá o processo de liberação do fármaco (OHARA *et al.*, 2005). Entretanto, esse conhecimento é fundamental para facilitar o desenvolvimento racional de novos sistemas dispersos sólidos (CRAIG, 2002), e as teorias mais utilizadas na literatura serão discutidas aqui.

As dispersões sólidas são basicamente sistemas matriciais de liberação de fármacos, onde esses se encontram homogeneamente dispersos na matriz polimérica, seja ela hidrofóbica ou hidrofílica. Esses sistemas são mais comumente utilizados para administração por via oral, devido aos seus benefícios econômicos, a relativa simplicidade de processo e procedimentos de aumento de escala, além da possibilidade de suportar um aporte de fármaco apropriado com uma ampla variedade de propriedades físicas e químicas (TRAN *et al.*, 2011). Segundo Siepmann e colaboradores e Puncochová e colaboradores, a liberação do fármaco a partir de sistemas matriciais ocorre, basicamente, pelos mecanismos da difusão e/ou erosão, com variáveis em relação a capacidade de absorção de água e intumescimento do polímero (PUNČOCHOVÁ *et al.*, 2015; SIEPMANN *et al.*, 1999). Estes processos elementares são ilustrados na Figura 10, e podem ajudar na explicação da liberação dos fármacos a partir de uma dispersão sólida, além de auxiliar na escolha do polímero ideal (PUNČOCHOVÁ *et al.*, 2015). As equações matemáticas disponíveis para explicar as diferentes cinéticas de liberação do fármaco podem ser consultadas no trabalho de Giri e colaboradores (2012).

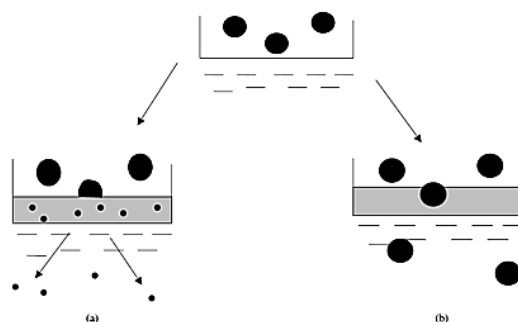
Figura 10 - Processos elementares e possíveis mecanismos de liberação de fármacos a partir de um comprimido obtido por um sistema disperso sólido, cujo polímero é intumescível na presença de água.



Fonte: Adaptado de Puncchová e colaboradores (2015).

Segundo Craig (2002), a liberação dos fármacos por difusão de uma dispersão sólida se dá pela formação de lâminas ricas em polímero, que quando entram em contato com o meio de dissolução geram um gradiente de concentração entre a área externa do aglomerado de pó e a área interna. Este mecanismo é aplicado, sobretudo, aos polímeros hidrofílicos, pois estes formam camadas de gel na superfície do sistema via absorção de água, como os polímeros derivados de celulose (TRAN *et al.*, 2011). Os estudos de Higuchi e Connors (1965) apoiam esta teoria. Craig (2002) defende, ainda, que este mecanismo é dependente do aporte de fármaco presente na dispersão sólida, levando a dois tipos de controles de liberação: a) dissolução controlada pelo carreador, onde o fármaco é dissolvido nas camadas ricas em polímero antes de ser liberado para o meio de dissolução; e b) dissolução controlada pelo fármaco, onde este é liberado intacto para o meio de dissolução, como ilustra a Figura 11.

Figura 11 - Esquema do processo de dissolução de fármacos a partir de uma dispersão sólida.



Fonte: Adaptado de Craig (2002). Legenda: (a) dissolução do fármaco controlada pelo carreador; (b) dissolução do fármaco controlada pelas propriedades do fármaco; As esferas maiores representam o fármaco no estado sólido (partícula), enquanto que as esferas menores representam o fármaco dissolvido (molecular).

No primeiro cenário (Figura 11a), o modelo trabalha com a premissa de que há baixo aporte de fármaco. Assim, as partículas são dissolvidas dentro da camada de difusão rica em polímero a uma taxa suficientemente rápida, repercutindo em tempo insuficiente para haver o rearranjo molecular e, conseqüentemente, a recristalização do fármaco, mantendo-o molecularmente disperso. Entretanto, a viscosidade da camada rica em polímero é tal que a difusão do fármaco é muito lenta, tornando-se igual a taxa de dissolução do polímero, ou seja, a taxa de liberação do fármaco é controlada pela taxa de liberação do polímero. Portanto, as velocidades da absorção inicial de água e da conversão na camada viscosa são importantes para avaliar o controle e os mecanismos da liberação do fármaco a partir destes sistemas (TRAN *et al.*, 2011). Craig (2002) destaca, ainda, que a dissolução de um polímero solúvel em água não deve ser modelado por uma equação de dissolução simples, uma vez que os polímeros não apresentam solubilidade de saturação, já que podem intumescer e adsorver moléculas de água para produzir concentrações contínuas entre a superfície e o núcleo do material no estado sólido.

No segundo cenário (Figura 11b), diante de um aporte maior de fármaco, a dissolução nas camadas ricas em polímero é pequena e, portanto, o fármaco é liberado na forma de partículas. Assim, a taxa de dissolução se dará em função das características do fármaco, tais como tamanho e geometria da partícula, dentre outros. Nesta situação ainda é possível observar incrementos significativos na taxa de dissolução, uma vez que pode ocorrer aumento da superfície de contato das partículas de fármaco com o meio de dissolução, bem como o polímero pode proporcionar um aumento da molhabilidade e a redução da capacidade de aglomeração destas partículas.

A definição sobre que cenário a dissolução do fármaco deve seguir em uma situação experimental se dá pela capacidade do polímero solubilizar o fármaco. Esta informação é que vai direcionar se o aporte de fármaco utilizado na dispersão sólida é alto ou baixo e, assim, definir qual o tipo de liberação este sistema irá seguir. Além disso, é possível que um sistema sólido disperso libere o fármaco através dos dois mecanismos, já que parte dele pode estar solúvel no polímero e parte insolúvel, caso a concentração do fármaco ultrapasse a solubilidade máxima no polímero. As diversas equações que ajudam a explicar a liberação de fármacos por esta teoria podem ser consultadas no trabalho de Craig (2002).

A espessura da camada de gel hidratado formada determina o caminho de difusão do fármaco. Quando o carreador intumescer, o caminho a ser percorrido pelo fármaco é alongado, aumentando o tempo necessário para difusão do mesmo para fora da matriz. A medida que a camada exterior torna-se totalmente hidratada, as cadeias do polímero tornam-se totalmente

relaxadas, perdendo a integridade na forma de gel e levando à erosão da matriz. A água penetra continuamente em direção ao núcleo sólido, até que este esteja completamente dissolvido. O intumescimento do carreador permite a liberação do fármaco por difusão Fickiana, enquanto que a erosão resulta em uma difusão anômala (TRAN et al., 2011).

Outras características também podem modular a liberação do fármaco de um sistema disperso sólido. O tamanho das partículas do fármaco no sistema, sobretudo de moléculas de moderada solubilidade, pode influenciar bastante sua liberação. A concentração do polímero também influencia, onde quanto maior menor é a taxa de liberação do fármaco, devido ao incremento da viscosidade do sistema. Na maioria dos casos, a escolha do polímero e sua concentração determinam a cinética de liberação dos fármacos de um sistema disperso sólido (TRAN et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EPI

A epiisopiloturina foi extraída e isolada pela indústria Anidro do Brasil Extrações S. A., situada em Parnaíba (PI), conforme metodologia descrita por Vêras e colaboradores (2013).

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Nesse trabalho foram empregados os solventes: água ultrafiltrada (Millipore®), dimetilsulfóxido, clorofórmio, acetona, metanol e o tampão *Sirius Neutral Linear UV*®.

Para composição dos meios de dissolução e da fase móvel, foram empregados os materiais: ácido clorídrico 0,5 M, hidróxido de potássio 0,5 M, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, ácido fórmico, trietilamina e metanol grau HPLC.

Como carreadores, foram empregados os polímeros: Hidroxipropilmetilcelulose acetato succinato do tipo MF (Shinetsu®, lote #9123308), aqui denominado como HPMCAS; Poli (acrilato de ácido metacílico-etílico), aqui denominado como Eudragit L100-55 ou Eudragit (Degussa®, lote #B050204040); Hidroxipropilmetilcelulose do tipo E5, aqui denominado como HPMC ou HPMC E5 ou Methocel® E5 (Dow®, lote #TB09012401); e o homopolímero de 2-pirrolidona 1 1-Etenil, aqui denominado como PVP K30 ou Plasdone® K-29/32 (ISP Technologies®, lote #05500138829). Todos os carreadores foram generosamente doados pelas empresas Shin-Etsu®, Degussa®, The dow chemical company® e ISP Technologies®, respectivamente.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA EPI NO ESTADO SÓLIDO

4.3.1 Análise Térmica

As curvas DSC foram obtidas em Calorímetro de Varredura DSC Q200® (TA instruments®), interligado ao software TA60® versão 2.20 (TA instruments®), sob atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, na faixa de temperatura de 30–300°C. Porta-amostras de alumínio hermeticamente fechados foram empregados para

conter 5-10 mg ($\pm 0,2$) de protótipo. O mesmo tipo de porta-amostra foi empregado como referência em todas as verificações. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

A caracterização térmica quanto a variação de massa da EPI foi realizada em termobalança Shimadzu®, modelo DTG-60H, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e faixa de aquecimento de 30 a 600°C. Para este método foram utilizados 3 mg ($\pm 0,3$) de amostra, que foi acondicionada em porta-amostra de alumínio. Antes dos ensaios verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monohidratado com perdas de massa definidas. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS® (*Thermal Analysis*®), versão 2.20 da Shimadzu®.

O estudo cinético não-isotérmico foi realizado conforme método de Ozawa (OZAWA, 1965), com aquecimento das amostras no intervalo de 30° a 600°C, e razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 20 e 40°C.min⁻¹. Para o tratamento dos dados, foi utilizado o modelo proposto por Ozawa (1965), conforme programa de análise cinética desenvolvido pela Shimadzu®. O coeficiente angular (*slope*) do gráfico log A vs. 1/T (K⁻¹) fornece a energia de ativação (Ea) do processo. Os valores do fator frequência (A) e ordem de reação também são obtidos neste estudo cinético, a partir do gráfico que correlaciona a massa residual da amostra pelo tempo reduzido em minutos.

4.3.2 Difração de Raios-X

Os difratogramas do protótipo foram obtidos no difratômetro Miniflex II® (Rigaku®), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo de 5-40° a uma velocidade de digitalização de 2°.min⁻¹. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de pó sem solvente.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA EPI EM SOLUÇÃO AQUOSA

4.4.1 Quantificação Espectrofotométrica na Região do Ultravioleta Visível

As amostras de EPI foram obtidas a partir de uma solução estoque de concentração 65 mg.mL⁻¹ do protótipo em ácido clorídrico pré diluído para 0,05 N. Diminutas alíquotas dessa solução concentrada eram retiradas para obtenção de concentrações inferiores, com diluição em

solução tampão fosfato pH 6,86 (BRASIL, 2010). Um volume máximo de 3% da solução concentrada na solução diluída foi estabelecido visando manter o pH das soluções de leitura em $6,83 \pm 0,3$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro na região do UV-visível Cary 50 (Varian®), no modo “fast” e sempre como varredura de 200 a 400 nm. O comprimento de onda empregado para leitura dos espectros de ordem zero foi 260 nm, enquanto que para leitura da segunda derivada dos espectros empregou-se comprimento de onda de 275 nm. A segunda derivada do espectro de UV foi empregado sempre que a presença de cristais era possível.

O cálculo da absortividade molar relativa em 220 e 260 nm foi realizado a partir dos valores de absorbância obtidos pelo espectro de ordem zero em cada uma dessas regiões, a partir de uma solução de concentração fixa ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$). De acordo com a Lei de Lambert-Beer (Equação 5), foi possível igualar a variável concentração e verificar, proporcionalmente, os valores das absortividades molares (Equação 6).

$$A_x = \varepsilon_x \ell C \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\frac{A_{220 \text{ nm}}}{A_{260 \text{ nm}}} = \frac{\varepsilon_{220 \text{ nm}}}{\varepsilon_{260 \text{ nm}}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que A é a absorbância, ε é a absortividade molar, ℓ é a distância percorrida pela luz ao incidir na amostra e C é a concentração.

A influência do pH da absortividade molar também foi avaliada a partir de soluções de EPI de concentração fixa ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$), as quais foram obtidas em solução pré-diluída de HCl 0,05N (pH 1,0); solução tampão fosfato (pH 6,86); e água destilada, que na ocasião do experimento possuía pH 8,0. Todas as medidas de pH foram avaliadas em potenciômetro previamente calibrado para os pHs 4, 7 e 10. As amostras de mesma concentração foram lidas no espectrofotômetro de UV-vis, em triplicata, e seus valores de absorbância em 260 nm registrados.

A linearidade das cuvas foi avaliada em uma ampla faixa de concentração (de 50 a $2600 \mu\text{g.mL}^{-1}$), através do método da regressão linear, efetuado pelo programa Origin Pro8®, que também calculou os valores de R^2 e demais informações sobre a curva. Uma curva a cada dia foi preparada, a partir de soluções concentradas individuais, para averiguar se o comportamento da regressão linear era alterado. Para isso, o coeficiente de variação, em percentual (CV%), do coeficiente angular e das concentrações, foram calculados através do programa Excel (Microsoft®).

A partir dos dados oriundos da varredura das amostras da linearidade, foi o programa Origin Pro8® foi utilizado para cálculo dos valores de segunda derivada. A partir desses dados, identificou-se a região do espectro que responde proporcionalmente à variação da concentração e obteve-se a curva de calibração da segunda derivada.

Visando avaliar se a presença do polímero interfere na leitura da EPI, soluções contendo EPI nas mesmas concentrações foram obtidas, porém utilizando como solvente uma solução de polímero (2% p/v) em tampão pH 6,86. A solução de polímero foi utilizada como linha de base para leitura no espectrofotômetro, que teve a segunda derivada dos seus espectros calculada posteriormente. Os valores da inclinação da reta foram empregados para avaliar os parâmetros da regressão linear e comparar com os dados obtidos tanto pela leitura dos espectros de ordem zero quanto pelos dados obtidos pela amostras contendo polímeros.

Quando necessário, uma análise de variância simples (*One-way ANOVA*) foi empregada para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os resultados, com intervalo de confiança de 95%.

4.4.2 Determinação Espectrofotométrica do pKa

O pKa experimental da EPI foi obtido através do equipamento Sirius T3 com auxílio do programa *SiriusT3Control*®, aplicando-se o procedimento chamado de *Fast UV pKa*®, previamente desenvolvido com base no método de titulação espectrofotométrica (*UVmetric*®) já relatado na literatura (TAM; TAKÁCS-NOVÁK, 2001) e que teve sua confiabilidade comprovada em estudos anteriores (BOX *et al.*, 2003; HOSSAIN, 2014; TAM; TAKÁCS-NOVÁK, 2001). Uma solução 100 mM do protótipo foi preparada em DMSO. Em seguida, 5 µL dessa solução foram retirados e 25 µL de uma solução tampão denominada de *Sirius Neutral Linear UV*® foram adicionados para facilitar a estabilização do pH da solução após cada titulação. Executaram-se três titulações da mesma amostra, sempre do menor pH para o maior, cobrindo uma faixa de pH entre 2 e 12. Como agentes titulantes, foram utilizados o HCl e KOH 0,5 M. As titulações foram executadas em água ultra-purificada. Os espectros de absorção no UV da solução foram monitorados continuamente na amostra a cada titulação por uma sonda de fibra óptica de imersão, realizando-se, desta forma, uma varredura da amostra entre 118 e 1100 nm para construir um gráfico absorvância versus pH e, deste modo, determinar o pKa do protótipo. Os dados coletados foram analisados através do programa *SiriusT3Refine*® e apenas os dados obtidos entre 250 e 275 nm foram incluídos na análise. Os números de valores de pKa foram obtidos com auxílio da análise do *Target Factor Analysis*® (TFA), um recurso

matemático do programa. A temperatura em 25°C e uma atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹ foi mantida durante todo experimento. Os níveis de CO₂ também foram monitorados durante todo o experimento para que não interferissem nos resultados. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4.3 Determinação da Taxa de Dissolução Intrínseca da EPI

A determinação da TDI da EPI foi realizada em dissolutor Vankel 7010, utilizando o aparato de Wood (disco rotatório). A EPI foi submetida à pressão de 15 mPA por 1 minuto (USP NF 37). 100 mg de protótipo foram pesados visando não desintegrar durante a dissolução e foram expostas a uma área superficial de 0,5 cm². Para cada ensaio, três cubas foram preenchidas com 500 mL de solução tampão fosfato pH 6,86 e aquecidas até a temperatura de 37 ± 0,1°C. O procedimento foi realizado sob rotação de 150 rpm. As amostras (3 mL) foram retiradas nos tempos 90, 210, 240, 310, 340, 410, 440, 510, 540, 610, 640, 710 e 740 minutos, sem reposição do meio de dissolução. Devido a baixa absorvidade molar da EPI, esta foi lida em HPLC sem diluição prévia, conforme metodologia proposta por Avancini (AVANCINI *et al.*, 2003). As áreas dos picos foram convertidas em concentração a partir de uma curva de calibração realizada no mesmo dia da análise, contemplando os pontos 6, 12, 40, 80, 100, 150, 200 e 250 µg.mL⁻¹, na qual obteve R² = 0,9983.

A taxa de dissolução intrínseca (TDI) da EPI foi determinada por meio do valor da inclinação da equação (*slope*) das curvas de dissolução intrínseca obtidas por regressão linear a partir dos resultados de dissolução do protótipo, que é expresso em µg/min/cm², e posteriormente convertido para mg/min/cm², unidade mais frequentemente utilizada para caracterização da TDI de fármacos (YU *et al.*, 2002).

4.4.4 Determinação da Concentração de Equilíbrio da EPI

Um frasco de vidro com capacidade para 20 mL, acrescido de uma barra magnética de tamanho fixo foi empregado para todas as dissoluções neste trabalho. Ao frasco de vidro contendo a barra magnética foram adicionados 10 mL de solução tampão fosfato pH 6,86, previamente medidos por uma pipeta volumétrica. O frasco foi introduzido em uma incubadora, que continha em seu interior um agitador magnético, tornando-se capaz de manter todo o sistema sob 37°C e 125 rpm. Ao volume de 10 mL, excesso de EPI (≅ 20 mg) foi adicionado. Alíquotas dessa solução foram retiradas nos tempos 2, 4, 6, 8, 32, 48, 70, 94, 118, 142 e 166 h.

Todas as amostras eram retiradas, rapidamente lidas no espectrofotômetro de UV-visível Cary 50 (Varian®), e devolvidas ao meio de dissolução, para evitar variações de volume. Todas as leituras foram realizadas em varredura, para permitir o emprego da segunda derivada posteriormente. Para todas as análises, foi realizada previamente a leitura do branco (solução tampão fosfato pH 6,86 sem conter a EPI). Para cada dia, foi obtida uma curva de calibração específica, que envolvesse os valores de absorbância obtidos. As dissoluções ocorreram em triplicata, e os coeficientes de variação de cada ponto foram calculados através do software Excel (Microsoft®).

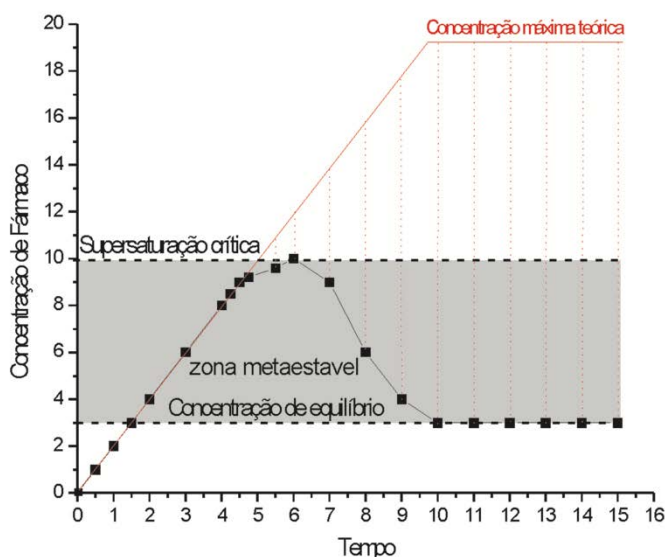
4.4.5 Teste de Infusão

O teste de infusão foi primeiramente empregado por Sun e Lee (SUN; LEE, 2013) para verificar a influência da oferta de droga amorfa na sua capacidade de supersaturação. Aqui, esta metodologia foi empregada com adaptações. Para prover um meio de gerar a supersaturação na EPI, uma solução concentrada do protótipo foi preparada em HCl 0,05 N (65 mg.mL^{-1}). O volume de 0,3 mL dessa solução foi aferida em seringa de plástico BD® com capacidade para 1 mL. Uma agulha fina e curta foi acoplada à seringa, para não permitir a estocagem de volumes significativos. A seringa foi acoplada a um infusor, que pressiona o bulbo em uma razão pré-definida. Na medida que o infusor pressiona o bulbo da seringa, gotas da solução concentrada vão sendo introduzidas em um frasco de vidro com capacidade para 20 mL, contendo 10 mL de solução tampão fosfato pH 6,86. Foram testadas as velocidades de liberação de 0,003; 0,01; 0,03 e $0,3 \text{ mL.min}^{-1}$. Através de um potenciômetro previamente calibrado, garantiu-se a manutenção do pH final da amostra em $6,8 \pm 0,3$. Alíquotas em tempos variados foram coletadas a partir do meio de dissolução para quantificação em espectrofotômetro de UV-visível Cary 50 (Varian®), com retorno da alíquota em seguida. O programa Origin Pro8® foi empregado para calcular a segunda derivada dos espectros obtidos. Foram utilizadas as absorbâncias obtidas em 275 nm. Os perfis de dissolução foram avaliados e comparados utilizando o parâmetro de área sob a curva (AUC) que foi calculado usando a regra do trapézio.

A cinética de cristalização foi obtida a partir da subtração entre a concentração teórica solúvel e a concentração mensurada nos pontos de análise. A Figura 12 ilustra a teoria do cálculo envolvido. Uma reta é traçada respeitando a cinética de liberação, que é governada pela velocidade de gotejamento da solução concentrada no meio de dissolução, programada previamente. Quando os eventos de nucleação e cristalização são iniciados, as concentrações obtidas começam a se afastar da continuidade da reta de dissolução teórica. A diferença entre a

concentração teórica e a concentração mensurada pelo espectrofotômetro é assumida como a quantidade de protótipo precipitada.

Figura 12 - Perfil teórico de concentração versus tempo durante a dissolução e precipitação de fármacos amorfos moderadamente solúveis em água



Fonte: Adaptado de (SUN; LEE, 2013)

4.4.6 Estimativa da Solubilidade da EPI no Estado Amorfo

Para estimar a solubilidade da EPI no estado amorfo, foi aplicado o gráfico de Wilson (SUN; LEE, 2013). Foi traçada uma curva que contempla as concentrações máximas obtidas para cada velocidade de oferta de EPI amorfa *versus* a velocidade de oferta. Na tentativa de linearizar a curva, foi aplicado o logaritmo neperiano nos dois eixos. A inclinação da reta deve substituir o termo α empregado na construção do gráfico de Wilson, que envolve $C_{\max} \times (1/v)^{\alpha}$, onde v é a velocidade de oferta de protótipo, oriunda do teste de dissolução; e $C_{\max}$ é a concentração máxima de protótipo alcançada para cada velocidade de infusão. Uma vez alcançado o gráfico de Wilson, o ponto da reta que toca o eixo y (*intercept*) é a concentração máxima alcançada a uma velocidade de oferta de fármaco amorfa infinita, aqui assumida como a solubilidade do protótipo amorfo.

4.5 OBTENÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS E MISTURAS FÍSICAS

Diversos polímeros foram pré-selecionados para obtenção das dispersões sólidas, tais como: HPMCP, PVPVA, HPMCAS (tipos MF, HF e LF), Eudragit L100-55, HPMC 5E e PVP K-30. Buscou-se obter primeiramente dispersões sólidas contendo 10% p/p de EPI, com composição de solvente aleatoriamente selecionada em função da solubilidade do protótipo e do polímero. Aqueles carreadores que demonstraram aptidão de formar soluções sólidas foram levados adiante para obtenção de maiores percentuais de protótipo, enquanto que foram descartados os polímeros que não conseguiam evitar a cristalização do protótipo. Para todos os testes, as quantidades de EPI e de cada carreador foram rigorosamente pesadas utilizando balança analítica Mettler Toledo® L1339. A EPI e o carreador foram dissolvidos na proporção 40 mg de mistura para cada 1 mL de solvente. As misturas foram agitadas em agitador magnético por tempo suficiente até completa solubilização do protótipo e polímero. As soluções com o carreador e o protótipo foram espalhadas em placas de teflon e os solventes foram removidos por evaporação, sob temperatura específica em detrimento da temperatura de transição vítrea do polímero, sob pressão normal, em estufa convencional por tempo variado. Não mais que $\frac{1}{4}$ da altura da placa foi preenchida. Em seguida, as amostras foram levadas para estufa a vácuo Isotem vacuum (Modelo 280^a), por 6 horas e sob pressão reduzida, para garantir a completa evaporação do solvente. O filme obtido com cada dispersão sólida foi analisado visualmente e/ou microscopia de polarização. As dispersões sólidas resultantes foram trituradas com a presença de nitrogênio líquido, tamisadas em malha de 180 μm , acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas em dessecador sob vácuo com umidade controlada e temperatura ambiente. Para cada um desses sistemas foram obtidas misturas físicas que constistiram da mistura do prototipo e do carreador em proporções pré-definidas, sem a presença do solvente, em recipiente de vidro, por um minuto.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO FINAL DOS SISTEMAS DISPERSOS OBTIDOS

4.6.1 Difração de Raios-X

Os difratogramas do protótipo, dos carreadores, das misturas físicas e dos sistemas dispersos sólidos foram obtidos no difratômetro Miniflex II® (Rigaku®), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo de 5-40° a uma velocidade de

digitalização de $2^{\circ}.\text{min}^{-1}$. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

4.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

Os termogramas do protótipo, dos carreadores, das misturas físicas e das dispersões sólidas foram obtidos em Calorímetro de Varredura DSC Q200[®] (TA instruments[®]), interligado ao software TA60[®] versão 2.20 (TA instruments[®]), com atmosfera de nitrogênio de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de $30\text{--}300^{\circ}\text{C}$. As amostras foram colocadas em porta amostras de alumínio hermeticamente fechados com $5\text{--}10 \text{ mg}$ (± 0.2) de amostra. Este tipo de porta amostra foi utilizado como referência em todas as verificações. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

4.6.3 Microscopia de Polarização

A propriedade da luz polarizada da EPI e dos sistemas dispersos sólidos foi avaliada com auxílio de microscópio Motic BA400[®] (Opti-tech Scientific Inc[®]) equipado com câmera de vídeo Dinoeyepiece[®] acoplada ao programa Dinocapture[®] 2.0. As amostras foram analisadas com ampliação de 4 vezes.

4.6.4 Infravermelho

Os espectros de infravermelho da EPI, dos carreadores, das misturas físicas, e das dispersões sólidas foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer[®] (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de seloneto de zinco. As amostras analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR. Foram obtidas com varreduras de 650 a 4000 cm^{-1} de resolução de 4 cm^{-1} .

4.6.5 Avaliação da Miscibilidade e do Aporte de Solute Limítrofe à Cristalização

4.6.5.1 Parâmetro de solubilidade de Hansen

O parâmetro de solubilidade de Hansen foi definido a partir do bem estabelecido método da contribuição de grupos de Van Krevelen (Van Krevelen e Te Nijenhuis, 2009), que leva em consideração a contribuição de todos os grupamentos químicos contidos nas moléculas do protótipo e dos carreadores, em termos de forças dispersas (δ_d^2), forças polares (δ_p) e energia de ligação de hidrogênio (δ_h). As forças descritas foram calculadas através das equações 7, 8 e 9, respectivamente. Já o parâmetro de solubilidade de Hansen foi calculado de acordo com a equação 10 (HANSEN, 2004; TIAN, Y. *et al.*, 2013).

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V} \quad \text{Eq. 7}$$

$$\delta_p = \frac{\sum F_{pi}^2}{V} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\delta_h = \frac{\sum F_{hi}}{V} \quad \text{Eq. 9}$$

$$\delta_{\text{total}} = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad \text{Eq. 10}$$

Onde F_{di} é o grupo de contribuição das forças dispersas, F_{hi} é o grupo de contribuição da energia das ligações de hidrogênio, F_{pi} é o fator de simetria planar para os grupos polares e V é o volume molar de cada grupo, obtido através do cálculo teórico efetuado pelo programa on-line *Mol Inspiration*, cujo resultado foi incluso na Equação 11.

$$MV = \frac{M}{\rho_s} = \frac{V_s}{1,66} \quad \text{Eq. 11}$$

Onde V_s é o volume estimado da molécula no cristal, ρ_s é a densidade do sólido, M é o peso molecular e MV é o volume molar.

4.6.5.2 Parâmetro de interação de Flory-Huggins

O parâmetro de Interação de Flory-Huggins (χ) foi calculado através do método de depressão do ponto de fusão. Diferentes proporções de protótipo e polímero foram preparadas

como misturas físicas (90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 55:45; e 50:50 de EPI/carreador, p/p). Cinco bolas de vidro foram introduzidas em um frasco de vidro com capacidade para 10 mL contendo 50 mg da mistura, que foi misturada em um agitador vortex por 10 minutos. Aproximadamente 3 – 8 mg de cada mistura física foi pesada e selada em um porta-amostra de alumínio hermeticamente fechado para DSC. Um porta amostra vazio foi empregado como referência. Antes da análise, um porta-amostra vazio era analisado para gerar uma linha de base. As amostras foram analisadas em instrumento DSC (TA Instruments 2010 DSC, Delaware, USA). Amostras e referência foram aquecidas de 30 – 230°C sob razão de aquecimento de 1 °C.min⁻¹ e sob atmosfera de nitrogênio (50 mL.min⁻¹). O valor de χ foi calculado de acordo com a equação 12, onde a inclinação da reta do gráfico linear $(1/T_{m_{mistura}} - 1/T_{m_{puro}}) \times (\Delta H_{fusão} / -R) - \ln(\phi_{subst}) - (1 - 1/m)\phi_{polímero}$ versus $\phi_{polímero}^2$ foi empregado para determinar o valor de χ dentro das condições experimentais.

$$\frac{1}{T_{mistura}} - \frac{1}{T_{puro}} = \frac{R}{\Delta H_{fusão}} \left[\ln \phi_{drug} + \left(1 - \frac{1}{m}\right) \phi_{polímero} + \chi \phi_{polímero}^2 \right] \quad \text{Eq. 12}$$

Onde $T_{mistura}$ e T_{puro} são os pontos de término da fusão observados para EPI (T_{endset}) na mistura e isoladamente, respectivamente, em Kelvin; ΔH_{fus} é a energia envolvida no processo de fusão da EPI, em KJ.mol⁻¹; ϕ_{subst} e $\phi_{polímero}$ são as frações de volume do protótipo e do polímero, respectivamente; m é a razão do volume do polímero em relação ao protótipo e R é a constant universal dos gases, em KJ.mol⁻¹.K⁻¹. Para os sistemas compostos com Eudragit, onde o T_{endset} de fusão é encoberto por outros eventos térmicos, foi empregado a temperatura do pico (T_{pico}).

O cálculo da variação da energia livre de Gibbs para as misturas ($\Delta G_{mistura}$) foi realizado empregando-se a equação 13.

$$\Delta G_{mistura} = RT (\phi_{subs} \ln \phi_{subs} + \frac{\phi_{polímero}}{m} \ln \phi_{polímero} + \chi \phi_{subs} \phi_{polímero}) \quad \text{Eq. 13}$$

Em seguida, calculou-se os valores de χ em função da temperatura T , a partir dos valores que respondiam de forma linear. A partir desses resultados, calculou-se os valores de A e B da equação 14, permitindo assim verificar como o fator χ se comporta em valores de temperatura diferentes dos testados experimentalmente (TIAN, Y. *et al.*, 2013).

$$\chi = A + \frac{B}{T} \quad \text{Eq. 14}$$

Os valores do fator χ para toda a faixa de temperatura avaliada (inclusive aquelas não empregadas no experimento) foram reaplicados na Equação 13 para visualizar o comportamento de ΔG_{mix} em uma ampla faixa de temperatura, em função do aporte de protótipo no sistema. O ponto de cruzamento no eixo x (aporte de protótipo) foi considerada a solubilidade máxima do protótipo no polímero (quando $\Delta G_{\text{mix}} = 0$).

4.6.5.3 Análise do aporte de soluto limítrofe à cristalização

100 mg de dispersão sólida à base de HPMCAS, Eudragit, HPMC e PVP K-30 foram preparadas contendo diferentes quantidades de EPI (10, 20, 30, 40 e 50% p/p) e posteriormente analisadas por microscopia de polarização, na tentativa de evidenciar a formação dos cristais. Em função do aporte de protótipo necessário para cristalizar na dispersão, concentrações intermediárias de protótipo foram obtidas para tornar o resultado mais exato na determinação do aporte limítrofe à cristalização. Os filmes das dispersões sólidas foram avaliados através de microscópio de polarização Motic BA400® (Opi-tech Scientific Inc®), com magnificação de 4x para todas as amostras. Um fundo azul foi empregado para melhor visualização dos cristais de EPI por apresentar a melhor condição de visualização desses cristais devido ao contraste.

4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS

100 mg de dispersão sólida à base de HPMCAS, Eudragit, HPMC e PVP K-30 foram preparadas contendo diferentes quantidades de EPI, sem haver cristalização do protótipo no filme. Um disco dos filmes com diâmetro de 8 mm foi obtido com o auxílio de um punção de biópsia com essas dimensões. O disco de dispersão sólida foi acomodado em lâmina de vidro para microscópio, e foi coberto com uma lamínula. As amostras foram inseridas em dessecador contendo solução saturada de NaCl, que mantinha a umidade relativa do ar em 75%. Todo o conjunto do dessecador foi então deixado dentro de uma incubadora, com temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 0,2$. As amostras foram retiradas do dessecador em tempos pré-determinados para checar, através do microscópio de polarização, se havia ocorrido evento de cristalização durante o período de exposição às condições de estabilidade. Para essa análise, empregou-se microscópio

de polarização Motric BA400[®] (Opi-tech Scientific Inc[®]), com magnificação de 4x para todas as amostras, com fundo azul para melhor visualização dos cristais de EPI.

4.8 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DOS SISTEMAS DISPERSOS SÓLIDOS OBTIDOS

4.8.1 Avaliação da Influência do Polímero na Concentração de Equilíbrio da EPI

A concentração de equilíbrio da EPI (C_{eq}) na presença de polímero foi calculada a partir da obtenção prévia de soluções de polímero em solução tampão fosfato pH 6,86 nas concentrações 0,5; 0,66; 1 e 2%. Excesso de EPI (≈ 20 mg) foi adicionado à 5 mL dessas soluções. As amostras foram agitadas, com um agitador magnético, por 5 dias, sob temperatura de 37°C, para alcançar a concentração de equilíbrio. As amostras foram filtradas com filtro millipore[®] e analisadas em espectrofotômetro na região do UV-visível Cary 50 (Varian[®]), em 260 nm. A análise foi realizada em quadruplicata. Cada solução de polímero sem a EPI foi utilizada como linha de base.

4.8.2 Perfil de Dissolução sob Condição Não-sink

Os perfis de dissolução das dispersões sólidas obtidas foram comparadas ao perfil de dissolução da EPI cristalina e das mistura física EPI:polímero contendo a menor proporção de protótipo (10%). Um frasco de vidro com capacidade para 20 mL, acrescido de uma barra magnética de tamanho fixo foi empregado para todas as dissoluções neste trabalho. Ao frasco de vidro contendo a barra magnética foram adicionados 10 mL de solução tampão fosfato pH 6,86, previamente medidos por uma pipeta volumétrica. O frasco foi introduzido em uma incubadora, que continha em seu interior um agitador magnético, tornando-se capaz de manter todo o sistema sob 37°C e 125 rpm. Visando avaliar a performance verdadeira de cada sistema de dispersão sólida, a condição sink não foi mantida durante esse experimento para visualização da extensão da fase supersaturada e dos eventos de nucleação e cristalização, que comumente ocorrem quando um soluto amorfo se encontra dentro de um volume finito, semelhante a situação provavelmente encontrada no fluido do TGI. Para tanto, o índice sink, definido como $IS = C_s V / \text{Dose}$ foi empregado aqui para caracterizar o quão distante da condição sink encontra-se o experimento, onde C_s é a solubilidade de equilíbrio do protótipo cristalino, V é o volume

do meio de dissolução e “Dose” é a quantidade total de protótipo empregada no ensaio. Aqui, um IS = 0,3 foi empregado para avaliar a dissolução das dispersões sólidas a base de Eudragit L100-55, enquanto que um IS = 0,1 foi empregado para avaliar a dissolução das dispersões sólidas a base de HPMCAS e PVP K-30. Os valores de SI considerados aqui empregam a concentração de equilíbrio do protótipo em solução tampão fosfato pH 6,86, sem a presença de polímero. Os perfis de dissolução foram obtidos em triplicata. Alíquotas da amostra eram retiradas em função do tempo, para leitura em espectrofotômetro na região do UV-visível Cary 50 (Varian®), e devolvidas ao meio de dissolução. Para retirar os interferentes da presença de partículas, empregou-se o cálculo da segunda derivada, com leitura da absorbância em 275 nm, com o auxílio do programa Origin Pro8. Os valores de média e desvio padrão (%) foram calculados com o auxílio do programa Excel (Microsoft®).

4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade das dispersões sólidas a base de HPMCAS e PVP K-30 foi realizado de acordo com as condições de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2$ / 75% UR ± 5). As amostras foram armazenadas em dessecadores selados contendo solução de cloreto de sódio saturada (UR = 75%), que foram inseridos em incubadora de temperatura programável (40°C). A análise ocorreu nos tempos 7 dias (apenas observacional), 15, 30, 60 e 90 dias (estudo de dissolução e avaliação do DRX).

Apenas o estudo de dissolução empregado para avaliar a estabilidade das amostras foi realizado sob IS = 1,625, o que representa uma concentração máxima de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, considerada aqui como 100%. As amostras coletadas foram lidas em espectrofotômetro na região do UV-visível Cary 50 (Varian®), com rápida devolução ao meio de dissolução. Para limpar a interferência de possíveis partículas, a segunda derivada foi empregada, com leitura em 275 nm. As curvas de calibração foram analisadas no programa Origin Pro8®. As dissoluções foram realizadas em triplicata, e as quantificações mensuradas em curva de calibração do dia. Os valores das médias e coeficientes de variação foram obtidos com o programa Excel (Microsoft®). Em função do tempo, as mesmas amostras foram avaliadas por DRX e microscopia de polarização, nas mesmas condições empregadas para a caracterização das dispersões sólidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

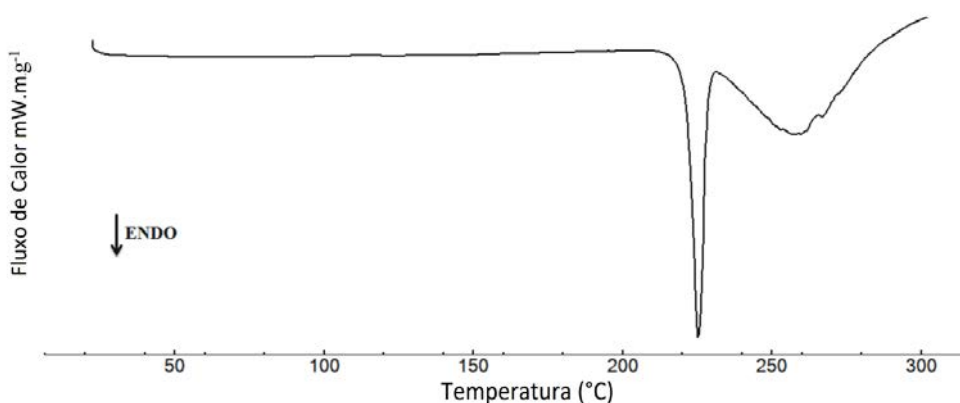
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA EPIISOPILLOTURINA

5.1.1 Caracterização da EPI no Estado Sólido

5.1.1.1 Análise térmica

O perfil térmico dos cristais de EPI foi determinado a partir do somatório de informações obtidas através das curvas DSC e TG/DTG. Assim, o pico endotérmico agudo evidenciado na curva DSC (Figura 13), com faixa de fusão de 221,72 a 228,24°C ($\Delta E = -148,75 \text{ J.g}^{-1}$), está em concordância com os estudos anteriores realizados por Vêras e colaboradores (VÉRAS *et al.*, 2013).

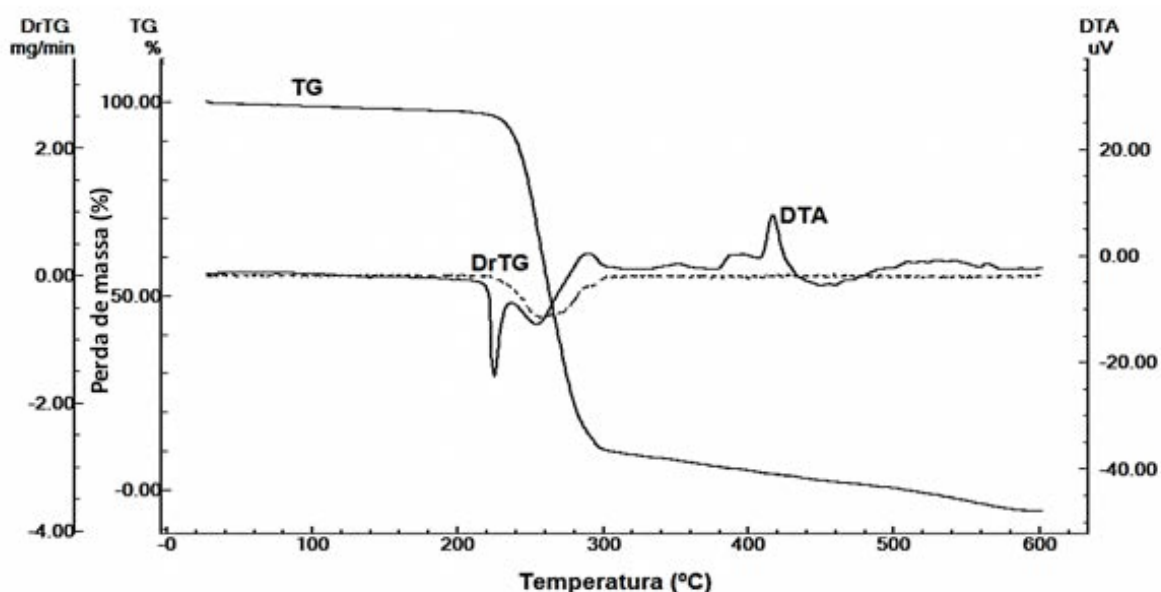
Figura 13 - Curva DSC da EPI, sob razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min^{-1} .



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Adicionalmente, as curvas TG/DTG obtidas (Figura 14) demonstram que a degradação do protótipo se inicia em aproximadamente 224 °C, com perda de massa (Δm) de 79,27%, antes mesmo de finalizar o evento referente a fusão da EPI evidenciado no DSC. Deste modo, pode-se identificar a faixa de temperatura na qual o protótipo apresenta-se termicamente estável.

Figura 14 - Curva TG, DTG e DTA da EPI, sob razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Uma vez que as curvas TG apresentaram variação de massa, foi possível calcular a cinética de degradação térmica não isotérmica da EPI aplicando-se o modelo de Ozawa (COSTA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2015; VIANA *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2013). Vieira e colaboradores (2013) destacam a importância do conhecimento acerca das propriedades de decomposição térmica de fármacos e excipientes, pois, este compreende um dos requisitos para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, uma vez que determinam parâmetros de grande interesse para avaliação de sua estabilidade.

A partir dos ensaios da análise cinética obtiveram-se as curvas TG (Figura 15) que proporcionaram a correlação de $\log A \times 10^3 \text{ K}^{-1}$ (Figura 16a), a partir do modelo proposto por Ozawa em 1965. Assim, foi possível a obtenção do gráfico $G(x)$ versus tempo reduzido (min) (Figura 16b), onde através deste foram calculados os parâmetros cinéticos: energia de ativação (E_a) de $88,95\text{ kJ}.\text{mol}^{-1}$ e fator frequência (A) de $1,165 \times 10^8\text{ min}^{-1}$. A ordem de reação foi estimada de acordo com a linearidade da reta obtida para o gráfico $G(x)$ versus o tempo reduzido (Tabela 2), o que demonstrou ser uma reação de primeira ordem, caracterizada pela independência da velocidade da reação com a concentração do substrato

Figura 15 - Curvas TG da EPI nas diferentes razões de aquecimentos (2,5; 5; 10; 20 e 40° C), sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹

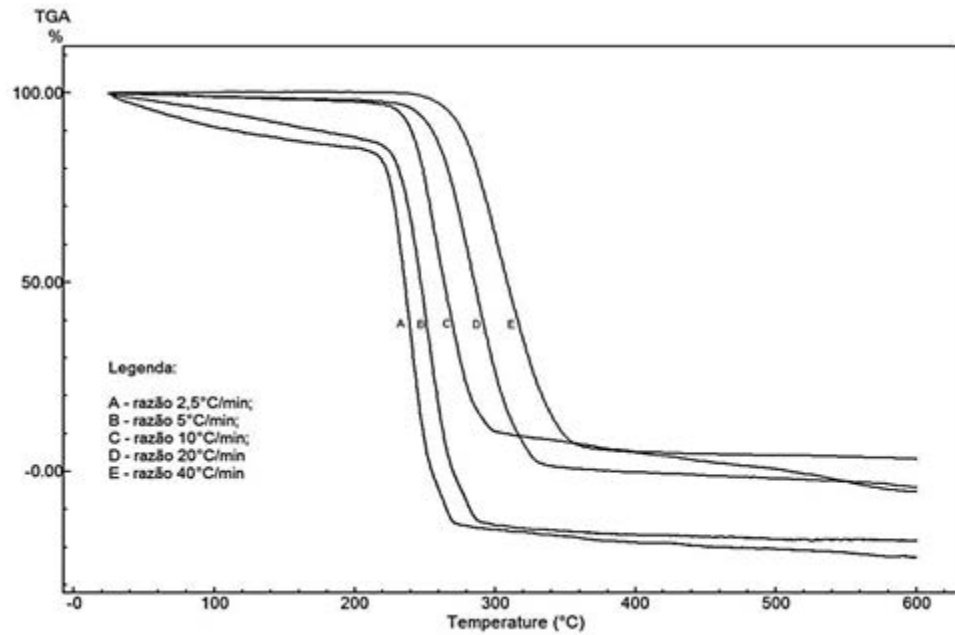
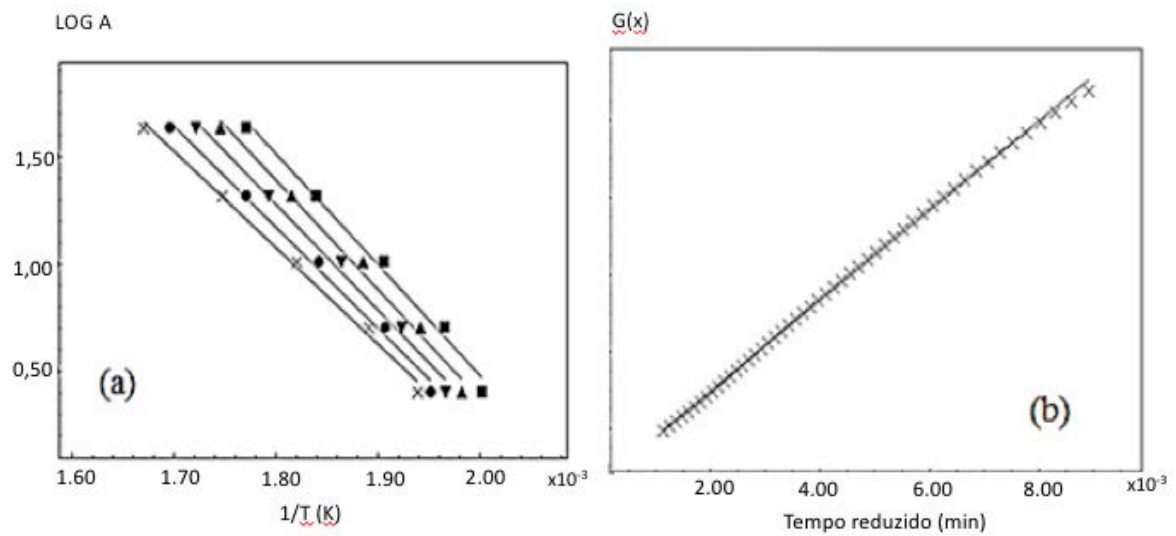


Figura 16 - a) Gráfico log A vs. K⁻¹; b) Gráfico da função G(x) vs. Inverso da temperatura de EPI



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Tabela 2- Linearidade das diferentes ordens de reação da cinética de degradação da EPI

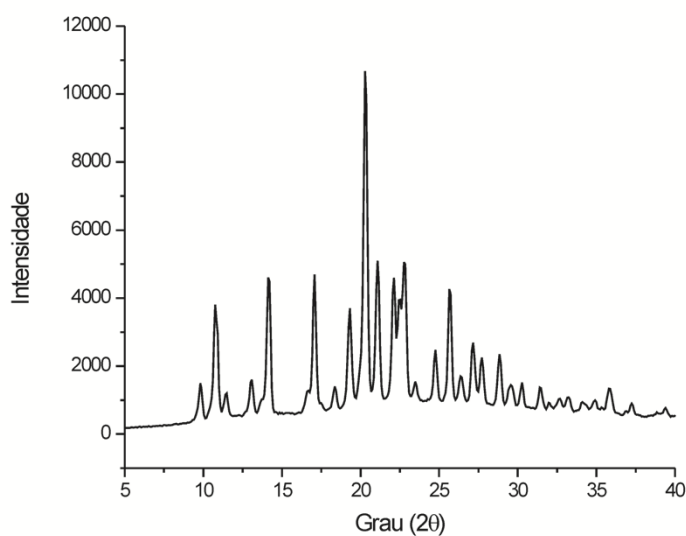
Ordem da reação		Parâmetros					r^2
0	G(x)	0,14	0,28	0,44	0,56	0,65	0,9728
	TR	0,26	0,4	0,59	0,78	1	
1 ^a	G(x)	0,17	0,32	0,58	0,81	1,02	0,9961
	TR	0,26	0,4	0,59	0,78	1	
2 ^a	G(x)	0,18	0,35	0,78	1,26	1,87	0,9878
	TR	0,26	0,4	0,59	0,78	1	

Fonte: dados da pesquisa (2017).

5.1.1.2 Difração de raios-X

De acordo com o difratograma (Figura 17), a EPI apresenta vários picos bem definidos, dos quais são principais aqueles expressos em: 10,76; 14,12; 17,08; 20,28; 21,08; 22,12; 22,84; e 25,64° 2 θ ; característicos de material cristalino.

Figura 17- Difratograma de Raios-X da EPI

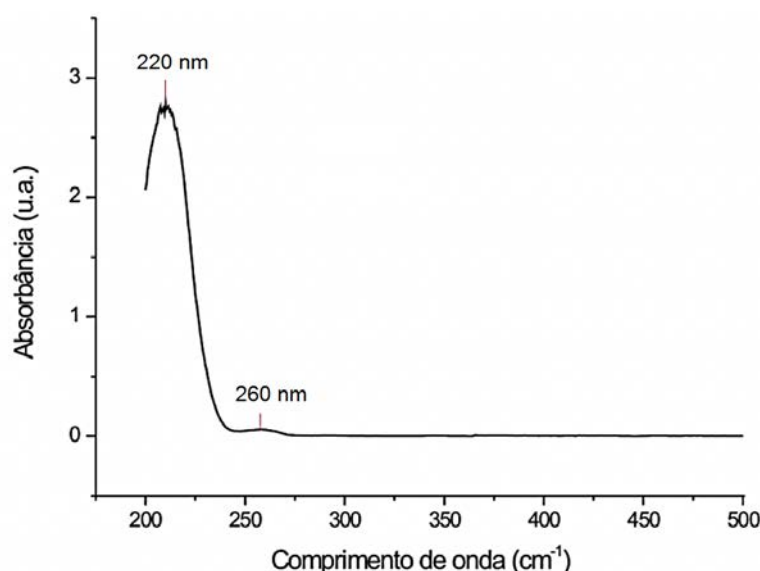


Fonte: dados da pesquisa (2017).

5.1.2 Caracterização da EPI em Solução Aquosa

No presente estudo, a quantificação da EPI em solução pode ser realizada tanto a partir do CLAE, com detecção em 216 nm (AVANCINI *et al.*, 2003; VÉRAS *et al.*, 2013) quanto por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV). O método por UV foi empregado devido a sua conveniência e acurácia, além de não ter sido reportado na literatura antes. Como apresentado na Figura 18, o espectro de ultravioleta da EPI exhibe máximos de absorção em 220 e 260 nm. Trata-se de um espectro típico dos alcalóides tiazolidínicos, reportado por Sangster e Stuart (SANGSTER; STUART, 1964), que é caracterizado por uma banda muito intensa em torno de 190-220 e uma outra banda pouco expressiva em torno de 230-260 nm. Entretanto, a posição da primeira banda de absorção está muito próxima do limite mínimo de comprimento de onda do UV próximo, onde algumas moléculas da atmosfera (como o óxido de carbono) também passam a exibir absorção característica, dificultando seu uso para quantificação do protótipo (PERAL; GALLEGO, 2000). Por outro lado, apesar de a segunda banda de absorção não ser tão forte, ela permanece sendo uma alternativa viável para quantificação da EPI.

Figura 18– Espectro de UV típico da EPI.



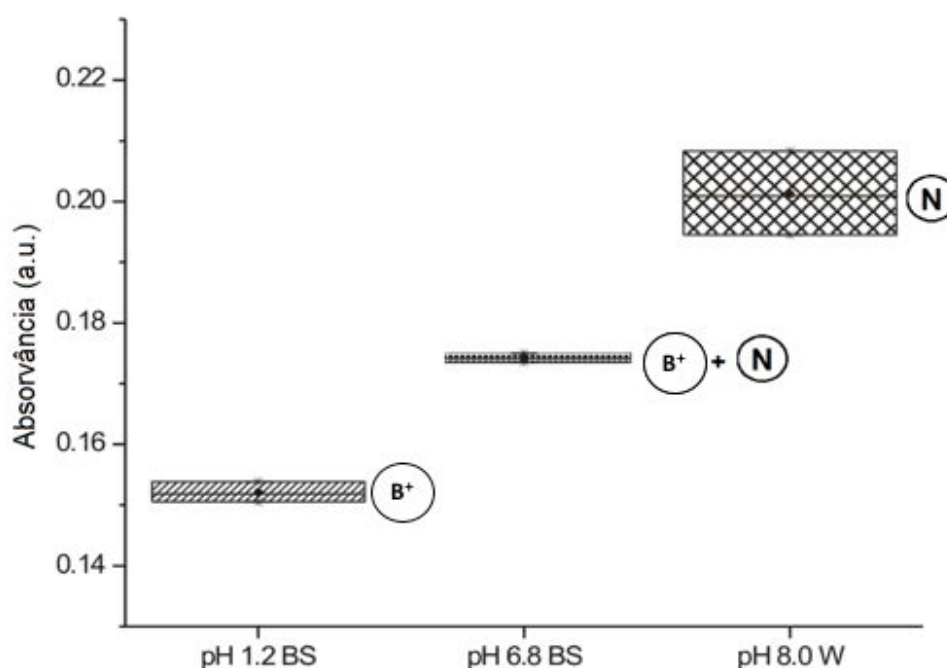
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Baseando-se na lei de Lambert-Beer, a absorvidade molar (ϵ) da EPI nos dois comprimentos de onda podem ser avaliados a partir de uma curva de calibração correspondente.

Os dados mostram que ε_{220} é, ao menos, 20 vezes maior que ε_{260} , sugerindo assim que um comprimento de onda mais baixo (220 nm) pode ser mais interessante para quantificação de baixas concentrações de EPI, já que é capaz de gerar valores de absorvância mais detectáveis a baixas concentrações, enquanto que para um comprimento de onda mais alto (260 nm), os valores de absorvância correspondentes são próximos ou inferiores ao limite mínimo aceitável da faixa de absorvância.

Peral e Galego (PERAL; GALLEGO, 2000) previamente reportaram a influência da concentração e do pH do meio dos valores de absorvidade molar envolvendo anéis imidazólicos e seus derivados (em 200 nm), grupo químico presente na molécula de EPI. A Figura 19 mostra que o pH do meio também interfere no ε da EPI, através do seu efeito no grau de ionização do protótipo, em que os resultados da absorvidade molar aumentam com o pH superior ao valor do pKa da base fraca EPI (ver adiante).

Figura 19 - Influência do pH na absorvidade molar da EPI ($p < 0,05$) em 260 nm, para uma concentração fixa de EPI de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$.



Fonte: dados da pesquisa (2017). BS = Solução tampão; W = água destilada; (B⁺) EPI ionizada; (N) EPI não-ionizada. Significância estatística considerada em um intervalo de confiança de 95% ($n = 3$).

Os autores demonstraram um efeito hipocrômico quando em baixo comprimento de onda, como uma função da concentração do anel imidazólico, entretanto, esse fenômeno não foi evidenciado para EPI. Como reportado por esses autores, o efeito foi muito mais pronunciado em

comprimento de onda igual ou inferior a 195 nm, e é menos detectável em comprimentos de onda superiores. Neste estudo, não há evidências para um efeito hipocrômico tanto em 220 quanto em 260 nm.

As leituras em 220 nm mostram o aumento da absorbância em função do aumento da concentração da amostra, entretanto, o comportamento não é linear. Em contraste, a linearidade é observada em 260 nm ($R^2 = 0.997$ e 0.999 para soluções de EPI em solução tampão pH 6,8 e 1,2, respectivamente). Baseando-se nessas curvas de regressão linear e na lei de Lambert Beer, a faixa de quantificação ótima em solução tampão pH 6,8 inicia com a concentração de $193 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e se estende até o limite de sua solubilidade em água. Assim, apesar de o aumento do pH repercutir em aumento da absorvidade molar, a solubilidade da EPI nesse meio é limitante. Por outro lado, apesar de essa limitação de solubilidade não acontecer para pHs baixos (ácidos), já que o protótipo apresenta-se livremente solúvel, uma concentração muito alta de EPI é requerida (em torno de $456,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para alcançar a absorbância de 0,2.

Uma alternativa para contornar a limitação da solubilidade em pH 6,8 e alcançar concentrações mais altas foi alcançada através do preparo de uma solução estoque em ácido clorídrico (HCl 0.05 M) com subsequente diluição em solução tampão pH 6,8. A partir desse método, os valores de absorbância em 260 nm respondem de maneira linear à variação da concentração ($r^2 > 0.99$), além de apresentar-se reprodutível dentro da faixa de concentração testada (de 40 a $2600 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 3). É importante notar aqui que a absorbância da EPI continua se apresentando linear e reprodutível mesmo quando a resposta é inferior àquela preconizada como mínima por Lambert-Beer, permitindo quantificações precisas e exatas a partir de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 3– Coeficiente de variação (%) alcaçado a partir das curvas de calibração (interdias) e inclinação da reta (interdias).

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância								slope
	50	60	80	90	130	650	1300	2600	
Dia 1	0.0096	0.0136	0.0279	0.0356	0.066	0.345	0.728	1.421	5.55×10^{-4}
Dia 2	0.0101	0.0126	0.026	0.036	0.063	0.355	0.723	1.425	5.44×10^{-4}
Dia 3	0.0093	0.0134	0.0268	0.0373	0.064	0.346	0.711	1.395	5.56×10^{-4}
Media	0.0096	0.0132	0.0269	0.0363	0.064	0.349	0.721	1.422	5.51×10^{-4}
CV (%)	4.1808	4.0087	3.5462	2.4485	2.177	1.575	1.284	1.154	1.2069

Fonte: dados da pesquisa (2017).

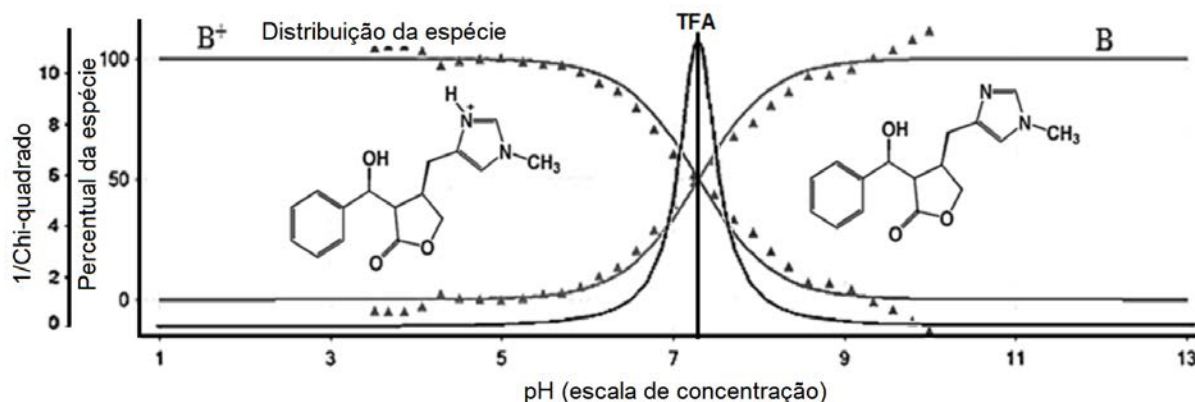
Devido a ausência de método de quantificação por espectrofotometria por UV-vis para alcalóides, os resultados obtidos aqui tornam-se uma alternativa importante para quantificação deste protótipo, pois permite quantificá-lo de forma mais prática e econômica. Apesar disso, um método de análise para quantificação de EPI por HPLC já foi reportado (AVANCINI *et al.*, 2003; VÉRAS *et al.*, 2013), onde a detecção foi realizada em 216 nm, um comprimento de onda que apresentou resultado não-linear por UV-vis como já mencionado.

Adicionalmente, no tocante ao desenvolvimento de sistemas amorfos, é sabido que as quantificações vão envolver a presença de partículas insolúveis, oriundas do processo de precipitação durante o ensaio de dissolução. A presença de partículas insolúveis podem levar ao espalhamento de luz, causando interferência na leitura e, conseqüentemente, perda de acurácia na determinação da concentração. Nesse sentido, a segunda derivada do espectrofotômetro da região do UV-vis foi aplicada para averiguar a possibilidade de minimizar a interferência do espalhamento de luz a partir das partículas suspensas na solução, alcançando assim um resultado mais preciso. Nesse estudo, a eficiência da segunda derivada no método de UV foi testada comparando o espectro de UV de uma solução límpida de EPI com soluções de EPI de mesma concentração, na presença de polímeros parcialmente solúveis, tais como HPMCAS e Eudragit L 100-55.

Nessas situações, EPI foi quantificada a partir da segunda derivada das absorbâncias, cuja absorbância máxima foi adotada em 275 nm. Os resultados mostram uma curva de calibração linear com coeficientes (r^2) de 0,9966; 0,9964; e 0,9966 para solução límpida de EPI; solução de EPI e HPMCAS; e solução de EPI e Eudragit L 100-55, respectivamente. Os fatores de resposta da EPI, determinados a partir das inclinações das curvas lineares (com ou sem o efeito de espalhamento) foram $3,98 \times 10^{-6}$, $4,18 \times 10^{-6}$ and $3,98 \times 10^{-6}$ ($\text{abs} \times \text{nm}^{-2} \times \mu\text{g.mL}^{-1}$) ($p > 0,05$, $n = 3$), respectivamente, demonstrando mais uma vez que o emprego da segunda derivada pode eliminar a interferência spectral causada pelo espalhamento de luz oriundo da interferência de partículas pouco solúveis em água (PATEL *et al.*, 2011).

A partir de quantificações simulâneas da EPI como função do pH no equipamento Sirius T3 (método titulométrico automático), apenas um valor de pKa foi detectado (ou seja, EPI é monotrópica dentro da faixa de pH 2-12). O pico bem definido e intenso “análise do fator *target*” (Target Factor Analysis) representa o pKa da EPI em $7,46 \pm 0,29$ (Figura 20).

Figura 20– Gráfico TFA e curva de distribuição das espécies da EPI.



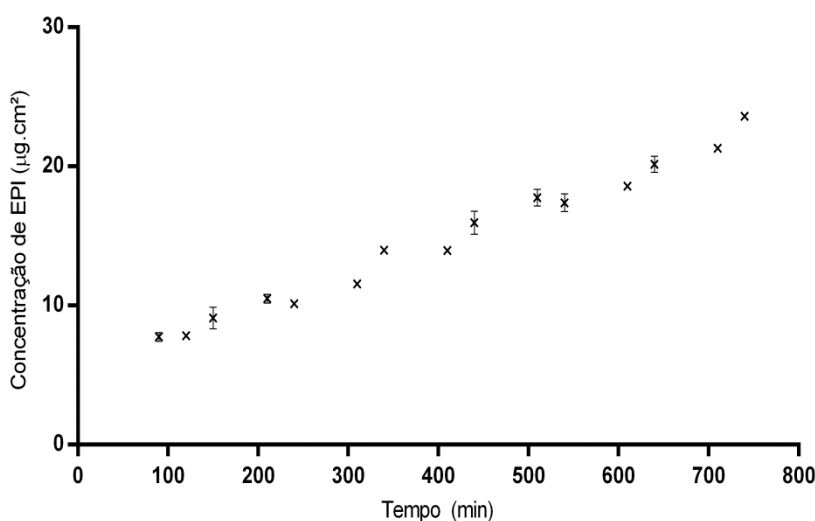
Fonte: dados da pesquisa (2017).

A Figura 20 apresenta que quanto mais inferior for o pH, maior a concentração de moléculas ionizadas, um comportamento característico de bases fracas (formando espécies protonadas, B^+). Assim, uma solução em que o pH é igual ao pKa (Figura 3) B (base livre) e B^+ apresentam-se em igual concentração.

Baseando-se na estrutura molecular do protótipo, seu anel imidazólico é o grupo químico mais favorável à protonação em pH ácido (BLOMBERG; MAURER; RÜTERJANS, 1977; PERAL; GALLEGU, 2000). Adicionalmente, quando há um grupo metil na posição 1 do anel imidazólico, essa ionização deve acontecer na posição 3 do anel (PERAL; GALLEGU, 2000). Esse esquema está de acordo com os resultados obtidos no estudo de absorvidade molar e parece ser coerente.

Buscando compreender a solubilidade aquosa do protótipo considerando a classificação biofarmacêutica, o perfil da dissolução intrínseca da EPI foi obtido (Figura 21). Isso porque Yu e colaboradores (YU *et al.*, 2002) demonstraram uma correlação entre a classificação da solubilidade aquosa de fármacos com a inclinação da reta obtida pelo perfil de dissolução intrínseco. De acordo com os autores, fármacos cuja dissolução intrínseca é igual ou maior que $0,1 \text{ mg/min/cm}^2$ são classificados como altamente solúveis, enquanto que aqueles que apresentam resultado inferior são classificados como pouco solúvel em água, de acordo com a classificação biofarmacêutica. Essa abordagem tem sido extensivamente aplicada na literatura (ISSA; FERRAZ, 2011; YU, LAWRENCE *et al.*, 2004; YU, L X *et al.*, 2002; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

Figura 21 - Perfil de dissolução intrínseca da EPI sob pH 6,8 e velocidade de 150 rpm

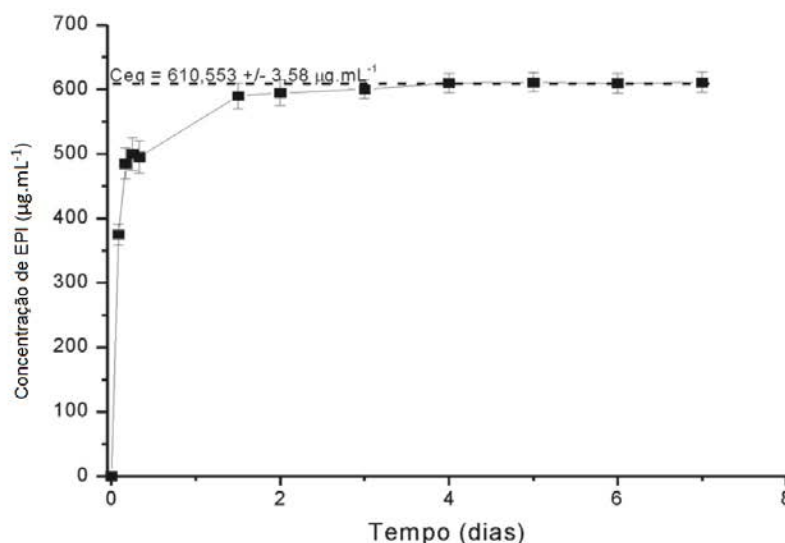


Fonte: dados da pesquisa (2017).

O experimento foi realizado em pH 6,8, visto que, de acordo com a análise do pKa, essa é a região do TGI mais crítica para o protótipo, em termos de solubilidade. Para este perfil, foram obtidos os valores de 0,0232; 5,2471 e 0,98 para os coeficientes angular, linear e de correlação, respectivamente. Já que a TDI pode ser calculada a partir da inclinação da porção linear da reta obtida no estudo de dissolução, a EPI, cuja TDI é de 0,0232 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}^2$, é classificada como pobremente solúvel em água e pode ser enquadrada nas classes 2 ou 4 do sistema de classificação biofarmacêutico, dependendo de sua permeabilidade, de acordo com os parâmetros estabelecidos por Yu e colaboradores (YU *et al.*, 2002).

A dissolução do fármaco cristalino em condição saturável (não sink) foi empregada para verificar a concentração de equilíbrio do protótipo. A condição não sink foi escolhida aqui por ser a condição mais próxima da fisiológica, já que o volume intestinal torna-se finito em detrimento à suposta baixa solubilidade aquosa do protótipo, permitindo assim compreender seu funcionamento dentro do corpo (CRUAÑES *et al.*, 2013). Assim, a Figura 22 apresenta o comportamento da dissolução da EPI em pH 6,8 na condição não sink, durante 7 dias, contendo excesso de EPI. O perfil de dissolução apresenta duas etapas de dissolução: a primeira, em que o protótipo é rapidamente liberado até alcançar a concentração de, aproximadamente, 500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e, a segunda, caracterizada por uma liberação muito lenta que permanece crescente durante alguns dias até alcançar a concentração de equilíbrio de $610,553 \pm 3,5829 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Esse valor de solubilidade permite classificar o protótipo em muito pouco solúvel em água, de acordo com a farmacopéia brasileira (BRASIL, 2010).

Figura 22– Perfil de dissolução da EPI sob condição não-sink e pH 6,8.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Até o momento, é possível inferir que este protótipo apresenta dissolução e dose como fatores críticos para previsão da taxa e extensão de sua absorção oral (TSINMAN *et al.*, 2009). Este resultado sugere a necessidade da utilização de tecnologias a fim de incrementar sua solubilidade aquosa e promover perfis de liberação previsíveis e, consequentemente, eficazes e seguros, por muitas vezes alcançado através do emprego das dispersões sólidas.

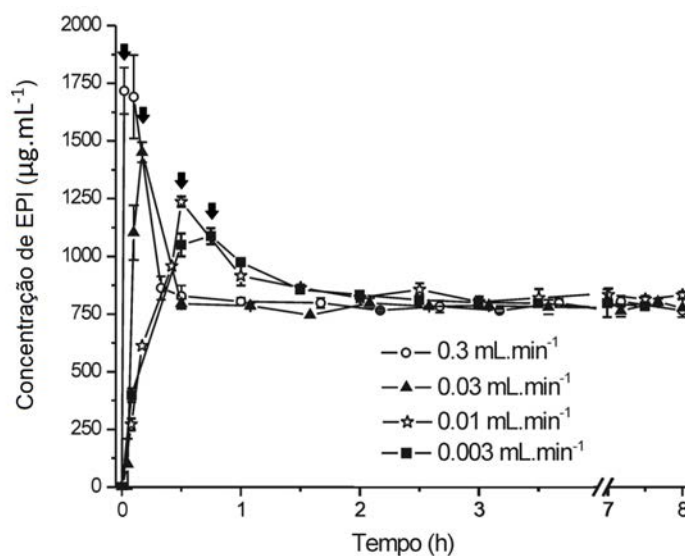
Geralmente, a abordagem dos sistemas dispersos sólidos é baseada na geração da supersaturação, também chamada de “zona metaestável”. De acordo com a teoria de nucleação clássica, o comportamento esperado para uma droga em um meio de supersaturação apresenta, primeiramente, um crescimento gradual da saturação. Uma vez alcançada próxima a concentração de saturação crítica, há a formação de pequenos embriões e núcleos que tornam esse crescimento mais lento, e as taxas de dissolução e precipitação começam a se tornar equivalentes (concentração de saturação crítica). A concentração de saturação crítica foi definida por Sun e Lee (2013) e representa o estado limite de supersaturação sobre o qual uma incontável recristalização ocorre. Em outras palavras, quando o fármaco alcança essa concentração, o processo de cristalização passa a dominar o evento, e um rápido declínio na concentração do fármaco ocorre. Em seguida, a curva concentração versus tempo remanescente é governada pela cinética de cristalização existente e a contínua formação de núcleos.

Uma vez que essa abordagem pode ser aplicada na liberação de fármacos a partir de sistemas amorfo, o experimento de infusão foi realizado para compreender as condições com que isso ocorre para o protótipo. A ideia aqui é mimetizar o fornecimento do protótipo amorfo, como

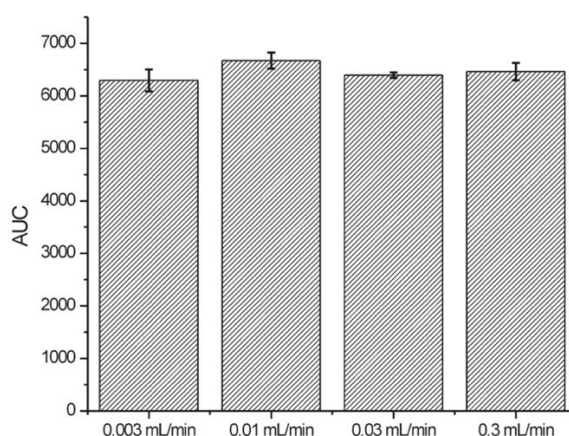
seria a liberação do mesmo a partir de um sistema sólido amorfo. Para isso, uma solução estoque suficientemente concentrada do protótipo foi preparada. A concentração da solução estoque (obtida em solução de HCl 0,05 N) foi definida com base em alguns critérios: 1) a solubilidade do protótipo nesse meio; 2) o volume máximo de ácido suportável pela solução tampão fosfato, visando manter o pH do meio de dissolução em 6,8; 3) na redução da interferência na concentração devido ao aumento de volume; e 4) no valor do índice sink necessário para permitir a visualização dos eventos. Considerando todos esses fatores, foi possível alcançar um $IS = 0,3$ (Figura 23).

Figura 23– a) Comportamento de supersaturação e cristalização da EPI, sob condições não sink ($IS = 0,3$), considerando uma fonte de protótipo amorfa; b) Relação entre AUC e taxa de infusão calculada pelos resultados do teste de infusão.

a)



b)



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Esse experimento traz informações importantes. Primeiramente, nota-se que apesar de ofertado amorfo, o protótipo tende a precipitação quando se depara com o pH básico intestinal. Ou seja, apesar de sua alta solubilidade em pH gástrico, ao alcançar o intestino o protótipo tende a sofrer uma queda abrupta na solubilidade, levando rapidamente aos eventos de nucleação, cristalização e, conseqüentemente, precipitação.

Na primeira situação ($0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), a concentração de saturação crítica é alcançada muito rapidamente, provocando, conseqüentemente, um rápido processo de cristalização e precipitação também, reduzindo drasticamente seu platô de solubilidade, que é entendido como uma solubilidade relativamente estável por um certo período de tempo, superior à concentração de saturação do soluto (região supersaturada). Por outro lado, uma taxa de liberação muito pequena faz com que a taxa de cristalização exerça ação mais pronunciada do que o processo de dissolução, reduzindo também a AUC ($p < 0,05$).

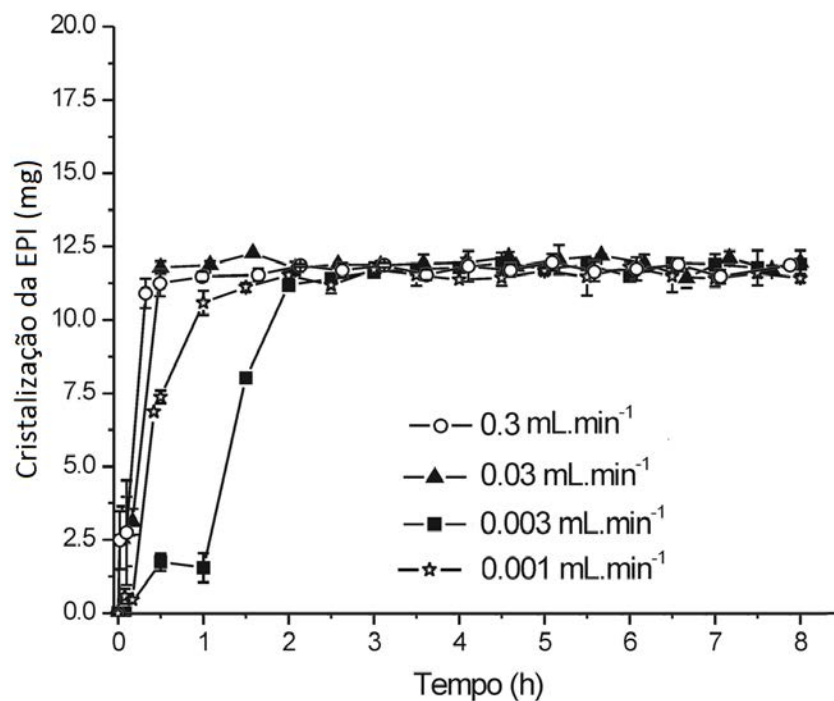
É preciso compreender aqui que, durante todo o período em que o soluto está em contato com o solvente, há uma competição entre o processo de dissolução e o processo de cristalização/precipitação. A depender das características físico-químicas do soluto, um ou outro torna-se mais expressivo, favorecendo assim um desses processos. Pensando assim, uma taxa de dissolução muito rápida garantiria as melhores AUC mas, ao mesmo tempo, alcança mais rapidamente a concentração de saturação crítica. Nota-se, então, que há uma taxa de liberação ótima para cada substância, onde a velocidade de dissolução é a mais alta possível para evitar o alcance precoce da concentração de saturação crítica. Em outras palavras, amplia-se o período de supersaturação do fármaco, aumentando assim consideravelmente a força motriz para transferência e, conseqüentemente, repercutindo na biodisponibilidade.

Para a EPI, a oferta de solução de fármaco a uma velocidade de $0,01 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (30 vezes menor que a velocidade máxima testada), repercute na maior AUC e, portanto, alcança o valor ótimo, sugerindo que esta é a taxa de liberação ótima da EPI a partir das formas farmacêuticas, se não levado em consideração a habilidade do polímero em manter os níveis de supersaturação.

A partir de um cálculo simples confrontando a concentração real de EPI solúvel em cada ponto versus a concentração solúvel teórica (considerando que todo o protótipo existente estaria dissolvido), é possível visualizar como ocorre a cinética de cristalização do protótipo. A partir dessa análise, pode-se afirmar que a cinética de cristalização é variada em função da oferta de protótipo amorfo para o sistema (Figura 24), onde a taxa de infusão mais lenta gera a velocidade de precipitação mais lenta (Tabela 4). Esse comportamento está de acordo com o trabalho de Sun

e Lee (2013), onde afirma que a cinética de cristalização geralmente depende da taxa de geração de supersaturação.

Figura 24 – Perfil cinético da cristalização de EPI, durante o teste de infusão.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Tabela 4– Influência da taxa de liberação da EPI na cinética de cristalização

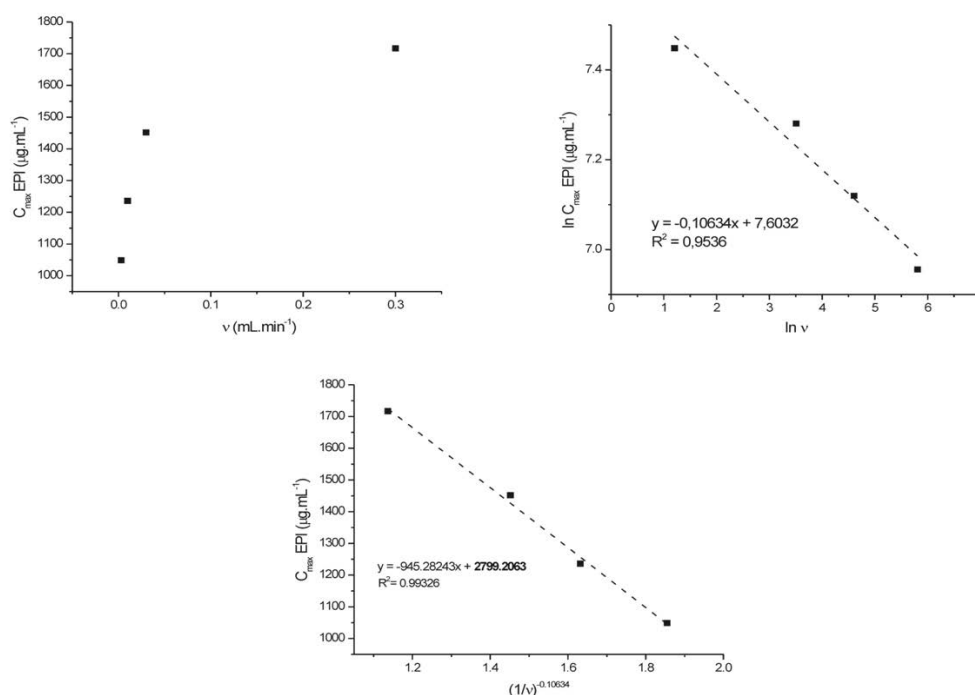
Velocidade (mL.min ⁻¹)	Inclinação da Reta	R ²
0,003	5,5625	0,8898
0,01	22,0733	0,9433
0,03	22,365	0,9596
0,3	31,2301	0,9355

Fonte: dados da pesquisa (2017).

Ainda, o comportamento da concentração máxima alcançada versus a velocidade de liberação do protótipo permite estimar a solubilidade do protótipo amorfo, a partir do cálculo da solubilidade a uma velocidade de liberação infinita, calculada pelo gráfico de Wilson (SUN;

LEE, 2013) (Figura 25), em que v representa a velocidade de liberação da EPI para o meio de dissolução. Assim, a solubilidade do protótipo quando no estado amorfo é estimada em $2,8 \text{ mg.mL}^{-1}$, mais de 4x maior que a solubilidade do protótipo no estado cristalino.

Figura 25 – Aplicação do gráfico de Wilson para estimar a solubilidade da EPI quando no estado amorfo.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Esses resultados demonstram que a obtenção de sistemas amorfos podem ser uma alternativa útil para incrementar a solubilidade aquosa aparente da EPI.

5.2 OBTENÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS

5.2.1 Seleção do Carreador

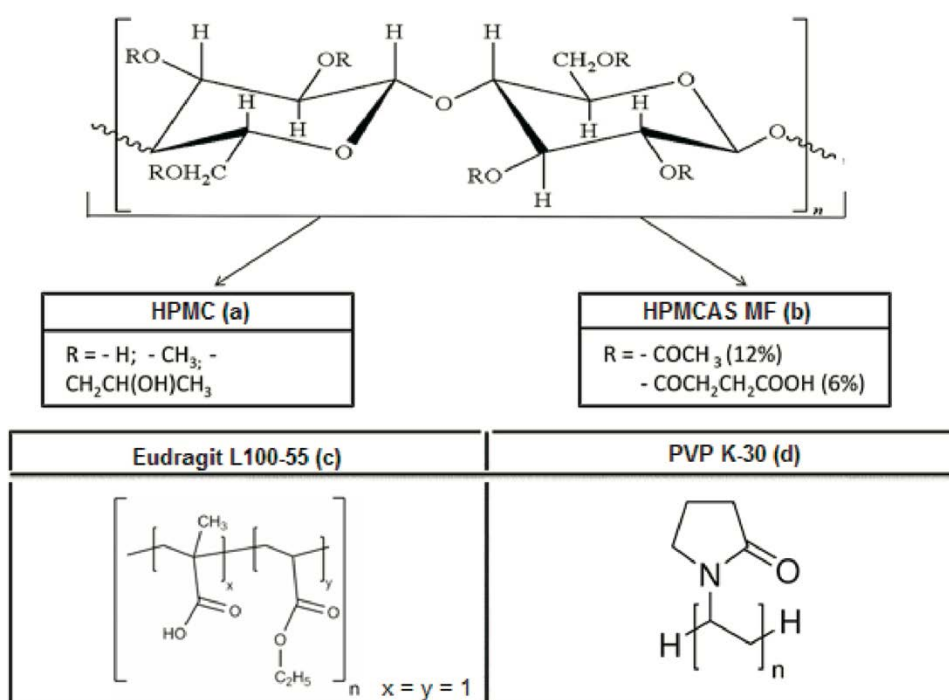
5.2.1.1 Seleção quanto à aplicabilidade no corpo

Como discutido antes, EPI apresenta alta solubilidade em solução aquosa ácida e baixa solubilidade em solução aquosa neutra ou básica. Esse comportamento é associado com sua natureza de base fraca, também demonstrada pelo estudo do pKa. Ainda, o estudo de

precipitação mostrou sua forte tendência à precipitação quando alcançar o lúmen intestinal, o que também acontece com diversas outras substâncias de caráter base fraca (KOSTEWICZ *et al.*, 2014). Essa informação norteia a obtenção dos sistemas amorfos já que, claramente, é no pH em torno de 6,8 que sua cinética de dissolução precisa ser melhorada (pH intestinal). Diante desse cenário, a primeira estratégia a ser aplicada aqui é a seleção de polímeros entéricos para obtenção dos sistemas dispersos sólidos, pois, esses polímeros podem proteger a liberação de EPI no estômago e favorecê-la no intestino, de maneira uniforme, e com sua cinética de dissolução aumentada. Em outras palavras, essa abordagem faz com que o sistema polímero-EPI alcance o intestino de forma intacta permitindo assim a liberação do fármaco apenas no estado amorfo (solubilidade aumentada).

Entretanto, para fins de desenvolvimento de sistemas, polímeros não iônicos também foram inclusos nas análises uma vez que esses sistemas podem sofrer o processo de revestimento gástrico caso apresentem benefícios importantes à cinética de dissolução do protótipo. Assim, dentre as opções de polímero entéricos e neutros, foram selecionadas quatro opções: Hidroxipropilmetilcelulose Acetato Succinato do tipo MF (HPMCAS); Eudragit L100-55; Hidroxipropilmetilcelulose do tipo 5E (HPMC 5E); e Polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) (Figura 26).

Figura 26 - Estruturas moleculares dos polímeros HPMC (a), HPMCAS (b), Eudragit L100-55 (c), e PVP K-30 (d).



Fonte: autoria própria (2017).

Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero não-iônico composto por uma mistura de alquil éter de celulose hidroxialquilo, contendo grupos metoxi e hidroxipropil em diferentes graus de substituição (GIRI *et al.*, 2012; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Apresenta peso molecular variável entre 10.000 e 1.500.000 g.mol⁻¹ e é solúvel em água e misturas de etanol ou metanol com diclorometano (LEUNER; DRESSMAN, 2000). A literatura aponta inúmeros estudos aplicando o HPMC como carreador em sistemas dispersos (NGUYEN *et al.*, 2016; TSUNASHIMA *et al.*, 2016; VERRECK *et al.*, 2003). Em estudos realizados com o alendazol, nilvadipina e benidipina, fármacos pobremente solúveis em água, o HPMC foi capaz de inibir sua recristalização (LEUNER; DRESSMAN, 2000). A depender do tamanho da cadeia polimérica, este polímero pode conferir liberação prolongada (VO; PARK; LEE, 2013), porém, neste trabalho foi selecionado HPMC de baixo peso molecular (HPMC 5E) visando a liberação imediata.

Succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCAS) é um polímero derivado da celulose em que tiveram seus grupos hidroxila substituídos, sobretudo, pelos radicais acetato e succinato. São polímeros comumente utilizados como revestimento entérico para formas farmacêuticas sólidas, pois possuem baixa e alta solubilidade aquosa em pH ácido e neutro/básico, respectivamente (GIRI *et al.*, 2012). Assim, estes polímeros foram selecionados visando alcançar uma liberação retardada do protótipo. Sua alta *Tg*'s promove redução da mobilidade molecular do soluto e incrementa a estabilidade física de dispersões sólidas. Devido a sua propriedade anfifílica, este polímero permite associar fármacos pouco solúveis em água à sua parte lipofílica, enquanto que sua parte hidrofílica facilita a formação de estruturas coloidais não ionizadas hidratadas após a administração oral, inibindo, assim, a formação de cristais do fármaco (CURATOLO; NIGHTINGALE; HERBIG, 2009; XIANG; ANDERSON, 2014). De acordo com Sun, Jun e Lee (SUN; JU; LEE, 2012), dispersões sólidas a base de HPMCAS tem demonstrado ser, através de estudos recentemente encontrados, mais efetivo na manutenção da supersaturação no intestino do que outros polímeros investigados e tem promovido importante aumento da biodisponibilidade, de acordo com estudos *in vivo*.

Eudragit L 100-55 é o nome comercial de um polímero entérico do grupo dos polimetacrilatos. É um polímero aniônico co-polimerizado de ácido metacrilato e ácido metil metacrilato na proporção 1:1. Os polimetacrilatos foram primeiramente empregados na administração oral de cápsulas e como revestimento de comprimidos, devido a sua propriedade de formar filme, que se mantém para o Eudragit L 100-55. Uma vez que este polímero se apresenta solúvel em água a partir do pH 5,0, este tem sido empregado como revestimento

entérico de comprimidos. É solúvel em acetona e álcools (GIRI *et al.*, 2012; LEUNER; DRESSMAN, 2000; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

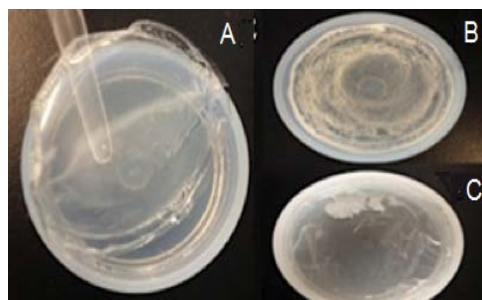
Já a polivinilpirrolidona (PVP) é obtida a partir da polimerização de moléculas de vinilpirrolidona e, a depender da quantidade de monômeros, recebe uma classificação diferente (K-12, K-25, K-30 e K-90, por exemplo). Uma vez que possui boa solubilidade em uma variedade de solventes orgânicos, PVP tem sido empregado na obtenção de dispersões sólidas pelo método do solvente. Devido a sua boa solubilidade em água, suas dispersões sólidas podem aumentar a molhabilidade de moléculas pobremente solúveis em água, aumentando assim sua taxa de dissolução, que varia de performance em função do tamanho da cadeia. PVP possui uma temperatura de transição vítrea (T_g) dependente não só do peso molecular, mas também da umidade relativa do ar (UR) (CURATOLO; NIGHTINGALE; HERBIG, 2009; LEUNER; DRESSMAN, 2000; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

5.2.2 Seleção e Discussão da Metodologia de Obtenção

De acordo com as curvas DSC e TG do protótipo, sua degradação inicia antes do processo de fusão ter finalizado. Assim, qualquer método que emprega calor visando à fusão do protótipo deve ser evitado, como acontece na técnica de *hot melt extrusion* (THIRY *et al.*, 2017). Outra técnica muito bem descrita na literatura é a evaporação do solvente, uma opção que emprega escala de bancada com vistas a ser transposta industrialmente ao *spray-drier*. Essa abordagem tem sido extensamente aplicada na literatura e tem gerado resultados promissores (PARIKH *et al.*, 2015; SINGH; VAN DEN MOOTER, 2016; SUN; JU; LEE, 2012), além de se mostrar completamente aplicável às características físico-químicas da EPI.

Uma variedade de solventes foi selecionada para obter as dispersões sólidas. Essa seleção foi baseada na habilidade de tanto o protótipo quanto o polímero serem solubilizados. Os solventes foram testados individualmente ou em associação, dentre as opções: dicloroetano, etanol, metanol, acetonitrila, clorofórmio, dimetilsulfóxido, dimetilformamida e solução HCl 0,05 N. A seleção do solvente levou em consideração a habilidade em formar um filme completamente transparente, com aporte de protótipo fixo em 10% p/p (Figura 27), o que significa a ausência de cristal à olho nu. Nesse sentido, o Quadro 3 apresenta as decisões finais quanto à seleção da metodologia de obtenção dos sistemas dispersos sólidos.

Figura 27– Aspecto macroscópico dos filmes transparentes.



Fonte: dados da pesquisa (2017). Legenda: A – Filme transparente; B e C – exemplos de precipitação durante o processo de obtenção.

Quadro 3– Metodologia de obtenção final dos sistemas dispersos sólidos.

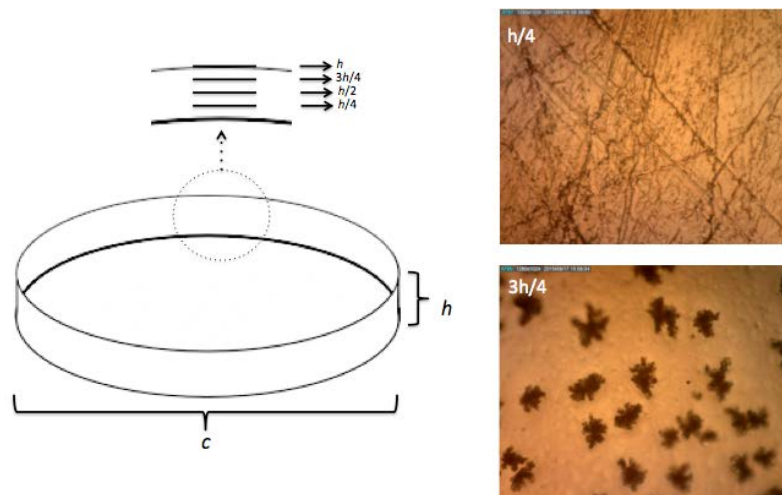
Polímero	Sistema solvente	Temperatura de secagem em estufa de ar circulante/ tempo de secagem
HPMCAS	Acetona/metanol 60:40	70°C/3h
EUDRAGIT L 100-55	DMSO/clorofórmio 1:2	70°C/48h
HPMC E5	DMSO/clorofórmio 1:2	70°C/48h
PVP K-30	HCl 0.5N	70°C/2h

Fonte: dados da pesquisa (2017).

Uma vez que essa metodologia mimetiza o *spray drier*, algumas observações são importantes aqui. A quantidade de solução inserida no disco de teflon e a temperatura de secagem são dois fatores críticos, uma vez que ambos podem alterar a cinética de cristalização do soluto e promover uma dispersão sólida cristalina por erro. Durante a técnica de *spray drier*, a solução do fármaco junto ao carreador é exposta a um compartimento de secagem via *spray*, ou seja, pequenas gotículas de solução são expostas ao ambiente de secagem, o que repercute em um processo de solidificação muito rápido, mantendo assim o soluto na forma amorfa (FRIESEN *et al.*, 2008). A partir desse raciocínio, o volume de solução a ser seco dentro do disco de teflon deve ser aquele mínimo necessário para retirada do filme após seco. Além disso, a temperatura necessita ser a mais alta possível, levando em conta as características físico-químicas do soluto e dos carreadores. Temperaturas próximas à T_g do polímero não parecem ser interessantes, visto que a redução da viscosidade do polímero favorece a mobilidade molecular do soluto, acelerando assim o processo de nucleação e cristalização (CURATOLO; NIGHTINGALE; HERBIG, 2009). Em outras palavras, é desejável obter um processo de secagem a partir de uma camada de filme tão fina quanto as gotas no *spray drier* para obter um

resultado próximo à esta técnica. Esse parâmetro foi testado com as dispersões sólidas à base de HPMCAS e, através dele, nota-se que esse é, de fato, um parâmetro crítico (Figura 28).

Figura 28 – Influência do volume de solução submetido à secagem na cristalização do protótipo.



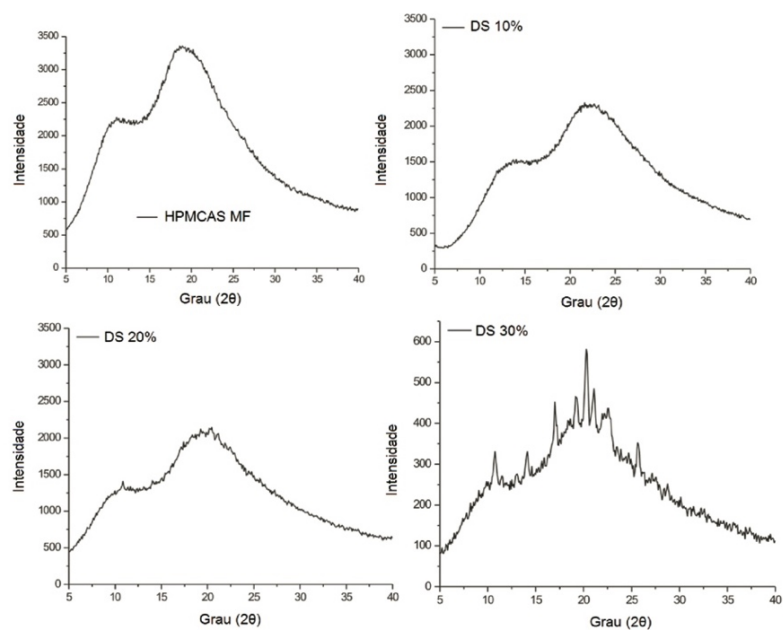
Fonte: dados da pesquisa (2017). A dispersão sólida utilizada para representar essa abordagem foi à base de HPMCAS, contendo 10% p/p de protótipo.

5.2.3. Características Físico-químicas dos Carreadores e Sistemas Dispersos

5.2.3.1 Caracterização do estado sólido final dos sistemas

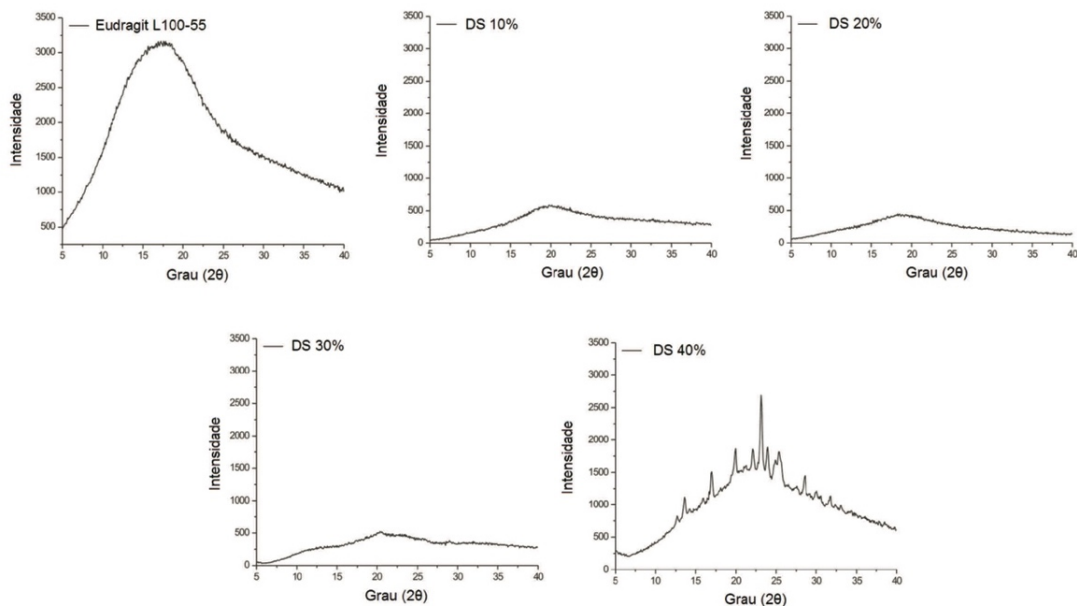
Com o objetivo de identificar o estado sólido final dos sistemas obtidos, foram empregadas três técnicas-chaves que, juntas, permitem esclarecer características físico-químicas importantes. Para todos eles foram empregadas as técnicas DRX, DSC e microscopia de polarização. O difratograma de raios-X do polímero isolado e dos sistemas dispersos são apresentados nas Figuras 29, 30, 31 e 32 para o HPMCAS, Eudragit L100-55, HPMC 5E e PVP K-30, respectivamente. Os difratogramas permitem identificar o aporte de protótipo máximo que permite a obtenção do sistema no estado amorfo. Esse estado é identificado na imagem como uma ou duas bandas largas, com ausência de qualquer pico bem definido. Por outro lado, a presença de picos bem definidos, observados para os sistemas HPMCAS 20 e 30%; Eudragit L 100-55 40%; HPMC 20% e PVP K-30 50%, confirmam que houve cristalização do protótipo durante o processo de preparação dos sistemas. A presença desses picos também acontece no difratograma das misturas físicas com todos os polímeros, desde o aporte de 10% de EPI (Figura 33), demonstrando assim que o processo empregado na obtenção dos sistemas desempenha papel crítico na amorfização do protótipo.

Figura 29– Difrátograma de Raios-X para o polímero HPMCAS-MF e suas dispersões sólidas contendo diferentes percentuais de Epiisopiloturina.



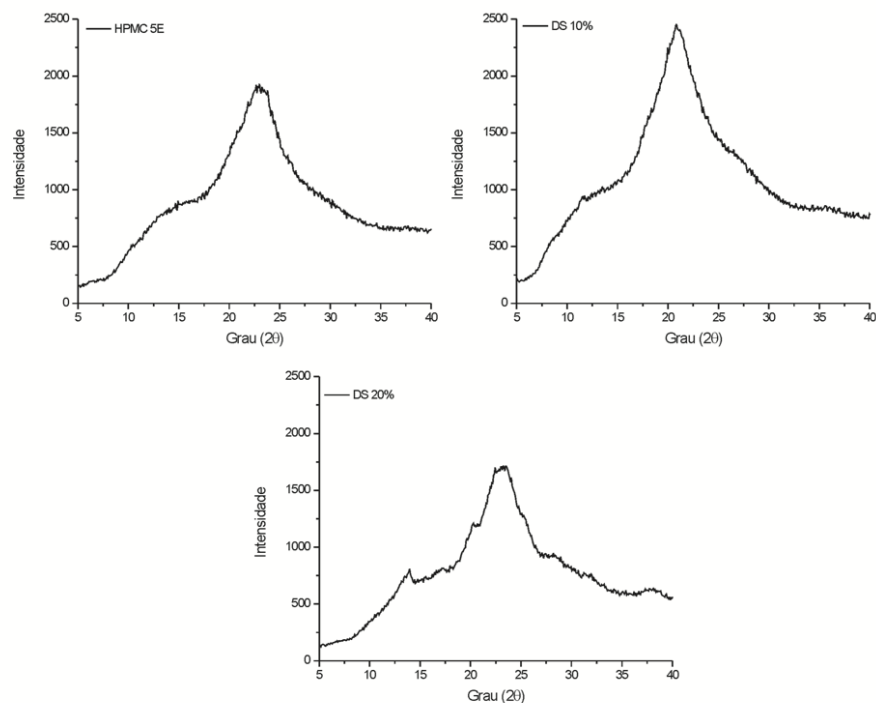
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 30– Difrátograma de Raios-X para o polímero Eudragit L100-55 e suas dispersões sólidas contendo diferentes percentuais de Epiisopiloturina.



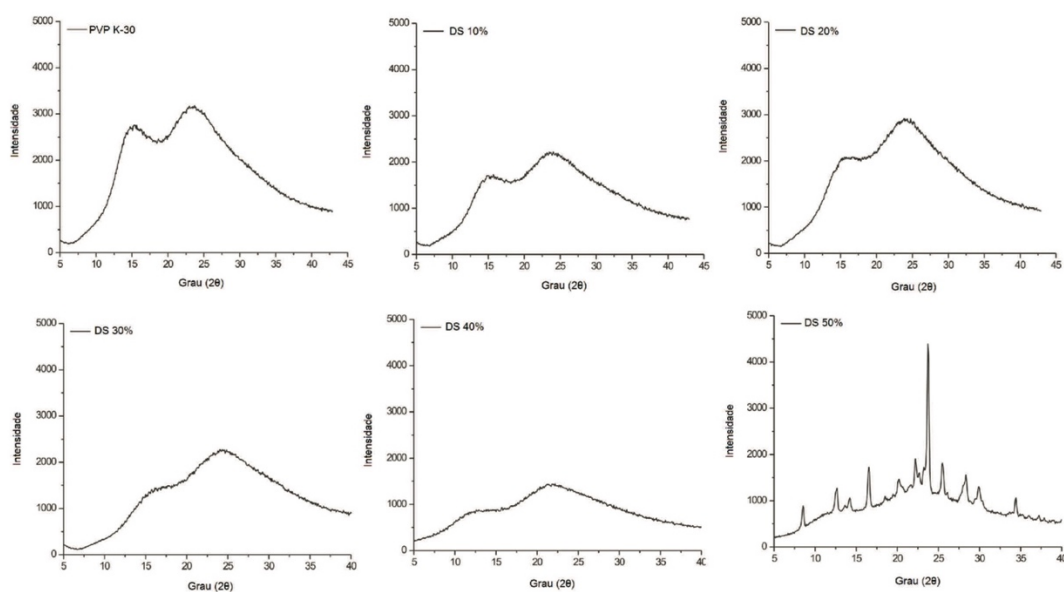
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 31 – Difratoograma de Raios-X para o polímero HPMC 5E e suas dispersões sólidas contendo diferentes percentuais de Epiisopiloturina



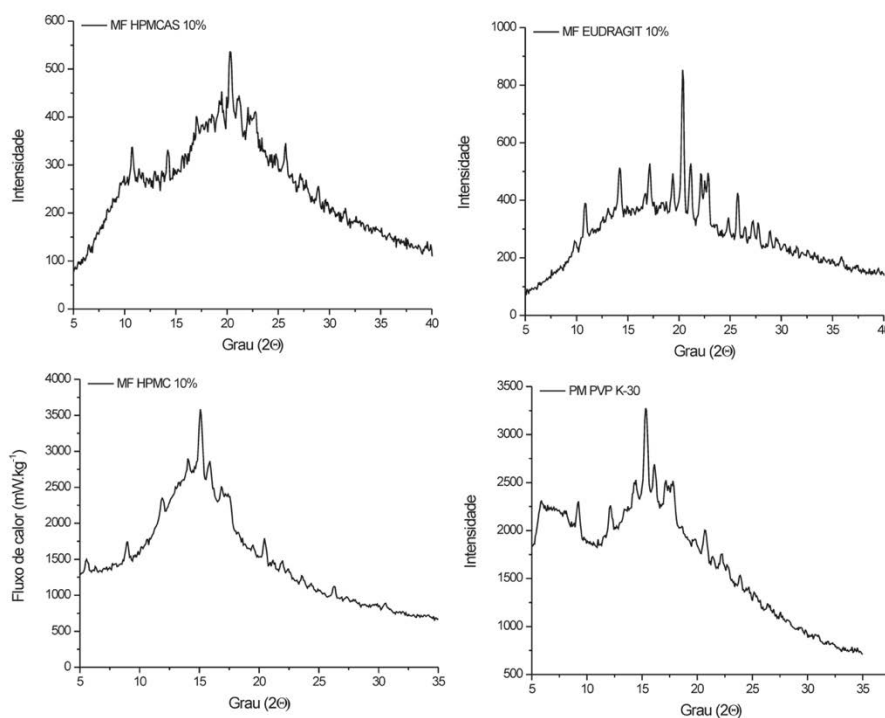
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 32 – Difratoograma de Raios-X para o polímero PVP K-30 e suas dispersões sólidas contendo diferentes percentuais de Epiisopiloturina.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

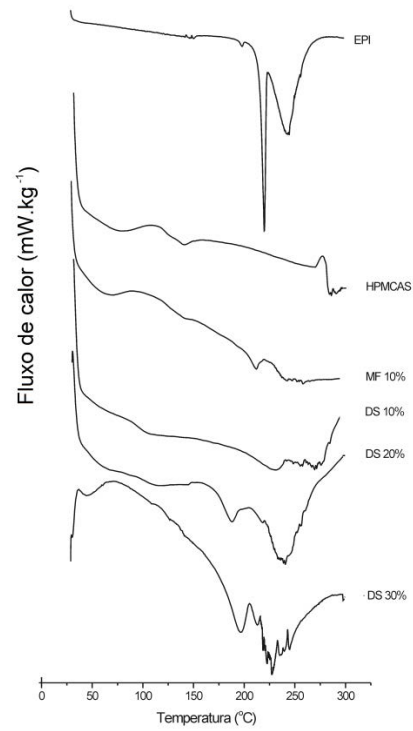
Figura 33– Difratoograma de Raios-X para as misturas físicas compostas por 10% (p/p) de Epiisopiloturina e 90% de HPMCAS-MF ou Eudragit L100-55 ou HPMC 5E ou PVP K-30.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

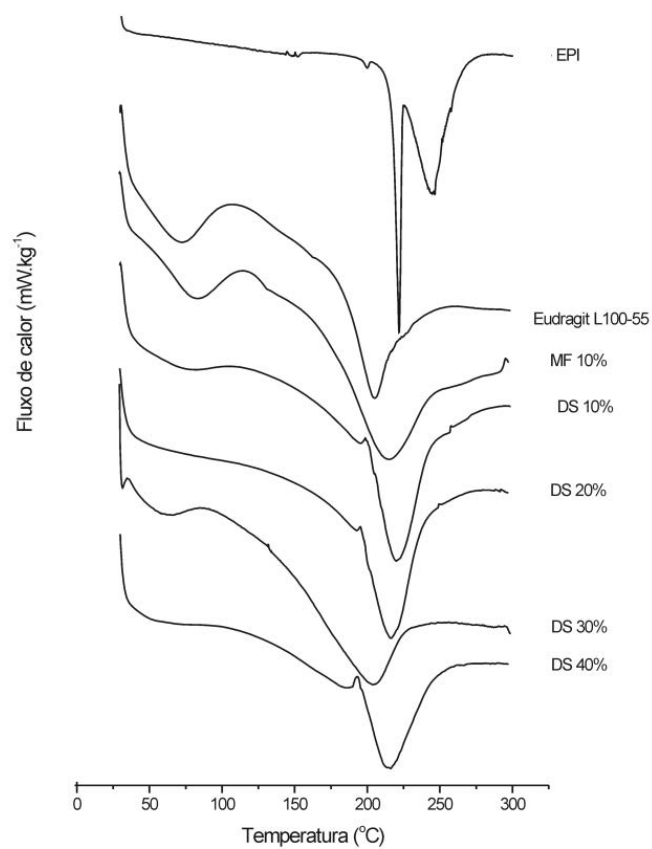
O DSC apresenta resultados ainda mais detalhados que o DRX, devido a maior sensibilidade do equipamento. As curvas DSC para os sistemas dispersos e misturas físicas compostas por diferentes proporções de EPI e HPMCAS, Eudragit, HPMC e PVP K-30 são apresentadas nas Figuras 34, 35, 36 e 37, respectivamente. A partir delas, nota-se que os sistemas dispersos HPMCAS (10%), HPMC (10%) e PVP K-30 (10, 20 e 30%) são sistemas amorfos, devido à completa ausência do pico de fusão, somado ao difratograma amorfo na DRX.

Figura 34– Curvas DSC para a EPI, suas misturas físicas e sistemas dispersos contendo HPMCAS como carreador, em diferentes proporções



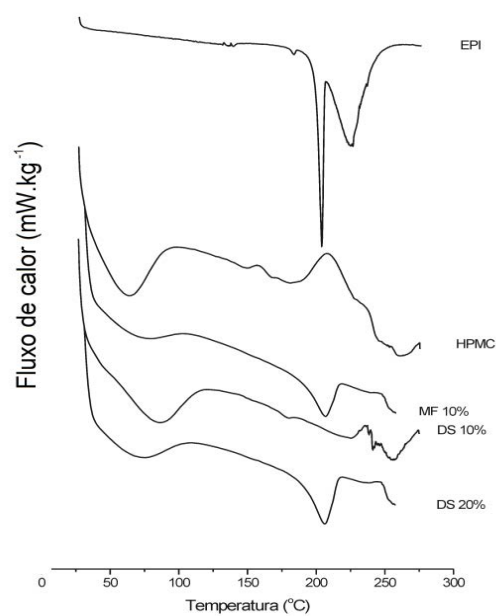
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 35 – Curvas DSC para a EPI, suas misturas físicas e sistemas dispersos contendo Eudragit L100-55 como carreador, em diferentes proporções.



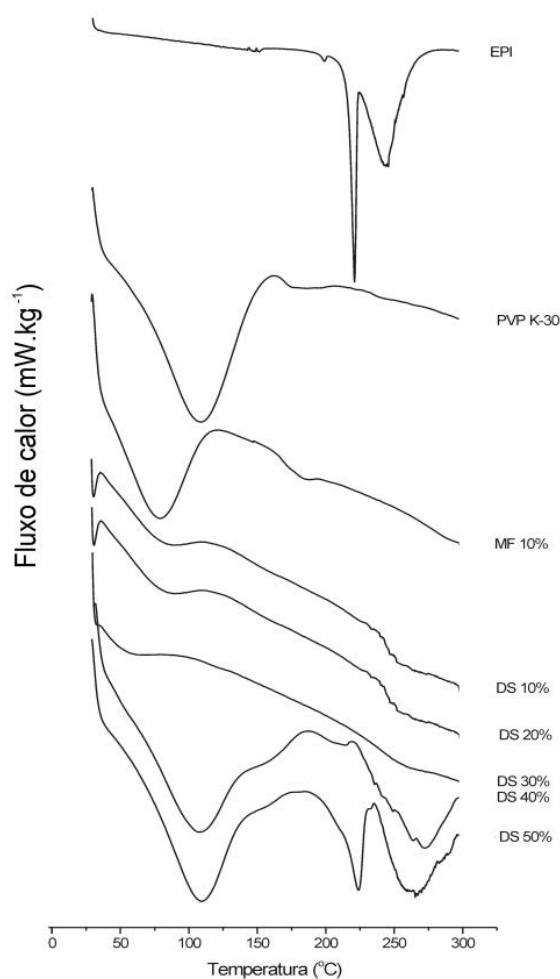
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 36 – Curvas DSC para a EPI, suas misturas físicas e sistemas dispersos contendo HPMC E5 como carreador, em diferentes proporções.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 37 – Curvas DSC para a EPI, suas misturas físicas e sistemas dispersos contendo PVP K-30 como carreador, em diferentes proporções.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

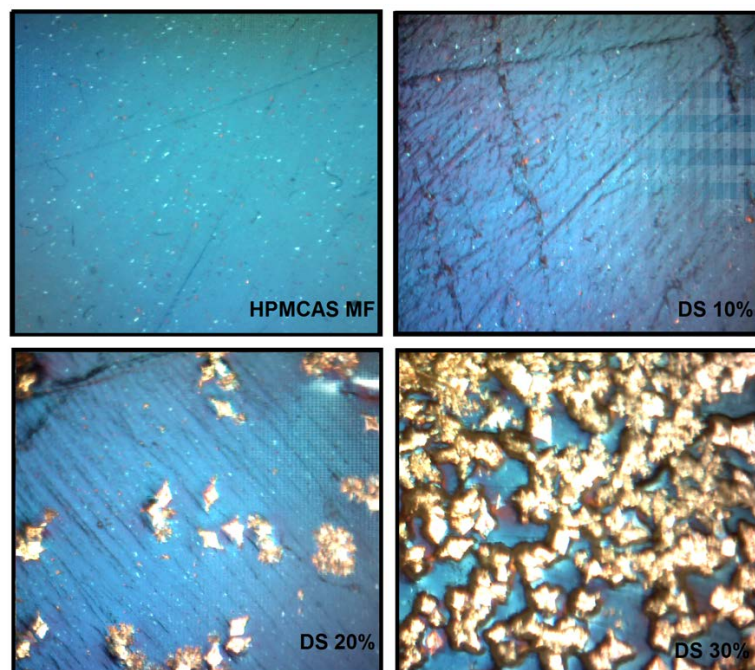
Apesar de a temperatura de transição vítrea do protótipo não ser conhecida, é de se esperar que, em caso de formação de uma única fase, o sistema apresente uma única Tg deslocada para uma região intermediária entre a Tg do polímero e a Tg do protótipo. A DS HPMCAS teve sua Tg antecipada, em relação ao polímero puro, em 25,13; 23,48; e 15,11 °C, para os sistemas com 10, 20 e 30 % de EPI, respectivamente, caracterizando um efeito plastificante do polímero (designado como a capacidade de aumentar a mobilidade de um fármaco na formulação, podendo acelerar sua cristalização). Para os demais sistemas, também foi evidenciado apenas uma Tg, que foi retardada em relação à Tg do polímero isolado: para o sistema composto por Eudragit, a Tg sofre aumento de 15,46; 52,79; 37,5; e 43,15 °C para as DS contendo 10, 20, 30 e 40% de protótipo, respectivamente; para o sistema composto por

HPMC contendo 10% de protótipo, o deslocamento é de 12,23°C; e para o PVP K-30, o deslocamento é de 5,04; 31,3; 34,47; e 27,55°C para as DS contendo 10, 20, 30 e 40% de protótipo, respectivamente. Esse comportamento evidencia o efeito anti-plastificante do polímero nesses sistemas, o que é benéfico à estabilidade física dos mesmos, pois evita a mobilidade molecular e a cristalização.

As curvas DSC dos sistemas compostos por Eudragit L100-55 (Figura 35) deixam a desejar na interpretação, já que o próprio polímero, semi-cristalino, apresenta evento de fusão largo numa região pouco antes da de fusão da EPI. A composição do sistema majoritariamente formada pelo polímero também faz com que o consumo energético da fusão (evento endotérmico) do polímero se sobressaia ao consumo energético de uma possível fração cristalina de protótipo, impedindo assim qualquer conclusão. Ainda, um evento endotérmico largo em torno de 100°C, referente à perda de água, compromete o outro lado da curva, dificultando também a identificação precisa da quantidade de Tgs que o sistema sofre. Aqui, apenas é possível visualizar um evento de Tg que aumenta de temperatura conforme se aumenta o aporte de fármaco (aumento de 15,46; 52,79; 37,5; e 43,15 °C para as DS 10, 20, 30 e 40%, respectivamente), atuando assim como anti-plastificante.

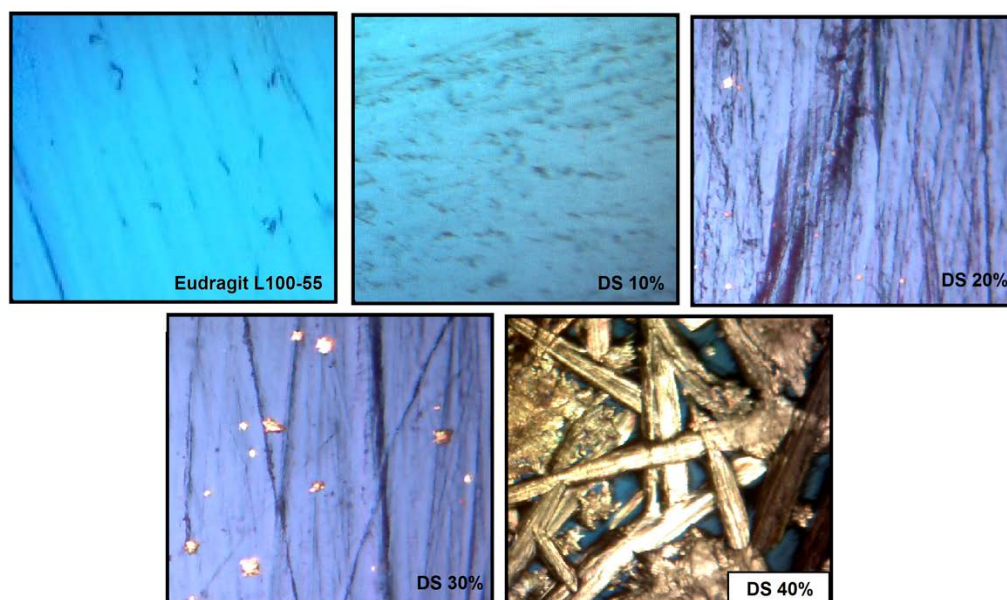
Um microscópio de polarização foi utilizado para avaliar qualitativamente a cristalização do protótipo no filme obtido. Esse equipamento lança um feixe de luz polarizada na amostra em que exibe birrefringência quando um cristal é encontrado, fazendo com que esses apareçam brilhantes e assim facilitando a percepção da presença dessas estruturas no filme obtido (KIM, N. A. *et al.*, 2014). A microscopia de polarização dos sistemas, apresentadas nas Figuras 38, 39, 40 e 41, possuem resultados concordantes com as curvas DSC e os difratogramas de Raios-X. A ausência de cristais nos sistemas dispersos HPMCAS (10%), Eudragit (10 e 20%), HPMC (10%) e PVP K-30 (10, 20 e 30%), somado ao resultado das demais técnicas, sugerem a classificação dos mesmos como soluções sólidas, estado em que o fármaco se apresenta molecularmente disperso na malha polimérica.

Figura 38– Microscopia de polarização para os sistemas obtidos à base de HPMCAS.



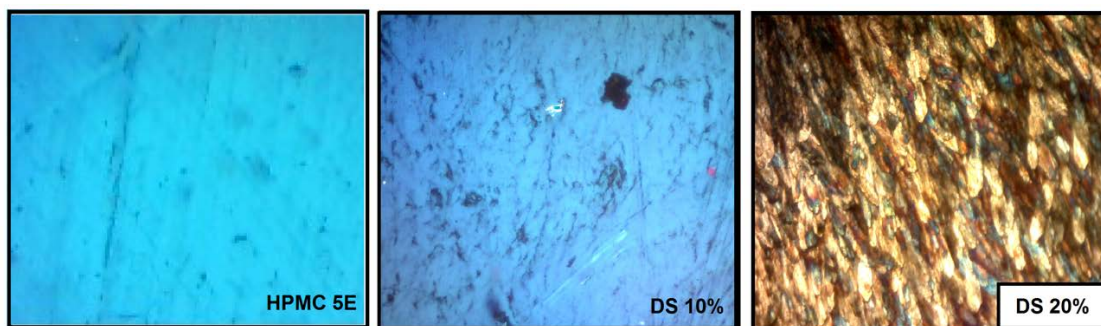
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 39 – Microscopia de polarização para os sistemas obtidos à base de Eudragit L100-55.



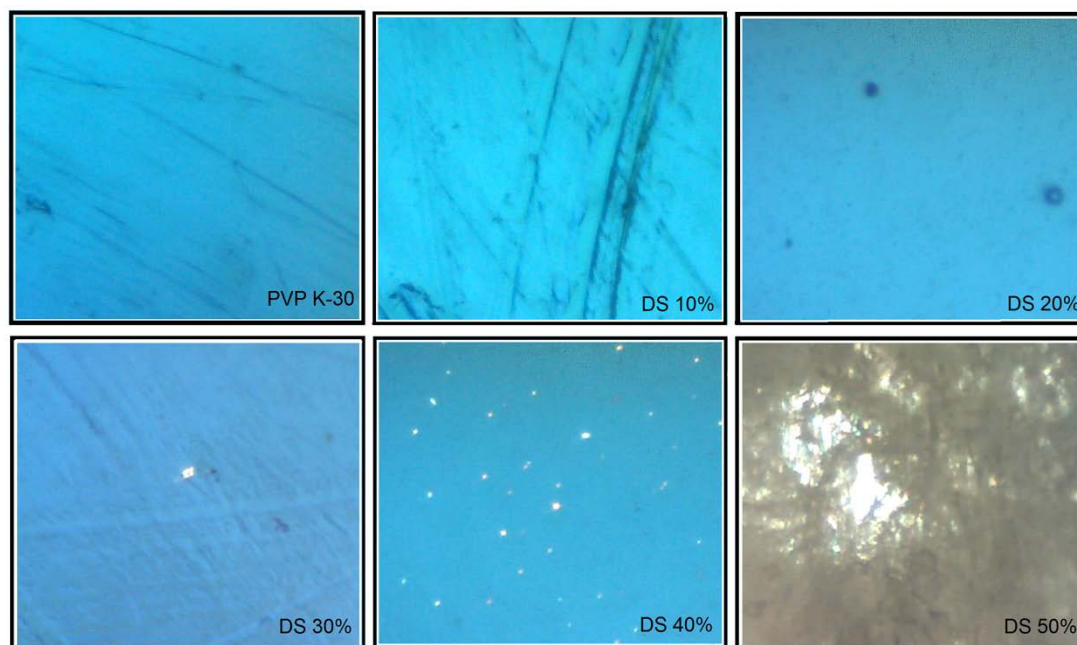
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 40– Microscopia de polarização para os sistemas obtidos à base de HPMC E5.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 41– Microscopia de polarização para os sistemas obtidos à base de PVP K-30.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

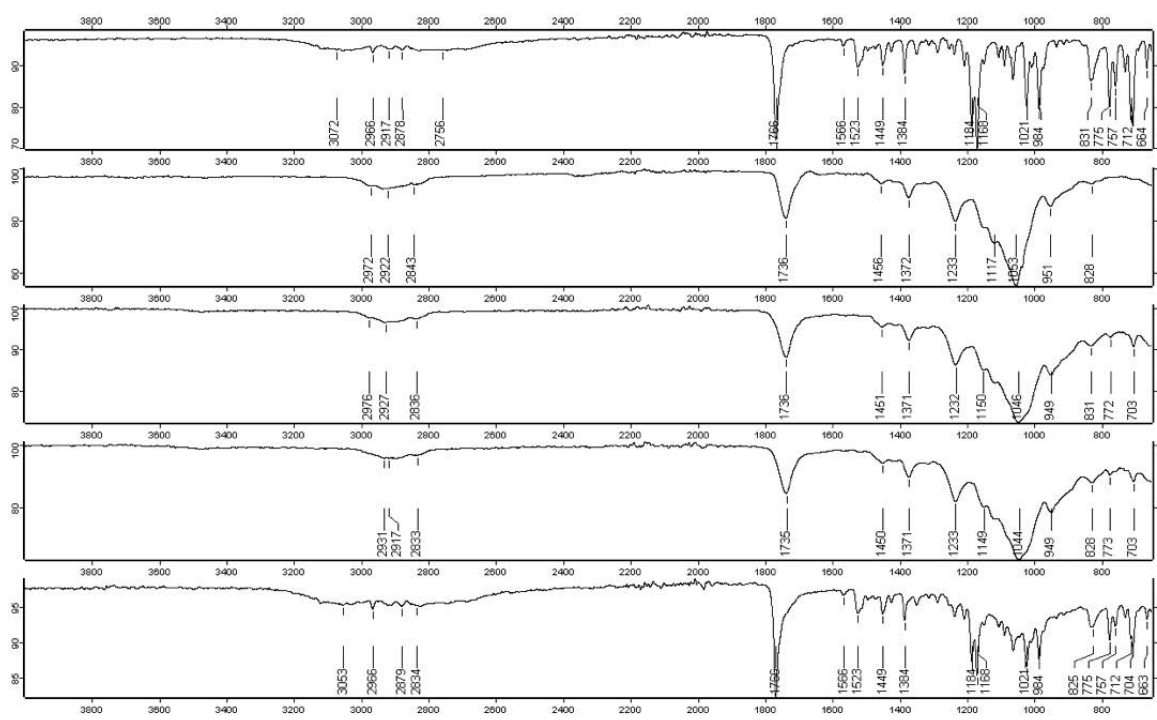
5.2.3. Características Químicas dos Carreadores e Sistemas Dispersos

5.2.3.1 Infravermelho

As Figuras 42, 43, 44 e 45 trazem o espectro de infravermelho dos sistemas contendo HPMCAS, Eudragit, HPMC e PVP K-30, respectivamente. Na Figura 42, nota-se que a banda referente à carbonila da EPI aparenta desaparecer para as DS com 10 e 20% de protótipo, e retorna a aparecer na concentração de 30% de protótipo. Uma vez que a banda referente à carbonila do HPMCAS é muito próxima a da EPI, não é possível afirmar que a banda da EPI

de fato desapareceu: ela pode ter sido deslocada ou sofrido redução da intensidade de tal forma que se torna imperceptível no espectro. Entretanto, esse comportamento sugere que a carbonila da EPI está envolvida em alguma interação química com o polímero.

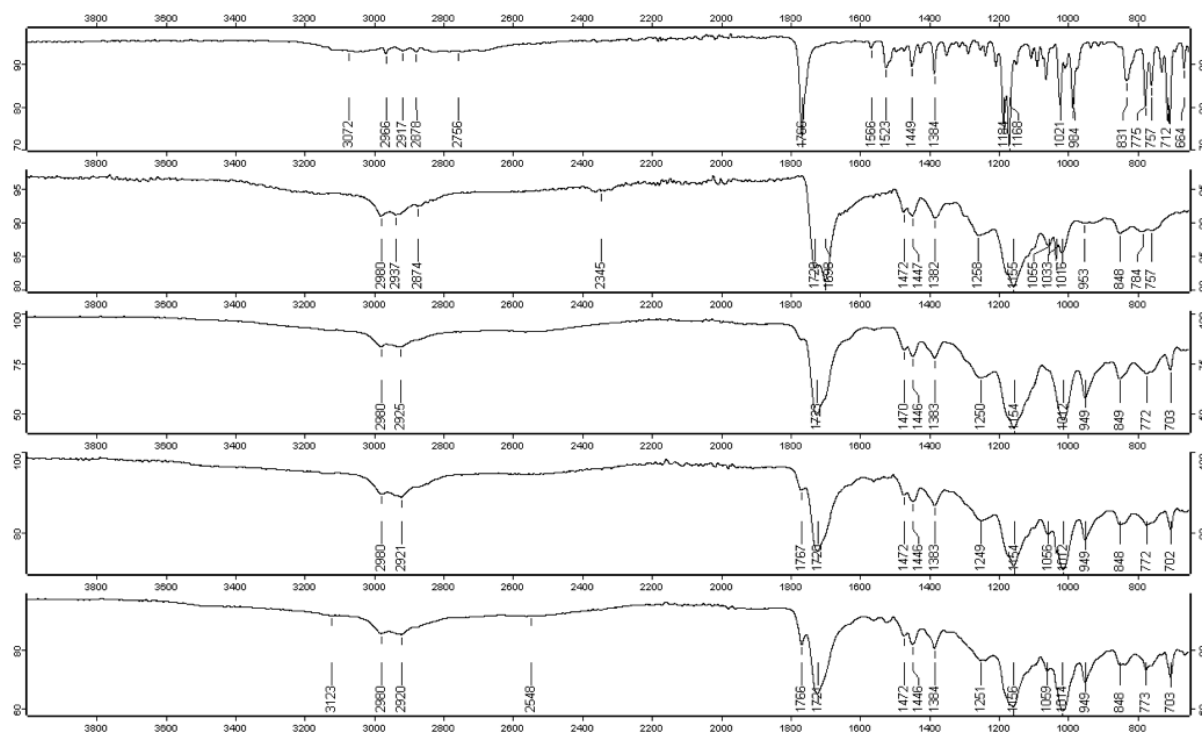
Figura 42 – Espectrometria de infravermelho para: a) EPI, b) HPMCAS, c) DS 10%, d) DS 20% e e) DS 30%.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Para os sistemas obtidos com Eudragit L100-55 (Figura 31), nota-se que a banda referente ao grupamento hidroxila do polímero sofre deslocamento de 15 cm^{-1} quando na presença de 10, 20 e 30% de EPI, e nenhum sinal de interação foi identificado para o sistema contendo 40% de protótipo. Esse deslocamento também sugere interação entre o polímero e a EPI. Para os sistemas compostos por HPMC, não há deslocamento de nenhuma banda para nenhuma das concentrações de protótipo testadas. Entretanto, nota-se que a intensidade da banda carbonila foi significativamente reduzida, o que pode indicar estar havendo alguma interação.

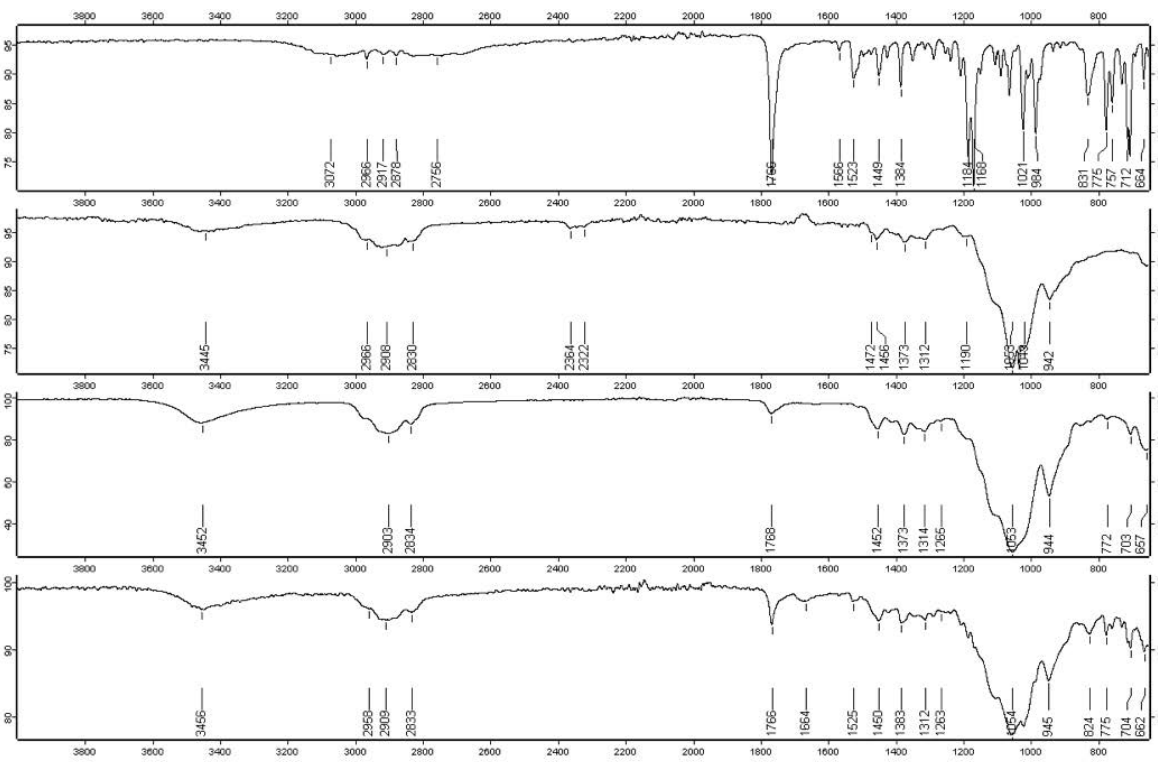
Figura 43– Espectrometria de infravermelho para: a) EPI, b) Eudragit L100-55, c) DS 10%, d) DS 20%, e) DS 30% e f) 40%.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

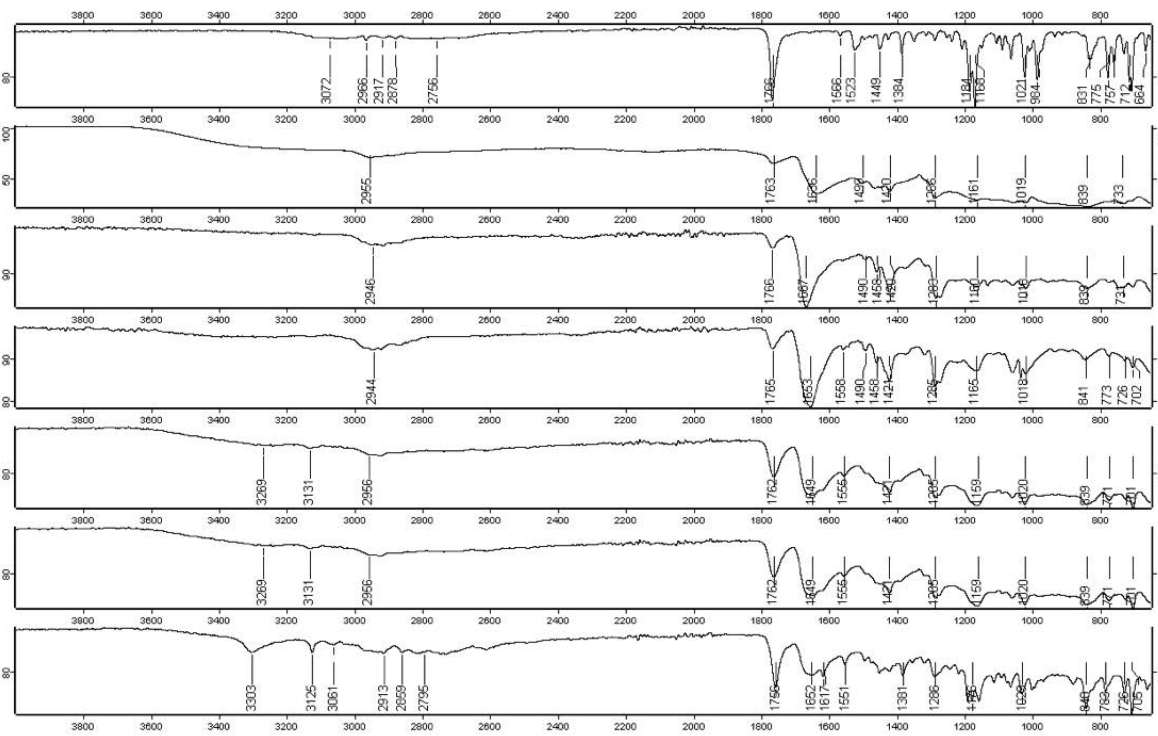
Por fim, os sistemas dispersos contendo PVP K-30 (Figura 45) apresentou um deslocamento para a banda referente à carbonila do protótipo de 20 cm⁻¹ e 15 cm⁻¹, para as dispersões contendo de 10-20% e 30-50%, respectivamente. Ainda, nota-se que para as composições de 30, 40 e 50% de polímero, há o aparecimento de bandas em 3303 e 3125 cm⁻¹, característico de que alguma mudança significativa ocorreu.

Figura 44– Espectrometria de infravermelho para: a) EPI, b) HPMC E5, c) DS 10%, d) DS 20% e e) DS 30%.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 45– Espectrometria de infravermelho para: a) EPI, b) PVP K-30, c) DS 10%, d) DS 20%, e) DS 30%, f) 40% e g) 50%.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

5.2.4 Avaliação da Miscibilidade e do Aporte de Solute Limítrofe à Cristalização

A miscibilidade fármaco-polímero foi avaliada por meios teóricos e práticos. Na avaliação teórica, a habilidade do polímero em formar ligações de hidrogênio e o parâmetro de solubilidade de Hansen foram levados em consideração. Para avaliação prática, o parâmetro de interação de Flory-Huggins foi calculado, baseado no método de antecipação do ponto de fusão. Uma nova análise proposta neste trabalho também foi empregada, que correlaciona o limite do aporte de protótipo para iniciar o processo de cristalização com a miscibilidade.

5.2.4.1 Seleção quanto a habilidade de formar ligações de hidrogênio

A princípio, polímeros que são capazes de formar ligações de hidrogênio complementares com o fármaco tende a promover grande resistência ao processo de cristalização do mesmo (TIAN, Y. *et al.*, 2013). EPI possui um grupo doador de ligação de hidrogênio (-OH) e dois grupos aceptores (C=O; -N=), o que facilita a formação deste tipo de interação com os polímeros. De acordo com o Quadro 4, todos os polímeros pré-selecionados apresentam a habilidade de formar ligações de hidrogênio com o composto em análise. O Quadro 2 também apresenta propriedades importantes do protótipo e dos polímeros pré-selecionados.

Quadro 4– Propriedades dos polímeros e protótipo.

Amostra	Peso molecular (g/mol)	Ligação de Hidrogênio (grupos)	Tg (°C)	Densidade (g/cm ³)	δ (MPa.s)
EPI	286.33	-OH; C=O; -N=	-	0.24	21.4
HPMCAS	~ 18.000 ^G	- OH; C=O	130	1.285	29.1
EUDRAGIT L 100-55	~ 320.000	- OH; C=O	96	0.83	21.65
HPMC E5	~ 18.900 ^H	-OH	170-180	0.5	40.01
PVP K-30	~ 58.000	-C=O	164	0.36	22.5

Fonte: dados da pesquisa (2017).

5.2.4.2 Parâmetro de solubilidade de Hansen

O parâmetro de solubilidade de Hansen para EPI foi estimado 19.97 mPa^{1/2}, de acordo com o cálculo da contribuição dos grupos, descrito na Tabela 5.

Tabela 5– Cálculo do parâmetro de solubilidade de Hansen para EPI.

Grupo químico	Quantidade	F_{di} x quantidade	F_{pi}^2 x quantidade	E_{hi} x quantidade
Benzeno	1	0	0	0
>C<	1	-70	0	0
OH	1	210	0	20
>CH-	2	160	0	0
CH ₂ <	1	270	0	0
-O-	1	100	160	3
C=O	1	290	593	2
-C-	1	279	0	0
=C<	1	279	0	0
-N=	3	210	0	0
CH ₃	2	40	1280	10
SOMA		1900	2033	35
Volume (cm³)	95,21			
		$\delta_d = 21.43$	$\delta_p = 0.51$	$\delta_h = 0.63$
		$\delta_d^2 = 459.10$	$\delta_p^2 = 0.26$	$\delta_h^2 = 0.39$
		$\delta = 19,97 \text{ Mpa}^{1/2}$		

Fonte: Van Krevelen e Te Nijenhuis, 2009.

O volume molecular foi estimado pelo programa on-line *Mol Inspiration*, que fornece essa informação de forma precisa através de cálculos computacionais. Cada molécula de EPI apresenta um volume de 262,45 Å³ ou 2,62x10⁻²² cm³. Convertendo este dado para cm³/mol tem-se 158,0474 cm³/mol. A teoria de Hansen descreve o volume molar total (MV) como o volume molar dividido por 1,66. Dessa forma, MV torna-se igual a 95,21 cm³/mol.

O parâmetro de solubilidade é utilizado para guiar a miscibilidade fármaco-polímero através da comparação desses resultados, onde compostos com parâmetro de solubilidade similares (~ 7 Mpa^{1/2} ou menos) é mais provável de ser miscível, enquanto compostos com parâmetro de solubilidade diferentes (~ 10 Mpa^{1/2} ou mais) são mais prováveis de serem imiscíveis (BAIRD; TAYLOR, 2012; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). Baseado nessa abordagem, a miscibilidade da EPI em PVP K-30 e Eudragit L100-55 é favorável de acontecer, enquanto que para HPMCAS o valor de $\Delta\delta$ parece estar no limite e HPMC 5E não é favorável de ser miscível com a EPI (Tabela 6).

Tabela 6 - $\Delta\delta$ entre EPI e os polímeros pré-selecionados.

Polymer	$\Delta\delta$ (MPa.s)
HPMCAS	9,13
EUDRAGIT L 100-55	1,68
HPMC 5E	20,04
PVP K-30	2,53

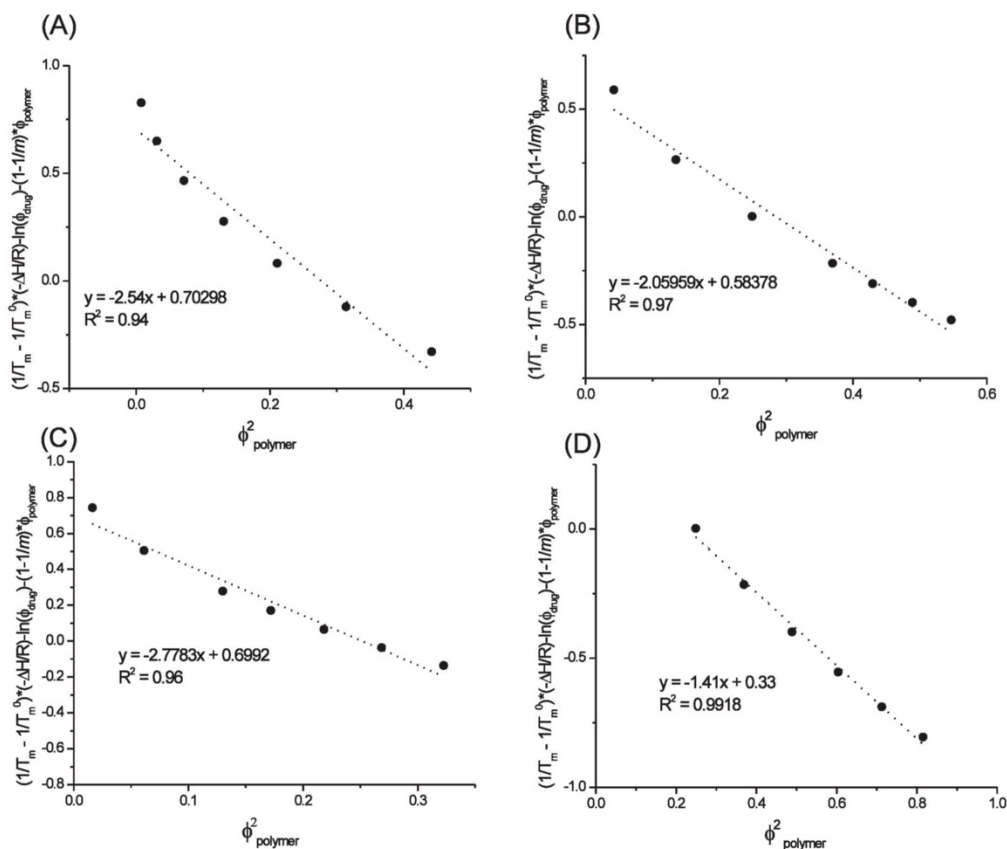
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Entretanto, como já mencionado, esse método não é conclusivo, uma vez que o mesmo geralmente funciona para sistemas com estruturas moleculares simples, onde as forças de Van der Waals desempenham um papel predominante, o que não é verdadeiro para os sistemas dispersos sólidos (GUPTA *et al.*, 2011; MARSAC; SHAMBLIN; TAYLOR, 2006; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015). Em outras palavras, esse método pode fornecer indícios de evidência sobre a miscibilidade fármaco-polímero, mas outros métodos são necessários para verificar os resultados mais aprofundadamente.

5.2.4.3 Parâmetro de interação de Flory-Huggins

O método de depressão do ponto de fusão determina a miscibilidade fármaco-polímero quando uma significativa depressão do ponto de fusão é observada para o fármaco devido ao processo de mistura ter sido exotérmico (MARSAC; SHAMBLIN; TAYLOR, 2006; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015), uma vez que em um sistema miscível há a mistura espontânea, provocando alterações no processo de fusão. Em outras palavras, há uma energia livre de mistura negativa e o potencial químico do fármaco na mistura é reduzido em relação ao fármaco puro (BAIRD; TAYLOR, 2012; MENG *et al.*, 2015). Baseando-se nesse resultado, o parâmetro de Flory-Huggins (χ) foi calculado a partir da inclinação da reta expressa em $(1/T_{m_{mix}} - 1/T_{m_{pure}}) \times (\Delta H_{fus} / -R) - \ln(\phi_{drug}) - (1 - 1/m)\phi_{polymer}$ versus $\phi_{polymer}^2$, como demonstrado na Figura 46.

Figura 46– Cálculo do fator χ para as misturas físicas EPI:HPMCAS (A); EPI:PVP K-30 (B); EPI: Eudragit L100-55 (C); e EPI:HPMC (D) sob diferentes concentrações de EPI.



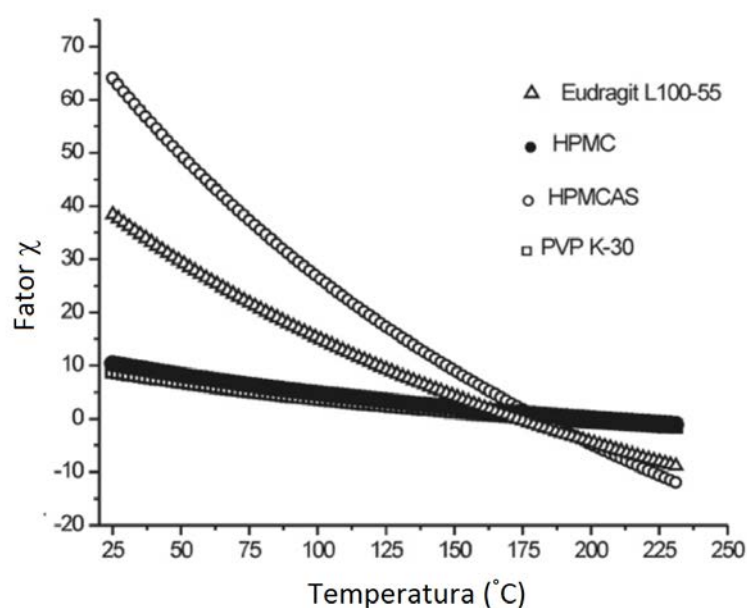
Fonte: dados da pesquisa (2017).

A partir da inclinação das retas obtidas é possível obter o valor correspondente de χ para cada mistura física sob as variações de temperatura experimentais (T_{endset}) e para variação da composição fármaco-polímero. A reta obtida mostra que para todos os polímeros empregados, um valor negativo para a inclinação da reta foi obtido, o que indica que todos os polímeros pré-selecionados exibem um processo de mistura termodinamicamente favorável quando sob as temperaturas empregadas neste experimento. Entretanto, essa faixa experimental de temperatura é muito superior a temperatura ambiente e, por isso, a curva foi extrapolada para verificar o suposto comportamento do sistema quando sob temperatura ambiente e em torno da temperatura de secagem do sistema. Para tanto, uma relação entre o fator χ e a temperatura foi contruída aplicando-se a Equação 14 (TIAN, Y. *et al.*, 2013).

Através do cálculo de χ para cada situação individual, um gráfico fator χ versus $1/T$ foi construído, com R^2 variando de 0,79 a 0,97 (Equação 14). Como mencionado por Tian e colaboradores (TIAN, Y. *et al.*, 2013), não é possível alcançar uma relação linear em altas temperaturas, porém, quando a temperatura é reduzida, um comportamento linear é alcançado

e aqui é assumido que este comportamento linear continua até o alcance da temperatura de análise (ambiente). O comportamento linear permite o cálculo dos termos A e B apresentados na Equação 14, que também permite uma melhor estimativa χ sob temperatura ambiente (Figura 47).

Figura 47– Gráfico do fator χ versus temperatura para as misturas físicas com EPI. temperature for the physical mixtures with EPI.



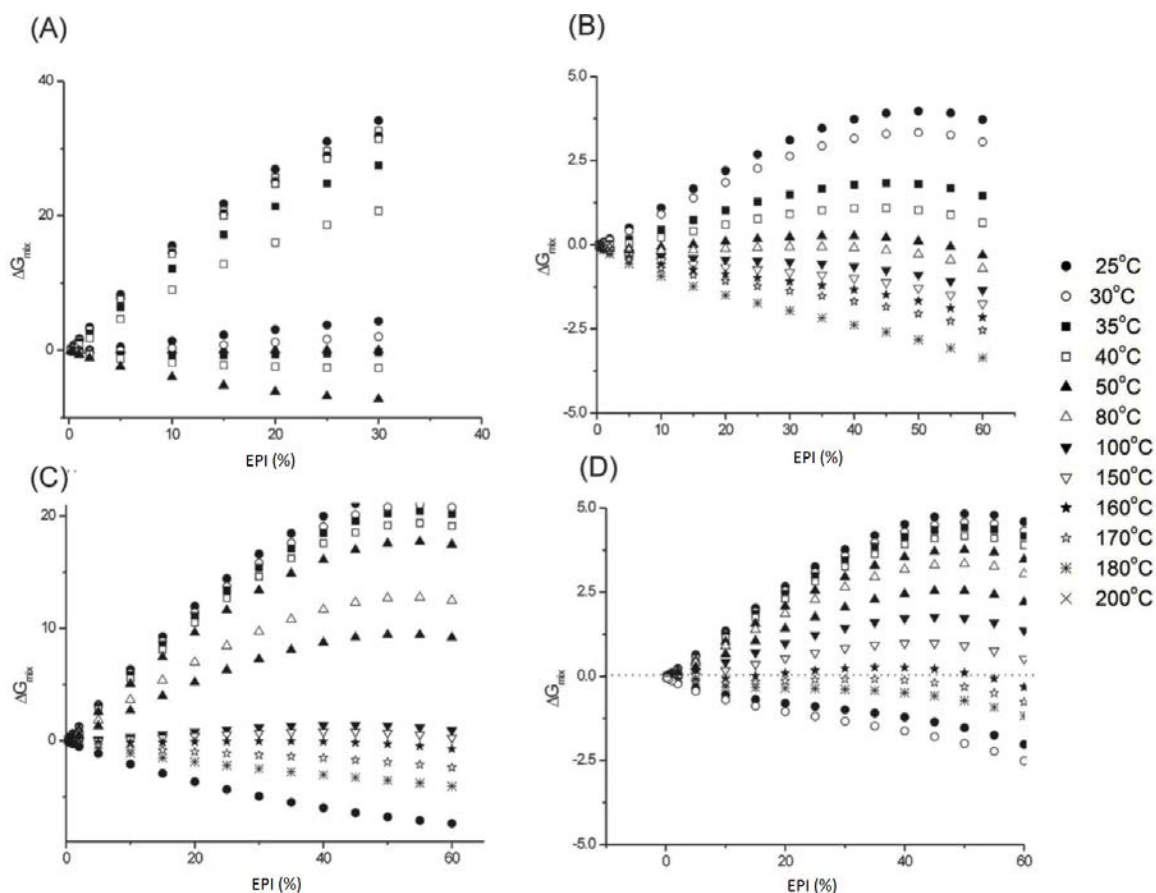
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Torna-se claro com a Figura 47 que apesar de o fator χ ter se apresentado bastante negativo quando sob altas temperaturas, este pode mudar completamente sob temperatura ambiente, se for assumido que a Equação 14 pode ser extrapolada até esse ponto. Assim, a Figura 2 ilustra a influência da temperatura no fator χ e, além disso, a miscibilidade da EPI nesses polímeros. Para as misturas contendo HPMCAS e Eudragit L100-55, o aumento da temperatura parece decrescer bastante o valor de χ e, por outro lado, também aumenta intensamente quando a temperatura é reduzida. Já as misturas físicas com os polímeros PVP K-30 e HPMC parecem sofrer menor influência da temperatura e pode oferecer um comportamento mais miscível sob temperatura ambiente.

A energia livre de Gibbs é um parâmetro importante na determinação da miscibilidade. Para melhor compreender as mudanças da energia livre de Gibbs dos sistemas quando expostos

à variação da temperatura da quantidade de EPI, um gráfico ΔG versus o aporte de EPI foi construído baseado na Equação 13 (Figura 48).

Figura 48– Relação entre ΔG e o aporte de protótipo (p/p) sob várias temperaturas para as misturas físicas: EPI:HPMCAS (a), EPI:PVP K-30 (b), EPI:Eudragit L100-55 (c) and EPI:HPMC (d).



Fonte: dados da pesquisa (2017).

De acordo com a Figura 36, todos os gráficos mostram uma curva sigmoideal aos arredores de ΔG igual a zero. Através da seleção dos pontos lineares de cada região que corta o eixo “x”, é possível calcular o máximo de EPI miscível em cada sistema sob cada temperatura (Quadro 5).

Quadro 5– Equações das regressões lineares e a solubilidade da EPI (Cs) no Polímero para as misturas Físicas de EPI com HPMCAS, PVP K-30, Eudragit L100-55 and HPMC.

Polímero	T (°C)	Cs da EPI no polímero (% p/p)	Polímero	T (°C)	Cs da EPI no polímero (% p/p)
PVP K-30	25	0.042	HPMCAS	40	0
PVP K-30	30	0.102	HPMCAS	50	0
PVP K-30	35	0.228	HPMCAS	80	0
PVP K-30	40	0.36	HPMCAS	100	0.18
PVP K-30	50	0.6	HPMCAS	150	0.84
PVP K-30	80	1.89	HPMCAS	160	5.73
PVP K-30	100	3.85	HPMCAS	170	40.89
PVP K-30	125	13.497	HPMCAS	173	63.25
PVP K-30	150	22.69	HPMCAS	175	100
PVP K-30	160	100	HPMC	25	0.11
EUD L100-55	25	0	HPMC	30	0.14
EUD L100-55	30	0	HPMC	35	0.16
EUD L100-55	40	0	HPMC	40	0.20
EUD L100-55	50	0	HPMC	50	0.23
EUD L100-55	80	0	HPMC	60	0.35
EUD L100-55	100	0	HPMC	80	0.6
EUD L100-55	150	3.48	HPMC	100	1.04
EUD L100-55	155	6.12	HPMC	150	2.43
EUD L100-55	160	100	HPMC	160	100
HPMCAS	25	0			
HPMCAS	30	0			

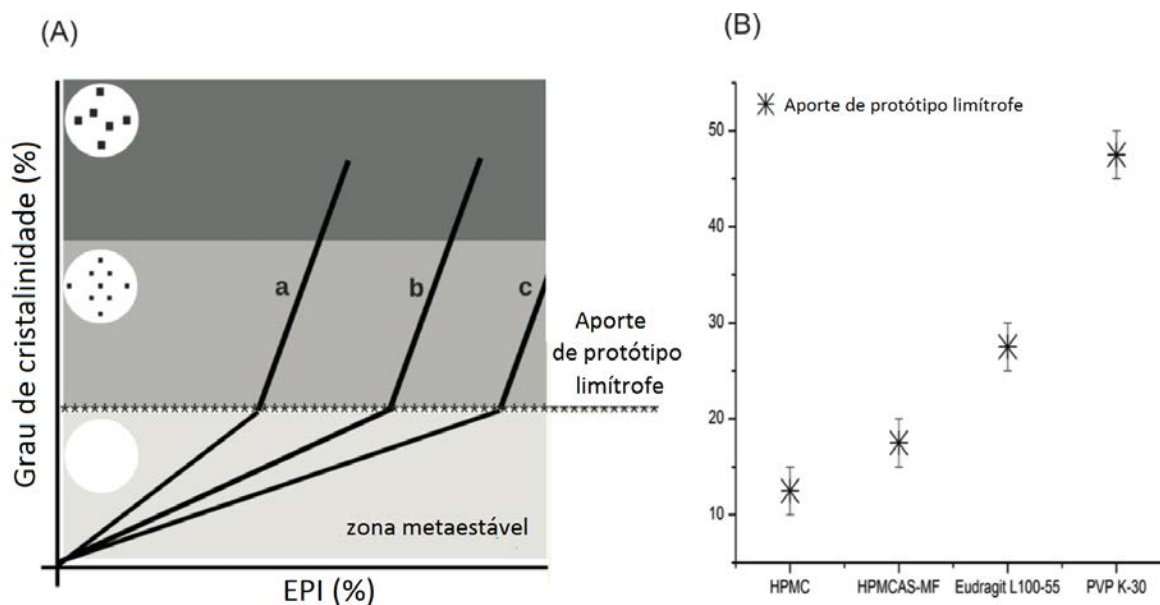
Fonte: dados da pesquisa (2017). Legenda: Cs – concentração de saturação.

Até o momento, parece que calculando o fator χ sob altas temperaturas pode oferecer certa direção sobre a miscibilidade, mas não informa fidedignamente como o sistema se comporta sob temperatura ambiente. Assumir esse fato pode explicar porque a solubilidade da EPI no Polímero não segue a mesma tendência observada para o fator χ sob temperatura ambiente.

5.2.4.4 Análise do aporte de soluto limítrofe à cristalização

Na análise qualitativa do aporte de fármaco limítrofe à cristalização, também denominado de concentração de supersaturação crítica do protótipo no polímero (considerado aqui como a carga de fármaco limite sobre a qual um significativo processo de cristalização ocorre na dispersão sólida) (Figura 49a), foi observado que há uma diferença significativa de comportamento entre os polímeros. De acordo com a Figura 49b, a concentração de saturação crítica da EPI no polímero PVP K-30 apresentou-se muito maior do que para o HPMC, por exemplo, distanciando-se assim dos resultados calculados com base na teoria de Flory-Huggins.

Figura 49– Aporte limítrofe à cristalização de EPI nos sistemas dispersos sólidos.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Este comportamento pode ser correlacionado com a abordagem convencional sobre cinética de cristalização, uma vez que o processo de recristalização de um fármaco pobremente solúvel em água a partir de uma solução supersaturada mostra que a cinética de cristalização é geralmente dependente da razão da geração de supersaturação (SUN; LEE, 2013). Adicionalmente, uma correlação entre o “tempo de indução” (TI) (o tempo em que os eventos de nucleação e cristalização não acontecem ou acontecem de forma negligível) e a taxa de cristalização tem sido demonstrado por trabalhos pioneiros na literatura (HAN; LEE, 2017; SUN; LEE, 2013), em que quanto menor o tempo de indução para nucleação, mais rápida será a taxa de cristalização (uma maior inclinação da reta na porção linear do perfil de cristalização é observada).

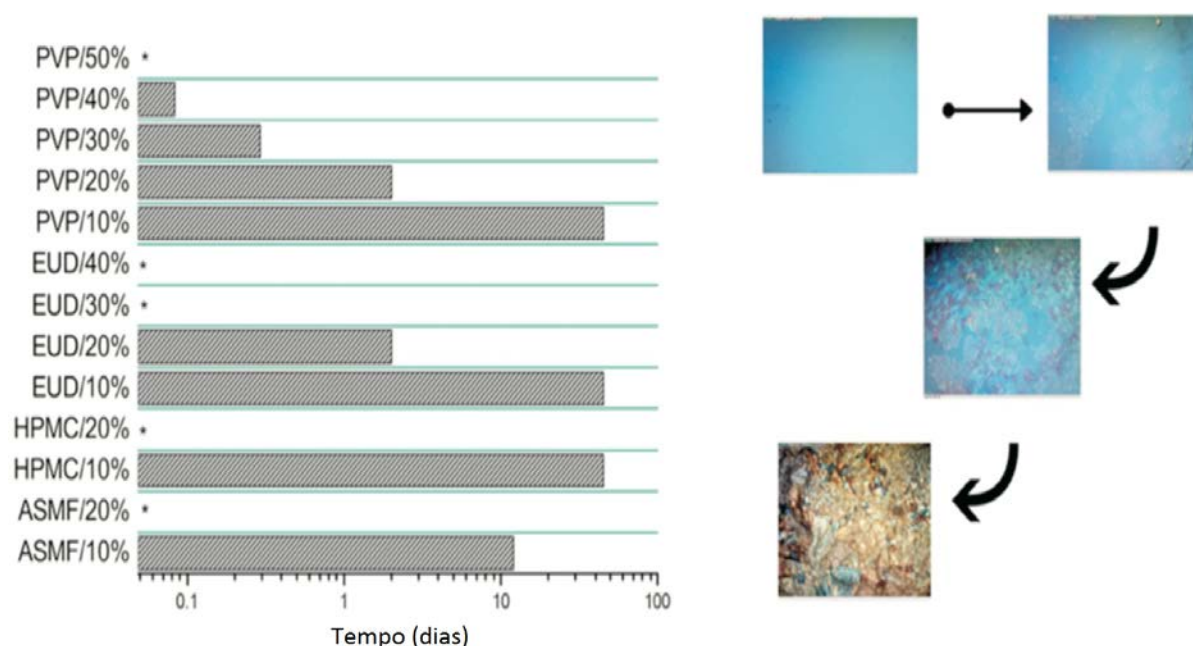
Aplicando essa abordagem nos resultados do aporte de fármaco limítrofe à cristalização, torna-se claro que quanto mais longo do TI mais miscível tende a ser o sistema. Essa afirmação pode ser teoricamente explicada pela dissolução de uma substância pouco solúvel em água dentro de um sistema aquoso, em que pode ser usada para explicar a solubilidade do fármaco no Polímero através de 3 fases: fase 1, que corresponde ao crescimento gradual da supersaturação em uma solução livre de precipitado, levando a formação de pequenos embriões e núcleos (processo de nucleação); fase 2, que é marcada pelo crescimento desses núcleos resultando na formação do cristal; e fase 3, onde uma espontânea e incontrolável cristalização acontece. Aqui, a fase 1 é a regra geral para a maioria dos processos (SUN; LEE, 2013), e sua

estabilidade é significativamente dependente do grau de supersaturação. Em outras palavras, o aporte de fármaco em uma dispersão sólida distante daquela limítrofe à cristalização irá representar uma estabilidade física muito melhor do que aquelas próximas à concentração limítrofe.

Apesar de esses aspectos terem sido citados na literatura como um início crítico para o evento de cristalização (por exemplo: supersaturação da solução de fármaco, viscosidade do polímero e temperatura de transição vítrea do polímero, etc), esse não é o único fator que permite o início da cristalização. Uma certa quantidade mínima de energia (conhecida como energia de ativação) é também requerida para superar a tensão interfacial entre as partículas pequenas. Assim, a nucleação pode não começar até um certo grau de supersaturação ser atingido para superar essa barreira energética, e o polímero escolhido pode ajudar a manter essa energia baixa (BAGHEL *et al.*, 2016; HAN; LEE, 2017; JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009). Essa mudança na concentração supersaturada quando não há nucleação ocorrendo é conhecida como zona metaestável, e é completamente relacionável ao TI discutido por Sun e Lee (2013) e Han e Lee (2017) em seus estudos sobre cristalização de substâncias originalmente amorfas.

Dessa forma, os filmes de dispersão sólida foram analisados em função do tempo por microscópio de polarização, quando expostos às condições de estabilidade acelerada (40°C e 75% UR). Imediatamente após a preparação, um filme opticamente transparente foi produzido e analisado, apresentando ausência de birrefringência quando examinados através do microscópio óptico de polarização, indicando que uma solução sólida foi produzida. Com o tempo, pequenos pontos de luz começaram a aparecer, indicando que pequenos cristais começam a aparecer no sistema em função do tempo. O primeiro momento de identificação desses cristais foi denominado de T_{onsetC} (tempo inicial de cristalização), assumido aqui como o tempo requerido para que o processo de nucleação e cristalização iniciasse, considerando as condições experimentais (Figura 50).

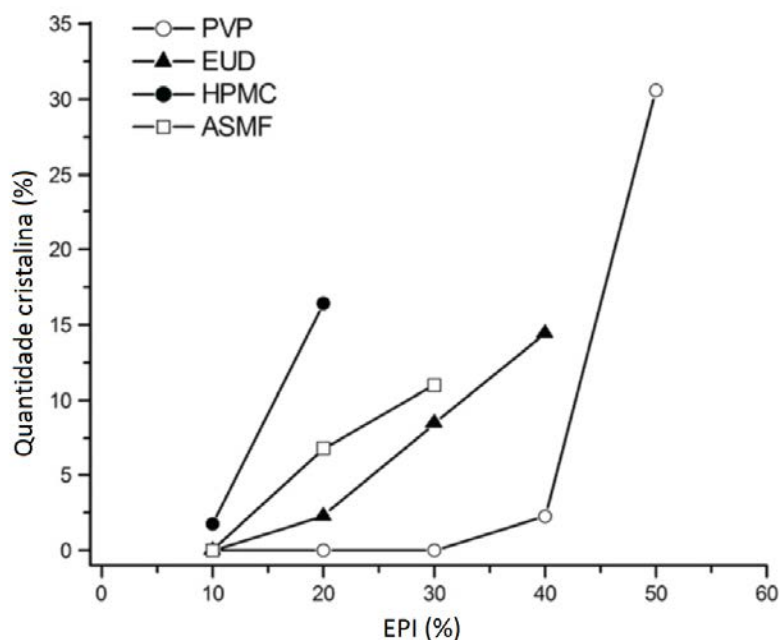
Figura 50– (a) Relação entre o aporte de EPI e o tempo requerido para iniciar os eventos de nucleação e cristalização; (b) fotomicrografias oriundas do microscópio de polarização em função do tempo (exemplo da amostra de Eudragit).



Fonte: dados da pesquisa (2017). Legenda: ASMF = HPMCAS; *Cristalização desde o tempo 0; Observação: As dispersões compostas por PVP K-30, Eudragit L100-55 e HPMC, contendo 10% de EPI, não cristalizaram até o último dia de análise.

Para melhor entender o papel do polímero na estabilidade dos sistemas sólidos, cada dispersão sólida foi avaliada de acordo com sua composição cristalina logo após o preparo, através do DRX (Figura 51). Apesar de ser possível identificar pontos muito pequenos de luz na microscopia de polarização para a dispersão sólida à base de HPMCAS MF, o que significa que o processo de cristalização foi iniciado, a inclinação da reta construída entre o incremento do percentual cristalino da amostra e o incremento efetivo de fármaco no sistema é menor que aquele apresentado para as dispersões à base de HPMC; além disso, o primeiro não apresenta nenhum sinal de cristalização por DRX até 10% de aporte de fármaco. Essa observação sugere que o HPMCAS tem a habilidade de retardar o evento de cristalização mesmo após o processo de nucleação e cristalização já ter sido iniciado. Eudragit apresenta uma inclinação da reta ainda menor em relação aos polímeros mencionados, enquanto as dispersões obtidas com PVP K-30 apresenta a menor inclinação da reta, o que reflete na melhor habilidade em retardar os eventos de nucleação e cristalização para o composto em estudo.

Figura 51– Percentual de EPI cristalina nas amostras de dispersões sólidas baseados nos resultados de DRX.



Fonte: dados da pesquisa (2017). Legenda: ASMF = HPMCAS

O Quadro 6 aponta os resultados obtidos por todos os experimentos empregados na análise de miscibilidade entre o protótipo e os polímeros, e destaca a habilidade de prever a estabilidade dos sistemas através da análise do aporte de soluto limítrofe à cristalização.

Quadro 6– Resumo das abordagens para predição da miscibilidade.

Maximum Misibility ↑ Minimal Misibility	Resultados calculados para prever a miscibilidade (teórico e experimental)					Resultado real da miscibilidade
	Parâmetro de Hansen (teórico)	factor χ (experimental)	fator χ sob temperatura ambiente (teórico-experimental)	Tempo de Indução (experimental)	Aporte de soluto limítrofe à cristalização (experimental)	Resultado da Estabilidade (experimental)
	PVP	ASMF	HPMC	PVP	PVP	PVP
	EUD	EUD	PVP	EUD	EUD	EUD
	ASMF	HPMC	EUD	HPMC	ASMF	HPMC
	HPMC	PVP	ASMF	ASMF	HPMC	ASMF

Fonte: dados da pesquisa (2017).

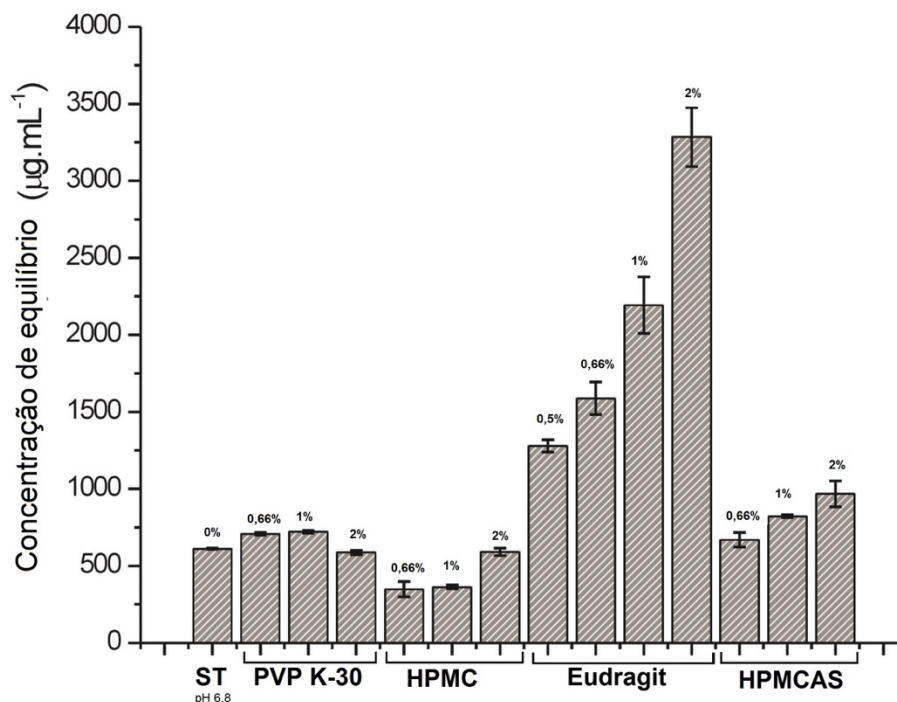
Assim, neste trabalho foi evidenciado que o aporte limítrofe à recristalização de soluto e o tempo de indução é um bom indicador para prever o comportamento da estabilidade entre diferentes sistemas poliméricos. Baseando-se nisso, quão mais alto for a quantidade de soluto suportado pelo sistema para mantê-lo amorfo, mais estável é o sistema (considerando uma concentração fixa de soluto). Apesar de essas informações serem conseguidas através de métodos experimentais, a quantidade de material necessária para realizar esse estudo é geralmente muito pequena. Essa abordagem pode contribuir para resolução de um dos problemas mais desafiadores sobre dispersões sólidas, que é sua estabilidade física.

5.3 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DOS SISTEMAS DISPERSOS SÓLIDOS OBTIDOS

5.3.1 Perfil de Dissolução sob Condição Não-sink

As dissoluções in vitro foram realizadas para avaliar a performance dos sistemas. O cálculo do Índice Sink (IS) foi realizado aqui para quantificar o grau de desvio da condição sink em que o experimento foi realizado. Uma vez que o objetivo é a quantificação de protótipo em função do tempo para observar o seu perfil de dissolução, o meio de dissolução torna-se, no decorrer do processo, composto por solução tampão e polímero solúvel. Assim, a concentração de equilíbrio da EPI no meio contendo o carreador foi realizada (Figura 52). Isso porque os polímeros solúveis também ajudam a retardar os processos de nucleação e cristalização e/ou atuam como surfactantes, que incrementa a solubilidade de equilíbrio dos solutos (SUN; LEE, 2015). Aqui foram consideradas as concentrações finais que as diferentes proporções de polímero nos sistemas dispersos poderiam gerar, considerando o aporte máximo de 40% de protótipo. Assim, originaram-se as concentrações de 2; 1; 0,66; e 0,5% de polímero no meio de dissolução para os sistemas dispersos compostos por 10, 20, 30 e 40% de protótipo, respectivamente.

Figura 52– Concentração de equilíbrio da EPI em solução de água e polímero



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Os resultados mostram leves flutuações na concentração de equilíbrio da EPI quando na presença dos polímeros PVP K-30 e HPMC E5, que são claramente não relacionadas à concentração do protótipo no meio. Entretanto, para os polímeros HPMCAS e, sobretudo, Eudragit L100-55, há um significativo incremento na concentração de equilíbrio do protótipo, o que interfere na dose.

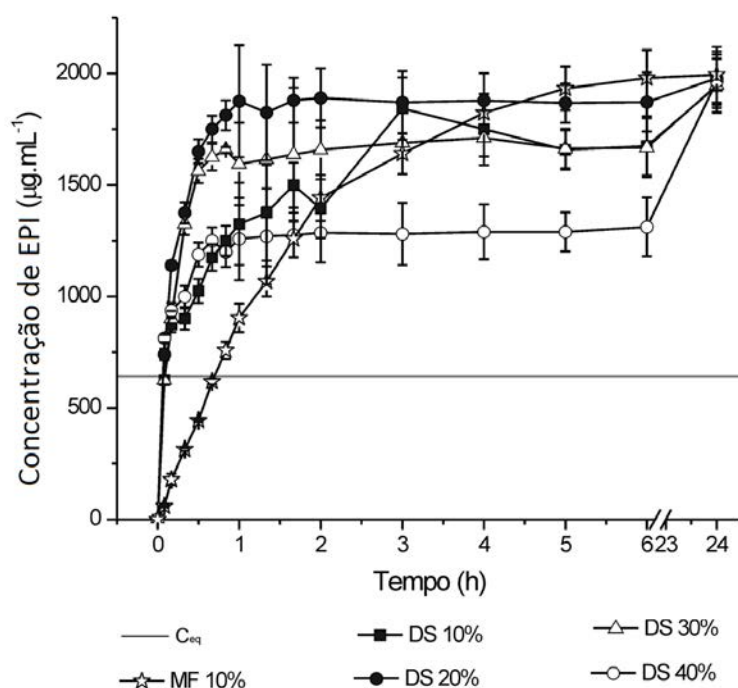
De acordo com Curatolo (2009), o mecanismo de supersaturação e o incremento da biodisponibilidade por dispersões sólidas é oriunda das várias formas possíveis de se encontrar o fármaco, incluindo 1) conjuntos nanométricos de fármaco-polímero; 2) fármaco dentro de misturas de lecitina ou de sal biliar; 3) fármaco verdadeiramente livre supersaturado; e 4) fármaco precipitado. Como o HPMCAS é um polímero anfifílico, esse grupo avaliou e constatou a formação de partículas coloidais a partir do próprio polímero e a habilidade de os fármacos se inserirem nessa partícula como mais uma razão para o incremento da solubilidade, sendo este o motivo mais plausível para justificar o incremento da solubilidade de equilíbrio da EPI, que acontece em função do aumento da concentração do polímero.

Essas partículas coloidais são formadas em pH superior a 5, quando o polímero está parcialmente ionizado e sua carga suporta agregados poliméricos estáveis na escala

manométrica (partículas coloidais), que é misturada com a fração livre ou solvatada de soluto, nanoestruturas de polímero/soluto, nanoagregados (estruturas menores que as nanoestruturas) e partículas maiores de soluto (precipitado). Sua natureza anfifílica somada a presença de regiões hidrofóbicas permite a formação de sítios de associação com o fármaco lipofílico, auxiliando ainda mais na formação de nanoestruturas amorfas do fármaco/polímero na solução, enquanto que as regiões hidrofílicas permitem a formação de estruturas coloidais hidratadas estáveis no meio aquoso (FRIESEN *et al.*, 2008).

Essa mesma hipótese pode ser atribuída ao incremento da solubilidade de equilíbrio do protótipo na presença do Eudragit L100-55. Uma vez que o carreador se apresenta parcialmente ionizado no pH 6,8, este se torna propenso a formação dessas partículas coloidais. Adicionalmente, polimetacrilatos podem conter surfactantes, como o dodecil sulfato de sódio ou polissorbato 80 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Assim, o resultado obtido para o perfil de dissolução da dispersão sólida composta por este carreador (Figura 53) mostra claramente o alcance da concentração teórica máxima utilizada (100%), reafirmando que se trata de uma condição sink, mesmo tendo sido aplicado um SI=0,3 relativo à solubilidade de equilíbrio dos cristais de EPI na ausência de polímero (o que representa uma concentração final 3,33 vezes maior que a concentração de saturação da EPI em solução tampão pH 6,8).

Figura 53– Perfil de dissolução das dispersões sólidas compostas por Eudragit L100-55 e Epiisopiloturina, em diferentes proporções.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

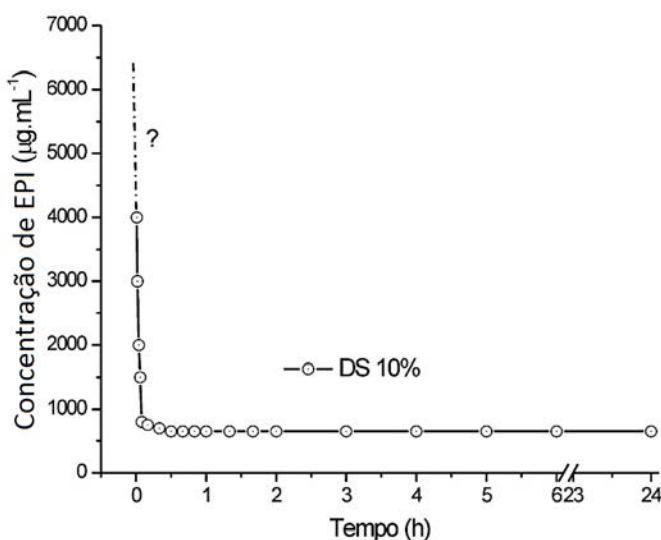
O incremento da concentração de equilíbrio de EPI devido a presença de Eudragit L100-55 faz com que a condição não-sink para esse sistema não seja realista, já que o volume disponível à dissolução do protótipo no intestino passa a ser infinito. A partir desse perfil de dissolução, percebe-se que a composição de 20% de EPI libera mais rapidamente o protótipo, provavelmente devido a uma relação protótipo-polímero mais favorável, já que nesta concentração também se tem uma solução sólida. Em outras palavras, parece que a presença de 90% de polímero (na DS 10%) pode retardar ligeiramente a liberação do protótipo, embora ambas alcancem a solubilidade máxima ao final do experimento. A concentração de 30% de EPI apresenta um início de dissolução semelhante a DS 20%, provavelmente devido à dissolução da fração amorfa desse sistema, que alcança um platô inicial inferior, devido à fração cristalina do sistema. Essa fração cristalina se dissolve por completo ao fim do experimento, devido a concentração de saturação aumentada. Essa mesma hipótese se aplica a DS 40%, em que a velocidade inicial da dissolução é semelhante às demais concentrações, devido à fração amorfa, porém logo se alcança um platô que corresponde à dissolução lenta da fração cristalina de EPI, que também alcança em algum momento a solubilidade máxima.

Já que o aumento da força motriz à transferência de soluto do meio de dissolução para a membrana é dado pela fração supersaturada da dissolução, pode-se presumir que a liberação do protótipo a partir desse sistema não trará benefícios à essa transferência. Essa foi a importante conclusão do trabalho de Theeuwes e colaboradores (THEEUWES; GALE; BAKER, 1976), em que avaliou a transferência de massa através da membrana a partir de diferentes soluções de soluto e constatou que, mesmo que a concentração de equilíbrio do soluto aumente em função da mudança de solvente, a transferência de massa é praticamente fixa. O aumento dessa transferência só é visualizado a partir de soluções supersaturadas.

Visando manter a condição não sink, para os demais sistemas foi empregado um $SI = 0,1$ (dez vezes a concentração de saturação do protótipo, considerando aqui a interferência da presença do polímero na concentração de equilíbrio da EPI). Em total contraste aos resultados obtidos para os sistemas compostos por Eudragit L100-55, o perfil de dissolução dos sistemas com HPMC não puderam ser obtidos, devido à descontrolada cristalização que acontece antes mesmo do 5º minuto de experimento. Um perfil de dissolução teórico é exemplificado aqui, com base nos achados experimentais (Figura 54). Esse fenômeno mostra que o HPMC tem uma capacidade bastante reduzida de evitar os eventos de nucleação e cristalização da EPI, independente de sua concentração no meio. Esse resultado está em concordância com os

resultados preliminares que demonstram fracas ou imperceptíveis interações físicas ou químicas entre o protótipo e o polímero.

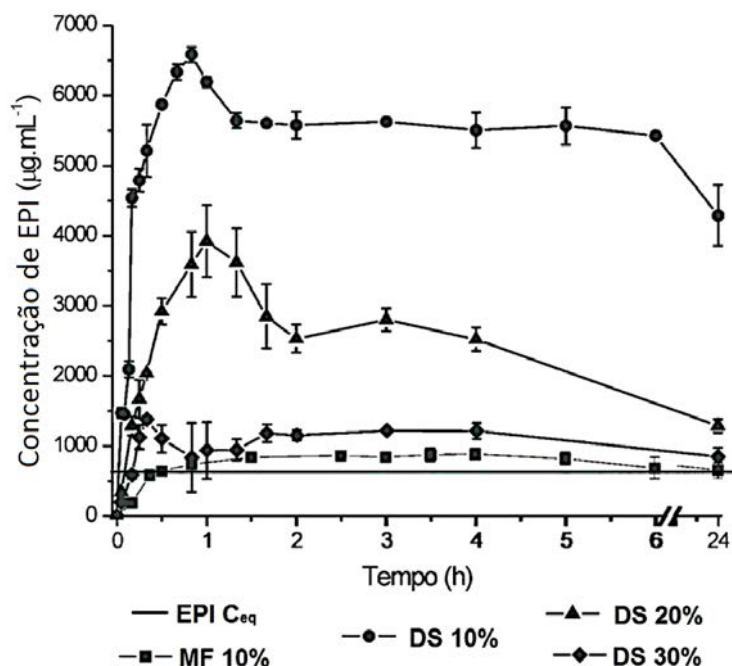
Figura 54– Perfil de dissolução teórico das dispersões sólidas compostas por HPMC 5E e Epiisopiloturina.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Para os sistemas compostos com o carreador HPMCAS (Figura 55), o SI = 0,1 permite enxergar o perfil “salto e para-quedas” (do inglês *spring and parachute*) para todas as concentrações de protótipo testadas. A completa ausência de cristais observada para a dispersão com 10% de EPI faz com que esta alcance a concentração de saturação crítica e inicie os eventos de nucleação e cristalização, porém muito lentamente. Esse aspecto “para-quedas” bem evidenciado para todas as concentrações testadas é característico dos sistemas dispersos obtidos com este polímero, devido à formação de partículas coloidais, como já previamente discutido (CURATOLO; NIGHTINGALE; HERBIG, 2009; FRIESEN *et al.*, 2008). Curatolo e colaboradores (2009) testou alguns polímeros com 9 diferentes fármacos pobremente solúveis em água e constatou que HPMCAS apresenta uma superioridade como inibidor de precipitação, também devido a habilidade de formar partículas coloidais. Assim como visto aqui, o retardamento dos eventos de nucleação e cristalização duram durante todo o experimento (25 horas). De acordo com Friesen e colaboradores (2008), esse fenômeno pode ser estável mesmo durante várias horas ou até mesmo dias, e essas nanoestruturas são a chave para performance das dispersões sólidas compostas por HPMCAS.

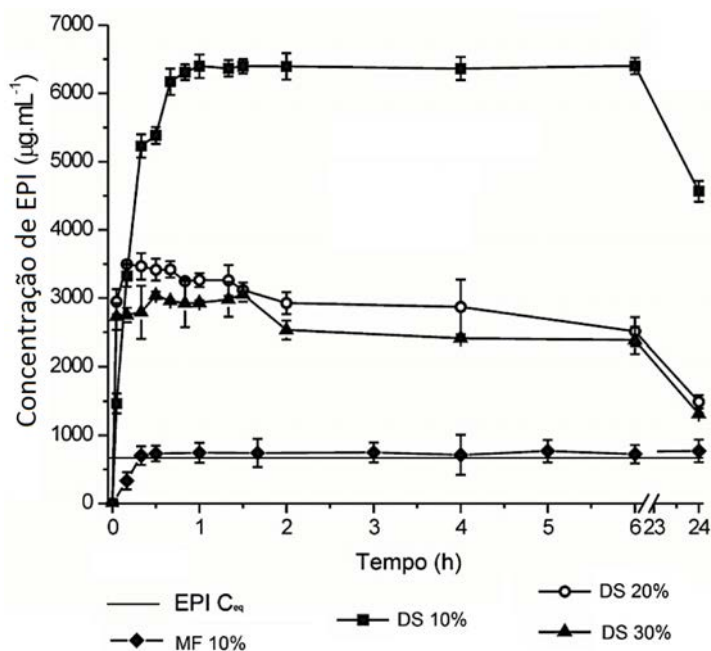
Figura 55– Perfil de dissolução das dispersões sólidas compostas por HPMCAS e Epiisopiloturina, em diferentes proporções.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Já para os sistemas compostos por PVP K-30, o estudo do perfil de dissolução foi limitado a concentração de 30% de EPI, já que a tendência real é a performance da dissolução reduzir em função do aumento da carga de soluto. Para esses sistemas, o perfil de dissolução (Figura 56) demonstrou uma forte habilidade do polímero em prevenir os eventos de nucleação e cristalização do protótipo. Nota-se que, para a ds 10%, não é evidenciado sinal de precipitação até as 6h de experimento, sendo a concentração mantida na concentração máxima teórica de protótipo. Uma vez que o PVP K-30 não interfere na concentração de equilíbrio da EPI (de acordo com o estudo da solubilidade de equilíbrio), essa habilidade de sustentar altas concentrações do protótipo no meio de dissolução durante um longo período de pode ser atribuída a duas possíveis situações: 1) há a nucleação de uma estrutura de EPI metaestável, que facilita a manutenção desses níveis de protótipo no meio; ou 2) o polímero é bastante eficaz para impedir os eventos e nucleação e cristalização da substância em análise.

Figura 56– Perfil de dissolução das dispersões sólidas compostas por PVP K-30 e Epiisopiloturina, em diferentes proporções.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Para sanar essa dúvida, cristais de EPI oriundos das DS 20 e 30% foram coletados, filtrados e levados à análise de DRX. Através deste resultado (dado não apresentado) concluiu-se que não houve a formação de uma nova estrutura cristalina. Desse modo, pode-se concluir que não há modificação na estrutura cristalina do protótipo quando precipitado, e a explicação mais plausível para manutenção dos altos níveis de EPI no meio de dissolução é devido a habilidade do polímero em inibir a precipitação devido a formação de interações com o protótipo no meio de dissolução.

Diante do exposto, a comparação das performances só pode ser realizada entre os sistemas compostos por HPMCAS e PVP K-30, já que apenas nessas situações exatamente as mesmas condições puderam ser empregadas. As áreas sob a curva calculadas para esses sistemas (Tabela 7) mostram que foi possível alcançar um incremento da cinética de dissolução do protótipo de 10,57; 4,3; e 2,19 vezes para as dispersões HPMCAS 10, 20 e 30%, respectivamente; e de 12,04; 5,54; e 5,46 vezes para as dispersões PVP K-30 10, 20 e 30%, respectivamente.

Tabela 7– AUC da média de três perfis de dissolução, durante 24 h, da EPI isolada e dispersões sólidas obtidas com os polímeros HPMCAS e PVP K-30.

Amostra	AUC
EPI	11405
DS HPMCAS 10%	120558,23
DS HPMCAS 20%	49126,84
DS HPMCAS 30%	24978,72
DS PVP K-30 10%	137362,26
DS PVP K-30 20%	63273,18
DS PVP K-30 30%	62377,59

Fonte: dados da pesquisa (2017).

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade demonstrou comportamentos discrepantes em relação às dispersões sólidas a base de PVP K-30 e HPMCAS. Para o primeiro, em apenas 4 dias de exposição às condições de estabilidade acelerada, as amostras contendo todos os percentuais de protótipo transformaram-se de pó para pasta, indicando que houve absorção de quantidade relevante de água do ambiente pela amostra. Esse comportamento é compreensível devido a alta higroscopicidade do polímero, sendo capaz de absorver do ambiente grande quantidade de água mesmo que submetido a baixa umidade relativa do ambiente (UR) (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Dessa forma, os experimentos de dissolução e DRX para os sistemas dispersos a base de PVP K-30 não puderam ser efetuados.

Por outro lado, esse problema não foi evidenciado para a dispersões sólidas a base de HPMCAS, apesar de ser descrito como higroscópico pelo *handbook* de excipientes farmacêuticos. De acordo com o fabricante ShinEtsu®, a quantidade de água absorvida pelo polímero no equilíbrio é inferior a 6 % p/p quando sob UR 75%. Já para o PVP-K30, estima-se um acúmulo de água de, aproximadamente, 30%, considerando também uma UR de 75% (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

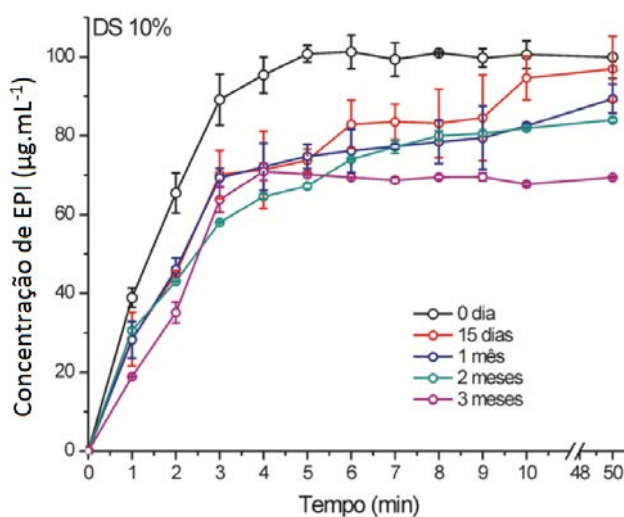
Outras características do polímero dão base para o resultado discrepante observado aqui. O HPMCAS possui uma Tg relativamente alta quando a umidade relativa (UR) do ar é de 0%, e baixa dependência da Tg com as variações sofridas no percentual de UR. Por outro lado, apesar de PVP K-30 possuir alta Tg quando em UR 0%, esta característica é altamente dependente de suas variações, em que reduz quando a UR aumenta. Estima-se que a Tg do PVP K-30 pode alcançar 50°C quando submetido a uma UR de 50%. Uma vez que a Tg deve ser 30 - 50°C superior a temperatura ambiente para alcançar uma baixa mobilidade molecular e evitar, assim, a recristalização, nota-se que o PVP K-30 é desfavorável a esta estabilidade física (a

relação entre Tg e estabilidade é descrita na equação de Gordon-Taylor) (CURATOLO; NIGHTINGALE; HERBIG, 2009).

As Figuras 57, 58 e 59 apresentam os perfis de dissolução e os difratogramas de Raios-X para as concentrações de EPI de 10, 20 e 30%, respectivamente. Através delas, nota-se que para o sistema disperso composto de 10% do protótipo, a amostra manteve-se amorfa durante todo o período analisado (3 meses). Os valores de eficiência de dissolução (ED%) obtidos foram: $88,58 \pm 2,93$; $70,61 \pm 4,4$; $67,74 \pm 3,34$; $64,9 \pm 3,7$; e $60,02 \pm 3,00$ para os tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias. Algum processo de nucleação e cristalização provavelmente ocorreu entre o tempo 0 e o tempo 15 dias, que repercutiu na redução da ED% de forma estatisticamente significativa ($p = 0,0048$), provavelmente devido à pequena absorção de água do ambiente, até alcançar o equilíbrio. Assim, o perfil de dissolução se mantém muito parecido entre 15 dias e 3 meses de avaliação. A diferença observada na ED% do tempo 0 para o tempo 90 dias foi de 28,56%.

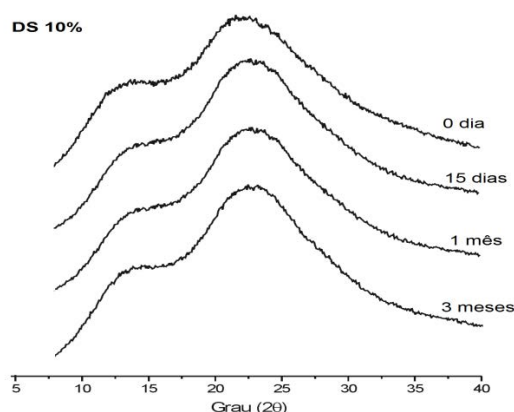
Figura 57– (a) Dissolução sob condição sink para DS HPMCAS (10% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, 2 e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR; (b) Difratogramas de Raios-X para DS HPMCAS (10% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR.

(a)



Fonte: dados da pesquisa (2017).

(b)

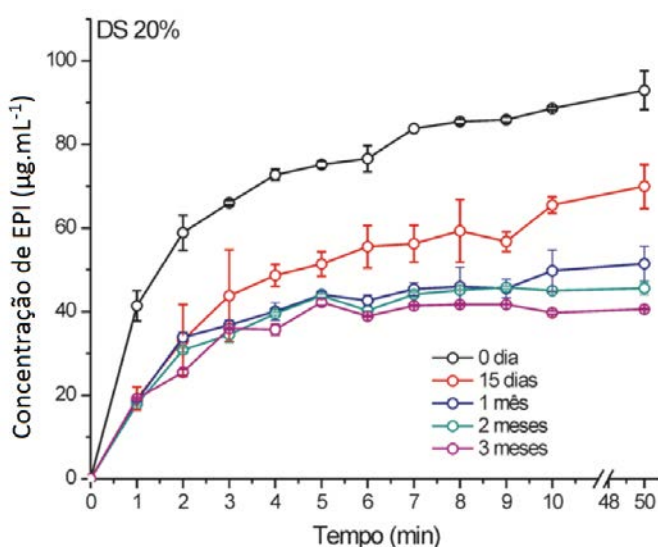


Fonte: dados da pesquisa (2017).

Os sistemas dispersos compostos por 20 e 30% de EPI já iniciaram a avaliação da estabilidade com a presença de cristais. Foram obtidos valores de ED% de $72,74 \pm 4,46$; $46,06 \pm 1,91$; $38,27 \pm 2,69$; $36,87 \pm 1,65$; $35,61 \pm 1,07$ para as DS conceto 20% de EPI nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias, respectivamente; E as ED% de $50,026 \pm 1,49$; $52,39 \pm 1,37$; $45,74 \pm 0,6$; $39,86 \pm 1,24$; e $34,11 \pm 1,57$ para as DS conceto 30% de EPI nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias, respectivamente. A Figura 58b mostra, portanto, a evolução da cristalinidade da amostra (DRX) e a repercussão disso na performance avaliada pelo perfil de dissolução.

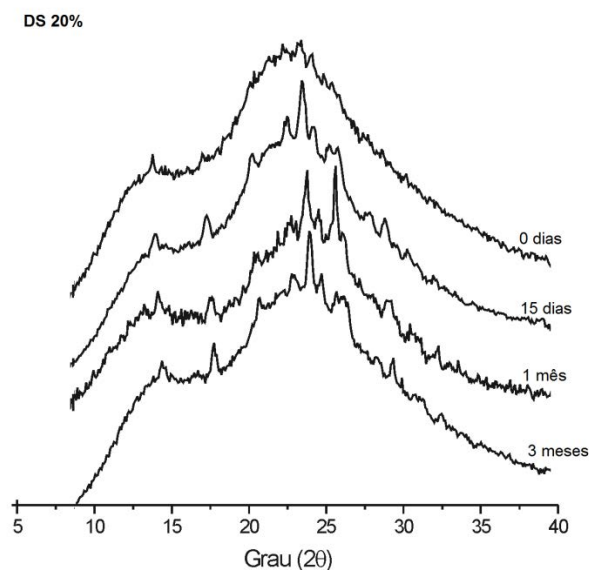
Figura 58– (a) Dissolução sob condição sink para DS HPMCAS (20% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, 2 e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR; (b) Difratomogramas de Raios-X para DS HPMCAS (20% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR.

(a)



Fonte: dados da pesquisa (2017).

(b)

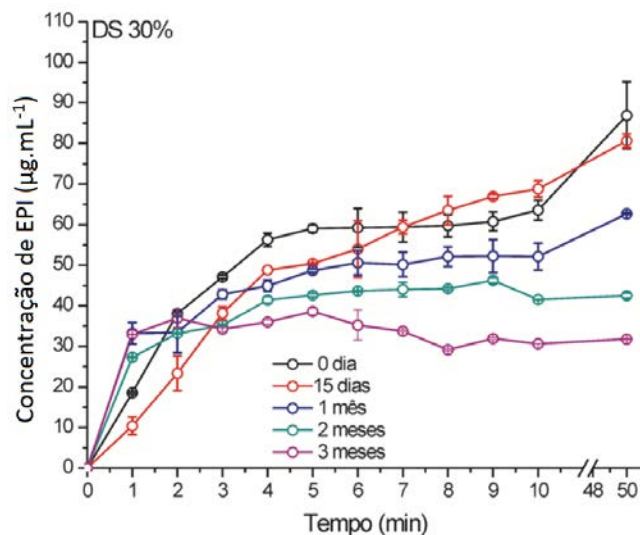


Fonte: dados da pesquisa (2017).

Em concordância com a teoria, as dispersões sólidas compostas por 30% de EPI apresentam a pior performance no perfil de dissolução (Figura 59). Ainda, as curvas se mantêm mais próximas uma vez que a amostra já iniciou a avaliação como cristalina. De forma interessante, observa-se uma alteração do hábito cristalino da EPI após 1 mês de exposição às condições de estabilidade e nas condições desse experimento. Um pico adicional (principal) em aproximadamente $10^\circ 2\theta$, de grande intensidade, passa a fazer parte do difratograma da amostra.

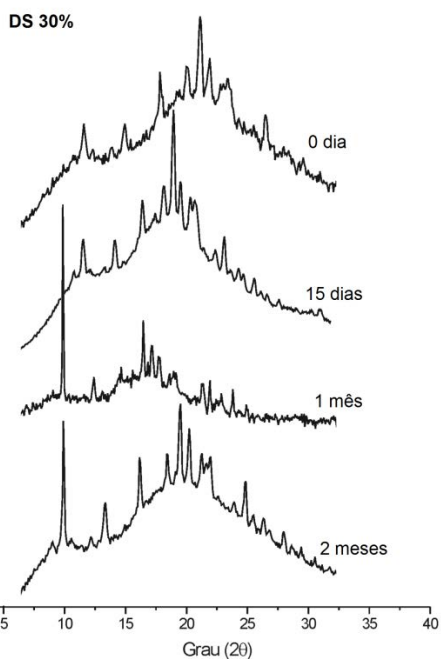
Figura 59– (a) Dissolução sob condição sink para DS HPMCAS (30% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, 2 e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR; (b) Difrátogramas de Raios-X para DS HPMCAS (30% de EPI) em 0 dia, 15 dias, 1, e 3 meses de exposição a 40°C e 75% UR.

(a)



Fonte: dados da pesquisa (2017).

(b)



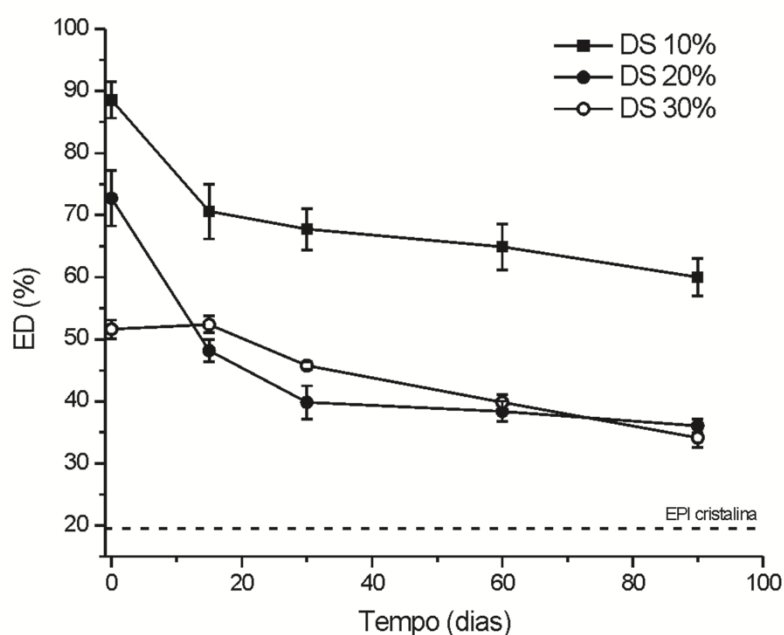
Fonte: dados da pesquisa (2017).

Considerando as condições do experimento e a tendência de o soluto iniciar os processos de nucleação e cristalização, é possível assumir que o sistema formulado com HPMCAS possui boa estabilidade. A literatura indica as dispersões baseadas em HPMCAS como muito estáveis,

justificada pela alta solubilidade da maioria dos compostos no polímero, e também devido a sua T_g , que além de possuir alto valor, é independente da UR, como já mencionado (CURATOLO; NIGHTINGALE; HERBIG, 2009). Assim, esse comportamento é evidenciado mesmo em temperaturas de 40°C e umidade relativa do ar superior a 60% RH, tornando a difusão como etapa limitante à cristalização do fármaco (FRIESEN *et al.*, 2008).

A Figura 60 apresenta um resumo quanto à eficiência de dissolução dos sistemas em função do tempo. Com base nos últimos quatro pontos dessas curvas, calculou-se uma perda de 0,1347% e 0,23% por dia para as DS compostas por 10 e 30% de EPI, respectivamente ($R^2 = 0,97$ e $0,95$, respectivamente).

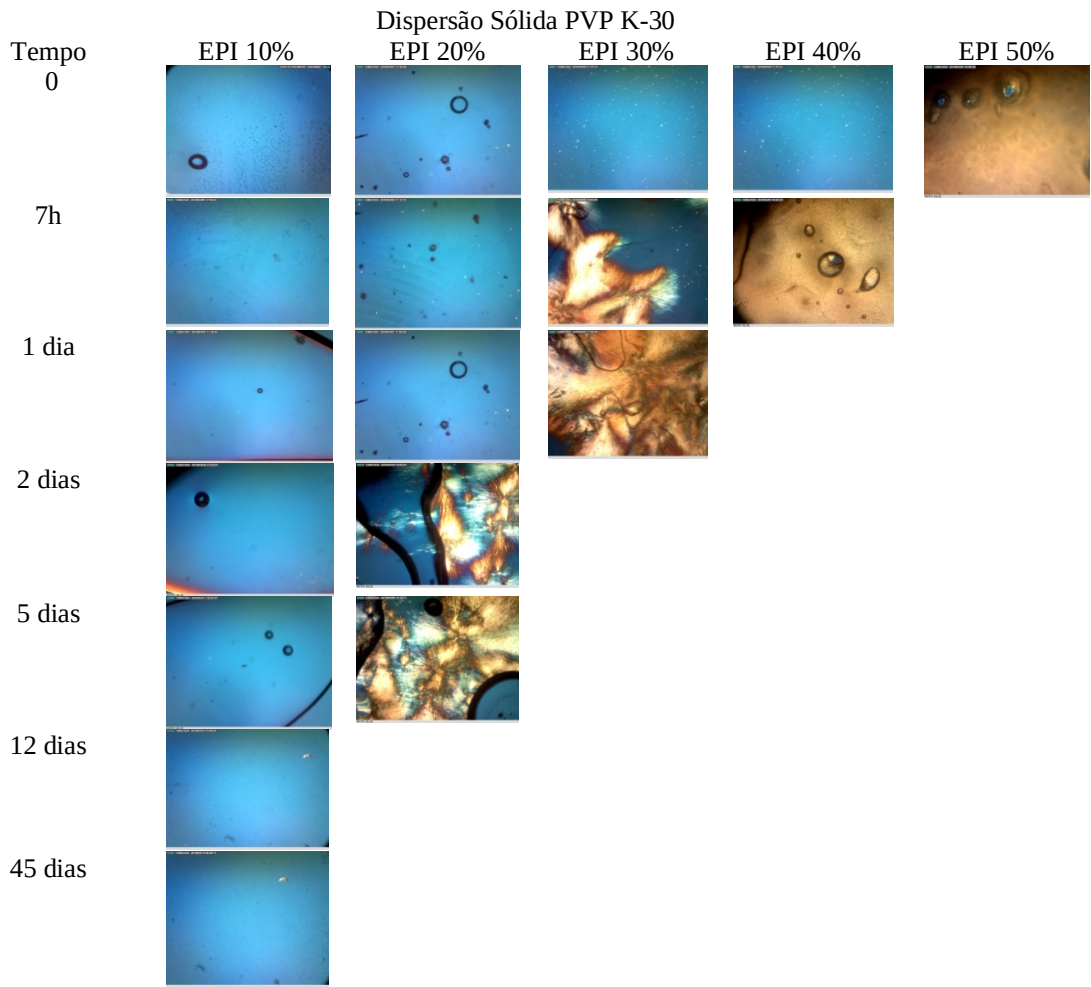
Figura 60 - Eficiência de Dissolução (ED%) em função do tempo para as DS compostas por HPMCAS sob condição de estabilidade acelerada.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

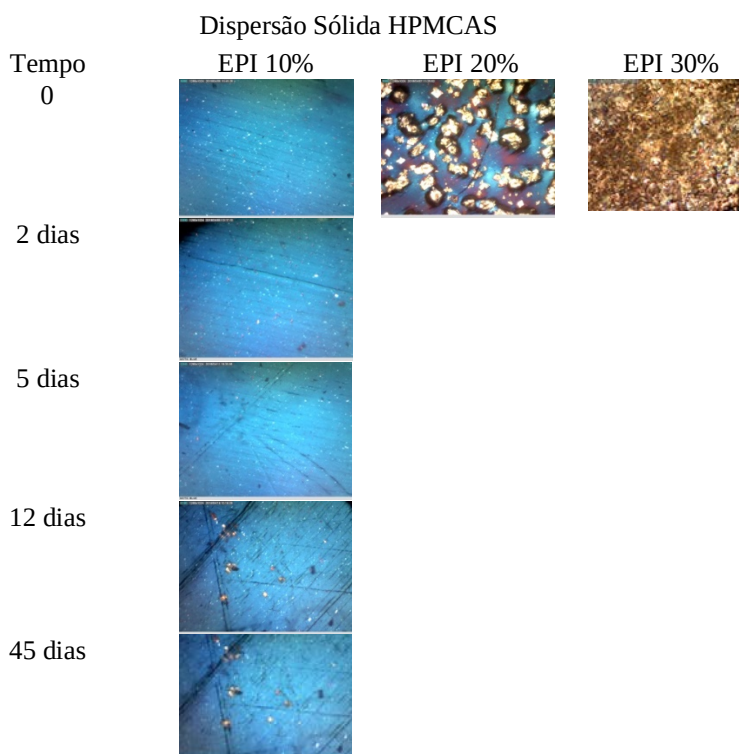
Visando tornar comparável a estabilidade das dispersões a base de PVP K-30 e HPMCAS, foi desenvolvido um estudo mais simples, porém capaz de identificar o processo de cristalização das amostras. A partir da exposição de um disco de dispersão de 6 mm de diâmetro às condições de estabilidade acelerada, foram registrados os comportamentos dos sistemas em função do tempo, com o auxílio de um microscópio de polarização (Figuras 61 e 62).

Figura 61– Avaliação da estabilidade acelerada das dispersões sólidas a base de PVP K-30 através da microscopia de polarização.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Figura 62– Avaliação da estabilidade acelerada das dispersões sólidas a base de HPMCAS através da microscopia de polarização.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

Surpreendentemente, a dispersão sólida a base de PVP K-30 contendo 10% de protótipo não apresentou evento de cristalização em até 45 dias de avaliação. Já para o aporte de 20%, 30 e 40%, o evento de cristalização já havia acontecido em 2 dias, 7 horas e 7 horas, respectivamente. As dispersões formuladas com HPMCAS contendo 10% de EPI só apresentou cristalização no 12º dia de avaliação. Considerando a recristalização do protótipo, a dispersão formulada com PVP K-30 e composta de 10% de protótipo é ainda mais estável, do ponto de vista físico, do que a dispersão formulada com HPMCAS, na mesma proporção de protótipo. É válido destacar, ainda, que o evento de cristalização não aconteceu para o primeiro mesmo havendo uma significativa absorção de água do ambiente, mesmo sabendo-se que a água funciona como um plastificante, aumentando a mobilidade molecular e, teoricamente, facilitando a recristalização. Do ponto de vista químico e microbiológico, essa absorção de água é maléfica em virtude da aceleração da degradação química e da contaminação e crescimento dos microrganismos (YU, 2001).

6 CONCLUSÃO

Este trabalho trouxe contribuições importantes sobre características-chave do protótipo Epiisopiloturina. Assume-se aqui que, diante da administração oral, a EPI permanecerá, majoritariamente, iônica durante todo o TGI, podendo sofrer precipitação no intestino devido a sua baixa concentração de equilíbrio no pH 6,8. A taxa de dissolução intrínseca característica de substâncias insolúveis conforme o sistema de classificação biofarmacêutico reforça essa hipótese.

O estudo de miscibilidade fármaco-polímero demonstrou ser muito útil no direcionamento racional para obtenção de dispersões sólidas, entretanto, destacou-se aqui que os métodos convencionais (parâmetros de Hansen e de Flory-Huggins) foram menos realísticos do que a abordagem do tempo de indução, e esse último parâmetro pode ser empregado no estudo de dispersões sólidas envolvendo outros fármacos no futuro.

Por fim, a cinética de dissolução da EPI foi aumentada em até 12 vezes, quando analisada a área sob a curva dos sistemas em comparação à área sob a curva do protótipo cristalino. As melhores dispersões obtidas nesse trabalho foram as soluções sólidas compostas por HPMCAS ou PVP K-30, ambas contendo 10% de EPI, cujo estudo de estabilidade chama atenção para higroscopicidade do PVP K-30.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar teste de permeabilidade com a epiisopiloturina para propor sua classificação biofarmacêutica;
- Ampliar o estudo de miscibilidade para outros polímeros e outras moléculas biologicamente ativas;
- Aplicar os sistemas desenvolvidos em modelos *in vivo* visando observar o benefício do incremento da área sob a curva nessas circunstâncias;

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. D. S. *et al.* Avanços, propriedades e aplicações de dispersões sólidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 33, n. 1, p. 17–25, 2012.
- ALVES, L. F. Production of Phytotherapeutics in Brazil: History, Problems and Perspectives. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 3, p. 450–513, 2013. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20130038>>.
- AUGUSTIJNS, P.; BREWSTER, M. Supersaturating Drug Delivery Systems: Fast is Not Necessarily Good Enough. *International Journal of Drug Development and Research*, v. 101, n. 1, p. 7–9, 2012.
- AVANCINI, G. *et al.* Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry*, v. 63, n. 2, p. 171–175, 2003.
- BAGHEL, S. *et al.* An investigation into the crystallization tendency/kinetics of amorphous active pharmaceutical ingredients: A case study with dipyrindamole and cinnarizine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 104, p. 59–71, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.04.017>>.
- BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 105, n. 9, p. 2527–2544, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2015.10.008>>.
- BAIRD, Jared A.; TAYLOR, Lynne S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. , v. 64, n. 5, p. 396–421.
- BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 106, n. 4, p. 315–324, 2002.
- BERNABÉ, É. DE C. *Extração de pilocarpina e epiisopiloturina de jaborandi utilizando processos envolvendo solventes supercríticos* Élide de Castilho Barnabé. 2008. 85 f. 2008.
- BIKIARIS, D. *et al.* Physicochemical studies on solid dispersions of poorly water-soluble drugs: Evaluation of capabilities and limitations of thermal analysis techniques. *Thermochimica Acta*, v. 439, n. 1–2, p. 58–67, 2005.

BLOMBERG, F.; MAURER, W.; RÜTERJANS, H. Nuclear magnetic resonance investigation of ^{15}N -labeled histidine in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, v. 99, n. 25, p. 8149–59, 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/925263>>.

BOX, K. *et al.* High-throughput measurement of pKa values in a mixed-buffer linear pH gradient system. *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 4, p. 883–892, 2003.

BRASIL, M. DAS S. A. N. DE V. S. *Farmacopéia Brasileira*. [S.l: s.n.], 2010. v. 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>.

CHIOU, W. L.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 60, n. 9, p. 1281–1302, 1971.

CHIOU, W. L.; RIEGELMAN, S. Preparation and dissolution characteristics of several fast-release solid dispersions of griseofulvin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, n. 12, p. 1505–1510, 1969.

COSTA, R.S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará, 2010.

COSTA, S. P. M. *et al.* Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. *Thermochimica Acta*, v. 562, p. 29–34, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2013.03.003>>.

CRAIG, D. Q. M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 231, n. 2, p. 131–144, 2002.

CRUAÑES, M. T. *et al.* Technical note: Non-sink dissolution media for identification of functional formulation excipients-the case of a precipitation inhibitor. *Dissolution Technologies*, v. 20, n. 4, p. 39–41, 2013.

CURATOLO, W.; NIGHTINGALE, J. A.; HERBIG, S. M. Utility of hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMCAS) for initiation and maintenance of drug supersaturation in the GI milieu. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 6, p. 1419–1431, 2009.

DAHAN, A.; MILLER, J. M.; AMIDON, G. L. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The AAPS journal*, v. 11, n. 4, p. 740–746, 2009.

DANIEL, J. S. P. *et al.* Caracterização no estado sólido e compatibilidade farmacêutica de cloridrato de ziprasidona. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 36, n. 4, p. 497–502, 2015.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 321, n. 1–2, p. 1–11, 2006.

DOKOUMETZIDIS, A.; PAPADOPOULOU, V.; MACHERAS, P. Analysis of Dissolution Data Using Modified Versions of Noyes–Whitney Equation and the Weibull Function. *Pharmaceutical Research*, v. 23, n. 2, p. 256–261, 2006.

EL'TSOVA, N. O.; GOLUBITSKII, G. B.; BUDKO, E. V. Analytical methods for studying the stability of pharmaceutical compositions and the compatibility of their components. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 69, n. 10, p. 917–928, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1061934814100062>>.

EMA – EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Pre-authorization Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Medicinal Products for Human Use. DRAFT. Guideline on the investigations of bioequivalence. London, 2008. (CPM/EWP/QWP/1401/98). Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1.pdf>. Acesso em: 16 de setembro de 2009.

FDA Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Rockville:FDA, p. 1-13. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 20 de abril de 2009.

FRIESEN, D. T. *et al.* Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-based spray-dried dispersions: An overview. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 6, p. 1003–1019, 2008.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 2, p. 178–182, 2005.

GIRI, T. K. *et al.* A novel and alternative approach to controlled release drug delivery system based on solid dispersion technique. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, v. 50, n. 2, p. 147–159, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2012.07.002>>.

GOLDBERG, A. H.; GIBALDI, M.; KANIG, J. L. Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures II: Experimental evaluation of a eutectic mixture: Urea-acetaminophen system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 55, n. 5, p. 482–487, 1966.

GREENHALGH, D. J. *et al.* Solubility parameters as predictors of miscibility in solid dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 88, n. 11, p. 1182–90, 1999.

GUIMARÃES, M. A. *et al.* Nanopharmaceutical approach of epiisopiloturine alkaloid carried in liposome system: preparation and in vitro schistosomicidal activity. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 14, n. 6, p. 4519–28, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24738423>>.

GUMIER-COSTA, F. *et al.* Parcerias institucionais e evolução do extrativismo de jaborandi na Floresta Nacional de Carajás, Pará, Brasil. *Sustentabilidade em Debate*, v. 7, n. 3, p. 91, 2016. Disponível em: <<http://periodicos.unb.br/index.php/sust/article/view/18955>>.

GUPTA, J. *et al.* Prediction of solubility parameters and miscibility of pharmaceutical compounds by molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 115, n. 9, p. 2014–2023, 2011.

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, 2017. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00788>>.

HANSEN, Charles M. 50 Years with solubility parameters - Past and future. *Progress in Organic Coatings*, 2004. , v. 51, n. 1, p. 77–84.

HIRASAWA, N. *et al.* Physicochemical Characterization and Drug Release Studies of Nilvadipine Solid Dispersions Using Water-Insoluble Polymer as a Carrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 29, n. 3, p. 339–344, 2003.

HIXSON, A. W.; CROWELL, J. H. Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation. *Industrial & Engineering Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 923–931, 1931.

HOSSAIN, M. F. UV-Metric, pH-Metric and RP-HPLC Methods to Evaluate the Multiple pKa Values of a Polyprotic Basic Novel Antimalarial Drug Lead, Cyclen Bisquinoline. *Modern Chemistry & Applications*, v. 2, n. 4, 2014. Disponível em: <<http://esciencecentral.org/journals/uvmetric-phmetric-and-rphplc-methods-to-evaluate-the-multiple-pka-values-of-a-polyprotic-basic-novel-antimalarial-drug-lead-cyclen-bisquinoline-2329-6798.1000145.php?aid=36508>>.

HUANG, Y.; DAI, W. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 4, n. 1, p. 18–25, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2013.11.001>>.

INCECAYIR, T.; TSUME, Y.; AMIDON, G. L. Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and caco-2 cells: Use as a reference standard for BCS

classification. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 3, p. 958–966, 2013.

ISSA, M. G.; FERRAZ, H. G. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies*, v. 18, n. 3, p. 6–13, 2011.

JANSSENS, S.; VAN DEN MOOTER, G. Review: physical chemistry of solid dispersions. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 61, n. 12, p. 1571–1586, 2009.

JÚLIO, T. A. *et al.* Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC – UV. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 111, n. 3, p. 2037–2044, 2013.

JUPPO, A. M.; BOISSIER, C.; KHOO, C. Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, n. 2, p. 385–401, 2003.

KIM, K. T. *et al.* Solid Dispersions as a Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 41, n. 3, p. 125–142, 2011.

KIM, N. A. *et al.* Investigation of polymeric excipients for dutasteride solid dispersion and its physicochemical characterization. *Archives of Pharmacal Research*, v. 37, n. 2, p. 214–224, 2014.

KOSTEWICZ, E. S. *et al.* In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 57, n. 1, p. 342–366, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.024>>.

LACHMAN, L.; LIEBERMEN, H.A.; KANIG, J.L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica¹. ed. Lisboa: Fundação Galoute Guldenkian,. v. II, pp. 1017, 2001.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, v. 50, n. 1, p. 47–60, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840192>>.

LI, J.; CHIAPPETTA, D. An investigation of the thermodynamic miscibility between VeTPGS and polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, n. 1–2, p. 212–219, 2008.

LIMA, L. I. *Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide epiisopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral*. 2016. 49 f. 2016.

M. VERAS, L. *et al.* Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 13, p. 2051–2058, 2012.

MANIRUZZAMAN, M. *et al.* Molecular Modeling as a Predictive Tool for the Development of Solid Dispersions. *Molecular Pharmaceutics*, v. 12, n. 4, p. 1040–1049, 2015.

MARSAC, P. J.; LI, T.; TAYLOR, L. S. Estimation of drug-polymer miscibility and solubility in amorphous solid dispersions using experimentally determined interaction parameters. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 1, p. 139–151, 2009.

MARSAC, P. J.; SHAMBLIN, S. L.; TAYLOR, L. S. Theoretical and practical approaches for prediction of drug-polymer miscibility and solubility. *Pharmaceutical Research*, v. 23, n. 10, p. 2417–2426, 2006.

MELO, C. M. *et al.* A compatibility study of the prototype epiisopiloturine and pharmaceutical excipients aiming at the attainment of solid pharmaceutical forms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 120, n. 1, p. 689–697, 2015.

MENDONÇA, C. M. S. *et al.* Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, n. 3, p. 2277–2285, 2013.

MENG, F. *et al.* Investigation and correlation of drug polymer miscibility and molecular interactions by various approaches for the preparation of amorphous solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 71, p. 12–24, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.003>>.

MENG, Fan; DAVE, Vivek; CHAUHAN, Harsh. Qualitative and quantitative methods to determine miscibility in amorphous drug-polymer systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015. , v. 77, p. 106–111.

MIURAS, M. L. C. *Isolamento do alcalóide Epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (Pilocarpus microphyllus) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antivira, antiesquistosoma e silagoga*. 2009. 123 f. 2009.

MOYANO, A.; BROUSSALIS, Æ. A. M.; SEGALL, A. I. Thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipientes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 99, n. 2, p. 631–637, 2010.

NGUYEN, T. N. G. *et al.* Development of a Sustained Release Solid Dispersion Using Swellable Polymer by Melting Method. *Pharmaceutical Research*, v. 33, n. 1, p. 102–109, 2016.

NICKLASSON, M.; BRODIN, A.; SUNDELÖF, L. O. On the determination of true dissolution rate parameters from rotating disc experiments. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 87–95, 1983.

NICOLAU, L. A. D. *et al.* Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *ScienceDirect*, v. 87, p. 188–195, 2017.

NOYES, A. A.; WHITNEY, W. R. The Rate of Solution of Solid Substances in Their Own Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 19, n. 12, p. 930–934, 1897.
Disponível em: <http://pubs3.acs.org/acs/journals/doilookup?in_doi=10.1021/ja02086a003>.

O'DRISCOLL, C. M.; GRIFFIN, B. T. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility-The potential impact of lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 6, p. 617–624, 2008.

OHARA, T. *et al.* Dissolution mechanism of poorly water-soluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 302, n. 1–2, p. 95–102, 2005.

OLIVEIRA, M. A. DE; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. DE L. Revisão. *Quim. Nova*, v. 34, n. 7, p. 1224–1230, 2011.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L. *et al.* In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, n. 4, p. 325–329, 2007.

OZAWA, T. A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 38, n. 11, p. 1881–1886, 1965.

PARIKH, T. *et al.* Application of Film-Casting Technique to Investigate Drug-Polymer Miscibility in Solid Dispersion and Hot-Melt Extrudate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, n. 7, p. 2142–2152, 2015.

PATEL, D. D. *et al.* Maintenance of supersaturation I: Indomethacin crystal growth kinetic modeling using an online second-derivative ultraviolet spectroscopic method. *Wiley Online Library*, v. 7, n. 100, p. 2623–2640, 2011.

PERAL, F.; GALLEGÓ, E. Study by ultraviolet spectroscopy on self-association of purine, 6-methylpurine, benzimidazole, and imidazo [1,2-a]pyridine in aqueous solution. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 56, n. 4, p. 747–759, 2000.

PHAM-THE, H. *et al.* Provisional Classification and in Silico Study of Biopharmaceutical System Based on Caco - 2 Cell Permeability and Dose Number. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 6, p. 2445–2461, 2013.

PHILLIPS, D. J. *et al.* Overcoming sink limitations in dissolution testing: A review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 64, n. 11, p. 1549–1559, 2012.

PORTES, M. C. *et al.* Structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine-metal complexes, and anthelmintic activity vs . *S. mansoni*. *Journal of Coordination Chemistry*, v. 8972, n. May, p. 1–21, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00958972.2016.1182162>>.

PRETORIUS, E.; BOUIC, P. J. D. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, n. 1, p. 270–5, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1208/s12249-009-9207-4/fulltext.html>>.

PUNČOCHOVÁ, K. *et al.* Identifying the mechanisms of drug release from amorphous solid dispersions using MRI and ATR-FTIR spectroscopic imaging. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 483, n. 1–2, p. 256–267, 2015.

QIAN, F. *et al.* Is a distinctive single Tg a reliable indicator for the homogeneity of amorphous solid dispersion? *International Journal of Pharmaceutics*, v. 395, n. 1–2, p. 232–235, 2010.

QIAN, F.; HUANG, J.; HUSSAIN, M. A. Drug–Polymer Solubility and Miscibility: Stability Consideration and Practical Challenges in Amorphous Solid Dispersion Development FENG. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 7, p. 2941–2947, 2010.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; QUINN, M. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 9a. ed. [S.l.: s.n.], 2009.

SALAMA, N. N.; MOHAMMAD, M. A.; FATTAH, T. A. Thermal Behavior , Compatibility Study and Decomposition Kinetics of Pioglitazone under Isothermal and Non-Isothermal Conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 120, n. 1, p. 953–958, 2015.

SANGSTER, A. W.; STUART, K. L. Spectra of. *Chem. Rev.*, v. 67, n. 276, p. 96–100, 1964.

SANTOS *et al.* Pesquisa , desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, v. 33, n. 1, p. 37–47, 2012.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: a survey of its chemical constituents and biological activities. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 2, p. 116–137, 2004.

SARODE, A. L. *et al.* Hot Melt Extrusion for Amorphous Solid Dispersions : Temperature and Moisture Activated Drug – Polymer Interactions for Enhanced Stability. 2013.

SIEPMANN, J. *et al.* HPMC-Matrices for Controlled Drug Delivery: A New Model Combining Diffusion, Swelling, and Dissolution Mechanisms and Predicting the Release Kinetics. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 11, p. 1748–1756, 1999.

SILVA, V. G. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *pilocarpus microphyllus*. *Journal of Natural Products*, v. 76, n. 6, p. 1071–1077, 2013.

SIMONELLI, A.; MEHTA, S.; HIGUCHI, W. Dissolution rates of high energy polyvinylpyrrolidone PVP sulfathiazole Coprecipitates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, n. 5, p. 538–549, 1969.

SIMONELLI, A. P.; MEHTA, S. C.; HIGUCHI, W. I. Dissolution rates of high energy sulfathiazole-povidone coprecipitates II: Characterization of form of drug controlling its dissolution rate via solubility studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 65, n. 3, p. 355–361, 1976.

SINGH, A.; VAN DEN MOOTER, G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 100, p. 27–50, 2016.

SOARES, M. F. D. L. R. *et al.* Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 104, n. 1, p. 307–313, 2011.

SOVIZI, M. R.; HOSSEINI, S. G. Studies on the thermal behavior and decomposition kinetic of drugs cetirizine and simvastatin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 111, n. 3, p. 2143–2148, 2013.

STEINMANN, P. *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*, v. 6, n. 7, p. 411–425, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790382>>.

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, 2012.

SUN, D. D.; LEE, P. I. Evolution of Supersaturation of Amorphous Pharmaceuticals: The Effect of Rate of Supersaturation Generation. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 11, p. 4330–4346, 2013.

SUN, D. D.; LEE, P. I. Haste Makes Waste: The Interplay Between Dissolution and Precipitation of Supersaturating Formulations. *The AAPS Journal*, v. 17, n. 6, p. 1317–1326, 2015a. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1208/s12248-015-9825-6>>.

SUN, D. D.; LEE, P. I. Probing the mechanisms of drug release from amorphous solid dispersions in medium-soluble and medium-insoluble carriers. *Journal of Controlled Release*, v. 211, n. 10, p. 85–93, 2015b.

TACHIBANA, T.; NAKAMURA, A. A method for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: Dispersion of β -carotene by polyvinylpyrrolidone. *Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift für Polymere*, v. 203, n. 2, p. 130–133, 1965.

TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, M. Host-guest interactions between swelling clay minerals and poorly water-soluble drugs. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 146, n. 2, p. 556–564, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002197979190219X>>.

TAM, K. Y.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: A validation study. *Analytica Chimica Acta*, v. 434, n. 1, p. 157–167, 2001.

THEEUWES, F.; GALE, R. M.; BAKER, R. W. Transference: a comprehensive parameter governing permeation of solutes through membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 1, n. C, p. 3–16, 1976.

THIRY, J. *et al.* Bioavailability enhancement of itraconazole-based solid dispersions produced by hot melt extrusion in the framework of the Three Rs rule. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.001>>.

TIAN, B. *et al.* A comparison of the effect of temperature and moisture on the solid dispersions: Aging and crystallization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 475, n. 1–2, p. 385–392, 2014.

TIAN, Y. *et al.* Construction of drug-polymer thermodynamic phase diagrams using flory-huggins interaction theory: Identifying the relevance of temperature and drug weight fraction to phase separation within solid dispersions. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 1, p. 236–248, 2013.

TRAN, P. H.-L. *et al.* Controlled release systems containing solid dispersions: strategies and mechanisms. *Pharmaceutical research*, v. 28, n. 10, p. 2353–78, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21553168>>.

TSINMAN, K. *et al.* Powder dissolution method for estimating rotating disk intrinsic dissolution rates of low solubility drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 9, p. 2093–2100, 2009.

TSUNASHIMA, D. *et al.* Preparation of extended release solid dispersion formulations of tacrolimus using ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose by solvent evaporation method. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 68, n. 3, p. 316–323, 2016.

VAN SPEYBROECK, M. *et al.* Enhanced absorption of the poorly soluble drug fenofibrate by tuning its release rate from ordered mesoporous silica. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 5, p. 623–630, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.002>>.

VÉRAS, L. M. C. *et al.* Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2013.

VERRECK, G. *et al.* Characterization of solid dispersions of itraconazole and hydroxypropylmethylcellulose prepared by melt extrusion—part I. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 251, n. 1–2, p. 165–174, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302005914>>.

VIANA, O. S. *et al.* Kinetic analysis of the thermal decomposition of efavirenz and compatibility studies with selected excipients. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 2, p. 211–216, 2008.

VIEIRA, A. C. Q. DE M. *et al.* Physical–chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, n. 3, p. 2339–2349, 2013.

VO, C. L.-N.; PARK, C.; LEE, B.-J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 85, n. 3, p. 799–813, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.09.007>>.

VÖLGYI, G. *et al.* Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system. *Analytica Chimica Acta*, v. 583, n. 2, p. 418–428, 2007.

WILDERMAN, M. Philosophical Magazine Series 6 LXI . On velocity of molecular and chemical reactions in heterogeneous systems. *Physiological Magazine*, v. 18, n. 106, p. 538–577, 1909.

XIANG, T. X.; ANDERSON, B. D. Molecular dynamics simulation of amorphous hydroxypropyl-methylcellulose acetate succinate (HPMCAS): Polymer model development, water distribution, and plasticization. *Molecular Pharmaceutics*, v. 11, n. 7, p. 2400–2411, 2014.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: Preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, n. 1, p. 27–42, 2001.

YU, L. X. *et al.* Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaver extensions. *Pharm. Res.*, v. 19, n. 7, p. 921–925, 2002.

YU, L. X. *et al.* Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 270, n. 1–2, p. 221–227, 2004.

YUASA, H. *et al.* Application of the Solid Dispersion Method to the Controlled Release of Medicine. VI. Release Mechanism of a Slightly Water Soluble Medicine and Interaction between Flurbiprofen and Hydroxypropyl Cellulose in Solid Dispersion. ... & *Pharmaceutical Bulletin*, v. 42, n. 2, p. 354–358, 1994. Disponível em: <<http://ci.nii.ac.jp/naid/130003773078/>>.

ZAJC, N. *et al.* Physical properties and dissolution behaviour of nifedipine/mannitol solid dispersions prepared by hot melt method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 291, n. 1–2, p. 51–58, 2005.

ZAKERI-MILANI, P. *et al.* Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 73, n. 1, p. 102–106, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.04.015>>.

ZRNCIC, M.; BABIC, S.; PAVLOVIC, D. M. Determination of thermodynamic p K a values of pharmaceuticals from five different groups using capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 38, n. 7, p. 1232–1239, 2015.