

Paola Aline Amarante Borba

**ESTRATÉGIAS TECNOLÓGICAS VISANDO AUMENTAR A  
SOLUBILIDADE E O PERFIL DE DISSOLUÇÃO DA  
TELMISARTANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Hellen Karine Stulzer

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Borba, Paola Aline Amarante

Estratégias tecnológicas visando aumentar a solubilidade e dissolução da Telmisartana / Paola Aline Amarante Borba ; orientadora, Hellen Karine Stulzer - Florianópolis, SC, 2014.

174 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Controle de qualidade. 3. Validação de metodologia analítica. 4. Complexos de inclusão em beta-ciclodextrinas. 5. Dispersões sólidas. I. Stulzer, Hellen Karine. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Paola Aline Amarante Borba

**ESTRATÉGIAS TECNOLÓGICAS VISANDO AUMENTAR A  
SOLUBILIDADE E O PERFIL DE DISSOLUÇÃO DA  
TELMISARTANA**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis - SC, 28 de Março de 2014

---

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczinski Pasa  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Hellen Karine Stulzer  
Orientadora

---

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto,  
UFSC - Membro Titular

---

Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira,  
UNICENTRO - Membro Titular

---

Dr. Jadel Müller Kratz,  
UFSC - Membro Titular



Dedico este trabalho aos meus pais, Celso e Vilma, aos meus irmãos e ao meu namorado pelo apoio, incentivo e por estarem presentes em todos os momentos desta jornada.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Hellen Karine Stulzer, pela oportunidade engrandecedora, confiança e apoio. Agradeço, sobretudo, pela imensa colaboração neste trabalho, constante incentivo da minha auto-superação e por transmitir o real espírito de liderança;

Aos professores do laboratório de controle de qualidade (LCQ), Marcos Antônio Segatto Silva, Silvia Lúcia Cuffini e Simone Gonçalves Cardoso pela descontração, ensinamentos e amizade;

Às minhas dedicadas ICs, Caroline Cavalleri e Marihá Pinotti, as quais tive o privilégio de trabalhar e cuja colaboração foi de extrema importância para realização deste trabalho;

À minha primeira orientadora, Profa. Dra. Bianca Ramos Pezzini, pela oportunidade como sua aluna de IC na Universidade da Região de Joinville (Univille) e pelo incentivo ao ingresso na pós-graduação;

Aos professores, alunos e funcionários da UFSC que de alguma forma colaboraram com este trabalho: Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campos, Prof. Dr. Adailton Bortoluzzi, Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, Matheus Vinícius de Oliveira Brisola Maciel e Dra. Renata Ozório;

O meu agradecimento especial aos professores e alunos colaboradores de outras universidades: Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Jr., seu aluno de doutorado George Ricardo Santana Andrade, Universidade Federal de Sergipe (UFS), pela colaboração nas análises de modulação molecular computacional; ao Prof. Dr. Daniel Fernandes, seu aluno de mestrado Luiz Renato Olchanheski Jr., Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pela colaboração nos ensaios *in vivo*;

Aos amigos e colegas do laboratório de controle de qualidade: Amarilis Scremin, Ana Carolina de Mello Miranda, Andrea Granada, Andrea Mariela Araya Sibaja, Andrea Mayumi Koroishi, Camila Konell, Cassiana Mendes, Cinira Fandaruff, Gabriela Rauber, Gislaine Kuminek, Karolyne Skripnik, Larissa Bernardi, Manoela Riekes, Monika Tagliari, Paulo Oliveira, Rafael Nicolay Pereira, Sana Siedler, Silvia Borgmann e Viviane Nart pelos ensinamentos, apoio técnico e alegrias;

Aos ICs do LCQ, Aline, Barbara, Bruno, Juliana e Thaís pelos momentos de descontração e amizade;

Aos meu pais Celso e Vilma pelo incentivo, apoio e por estarem sempre presentes em minha vida, principalmente neste período intenso do mestrado. Minha imensa gratidão pela dedicação, disposição, confiança e por não terem poupado esforços para investir na educação dos filhos;

Ao meu pai, por ter ensinado que tudo é possível desde que se tenha força de vontade, disciplina e foco;

À minha mãe, meu braço direito e fiel incentivadora, pela amizade, confiança e por estar sempre ao meu lado;

Aos meus irmãos, Diego e Marcela, pelo incentivo e amor que nos mantêm unidos nesta vida, mesmo à distância;

Ao meu namorado David, pela parceria, amizade, carinho, suporte técnico e apoio incondicional. Por ter me apresentado o processador de documentos LyX e outros programas que facilitaram muito a escrita desta dissertação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela estrutura e suporte financeiro, os quais viabilizaram a realização deste trabalho.



“Eu chamo de bravo aquele que ultrapassou seus desejos, e não aquele que venceu seus inimigos; pois a mais dura das vitórias é a vitória sobre si mesmo.”

(Aristóteles)



## RESUMO

A telmisartana (TEL) é um antagonista não peptídico do receptor da angiotensina II do tipo-1 utilizado no tratamento da hipertensão arterial sistêmica que apresenta problemas de biodisponibilidade em razão da sua baixa solubilidade aquosa. Não obstante, o fármaco apresenta três valores de pKa (3,5; 4,1 e 6,0) que restringem ainda mais a sua solubilidade. Neste contexto, o emprego de sistemas capazes de melhorar as características biofarmacêuticas da TEL através de complexos de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrinas (CIM) e dispersões sólidas (DS) foi proposto. Os CIM de TEL foram formados por 6 formulações, sendo três nas proporções hóspede:hospedeiro 1:2 (M2\_7, M2\_15 e M2\_30) e outras três na proporção 1:3 (M3\_7, M3\_15 e M3\_30). Estas foram obtidas pela técnica de ativação mecânica em moinho de bolas empregando-se diferentes tempos de moagem: 7, 15 e 30 minutos. As formulações sofreram graus diferentes de amorfização, sendo que os CIM moídos por 30 minutos (M2\_30 e M3\_30) apresentaram caráter amorfo com halos de cristalinidade residuais, associados a formação de ligações de hidrogênio entre hóspede e hospedeiro. Os melhores resultados de dissolução foram observados para as formulações submetidas a maiores tempos de moagem (M2\_30 e M3\_30), as quais foram capazes de liberar 81% e 74% do fármaco em apenas 5 minutos, respectivamente. Devido aos promissores resultados obtidos *in vitro*, M2\_30 e M3\_30 foram submetidas a estudos *in vivo*. Estas apresentaram efeitos anti-hipertensivos rápidos e eficazes para estas duas formulações frente a angiotensina II durante a totalidade do experimento, principalmente, nos primeiros 30 minutos após a administração oral, período crítico na absorção do fármaco. As dispersões sólidas de TEL foram obtidas em dois lotes, denominados lote A e lote B. O Lote A é formado por 5 formulações com diferentes proporções fármaco:alginato de sódio (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9), enquanto o lote B é composto por 5 formulações com diferentes proporções fármaco:cloridrato de quitosana (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9). Ambos os lotes foram obtidos através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas, sem adição de solvente e moídas pelo período de 45 minutos. As DS do lote A apresentaram-se amorfas com interações de hidrogênio formadas entre fármaco e carreador. As DS A11 e A13 apresentaram traços de cristalinidade. Os melhores resultados do lote A foram observados para as formulações contendo maiores proporções do carreador alginato de sódio (A15, A17 e A19), onde A15 foi capaz de aumentar a solubilidade aquosa da TEL em 1.638%, além de promover 83% de liberação da TEL em apenas 30 minutos em ensaio de dissolução *in vitro*, destacando-se dentre as outras formulações quanto a sua eficiência de dissolução (ED). Todas as DS do lote B apresentaram-se amorfas e expressaram ligações de hidrogênio entre fármaco e carreador. Este lote também demonstrou bons valores de rendimento, teor e aumentou com

sucesso a solubilidade aquosa da TEL. A formulação Q19 foi capaz de aumentar a solubilidade aquosa da TEL em 3.911% e apenas as formulações Q11 e Q13 apresentaram traços de cristalinidade. Contudo, as DS contendo cloridrato de quitosana apresentaram perfil de dissolução insatisfatório em tampão fosfato monobásico pH 7.5 (ajustado com NaOH) e ED indesejável, limitando a biodisponibilidade do fármaco. Os excelentes resultados em termos de solubilidade, dissolução e ED observados para as DS A15 foram determinantes na escolha desta como a melhor formulação dentre as DS obtidas. Os CIM e as DS do lote A, armazenados em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram submetidos a estudos de estabilidade física durante o período de 90 dias. Os CIM demonstraram mudanças físicas ao final de 90 dias, contudo as ligações de hidrogênio entre hóspede e hospedeiro se mantiveram estáveis ao final dos estudos de estabilidade. As DS do lote A apresentaram-se estáveis fisicamente após o período de 90 dias, sendo demonstrado a manutenção das ligações de hidrogênio entre fármaco e carreador durante os 90 dias. É importante mencionar que todas as formulações, obtidas através dos diferentes sistemas, apresentaram resultados promissores e inovadores no que se refere às propriedades biofarmacêuticas da telmisartana e, desse modo, são considerados executáveis no tratamento farmacológico da hipertensão arterial.

**Palavras-chave:** telmisartana, caracterização, validação de método analítico,  $\beta$ -ciclodextrinas, dispersões sólidas, estabilidade física

## ABSTRACT

Telmisartan (TEL) is a non-peptide angiotensin II type-1 receptor used in the treatment of hypertension that has bioavailability problems because of its low aqueous solubility. Furthermore, the drug presents three pKa values (3.5, 4.1 and 6.0) further restricting their solubility. In this context, the use of systems capable of improving the biopharmaceutical characteristics of TEL through inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrins (CIM), and solid dispersions (DS) has been proposed. The CIM of TEL are formed by 6 formulations, three in guest:host ratios 1:2 (M2\_7, M2\_15 and M2\_30) and three in the ratio 1:3 (M3\_7, M3\_15 and M3\_30). These were obtained by the technique of mechanical activation in a ball mill using different milling times of 7, 15 and 30 minutes. The formulations showed different degrees of amorphization, and the CIM milled for 30 minutes (M2\_30 and M3\_30) presents amorphous characteristics with halos of residual crystallinity, associated with the formation of hydrogen bonds between host and guest. The best dissolution results were observed for the formulations submitted to higher milling times (M2\_30 and M3\_30), which were able to release 81 % and 74 % of the drug in only 5 minutes, respectively. Due to the promising results obtained *in vitro*, M2\_30 and M3\_30 were subjected to *in vivo* studies. These two formulations showed rapid and efficacious antihypertensive effects against angiotensin II during the entire experiment, mainly in the first 30 minutes after oral administration, the critical absorption drug period. TEL's solid dispersions were obtained in two batches, named batch A and batch B. The batch A is formed by five formulations with different ratios of drug:sodium alginate (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 and 1:9), while batch B is composed of five formulations with different ratios of drug:chitosan hydrochloride (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 and 1:9). Both batches were obtained through the technique of mechanical activation in a ball mill, without added solvent, and milled for 45 minutes. The DS of batch A were amorphous with hydrogen interactions formed between drug and carrier. The DS A11 and A13 showed traces of crystallinity. The best results were observed for the batch formulations containing higher proportions of carrier sodium alginate (A15, A17, and A19), where A15 showed to be able to increase the aqueous solubility of TEL in 1.638 %, and promotes an 83% TEL release in only 30 minutes at the *in vitro* dissolution test, outstanding among other formulations at dissolution efficiency values. The whole DS batch B showed to be amorphous with hydrogen bonds between the drug and the carrier. This batch also showed good yield and content values besides successfully increasing TEL's aqueous solubility. The Q19 formulation was able to increase the aqueous solubility of TEL in 3.911% and only Q11 and Q13 formulations showed traces of crystallinity. However, the DS containing chitosan hydrochloride exhibited unsatisfactory dissolution profile in

phosphate monobasic buffer at pH 7.5 (adjusted with NaOH) and undesirable ED values, limiting the bioavailability of the drug. The excellent results in terms of solubility, dissolution and ED values observed for DS A15 were decisive in choosing this as the best formulation among all others. The CIM and DS batch A, stored at room temperature and protected from light, were subjected to physical stability studies during a 90 days period. The CIM showed physical changes at the end of 90 days, however, the hydrogen bonds between host and guest were stable at the end of the stability studies. The DS batch A were physically stable after a 90 days period, and demonstrated the maintenance of hydrogen bonds between the drug and carrier for this lapse. It is important to mention that all the formulations obtained through different systems have shown promising and innovative results in what refers to the biopharmaceutical properties of telmisartan and thus are considered useful in the hypertension pharmacological treatment.

**Keywords:** telmisartan, characterization, validation of analytical method,  $\beta$ -cyclodextrins, solid dispersions, physical stability

## LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química da TEL . . . . .	41
2	Estrutura química da $\beta$ -ciclodextrina. Fonte: Del Valle (2004) 42	
3	Estrutura química do ácido algínico . . . . .	45
4	Estrutura química da quitina e quitosana. Fonte: Silva; Santos; Ferreira (2006). . . . .	46
5	Estrutura química da TEL . . . . .	52
6	Perfil de dissolução intrínseca da TEL em lauril sulfato de sódio 0,25% . . . . .	59
7	Caracterização do estado sólido da TEL através do DSC e TG/DTG . . . . .	60
8	Curvas TG isotérmicas de TEL obtidas em 300, 310, 320, 330 e 340 ° C, sob atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de 50 mL min <sup>-1</sup> . . . . .	61
9	Difração de Raio-X de pó da TEL . . . . .	62
10	Fotomicrografias MEV da TEL (ampliação de 1000x) . . . . .	63
11	Espectro IV (A e B) da TEL e Espectro Raman da TEL (B) . . . . .	64
12	Espectro de Ressonância magnética nuclear da TEL: <sup>1</sup> H (A) e <sup>13</sup> C (B) . . . . .	66
13	Espectrometria de massa da TEL. . . . .	67
14	Estrutura química da TEL . . . . .	72
15	(A) Cromatograma HPLC da solução placebo; (B) Cromatograma HPLC da TEL a 10 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> ; (C) Espectros de absorção UV de TEL a 12 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> : (1) solução padrão de trabalho de TEL, (2) solução amostra de TEL, (3 ) solução placebo . . . . .	80
16	Diagrama de solubilidade de fases . . . . .	97
17	Plotagem da variação contínua . . . . .	98
18	Curvas de DSC referente ao (A) fármaco, (B) BCD e a (C) MFB composta pelo hóspede:hospedeiro na proporção 1:1 . . . . .	99
19	Curvas de DSC referentes ao CIM obtidos por MB . . . . .	100
20	Difratogramas referentes ao fármaco, BCD e os CIM . . . . .	102
21	Espectros IV referentes a TEL, BCD, MFB e os CIM . . . . .	104
22	Fotomicrografias da TEL, BCD e MFB (aumento de 500 x) . . . . .	105
23	Fotomicrografias dos CIM M2_7, M2_15, M2_30, M3_7, M3_15 e M3_30 em ampliação de 500 x . . . . .	106

24	Fotomicrografias da MB0_15 em aumentos de A (300 x), B (1000 x) e C (3000 x) . . . . .	106
25	Geometria inicial calculada através do método PM3 (A) TEL e (B) BCD . . . . .	107
26	Estruturas dos complexos de inclusão TEL:BCD calculados pelo método PM7: complexos 1:1 BNZ-in (A) e BZD-out (B), complexos 1:2 (C) . . . . .	108
27	Complexo de inclusão TEL:BCD 1:3 calculado pelo método PM7: (A) vista lateral e (B) vista inclinada. Os números exibem o comprimento das pontes de hidrogênio . . . . .	109
28	Perfis de dissolução dos CIM obtidos por MB . . . . .	110
29	Comparativo da ED (%) do fármaco livre e dos CIM . . . . .	112
30	Alteração da PA <sub>m</sub> frente à administração de angiotensina II para os grupos controle e que receberam TEL, M0_15, M2_30 e M3_30, avaliados em diferentes tempos. Os símbolos *, **, *** correspondem a p < 0,05; p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente, comparados ao grupo controle. && corresponde a p < 0,01 comparado ao grupo que recebeu TEL . . . . .	113
31	Plotagem da solubilidade da TEL pura frente ao Lote A de DS, em µg/mL . . . . .	126
32	Curvas de DSC referentes a TEL, carreador (alginato de sódio) e MFA composta por fármaco:carreador na proporção 1:1 (m/m) . . . . .	127
33	Difratogramas referentes ao fármaco, carreador (AS), MFA e as DS . . . . .	129
34	Espectros IV referentes a TEL, carreador (AS), MFA e as DS	130
35	Fotomicrografias da TEL, AS e MFA em magnitude de 500 x	131
36	Fotomicrografias das DS do Lote A em magnitude de 500 x	132
37	Perfis de dissolução das DS do Lote A . . . . .	133
38	Comparativo da ED (%) do fármaco puro, MFA e DS AS (Lote A) . . . . .	135
39	Plotagem da solubilidade da TEL pura frente às DS Lote B, em µg/mL . . . . .	138
40	Curvas de DSC referentes a TEL, carreador (cloridrato de quitosana) e MFQ composta por fármaco:carreador na proporção 1:1 (m/m) . . . . .	139
41	Difratogramas referentes ao fármaco, carreador (CQ), MFQ e as DS . . . . .	141
42	Espectros IV referentes a TEL, carreador (CQ), MFQ e as DS	142
43	Fotomicrografias da TEL, CQ e MFQ em magnitude de 500 x	143
44	Fotomicrografias das DS do Lote B em magnitude de 500 x	144



45	Perfis de dissolução das DS do Lote B . . . . .	145
46	Comparativo da ED (%) do fármaco puro, MFQ e DS CQ (Lote B) . . . . .	147
47	Curvas de DSC dos CIM em 0 e após 90 dias . . . . .	153
48	Digratogramas dos CIM em 0 e após 90 dias . . . . .	154
49	Espectros de IV dos CIM em 0 e após 90 dias . . . . .	155
50	Curvas de DSC as DS de AS em 0 e após 90 dias . . . . .	156
51	Digratogramas das DS de AS em 0 e após 90 dias . . . . .	157
52	Espectros de IV dos CIM em 0 e após 90 dias . . . . .	158



## LISTA DE TABELAS

1	Classificação farmacopeica da solubilidade empregada na determinação da solubilidade aproximada da TEL em diferentes solventes a 25°C . . . . .	56
2	Dados da solubilidade média de TEL em diferentes solventes a 25°C . . . . .	57
3	Estabilidade das soluções estoque (SE) e de trabalho (ST) de Telmisartana . . . . .	78
4	Parâmetros de Linearidade na determinação da TEL . . . . .	79
5	Resultados do método de precisão da matéria-prima . . . . .	81
6	Resultados do método de precisão para comprimidos de Telmisartana . . . . .	82
7	Resultados do método de exatidão para TEL . . . . .	83
8	Resultados da Robustez do método espectrofotométrico no UV	84
9	Resultados da robustez do método de HPLC . . . . .	85
10	Doseamento dos comprimidos de Temisartana . . . . .	85
11	Composição dos CIM de TEL . . . . .	92
12	Valores de rendimento referentes aos CIM . . . . .	98
13	Energia de complexação obtido por PM3 e PM7 para os complexos nas proporções avalidas neste estudo . . . . .	107
14	Composição das DS de TEL . . . . .	121
15	Composição das MF deTEL e carreadores hidrofílicos . . . . .	122
16	Valores de rendimento referentes ao Lote A de DS . . . . .	125
17	Valores de teor de TEL para o Lote A de DS . . . . .	125
18	Proporção de aumento da solubilidade da TEL ( %) referente ao Lote A de DS . . . . .	127
19	Valores do pH do meio de dissolução ao final do ensaio de dissolução das DS Lote A . . . . .	134
20	Valores de rendimento referentes às DS pertencentes ao Lote B . . . . .	136
21	Valores de teor de TEL para o Lote B de DS . . . . .	137
22	Proporção de aumento da solubilidade da TEL (em %) referente às DS do Lote B . . . . .	138
23	Valores do pH do meio de dissolução ao final do ensaio de dissolução das DS Lote B . . . . .	146



## ABREVIATURAS E SIGLAS

AII	Angiotensina II
AS	Alginato de sódio
AT1	Receptor da angiotensina II tipo 1
AUC	Área sob a curva
BCD	Beta-ciclodextrina
BZD-in	Orientação preferencial do anel benzimidazólico dentro da cavidade da BCD
BZD-out	Orientação preferencial do anel benzimidazólico fora da cavidade da BCD
CCD	Peltier-cooled change-coupled
CIM	Complexos de inclusão molecular
Cmax	Concentração plasmática máxima
CQ	Cloridrato de Quitosana
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raios X de pó
DS	Dispersões sólidas
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
ECA	Enzima conversora da Angiotensina
ED	Eficiência de dissolução
ESI	Ionização de electropulverização
FDA	Food and Drug Administration
Halg	Ácido algínico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica

HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de espectrometria de massa.
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M0	TEL submetida a moagem
M2	Formulação contendo TEL:BCD na proporção 1:2 submetida a moagem
M3	Formulação contendo TEL:BCD na proporção 1:3 submetida a moagem
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura Física
MFA	Mistura física TEL:Alginato de sódio
MFB	Mistura física TEL:Beta-ciclodextrina
MFQ	Mistura física TEL:Cloridrato de quitosana
MM	Modelagem molecular
MS	Espectrometria de massa
PAm	Pressão arterial média
PI	Precisão Intermediária
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
RTMS	Real Time Multiple Strip
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
SE	Solução Estoque
ST	Solução de Trabalho

TEL	Telmisartana
TGI	Trato gastrointestinal
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Espectrofotometria no ultravioleta
VDI	Velocidade de dissolução intrínseca





## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>33</b>
1.1 OBJETIVOS . . . . .	35
1.1.1 Objetivos gerais . . . . .	35
1.1.2 Objetivos específicos . . . . .	35
<b>CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>37</b>
1 INTRODUÇÃO . . . . .	38
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA . . . . .	38
1.2 ANTAGONISTAS NÃO PEPTÍDICOS DOS RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II . . . . .	39
1.2.1 Telmisartana . . . . .	40
1.2.2 Propriedades físico-químicas . . . . .	41
1.2.3 Propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas . . . . .	42
1.3 COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM CICLODEXTRINAS . . . . .	42
1.4 DISPERSÕES SÓLIDAS . . . . .	43
1.4.1 Carreadores utilizados nas dispersões sólidas . . . . .	44
1.4.2 Ativação mecânica em moinho de bolas . . . . .	47
<b>CAPÍTULO II - TELMISARTANA: CONTROLE DE QUALIDADE, PUREZA E CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO</b>	<b>49</b>
1 INTRODUÇÃO . . . . .	51
2 EXPERIMENTAL . . . . .	52
2.1 MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .	52
2.2 CARACTERIZAÇÃO . . . . .	53
2.2.1 Estudos de solubilidade . . . . .	53
2.2.2 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI) . . . . .	53
2.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) . . . . .	53
2.2.4 Termogravimetria (TG) . . . . .	54
2.2.5 Difração de Raio-X de pó (DRX) . . . . .	54
2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) . . . . .	54
2.2.7 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV) . . . . .	55
2.2.8 Espectroscopia Raman . . . . .	55
2.2.9 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) . . . . .	55
2.2.10 Espectrometria de massa (MS) . . . . .	55

<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	56
3.1	ESTUDOS DE SOLUBILIDADE	56
3.2	VDI	58
3.3	PERFIL TÉRMICO	59
3.4	DRX	61
3.5	MEV	62
3.6	IV	63
3.7	ESPECTROSCOPIA RAMAN	64
3.8	RMN	65
3.9	ESPECTROMETRIA DE MASSA	66
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	67
<b>5</b>	<b>AGRADECIMENTOS</b>	67

**CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E COM-  
PARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA TEL-  
MISARTANA POR UV E HPLC** **69**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	71
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTAL</b>	73
2.1	REAGENTES E AMOSTRAS	73
2.2	EQUIPAMENTOS E REAGENTES	73
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	74
3.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES	74
<b>3.1.1</b>	<b>Soluções padrão estoque e de Trabalho</b>	74
<b>3.1.2</b>	<b>Solução amostra</b>	74
3.2	ESTABILIDADE DA TELMISARTANA EM SOLUÇÃO	74
3.3	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS UV E HPLC	74
<b>3.3.1</b>	<b>Linearidade</b>	75
<b>3.3.2</b>	<b>Limites de detecção e quantificação</b>	75
<b>3.3.3</b>	<b>Especificidade</b>	75
<b>3.3.4</b>	<b>Precisão</b>	76
<b>3.3.5</b>	<b>Exatidão</b>	76
<b>3.3.6</b>	<b>Robustez</b>	77
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
3.5	ANÁLISE DOS PRODUTOS FARMACÊUTICOS	77
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	78
4.1	ESTABILIDADE DA TEL EM SOLUÇÃO	78
4.2	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS UV E HPLC	78
<b>4.2.1</b>	<b>Linearidade e faixa</b>	78
<b>4.2.2</b>	<b>Limites de Detecção e Quantificação</b>	79
<b>4.2.3</b>	<b>Especificidade</b>	80

4.2.4	Precisão . . . . .	80
4.2.5	Exatidão . . . . .	82
4.2.6	Robustez . . . . .	84
5	DOSEAMENTO DOS COMPRIMIDOS DE TEL . . . . .	85
6	CONCLUSÕES . . . . .	86
7	AGRADECIMENTOS . . . . .	86

**CAPÍTULO IV - ENCAPSULAÇÃO MOLECULAR DA TELMI-SARTANA EM COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM  $\beta$ -CICLODEXTRINAS: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE *IN VITRO* E *IN VIVO*** **87**

1	INTRODUÇÃO . . . . .	88
2	METODOLOGIA . . . . .	90
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .	90
2.2	CÁLCULOS DA ESTEQUIOMETRIA DE ENCAPSULAÇÃO . . . . .	90
2.2.1	Estudo de solubilidade de fases . . . . .	90
2.2.2	Determinação da relação de inclusão pelo método de variação contínua . . . . .	90
2.3	PREPAROS DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO MOLECULAR . . . . .	91
2.3.1	Preparo das misturas físicas . . . . .	92
2.4	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DOS CIM . . . . .	92
2.5	CARACTERIZAÇÃO DOS CIM OBTIDOS POR MOINHO DE BOLAS . . . . .	92
2.5.1	Calorimetria exploratória diferencial . . . . .	92
2.5.2	Difração de Raios-X de pó . . . . .	93
2.5.3	Espectroscopia na região do Infravermelho . . . . .	93
2.5.4	Microscopia eletrônica de varredura . . . . .	93
2.5.5	Estudos de Modelagem Molecular (MM) . . . . .	93
2.6	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> . . . . .	94
2.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO <i>IN VIVO</i> DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO MOLECULAR . . . . .	95
2.7.1	Animais . . . . .	95
2.7.2	Protocolo experimental . . . . .	95
2.7.3	Medida de Pressão arterial média ( $PA_m$ ) . . . . .	95
3	RESULTADOS . . . . .	96
3.1	CÁLCULOS ESTEQUIOMÉTRICOS DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO MOLECULAR . . . . .	96
3.1.1	Estudo de solubilidade de fases . . . . .	96

<b>3.1.2</b>	<b>Determinação da relação de inclusão pelo método de variação contínua (Método de Job)</b> . . . . .	97
3.2	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DOS CIM DE TEL . . . . .	98
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS CIM . . . . .	99
<b>3.3.1</b>	<b>DSC</b> . . . . .	99
<b>3.3.2</b>	<b>DRX</b> . . . . .	101
<b>3.3.3</b>	<b>IV</b> . . . . .	103
<b>3.3.4</b>	<b>MEV</b> . . . . .	105
<b>3.3.5</b>	<b>Estudos de Modelagem Molecular</b> . . . . .	107
3.4	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> . . . . .	109
3.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO <i>IN VIVO</i> DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO MOLECULAR . . . . .	112
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> . . . . .	114

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DISPERSÕES SÓLIDAS DE TELMI-SARTANA, OBTIDO ATRAVÉS DE ATIVAÇÃO MECÂNICA EM MOINHO DE BOLAS E COM DISTINTOS CARREADORES** **117**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> . . . . .	118
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> . . . . .	120
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .	120
2.2	PREPAROS DAS DISPERSÕES SÓLIDAS . . . . .	120
<b>2.2.1</b>	<b>Preparo das misturas físicas</b> . . . . .	121
2.3	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS DS . . . . .	122
2.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DA TEL NAS DS . . . . .	122
2.5	AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE . . . . .	122
2.6	CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS DS . . . . .	123
<b>2.6.1</b>	<b>Calorimetria exploratória diferencial</b> . . . . .	123
<b>2.6.2</b>	<b>Difração de Raios-X de pó</b> . . . . .	123
<b>2.6.3</b>	<b>Espectroscopia na região do Infravermelho</b> . . . . .	123
<b>2.6.4</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b> . . . . .	123
2.7	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> . . . . .	124
<b>3</b>	<b>AVALIAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS DO LOTE A</b> . . . . .	125
3.1	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS DS . . . . .	125
3.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DA TEL NAS DS . . . . .	125
3.3	AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE . . . . .	126
3.4	CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS DS . . . . .	127
<b>3.4.1</b>	<b>DSC</b> . . . . .	127
<b>3.4.2</b>	<b>DRX</b> . . . . .	128
<b>3.4.3</b>	<b>IV</b> . . . . .	129

3.4.4	MEV . . . . .	131
3.5	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i>	132
4	<b>AVALIAÇÃO DO LOTE B DE DISPERSÕES SÓLIDAS</b>	136
4.1	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS DS . . . . .	136
4.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DA TEL NAS DS . . . . .	137
4.3	AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE . . . . .	137
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS DS . . . . .	139
4.4.1	DSC . . . . .	139
4.4.2	DRX . . . . .	140
4.4.3	IV . . . . .	141
4.4.4	MEV . . . . .	143
4.5	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i>	144
5	<b>CONCLUSÕES</b> . . . . .	147

**CAPÍTULO VI - ESTUDOS DE ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO E DAS DISPERSÕES SÓLIDAS DE TEL 149**

1	<b>INTRODUÇÃO</b> . . . . .	150
2	<b>METODOLOGIA</b> . . . . .	152
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .	152
2.2	ESTUDOS DE ESTABILIDADE . . . . .	152
2.2.1	Calorimetria exploratória diferencial . . . . .	152
2.2.2	Difração de Raios-X de pó . . . . .	152
2.2.3	Espectroscopia na região do Infravermelho . . . . .	152
3	<b>RESULTADOS</b> . . . . .	153
3.1	ANÁLISE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DA TELMI-SARTANA EM $\beta$ -CICLODEXTRINAS . . . . .	153
3.1.1	DSC . . . . .	153
3.1.2	DRX . . . . .	154
3.1.3	Espectroscopia na região do IV . . . . .	154
3.2	ANÁLISE DAS DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO ALGINATO DE SÓDIO (LOTE A) . . . . .	155
3.2.1	DSC . . . . .	155
3.2.2	DRX . . . . .	156
3.2.3	IV . . . . .	157
4	<b>CONCLUSÕES</b> . . . . .	158

**CONSIDERAÇÕES FINAIS 159**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 163**



## INTRODUÇÃO GERAL

A hipertensão arterial sistêmica é considerada um importante problema de saúde e uma das principais causas de morbidade e mortalidade na maioria dos países desenvolvidos do mundo (MCCARTY, 1983; SUKOR, 2011).

A Telmisartana (TEL) é um potente e seletivo antagonista do receptor da angiotensina II do tipo-1 (AT1), a qual promove efeito anti-hipertensivo através do relaxamento da musculatura lisa arterial (WIENEN et al., 2000; DINNEBIER et al., 2000; GOODMAN; GILMAN, 2005). Entretanto, a TEL apresenta problemas de solubilidade em razão da sua baixa solubilidade aquosa (ZHANG et al., 2010b), associado a outro agravante: é altamente ionizada em solução, apresentando também solubilidade pH dependente. Desse modo, levando-se em consideração que faz-se necessário que o fármaco esteja dissolvido no lúmen gastrointestinal para que ocorra a absorção (STORPIRTIS; CHANG; GONCALVES, 2009), a solubilidade é considerada um fator limitante na biodisponibilidade da TEL (TRAN; TRAN; LEE, 2008; USP, 2011a; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012; WIENEN et al., 2000; MARTINDALE, 2013).

O medicamento de referência da TEL, comercializado na forma de comprimidos de administração oral (Micardis<sup>®</sup> 40 e 80 mg), é capaz de aprimorar as características biofarmacêuticas do fármaco e alcançar um perfil de dissolução satisfatório devido a presença de agentes alcalinizantes em sua formulação (ZHANG et al., 2010a; TRAN; TRAN; LEE, 2008). Apesar de bem sucedido no mercado, estudos apontam que a biodisponibilidade do Micardis<sup>®</sup> é dose-dependente e influenciada pela presença de alimentos no trato gastrointestinal, variando no estado alimentado e jejum (SIMASAKI et al., 1999).

Tendo em vista que um dos maiores desafios encontrados pelas indústrias farmacêuticas, durante o desenvolvimento farmacotécnico, está relacionado com a baixa solubilidade aquosa de fármacos (LAITINEN et al., 2013a; KAWABATA et al., 2011; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007), o desenvolvimento de sistemas capazes de aprimorar as características biofarmacêuticas da TEL é de grande relevância, uma vez que vêm a assegurar a eficácia terapêutica do fármaco.

Diversos trabalhos tem sido relatados na literatura empregando, com sucesso, a tecnologia de dispersões sólidas no aumento da solubilidade e velocidade de dissolução da TEL. Alguns exemplos são dispersões sólidas contendo carreadores hidrofílicos (KOTHAWADE et al., 2010), alcalinizantes (TRAN; TRAN; LEE, 2008; MARASINI et al., 2013), empregando a técnica de moinho de bolas (ZHONG et al., 2013), a tecnologia de fluído supercrí-

tico (PARK et al., 2013) e a técnica fusão-resfriamento (DUKECK; SIEGER; KARMWAR, 2013). Da mesma forma, há relatos de complexos de inclusão da TEL em ciclodextrinas bem sucedidos na literatura (MURPHY; Sudha Purna; VIJAYAKUMAR, 2011; KAUSALYA et al., 2011), os quais foram obtidos através de técnicas convencionais como mistura física, malaxagem e evaporação do solvente orgânico.

Neste contexto, a encapsulação molecular da telmisartana em complexos de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrinas (CIM) e o desenvolvimento de dispersões sólidas (DS) são consideradas promissoras na melhoria das características biofarmacêuticas da TEL. Assim, os CIM e as DS foram obtidas através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas empregando carreadores hidrofílicos.

O presente trabalho encontra-se dividido em forma de capítulos/artigos com o objetivo de facilitar a leitura, compreensão e a interpretação dos dados.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivos gerais

Obter sistemas capazes de aprimorar as características biofarmacêuticas da TEL através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas empregando duas tecnologias distintas: complexos de inclusão molecular entre a telmisartana e  $\beta$ -ciclodextrinas e dispersões sólidas.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a telmisartana quanto as suas características físico-químicas tais como a solubilidade, velocidade de dissolução intrínseca (VDI), pureza, forma cristalina, utilizando diversas de técnicas como: análise térmica (DSC e TG/DTG), Difração de Raio-X de pó (DRX), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia na região do infravermelho (IV), Raman, Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS);
- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) a fim de quantificar a TEL em complexos de inclusão molecular em  $\beta$ -ciclodextrinas e dispersões sólidas;
- Desenvolver complexos de inclusão molecular fármaco- $\beta$ -ciclodextrinas através através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas;
- Caracterizar os complexos de inclusão molecular fármaco- $\beta$ -ciclodextrinas quanto as suas características físico-químicas em solução (solubilidade de fases e método de variação contínua), em estado sólido (DSC, DRX, IV, MEV), computacionalmente (Estudo de Modelagem Molecular) e em relação ao perfil de dissolução *in vitro*;
- Avaliar o efeito anti-hipertensivo *in vivo* dos complexos de inclusão que apresentarem os melhores resultados de dissolução *in vitro*;
- Desenvolver dispersões sólidas binárias de telmisartana contendo alginato de sódio (lote A) e cloridrato de quitosana (lote B) através através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas;
- Caracterizar as dispersões sólidas quanto as suas características físico-químicas em estado sólido (DSC, DRX, IV, MEV) e avaliar os parâmetros de rendimento, teor, solubilidade e perfil de dissolução *in vitro*;

- Analisar a estabilidade física dos complexos de inclusão molecular fármaco- $\beta$ -ciclodextrinas e das dispersões sólidas, mantidas em dessecador, após o período de 90 dias.
- Comparar os diferentes sistemas obtidos através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas quanto as características físico-químicas das amostras obtidas.

# **Capítulo I**

## **Revisão de literatura**

---

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na maioria dos países desenvolvidos do mundo (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010; MCCARTY, 1983; SUKOR, 2011). Sua prevalência mundial é de aproximadamente 30%, sendo considerada um importante fator de risco para o acidente vascular cerebral, doença cardíaca isquêmica e insuficiência cardíaca (SUKOR, 2011).

No Brasil, a HAS é considerada um dos principais problemas de saúde do país. Além disso, a HAS é apontada como uma das causas de maior redução da qualidade e expectativa de vida da população (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). A HAS é uma condição clínica multifatorial, a qual é caracterizada por níveis pressóricos elevados e sustentados, ou seja, valores de pressão diastólica maior do que 90 mmHg, ou pressão sistólica superior a 140 mmHg. Essa condição está associada a alterações funcionais podendo, ou não, levar a complicações como alterações estruturais dos órgãos alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares não fatais (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). Em 2001, cerca de 7,6 milhões de pessoas morreram em decorrência da elevação da pressão arterial (PA), sendo que 54% dos casos tiveram como causa o acidente vascular encefálico e 47% devido a doença isquêmica do coração. A maioria das mortes foi observada em países de baixo e médio desenvolvimento econômico, onde acometeram indivíduos entre 45 e 69 anos. No Brasil, esta patologia é responsável por 25% das causas da cardiopatia isquêmica e de 40% dos acidentes vasculares cerebrais, sendo considerado um importante fator de acometimento cardíaco, cerebral, renal e vascular periférico (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). A terapia anti-hipertensiva tem como objetivo reduzir a morbimortalidade em pacientes hipertensos que apresentam alto risco de doenças cardiovasculares e prevenir o acidente vascular cerebral. Dentre as patologias consideradas fatores de alto risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, secundárias à hipertensão arterial crônica, estão o diabetes, a insuficiência cardíaca, as nefropatias e as vasculopatias periféricas (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

Neste contexto, a hipertensão representa um alto custo econômico e social sobre os sistemas de saúde, famílias e sociedade (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

## 1.2 ANTAGONISTAS NÃO PEPTÍDICOS DOS RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II

O sistema renina-angiotensina desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial e na homeostase eletrolítica e, dessa forma, influencia diretamente nos processos fisiológicos e fisiopatológicos da pressão arterial (GOODMAN; GILMAN, 2005; GOODMAN; GILMAN, 2008; RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000). A angiotensina II é um agente vasoconstritor, o qual contribui na retenção hídrica (reabsorção de sódio) e na excreção de potássio. O sistema de receptores da angiotensina II (AII) do tipo 1 (AT1) tem um papel crucial na regulação da pressão arterial, uma vez que está relacionado com praticamente todos os efeitos cardiovasculares conhecidos da AII (GOODMAN; GILMAN, 2008; RANG et al., 2007; GOODMAN; GILMAN, 2005; RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000). A angiotensina II liga-se a dois subtipos de receptores, AT1 e o AT2, sendo que todas as funções conhecidas da AII se dão pela ligação com os receptores AT1 (GOODMAN; GILMAN, 2008; RANG et al., 2007; GOODMAN; GILMAN, 2005).

Os antagonistas dos receptores da AII têm como mecanismo de ação o bloqueio das ações da AII pela ocupação específica do receptor AT1, exercendo assim, ação anti-hipertensiva e protetora para os diferentes órgãos-alvo da hipertensão arterial (RANG et al., 2007). A importância da AII na regulação da função cardiovascular levou ao desenvolvimento de antagonistas não peptídicos do receptor da AII (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Os antagonistas não peptídicos dos receptores de AII atuam bloqueando os receptores AT1 da angiotensina II e, dessa forma, exercendo efeito anti-hipertensivo através do relaxamento da musculatura lisa arterial, gerando vasodilatação, o aumento da excreção renal de sal e água, a redução do volume plasmático e a diminuição da hipertrofia celular (GOODMAN; GILMAN, 2005). Os bloqueadores dos receptores da AII são empregados no tratamento de hipertensão arterial e na manutenção da insuficiência cardíaca causada por infarto, além de promover melhorias na função ventricular esquerda, através do bloqueio do receptor da AII do tipo 1 (GOYAL et al., 2009). Neste contexto, o bloqueio dos receptores da AII representa uma abordagem lógica para a inibição selectiva da resposta pressórica do sistema renina-angiotensina e, por conseguinte, para a redução da pressão arterial (WIENEN et al., 2000).

Diferentemente dos antagonistas não peptídicos do receptor da AII, os inibidores da enzima de conversora da angiotensina (ECA) atuam regulando os níveis pressóricos através do bloqueio não seletivo da conversão enzimática da angiotensina I em AII (GOODMAN; GILMAN, 2008; RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000). Devido a falta de especificidade, os inibidores da ECA

além de inibir a formação de AII, também reduzem a degradação da bradici-nina e da substância P, gerando o efeito colateral característico dos inibidores da ECA, a tosse (GOODMAN; GILMAN, 2008; RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000).

Neste contexto, os antagonistas não peptídicos do receptor de AII, o qual é desprovido da tosse como efeito colateral, destaca-se por apresentar um bloqueio mais completo de todo o sistema renina-angiotensina (WIENEN et al., 2000).

### 1.2.1 Telmisartana

A telmisartana (TEL) é um potente e seletivo inibidor do receptor da angiotensina II tipo 1, a qual é amplamente utilizada na prevenção e tratamento da hipertensão arterial (GOODMAN; GILMAN, 2008). Este fármaco promove a diminuição da pressão arterial através do relaxamento da musculatura lisa arterial (GOODMAN; GILMAN, 2008) e apresenta a maior afinidade de ligação ao receptor AT1 dentre sua classe (KAKUTA et al., 2005; DESTRO et al., 2011; GALZERANO et al., 2010). A ordem de afinidade dos antagonistas dos receptores da AII pelos receptores AT1 em ordem crescente dá-se da seguinte maneira: candesartana=olmesartana > iber-sartana=eprosartana > valsartana=metabólito ativo da losartana=telmisartana (GOODMAN; GILMAN, 2008). Desse modo, a TEL apresenta reduzidos efeitos colaterais, os quais estão relacionados a sua elevada seletividade, não interferindo em outros sistemas de receptores envolvidos na regulação cardiovascular (WIENEN et al., 2000). Além disso, a TEL fornece benefícios de proteção contra o dano vascular e renal causada por insuficiência cardíaca e diabetes (GOYAL et al., 2009; GRASSI; QUARTI-TREVANO; MANCIA, 2008; HINOI et al., 2008; RAO et al., 2011; GOODMAN; GILMAN, 2008). Neste contexto, o tratamento com a TEL apresenta várias vantagens em relação a outros fármacos, destacando sua seletividade pelos receptores AT1, efeitos hipotensores de longa duração (exigindo apenas uma administração por dia), boa tolerabilidade e perfil de segurança favorável, que estão presentes sozinhos e em terapias combinadas (GOSSE, 2006).

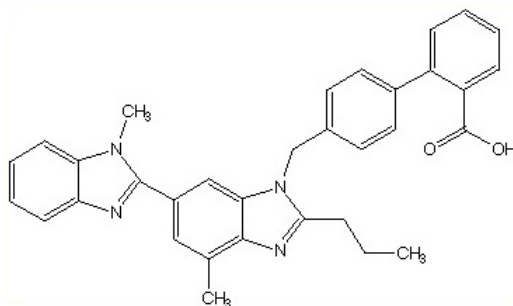
A telmisartana foi aprovada pelo órgão fiscalizador americano FDA no ano 2000, demonstrando um estudo extensivo no domínio farmacológico (SHAH; SINGH, 2010), contudo poucas informações estão disponíveis na literatura a respeito desta. A monografia da TEL foi recentemente lançada na Farmacopéia Britânica 2012 (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012) e também está disponível para a forma de comprimidos na Farmacopéia Americana desde 2011 (ZHANG et al., 2010a; TRAN; TRAN; LEE, 2008; USP, 2011b). No Brasil a TEL é comercializada na forma de comprimidos de administração

oral (Micardis® 40 e 80 mg).

### 1.2.2 Propriedades físico-químicas

A TEL (Figura 1) é quimicamente conhecida como 4'-{[4-Metil-6-(1-metil-2-benzimidazolil)-2-propil-1-benzimidazolil] metil}-2-ácido bifenilcarboxílico, sendo caracterizada como um pó cristalino branco amarelado praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em metanol, moderadamente solúvel em diclorometano e solúvel em solução de hidróxido de sódio 1M (MARTINDALE, 2013). Esta apresenta fórmula química  $C_{33}H_{30}N_4O_2$  e massa molecular 514,63 g / mol (MARTINDALE, 2013; BRITISH PHARMACOPEIA, 2012), sendo relatado na literatura a presença de polimorfismo (DINNEBIER et al., 2000).

Figura 1: Estrutura química da TEL



Este fármaco apresenta baixa solubilidade em meio aquoso e alta permeabilidade intestinal, sendo classificado como classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (ZHANG et al., 2010b; AMIDON et al., 1995).

A TEL é considerada um ácido fraco, apresenta três valores de pKa 3.5; 4.1 e 6.0 e, dessa forma, apresenta solubilidade pH dependente devido a sua natureza altamente ionizável em solução (WIENEN et al., 2000; CAGIGAL et al., 2001; TRAN; TRAN; LEE, 2008; MARTINDALE, 2013). Analisando as propriedades físico-químicas da TEL, pode-se dizer que requer um meio básico para se solubilizar, uma vez que ácidos fracos são ionizados em pH básico e se apresentam na forma não ionizada em pH ácido. Assim, a TEL será absorvida na forma não ionizada no TGI, com excessão do estômago (WIENEN et al., 2000; CAGIGAL et al., 2001; TRAN; TRAN; LEE, 2008).

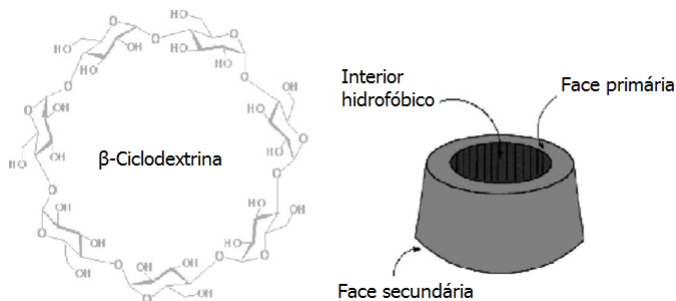
### 1.2.3 Propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas

A TEL é rapidamente absorvida a partir do trato-gastrointestinal, apresentando biodisponibilidade oral em torno de 50%. Este fármaco apresenta tempo de meia-vida de aproximadamente 24 h, atingindo o pico de concentração plasmática máxima dentro de aproximadamente 0,5 a 1 h após a administração de uma dose oral. A ligação a proteínas plasmáticas é muito alta, (mais que 99%). A TEL é depurada da circulação principalmente por secreção biliar do fármaco intacto, assim a depuração plasmática da telmisartana é afetada pela insuficiência hepática, mas não pela insuficiência renal. A dose oral recomendada é de 40 a 80 mg, 1 vez ao dia (WIENEN et al., 2000; GOODMAN; GILMAN, 2008; MARTINDALE, 2013). No entanto, estudos apontam que a biodisponibilidade dos comprimidos da TEL disponíveis no mercado é influenciada pela presença de alimentos no TGI, sendo dose-dependente variando no estado alimentado e jejum (SIMASAKI et al., 1999).

### 1.3 COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM CICLODEXTRINAS

A cada ano, as ciclodextrinas são tema de aproximadamente 1000 artigos científicos e resumos científicos publicados. Em 2007, mais de 30 produtos farmacêuticos estavam disponíveis no mercado em todo mundo. A maioria dos estudos demonstram efeitos positivos em formulações onde houve inclusão do fármaco em CDs (CARRIER; MILLER; AHMED, 2007; DEL VALLE, 2004). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, compostos por seis ( $\alpha$ -ciclodextrina), sete ( $\beta$ -ciclodextrina) e oito ( $\gamma$ -ciclodextrina) ou mais unidades D-glucopiranosídicas ligadas entre si por meio de ligações alfa- (1,4) glicosídicas (Figura 2).

Figura 2: Estrutura química da  $\beta$ -ciclodextrina. Fonte: Del Valle (2004)





Estas moléculas apresentam estrutura cilíndrico-cônica cortada, a qual é composta por uma superfície externa hidrofílica (solúvel em água) e uma cavidade interna apolar (a qual proporciona uma matriz hidrofóbica). Assim, as ciclodextrinas apresentam como principal característica a habilidade de formar complexos de inclusão com diversas moléculas apolares (CARRIER; MILLER; AHMED, 2007; DEL VALLE, 2004). Evidencia-se que as ciclodextrinas são amplamente utilizadas em pesquisas e desenvolvimento na área farmacêutica, uma vez que grande parte dos fármacos apresentam problemas relativos à solubilidade. Devido a essa baixa solubilidade, muitos fármacos apresentam baixa biodisponibilidade e, conseqüentemente, um maior número de efeitos colaterais. Para que um fármaco administrado por via oral seja absorvido, este deve apresentar um determinado nível de solubilidade em água, mas também precisa ser hidrofóbico suficiente para permear as membranas biológicas. Neste contexto, as ciclodextrinas representam uma alternativa na melhoria da solubilidade de fármacos apolares, sua biodisponibilidade e, por conseguinte, o seu efeito farmacológico, promovendo um avanço na qualidade de vida do paciente (CARRIER; MILLER; AHMED, 2007; DEL VALLE, 2004).

#### 1.4 DISPERSÕES SÓLIDAS

As dispersões sólidas tem se mostrado um dos processos tecnológicos mais efetivos no aumento da taxa de dissolução/biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água, destacando-se dentre outras técnicas por promover melhores resultados (LEUNER; DRESSMAN, 2000; SERAJUDDIN, 1999; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

Tal fato deve-se a obtenção de um sistema onde a cristalinidade do fármaco é alterada a ponto de mudar sua velocidade de dissolução, a qual também é influenciada pelas propriedades físico-químicas do carreador hidrossolúvel que recobre o sistema. A redução do tamanho das partículas do fármaco ao menor possível, a qual pode levar a amorfização completa do fármaco e, dessa forma, promove melhorias na molhabilidade do fármaco e, conseqüentemente, na dissolução e na biodisponibilidade do fármaco (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; KIM et al., 2006).

Esses sistemas são muitas vezes chamados de cristais misturados ou mistos, devido aos dois componentes cristalizarem-se juntos em um sistema homogêneo unifásico (LEUNER; DRESSMAN, 2000). Quando uma mistura consistindo de um fármaco pouco solúvel em água e um carreador inerte, altamente solúvel, é dissolvida em um meio aquoso, o carreador se dissolve rapidamente liberando cristais muito finos do fármaco. A extensa área de superfície resulta em um aumento da taxa de dissolução e, portanto melhora

a biodisponibilidade (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Além disso, a tecnologia de dispersão sólida tem sido aplicada com sucesso para desenvolver formulações amorfas com uma elevadas concentrações de fármaco e/ou contendo fármacos com alta tendência a cristalização, uma vez que contribui na estabilização física da forma amorfa de fármacos (HUANG; DAI, 2014).

A proporção de fármaco/carreador, em uma dispersão sólida, exerce papel determinante sobre o desempenho da dissolução e, conseqüentemente, na biodisponibilidade do fármaco. Altas porcentagens de fármaco gera pequenos cristais na dispersão, inviabilizando que o fármaco permaneça molecularmente disperso e, assim, compromete o sistema. Em contrapartida, altas proporções do carreador são vantajosas, uma vez que a presença do carreador em grandes quantidades tende a levar à completa ausência de cristalinidade do fármaco e, dessa forma, promove o aumento da solubilidade e taxa de dissolução do fármaco (LEUNER; DRESSMAN, 2000).

#### 1.4.1 Carreadores utilizados nas dispersões sólidas

A escolha do carreador (polímero ou composto químico) é determinante no desempenho das dispersões sólidas, uma vez que a taxa de dissolução depende apenas do carreador, não estando relacionado com as propriedades biofarmacêuticas do fármaco (LEUNER; DRESSMAN, 2000).

- Alginato de sódio (AS)

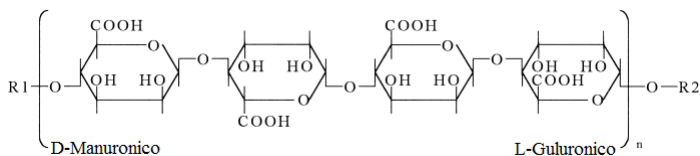
O alginato de sódio é polissacarídeo hidrofílico aniônico, obtido através da substituição dos hidrogênio do biopolímero ácido algínico por cátions  $\text{Na}^+$  (MUZZARELLI, 1973; YEOM; LEE, 1998).

O ácido algínico (Halg) (Figura 3) é um polissacarídeo natural linear constituído por unidades monoméricas dos ácidos  $\beta$ -D-manurônico (M) e  $\alpha$ -L-gulurônico (G) unidos por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4) de composição e sequencia variada. Este ocorre na pareça celular de algas marinhas castanhas, usualmente na forma de um sal misto de cálcio, magnésio sódio e potássio (BROWNEE et al., 2009; GEORGE; ABRAHAM, 2006; HUANG; PAL; MOON, 1999). Devido à presença de grupos carboxila e hidroxila na cadeia polimérica, o ácido algínico apresenta forte interação com diversos íons de compostos orgânicos (SOARES et al., 2004). Vale ressaltar que o ácido algínico apresenta a mesma estrutura e grupamentos funcionais que a carboximetilcelulose (MUZZARELLI, 1973).

Dentre as principais propriedades do AS, destaca-se o fato de ser um biopolímero atóxico, hidrofílico, biocompatível e biodegradável em condições biológicas normais (SAETHER et al., 2008). Em geral os alginatos

são solúveis em água e insolúveis em solventes mais polares como álcoois e acetona. Em soluções aquosas, os alginatos precipitam após adição de aproximadamente 30% desses solventes orgânicos. É quimicamente estável em valores de pH entre 5,0 e 10,0, mas é precipitado em valores muito ácidos de pH (NAKAMURA et al., 2000; BROWNLEE et al., 2009). No fluido gástrico, o AS hidratado é convertido em um filme poroso e insolúvel de ácido algínico, evitando a liberação do fármaco no estômago, o qual ocorre somente após atingir um região do TGI com pH mais elevado, onde o filme de Halg é convertido em uma camada solúvel viscosa que, em combinação com o polímero gelificante, controla a liberação do fármaco através do mecanismo de erosão (BROWNLEE et al., 2009).

Figura 3: Estrutura química do ácido algínico



Os alginatos são polissacarídeos formadores de gel usados frequentemente em vários setores industriais como a indústria alimentícia e farmacêutica (GACESA, 1988; BROWNLEE et al., 2009). Devido as suas propriedades físico-químicas, o alginato de sódio é amplamente utilizado no processamento de alimentos, sendo muito utilizado por indústrias farmacêuticas como carreador de fármacos, na preparação de géis, e é utilizado em combinação com outros polímeros gelificantes na liberação de biomoléculas como fármacos, peptídios e proteínas (WONG et al., 2002). Sistemas de liberação controlada empregando microsferas de alginato vem sendo bastante estudados como uma forma de liberação de diversos fármacos em órgãos alvo (SOARES et al., 2004).

Tais propriedades físicas e químicas descritas anteriormente para o ácido algínico e seus sais foram responsáveis pela seleção do alginato de sódio como um promissor carreador na formação de dispersões sólidas contendo TEL.

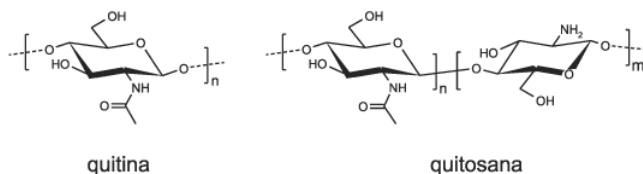
- Cloridrato de quitosana (CQ)

O cloridrato de quitosana é um sal derivado da quitosana, o qual é obtido através da desacetilação parcial da quitina (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005). A quitina (Figura 4) é um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo e a lagosta. A quitina, juntamente

com a celulose, são considerados os polissacarídeos naturais mais abundantes na natureza (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005).

A quitosana (Figura 4), um polímero catiônico obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, o qual é formado por uma cadeia linear contendo unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina (D-glucosamina) e 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosamina (N-acetil-D-glucosamina), unidos por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  (GEORGE; ABRAHAM, 2006; GUINESI et al., 2007; SIGNINI; Campana Filho, 1998).

Figura 4: Estrutura química da quitina e quitosana. Fonte: Silva; Santos; Ferreira (2006).



Este polissacarídeo, oriundo de uma fonte renovável, é biocompatível, biodegradável, atóxico e apresenta atividade anti-bacteriana (GEORGE; ABRAHAM, 2006; ROSCA et al., 2005). Devido as suas inúmeras propriedades, esta apresenta uma imensa variedade de aplicações em diversas áreas, como no tratamento de efluente, na agricultura, na área médica e nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Na área farmacêutica, a quitosana é empregada principalmente na formação de filmes, em sistemas bioadesivos, como excipiente em comprimidos, para melhorar a taxa de dissolução de compostos pouco solúveis e no controle da liberação de fármacos e proteínas como matrizes e em sistemas microparticulados e nanoparticulados (ILLUM, 1998; SILVA; KATIA; FERREIRA, 2006; GEORGE; ABRAHAM, 2006).

A quitosana é insolúvel em pH neutro e em soluções alcalinas e forma sais com ácidos orgânicos e inorgânicos como o ácido clorídrico, fórmico, glutâmico, láctico, cítrico, acético e o ácido ascórbico. Os grupamentos amino reativos, presentes nas cadeias de quitosana, podem ser protonados ( $\text{NH}_3^+$   $\text{OCOR}^-$ ) com os ácidos mencionados anteriormente, resultando em um polissacarídeo solúvel em água carregado positivamente (CERVERA et al., 2011; GEORGE; ABRAHAM, 2006; ILLUM, 1998).

O cloridrato de quitosana é um sal obtido através da desacetilação parcial da quitina, o qual apresenta uma cadeia heteropolissacarídica não ramificada, consistindo de duas unidades N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina. Normalmente apresenta um grau de desacetilação de 70 a 95%. Diferen-

temente da quitina e quitosana, o cloridrato de quitosana é moderadamente solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005).

A solubilidade dos sais de quitosana é dependente do grau de desacetilação da quitosana, do valor de pKa da quitosana e do pH do meio. Quitosanas com baixo grau de desacetilação (40%) tem se mostrado solúveis até pH 9, enquanto quitosanas com grau de desacetilação superior a 85% tem se mostrado solúveis apenas até pH 6,5. Além disso, a solubilidade da quitosana é também influenciada pela adição de sais na solução, onde quanto maior a força iônica, menor a solubilidade. A viscosidade da quitosana aumenta com proporcionalmente ao aumento da concentração desta em solução e diminui com o aumento da temperatura. Além disso, a viscosidade aumenta em função do grau de desacetilação (CERVERA et al., 2011; ILLUM, 1998).

As propriedades químicas, físicas e biológicas da quitosana e seus sais são dependentes da fonte de quitina (material inicial da quitosana), uma vez que isso afeta o grau de desacetilação e massa molecular do polissacarídeo (CERVERA et al., 2011; ILLUM, 1998).

Levando-se em consideração as propriedades físicas e químicas do cloridrato de quitosana, um polímero natural, biodegradável, atóxico e solúvel em pH alcalino, este foi selecionado como um polímero promissor para a formação de dispersões sólidas contendo a TEL.

#### **1.4.2 Ativação mecânica em moinho de bolas**

A técnica de moagem mecânica em moinho de bolas é capaz de amorfizar partículas em larga escala e, assim, melhorar características biofarmacêuticas de fármacos, destacando-se frente outras técnicas devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e possibilidade de escalonamento (LIM; NG; TAN, 2013; BARZEGAR-JALALI et al., 2010). Além disso, o processo de moagem mecânica propicia interações entre fármaco e excipiente e, dessa forma, é capaz de promover modificações tanto nas propriedades físico-químicas da estrutura cristalina de fármacos, quanto na formação de complexos entre fármaco-excipiente, resultando no melhoramento de características de solubilidade, dissolução e biodisponibilidade destes (CROWLEY; ZOGRAFI, 2002). É importante ressaltar que a moagem mecânica é considerada uma das operações unitárias mais simples e comuns da indústria farmacêutica, a qual não requer o uso de solventes em seu processo, sendo considerada uma técnica limpa e ambientalmente correta (BARZEGAR-JALALI et al., 2010).



## **Capítulo II**

### **Telmisartana: Controle de qualidade, pureza e caracterização do estado sólido**

---

Publicação: “*Telmisartan: Quality control, purity and solid state characterization*”.

Artigo aceito pela revista *Latin American Journal of Pharmacy* em Janeiro de 2014



## 1 INTRODUÇÃO

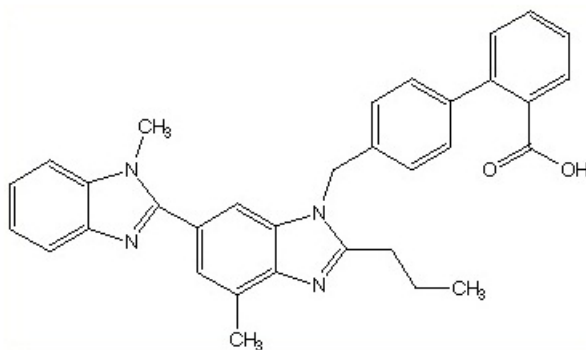
A telmisartana (TEL) é um potente e seletivo antagonista do receptor da angiotensina II do tipo 1 (AT1), a qual é amplamente utilizada na prevenção e tratamento da hipertensão arterial (GOODMAN; GILMAN, 2008). Este fármaco apresenta a maior afinidade de ligação ao receptor AT1 dentre sua classe (KAKUTA et al., 2005; DESTRO et al., 2011; GALZERANO et al., 2010), não afetando outros sistemas de receptores envolvidos na regulação cardiovascular, resultando em poucos efeitos colaterais (WIENEN et al., 2000). Além disso, a TEL também fornece benefícios de proteção contra o dano vascular e renal causada por insuficiência cardíaca e diabetes (GOYAL et al., 2009; GRASSI; QUARTI-TREVANO; MANCIA, 2008; HINOI et al., 2008). Neste contexto, o tratamento com a TEL apresenta diversas vantagens em relação a outros fármacos, destacando sua seletividade, longa duração de ação (exigindo apenas uma administração por dia), boa tolerabilidade e perfil de segurança favorável, que estão presentes sozinhos e em terapias combinadas (GOSSE, 2006).

A TEL, Figura 5, é quimicamente conhecida como 4'-[4-Metil-6-(1-metil-2-benzimidazolil)-2-propil-1-benzimidazolil] metil}-2-ácido bifenilcarboxílico, sendo caracterizada como um pó cristalino branco amarelado praticamente insolúvel em água, de fórmula química  $C_{33}H_{30}N_4O_2$  e massa molecular 514,63 g / mol (MARTINDALE, 2013; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012). Este fármaco apresenta baixa solubilidade em meio aquoso e alta permeabilidade intestinal, sendo classificado como classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON et al., 1995; ZHANG et al., 2010b). A literatura relata a presença de polimorfismo (MARTINDALE, 2013; DINNEBIER et al., 2000).

Embora a TEL tenha sido aprovada pelo órgão fiscalizador americano FDA no ano 2000, demonstrando um extensivo estudo no domínio farmacológico (SHAH; SINGH, 2010), poucas informações estão disponíveis na literatura a respeito desta. A monografia da TEL foi recentemente lançada na Farmacopéia Britânica 2012 (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012) e também está disponível para a forma de comprimidos na Farmacopéia Americana desde 2011 (USP., 2011c). No entanto, a caracterização da TEL não foi completamente elucidada nestas monografias, tornando as propriedades físico-químicas da TEL ainda substancialmente desconhecidas.

Apesar das matérias primas nacionais e importadas apresentarem um certificado aceitável de pureza, estas são suscetíveis a apresentar diferenças em suas características de estado sólido, como polimorfismo, hábito cristalino e tamanho de partícula.

Figura 5: Estrutura química da TEL



Estas diferenças do estado sólido podem implicar em mudanças significativas na solubilidade, compatibilidade e estabilidade física do composto. Assim, a investigação das propriedades físico-químicas da matéria-prima, tais como a solubilidade, a pureza e o polimorfismo são extremamente relevantes durante o desenvolvimento de produtos farmacêuticos a fim de evitar problemas com a biodisponibilidade do fármaco (BRITAIN, 2008; HUANG; TONG, 2004).

Neste contexto, o objetivo do estudo foi determinar o perfil físico-químico da TEL, tais como a sua solubilidade, velocidade de dissolução intrínseca (VDI), a pureza e a forma cristalina, utilizando uma variedade de técnicas. Os ensaios de caracterização foram realizados através de diferentes técnicas, incluindo análise térmica (DSC e TG/DTG), Difração de Raio-X de pó (DRX), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia na região do infravermelho (IV), Raman, Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS). Este trabalho tem como objetivo estabelecer parâmetros de qualidade para TEL, e, desta forma, melhorar a qualidade deste importante ingrediente farmacêutico.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria-prima TEL foi fornecida pela Haohua Industry Co. Ltd. (China). Todos os solventes e reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico.

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO

### 2.2.1 Estudos de solubilidade

Os testes foram realizados utilizando fármaco em excesso em 10 mL em diferentes solventes. As amostras foram agitadas a 25 ° C ( $\pm 2$  ° C), até atingir o equilíbrio, e, em seguida, foram filtradas e quantificadas através de um método espectrofotométrico previamente validado a 298 nm. Este experimento foi realizado em triplicata para garantir uma maior confiabilidade dos resultados. A solubilidade da TEL foi determinada em solventes com diferentes polaridades. Estes solventes são: água, metanol, etanol, acetona, acetato de etila, diclorometano, hexano, clorofórmio, acetonitrila, ácido hidrocloreto 0,1M, hidróxido de sódio 1M.

### 2.2.2 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI)

A velocidade de dissolução intrínseca foi avaliada empregando aparato de Wood. Uma pastilha foi preparada através da compactação de 100,0 mg de amostra (TEL) durante um minuto empregando uma pressão de 400 kgf/cm<sup>2</sup>. O tempo de compactação e descompressão foi mantido constante. As amostras foram preparadas em triplicata e armazenadas em condições constantes em temperatura ambiente e umidade relativa. Antes do teste de dissolução, as amostras foram armazenadas em estufa a 40 ° C durante 20 minutos. A matriz com uma superfície de 0,5 cm<sup>2</sup> foi mantida em contato direto com o meio de dissolução.

O disco de dissolução intrínseca foi imerso em 250,0 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,25% e mantido em rotação a 75 rpm a 37 ° C ( $\pm 0,5$  ° C), durante 180 minutos. Alíquotas de 5,0 mL foram retiradas aos 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. O meio de dissolução foi repostado depois de cada amostragem. A concentração da TEL na solução foi quantificada por um método de UV previamente validado em um espectrofotômetro UV/visível (Varian, Cary 50 Bio) no comprimento de onda de 298 nm. As condições de imersão foram mantidas durante toda a experiência de dissolução.

### 2.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu) utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, com cerca de 2 mg de amostra, sob uma atmosfera de N<sub>2</sub> dinâmica (velocidade de fluxo: 50 mL.min<sup>-1</sup>). A faixa de temperatura foi de 30 ° C a 350 ° C com taxa de aquecimento de 10 ° C.min<sup>-1</sup>. Um cadinho de alumínio vazio foi utilizado como

referência. A célula de DSC foi calibrada com índio ( $T_{\text{pico}} 156\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\Delta H_{\text{fusion}} = 28,54\text{ J g}^{-1}$ ) e zinco ( $T_{\text{pico}} 419\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A determinação da pureza da TEL foi calculada com base na equação de van't Hoff (BRITTAIN, 2008; FELIX et al., 2008). A análise foi efetuada utilizando 1 mg de amostra com uma velocidade de aquecimento de  $2\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$  na faixa de temperaturas  $30\text{-}350\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em uma atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de  $50\text{ mL.min}^{-1}$ . A análise foi realizada em triplicata.

#### 2.2.4 Termogravimetria (TG)

As curvas TG/DTG foram obtidas utilizando-se termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu na faixa de temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com uma taxa de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ , utilizando cadinhos de platina com aproximadamente 1 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  (taxa de fluxo:  $50\text{ mL.min}^{-1}$ ). O equipamento foi previamente calibrado com padrão de oxalato de cálcio. Os estudos de cinéticas isotérmicas foram realizados sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com a taxa de fluxo de  $50\text{ mL.min}^{-1}$ . As temperaturas utilizadas foram  $300, 310, 320, 330$  e  $340\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  de incremento de temperatura. O estudo de cinética isotérmica foi monitorada com base no tempo a uma perda de massa de 5% de degradação e os dados experimentais foram tratados aplicando uma regressão linear.

#### 2.2.5 Difração de Raio-X de pó (DRX)

Os difratogramas foram obtidos utilizando um  $\theta - \theta$  difratômetro de raios-X (Xpert Pro Multi-Purpose Diffractometer, PanAnalytical) equipado com radiação de cobre  $\text{K}\alpha$  ( $\lambda = 1.5418\text{ \AA}$ ) operando com corrente de 40 mA e voltagem de 45 kV, amostra giratória e um detector Real Time Multiple Strip (RTMS). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, varredura  $2\theta$  a partir de  $4^{\circ}$  a  $50^{\circ}$ , com 0.033 tamanho de passo e 19.7 segundos tempo do passo.

#### 2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias foram tiradas com um microscópio eletrônico de varredura Philips, modelo XL30. As amostras foram colocadas em uma base metálica utilizando fita adesiva dupla-face e recobertas com ouro ( $350\text{ \AA}$ ) sob vácuo com auxílio de um aparelho Polaron modelo E5000 e analisadas por MEV (ampliação de 1000x).

### 2.2.7 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos em equipamento Perkin-Elmer modelo 1600, utilizando fármaco disperso em KBr em um intervalo de 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.2.8 Espectroscopia Raman

O espectro na região do Raman foi realizado em um equipamento PeakSeeker 785 (RAM-PRO-785 equipado com laser diodo de 785nm e 300mW direto da fonte). A radiação coletada por Raman foi dispersa com uma grade e focada sobre um dispositivo Peltier-cooled charge-coupled (CCD), que permite a obtenção de uma resolução espectral de  $6\text{cm}^{-1}$ . O laser foi focado na amostra pela lente objetiva de 4x de um microscópio, resultando em um feixe de aproximadamente  $2\ \mu\text{m}$  de diâmetro. Todos os espectros foram registrados em uma janela espectral de 200- 1800  $\text{cm}^{-1}$  com o mesmo tempo de aquisição (30s). A amostra em pó foi analisada em uma lâmina de vidro a temperatura ambiente.

### 2.2.9 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

O espectro RMN foi obtido utilizando um espectrômetro Bruker HX-270 ( $^1\text{H}$  200 MHz e  $^{13}\text{C}$  50 MHz) e Varian Mercury Plus400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 108 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) utilizando TMS como padrão interno.

### 2.2.10 Espectrometria de massa (MS)

Medidas ESI-Q-TOFMS foram realizadas com um espectrofotômetro de massa modelo microOTOF Q-II (Bruker Daltonics) equipado com uma bomba de seringa automática de KD Scientific para a injeção da amostra. O espectrofotômetro de massas ESI-QTOF foi utilizado a 4,5kV a uma temperatura de dessolvatação de 180 °C. O espectrofotômetro de massas operou em modo íon positivo. A fonte padrão da (ESI) foi utilizada para gerar íons. As amostras foram injetadas a fluxo constante ( $3\ \mu\text{L}/\text{min}$ ). O solvente utilizado foi o metanol. O instrumento ESI-Q-TOFMS foi calibrado na faixa  $m/z$  50 - 3000 utilizando padrão de calibração interna (solução de mistura ajustada a baixa concentração), que é fornecido a partir da Agilent Technologies. Os dados foram processados através do Bruker Data Analysis software version 4.0

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE

O estudo de solubilidade da substância pura em alguns solventes a temperatura constante é um parâmetro característico de cada substância e, assim, pode ser utilizado para identificar e avaliar a pureza de compostos químicos (BRASIL., 2003; MURAKAMI et al., 2009). Além disso, a solubilidade de fármacos afeta diretamente a farmacocinética e a estabilidade química da molécula. Desse modo, o conhecimento da solubilidade do fármaco em diferentes solventes é bastante útil para escolher o solvente mais adequado para ser utilizado em métodos analíticos ou o melhor veículo para testes *in vivo*, bem como o desenvolvimento de uma possível formulação líquida contendo o fármaco (MAXIMIANO et al., 2010).

A classificação farmacopeica da solubilidade da TEL está apresentada na Tabela 1. A expressão "parte" descreve quantos mililitros (mL) de solvente, representado pelo número de partes declarado, em que 1 grama do sólido é solúvel (BRASIL., 2003).

Tabela 1: Classificação farmacopeica da solubilidade empregada na determinação da solubilidade aproximada da TEL em diferentes solventes a 25°C

Classificação Farmacopeica da Solubilidade	
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 parte
Moderadamente solúvel	De 30 a 100 partes
Ligeiramente solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10 000 partes

Os dados da solubilidade da TEL em diferentes solventes é mostrado na Tabela 2. Os solventes com uma maior capacidade de dissolver a TEL foram hidróxido de sódio (1M), clorofórmio e diclorometano. Em hidróxido de sódio (1M) TEL foi classificada como muito solúvel, no entanto, observou-se experimentalmente que a solução resultante apresentou elevada viscosidade, o qual impede a sua utilização em métodos analíticos.

Embora em clorofórmio e diclorometano a TEL tenha sido classificada como solúvel e moderadamente solúvel, respectivamente, estes solventes apresentam vários inconvenientes relacionados com a sua natureza orgânica, o que as tornam não miscíveis em água e podem também levar a formulações tóxicas.

Tabela 2: Dados da solubilidade média de TEL em diferentes solventes a 25°C

Solvente	Solubilidade (mg/mL)	Classificação Experimental	Classificação da Literatura
Água destilada	0,0005	Praticamente insolúvel	Praticamente insolúvel
Metanol	2,887	Ligeiramente solúvel	Ligeiramente solúvel
Etanol	1,035	Ligeiramente solúvel	-
Acetona	1,610	Ligeiramente solúvel	-
Acetato de etila	0,739	Muito pouco solúvel	-
Diclorometano	28,776	Moderadamente solúvel	Moderadamente solúvel
Hexano	0,014	Praticamente insolúvel	-
Clorofórmio	63,516	Solúvel	-
Acetonitrila	0,325	Muito pouco solúvel	-
Ácido clorídrico (0,1M)	0,517	Muito pouco solúvel	-
Hidróxido de sódio (1M)	258,480	Muito solúvel	-

Entre os solventes, onde a TEL foi classificada como ligeiramente solúvel estão o metanol, o etanol e a acetona. A solubilidade de TEL nestes solventes é suficientemente aceitável para a sua utilização em métodos analíticos. Além disso, esses solventes são miscíveis em água, o que torna a sua utilização mais fácil em uma variedade de equipamentos analíticos.

A TEL é um fármaco descoberto recentemente e, desse modo, existem poucos estudos sobre suas características físico-químicas. O conhecimento da solubilidade da TEL em uma faixa mais ampla de solventes daqueles disponibilizados na literatura pode fornecer uma base de dados para novos estudos empregando este fármaco. Vale ressaltar que dados obtidos experimentalmente estão de acordo com os resultados previamente relatados na literatura (MARTINDALE, 2013; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012).

### 3.2 VDI

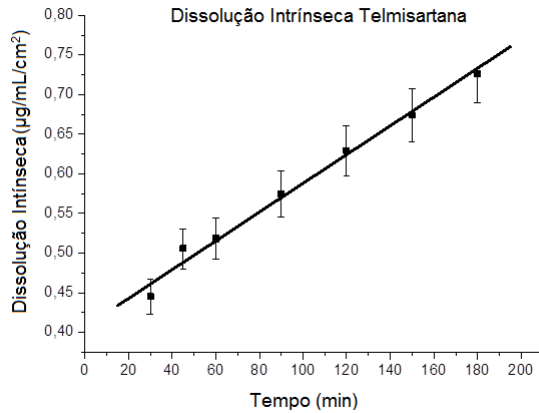
A avaliação da velocidade de dissolução intrínseca é uma ferramenta bastante útil na caracterização de matérias primas e excipientes. É definida como a velocidade de dissolução de uma substância pura, sob condições constantes de área de superfície, temperatura, agitação, pH do meio e da força iônica (USP, 2011c). A VDI é utilizada como alternativa para determinação da solubilidade de compostos, apresentando diversas vantagens sobre testes de solubilidade. A VDI requer pouca quantidade de matéria prima para execução do teste de solubilidade, permite a determinação da classe de solubilidade de um composto (SCB) e a verificação de interferência nos resultados, os quais são graficamente mensuráveis por meio de curvaturas nos gráficos que podem estar relacionadas com a transição a partir da estrutura cristalina ou a formação de sais (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012; SEHÍC et al., 2010).

Como pode ser observado na Figura 6, a curva de dissolução intrínseca da TEL teve alta correlação linear ( $R^2 = 0,99$ ,  $P < 0,0001$ ) não demonstrando transição de fase ao longo do processo (SEHÍC et al., 2010). O valor da inclinação da curva, utilizado nos cálculos da VDI, foi 0,0018. De acordo com Yu e colaboradores (YU et al., 2004), os compostos com valores abaixo de  $0,1 \text{ mg/min/cm}^2$  indica uma baixa solubilidade em água (ZAKERI-MILANI et al., 2009; ISSA; FERRAZ, 2011).

O lauril sulfato de sódio foi utilizado como meio de dissolução, levando em consideração as orientações da USP (MAXIMIANO et al., 2010) para a VDI de fármacos pouco solúveis, como TEL. De acordo com a USP, soluções aquosas contendo uma porcentagem de surfactante, como lauril sulfato de sódio, são usadas para aumentar a solubilidade do fármaco nas análises de VDI (STORPIRTIS; CHANG; GONCALVES, 2009; USP, 2011c).



Figura 6: Perfil de dissolução intrínseca da TEL em lauril sulfato de sódio 0,25%



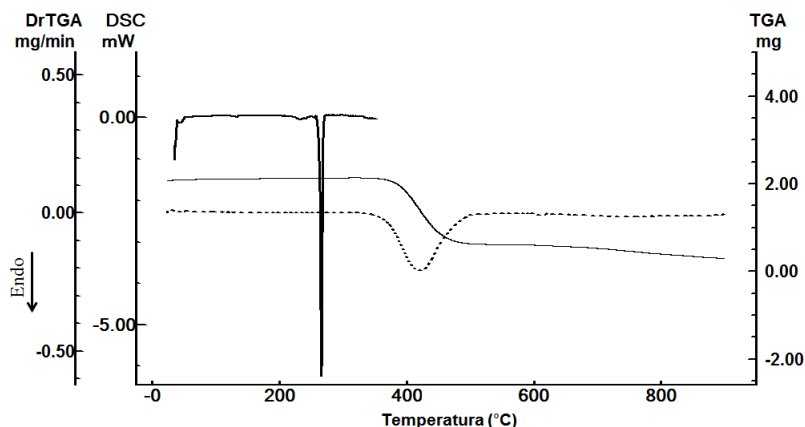
Como pode ser observado na Figura acima, o primeiro ponto da curva da VDI foi observado após o período de 30 min do início da dissolução. Este atraso pode ser explicado devido à baixa solubilidade de TEL, que dificulta a molhabilidade do composto e, conseqüentemente, retarda a velocidade de dissolução inicial.

### 3.3 PERFIL TÉRMICO

O perfil térmico da amostra foi caracterizado por DSC e TG/DTG, demonstrado na Figura 7. A curva de DSC mostrou um único pico endotérmico que corresponde a um evento de fusão no intervalo entre 263.17 e 268.17 °C ( $T_{peak} = 265.28$  °C e  $\Delta H_{fusion} = -124.95$  J g<sup>-1</sup>), de acordo com o intervalo descrito na literatura para o polimorfo A ( $269 \pm 2$  °C), que é o único dos polimorfos que apresenta apenas um único pico endotérmico (USP., 2011a; DINNEBIER et al., 2000; CSD. Cambridge Structural Database, 2000), sugerindo que a amostra analisada se refere ao polimorfo A.

A determinação da perda de massa de uma substância em certos intervalos de temperatura pode ser utilizada para avaliar o comportamento térmico da amostra, permitindo a determinação da temperatura de decomposição do composto (MAXIMIANO et al., 2010).

Figura 7: Caracterização do estado sólido da TEL através do DSC e TG/DTG



A partir das curvas TG/DTG pode-se observar que a perda de massa, relacionada a degradação do composto, inicia após o evento de fusão ser completamente concluído. A TEL começa a se decompor acima de 300 ° C, de acordo com a literatura (DINNEBIER et al., 2000), mas especificamente no intervalo de temperatura de 383-452 ° C, em apenas uma etapa, totalizando 86% de perda de massa (ponto médio= 419.64 ° C; início= 383.31°C ; final= 452.67 ° C ). Desta forma, a estabilidade térmica da TEL foi evidenciada até 380 ° C.

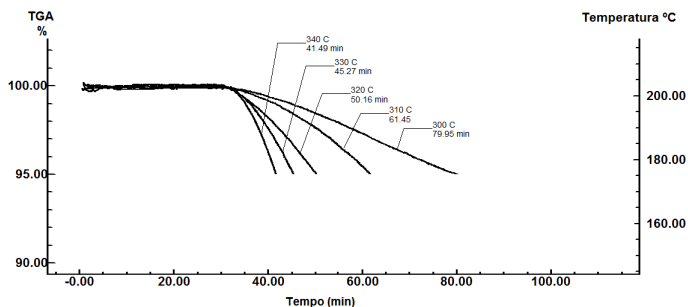
A pureza da TEL foi determinada por DSC utilizando a equação de van't Hoff. A determinação de pureza do fármaco através de metodologia termogravimétrica é recomendada pela Farmacopéia Americana(USP., 2011c). Este método é baseado na equação de van't Hoff, o qual representa um método rápido e preciso para este tipo de análise. Este método baseia-se no fato de que a presença de pequenas quantidades de impurezas em uma amostra é capaz de diminuir o ponto de fusão característico do composto e ampliar a sua faixa de fusão (BRASIL., 2003). O controle de qualidade de fármacos tem um papel importante na garantia da qualidade de matérias-primas e formulações farmacêuticas, estando diretamente relacionado com a segurança destes insumos farmacêuticos. Os três atributos principais de qualidade de fármacos são identidade, potência e pureza.

A determinação da pureza de matérias-primas é extremamente importante fisiologicamente, uma vez que a presença de impurezas, tais como produtos de síntese, e os produtos de degradação estão diretamente relacionados com os efeitos colaterais do fármaco (GOROG, 2008).

As amostras de TEL analisadas a uma taxa de aquecimento de 2 °C/min, mostrou pureza estimada em 96%.

Os estudos cinéticos isotérmicos são mostrados na Figura 8.

Figura 8: Curvas TG isotérmicas de TEL obtidas em 300, 310, 320, 330 e 340 ° C, sob atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>



Os resultados demonstraram perda de massa em função do tempo. Foi observado que a curva isotérmica de 340°C necessita de menos tempo para perder 5% de massa (41.49 min) em relação a menor temperatura empregada de 300 °C (79.95 min). Assim, evidenciou-se que quanto maior a temperatura utilizada, menor será o tempo necessário para atingir a mesma perda de massa de 5%.

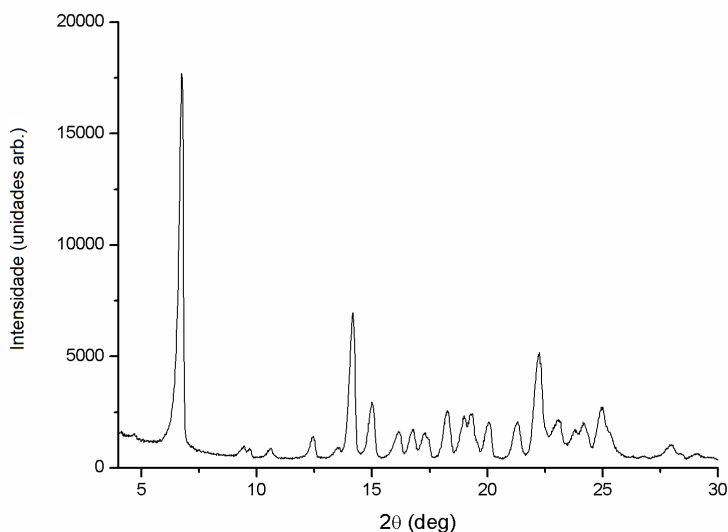
### 3.4 DRX

A técnica de difração de pó é comumente empregada na identificação de rotina e na determinação da pureza relativa de materiais cristalinos (USP., 2011c). O padrão de difração de Raio-X da TEL, é mostrado na Figura 9, apresentando picos predominantes em  $2\theta$ : 6.7, 14.18, 15.00, 22.25 e 24.96°, o qual reflete caracter cristalino do fármaco, de acordo com as análises por Raio-X descritas na literatura (ZHANG et al., 2010b; KANE; KUCHEKAR, 2010).

A existência de polimorfos é de grande importância para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, uma vez que o estado sólido do fármaco (arranjos moleculares e hábito cristalino) como polimórfico, solvato ou amorfo representa um impacto significativo na solubilidade, taxa de dissolução, biodisponibilidade e estabilidade das formulações farmacêuticas (GENARO, 2000; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). De acordo com Cambridge Structural Database a TEL possui quatro polimorfos descritos na literatura:

SONKEM, XUYHOO, XUYHOO01 e XUYHUU (CSD. Cambridge Structural Database, 2000). Nas análises por DRX da TEL foi observado que o padrão de difração da amostra apresenta similaridade com o polimorfo XUYHOO01/ Polymorph A (DINNEBIER et al., 2000; CSD. Cambridge Structural Database, 2000), sem desvio ou o aparecimento de novos picos, o que confirma que a amostra analisada é o polimorfo A, a forma estável da TEL.

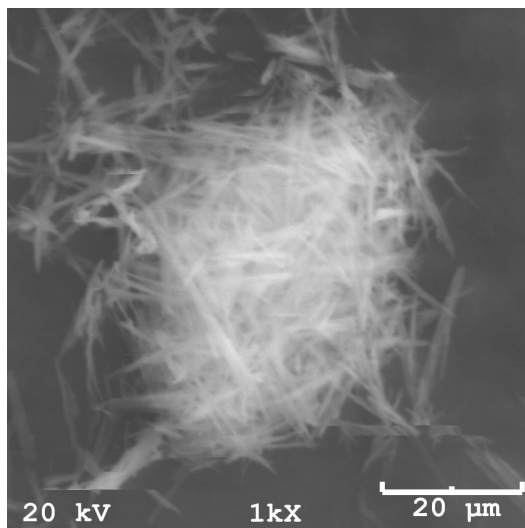
Figura 9: Difração de Raio-X de pó da TEL



### 3.5 MEV

A análise morfológica de fármacos é uma maneira fácil de monitorar e detectar mudanças relacionadas com variações no processo de síntese de cristais ou até mesmo em processos farmacêuticos (MAXIMIANO et al., 2010). A fotomicrografia da TEL foi obtida com uma ampliação de 1000x e pode ser observada na Figura 10. Como pode ser observado, a TEL é caracterizada por longos cristais aciculares (em forma de agulhas), os quais são característicos do Polimorfo A (DINNEBIER et al., 2000), de acordo com os resultados previamente observados através de DRX.

Figura 10: Fotomicrografias MEV da TEL (ampliação de 1000x)



Dentre as técnicas de caracterização, o IV e outras técnicas modernas, tais como Raman, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e de carbono-13 (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-VIS) e espectrometria de massa (MS) são reconhecidos como os principais recursos para identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas (USP., 2011a; LOPES; FASCIO, 2004). Deste modo, a fim de gerar os dados complementares e mais concisos, IV, Raman, RMN e MS foram utilizados a fim de identificar a amostra.

### 3.6 IV

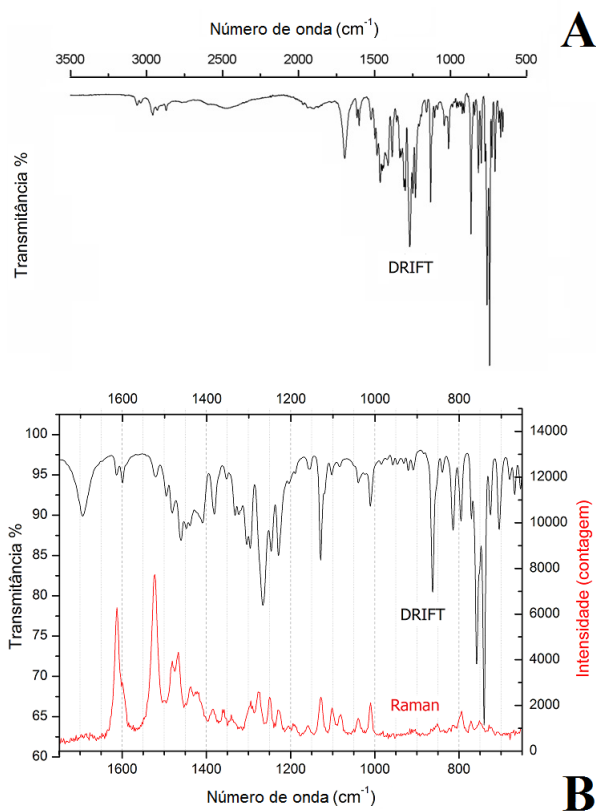
O espectro de absorção IV de uma substância, quando comparado com a referência, propicia, possivelmente, a evidência mais conclusiva da identidade de uma substância química (USP., 2011c).

Esta análise fornece informações sobre os grupos funcionais, os quais estão presentes na estrutura da substância, permitindo diferenciar as substâncias através de sua estrutura química. Assim, esta técnica é amplamente utilizada para elucidar estruturas de substâncias orgânicas (BRASIL., 2003; RIBEIRO; SOUZA, 2007).

O espectro IV da TEL, Figura 11 A e B, mostraram bandas características de alongamento C-H aromático em  $3059\text{ cm}^{-1}$ , modos vibracionais

de estiramento alifático C-H em  $2956\text{ cm}^{-1}$ , de ácido carboxílico COOH em  $1694\text{ cm}^{-1}$ , vibrações de flexão e estiramento em C=C aromático em  $1600\text{ cm}^{-1}$ , flexão C-H aromática em  $1461\text{ cm}^{-1}$ , flexão -OH e estiramento C=O do ácido COOH em  $1381\text{ cm}^{-1}$ , e vibração do anel 1,2 do benzeno disubstituído em  $740$  e  $758\text{ cm}^{-1}$ . Resultados semelhantes para a análise de TEL por IV foram anteriormente descritos na literatura (KANE; KUCHEKAR, 2010).

Figura 11: Espectro IV (A e B) da TEL e Espectro Raman da TEL (B)



### 3.7 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman é uma das técnicas mais promissoras para identificação e quantificação de componentes químicos, como fármacos, ex-

cientes e polimorfos dentro de comprimidos intactos, cápsulas ou pós.

Estas medições permitem uma análise rápida e não-destrutiva, não requerendo preparo de amostras, proporcionando uma melhora significativa no controle de qualidade de rotina e redução de custos para a indústria farmacêutica. (BUCKLEY; MATOUSEK, 2011; VANKEIRSBILCK et al., 2002).

A espectroscopia Raman foi realizada a fim de complementar a técnica de IV, a fim de elucidar o espectro do Polimorfo A da TEL. O espectro Raman é apresentado na Figura 11 B. As bandas características principais são vistas em  $1465 - 1481 \text{ cm}^{-1}$  (vibrações  $\text{CH}_3 \text{ CH}_2$ ),  $1525 \text{ cm}^{-1}$  (vibrações de anel aromático C-C) e  $1615 \text{ cm}^{-1}$  (vibrações C=N), de acordo com os resultados prévios descritos na literatura para TEL polimorfo A (DUKECK; SIEGER; KARMWAR, 2013).

### 3.8 RMN

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução é uma das técnicas mais importantes para elucidar a estrutura química de moléculas (LINDON; NICHOLSONA; WILSON, 2000). RMN de hidrogênio e de carbono-13 indica a disposição da estrutura hidrocarbônica, ou seja, situações de diferentes ambientes químicos dos átomos de carbono e de hidrogênio na estrutura química (RIBEIRO; SOUZA, 2007). No campo farmacêutico, esta técnica é muito utilizada em conjunto com MS e em associação com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em análise de fármacos a fim de elucidar as impurezas ou os produtos de degradação que podem estar presentes na amostra.

No presente trabalho, a estrutura química da TEL (Figura 5) foi confirmada com base nos sinais obtidos nos espectros (Figura 12) e comparado com os dados da literatura (KUMAR et al., 2009). Todos os sinais característicos da estrutura química da TEL podem ser observados claramente usando RMN de próton.

Foram observados dois singletos de metila, N-Me e Ar-Me, e a cadeia propionica característica, em conjunto com o grupo metileno benzílico na formas de singletos a estrutura do composto saturado. Todos os hidrogênios aril foram confirmados por deslocamentos químicos e integração. O carbono-13 mostra os espectros de sinais para todos os átomos de carbono da TEL.

O RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são mostrados a seguir:

$^1\text{H}$  RMN (200MHz,  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$ ppm):

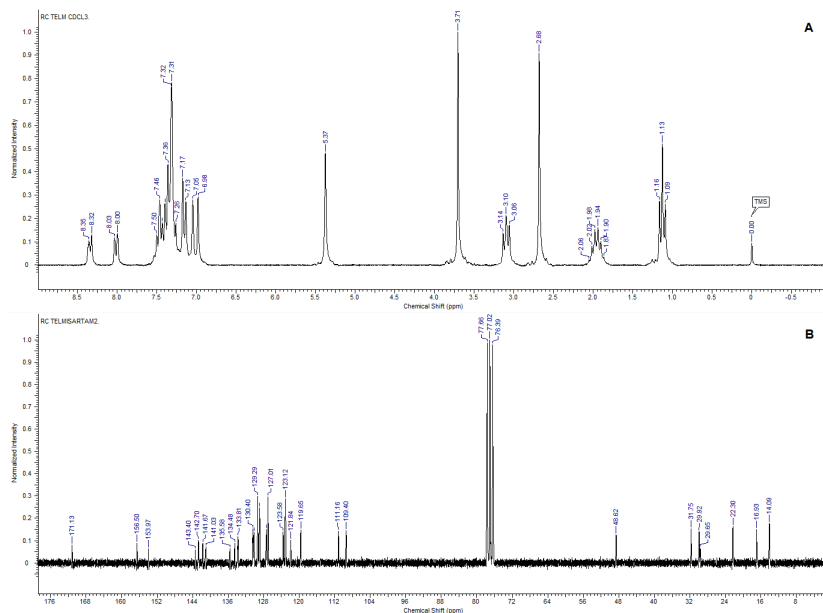
8.34 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 1 H, ArH) 8.01 (d,  $J= 7.1 \text{ Hz}$ , 1H, ArH) 7.50-7.31 (m, 8HArH), 7.13 (d,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ , 2H, ArH), 7.04 (s, 1H, ArH), 6.98 (s, 1H, ArH), 5.37 (s, 2H,  $-\text{CH}_2$ ), 3.70 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 3.10 (t,  $J = 8.0 \text{ Hz}$ , 2H  $-\text{CH}_2$ ), 2.68 (s, 3H  $-\text{CH}_3$ ), 1.96 (m,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ , 2H  $-\text{CH}_2$ ), 1.13 (t,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ ,

3H-CH<sub>3</sub>);

<sup>13</sup>C RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>(δppm):

14.9, 16.93, 22.30, 29.65, 29.92, 31.75, 48.62, 109.40, 111.16, 119.65, 121.84, 123.12, 123.58, 127.01, 127.37, 128.89, 129.29, 130.21, 130.40, 133.72, 133.87, 134.48, 135.58, 141.03, 141.67, 142.70, 143.40, 153.97, 156.50, 171.13

Figura 12: Espectro de Ressonância magnética nuclear da TEL: <sup>1</sup>H (A) e <sup>13</sup>C (B)



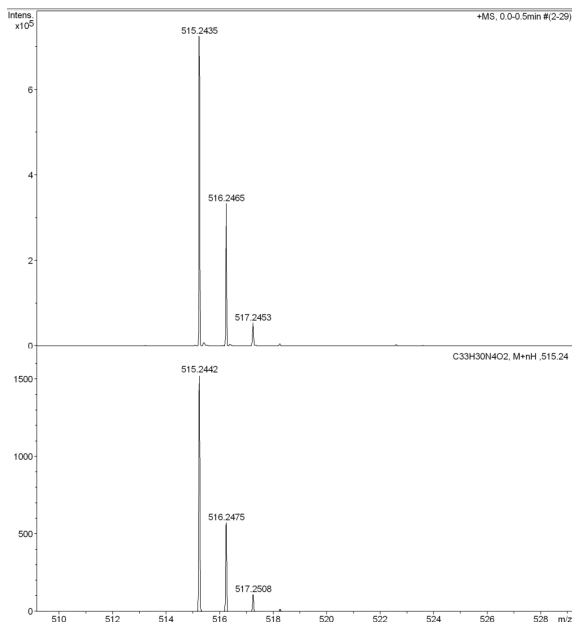
### 3.9 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A técnica de espectrometria de massa fornece informação sobre o massa molecular e padrão isotópico de íons derivados da amostra e da abundância relativa de cada um destes íons. Na área farmacêutica, esta técnica é geralmente utilizada para a identificação e quantificação de compostos específicos (USP, 2011c).

O espectro de massa de alta resolução (Figura 13) confirmou a massa exata da amostra, por usar ionização *electrospray* no modo positivo, apresentando dados concisos que permitiram a identificação definitiva do composto. HRMS (ESI C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> M+H) calculado 515.2442, encontrado 515.2435.



Figura 13: Espectrometria de massa da TEL.



## 4 CONCLUSÕES

É possível concluir que as técnicas propostas são complementares e permitem a identificação correta da TEL. O presente estudo fornece informações detalhadas sobre a natureza físico-química do fármaco, incluindo a sua velocidade de dissolução intrínseca e sua solubilidade em vários solventes com diferentes naturezas e polaridades. Assim, este trabalho pode ser usado como uma base de dados para a caracterização e controle de qualidade da matéria-prima e também fornecer subsídios para o estabelecimento de diretrizes de qualidade para os laboratórios das indústrias farmacêuticas de controle de qualidade.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores reconhecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Agradecemos também ao Laboratório de Síntese de substâncias de Selênio (LabSelen) e Centro de Biologia Estrutural Molecular (CEBIME) da Universidade Federal de

Santa Catarina. As medições de raios-X foram realizadas no Laboratório de raios-X Difração (LDRX) da Universidade Federal de Santa Catarina. Equipamento Raman utilizado foi adquirido com recursos do Processo Nummer: 577385/2008-9 Edital MCT / CNPq n° 62/2008 - Jovens Pesquisadores (Nanotecnologia) Coord. C. E.M Campos.

## **Capítulo III**

### **Desenvolvimento, validação e comparação de métodos para a quantificação da Telmisartana por UV e HPLC**

---

Publicação: *“Development, validation and comparison methods for Telmisartan quantification by UV-spectrophotometry and HPLC”*.

Artigo submetido à revista *Journal of Chromatographic Science*

## 1 INTRODUÇÃO

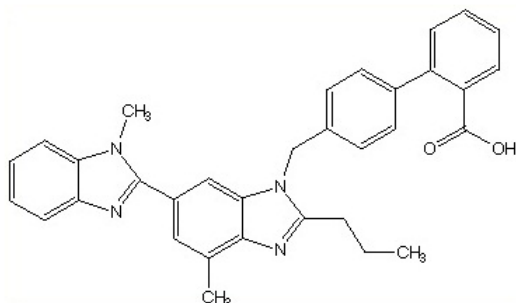
A hipertensão arterial é considerada um importante problema de saúde e uma das principais causas de morbidade e mortalidade na maioria dos países desenvolvidos do mundo (MCCARTY, 1983; SUKOR, 2011; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). Sua prevalência mundial é de aproximadamente 30%, sendo considerado um importante fator de risco para o acidente vascular cerebral, doença cardíaca isquêmica e insuficiência cardíaca. Neste contexto, a hipertensão representa um alto custo econômico e social sobre os sistemas de saúde, famílias e sociedade (SUKOR, 2011; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

A Telmisartana (TEL) é potente e seletivo antagonista dos receptores da angiotensina II do tipo I (AT1), frequentemente utilizado na prevenção e tratamento da hipertensão (GOODMAN; GILMAN, 2008). Este fármaco destaca-se devido à sua seletividade, uma vez que apresenta a maior afinidade de ligação ao receptor AT1 dentro de sua classe (KAKUTA et al., 2005; DESTRO et al., 2011; GALZERANO et al., 2010), não afetando outros sistemas de receptores relacionados à regulação cardiovascular, resultando em poucos efeitos colaterais (WIENEN et al., 2000). Não obstante, a TEL também fornece benefícios de proteção contra o dano vascular e renal causados pela insuficiência cardíaca e diabetes (GOYAL et al., 2009; HINOI et al., 2008; GRASSI; QUARTI-TREVANO; MANCIA, 2008). Neste contexto, o tratamento com TEL apresenta várias vantagens sobre outros fármacos, destacando-se devido a sua seletividade, longa duração de ação (o que exige apenas uma administração por dia), boa tolerabilidade e perfil de segurança favorável, as quais estão presentes tanto sozinho quanto em terapias combinadas (GOSSE, 2006).

A TEL, Figura 14, é caracterizada como um pó cristalino branco amarelado praticamente insolúvel em água, de fórmula química  $C_{33}H_{30}N_4O_2$  e massa molecular  $514,63 \text{ g.mol}^{-1}$  (MARTINDALE, 2013; USP., 2011c). O seu tempo de meia vida é de aproximadamente 24 horas, necessitando de apenas uma administração por dia, a qual atinge a concentração plasmática máxima dentro de cerca de 0,5 a 1 hora após a administração de uma dose oral. Este fármaco possui baixa solubilidade em meio aquoso e alta permeabilidade nas membranas biológicas, sendo classificado como classe II do sistema de classificação biofarmacêutica (ZHANG et al., 2010b).

Embora a TEL tenha sido aprovada pelo órgão fiscalizador americano FDA no ano 2000 (WIENEN et al., 2000), demonstrando um vasto estudo na área farmacológica, poucos métodos analíticos estão disponíveis na literatura visando a identificação e quantificação da TEL matéria prima e em produtos farmacêuticos.

Figura 14: Estrutura química da TEL



Dentre os métodos analíticos descritos na literatura para a determinação da TEL, a técnica de Cromatografia líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detector UV foi empregada na quantificação da TEL associada a outros fármacos como a amlodipina (SINHA; SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA, 2012) e o antihipertensivo hidroclorotiazida (WANKHEDE et al., 2007; GAN-GOLA; KAUSHIK; SHARMA, 2011). Além disso, há relatos de métodos analíticos para a determinação dos produtos de degradação da TEL empregando as técnicas de HPLC (GUPTA; CHARDE; CHARDE, 2011; SHEN et al., 2005), Cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) (SAHU; SAHU, 2012; PRABHU et al., 2007) e a Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massa (HPLC-MS/MS) (SHAH; SINGH, 2010). Contudo, não há relatos de metodologias analíticas simples visando a quantificação da TEL matéria prima isolada e em comprimidos empregando técnicas alternativas como a espectrofotométrica e de HPLC.

A técnica de espectrofotometria na região ultravioleta (UV) é uma técnica bastante simples e vantajosa no controle de qualidade de indústrias farmacêuticas, uma vez que contempla requisitos essenciais da rotina laboratorial como baixo custo operacional, rapidez e alta confiabilidade dos resultados (SOARES et al., 2008). Do mesmo modo, a técnica de HPLC tem sido muito utilizada no controle de qualidade de medicamentos na indústria farmacêutica, uma vez que exhibe excelente desempenho, principalmente em termos de especificidade, reprodutibilidade e rapidez (USP., 2007).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo desenvolver e validar métodos analíticos simples e econômicos para quantificar a TEL matéria-prima e em comprimidos empregando duas técnicas: espectrofotometria-UV, utilizando a água como solvente (reagente atóxico), e HPLC, utilizando acetônitrila:água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico) (40:60, v/v) como fase

móvel. Este trabalho também apresenta uma análise comparativa destes métodos, a fim de determinar o melhor método/técnica para quantificar TEL como matéria-prima e na forma de comprimidos. É importante salientar que não há estudos comparativos sobre este assunto descritos na literatura utilizando estas técnicas.

Ambos os métodos foram validados de acordo com as diretrizes do ICH. Os parâmetros de validação avaliados neste estudo foram: especificidade, linearidade, limite de quantificação e limite de detecção, precisão, exatidão e robustez.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 REAGENTES E AMOSTRAS

A TEL foi comprada através de Haohua Industry Co.Ltd. (China). Foram utilizados comprimidos de TEL de nome comercial Micardis® 40 mg (número do lote 6424) do laboratório farmacêutico Boehringer Ingelheim. A água ultrapura foi obtida através do sistema de purificação Millipore Milli-Q® (Millipore Corp, Bedford, MA, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico de acordo com a técnica empregada.

### 2.2 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

As análises espectrofotométricas na região do UV foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV/visível (Varian, Cary 50 Bio). O detector de UV foi ajustado na faixa de 298 nm e utilizou-se água destilada como solvente. Para a leitura, utilizou-se uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de largura, utilizando o branco da amostra para corrigir os espectros.

As análises por HPLC foram realizadas utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu LC -10, Japão) com detector UV/VIS SPD-10AVP e controlador SCL-10AVP. Os dados do HPLC foram processadas utilizando o *software Class VP*®. A separação foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica de fase reversa *Phenomenex Luna C18*® (250 x 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula) e pré-coluna *Phenomenex*® (4,0 x 3,0 mm e 5µm de tamanho de partícula). A fase móvel foi composta por acetonitrila: água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico) (40:60, v/v). A eluição isocrática foi realizada a uma taxa de fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> à temperatura de 25 °C. O detector de UV foi ajustado para a faixa de 254 nm, utilizando volume de injeção de 20 µL.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES

##### 3.1.1 Soluções padrão estoque e de Trabalho

As soluções padrão estoque (SE) contendo  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de TEL foram preparadas solubilizando 25,0 mg do padrão de TEL (previamente pesado) em pequena quantidade de metanol utilizando ultrasonicador por 30 segundos. Posteriormente, completou-se o volume do balão volumétrico de 50 mL com metanol. Esta solução foi preparada diariamente.

Soluções de padrão trabalho (ST) foram preparadas imediatamente antes da utilização através da diluição apropriada da SE a fim de obter concentrações adequadas, utilizando água destilada como diluente para a técnica de espectrofotometria UV e fase móvel para a técnica de HPLC.

##### 3.1.2 Solução amostra

Foram utilizados vinte comprimidos contendo 40 mg da TEL (Micardis®). Os comprimidos foram pesados e triturados até a formação de um pó fino. Em seguida, pesou-se massa equivalente a 40 mg de TEL e adicionou-se em um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com metanol até o menisco. Diluições apropriadas foram efetuadas utilizando água destilada como diluente para a técnica de espectrofotometria UV e com fase móvel para HPLC.

#### 3.2 ESTABILIDADE DA TELMISARTANA EM SOLUÇÃO

A estabilidade das soluções padrão estoque e de trabalho foram investigadas à luz ambiente em intervalos de tempo diferentes, utilizando condições experimentais durante o período de 7 dias. A estabilidade das soluções à luz ambiente foi investigada em metanol, a uma concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para determinação em UV e HPLC. A estabilidade das soluções à luz ambiente foi investigada após a diluição da SE em água, a  $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , para determinação em UV e após a diluição da SE em fase móvel, a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para determinação em HPLC. Os resultados foram avaliados por UV e HPLC, respectivamente.

#### 3.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS UV E HPLC

A validação do método foi realizada de acordo com as especificações da *International Conference on Harmonization* (ICH) e da Farmacopéia



Americana (USP., 2011c; ICH, 2006; USP., 2007). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, especificidade, exatidão, precisão, robustez, limites de detecção e de quantificação.

### 3.3.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada por análise de regressão linear da solução padrão de TEL através da construção de três curvas de calibração na faixa de 6-18  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (UV) e 2-20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (HPLC). Para a construção de cada uma das curvas de calibração, soluções em cinco concentrações diferentes foram preparadas a partir da solução padrão de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da TEL (6, 9, 12, 15 e 18  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para UV e (2, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para HPLC. Para UV, alíquotas de 300, 450, 600, 750 e 900  $\mu\text{L}$  da solução padrão foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL. Os frascos foram completados até o menisco com água ultra pura. A TEL foi quantificada em triplicata a 298 nm. Para HPLC, alíquotas de 100, 250, 500, 750 e 1000  $\mu\text{L}$  da solução padrão foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e completados com a fase móvel. A TEL foi quantificada em triplicata a 254 nm, com um volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

### 3.3.2 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) dos métodos UV e HPLC foram obtidos pelas equações (1) e (2),

$$LD = 3.3 \frac{\sigma}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (2)$$

onde  $\sigma$  é o desvio padrão do intercepto e S é o coeficiente angular da curva, obtidas através das curvas analíticas no estudo da linearidade.

### 3.3.3 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da análise dos espectros de UV/cromatograma das soluções placebo (sem fármaco) frente ao espectro UV/cromatograma das soluções da amostra TEL em concentrações de 12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para UV e HPLC, respectivamente. A solução placebo foi preparada com a mesma composição que a formulação farmacêutica (hidróxido de sódio, meglumina, povidona, sorbitol e estearato de magnésio), sem o fármaco, e tratada da mesma forma que as amostras comerciais e de referência (Figura 15).

### 3.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada em relação a repetibilidade e precisão intermediária (PI). A repetibilidade (precisão intradia) foi examinada por seis avaliações da mesma concentração de TEL ( $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para UV) e ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para HPLC), em diferentes períodos do mesmo dia (manhã, tarde e noite) e sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi avaliada através da realização de análises em três dias diferentes (interdia) e por dois diferentes analistas, no mesmo laboratório e sob as mesmas condições experimentais. A mesma análise de precisão, intra e interdia, foram realizadas com amostras de soluções de TEL na concentração de  $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para UV e HPLC, respectivamente. Os valores do desvio padrão relativo (DPR) das respostas analíticas foram calculados e os dados foram validados por uma análise de variância ANOVA.

### 3.3.5 Exatidão

A exatidão do método UV foi determinada através da quantificação da recuperação do padrão de referência em triplicata, em três níveis de 75 a 125% da concentração de trabalho do método ( $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Uma solução padrão estoque de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de TEL, foi preparada conforme descrito anteriormente. Em balões volumétricos de 50 mL, alíquotas de 300, 600 e 900  $\mu\text{L}$  desta solução (que produziria concentrações de 3, 6 e 9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente) foram combinadas com 600  $\mu\text{L}$  da solução estoque (resultando em uma concentração de 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os balões volumétricos foram completados com água destilada. Assim, as concentrações finais foram de 9, 12 e 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o que corresponde, respectivamente, a 75, 100 e 125% da concentração desejada. As recuperações médias de Micardis<sup>®</sup> 40 mg, expressa em termos de porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo (DPR) foram determinadas. Além disso, foi utilizado o teste *t de Student* para comparar a porcentagem de recuperação obtida.

A exatidão do método HPLC foi determinada através da quantificação da recuperação do padrão de referência em triplicata em três níveis de 75 a 125% da concentração de trabalho do método ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A solução padrão estoque de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  da TEL foi preparada conforme descrito anteriormente. Em um balão volumétrico de 50 mL alíquotas de 200, 400 e 600  $\mu\text{L}$  desta solução (que produziria concentrações de 4, 6 e 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente) foram misturadas com 200  $\mu\text{L}$  da solução estoque (que produziria concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os balões foram completados com 50 mL de fase móvel. Desse modo, foram obtidas concentrações finais de 8, 10 e 12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o que corresponde a 75, 100 e 125% da concentração desejada,

respectivamente. As recuperações médias de Micardis® 40 mg, expressa em termos de porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo (DPR) foram determinadas. Além disso, foi utilizado o teste *t de Student* para comparar a porcentagem de recuperação obtida.

### 3.3.6 Robustez

A robustez do método UV foi determinada a partir da solução de trabalho da TEL em uma concentração de  $12\mu\text{g.mL}^{-1}$ , variando os comprimentos de onda (296, 298 e 300 nm), os fabricantes de metanol (Qhemis®, JT® e Backer PANREAC®), também foi avaliada a estabilidade das soluções na presença e na ausência de luz. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram calculados, em cada caso. Além disso, os dados foram validados por uma análise de variância (ANOVA).

A robustez do método HPLC foi determinada a partir da solução de trabalho da TEL em uma concentração de  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ , variando os comprimentos de onda (252, 254 e 256 nm), a temperatura da coluna (20, 25 e 30 °C) e o volume de injeção (19, 20 e 21  $\mu\text{L}$ ). Os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram calculados, em cada caso. Além disso, os dados foram validados por uma análise de variância (ANOVA).

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância ANOVA unifatorial, onde os resultados são considerados significativos quando a probabilidade é inferior a 5% ( $p < 0,05$ , intervalo de confiança de 95%), teste *t de Student* com nível de significância  $\alpha = 0,05$  (intervalo de confiança de 95%). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do *software Microsoft Office Excel®*, versão 2007.

## 3.5 ANÁLISE DOS PRODUTOS FARMACÊUTICOS

O método espectrofotométrico UV validado foi aplicado para a quantificação da TEL matéria-prima e em comprimidos contendo TEL (Micardis® comprimidos 40 mg). O ensaio foi realizado a 298nm, utilizando água como solvente. O método empregando a técnica de HPLC validado foi aplicado na quantificação da TEL matéria-prima e em comprimidos contendo TEL (Micardis® comprimidos 40 mg). As análises foram realizadas a 254 nm, utilizando fase móvel como solvente.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTABILIDADE DA TEL EM SOLUÇÃO

Os resultados do estudo de estabilidade, analisados por UV e HPLC indicaram que soluções padrão estoque e soluções padrão de trabalho de TEL são estáveis na presença de luz em temperatura ambiente durante pelo menos sete dias. Neste contexto, a TEL mostrou ser estável em metanol, água e soluções de fase móvel (Tabela 3).

Tabela 3: Estabilidade das soluções estoque (SE) e de trabalho (ST) de Telmisartana

	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0h	48h	7dias	DPR %
UV	SE (500)	0,5657	0,5543	0,5720	1,30
	ST (12)	0,5749	0,5740	0,5986	2,60
HPLC	SE (500)	422115,0	423571,0	423115,0	1,18
	ST (10)	423559,8	425200,3	423101,5	0,26

Os dados foram avaliados por ANOVA e não apresentaram diferenças significativas entre as análises obtidas pelos métodos de espectrofotometria UV e HPLC, realizados em períodos e em dias diferentes. Dados de espectrofotometria UV: ( $F_{\text{calculado}} (3,7323) < F_{\text{crítico}} (7,7086)$ ,  $p > 0,05$ ); dados de HPLC: ( $F_{\text{calculado}} (1,7617) < F_{\text{crítico}} (7,7086)$ ,  $p > 0,05$ ).

### 4.2 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS UV E HPLC

A validação é uma ferramenta capaz de demonstrar através de estudos experimentais que o método é adequado para a finalidade que se destina, sendo capaz de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (USP., 2011a; PATIL et al., 2008; USP., 2007; ICH., 2005). Assim, este é considerado um importante instrumento na garantia de qualidade de formulações farmacêuticas (GANGOLA; KAUSHIK; SHARMA, 2011).

#### 4.2.1 Linearidade e faixa

A linearidade do método espectrofotométrico de UV, através da análise das curvas, foi considerada linear no intervalo de 6 a 18  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Obteve-se um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9994 (Tabela 4). Além disso, os dados foram validados por uma análise de variância, que mostrou regressão linear significativa ( $F_{\text{calculado}} (2530,06) > F_{\text{crítico}} (0,00001730)$ ) e nenhum desvio significativo da linearidade ( $p < 0,05$ ).

A linearidade do método HPLC, através da análise das curvas, foi considerada linear no intervalo de 2 a 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e obteve-se um coeficiente de correlação (r) de 0,9998 (Tabela 4). Além disso, os dados foram validados por análise de variância, que mostrou regressão linear significativa ( $F_{\text{calculado}} (14951,27) > F_{\text{crítico}} (1,206^{-06})$ ) e nenhum desvio significativo da linearidade ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4: Parâmetros de Linearidade na determinação da TEL

Parâmetro	UV	HPLC
Faixa de linearidade	6 - 18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 - 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Equação	$y = 0,048x - 0,018$	$y = 4353x - 12693$
Inclinação (a) $\pm$ DP	$0,048 \pm 0,0010$	$43509 \pm 533,8883$
Intercepto (b) $\pm$ DP	$0,018 \pm 0,0040$	$12205 \pm 1486,0573$
Coef. de correlação (r)	0,9994	0,9998

#### 4.2.2 Limites de Detecção e Quantificação

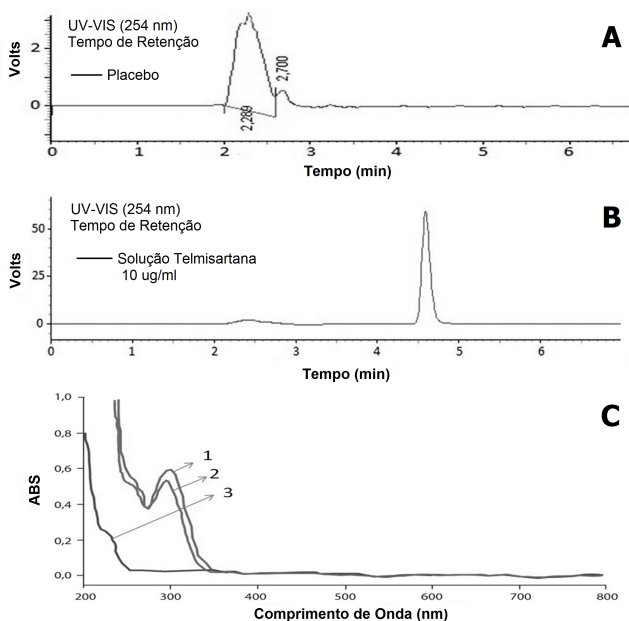
A sensibilidade do método foi analisada através da determinação dos limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD). O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra passível de ser detectado, embora não seja necessariamente quantificado sob as condições estabelecidas pelo método proposto. Em contrapartida, o LQ é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições estabelecidas. Os valores de LD e LQ do método espectrofotométrico UV encontrados foram 0,2500 e 0,8333  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Analisando o valor LQ, 7 vezes menor do que a concentração mínima estabelecida no intervalo de quantificação pode-se constatar que o método proposto apresenta excelente sensibilidade. Esses resultados demonstram que o método proposto é capaz de detectar e quantificar uma ampla faixa de concentração com segurança.

Os valores de LD e LQ do método HPLC encontrados foram 0,1127 e 0,3416  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Analisando o valor LQ, quase 6 vezes menor que a concentração mínima estabelecida no intervalo de quantificação, pode-se constatar que o método por HPLC é mais sensível para quantificar TEL do que o método por espectrometria UV. Isto assegura que ambos os métodos propostos são capazes de detectar e quantificar uma ampla de faixa de concentrações com segurança.

### 4.2.3 Especificidade

De acordo com os espectros mostrados na Figura 15 C, não houve sobreposição de picos relativos a solução do fármaco e placebo na faixa de absorção máxima da TEL em 298 nm.

Figura 15: (A) Cromatograma HPLC da solução placebo; (B) Cromatograma HPLC da TEL a  $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; (C) Espectros de absorção UV de TEL a  $12\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ : (1) solução padrão de trabalho de TEL, (2) solução amostra de TEL, (3) solução placebo



Desse modo, os excipientes da formulação, presentes na solução amostra (2) e no placebo (3), não interferiram na quantificação da TEL através do método de espectrofotometria UV. O mesmo resultado foi observado para a análise cromatográfica, onde não foram observados picos relacionados com os excipientes do comprimido Micardis<sup>®</sup> 40 mg, no tempo de retenção do fármaco em 254 nm, 15 A e B.

### 4.2.4 Precisão

A precisão do método avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma amostragem múltipla referente a uma mesma amostra. Os resultados

referentes à repetibilidade (precisão intradia) e à precisão intermediária (PI) foram expressos em valores de desvio padrão relativo (DPR). Os resultados da precisão da TEL matéria-prima e em comprimidos matriciais estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

A repetibilidade do método UV foi avaliada calculando o DPR de seis determinações da solução padrão de trabalho de  $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  realizado em três períodos do mesmo dia e com as mesmas condições experimentais. O valor de DPR obtido foi de 0.1867% (Tabela 5). A precisão intermediária do método UV foi avaliada através da análise da solução padrão de trabalho em três dias diferentes e por dois analistas diferentes. O valor de DPR obtido foi menor que 5.0%, confirmando que este método é suficientemente preciso (Tabela 5). Como mencionado anteriormente, os dados foram validados por ANOVA não demonstrando diferenças significativas entre as análises realizadas em diferentes períodos do mesmo dia ( $F_{\text{calculado}} (0.9381) < F_{\text{crítico}} (7.7086)$ ,  $p > 0.05$ ).

Tabela 5: Resultados do método de precisão da matéria-prima

Repetibilidade	UV*	HPLC*	PI	UV*	HPLC*
Manhã	0,5659	413153,8	Dia 1	0,5677	413153,8
Tarde	0,6577	421322,3	Dia 2	0,5665	420125,0
Noite	0,5678	413549,3	Dia 3	0,5603	424505,0
Média	0,5671	416008,5	Média	0,5649	419261,0
DPR %	0,1867	1,1072	DPR %	0,7054	1,3654

\*média de seis replicatas

A repetibilidade do método HPLC foi avaliada calculando o DPR de seis determinações da solução de trabalho de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  realizado em três períodos do mesmo dia e com as mesmas condições experimentais. O valor de DPR obtido foi de 0.1072% (Tabela 5). A precisão intermediária do método HPLC foi avaliada através da análise da solução padrão de trabalho em três dias diferentes e por dois analistas diferentes. O valor de DPR obtido foi menor que 5.0%, demonstrando precisão aceitável para este método (Tabela 5). Como mencionado anteriormente os dados foram validados por ANOVA, a qual não demonstrou diferenças significativas entre as análises conduzidas em diferentes períodos do mesmo dia ( $F_{\text{calculado}} (0.5879) < F_{\text{crítico}} (7.7086)$ ,  $p > 0.05$ ).

A repetibilidade do método de espectrofotometria no UV foi avaliada pelas determinações da solução de comprimidos de TEL na concentração de  $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  realizados três vezes no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. O valor de DPR obtido foi de 0,3924% (Tabela 6). A precisão intermédia do método espectrofotométrico no UV foi avaliada através da

análise da solução de amostra TEL em três dias diferentes, e por dois analistas. Neste caso, o valor DPR obtido foi de 0,2055% (Tabela 6). A ANOVA não mostrou diferenças significativas entre as análises realizadas em três dias diferentes ( $F_{calculado} (4,0500) < F_{crítico} (7,7086)$ ,  $p > 0,05$ ).

Tabela 6: Resultados do método de precisão para comprimidos de Telmisartana

Repetibilidade	UV*	HPLC*	PI	UV*	HPLC*
Manhã	0,5633	378655,3	Dia 1	0,5620	397745,0
Tarde	0,5663	397745,0	Dia 2	0,5597	408697,0
Noite	0,5620	396945,8	Dia 3	0,5612	392711,5
Média	0,5638	391115,4	Média	0,5610	399717,8
DPR %	0,3924	2,7609	DPR %	0,2055	2,0448

\*média de seis replicatas

A repetibilidade do método de HPLC foi avaliada através de determinações da solução de comprimidos de TEL na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e realizada três vezes no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. O valor de DPR obtido foi de 2,7609% (Tabela 6). A precisão intermédia do método de HPLC foi avaliada através da análise da solução de comprimidos de TEL em três dias diferentes, e por dois analistas. Neste caso, o valor DPR foi de 2,0448% (Tabela 6). A ANOVA não mostrou diferenças significativas entre as análises realizadas em três dias diferentes ( $F_{calculado} (1,2105) < F_{crítico} (7,7086)$ ,  $p > 0,05$ ).

#### 4.2.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da determinação de recuperações médias de amostras utilizando o método de adição de padrão (Tabela 7).

Como pode ser observado, a média percentual de recuperação do Micardis<sup>®</sup> 40 mg analisados por espectrometria UV foi 101,30 ± 1,7389 e DPR foi de 0,64%. Além disso, o teste t de Student mostra que a recuperação percentual para a técnica de espectrofotometria UV é estatisticamente igual a 100% ( $t_{calculado} (0,2693) < t_{crítico} (2,7764)$ ), para um nível de significância  $\alpha = 0.05$ .

A recuperação percentual média de Micardis<sup>®</sup> 40 mg analisados por HPLC, Tabela 7, foi de 101,94 ± 0,8058, apresentando DPR de 0,79%.



Tabela 7: Resultados do método de exatidão para TEL

Amostra ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Referência		Recuperação (%)	DPR % (n=3)*	Média Recuperação (%)
	Concentração Adicionado	Padrão Encontrado			
UV	3	9	99,80	0,0988	101,30 $\pm$ 1.7389
	6	12	103,24	0,1054	
	9	15	100,87	0,4491	
HPLC	2	8	101,10	0,4697	101,94 $\pm$ 0,8058
	4	10	102,54	0,9534	
	6	12	102,25	0,2162	

\*n = média de três triplicatas

Além disso, o teste t de Student mostra que a recuperação percentual para a técnica de HPLC é estatisticamente igual a 100% ( $t_{calculado}$  (0,0139) <  $t_{crítico}$  (2,7764)), para um nível de significância  $\alpha = 0.05$ . Os resultados dos dois métodos estão de acordo com os limites de teor fixos de 98,00 - 102,00% (USP., 2011b), indicando que os dois métodos estão aptos para quantificação do teor de TEL em comprimidos.

#### 4.2.6 Robustez

A fim de avaliar a robustez do método analítico UV, observou-se o comportamento dos resultados de absorbância em relação a três variáveis: comprimento de onda, fabricante do metanol e presença de luz. Observou-se que a constância da absorbância frente as alterações nos parâmetros experimentais de comprimento de onda, fabricante de metanol e na presença de luz, resultaram valores de DPR de 1,03; 0,10 e 1,27%, respectivamente (Tabela 8). Assim, como os valores de DPR obtidos são menores que 2,00%, o método é considerado robusto. A análise estatística realizada por ANOVA confirma que as pequenas alterações propostas não influenciaram significativamente os resultados ( $F_{calculado}$  (1,4666) <  $F_{crítico}$  (5,7861),  $p > 0,05$ ).

Tabela 8: Resultados da Robustez do método espectrofotométrico no UV

Parâmetros		Teor (mg)	Teor (%)	DPR
Comprimento de onda (nm)	296	39,81	99,51	1,03
	298	40,46	101,14	
	300	39,70	99,25	
Fabricante de metanol	Qhemis <sup>®</sup>	40,50	101,25	0,10
	J.T. Backer <sup>®</sup>	40,42	101,04	
	Panreac <sup>®</sup>	40,46	101,14	
Estabilidade	Presença de luz	39,74	99,36	1,27

A fim de avaliar a robustez do método analítico HPLC, observou-se o comportamento dos resultados de área do pico em relação a três variáveis: comprimento de onda, o volume de injeção e a temperatura do forno. Observou-se a variação da área cromatográfica quando pequenos parâmetros experimentais foram modificados, assim, verificou-se que apenas o parâmetro da temperatura do forno mostrou-se confiável, o qual apresentou valor DPR de 0,33 (Tabela 9). O valor DPR obtido é inferior a 2,00%, demonstrando assim, confiabilidade dos resultados. As outras variáveis, tais como

comprimento de onda e volume de injeção mostrou inconstância das áreas cromatográficas quando pequenos parâmetros experimentais foram modificados, apresentando valores de DPR de 2,95 e 5,56, respectivamente (Tabela 9). Apesar das divergências encontradas nos resultados dos DPR, a análise estatística realizada por ANOVA indica que as pequenas alterações propostas não influenciaram significativamente os resultados ( $F_{calculado} (1,1535) < F_{crítico} (5,1432)$ ,  $p > 0,05$ ).

Tabela 9: Resultados da robustez do método de HPLC

Parâmetros		Teor (mg)	Teor (%)	DPR
Comprimento de onda (nm)	252	10,2498	102,49	2,95
	254	9,9195	99,19	
	256	9,6827	96,82	
Volume de injeção ( $\mu$ L)	19	9,0992	90,99	5,56
	20	9,5144	95,14	
	21	10,1251	101,25	
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	20	9,9470	99,47	0,33
	25	9,9054	99,05	
	30	9,9684	99,68	

## 5 DOSEAMENTO DOS COMPRIMIDOS DE TEL

O método espectrofotométrico de UV validado foi aplicado para a determinação da TEL em comprimidos Micardis<sup>®</sup> 40 mg. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados, expressos como a porcentagem de fármaco relacionados a declaração do conteúdo do rótulo, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Doseamento dos comprimidos de Temisartana

Método	Teor (mg)	Teor (%)	DPR %
UV	40.51	101.28	0.15
	40.41	101.02	
	40.51	101.28	
HPLC	36,5548	91,38	2.80
	37,7998	94,49	
	38,6552	96,63	

Os resultados mostraram que a porcentagem de fármaco está de acordo

com a Farmacopéia Americana (USP., 2011b), a qual determina que comprimidos de TEL contenham de 90,0 a 110,0% do conteúdo declarado no rótulo.

## **6 CONCLUSÕES**

Os métodos analíticos validados para a determinação quantitativa de TEL matéria-prima e em comprimidos Micardis<sup>®</sup> 40 mg apresentaram parâmetros satisfatórios, como a linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez e adequados limites de detecção e quantificação (LD e LQ). A matéria-prima TEL mostrou estabilidade aceitável em solução de metanol, água e fase móvel durante o período de até 7.0 dias. O método UV destaca-se devido à sua simplicidade, fácil interpretação, rapidez, baixo custo operacional e a ausência de reagentes tóxicos. Por outro lado, o método de HPLC exibiu excelente desempenho, principalmente em termos de sensibilidade e rapidez. Neste contexto, ambos os métodos validados são considerados boas alternativas para o controle de qualidade de rotina da TEL matéria-prima e dos comprimidos Micardis<sup>®</sup> 40 mg, adaptando-se de acordo com a infraestrutura disponível nas indústrias/laboratórios farmacêuticos.

## **7 AGRADECIMENTOS**

Os autores reconhecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

## Capítulo IV

### **Encapsulação molecular da telmisartana em complexos de inclusão em $\beta$ -ciclodextrinas: Desenvolvimento, caracterização, análise *in vitro* e *in vivo***

---

## 1 INTRODUÇÃO

A Telmisartana (TEL), é um derivado benzimidazólico não peptídico antagonista do receptor da angiotensina II do tipo-1 (AT1), a qual promove efeito anti-hipertensivo através do relaxamento da musculatura lisa arterial (DINNEBIER et al., 2000; GOODMAN; GILMAN, 2005; WIENEN et al., 2000). Este fármaco é amplamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial, sendo considerado uma alternativa medicamentosa a pacientes hipertensos com insuficiência cardíaca e diabetes, devido à sua atividade protetora vascular e renal (GOODMAN; GILMAN, 2005; GOYAL et al., 2009; RAO et al., 2011).

A TEL apresenta baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade nas membranas intestinais, pertencendo a Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (LOBENBERG; AMIDON, 2000). Contudo, sua solubilidade é pH dependente, sendo praticamente insolúvel em soluções ácidas fortes (ácido clorídrico 0,1M) e espontaneamente solúvel em soluções altamente alcalinas (TRAN; TRAN; LEE, 2008; USP., 2011a; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012).

O descobrimento de novas entidades químicas expressando baixa solubilidade aquosa é considerado um dos maiores desafios encontrados pelas indústrias farmacêuticas (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). Dentre os diversos métodos existentes para aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis, o uso de alcalinizantes foi adotado como estratégia para melhorar as características biofarmacêuticas dos comprimidos Micardis®. O medicamento de referência contendo telmisartana é comercializado na forma de comprimidos de administração oral (Micardis® 40 e 80 mg), os quais contém agentes alcalinizantes em sua formulação (meglomina e o hidróxido de sódio). Tais alcalinizantes tem a finalidade de proporcionar um microclima favorável para a solubilização do fármaco nos fluídos do trato-gastrointestinal (TGI) e, dessa forma, atingir um perfil de dissolução desejável (ZHANG et al., 2010a; TRAN; TRAN; LEE, 2008). No entanto, os comprimidos disponíveis no mercado apresentam biodisponibilidade dose dependente, sendo influenciada pela presença de alimentos no TGI, variando no estado alimentado e jejum (SIMASAKI et al., 1999).

Inúmeras pesquisas tem sido publicadas nos últimos anos tendo como objetivo em comum o aumento da solubilidade e dissolução da TEL através de diferentes técnicas, sistemas e estratégias. Alguns exemplos são o emprego de sistemas nanoparticulados (ZHANG et al., 2010a; ZHANG et al., 2010b), dispersões solidas formadas por carreadores hidrofílicos (KOTHAWADE et al., 2010), contendo alcalinizantes (TRAN; TRAN; LEE, 2008; MARASINI et al., 2013), empregando a técnica de moinho de bolas (ZHONG et al.,

2013), a tecnologia de fluido supercrítico (PARK et al., 2013), a técnica fusão-resfriamento (DUKECK; SIEGER; KARMMWAR, 2013), amorfização através do método de vitrificação e moagem criogênica (LEPEK et al., 2013) e complexos de inclusão em ciclodextrinas (MURPHY; Sudha Purna; VI-JAYAKUMAR, 2011; KAUSALYA et al., 2011), os quais foram obtidos através de técnicas convencionais como mistura física, malaxagem e evaporação do solvente orgânico. Contudo, a literatura consultada não indica o desenvolvimento de complexos de inclusão de TEL:BCD no estado sólido, sem a adição de solvente e utilizando técnicas de fácil *scaling up*, a exemplo da técnica de moinho de bolas.

Técnicas capazes de amorfizar fármacos e, conseqüentemente, melhorar suas propriedades de solubilidade e taxa de dissolução são desejadas pelas indústrias farmacêuticas (YU, 2001). A técnica de moagem mecânica em moinho de bolas é capaz de amorfizar partículas em larga escala e, assim, melhorar características biofarmacêuticas de fármacos, destacando-se frente outras técnicas devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e possibilidade de escalonamento (BARZEGAR-JALALI et al., 2010; LIM; NG; TAN, 2013). Além disso, o processo de moagem mecânica propicia interações entre fármaco-excipientes e, dessa forma, é capaz de promover modificações tanto nas propriedades físico-químicas da estrutura cristalina de fármacos, quanto na formação de complexos entre fármaco-excipientes, resultando no melhoramento de características de solubilidade, dissolução e biodisponibilidade destes (CROWLEY; ZOGRAFI, 2002). É importante ressaltar que a moagem mecânica é considerada uma das operações unitárias mais simples e comuns da indústria farmacêutica, a qual não requer o uso de solventes em seu processo, sendo considerada uma técnica limpa e ambientalmente correta (BARZEGAR-JALALI et al., 2010).

A encapsulação molecular de fármacos em complexos de inclusão molecular em ciclodextrinas (CIM) vem desempenhando um papel importante e vantajoso na melhoria das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de compostos apolares (DEL VALLE, 2004). Há diversos relatos na literatura de complexos de inclusão bem sucedidos, os quais apresentaram melhora notável na estabilidade e, principalmente, na solubilidade/biodisponibilidade de compostos apolares. Alguns exemplos atuais de CIM promissores, empregando a técnica de moinho e bolas, são a loratadina (LIN; HSU; SHEU, 2010; LIN et al., 2012), o gemfibrozil (AIGNER et al., 2012), a rifampicina (HE et al., 2013) e a indometacina (LIM; NG; TAN, 2013).

Neste contexto, a encapsulação molecular da TEL em complexos de inclusão de BCD através da técnica de moinho de bolas é considerada promissora e inovadora, uma vez que este sistema é capaz de aumentar a solubilidade/dissolução da TEL de forma pH independente e que a técnica favorece

a formação de CIM através de interações moleculares entre hóspede e hospedeiro.

Todos os CIM serão avaliados em termos de rendimento e as características físico-químicas serão analisadas em solução (solubilidade de fases e método de variação contínua), em estado sólido (DSC, DRX, IV, MEV), computacionalmente (Estudo de Modelagem Molecular) e ainda avaliadas em relação à sua velocidade de dissolução *in vitro*. Finalmente, as 3 formulações que apresentarem os melhores resultados de perfil de dissolução *in vitro* serão avaliadas quanto ao seu efeito anti-hipertensivo *in vivo*.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria prima da Telmisartana foi comprada da Haohua Industry Co. Ltda. (China), caracterizada e avaliada em relação ao controle de qualidade, conforme descrito no capítulo II ( pureza  $\geq 96\%$ , forma polimorfica A). A  $\beta$ -ciclodextrina (BCD, peso molecular de 1135 Da) foi adquirida também da Haohua Industry Co. Ltda. (China). Todos os solventes e reagentes utilizados nos ensaios foram de grau analítico.

### 2.2 CÁLCULOS DA ESTEQUIOMETRIA DE ENCAPSULAÇÃO

#### 2.2.1 Estudo de solubilidade de fases

A análise de solubilidade de fases foi conduzida de acordo com Higuchi e Connors (HIGUCHI; CONNORS, 1965). Resumidamente, uma quantidade em excesso de TEL foi adicionada a uma solução tampão de fosfato monobásico pH 7.5 (ajustado com NaOH), contendo diferentes concentrações de BCD (0, 3, 6, 9, 12 e 15 mmol/L). As soluções resultantes foram mantidas em agitação (300 rpm) a 37°C até a solubilidade estabelecer o equilíbrio. Em seguida estas soluções foram filtradas em filtro quantitativo e analisadas em 298 nm em espectrofotômetro UV/Visível (Varian, Cary 50 Bio). O estudo de solubilidade de fases foi realizado em triplicata.

#### 2.2.2 Determinação da relação de inclusão pelo método de variação contínua

O método de variação contínua, também chamado de método de Job ou Job plot, foi utilizado para determinar a taxa de inclusão dos CIM. Resumidamente, diferentes volumes de concentrações molares iguais de TEL e



BCD em solução tampão fosfato monobásico pH 7.5 foram misturados sob a condição de que a concentração molar total de TEL e BCD fosse mantida constante e a fração molar de TEL (o molar de TEL dividido pelo total molar de TEL e BCD) variou de 0,4 a 1.0. Os valores de absorvância das soluções mistas ( $A_1$ ) e as concentrações correspondentes de soluções contendo TEL puro ( $A_2$ ) foram medidos separadamente em espectrofotômetro no UV em 298 nm. A diferença de absorvância ( $\Delta A = A_2 - A_1$ ) foram plotados versus a fração molar de TEL (R). Onde o valor máximo encontrado em  $\Delta A$ , em função de R, representa graficamente a proporção estequiométrica correspondente ao complexo de inclusão. Com base nas medições de absorvância pôde-se determinar a estequiometria do complexo de inclusão. A determinação da taxa de inclusão pelo método de Job foi realizada em triplicata.

### 2.3 PREPAROS DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO MOLECULAR

Os complexos de inclusão molecular (CIM) binários foram obtidos através do método de ativação mecânica, empregando Telmisartana (TEL) como molécula hóspede e  $\beta$ -ciclodextrina (BCD) como hospedeiro. Os CIM foram obtidos no estado sólido, sem adição de solvente em moinho de bolas.

Detalhes referentes a composição de todos os CIM obtidos, e suas respectivas denominações frente a técnica empregada na obtenção destes estão dispostos na Tabela 11.

Quantidades equimolares hóspede e hospedeiro foram cuidadosamente pesados (massa final de 514,63mg para M0 e 2,78mg para M2 e M3) e moídos em moinho de bolas de alta energia Spex Mixer Mill 8000 D (Stanmore, Reino Unido). Para a moagem, as amostras foram acondicionadas em recipientes cilíndricos, contendo em seu interior 3 bolas de aço inoxidável (duas de 6,4mm e uma de 12,8 mm de diâmetro), de modo que a taxa bola:pó (BPR) se manteve em 3.7. O procedimento foi realizado em diferentes períodos de tempo (7, 15 e 30 minutos) visando estimar o tempo ideal de moagem necessário para obter o máximo de interação no estado sólido entre os componentes à temperatura ambiente.

Ao final do processo foi observado aumento de temperatura em função do tempo de moagem para as formulações moídas por 15 e 30 minutos.

A mudança no grau de cristalinidade relativa/ amorfização do fármaco nas formulações foi avaliada através das técnicas de DSC e DRX, sendo que a intensidade das interações entre os componentes no estado sólido também foi investigado por IV. A fim de excluir o possível efeito da energia mecânica fornecida ao fármaco por moagem, TEL pura (M0\_15) também foi submetida ao mesmo processo e analisada por DSC e de DRX e IV.

Tabela 11: Composição dos CIM de TEL

Denominação	Proporção de TEL:BCD (mmol)	Técnica de obtenção	Tempo de moagem (min)
M0_15	1:0	Moinho de bolas	15
M2_7	1:2	Moinho de bolas	7
M2_15	1:2	Moinho de bolas	15
M2_30	1:2	Moinho de bolas	30
M3_7	1:3	Moinho de bolas	7
M3_15	1:3	Moinho de bolas	15
M3_30	1:3	Moinho de bolas	30

### 2.3.1 Preparo das misturas físicas

As misturas físicas (MF) foram preparadas através da pesagem do hospede e hospedeiro, na proporção 1:1 (mol/mol), seguido da homogeneização dos pós através da simples mistura destes com auxílio de uma espátula por 5 minutos. As amostras obtidas foram armazenadas em dessecador a vácuo e protegidas da luz. As misturas físicas TEL:BCD foram denominadas MFB .

## 2.4 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DOS CIM

Para a determinação do rendimento, os CIM obtidos foram pesados e correlacionados à massa inicial, em termos de percentagem (m/m).

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS CIM OBTIDOS POR MOINHO DE BOLLAS

### 2.5.1 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas de DSC do fármaco, BCD, CIM e MFB , foram obtidas em célula Shimadzu, modelo DSC-60, utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, com cerca de 2 mg de amostra, sob uma atmosfera

dinâmica de  $N_2$  (velocidade de fluxo: 100 mL/min). A faixa de temperatura foi de 30° C a 350° C com taxa de aquecimento de 10° C/min. Um cadinho de alumínio vazio foi utilizado como referência. A célula de DSC foi calibrada com índio ( $T_{pico}$  156° C;  $\Delta H_{fusion}$  = 28,54 J/g) e zinco ( $T_{pico}$  419° C). Os dados obtidos foram processados em *software* TA-60.

### 2.5.2 Difração de Raios-X de pó

Os difratogramas do fármaco, BCD, CIM e MFB foram obtidos utilizando um  $\theta - \theta$  X-ray diffractometer (Xpert Pro Multi-Purpose Diffractometer, PanAnalytical) equipado com radiação de cobre  $K\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) operando com corrente de 40 mA e voltagem de 45 kV, amostra giratória e um detector Real Time Multiple Strip (RTMS). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, varredura  $2\theta$  a partir de 4° a 50°, com 0.033 tamanho de passo e 19,7 segundos tempo do passo.

### 2.5.3 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros de Infravermelho foram registados em aparelho PerkinElmer Spectrum, na faixa espectral de 4000-700  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.5.4 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das amostras TEL, BCD, mistura física 1:1(m/m) e CIM foram investigadas separadamente em pó através de fotomicrografias. Estas foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura Phillips, modelo XL30. A amostra foi fixada sobre stubs metálicos com o auxílio de fita adesiva dupla-face e revestida com ouro ( $350 \times 10^{-10} \text{ m}$ ) em uma unidade de revestimento por pulverização catódica polaron E 5000. As amostras foram analisadas por MEV em diferentes ampliações.

### 2.5.5 Estudos de Modelagem Molecular (MM)

A geometria inicial da  $\beta$ -ciclodextrina foi obtido do CSD (Cambridge Structural Database) e a estrutura da telmisartana foi construída usando CaChe Worksystem 6.01 (Fujitsu Ltd., Japan). Inicialmente todas as estruturas de entrada foram otimizadas através do método MM3 implementado no CaChe Worksystem 6.01 e então otimizada usando PM3 (STEWART, 1989) e PM7 (STEWART, 2013) métodos implementados em MOPAC 2012.

Quatro estruturas diferentes para os complexos de inclusão foram construídos usando CaChe Worksystem Pro 6.01. As proporções TEL:BCD nos

complexos de inclusão foram 1:1, 1:2 e 1:3, sendo que duas orientações foram adotadas neste trabalho para avaliar a orientação preferencial do fármaco dentro da primeira ciclodextrina para o complexo 1:1: BZD-in (com o anel benzimidazólico dentro da cavidade) e BZD-out (com o anel benzimidazólico fora da cavidade).

Estes quatro complexos foram completamente otimizados pelos métodos PM3 e PM7 usando o software MOPAC 2012 sem nenhuma restrição de simetria. Todos os cálculos foram realizados na fase gasosa, assim não foi levado em consideração o efeito de solventes neste trabalho.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

O ensaio de dissolução do fármaco e dos CIM foi realizado em equipamento dissolutor Varian (VK 7000), baseado nas especificações da Farmacopéia Americana, a qual descreve a avaliação *in vitro* de comprimidos de TEL (USP, 2011b).

Dessa forma, quantidades correspondentes a 20mg de TEL foram pesadas e adicionadas diretamente sobre a superfície dos 900 mL de tampão fosfato monobásico pH 7.5, mantidos à  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , e rotacionados a 75 rpm através do aparato de dissolução II (pá). Em intervalos de tempo pré-definidos (5, 10, 15, 30 e 60 min), alíquotas de 5mL foram coletadas e imediatamente repostas com o mesmo volume de meio de dissolução. As amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo faixa preta e analisadas a 298 nm em espectrofotômetro UV/Visível (Varian, Cary 50 Bio) utilizando cubetas de quartzo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A fim de comparar o desempenho dos CIM contendo TEL com a formulação comercial, comprimidos referência de telmisartana (Micardis) contendo 40 mg do fármaco (Boehringer Ingelheim, lote 7320) foram adquiridos e também submetidos, em triplicata, às mesmas condições de dissolução.

A eficiência de dissolução (ED) do fármaco e dos CIM foi calculada a fim de comparar as formulações e evidenciar diferenças entre as formulações que não podem ser observadas através do perfil de dissolução. A avaliação integral comparativa da área sob a curva (AUC) do perfil de dissolução em relação à área representada pelo tempo total do ensaio foi calculado com o auxílio do programa *Graphpad Prism*, proposta inicialmente por Khan e Rhodes (KHAN; RHODES, 1975).

O valor de ED foi determinado pela razão entre a área sobre a curva de dissolução compreendida entre 0-30 min ( $ASC_{0-30min}$ ) e área total do retângulo ( $ASC_{total}$ ), definido pela ordenada 100% de dissolução e pela abscissa

(30 min), conforme a Equação 3.

$$ED(\%) = \frac{ASC_{0-30\text{ min}} \times 100}{ASC_{total}} \quad (3)$$

## 2.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO *IN VIVO* DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO MOLECULAR

As formulações obtidas por moinho de bolas que apresentaram os melhores resultados de perfil de dissolução *in vitro*, foram selecionadas para a avaliação do seu potencial *in vivo*.

### 2.7.1 Animais

Ratos Wistar fêmeas (pesando entre 200 e 300g) foram mantidos em ambiente com temperatura e iluminação controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ; 12h de ciclo claro/escuro), com livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos encontram-se de acordo com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina e a investigação respeita o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH Publication nº85-23, revisado em 1996).

### 2.7.2 Protocolo experimental

Os ratos foram randomizados em 5 grupos de 4 animais cada. Os grupos 1 e 2 receberam os CIM selecionados, o grupo 3 recebeu o fármaco puro moído, M0\_15, (todos na dose de 3mg/kg p.o.), o grupo 4 recebeu o fármaco puro e o grupo 5 recebeu água destilada. A administração do fármaco, fármaco moído (M0\_15), CIM e água destilada foi realizada por via oral, através de gavagem. Em diferentes tempos após o tratamento, (30, 60, 120 e 180 min) os animais foram instrumentados para medida da pressão arterial média ( $PA_m$ ) como descrito na próxima seção e a alteração desta em resposta à angiotensina II (3nmol/kg) foi obtida.

### 2.7.3 Medida de Pressão arterial média ( $PA_m$ )

Sob anestesia, catéteres heparinizados PE-20 e PE-50 foram inseridos na veia femoral esquerda dos ratos para injeção de angiotensina II e na artéria carótida direita para a medida de  $PA_m$  (mmHg). Aos animais foi permitido respirar espontaneamente e a sua temperatura corporal foi mantida em  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . A  $PA_m$  foi medida através de um catéter transdutor de pressão

(Mikro-Tip® Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, Estados Unidos) acoplado a um sistema de aquisição Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Austrália). Os resultados são expressos com a média  $\pm$  erro padrão da média das alterações de  $PA_m$  em resposta à administração do vasoconstritor angiotensina II, relativos à linha de base. Após os experimentos, os animais foram sacrificados através de sobredose anestésica de pentobarbital.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CÁLCULOS ESTEQUIOMÉTRICOS DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO MOLECULAR

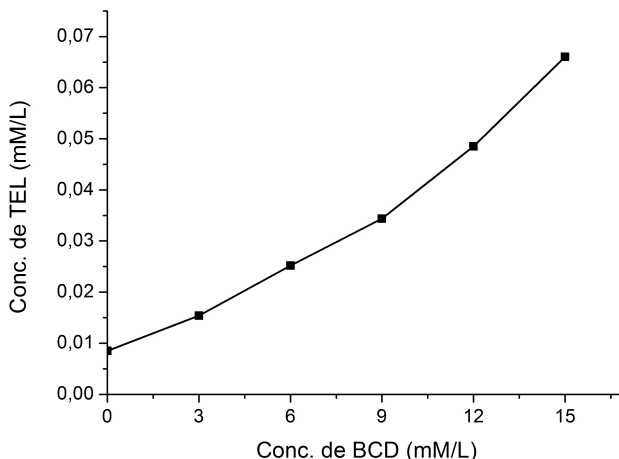
##### 3.1.1 Estudo de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fases, descrito por Higuchi e Connors em 1965, é amplamente utilizado para determinar a taxa de inclusão de complexos de inclusão molecular (HE et al., 2013), sendo considerado o método de primeira escolha para a verificação da formação de CIM em solução (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006). Neste contexto, no intuito de determinar a estequiometria dos complexos TEL:BCD, realizou-se o estudo de solubilidade de fases empregando água como solvente. No entanto, não foram observados resultados satisfatórios devido à baixa solubilidade do fármaco em água. Analisando as propriedades físico-químicas da TEL, um ácido fraco com três valores de  $pK_a$  3.5, 4.1 e 6.0, esta requer um meio básico para se solubilizar, uma vez que ácidos fracos são ionizados em pH básico e na forma não ionizada em pH ácido. Assim, a TEL será absorvida na forma não ionizada no TGI, exceto no estomago (WIENEN et al., 2000; CAGIGAL et al., 2001; TRAN; TRAN; LEE, 2008). Após a tentativa de ajustar o pH da água e testar diversos solventes, optou-se em utilizar outro meio em que o fármaco apresentasse melhor solubilidade/estabilidade: tampão fosfato monobásico pH 7.5, ajustado com NaOH (meio farmacopeico para dissolução do TEL em comprimidos) (USP., 2011b). O diagrama de solubilidade do sistema TEL:BCD em tampão fosfato monobásico pH 7.5, à 25°C, está apresentado na Figura 16.

Como pode ser observado, a curva de solubilidade de fases deste sistema apresenta um desvio positivo da linearidade, fazendo com que a concentração da TEL aumente em função do aumento da concentração de BCD de forma não linear. Este perfil de solubilidade de fases é classificado por Higuchi e Connors, 1965 como sendo do tipo  $A_p$ , e está relacionado com a formação de complexos solúveis de primeira ordem em relação ao fármaco, mas de segunda ou ordem superior em relação à BCD ( CIM de TEL:BCD

com estequiometria 1:2 ou 1:3).

Figura 16: Diagrama de solubilidade de fases

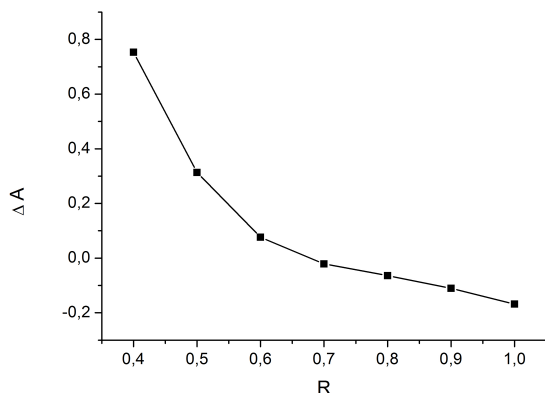


### 3.1.2 Determinação da relação de inclusão pelo método de variação contínua (Método de Job)

O método de variação contínua foi um dos primeiros métodos empregados na determinação da estequiometria de complexos de inclusão experimentalmente. (JOB, 1928; TABLET; MATEI; HILLEBRAND, 2012). Segundo o método de Job, a fração molar de TEL ( $R$ ) correspondente ao valor máximo de  $\Delta A$  representa graficamente a proporção estequiométrica correspondente ao complexo de inclusão.

Como pode ser observado na Figura 17, a taxa de inclusão obtida através do método de Job foi de  $R=0,4$ , sugerindo taxa de inclusão 1:2 ou 1:3. Vale ressaltar que a taxa de inclusão obtida pelo método de Job coincidiu com a taxa obtida pelo estudo de solubilidade de fases, confirmando a formação de complexos de estequiometria 1:2 ou 1:3.

Figura 17: Plotagem da variação contínua



### 3.2 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DOS CIM DE TEL

Os dados alusivos ao rendimento dos CIM M0\_15, M2\_7, M2\_15, M2\_30, M3\_7, M3\_15 e M3\_30 são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de rendimento referentes aos CIM

Técnica de obtenção	CIM	Rendimento (%)
Moinho de Bolas	M0_15	93
	M2_7	98
	M2_15	99
	M2_30	73
	M3_7	96
	M3_15	90
	M3_30	38

Os CIM obtidos através da técnica de moinho de bolas apresentaram-se em geral como pós soltos e finos de coloração bege claro. Os CIM submetidos ao processo de moagem pelo tempo de 30 minutos ( M2\_30 e M3\_30) apresentaram uma massa densa aderida ao fundo do recipiente ao final do processo, sendo que M3\_30 apresentou um maior acúmulo de massa aderida em relação a M2\_30.

Como pode ser observado, os CIM obtidos apresentaram valores de rendimento aceitáveis, sendo que as formulações M2 apresentaram valores de



rendimento maiores em todos os tempos de moagem em relação a M3. Taxas de rendimento discrepantes foram observadas para M2\_30 e, principalmente, para M3\_30, o qual apresentou a menor taxa de rendimento, apenas 38%; seguido por M2\_30, com 73%. Estes desvios nos valores de rendimento provavelmente estão relacionados com perda de massa observada ao final do processo de moagem.

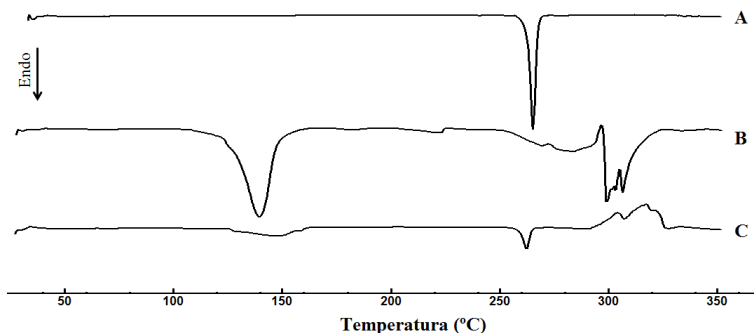
### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS CIM

#### 3.3.1 DSC

A análise térmica, em especial a DSC, é comumente utilizada como um método de rotina para uma investigação rápida e qualitativa da formação de CIM, sendo considerada o método analítico de primeira escolha para a investigação e caracterização físico-química de sistemas contendo ciclodextrinas no estado sólido. Tal fato deve-se capacidade desta técnica em avaliar e evidenciar qualquer tipo de interação entre a molécula hóspede e a hospedeira através da comparação do perfil térmico dos componentes puros, misturas físicas e complexos (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001).

As curvas de DSC referentes ao fármaco, BCD e MFB estão ilustradas na Figura 18.

Figura 18: Curvas de DSC referente ao (A) fármaco, (B) BCD e a (C) MFB composta pelo hóspede:hospedeiro na proporção 1:1



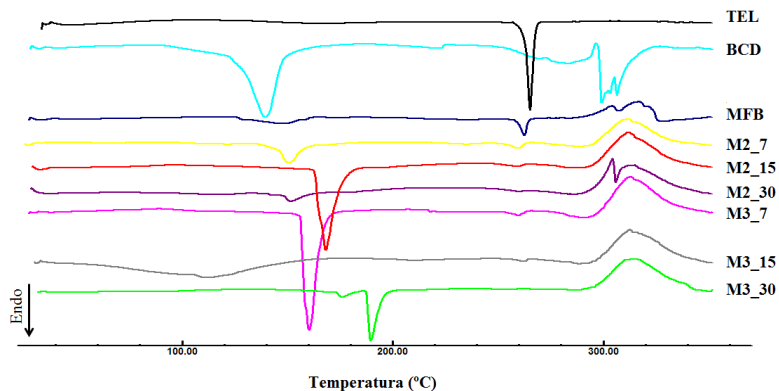
Como pode ser observado, a TEL apresenta apenas um único evento de fusão em 265 °C, característico do polimorfo A, conforme caracterização supracitada no capítulo II. A BCD apresenta um evento endotérmico alargado

em 140 °C, característico da perda de água contida na cavidade da BCD, seguido de degradação térmica em aproximadamente 250 °C e de um evento de fusão em aproximadamente 300 °C (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). A curva de DSC referente a MFB apresenta uma diminuição do evento endotérmico em 140 °C, seguido da diminuição e deslocamento do evento endotérmico da TEL para 262°C. A diminuição da endoterma em 140 °C é indicativo de ausência de água da cavidade da BCD, enquanto que a diminuição e deslocamento da endoterma da TEL indica a presença de interação entre o hóspede e o hospedeiro na mistura física (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001).

A fim de obter uma melhor visualização do evento de fusão, empregou-se a proporção TEL:BCD 1:1 (mol/mol) para a MFB, uma vez que o emprego fidedigno das proporções hóspede:hospedeiro, 1:2 e 1:3 (mol/mol), poderiam camuflar o evento de fusão do fármaco interferindo na análise.

As curvas de DSC referentes ao fármaco, BCD, MFB, MB0\_15 e CIM estão ilustradas na Figura 19.

Figura 19: Curvas de DSC referentes ao CIM obtidos por MB



Como pode ser observado, M0\_15 apresentou um alargamento, diminuição e o deslocamento da endoterma de fusão do fármaco para a temperatura de 260 °C, enquanto M2\_7, M2\_15, M2\_30, M3\_7 e M3\_15 apresentaram uma diminuição do evento de fusão característico da TEL, juntamente com um leve deslocamento para a temperatura de 259 °C, demonstrando uma interação entre hóspede e hospedeiro (RIBEIRO et al., 2003).

Este comportamento térmico sugere a formação de CIM (HE et al., 2013), devendo ser melhor investigado através de outras técnicas como DRX e IV. Diferentemente, M3\_30 não apresentou a endoterma de fusão caracte-

terística da TEL, apresentando um perfil não coincidente com o somatório das curvas dos componente isolados, sugerindo a formação de complexos de inclusão (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; RIBEIRO et al., 2003).

Em relação à BCD, todas as formulações apresentaram deslocamento do evento endotérmico característico desta, sugerindo a formação de complexos. M2\_7, M2\_30, e M3\_15 apresentaram endoterma de fusão de menor intensidade, deslocadas para temperaturas inferiores a 150 °C. Em contrapartida, as formulações que mais alteraram a característica da BCD foram M3\_7, M2\_15 e M3\_30, as quais apresentaram o surgimento de endotermas de fusão bem definidas, deslocadas para as temperaturas maiores: 160, 167 e 189 °C, respectivamente, sugerindo a formação de um novo composto.

Cabe mencionar que estes resultados sugerem a formação de complexos de inclusão molecular entre o hóspede e o hospedeiro nas proporções 1:2 e 1:3, sendo que M3\_30 apresenta maior estabilidade termodinâmica, uma vez que a endoterma de fusão deste surgiu em temperatura mais elevada (189 °C) (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; ARAUJO et al., 2009; AIGNER et al., 2012; HE et al., 2013).

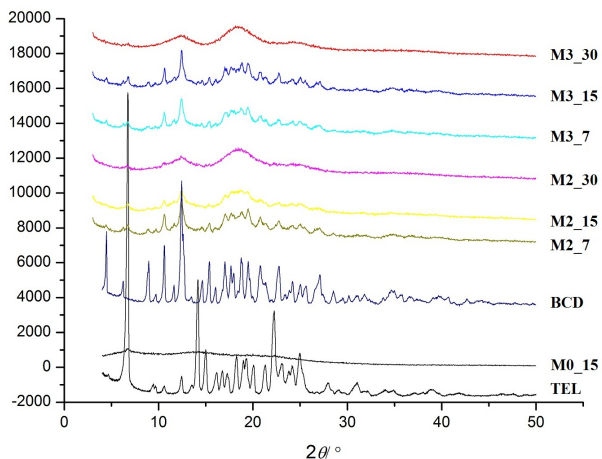
### 3.3.2 DRX

O método de DRX é simples e útil na detecção de CIM em pó ou estados microcristalinos. A existência de um verdadeiro CIM pode ser observada se o padrão de difração do complexo for claramente distinto daquele obtido pela sobreposição de cada componente (ASBAHR et al., 2009; RIBEIRO et al., 2003).

Os difratogramas referentes ao fármaco, BCD, MFB, M0\_15 e os CIM estão apresentados na Figura 20. Como pode ser observado, o espectro de difração da TEL exibe alto grau de cristalinidade, o qual é caracterizado por picos elevados em  $2\theta$  6.7, 14.18, 15.00, 22.25 e 24.96°, conforme apresentado anteriormente no capítulo II. Do mesmo modo, a BCD também apresenta caráter cristalino, o qual é indicado principalmente por picos proeminentes em  $2\theta$  4.48, 8.89, 10.60, e 12.45°. O espectro do fármaco moído em moinho de bolas (M0\_15), por sua vez, apresenta diferenças em relação ao fármaco não submetido ao processo de moagem (TEL). Como pode ser observado, M0\_15 apresenta perfil característico de um composto amorfo, apresentando apenas um halo de cristalinidade em 6,7 °, o qual é característico do fármaco. Dessa forma, fica demonstrado que 15 minutos de moagem é suficiente para amorfizar a TEL (composto cristalino) em sua totalidade.

Como pode ser observado, todos os CIM obtidos por moinho de bolas apresentaram uma diminuição na intensidade dos picos indicativos de cristalinidade, sendo que os mais amorfos apresentam halos de cristalinidade.

Figura 20: Difratogramas referentes ao fármaco, BCD e os CIM



Além disso, nota-se que a intensidade desses picos decresceram constantemente com o aumento do tempo de moagem, o qual provocaram a mudança progressiva no estado cristalino das amostras, as convertendo em forma amorfa. Desse modo, como pode ser observado, as amostras submetidas a moagem pelo período de 30 minutos, M2\_30 e M3\_30, foram as que apresentaram maior grau de amorfização, enquanto que M2\_7, M2\_15, M3\_7 e M3\_15 apresentaram picos de menor intensidade, característico de compostos semicristalinos. Dessa forma é possível observar que a amorfização ocorre independentemente da proporção hóspede:hospedeiro (1:2 e 1:3) e que está diretamente relacionada ao tempo em que as amostras foram submetidas a moagem. No entanto, se observarmos cuidadosamente o difratograma de M2\_15 frente aos compostos semicristalinos, observa-se que este apresenta picos diminutos, quase amorfos, de menor intensidade que M2\_7 e muito semelhante a M2\_30, uma amostra praticamente amorfa. Analisando os dados obtidos nestas análises, onde M2\_15 e M2\_30 apresentaram maiores graus de amorfização, pode-se inferir que a amorfização gerada pela moagem desempenhará um papel fundamental no aumento da dissolução do fármaco, podendo sugerir que a taxa de dissolução aumentará em função da amorfização das formulações. Tal dedução pode ser explicada devido a característica das substâncias amorfas em apresentarem um arranjo molecular desordenado, onde não há ordem tridimensional de longo alcance, diferentemente de sólidos cristalinos. Essa desordem gera um estado de desequilíbrio interno, de-

vido aos seus altos níveis de energia intramolecular, propiciando a compostos amorfos melhor molhabilidade e, conseqüentemente, maiores valores de solubilidade e taxa de dissolução mais rápida, em relação a compostos cristalinos (SHAN-YANG; CHUN-SEN, 1989; YU, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; LAITINEN et al., 2013a).

É importante enfatizar que os CIM apresentaram diferenças significativas na intensidade dos picos principais do fármaco e da BCD e, assim, diferentes graus de amorfização. Todos os difratogramas apresentaram uma reflexão característico da TEL em  $2\theta$  6.7° e uma reflexão em 12.45° para BCD, enquanto M2\_30 e M3\_30 apresentaram halos para estas reflexões. Além disso, foi observado o desaparecimento de um pico característico da TEL em  $2\theta$  14.18° em todas as formulações. A amorfização de M2\_30 e M3\_30 pode ser atribuída ao processo de moagem e também a uma forte interação entre hóspede/hospedeiro, o qual resultou em uma nova fase sólida. Resultados semelhantes foram relatados por Ribeiro et. al., o qual observou através de DRX a formação de uma nova fase sólida em complexos binários e ternários de vinpocetina e sulfobutil-eter-beta-ciclodextrina, sugerindo uma possível formação de complexos de inclusão (RIBEIRO et al., 2003).

Vale ressaltar que os resultados obtidos por DRX estão de acordo com os observados por DSC, uma vez que a presença de reflexões/ halos residuais observados no DRX estão diretamente relacionados com o aparecimento dos eventos endotérmicos (RIBEIRO et al., 2003) observados na Figura 19.

Da mesma forma que as investigações obtidas através da técnica de DSC, a análise de DRX não é capaz de distinguir entre compostos amorfos complexados e produtos não complexados amorfos. Além disso, estes métodos não são capazes de detectar a presença/ausência de pequena quantidade de TEL cristalina não complexada residual, originada no final do processo de moagem. Dessa forma, faz-se necessário uma melhor avaliação destes parâmetros através da técnica de IV.

### 3.3.3 IV

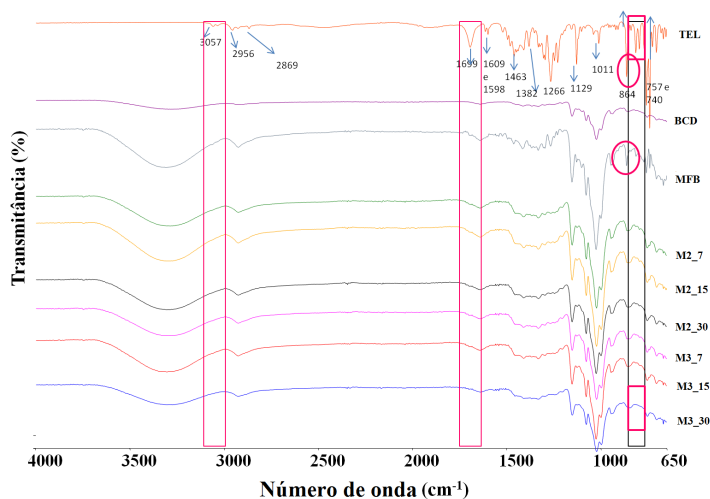
Os espectros IV obtidos para o fármaco, BCD, MFB e os CIM estão apresentados na Figura 21.

Conforme pode ser observado, o espectro da TEL pura apresenta uma banda C-H em  $3057\text{cm}^{-1}$ , C-H alifático em 2956, seguido de uma banda intensa referente ao grupamento carbonila do grupamento carboxílico (-COOH) em  $1699\text{cm}^{-1}$ . Este também apresenta uma banda em 1598, (C=C aromático), e vibração do anel benzenico disubstituído em 740 e  $758\text{cm}^{-1}$  (KANE; KUCHEKAR, 2010; TRAN; TRAN; LEE, 2008; ZHANG et al., 2010b). A elucidação completa do IV da TEL está apresentado no capítulo II, referente

a caracterização do fármaco. O espectro da BCD, por sua vez, apresenta uma banda característica intensa na faixa  $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  devido as vibrações O-H, e vibrações dos grupos -CH, -CH<sub>2</sub> na região  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ .

A espectroscopia na região do infravermelho foi empregada a fim de identificar a ocorrência de interações entre a molécula hóspede e a hospedeira no estado sólido. O mascaramento de bandas características do fármaco é considerado indicativo de interação entre hóspede e hospedeiro. Dessa forma, a banda de absorção característica da carbonila em  $1699\text{ cm}^{-1}$  e a vibração do anel benzenico dissubstituído em  $740$  e  $758\text{ cm}^{-1}$  foram tidos como marcadores da TEL, contida nas formulações, a fim de identificar desvios, mascaramentos destas decorrentes da complexação.

Figura 21: Espectros IV referentes a TEL, BCD, MFB e os CIM



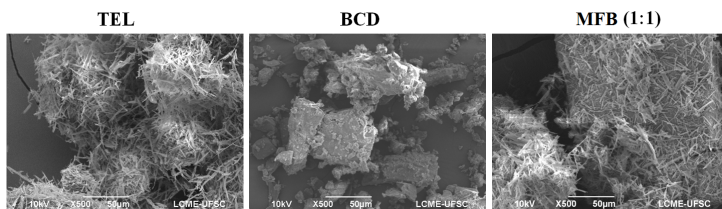
Como pode ser observado, ambos hóspede e hospedeiro absorvem na mesma região do IV e, dessa forma, todas as formulações apresentaram mascaramento de praticamente todas as bandas características da TEL. A mudança mais notável no espectro de IV da TEL, independente do tempo em que foram submetidas a moagem, foi observada em todas as amostras e está relacionado ao mascaramento do grupamento carbonila em  $1699\text{ cm}^{-1}$ . A redução da intensidade da banda da carbonila do grupamento ácido carboxílico é considerado indicativo de interações entre o hóspede e o hospedeiro e pode ser observada também na MFB, sugerindo interações entre hóspede e hospedeiro durante a preparação das misturas físicas. Cabe ressaltar que

esta interação está de acordo com o resultado obtido por DSC, onde também foram observadas interações entre hóspede e hospedeiro já na MFB.

### 3.3.4 MEV

As fotomicrografias do hóspede (TEL isolada), do hospedeiro ( $\beta$ -ciclodextrina) e da mistura física destes estão ilustradas na Figura 22.

Figura 22: Fotomicrografias da TEL, BCD e MFB (aumento de 500 x)



Como pode ser observado, a TEL apresenta-se sob a forma de cristais aciculares alongados (em forma de agulha), os quais encontram-se aglomerados em pequenos grumos. Este hábito cristalino corresponde ao polimorfo A da TEL (DINNEBIER et al., 2000), sendo que a caracterização do fármaco está elucidada com maior riqueza de detalhes no capítulo II. A BCD apresenta-se sob a forma de blocos com forma e superfície irregulares, os quais apresentam-se um pouco aglomerados. A MFB, por sua vez, apresenta morfologia da TEL e BCD em conjunto, ou seja, blocos irregulares de BCD envoltos por cristais aciculares da TEL.

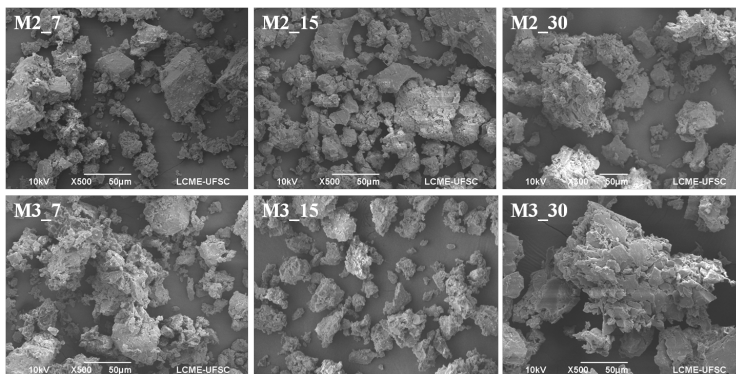
A morfologia dos CIM obtidos por ativação mecânica foi investigada a fim de analisar o impacto de fatores como a proporção hóspede:hospedeiro e o tempo de moagem no aspecto final dos CIM.

Como pode ser observado na Figura 23, os CIM obtidos por ativação mecânica em moinho de bolas apresentaram alterações morfológicas relevantes em relação aos seus componentes isolados e a mistura física.

Os CIM M2 e M3 apresentam-se dispostos de forma aglomerada, apresentando formas e tamanhos irregulares. Observando cuidadosamente as imagens, pode ser observado um sutil aumento da densidade das partículas em função do tempo de moagem, para ambos M2 e M3. Este sutil incremento da densidade também parece estar relacionado com a proporção entre hóspede e hospedeiro, uma vez que os CIM M3 demonstram um sutil incremento na densidade em relação aos CIM M2. Contudo, estas diferenças morfológicas são tão sutis, que a proporção hóspede:hospedeiro e o tempo de moagem aparentemente não impactam na morfologia dos CIM. É importante salientar

que não foi observado cristais aciculares alongados (em forma de agulha), característicos da TEL, em ambos os CIM M2 e M3, indicando que estes apresentam-se amorfos e, dessa forma, podem sugerir a formação de CIM da TEL.

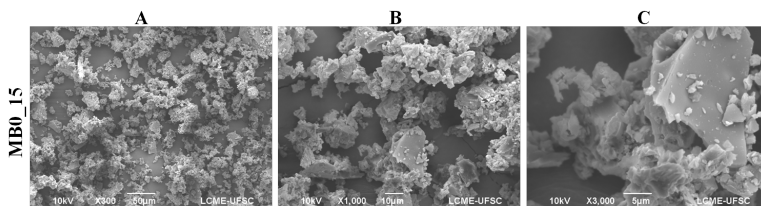
Figura 23: Fotomicrografias dos CIM M2\_7, M2\_15, M2\_30, M3\_7, M3\_15 e M3\_30 em ampliação de 500 x



Resultados de morfologia semelhantes foram descritos na obtenção de CIM empregando hidroxipropil $\beta$ -ciclodextrina e rifampicina na proporção 1:1 (mol/ mol) obtidos por moinho de bolas por 5h (HE et al., 2013).

A figura 24 apresenta as fotomicrografias da TEL isolada após o processo de moagem (MB0\_15).

Figura 24: Fotomicrografias da MB0\_15 em aumentos de A (300 x), B (1000 x) e C (3000 x)



Como pode ser observado, MB0\_15 apresenta-se de forma e tamanho irregular, sob a forma de blocos aglomerados. Vale ressaltar que não foi observado cristais aciculares alongados (em forma de agulha), característicos da TEL, em MB0\_15, indicando que o fármaco apresenta-se amorfo após o processo de moagem.



### 3.3.5 Estudos de Modelagem Molecular

A energia de ligação ou energia de complexação ( $\Delta E_{\text{complexação}}$ ) para as estruturas 1:1, 1:2 e 1:3 foram calculadas considerando a diferença entre o calor de formação do complexo TEL:BCD e o calor de formação do hóspede livre e do hospedeiro, como pode ser observado na equação abaixo:

$$\Delta E_{\text{complexação}} = E_{\text{complexo}} - (E_{\text{BCD}} + E_{\text{hóspede}}) \quad (4)$$

Onde  $\Delta E_{\text{complexação}}$ ,  $E_{\text{BCD}}$  e  $E_{\text{hóspede}}$  representam a energia total do complexo otimizado, a BCD livre e a TEL, respectivamente.

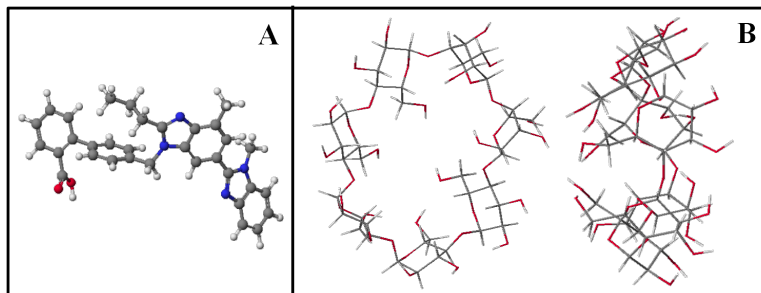
Como pode ser visto na Tabela 13, as energias de complexação para todos os complexos foram negativas, o que indica que a reação de complexação da TEL e BCD são exotérmicas, sugerindo que o processo de inclusão foi energeticamente favorável por natureza.

Tabela 13: Energia de complexação obtido por PM3 e PM7 para os complexos nas proporções avaliadas neste estudo

Proporção do complexo	$\Delta E_{\text{PM3}}(\text{KJ})$	$\Delta E_{\text{PM7}}(\text{KJ})$
1:1 in	-4,141	-49,908
1:1 out	-16,537	-45,917
1:2	-20,336	-106,115
1:3	-40,215	-206,894

As geometrias iniciais das moléculas da TEL e BCD estão apresentadas na Figura 25.

Figura 25: Geometria inicial calculada através do método PM3 (A) TEL e (B) BCD



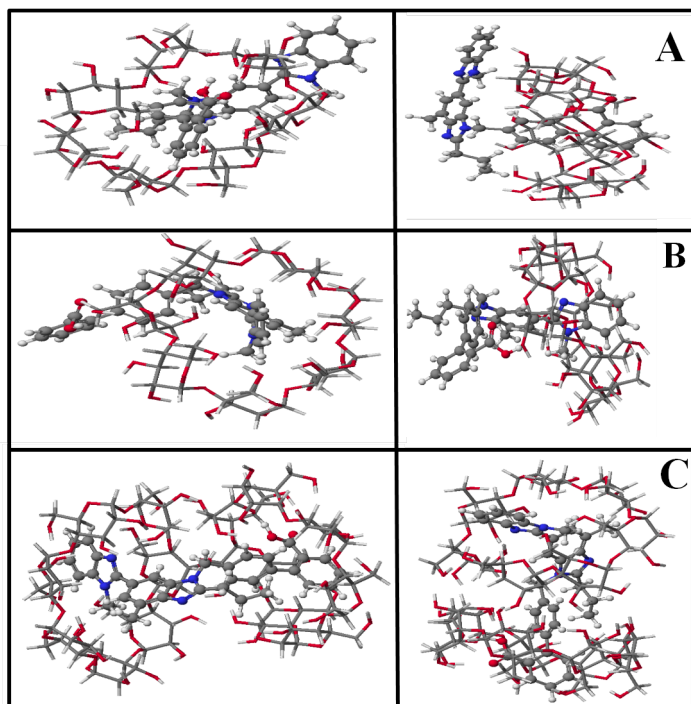
Adicionalmente, os métodos PM3 e PM7 sugeriram que os complexos com mais de uma molécula são energeticamente mais estáveis. A diferença

de energia pode alcançar mais de 150 KJ, como mostrado pelo método PM7. Para ambos PM3 e PM7 todas as estruturas 1:3 foram aquelas que tiveram a menor energia, seguidos pelos complexos 1:2 e 1:1. Este resultado é consistente com aqueles encontrados experimentalmente.

Quando comparado aos resultados de PM3, o método PM7 apresentou as menores energias de ligação para todos os complexos de inclusão molecular. Isto pode se dar devido a melhor descrição de interações não covalentes revelado por PM7, uma vez que tais interações são essenciais para o complexo de inclusão.

Neste trabalho, duas possíveis orientações da molécula do fármaco no interior da primeira ciclodextrina foram considerados nos complexos: BZD-in e BZD-out, os quais podem ser visualizados na Figura 26.

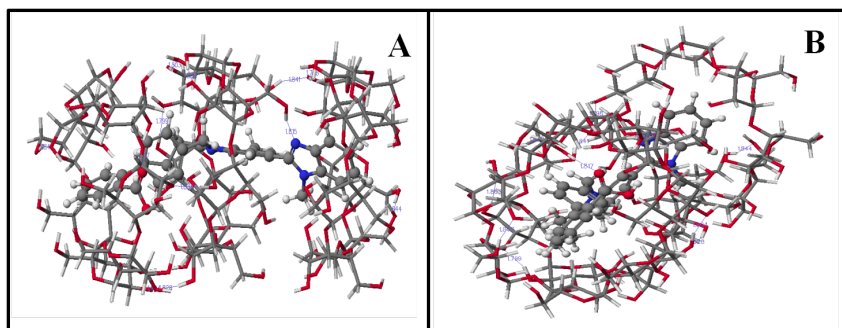
Figura 26: Estruturas dos complexos de inclusão TEL:BCD calculados pelo método PM7: complexos 1:1 BNZ-in (A) e BZD-out (B), complexos 1:2 (C)



Para o método PM7, a primeira ciclodextrina interage inicialmente com o anel benzimidazólico da TEL, mas a diferença entre essas duas orientações é de apenas 4KJ. Por outro lado, o método PM3 sugere BZD-out (com o anel benzimidazólico fora da cavidade da BCD) é mais favorável em termos de energia e a diferença dessas duas orientações alcançam mais de 12KJ.

Algumas propriedades estruturais podem contribuir para a estabilização do complexo de inclusão, como por exemplo, as pontes de hidrogênio. A Figura 27 mostra a existência de algumas pontes de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio da TEL e os átomos de oxigênio (ligados ao Carbono 6) da molécula da BCD. Também pode ser observado que existe algumas pontes de hidrogênio entre as moléculas da  $\beta$ -ciclodextrinas, os quais estabilizam os complexos de inclusão 1:2 e 1:3. Estes resultados estão de acordo com aqueles observados análises de IV (Figura 21), onde pôde-se observar interações entre a carbonila da TEL com a BCD até mesmo na mistura física, sugerindo a formação de complexos de inclusão.

Figura 27: Complexo de inclusão TEL:BCD 1:3 calculado pelo método PM7: (A) vista lateral e (B) vista inclinada. Os números exibem o comprimento das pontes de hidrogênio



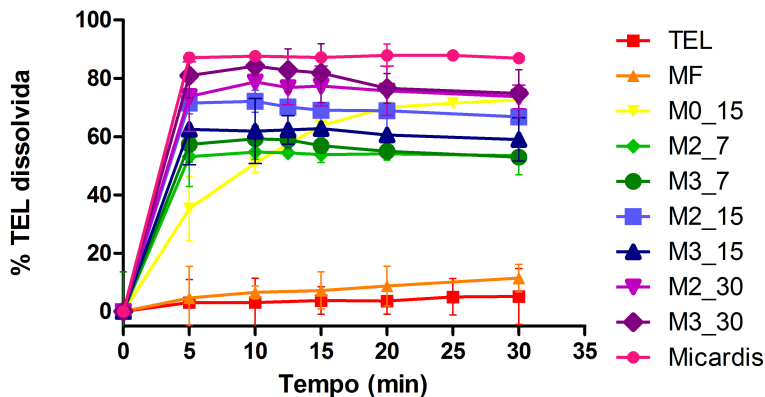
### 3.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

O método analítico de quantificação da TEL descrito no capítulo III foi revalidado a fim de quantificar a TEL e os CIM contidos no meio de dissolução, sendo avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, LD, LQ e exatidão (ICH, 2006). A dissolução da TEL liberada pelos CIM foi determinada através de método analítico por espectrofotometria no ultravioleta (UV) descrito no capítulo III.

Os perfis de dissolução dos CIM, do fármaco puro (livre), da mistura

física e de M0\_15 estão apresentados na Figura 28.

Figura 28: Perfis de dissolução dos CIM obtidos por MB



Como pode ser observado na Figura 28, todos os CIM apresentaram um rápido aumento da dissolução da TEL, em relação a TEL livre e a MFB. A TEL livre apresentou a menor velocidade de dissolução, liberando apenas 4,1% do fármaco em 30 minutos, seguido pela MFB, a qual atingiu 11% de fármaco dissolvido também em 30 minutos. O aumento da dissolução do fármaco na MFB comprova a presença de interação entre hospede e hospedeiro já na MFB, conforme observado anteriormente através das técnicas de DSC e IV.

Dentre os CIM, observou-se diferenças entre os perfis de dissolução, as quais não estão relacionadas com a proporção entre hospede e hospedeiro (mol/mol), mas sim com o fator tempo de moagem. Como pode ser observado, o fator tempo foi decisivo no aumento do perfil de dissolução das formulações.

Os melhores resultados foram obtidos para as formulações submetidas a moagem pelo tempo de 30 minutos, onde MB3\_30 foi a formulação que apresentou o melhor resultado, sendo capaz de liberar 81% do fármaco em apenas 5 minutos, seguido por M2\_30, com 74% de fármaco dissolvido em 5 min. Da mesma forma, formulações submetidas ao tempo de 15 min, M2\_15 e M3\_15, apresentam perfis de dissolução intermediários, liberando 71 e 62% de TEL em 5 min, respectivamente. As formulações submetidas ao menor tempo de moagem, 7 minutos, foram as que apresentaram os menores valores de dissolução, onde M2\_7 e M3\_7 liberaram 53% e 57% de TEL em 5min, respectivamente. É importante ressaltar que apesar de M2\_7 apresen-

tar o pior resultado de dissolução dentre os CIM, esta formulação apresentou quantidade de fármaco liberada equivalente a 12,9 vezes aquela obtida para a TEL livre.

Tendo em vista que o tempo de moagem está diretamente relacionado ao formação de calor durante o processo de moagem, e que as formulações expostas a períodos de tempo de moagem maiores apresentaram os melhores perfis de dissolução, pode-se sugerir que as amostras submetidas a moagem por períodos mais longos foram favorecidas em relação aquelas submetidas a tempos menores, uma vez que o aumento de temperatura favorece a evaporação da água presente na cavidade da BCD, deixando a cavidade livre pra interagir com a TEL durante o processo de moagem.

Além do fator tempo, outro fator que deve ser levado em consideração é a amorfização da amostra resultante do processo de moagem. Para tal, avaliou-se o perfil de dissolução do fármaco submetido a moagem M0\_15. Como pode ser observado, M0\_15 apresentou um perfil de liberação do fármaco gradual, liberando apenas 35% de fármaco em 5 min. Tal resultado é bastante relevante uma vez que demonstra que o aumento do perfil de dissolução não está relacionado somente com a amorfização das amostras obtidas por moinho de bolas, mas sim com a formação de CIM. Desse modo, pode-se inferir que o aumento da dissolução deve-se a formação de complexos de inclusão e está diretamente relacionado ao tempo de moagem em que as formulações foram submetidas, sendo considerado fator decisivo formação de complexos de inclusão e também na taxa de dissolução dos CIM.

O medicamento referência para a TEL disponível no mercado, os comprimidos de telmisartana (Micardis<sup>®</sup>), foram submetidos a análise de perfil de dissolução nas mesmas condições das formulações a fim de comparar o desempenho dos CIM frente a formulação do Micardis<sup>®</sup>. Como pode ser observado, o Micardis<sup>®</sup> apresentou o melhor perfil de dissolução, liberando 87% de TEL em apenas 5 min. Contudo, este trata-se de uma formulação farmacêutica sólida oral, a qual apresenta alcalinizantes como a meglumina e hidróxido de sódio em sua formulação no intuito de aumentar o pH do meio e, conseqüentemente, a solubilidade da TEL através da ionização desta em meio alcalino. Assim, apesar da formulação comercial apresentar melhor perfil de dissolução, os CIM apresentam-se promissores uma vez que o aumento da dissolução não está relacionado a modificação do pH do meio de dissolução, mas sim devido a maior molhabilidade/ solubilidade da TEL quando presente em complexos de inclusão em BCD. Além disso, os CIM são considerados convenientes por não se tratarem de formulações farmacêuticas finais, permitindo obter uma melhora do perfil de dissolução através da adição de excipientes selecionados durante o desenvolvimento da forma farmacêutica final.

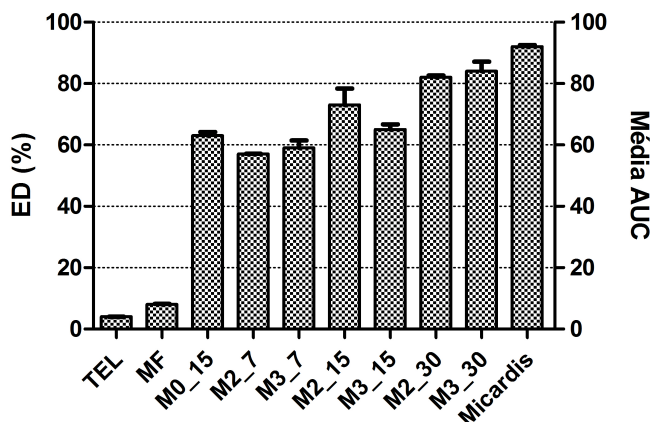
É importante mencionar que todos os pontos obtidos durante a análise

de dissolução dos CIM apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) de acordo com o especificado pela Farmacopéia Americana (USP., 2011c), a qual estabelece como limite para os pontos iniciais uma variação de 20% e de até 10% para os pontos restantes. Dessa forma, pode-se dizer que as amostras avaliadas apresentaram-se homogêneas.

Os dados alusivos à eficiência de dissolução (ED) em relação ao comprimido Micardis® estão ilustrados na Figura 29.

Como pode ser observado, todas as formulações apresentaram uma ED mais eficiente em relação ao fármaco livre, sendo as formulações M2\_30 e M3\_30 os CIM que apresentaram melhor desempenho.

Figura 29: Comparativo da ED (%) do fármaco livre e dos CIM



### 3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO *IN VIVO* DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO MOLECULAR

Os resultados obtidos para a  $PA_m$ , em resposta ao vasoconstritor angiotensina II, estão apresentados na Figura 30.

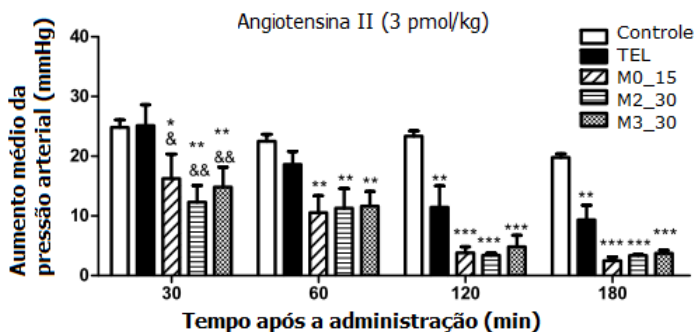
O efeito anti-hipertensivo da TEL foi avaliado através da sua administração sob a forma pura, M0\_15, M2\_30 e M3\_30 frente a administração da angiotensina II. Assim, quanto menor a resposta diante da administração do vasoconstritor angiotensina II, melhor o efeito anti-hipertensivo.

Como pode ser observado, durante todo o período de tempo analisado, M2\_30, M3\_30 e M0\_15 apresentaram valores de  $PA_m$  significativamente diferentes em relação ao grupo controle, confirmando o efeito anti-hipertensivo

rápido e sustentado durante a totalidade do experimento.

Observando a primeira aferição da pressão arterial, após o período de 30 min, nota-se que a resposta da TEL pura foi estatisticamente idêntica ao controle (placebo), não apresentando redução da  $PA_m$  nos animais testados neste mesmo período de tempo, indicando que o fármaco não foi absorvido e, dessa forma, não apresentou efeito farmacológico. Em contrapartida, todas as formulações M2\_20, M3\_30 e M0\_15 apresentaram efeito anti-hipertensivo rápido frente a angiotensina II e estatisticamente significativo em relação ao fármaco puro e ao controle.

Figura 30: Alteração da  $PA_m$  frente à administração de angiotensina II para os grupos controle e que receberam TEL, M0\_15, M2\_30 e M3\_30, avaliados em diferentes tempos. Os símbolos \*, \*\*, \*\*\* correspondem a  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, comparados ao grupo controle. && corresponde a  $p < 0,01$  comparado ao grupo que recebeu TEL.



Neste contexto, pode-se inferir que esta diferença de resposta observada frente ao mesmo estímulo vasoconstritor, apresentada por todas as formulações, deve-se a uma melhor solubilização do fármaco contido nas formulações, em relação ao fármaco puro, neste primeiro contato com os fluídos do trato gastrointestinal (TGI).

Após o período de 60 min, a TEL pura não apresentou redução significativa da  $PA_m$  sendo ainda considerada equivalente estatisticamente ao grupo controle. M0\_15, M2\_20 e M3\_30, por sua vez, apresentaram efeito anti-hipertensivo estatisticamente semelhante entre eles, e todos apresentaram diferença significativa frente ao controle, contudo não apresentaram efeito anti-hipertensivo significativo em relação a TEL pura. Desse modo, pode-se sugerir que as formulações avaliadas apresentaram melhor efeito anti-hipertensivo devido a uma melhor solubilização e biodisponibilidade no TGI neste período de tempo em relação ao fármaco puro.

Como pode ser observado, as últimas aferições da pressão arterial, realizadas em 120 e 180 min, apresentaram resultados semelhantes. Vale ressaltar que a TEL começou a expressar efeito anti-hipertensivo estatisticamente significativo em relação ao controle apenas após o período de 120 min, mantendo este resultado em 180 min. Novamente, M0\_15, M2\_20 e M3\_30 apresentam resultados estatisticamente semelhantes entre elas, exercendo efeito anti-hipertensivo estatisticamente significativo em relação ao controle, mantendo este resultado em 180 min.

Vale ressaltar que M0\_15, M2\_20 e M3\_30 apresentaram rápida absorção e, conseqüentemente, efeito anti-hipertensivo estatisticamente mais rápido em relação ao fármaco puro na primeira meia hora. Tal fato é bastante relevante, uma vez que a TEL atinge concentração plasmática máxima (C<sub>max</sub>) 30 a 60 minutos após a administração oral, fazendo destas formulações extremamente vantajosas, uma vez que apresentam melhor solubilidade e biodisponibilidade neste mesmo período de tempo e, conseqüentemente, melhor efeito terapêutico em relação ao fármaco puro.

Desse modo, fica evidente e confirmado o efeito anti-hipertensivo rápido e eficaz (no período de tempo avaliado), das formulações avaliadas -

(M0\_15, M2\_20 e M3\_30) frente a angiotensina II durante a totalidade do experimento. Apesar de as formulações não apresentarem resultados estatisticamente diferentes em relação a TEL puro nas últimas aferições, estas mostraram-se capazes de evitar o aumento da pressão arterial em todos os tempos e, em especial nos primeiros 30 minutos, onde as formulações analisadas apresentaram efeito anti-hipertensivo rápido e estatisticamente diferente em relação ao fármaco isolado, caracterizando efeito anti-hipertensivo.

#### 4 CONCLUSÕES

Os complexos de inclusão da TEL em  $\beta$ -ciclodextrinas foram obtidos com sucesso em diferentes proporções 1:2 e 1:3 (hóspede:hospedeiro) através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas após o período de 30 minutos. A estequiometria dos complexos foi confirmada através do estudo de solubilidade de fases, o qual demonstrou perfil característico de complexos de estequiometria 1:2 ou 1:3 (curva tipo  $A_p$ ) e através do método de variação contínua, o qual demonstrou a presença de estequiometria superior a 1:1, confirmando a formação de CIM de TEL:BCD nas proporções 1:2 ou 1:3.

Ao final do processo de moagem M2\_30 e M3\_30 apresentaram caráter amorfo contendo apenas halos de cristalinidade residuais, confirmados através das técnicas de DRX, DSC. A técnica de IV demonstrou desaparecimento de bandas características da TEL, sugerindo forte interação forte hós-



pede e hospedeiro nos CIM. Estas interações foram confirmadas pelos estudos de modelagem molecular, os quais apontaram a presença de ligações de hidrogênio entre o nitrogênio da TEL e o oxigênio do C6 da BCD, as quais promovem maior estabilidade para os complexos de inclusão de estequiometria 1:2 e 1:3. Além disso, os melhores resultados de dissolução foram observados para as formulações submetidas a maiores tempos de moagem (o qual favorece a evaporação da água presente na cavidade da BCD devido ao aquecimento e, dessa forma, deixa a cavidade livre pra interagir com a TEL). Todas os CIM promoveram aumento na velocidade de dissolução *in vitro* da TEL em relação ao fármaco puro e a mistura física em tampão fosfato monobásico pH 7.5 (ajustado com NaOH). Além disso, foi confirmado o efeito anti-hipertensivo rápido e eficaz das formulações avaliadas (M0\_15, M2\_30 e M3\_30) frente a angiotensina II durante a totalidade do experimento *in vivo* e, principalmente, nos primeiros 30 minutos após a administração oral, período crítico na absorção do fármaco.

Neste contexto, a formulação M2\_30 foi considerada a melhor formulação dentre os complexos de inclusão molecular em  $\beta$ -ciclodextrinas. Esta formulação, além de apresentar resultados semelhantes a M3\_30 e M0\_15, destaca-se em relação a M3\_30 por apresentar menor quantidade de BCD na sua formulação e, dessa forma, viabiliza a produção de comprimidos de mesma eficácia, mais econômicos e de tamanho e peso reduzidos. Em relação a M0\_15 (TEL pura na forma amorfa, sem adição de excipiente), M2\_30 tende a apresentar melhor estabilidade física e, conseqüentemente, a manutenção das suas características biofarmacêuticas, devido a capacidade de excipientes/CIM em inibir a recristalização de compostos amorfos.



## **Capítulo V**

**Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro* de Dispersões Sólidas de Telmisartana, obtido através de ativação mecânica em moinho de bolas e com distintos carreadores**

---

## 1 INTRODUÇÃO

O número crescente de novas entidades químicas expressando problemas de biodisponibilidade em função da baixa solubilidade aquosa durante o desenvolvimento de fármacos tem levado a investigação de meios eficazes para superar tais limitações (LAITINEN et al., 2013a; KAWABATA et al., 2011; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

A TEL é utilizada no tratamento da hipertensão arterial e apresenta diversas vantagens farmacológicas em relação a outros fármacos, destacando-se devido a sua longa duração de ação, alta seletividade (KAKUTA et al., 2005; DESTRO et al., 2011; GALZERANO et al., 2010), boa tolerabilidade (poucos efeitos colaterais) (WIENEN et al., 2000) e perfil de segurança favorável (GOSSE, 2006). Contudo, a TEL apresenta problemas de biodisponibilidade em razão da sua baixa solubilidade aquosa (ZHANG et al., 2010b) e, além disso, esta apresenta solubilidade pH dependente devido aos seus três valores de pKa 3.5, 4.1 e 6.0, restringindo mais ainda a sua solubilidade (TRAN; TRAN; LEE, 2008; USP, 2011a; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012; WIENEN et al., 2000; MARTINDALE, 2013).

Levando-se em consideração as inúmeras vantagens oferecidas pelo tramamento farmacológico da TEL, o desenvolvimento de sistemas capazes de melhorar as suas características biofarmacêuticas é de grande relevância. A conversão de fármacos cristalinos em sua forma amorfa é uma das estratégias mais promissoras a fim de aumentar a solubilidade e dissolução de fármacos pouco solúveis (SERAJUDIDIN, 2007). O estado amorfo possui altos níveis de energia intramolecular e apresenta maior mobilidade molecular que compostos cristalinos e, desse modo, apresenta melhorarias em parâmetros de molhabilidade, solubilidade e taxa de dissolução (SHAN-YANG; CHUN-SEN, 1989; YU, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; LAITINEN et al., 2013a) Contudo, o estado amorfo é menos estável energeticamente, tendendo a recristalização. Levando-se em consideração que a recristalização pode ocorrer durante a produção, armazenagem ou dissolução de sólidos amorfos (LAITINEN et al., 2013b; AALTONEN; RADES, 2009; HANCOCK; PARKS, 2000), métodos capazes de estabilizar a forma amorfa são promissores na manutenção das propriedades biofarmacêuticas de fármacos que apresentam problemas de solubilidade no estado cristalino.

As dispersões sólidas tem se mostrado um dos processos tecnológicos mais efetivos no aumento da taxa de dissolução/biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água, destacando-se dentre outras técnicas por promover melhores resultados (LEUNER; DRESSMAN, 2000; SERAJUDIDIN, 1999; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). Estas podem ser definidas como uma mistura molecular de fármaco hidrofóbico disperso

em carreadores hidrofílicos, onde o fármaco apresenta-se no estado amorfo e se comporta conforme as propriedades físico-químicas características do carreador (KIM et al., 2006). Além disso, a tecnologia de dispersão sólida tem sido aplicada com sucesso para desenvolver formulações amorfas com uma elevadas concentrações de fármaco e / ou contendo fármacos com alta tendência a cristalização, uma vez que contribui na estabilização física da forma amorfa de fármacos (HUANG; DAI, 2014).

A técnica de moagem mecânica em moinho de bolas é capaz de amorfizar partículas em larga escala e, assim, melhorar características biofarmacêuticas de fármacos, destacando-se frente outras técnicas devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e possibilidade de escalonamento (LIM; NG; TAN, 2013; BARZEGAR-JALALI et al., 2010). Além disso, o processo de moagem mecânica propicia interações entre fármaco e excipiente e, dessa forma, é capaz de promover modificações nas propriedades físico-químicas da estrutura cristalina de fármacos, resultando no melhoramento de propriedades de solubilidade, dissolução e biodisponibilidade (CROWLEY; ZOGRAFI, 2002). É importante ressaltar que a moagem mecânica é considerada uma das operações unitárias mais simples e comuns da indústria farmacêutica, a qual não requer o uso de solventes em seu processo, sendo considerada uma técnica limpa e ambientalmente correta (BARZEGAR-JALALI et al., 2010).

Diversos trabalhos tem sido publicados atualmente tendo como objetivo comum o aumento da solubilidade e dissolução da TEL através de diferentes técnicas, sistemas e estratégias. Há relatos do emprego da tecnologia de dispersões sólidas formadas por carreadores hidrofílicos (KOTHAWADE et al., 2010), contendo alcalinizantes (TRAN; TRAN; LEE, 2008; MARASINI et al., 2013), empregando a técnica de moinho de bolas (ZHONG et al., 2013), a tecnologia de fluido supercrítico (PARK et al., 2013) e a técnica fusão-resfriamento (DUKECK; SIEGER; KARMWAR, 2013). Contudo, a literatura consultada não indica o desenvolvimento de dispersões sólidas de TEL empregando alginato de sódio e cloridrato de quitosana como carreadores hidrofílicos no estado sólido, sem a adição de solvente e utilizando técnicas de fácil *scaling up*, a exemplo da técnica de moinho de bolas.

Diante do exposto, a obtenção de dispersões sólidas através da técnica de moinho de bolas é considerada promissora e inovadora, uma vez que este sistema é capaz de melhorar as características biofarmacêuticas da TEL de forma pH independente e que a técnica de obtenção propicia interações moleculares entre fármaco:carreador, além de favorecer a formação de DS amorfas.

Todas as DS serão avaliadas em termos de rendimento, solubilidade e as características físico-químicas serão avaliadas em estado sólido (DSC, DRX, IV, MEV) e em relação à sua velocidade de dissolução *in vitro*.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria prima da Telmisartana foi comprada da Haohua Industry Co. Ltda. (China), caracterizada e avaliada em relação ao controle de qualidade, conforme descrito no capítulo II ( pureza  $\geq 96\%$ , forma polimórfica A). O alginato de sódio (200.000 g/mol) foi adquirido através da Sigma-Aldrich (Alemanha) e o cloridrato de quitosana, 84% de grau de desacetilação, foi obtido da Sigma-Aldrich (Alemanha). Todos os solventes e reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico.

### 2.2 PREPAROS DAS DISPERSÕES SÓLIDAS

Dois lotes de dispersões sólidas binárias (DS) de TEL foram preparadas através do método de ativação mecânica em moinho de bolas, no estado sólido e sem adição de solvente. O Lote A é composto por DS contendo TEL e o carreador hidrofílico Algniato de sódio (AS) , enquanto o Lote B é composto por DS contendo TEL e o carreador hidrofílico cloridrato de quitosana (CQ) . A composição das dispersões sólidas obtidas está descrita na Tabela 14.

Ambos os lotes foram preparados empregando mesmas condições, onde fármaco e carreador foram cuidadosamente pesados ( massa final 2000 mg) e moídos em moinho de bolas de alta energia Spex Mixer Mill 8000 D (Stanmore, Reino Unido). Para a moagem, as amostras foram acondicionadas em recipientes cilíndricos, contendo em seu interior 4 bolas de aço inoxidável (três de 6,4mm e uma de 12,8 mm de diâmetro), de modo que a taxa bola:pó (BPR) se manteve em 5.6. O tempo de moagem foi determinado levando em consideração o fato de as DS apresentam maiores proporções de polímero que os CIM, chegando a 1:9 (fármaco:carreador). Assim, as DS foram moídas pelo período de 45 minutos, 15 minutos a mais do que o tempo necessário para amorfizar o fármaco nos CIM e obter um perfil de dissolução promissor, conforme descrito no capítulo IV. Ao final do processo de moagem foi observado um leve aumento na temperatura para todas formulações.

Após a obtenção, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo sua estabilidade avaliada durante o período de 3 meses, conforme será descrito no capítulo VII.

A mudança no grau de cristalinidade relativa/ amorfização do fármaco nas formulações foi avaliada através das técnicas de DSC e DRX, sendo que a intensidade das interações entre fármaco e carreador no estado sólido também foi investigado por IV.

Tabela 14: Composição das DS de TEL

Denominação	Proporção de TEL:carreador (m/m)	Técnica de obtenção	Tempo de moagem (min)
Lote A			
A11	1:1	Moinho de bolas	45
A13	1:3	Moinho de bolas	45
A15	1:5	Moinho de bolas	45
A17	1:7	Moinho de bolas	45
A19	1:9	Moinho de bolas	45
Lote B			
Q11	1:1	Moinho de bolas	45
Q13	1:3	Moinho de bolas	45
Q15	1:5	Moinho de bolas	45
Q17	1:7	Moinho de bolas	45
Q19	1:9	Moinho de bolas	45

### 2.2.1 Preparo das misturas físicas

As misturas físicas binárias foram preparadas através da pesagem do fármaco e cada cacarreador, na proporção 1:1 (mol/mol), seguido da homogeneização dos pós através da simples mistura destes com auxílio de uma espátula por 5 minutos. As amostras obtidas foram armazenadas em dessecador a vácuo e protegidas da luz. As misturas físicas foram denominadas de acordo com o carreador empregado, sendo MFA para TEL:alginato de sódio e MFQ para TEL:cloridrato de quitosana. Detalhes da composição das MF e suas denominação estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15: Composição das MF deTEL e carreadores hidrofílicos

Denominação	Proporção de TEL:carreador (m/m)	Técnica de obtenção	Tempo de mistura (min)
MFA	1:1	Mistura simples	2
MFQ	1:1	Mistura simples	2

### 2.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS DS

Para a determinação do rendimento, as DS obtidas foram pesadas e correlacionados à massa inicial, em termos de porcentagem (m/m).

### 2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DA TEL NAS DS

O teor de TEL contido nas DS foi determinado através de método analítico por espectrofotometria no ultravioleta (UV) descrito no capítulo III. Para tal, as DS foram proporcionalmente pesadas e solubilizadas em água e, posteriormente, diluídas em água afim de obter a concentração de  $10\mu\text{g/mL}$ . As amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo e analisadas a 298 nm em espectrofotômetro UV/Vis (Varian, Cary 50 Bio) em cubeta de quartzo. Os experimentos foram conduzidos em triplicata utilizando água como solvente.

### 2.5 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE

A fim de determinar a solubilidade das DS, quantidade em excesso de fármaco e DS foram pesados em balança analítica e adicionados a 15 mL de água destilada, a fim de formar um solução saturada. As amostras foram mantidas sob agitação por 24h a 25°C em equipamento Dist modelo DI-06. As soluções resultantes foram filtradas através de filtro quantitativo e determinada a 298 nm em espectrofotômetro UV/Visível (Varian, Cary 50 Bio) utilizando cubetas de quartzo. Os experimentos foram realizados em triplicata.



## 2.6 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS DS

### 2.6.1 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas de DSC do fármaco, carreadores, DS e as misturas físicas MFA e MFQ foram obtidas em célula Shimadzu DSC-60 utilizando cadinhos de alumínio abertos, com cerca de 2 mg de amostra, sob uma atmosfera dinâmica de  $N_2$  (velocidade de fluxo: 100 mL/min). A faixa de temperatura analisada foi de 30° C a 350° C com taxa de aquecimento de 10° C/min. Um cadinho de alumínio aberto vazio foi utilizado como referência. A célula de DSC foi calibrada com índio ( $T_{pico}$  156° C;  $\Delta H_{fusion} = 28,54$  J/g) e zinco ( $T_{pico}$  419° C). Os dados obtidos foram processados em *software* TA-60.

### 2.6.2 Difração de Raios-X de pó

Os difratogramas do fármaco, carreadores, DS e as misturas físicas MFA e MFQ foram obtidos utilizando um  $\theta - \theta$  X-ray diffractometer (Xpert Pro Multi-Purpose Diffractometer, PanAnalytical) equipado com radiação de cobre  $K\alpha$  ( $\lambda = 1.5418$  Å) operando com corrente de 40 mA e voltagem de 45 kV, amostra giratória e um detector Real Time Multiple Strip (RTMS). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, varredura  $2\theta$  a partir de 4° a 50°, com 0.033 tamanho de passo e 19,7 segundos tempo do passo.

### 2.6.3 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho do fármaco, carreadores, DS e as misturas físicas MFA e MFQ foram obtidos em aparelho PerkinElmer Spectrum, na faixa espectral de 4000-700  $cm^{-1}$ .

### 2.6.4 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das amostras das DS, TEL, carreadores e as misturas físicas MFA e MFQ 1:1(m/m) foram investigadas separadamente em pó através de fotomicrografias. Estas foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura Phillips, modelo XL30. A amostra foi fixada sobre stubs metálicos com o auxílio de fita adesiva dupla-face e revestida com ouro ( $350 \times 10^{-10}$  m) em uma unidade de revestimento por pulverização catódica polaron E 5000. As amostras foram analisadas por MEV em diferentes ampliações.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

O ensaio de dissolução do fármaco e das DS e as misturas físicas MFA e MFQ foi realizado em equipamento dissolutor Varian (VK 7000), baseado nas especificações da Farmacopéia Americana, a qual descreve a avaliação *in vitro* de comprimidos de TEL (USP., 2011b).

Dessa forma, quantidades correspondentes a 20mg de TEL foram pesadas e adicionadas diretamente sobre a superfície dos 900 mL de tampão fosfato monobásico pH 7.5, mantidos à  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , e rotacionados a 75 rpm através do aparato de dissolução II (pá). Em intervalos de tempo pré-definidos (5, 10, 15, 30 e 45), alíquotas de 5mL foram coletadas e imediatamente repostas com o mesmo volume de meio de dissolução. As amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo faixa preta e analisadas a 298 nm em espectrofotômetro UV/Visível (Varian, Cary 50 Bio) utilizando cubetas de quartzo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A fim de comparar o desempenho dos complexos de inclusão contendo TEL com a formulação comercial, comprimidos referência de telmisartana (Micardis®) contendo 40 mg do fármaco (Boehringer Ingelheim, lote 7320) foram adquiridos e também submetidos, em triplicata, às mesmas condições de dissolução.

A eficiência de dissolução (ED) do fármaco e dos CIM foi calculada a fim de comparar as formulações e evidenciar diferenças entre as formulações que não podem ser observadas através do perfil de dissolução. A avaliação integral comparativa da área sob a curva (AUC) do perfil de dissolução em relação à área representada pelo tempo total do ensaio foi calculado com o auxílio do programa *Graphpad Prism*, proposta inicialmente por Khan e Rhodes (KHAN; RHODES, 1975).

O valor de ED foi determinado pela razão entre a área sobre a curva de dissolução compreendida entre 0-30 min ( $ASC_{0-30\text{min}}$ ) e área total do retângulo ( $ASC_{total}$ ), definido pela ordenada 100% de dissolução e pela abcissa (30 min), conforme a Equação 5.

$$ED(\%) = \frac{ASC_{0-30\text{min}} \times 100}{ASC_{total}} \quad (5)$$

### 3 AVALIAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS DO LOTE A

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS DS

Os dados referentes ao rendimentos dos sistemas A11, A13, A15, A17 e A19 estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Valores de rendimento referentes ao Lote A de DS

Técnica de obtenção	DS	Rendimento (%)
Moinho de bolas	A11	89,5
Moinho de bolas	A13	90,1
Moinho de bolas	A15	89,7
Moinho de bolas	A17	90,2
Moinho de bolas	A19	96,0

As dispersões sólidas obtidas apresentaram-se como pós finos e soltos, sendo que a coloração variou de creme a amarelo com o aumento de alginato de sódio. Como pode ser observado, as DS apresentaram bons valores de rendimento, os quais estão em torno de 90% para todas as formulações.

#### 3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DA TEL NAS DS

Os dados referentes ao teor de TEL nas DS A11, A13, A15, A17 e A19 são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de teor de TEL para o Lote A de DS

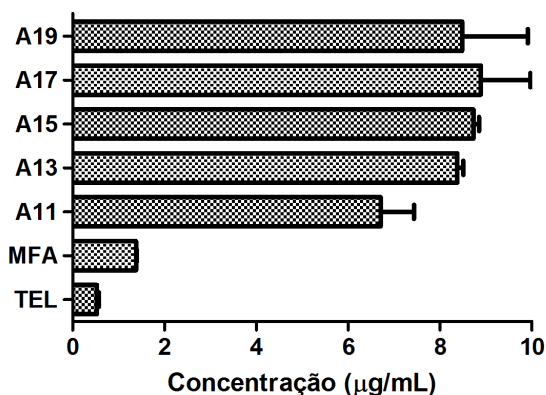
Técnica de obtenção	DS	Teor (%)±DP
Moinho de bolas	A11	65,6±0,94
Moinho de bolas	A13	74,3±0,18
Moinho de bolas	A15	63,3±2,45
Moinho de bolas	A17	54,1±1,24
Moinho de bolas	A19	50,8±0,16

Como pode ser observado na Tabela 17, todas as DS do lote A obtidas por moinho de bolas apresentaram valores de teor superiores a 50%. Observa-se que os valores de teor de TEL nas DS aumentou inversamente à concentração de AS nas formulações. Assim, A19 e A17 apresentaram os menores valores de teor, enquanto A11 e A13 apresentaram os maiores valores de teor, respectivamente.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE

A solubilidade das DS foi avaliada visando elucidar a influência da proporção fármaco:carreador na solubilidade aquosa da TEL. A avaliação da solubilidade aquosa das DS do lote A frente ao fármaco puro e a MFA está apresentada graficamente na Figura 31.

Figura 31: Plotagem da solubilidade da TEL pura frente ao Lote A de DS, em  $\mu\text{g/mL}$



Como pode ser observado, todas as formulações apresentaram aumento na solubilidade da TEL, determinada como sendo  $0,5\mu\text{g/mL}$  em água, sendo que as formulações A17, A15 e A19 apresentaram os melhores resultados de solubilidade. A MFA apresentou um aumento de apenas 2,6 vezes em relação a solubilidade da TEL isolada, indicando que o carreador AS é capaz de aumentar a solubilidade da TEL até mesmo na mistura física.

A Tabela 18 é possível visualizar a proporção do aumento da solubilidade da TEL, sob a forma de DS, em relação a TEL pura.

Como pode ser observado, o aumento de solubilidade da TEL variou de 1.258 a 1.668 % para as DS A11 e A17, respectivamente. Também é possível notar que a proporção de fármaco:carreador (m/m) influencia na solubilidade da TEL, onde os 3 melhores resultados foram observados nas formulações A17, A15 e A19, enquanto os dois piores resultados são referentes as menores proporções A11 e A13. A mistura física MFA apresentou valor de solubilidade de 259%, o qual é muito inferior aos apresentados pelas DS obtidas por moinho de bolas, demonstrando que o aumento da solubilidade está relacionado a dispersão da TEL no carreador AS, convertendo o fármaco hidrofóbico em uma forma hidrofílica nas DS.

Tabela 18: Proporção de aumento da solubilidade da TEL ( %) referente ao Lote A de DS

Técnica de obtenção	DS	Aumento da solubilidade (%)±DP
Simples mistura	MFA	259,5±0,01
Moinho de bolas	A11	1.258±0,73
Moinho de bolas	A13	1.572±0,13
Moinho de bolas	A15	1.638±0,12
Moinho de bolas	A17	1.668±1,08
Moinho de bolas	A19	1.592±1,43

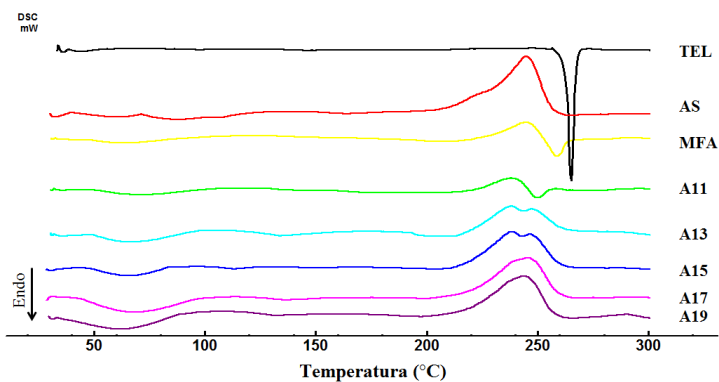
Uma vez que as DS do Lote A apresentaram resultados promissores de solubilidade, estas formulações serão melhor avaliadas através da caracterização do estado sólido e *in vitro*, sendo que a melhor formulação terá seu potencial anti-hipertensivo avaliado *in vivo*.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS DS

#### 3.4.1 DSC

As curvas de DSC do fármaco, do carreador AS, MFA e DS do Lote A são mostrados na Figura 32.

Figura 32: Curvas de DSC referentes a TEL, carreador (alginato de sódio) e MFA composta por fármaco:carreador na proporção 1:1 (m/m)



Como pode ser observado, a curva de DSC da TEL apresenta apenas um único evento de fusão em 265.28 °C, o qual é característico de uma subs-

tância cristalina anidra. O carreador AS apresenta um evento endotérmico em 74° C referente a perda de água adsorvida ao biopolímero e um evento exotérmico em 244° C, o qual está relacionado a degradação térmica do AS, de acordo com valores citados na literatura (SOARES et al., 2004). A curva de DSC referente a MFA apresenta uma diminuição do evento exotérmico do AS em 245 °C, seguido da diminuição e deslocamento do evento endotérmico da TEL para 258 °C, indicando a presença de interação entre fármaco e o carreador AS na mistura física.

Todas as formulações de DS do Lote A apresentaram-se como compostos amorfos hidratados, exibindo um evento endotérmico largo na faixa de 30-100 °C, o qual está associado a desidratação. A formulação A11 apresentou a diminuição e o deslocamento do evento de fusão do fármaco, sugerindo uma fraca interação entre fármaco e carreador. Nota-se que A13 e A15 também apresentaram deslocamento e diminuição do evento de fusão do fármaco para valores inferiores, enquanto A17 e A19 não apresentam o evento de fusão do fármaco, apenas o evento exotérmico característico do AS. A ausência do evento endotérmico do fármaco nas DS indica forte interação entre fármaco e carreador, sugerindo que o fármaco encontra-se molecularmente disperso nas DS e que este apresenta-se na forma amorfa (JUN et al., 2005; KIM et al., 2006; TRAN; TRAN; LEE, 2008; PARK et al., 2013; MARASINI et al., 2013). Resultados semelhantes de perfil térmico foram observados para DS de TEL e quitosana obtida por moinho de bolas (ZHONG et al., 2013).

### 3.4.2 DRX

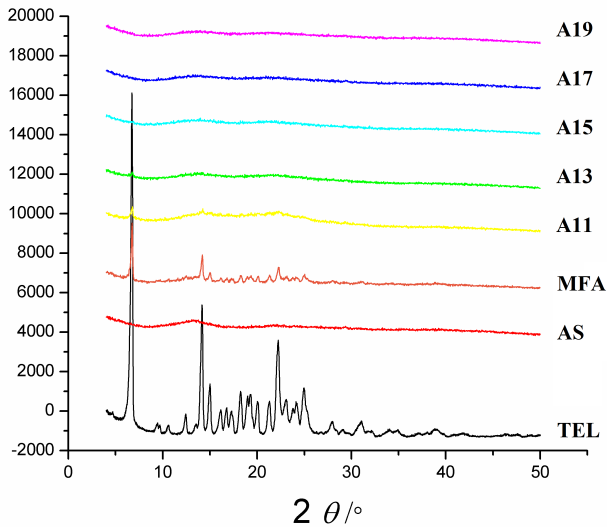
Os difratogramas do fármaco, do carreador AS, MFA e DS são mostrados na Figura 33.

O espectro de difração da TEL exibe alto grau de cristalinidade, o qual é caracterizado por picos elevados em 2 $\theta$ 6.7, 14.18, 15.00, 22.25 e 24.96°, conforme apresentado anteriormente no capítulo II. Diferentemente, o biopolímero AS apresenta perfil característico de um composto amorfo, não apresentando picos. O espectro de difração da MFA apresenta uma diminuição da intensidade dos picos característicos da TEL (2 $\theta$ 6.7, 14.18, e 24.96°), o qual é resultante do somatório dos espectros da TEL e do carreador AS.

Os espectros de difração das DS do Lote A apresentaram diferentes graus de amorfização, onde a diminuição do pico característico da TEL em 2 $\theta$ 6.7° foi observado em função do aumento do carreador AS. Assim, as formulações A11 e A13 apresentaram certo grau de amorfização, contudo estas exibem traços de cristalinidade característico da TEL em 2 $\theta$ 6.7°. Em contrapartida, A15, A17 e A19 apresentaram caráter totalmente amorfo, não apresentando picos referentes ao fármaco. Estes resultados estão de acordo com o

observado por DSC, uma vez que os picos endotérmicos da TEL observados em A11 e A13 estão relacionados a presença do pico de difração da com intensidade reduzida TEL em  $2\theta$   $6.7^\circ$ . Novamente, resultados semelhantes de perfil de difração foram evidenciados para DS de TEL e quitosana obtida por moinho de bolas (ZHONG et al., 2013).

Figura 33: Difratogramas referentes ao fármaco, carreador (AS), MFA e as DS



Vale ressaltar que os resultados obtidos através dos difratogramas sustentam os resultados de solubilidade apresentados anteriormente na Figura 31, uma vez que compostos amorfos apresentam um arranjo molecular desordenado, o qual propicia maiores valores de solubilidade e taxa de dissolução mais rápida a compostos amorfos, em relação a compostos cristalinos, devido a reduzido tamanho de partícula e molhabilidade destes (SHAN-YANG; CHUN-SEN, 1989; YU, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; LAITINEN et al., 2013a).

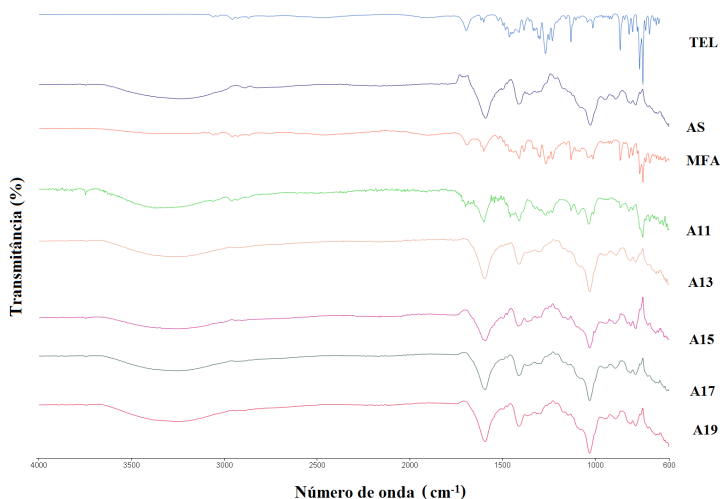
### 3.4.3 IV

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho é capaz de detectar interações entre o fármaco e o carreador através de mudanças nas ligações entre os grupamentos funcionais destes (LIN; HSU; SHEU, 2010).

Conforme pode ser observado na Figura 34, o espectro da TEL pura apresenta uma banda C-H em  $3057\text{cm}^{-1}$ , C-H alifático em  $2956$ , seguido de uma banda intensa referente ao grupamento carbonila do grupamento carboxílico (-COOH) em  $1699\text{cm}^{-1}$ . Este também apresenta uma banda em  $1598$ , (C=C aromático), e vibração do anel benzenico dissubstituído em  $740$  e  $758\text{cm}^{-1}$  (KANE; KUCHEKAR, 2010; TRAN; TRAN; LEE, 2008; ZHANG et al., 2010b). A elucidação completa do IV da TEL está apresentado no capítulo II, referente a caracterização do fármaco. O espectro do carreador AS, por sua vez, não apresenta a banda característica do grupamento COOH em aproximadamente  $1700\text{cm}^{-1}$ , uma vez que o ácido carboxílico transforma-se em carboxilado na presença do sódio (COO-Na), e, desse modo, apresenta bandas características do grupamento carboxílico salificado em  $1585$  e  $1410\text{cm}^{-1}$ . Detalhadamente, pode-se dizer que o biopolímero AS apresenta duas bandas características, a mais intensa proveniente da deformação axial assimétrica da ligação C-O entre  $1650-1550\text{cm}^{-1}$ , enquanto a banda mais fraca em torno de  $1400\text{cm}^{-1}$  está relacionada a deformação axial simétrica da ligação C-O (HUANG; PAL; MOON, 1999; SOARES et al., 2004; SEGATO, 2007).

Analisando o espectro IV do Lote A das DS é possível verificar que a MFA apresenta o bandas de menor amplitude equivalentes ao somatório do espectro da TEL e do AS em conjunto, indicando leve interação entre fármaco e carreador.

Figura 34: Espectros IV referentes a TEL, carreador (AS), MFA e as DS





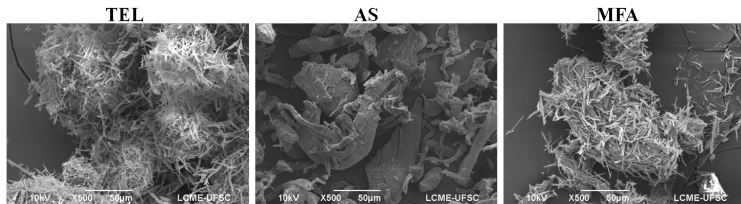
O espectro da A11 apresenta diferenças em relação a MFA (A11 e MFA apresentam-se na mesma proporção TEL:AS) no tocante as principais bandas de absorção da TEL, sendo mais visível a ausência da banda característica da carbonila da TEL em  $1699\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo interações intermoleculares de hidrogênio através do grupamento carbonila da TEL e grupamento hidroxila do AS. As DS do Lote A de proporções não equivalentes no que se refere a proporção (m/m) fármaco:carreador apresentaram espectros semelhantes ao espectro do AS isolado, uma vez que apresentam maior proporção do biopolímero AS em relação ao fármaco.

Analisando os resultados obtidos através da caracterização do estado sólido, pode-se inferir que o aumento da solubilidade observado para as DS do Lote A não se deve a característica do AS em propiciar um microclima básico a TEL, mas sim devido a amorfização das amostras conferido através do processo de moagem somado as ligações de hidrogênio entre fármaco e carreador os quais propiciaram o aumento da solubilização do fármaco quando na forma de DS.

### 3.4.4 MEV

A morfologia do fármaco, carreador (AS) e da mistura física destes (MFA) foi investigada através de fotomicrografias mostradas na Figura 35.

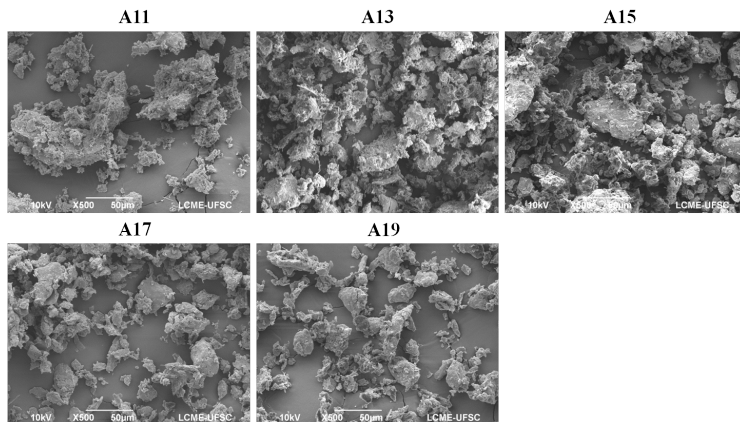
Figura 35: Fotomicrografias da TEL, AS e MFA em magnitude de 500 x



Como pode ser observado, a TEL apresenta-se sob a forma de cristais aciculares alongados (em forma de agulha), os quais encontram-se aglomerados em pequenos grumos. Este hábito cristalino corresponde ao polimorfo A da TEL (DINNEBIER et al., 2000), sendo que a caracterização do fármaco está elucidada com maior riqueza de detalhes no capítulo II. O Alginato de sódio apresenta-se sob a forma de blocos com forma e superfície irregulares, apresentando variação de tamanho. A MF, por sua vez, apresenta a morfologia da TEL e do carreador AS em conjunto, ou seja, blocos de AS envoltos por cristais aciculares de TEL.

Como pode ser observado na Figura 36, as DS obtidas através do processo de ativação mecânica em moinho de bolas apresentaram alterações morfológicas relevantes em relação aos seus componentes isolados e a MFA.

Figura 36: Fotomicrografias das DS do Lote A em magnitude de 500 x



Se observarmos cuidadosamente a Figura 36, fica evidente que todas as formulações do Lote A apresentam-se amorfas, sendo que tamanho de partícula parece diminuir proporcionalmente com o aumento da proporção de AS nas formulações.

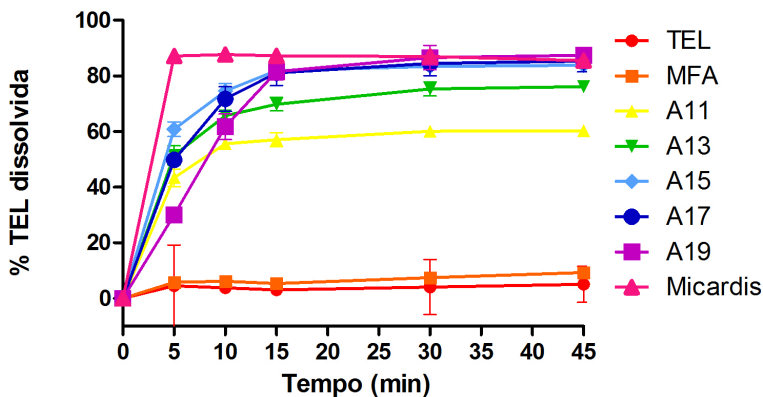
Os resultados de solubilidade apresentados na Tabela 18, onde a solubilidade aumenta em função do aumento do carreador nas DS do Lote A, podem ser justificados devido a amorfização do fármaco e a diminuição do tamanho de partícula, conforme observado nas micrografias. A diminuição do tamanho das partículas gera uma maior área superficial e, dessa forma, aumenta a molhabilidade das partículas e os valores de solubilidade (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; AULTON, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; GENARO, 2005).

### 3.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

O método analítico de quantificação da TEL descrito no capítulo III foi revalidado a fim de quantificar a TEL e nas DS contidos no meio de dissolução, sendo avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, LD, LQ e exatidão (ICH, 2006). A dissolução da TEL liberada pelos DS foi determinada através de método analítico por espectrofotometria no UV, o qual está descrito no capítulo III.

O perfil de dissolução das DS do Lote A foi investigado a fim de avaliar a influência das proporções fármaco/biopolímero na dissolução da TEL. Os perfis de dissolução das DS, fármaco puro, MFA e do comprimido Micardis<sup>®</sup> são mostrados na Figura 37.

Figura 37: Perfis de dissolução das DS do Lote A



Como pode ser observado na Figura 37, todas as DS do lote A apresentaram um rápido aumento da dissolução da TEL, em relação a TEL livre e a MFA. A TEL livre apresentou a menor velocidade de dissolução, liberando de 4,1% do fármaco em 30 minutos. A mistura física MFA atingiu apenas 7,5% de fármaco dissolvido também em 30 minutos. A semelhança na dissolução da TEL pura e da MFA está de acordo com os resultados de DRX, onde a MFA apresenta caráter semi-cristalino e, dessa forma, não apresenta diferença significativa na taxa de dissolução em relação a TEL, um composto cristalino.

Dentre as DS de AS, observou-se diferenças entre os perfis de dissolução, as quais estão relacionadas com a proporção entre fármaco e carreador (m/m). Analisando os perfis de dissolução, pode-se notar que as DS contendo as proporções fármaco:carreador mais uniformes foram as que apresentaram os menores valores de dissolução, onde A11 e A13 liberaram 60 e 75% de fármaco em apenas 30 min, respectivamente. Levando-se em consideração que estas formulações contêm maior porcentagem de fármaco, pode-se inferir que estas apresentaram as menores taxas de dissolução devido a problemas de molhabilidade gerada pela agregação do fármaco nas DS (LEUNER; DRESSMAN, 2000). É importante ressaltar que apesar de A11 apresentar o pior resultado de dissolução dentre as DS, esta formulação apresentou quantidade

de fármaco liberada equivalente a 14,6 vezes aquela obtida para a TEL livre.

As DS que apresentaram os melhores resultados, foram A15, A17 e A19. Estas apresentaram perfis de dissolução semelhantes, onde todas foram capazes de liberar mais de 80% do fármaco em apenas 30 minutos. Vale ressaltar que os resultados de dissolução estão de acordo com aqueles encontrados para a solubilidade e DRX, onde as DS com maior grau de amorfização (A15, A17 e A19) apresentaram os melhores resultados de solubilidade e dissolução. O pH do meio de dissolução (tampão fosfato monobásico pH 7.5) foi avaliado ao final do ensaio e está apresentado na Tabela 19.

Tabela 19: Valores do pH do meio de dissolução ao final do ensaio de dissolução das DS Lote A

Formulações	pH
MFA	7.47
A11	7.47
A13	7.47
A15	7.48
A17	7.48
A19	7.48
Micardis®	9.0

Como pode ser observado, o pH do meio de dissolução não apresentou mudança ao final das análises, mostrando que a proporção de fármaco/carreador em meio tamponado não influencia no aumento da dissolução das DS. Assim, pode-se inferir que a amorfização influenciou significativamente no aumento da solubilidade e dissolução da TEL, haja vista que compostos amorfos apresentam alto nível de energia interna, e assim, apresentam maiores valores de molhabilidade/solubilidade e taxa de dissolução mais rápida, em relação a compostos cristalinos e semicristalinos (A11 e A13) (SHAN-YANG; CHUNSEN, 1989; YU, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; LAITINEN et al., 2013a).

O medicamento referência para a TEL disponível no mercado na forma de comprimidos (Micardis®) foi submetido a análise de perfil de dissolução a fim de comparar o seu desempenho em relação as DS. Como pode ser observado, o Micardis® apresentou o melhor perfil de dissolução liberando 87% de TEL em apenas 5 min. Contudo, este perfil de dissolução deve-se a modificação do pH do meio de dissolução para 9.0, conferido por alcalinizantes (meglumina e hidróxido de sódio) presentes na formulação do comprimido. Estes proporcionam um microclima favorável para o aumento da solubilidade da TEL no meio de dissolução e, dessa forma, um perfil de dissolução aceitável é alcançado. Vale ressaltar que os valores de dissolução observados

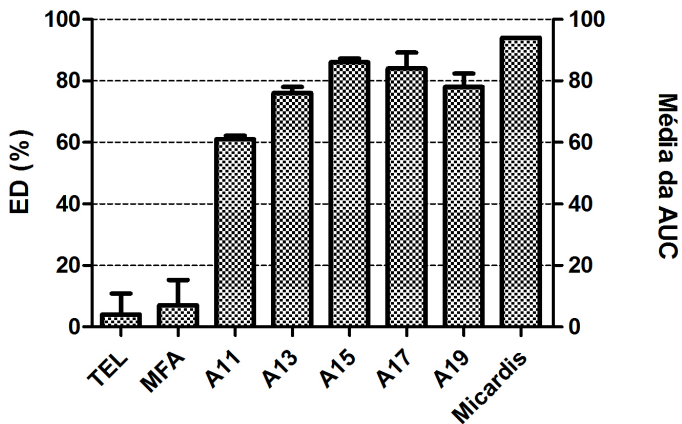
para os comprimidos Micardis<sup>®</sup> são inferiores ao determinado pela USP para comprimidos contendo TEL, os quais devem conter não menos que 90% e não mais que 110% de fármaco dissolvido em 30 min (USP., 2011b).

As formulações A15, A17 E A19 apresentaram resultado bastante semelhante, onde todas liberaram de 83, 84 e 87% de TEL em apenas 30 min, respectivamente. Este resultato é bastante promissor levando-se em consideração que o aumento da dissolução não está relacionado a modificação do pH do meio de dissolução, mas sim devido a formação de DS amorfas de TEL. Além disso, as DS apresentam a vantagem de não se tratarem de formulações farmacêuticas finais, onde o melhoramento do perfil de dissolução ainda pode ser delineado durante o desenvolvimento da forma farmacêutica final através da seleção de excipientes adequados.

É importante mencionar que todos os pontos obtidos durante a análise de dissolução das DS apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) de acordo com o especificado pela Farmacopéia Americana (USP., 2011c), a qual estabelece como limite para os pontos iniciais uma variação de 20% e de até 10% para os pontos restantes. Dessa forma, pode-se dizer que as amostras avaliadas apresentaram-se homogêneas.

Os dados alusivo à eficiência de dissolução (ED) do fármaco, DS e MFA em relação ao comprimido Micardis<sup>®</sup> estão ilustrados na Figura 38.

Figura 38: Comparativo da ED (%) do fármaco puro, MFA e DS AS (Lote A)



Como pode ser observado, a dissolução da TEL foi mais eficiente na forma de DS em relação a TEL puro e a MFA. Todas as DS apresentaram valores de ED maiores de 60%, sendo o melhor desempenho observado para

as DS A15, A17 e A19. Estas três formulações apresentaram valores de ED próximos 86, 84 e 78% respectivamente. Como pode ser observado a ED das DS A15, A17 e A19 é próximo ao ED dos comprimidos Micardis® (94%), mesmo se tratando apenas de um sistema o qual requer o desenvolvimento de uma forma farmacêutica final, o qual não contém alcalinizantes.

Dentre as DS que apresentaram resultados semelhantes de ED, A15 apresentou o melhor resultado e também é a DS que contém a menor quantidade de biopolímero em sua formulação. Tal fato é bastante relevante, uma vez que é relatado na literatura dificuldade no processamento de formas farmacêuticas finais contendo DS, uma vez que existe a necessidade da utilização de grandes quantidades de polímero para atingir um perfil de dissolução adequado e, dessa forma, requer grandes quantidades de matéria prima nas formas farmacêuticas finais (LAITINEN et al., 2013b; SERAJUDDIN, 1999). Além disso, comprimidos de tamanho e peso reduzidos são considerados convenientes tanto para o fabricante, quanto para o paciente. Para o fabricante, estes proporcionam facilidade no processo e economia na produção industrial. Para o paciente, estes geram comodidade na administração devido a facilidade de deglutição fornecida por comprimidos reduzidos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; GENARO, 2005). Dessa forma, a obtenção de comprimidos de TEL contendo a formulação A15 é considerada promissora, uma vez que esta viabiliza a produção de comprimidos de tamanho e peso reduzidos.

Neste contexto, a DS A15 foi considerada a melhor escolha para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica final, sendo uma perspectiva futura a avaliação do efeito anti-hipertensivo *in vivo* desta formulação.

## 4 AVALIAÇÃO DO LOTE B DE DISPERSÕES SÓLIDAS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS DS

Os dados referentes ao rendimento dos sistemas Q11, Q13, Q15, Q17 e Q19 estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Valores de rendimento referentes às DS pertencentes ao Lote B

Técnica de obtenção	DS	Rendimento (%)
Moinho de bolas	Q11	90,2
Moinho de bolas	Q13	87,6
Moinho de bolas	Q15	94,5
Moinho de bolas	Q17	80,6
Moinho de bolas	Q19	79,8

As dispersões sólidas obtidas apresentaram-se como pós de granulometria variável e coloração marrom a marrom escuro com o aumento do biopolímero cloridrato de quitosana. Como pode ser observado, as DS apresentaram valores aceitáveis de rendimento, os quais giram em torno de 80% para todas as formulações.

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DA TEL NAS DS

Os dados referentes ao teor de TEL nas DS Q11, Q13, Q15, Q17 e Q19 são mostrados na Tabela 21.

Como pode ser observado na Tabela 21, todas as DS de AS obtidas por moinho de bolas apresentaram valores de teor superiores a 70%.

Tabela 21: Valores de teor de TEL para o Lote B de DS

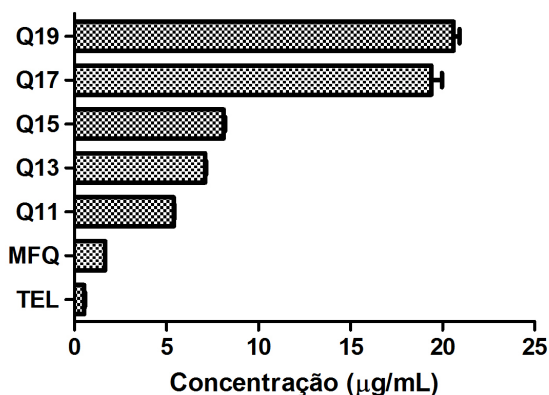
Técnica de obtenção	DS	Teor (%)±DP
Moinho de bolas	Q11	77,1±1,18
Moinho de bolas	Q13	97,3±0,20
Moinho de bolas	Q15	103,3±0,21
Moinho de bolas	Q17	106,6±0,42
Moinho de bolas	Q19	110,5±0,03

Interessantemente o teor de TEL nas DS aumentou proporcionalmente à concentração de CQ nas formulações. Valores de teor maiores de 100% foram observados para as formulações Q15, Q17 e Q19 e estão de acordo com o intervalo determinado pela USP para os comprimidos Micardis<sup>®</sup>, os quais devem conter não menos que 90% e não mais que 110% de fármaco (USP, 2011b).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE

A solubilidade das DS foi avaliada visando elucidar a influência da proporção fármaco:carreador na solubilidade aquosa da TEL. A avaliação da solubilidade aquosa das DS do lote B frente ao fármaco puro e a MFQ está apresentada graficamente na Figura 39.

Como pode ser observado, todas as formulações apresentaram aumento na solubilidade da TEL, determinada como sendo 0,5µg/mL em água, sendo que as formulações Q19, Q17 apresentaram os melhores resultados de solubilidade com mais de 35 vezes de aumento em relação a TEL isolada. A MFQ apresentou um aumento de apenas 3,13 vezes em relação a solubilidade aquosa da TEL isolada, indicando que o carreador CQ é capaz de aumentar a solubilidade da TEL até mesmo na mistura física.

Figura 39: Plotagem da solubilidade da TEL pura frente às DS Lote B, em  $\mu\text{g/mL}$ 

Na Tabela 22 é possível visualizar a proporção do aumento da solubilidade da TEL, sob a forma de DS, em relação a TEL pura.

Tabela 22: Proporção de aumento da solubilidade da TEL (em %) referente às DS do Lote B

Técnica de obtenção	DS	Aumento da solubilidade (%) $\pm$ DP
Simples mistura	MFQ	314,0 $\pm$ 0,01
Moinho de bolas	Q11	1.071 $\pm$ 0,44
Moinho de bolas	Q13	1.345 $\pm$ 0,04
Moinho de bolas	Q15	1.507 $\pm$ 0,09
Moinho de bolas	Q17	3.708 $\pm$ 0,56
Moinho de bolas	Q19	3.911 $\pm$ 0,32

Como pode ser observado, o aumento de solubilidade da TEL variou de 1.071 a 3.911 % para as DS Q11 e Q19, respectivamente. Também é possível notar que a proporção de fármaco:carreador (m/m) influencia na solubilidade da TEL, onde a solubilidade aumentou em função do aumento da proporção de carreador nas formulações. Assim, os 3 melhores resultados foram observados nas formulações Q19, Q17 e Q15, enquanto os dois piores resultados são referentes as menores proporções Q11 e Q13, respectivamente. A mistura física MFQ apresentou valor de solubilidade de 314%, o qual é muito inferior aos apresentados pelas DS obtidas por moinho de bolas, demonstrando que o aumento de solubilidade aquosa da TEL exibido pelas



DS do Lote A deve-se a dispersão da TEL no carreador CQ, convertendo o fármaco hidrofóbico em uma forma hidrofílica nas DS.

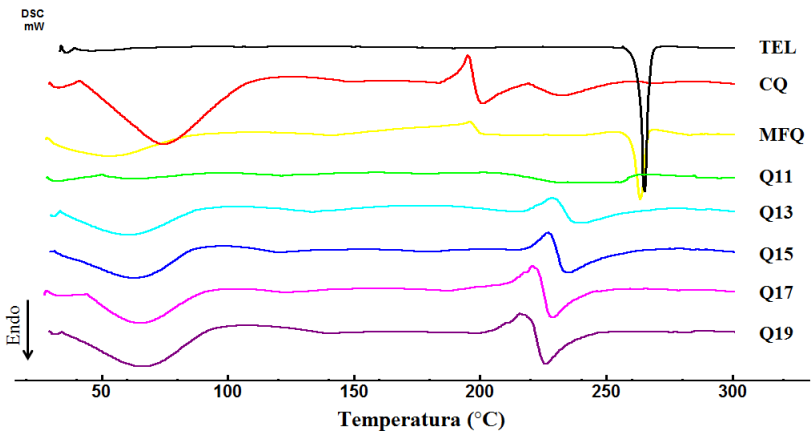
Uma vez que as DS do Lote B apresentaram resultados promissores de solubilidade, estas formulações serão melhor avaliadas através da caracterização do estado sólido e *in vitro*, sendo que a melhor formulação terá seu potencial anti-hipertensivo avaliado *in vivo*.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO DAS DS

### 4.4.1 DSC

As curvas de DSC do fármaco, do carreador CQ, MFQ e DS do Lote B são mostrados na Figura 40.

Figura 40: Curvas de DSC referentes a TEL, carreador (cloridrato de quitosana) e MFQ composta por fármaco:carreador na proporção 1:1 (m/m)



Como pode ser observado, a curva de DSC da TEL apresenta apenas um único evento de fusão em 265.28 °C, o qual é característico de uma substância cristalina anidra. O carreador CQ apresenta um evento endotérmico em 75 °C referente a perda de água adsorvida ao carreador e um evento exotérmico em 195 °C, o qual está relacionado a degradação térmica do CQ, de acordo com valores citados na literatura (ROSCA et al., 2005). A curva de DSC referente a MFQ apresenta um evento endotérmico em 55 °C referente a perda de água adsorvida ao carreador e um deslocamento e diminuição do evento endotérmico da TEL para 263 °C, sugerindo a ausência de interação

forte entre fármaco e o carreador CQ na mistura física. Resultados semelhantes de interação entre fármaco e carreador na mistura física foram observados em dispersões sólidas contendo TEL e diversos excipientes através da técnica de *spray drying* (MARASINI et al., 2013).

Todas as formulações de DS do Lote B apresentaram-se como compostos amorfos hidratados, exibindo um evento endotérmico largo na faixa de 30 - 100 °C, o qual está associado a desidratação. Diferentemente da MFQ, a formulação Q11 não apresentou o evento de fusão característico da TEL, nem a exotérmica característica da degradação do CQ. As DS Q13, Q15, Q17 e Q19 apresentam comportamento térmico semelhante, onde não é observado o evento de fusão da TEL, apenas o evento exotérmico característico do CQ. A ausência do evento endotérmico do fármaco nas DS indica forte interação entre fármaco e carreador, que o fármaco está molecularmente disperso nas DS e que este apresenta-se na forma amorfa (JUN et al., 2005; KIM et al., 2006; TRAN; TRAN; LEE, 2008; PARK et al., 2013; MARASINI et al., 2013).

#### 4.4.2 DRX

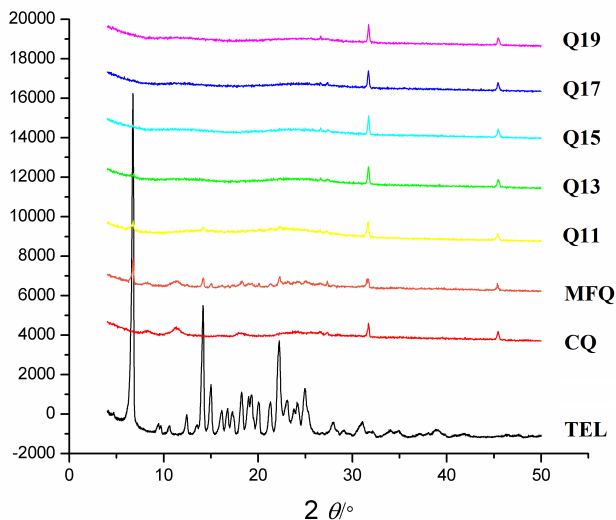
Os difratogramas do fármaco, do carreador CQ, MFQ e DS são mostrados na Figura 41.

O espectro de difração da TEL exibe alto grau de cristalinidade, o qual é caracterizado por picos elevados em  $2\theta$  6.7, 14.18, 15.00, 22.25 e 24.96° (DINNEBIER et al., 2000). Diferentemente, o carreador CQ apresenta perfil característico de um composto semi-cristalino, apresentando um halo em  $2\theta$  12° e picos com intensidade reduzida em  $2\theta$  32 e 45°. O espectro de difração da MFQ apresenta os picos característicos da TEL com intensidade reduzida somado aos picos característicos do CQ, indicando que a cristalinidade do fármaco e carreador não mudam na MF.

Todos difratogramas das DS do Lote B apresentaram os picos característicos do CQ em  $2\theta$  32 e 45°. Porém, pode-se notar que as formulações Q11 e Q13 apresentaram, em intensidade reduzida, o pico característico da TEL em  $2\theta$  6.7, enquanto Q15, Q17, Q19 não apresentam nenhum pico referentes ao fármaco. A ausência dos picos de difração da TEL indicam que as DS apresentam a TEL na forma amorfa (TRAN; TRAN; LEE, 2008; PARK et al., 2013; MARASINI et al., 2013). Nesse caso, os resultados de DSC não estão de acordo com o observado por DRX, uma vez que Q11 e Q13 não apresentam picos endotérmicos característicos da TEL no DSC, mas apresentam o pico de difração característico da TEL, em intensidade reduzida, em  $2\theta$  6.7°. Resultados não coincidentes entre a técnica de DSC e DRX foram relatados na literatura (LEUNER; DRESSMAN, 2000; TRAN; TRAN; LEE, 2008; MARASINI et al., 2013), sendo explicado devido ao fato da técnica de

DSC não conseguiu detectar graus de cristalinidade muito baixos (menores de 2%), como o observado nos difratogramas da Q11 e Q13.

Figura 41: Difratogramas referentes ao fármaco, carreador (CQ), MFQ e as DS



Vale ressaltar que os resultados obtidos através dos difratogramas sustentam os resultados de solubilidade apresentados anteriormente na Figura 39, uma vez que compostos amorfos apresentam um arranjo molecular desordenado, o qual propicia maiores valores de solubilidade e taxa de dissolução mais rápida a compostos amorfos, em relação a compostos cristalinos, devido a reduzido tamanho de partícula e molhabilidade destes (SHAN-YANG; CHUN-SEN, 1989; YU, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; LAITINEN et al., 2013a).

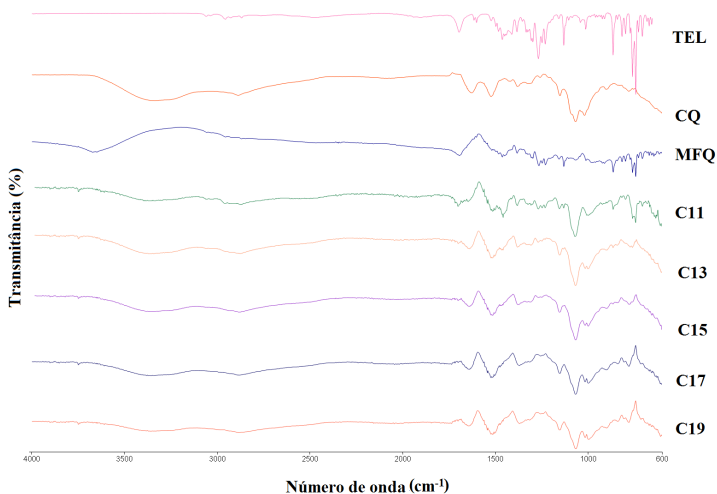
#### 4.4.3 IV

Conforme pode ser observado na Figura 42, o espectro da TEL pura apresenta uma banda C-H em  $3057\text{ cm}^{-1}$ , C-H alifático em  $2956\text{ cm}^{-1}$ , seguido de uma banda intensa referente ao grupamento carbonila do grupamento carboxílico (-COOH) em  $1699\text{ cm}^{-1}$ . Este também apresenta uma banda em  $1598\text{ cm}^{-1}$ , (C=C aromático), e vibração do anel benzenico disubstituído em  $740$  e  $758\text{ cm}^{-1}$  (KANE; KUCHEKAR, 2010; TRAN; TRAN;

LEE, 2008; ZHANG et al., 2010b). A elucidação completa do IV da TEL está apresentado no capítulo II, referente a caracterização do fármaco.

O espectro de IV do CQ apresenta bandas características em  $1627\text{ cm}^{-1}$  (amida primária),  $1524\text{ cm}^{-1}$  (amida secundária),  $1378\text{ cm}^{-1}$  (amida secundária). As bandas de absorção em  $1150$ ,  $1062$  e  $1017\text{ cm}^{-1}$  são características do esqueleto polissacarídico. A banda de absorção em  $2087\text{ cm}^{-1}$  é característico da ligação  $\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$ . Os resultados observados estão de acordo com resultados de IV previamente descritos da literatura para o CQ (ROSCA et al., 2005; CAI et al., 2012). A MFQ apresenta um espectro de IV correspondente apresenta um espectro diferente do somatório da TEL e CQ. Essas mudanças sugerem interações entre fármaco e CQ.

Figura 42: Espectros IV referentes a TEL, carreador (CQ), MFQ e as DS



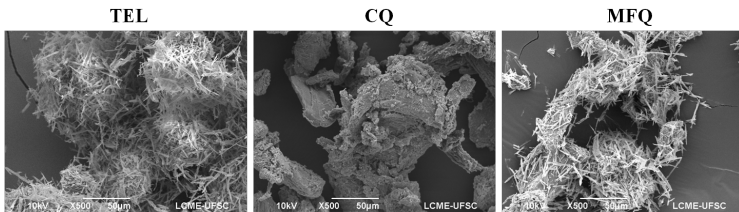
Analisando o espectro IV do Lote B das DS é possível observar que o espectro de Q11 apresenta diferenças em relação a MFQ (Q11 e MFQ apresentam-se na mesma proporção TEL:CQ) no tocante as principais bandas de absorção da TEL, sendo mais visível o desaparecimento da banda característica da carbonila da TEL em  $1699\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo interações intermoleculares de hidrogênio através do grupamento carbonila da TEL e grupamento hidroxila do CQ. As DS do Lote B de proporções não equivalentes no que se refere a proporção (m/m) fármaco:carreador apresentaram espectros semelhantes e diferentes da formulação C11, o qual ainda apresenta bandas características da TEL. Analisando os resultados obtidos através da caracterização do estado sólido, pode-se sugerir que o aumento da solubilidade

observado para as DS do Lote B não se deve a característica do CQ em propiciar um microclima alcalino a TEL, mas sim devido a dispersão da TEL no CQ, resultando em um sistema amorfo contendo ligações de hidrogênio entre fármaco e carreador, as quais propiciaram o aumento da solubilização do fármaco quando na forma de DS.

#### 4.4.4 MEV

A morfologia do fármaco, carreador (CQ) e da mistura física destes (MFQ) foi investigada através de fotomicrografias mostradas na Figura 43. Como pode ser observado, a TEL apresenta-se sob a forma de cristais aciculares alongados (em forma de agulha), os quais encontram-se aglomerados em pequenos grumos. Este hábito cristalino corresponde ao polimorfo A da TEL (DINNEBIER et al., 2000), sendo que a caracterização do fármaco está elucidada com maior riqueza de detalhes no capítulo II. O cloridrato de quitosana apresenta-se sob forma de aglomerado com forma e superfície irregulares, apresentando variação de tamanho. A MFQ, por sua vez, apresenta a morfologia da TEL e do carreador CQ em conjunto, ou seja, uma superfície irregular característica do CQ envoltos por cristais aciculares de TEL.

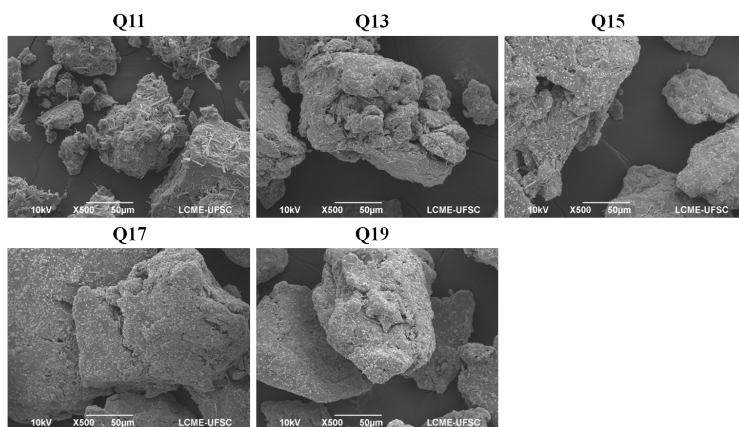
Figura 43: Fotomicrografias da TEL, CQ e MFQ em magnitude de 500 x



Como pode ser observado na Figura 44, as DS obtidas através do processo de ativação mecânica em moinho de bolas apresentaram alterações morfológicas relevantes em relação aos seus componentes isolados e a MFQ. Se observarmos cuidadosamente a Figura 44, fica evidente que todas as formulações do Lote B apresentam-se sob a forma aglomerada irregular, sendo que a visualização dos cristais da TEL é presente nas formulações Q11 e Q13 e ausente nas formulações Q17 e Q19. A quitosana e seus derivados apresentam diversos fatores que influenciam em sua solubilização aquosa. Entre eles está o efeito de amorfização sobre o fármaco, a redução do tamanho de partícula do fármaco e a formação de complexos solúveis em água (ZHONG et al., 2013). Assim, os resultados de solubilidade apresentados na Tabela 22, onde a solubilidade aumenta em função do aumento do carreador nas DS (os

mais amorfos), podem ser justificados devido ao maior grau de amorfização do fármaco nas formulações Q15, Q17 e Q19, somado a presença de maiores proporções do polímero hidrofílico CQ nestas DS, o qual promove a formação de complexos com maior capacidade de adsorção de água e, desta forma, aumenta a solubilidade aquosa das DS. (AULTON, 2001; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; GENARO, 2005; ZHONG et al., 2013).

Figura 44: Fotomicrografias das DS do Lote B em magnitude de 500 x



#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

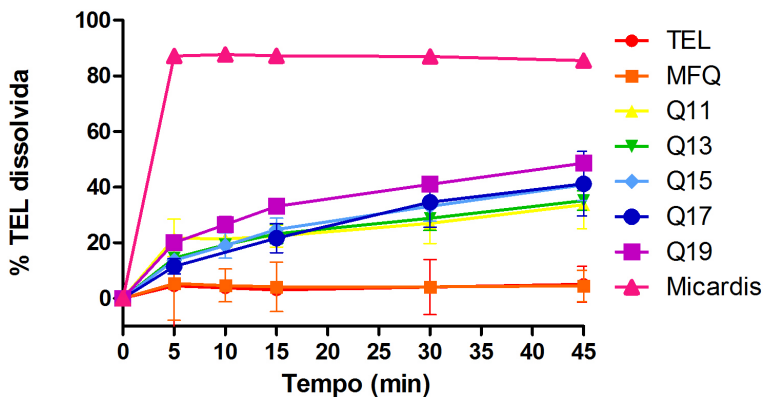
O método analítico de quantificação da TEL descrito no capítulo III foi revalidado a fim de quantificar a TEL e nas DS contidos no meio de dissolução, sendo avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, LD, LQ e exatidão (ICH, 2006). A dissolução da TEL liberada pelos DS foi determinada através de método analítico por espectrofotometria no UV, o qual está descrito no capítulo III. O perfil de dissolução das DS do Lote B foi investigado a fim de avaliar a influência das proporções fármaco/carreador na dissolução da TEL. Os perfis de dissolução das DS, fármaco puro, MFQ e do comprimido Micardis<sup>®</sup> são mostrados na Figura 45.

Como pode ser observado na Figura 45, todas as DS do lote B apresentaram perfil de dissolução semelhante e apresentaram aumento discreto da dissolução da TEL, em relação a TEL livre e a MFQ.

A TEL livre e a MFQ apresentaram as menores velocidade de dissolução, liberando iguais 4,1% do fármaco em 30 minutos. A equivalência na dissolução da TEL pura e da MFQ estão de acordo com os resultados de

DRX, uma vez que MFQ apresenta caráter semi-cristalino e, dessa forma, não apresenta diferença significativa na taxa de dissolução em relação a TEL, um composto cristalino.

Figura 45: Perfis de dissolução das DS do Lote B



Dentre as DS de CQ, observou-se diferenças discretas entre os perfis de dissolução, as quais estão relacionadas com a proporção entre fármaco e carreador (m/m). Analisando os perfis de dissolução, pode-se notar que as DS contendo as proporções fármaco:carreador mais uniformes foram as que apresentaram os menores valores de dissolução, onde Q11 e Q13 liberaram apenas 27 e 28% de fármaco em apenas 30 min, respectivamente. É importante ressaltar que apesar de Q11 apresentar o pior resultado de dissolução dentre as DS, esta formulação apresentou quantidade de fármaco liberada equivalente a 6,5 vezes aquela obtida para a TEL livre. As DS que apresentaram os melhores resultados foram Q19, Q17 e Q15, respectivamente. Estas apresentaram perfis de dissolução semelhantes, contudo apresentaram liberação de fármaco inferior a 50% em 30 minutos. Apesar de apresentarem resultado de dissolução insatisfatório, estes podem ser correlacionados com os resultados de solubilidade e DRX observados para as DS do Lote B, haja vista que as DS com maior grau de amorfização (Q19, Q17 e Q15) apresentaram os melhores resultados de solubilidade aquosa e dissolução. Vale ressaltar que os resultados de dissolução das DS do Lote B não foram tão promissores quanto os observados na análise de solubilidade. Tal fato pode ser explicado devido ao fato dos sais de quitosana apresentarem solubilidade dependente do grau de desacetilação, do valor de pKa da quitosana de origem, e do pH do meio. O meio de dissolução (tampão fosfato monobásico pH 7.5)

interferiu na solubilidade da quitosana, uma vez que quanto maior a força iônica, menor a solubilidade das quitosana (ILLUM, 1998). Além disso, o grau de desacetilação da quitosana também influenciou nos resultados de perfil de dissolução indesejável, haja vista que quitosanas contendo graus de desacetilação relativamente baixos (40%) são solúveis em meios alcalinos até pH 9.0, enquanto quitosanas com grau de desacetilação de aproximadamente 85% são solúveis apenas até pH 6.5 (ILLUM, 1998), sendo estes considerados fatores limitantes na dissolução das DS do lote B.

O pH do meio de dissolução (tampão fosfato monobásico pH 7.5) foi avaliado ao final do ensaio e está apresentado na Tabela 23.

Tabela 23: Valores do pH do meio de dissolução ao final do ensaio de dissolução das DS Lote B

Formulações	pH
MFQ	7.48
Q11	7.47
Q13	7.47
Q15	7.48
Q17	7.48
Q19	7.47
Micardis®	9.0

Como pode ser observado, o pH do meio de dissolução não apresentou mudança ao final das análises, mostrando que a proporção de fármaco/carreador em meio tamponado não influencia no aumento da dissolução das DS. Assim, pode-se inferir que a formação de DS influenciou significativamente no aumento da solubilidade e dissolução da TEL, haja vista que DS amorfas apresentam alto nível de energia interna, e assim, apresentam maiores valores de molhabilidade/solubilidade e taxa de dissolução mais rápida, em relação a compostos cristalinos e semicristalinos (SHAN-YANG; CHUN-SEN, 1989; YU, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; LAITINEN et al., 2013a).

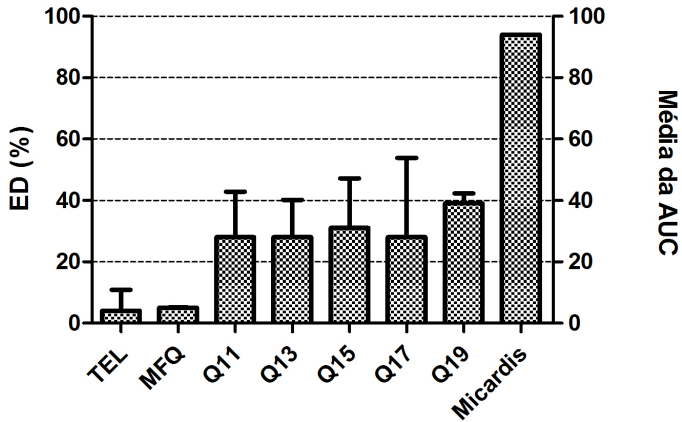
Os dados alusivo à eficiência de dissolução (ED) do fármaco, DS e MFQ em relação ao comprimido Micardis® estão ilustrados na Figura 46.

Como pode ser observado, as DS apresentaram melhora discreta na dissolução da TEL em relação a TEL puro e a MFQ. Contudo, todas as DS apresentaram valores de ED inferiores a 50%, sendo que não foram observadas diferenças significativas entre as formulações do Lote B.

Levando-se em consideração que as DS do Lote B apresentaram resultados insatisfatórios de dissolução, seu desempenho hipotensor e antihipertensivo não serão avaliados *in vivo*.



Figura 46: Comparativo da ED (%) do fármaco puro, MFQ e DS CQ (Lote B)



## 5 CONCLUSÕES

As DS contendo o carreador Alginato de sódio (Lote A) foram obtidas com sucesso, em diferentes proporções, através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas. Todas as formulações de DS apresentaram bons valores de rendimento e apresentaram-se amorfas ao final do processo de moagem, exceto as formulações A11 e A13, as quais apresentaram traços de cristalinidade confirmados através das técnicas de DRX, DSC, IV e MEV. Além disso, todas as DS demonstraram aumento na solubilidade aquosa em relação ao fármaco puro e também promoveram aumento na velocidade de dissolução da TEL em tampão fosfato monobásico pH 7.5 (ajustado com NaOH). Os resultados obtidos demonstraram ser influenciados pela proporção fármaco:carreador (sendo os melhores resultados observados para as formulações contendo maiores proporções do carreador AS) e da técnica de obtenção, a qual promoveu mudança na morfologia das DS.

Em contrapartida, as DS contendo o carreador cloridrato de quitosana (Lote B) apresentaram resultados insatisfatórios, uma vez que não apresentaram perfil de dissolução favorável. Estas foram obtidas através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas empregando diferentes proporções fármaco: carreador. Todas as formulações apresentaram bons valores de rendimento, teor e apresentaram-se amorfas ao final do processo de moagem. As formulações Q11 e Q13 apresentaram traços de cristalinidade, os quais foram confirmados através das técnicas de DRX, DSC, IV e MEV. Além disso,

todas as DS demonstraram êxito em aumentar a solubilidade aquosa da TEL em relação ao fármaco puro. Contudo, foi observado perfil de dissolução insatisfatório em tampão fosfato monobásico pH 7.5 (ajustado com NaOH) e ED indesejável, os quais estão diretamente relacionados com a biodisponibilidade do fármaco. Desse modo, análises *in vivo* não foram cogitadas, bem como o estudo de estabilidade para as DS do Lote B.

## **Capítulo VI**

### **Estudos de estabilidade dos complexos de inclusão e das dispersões sólidas de TEL**

---

## 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de dispersão sólida é um dos processos tecnológicos mais efetivos no aumento da taxa de dissolução/biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (SERAJUDDIN, 1999; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). Além disso, este sistema tem sido aplicado com sucesso na estabilização de fármacos amorfos com alta tendência a cristalização (HUANG; DAI, 2014). Contudo, a manutenção da estabilidade física de dispersões sólidas amorfas é considerado um dos maiores desafios no desenvolvimento de formulações farmacêuticas finais (GUO; SHALAEV; SMITH, 2013; JANSSENS; MOOTER, 2009). Tal fato deve-se a alta instabilidade intramolecular apresentada por compostos amorfos, os quais tendem a recristalização (SHAN-YANG; CHUN-SEN, 1989; YU, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; LAITINEN et al., 2013a). A recristalização de fármacos amorfos é preocupante, uma vez que pode alterar a taxa de dissolução e, conseqüentemente, reduzir a biodisponibilidade do fármaco contido no sistema (GUO; SHALAEV; SMITH, 2013). A conversão de fármacos amorfos para o estado cristalino pode ocorrer durante a produção, armazenagem ou dissolução de sólidos amorfos (LAITINEN et al., 2013b; AALTONEN; RADES, 2009; HANCOCK; PARKS, 2000).

A estabilização física de dispersões sólidas amorfas depende da formulação, do processo de fabricação e de diversos fatores como o controle da mobilidade molecular, interações intermoleculares entre o fármaco e o polímero, a viscosidade do polímero e temperatura de transição vítrea do sistema (BALANI et al., 2010; BHUGRA; PIKAL, 2008; CHOKSI et al., 2008). A formação de interações, como as ligações de hidrogênio entre o fármaco e o polímero, são capazes de aumentar a miscibilidade de dispersões sólidas e, dessa forma, a estabilidade de dispersões sólidas amorfas, sendo considerados os principais fatores para a inibição da cristalização (IVANISEVIC, 2010). Dispersões sólidas miscíveis são apontadas como redutores de mobilidade molecular do fármaco. Esse sistema consiste em uma única temperatura de transição vítrea (diferente do fármaco puro e carreador isolado), a qual é superior aquela observada para o fármaco isolado e, dessa forma, gera maior estabilidade ao sistema (IVANISEVIC, 2010; GUO; SHALAEV; SMITH, 2013; HANCOCK; PARKS, 2000).

Uma vez que a estabilização desses sistemas é desejável em produtos farmacêuticos, a avaliação da estabilidade física é necessária e deve ser acompanhada e otimizada durante o desenvolvimento farmacêutico (WATANABE et al., 2001).

Desse modo, os CIM (amorfo) e as DS de TEL do lote A, obtidas e caracterizadas nos capítulos IV e V, foram submetidas a estudos de estabilidade

---

a fim de avaliar possíveis recristalizações e degradações químicas durante o período de 90 dias. Todas as formulações foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As características físico-químicas como grau de cristalinidade e a tendência de recristalização das formulações moídas foram avaliadas utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X (XRPD). A Espectroscopia na região do infravermelho (IV), foi utilizada a fim de avaliar as possíveis interações químicas entre o fármaco e polímero.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Os complexos de inclusão molecular e as dispersões sólidas caracterizadas nos capítulos IV e V, respectivamente, foram armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Todas as amostras foram avaliadas durante o período de 90 dias, sendo os resultados comparados à caracterização realizada imediatamente após a obtenção das DS.

### 2.2 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

#### 2.2.1 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas de DSC do fármaco, carreadores, DS e as misturas físicas MFA e MFQ foram obtidas em célula Shimadzu DSC-60 utilizando cadinhos de alumínio abertos, com cerca de 2 mg de amostra, sob uma atmosfera dinâmica de  $N_2$  (velocidade de fluxo: 100 mL/min). A faixa de temperatura analisada foi de 30° C a 350° C com taxa de aquecimento de 10° C/min. Um cadinho de alumínio aberto vazio foi utilizado como referência. A célula de DSC foi calibrada com índio ( $T_{pico}$  156° C;  $\Delta H_{fusion} = 28,54$  J/g) e zinco ( $T_{pico}$  419° C). Os dados obtidos foram processados em *software* TA-60.

#### 2.2.2 Difração de Raios-X de pó

Os difratogramas do fármaco, carreadores, DS e as misturas físicas MFA e MFQ foram obtidos utilizando um  $\theta - \theta$  X-ray diffractometer (Xpert Pro Multi-Purpose Diffractometer, PanAnalytical) equipado com radiação de cobre  $K\alpha$  ( $\lambda = 1.5418$  Å) operando com corrente de 40 mA e voltagem de 45 kV, amostra giratória e um detector Real Time Multiple Strip (RTMS). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, varredura  $2\theta$  a partir de 4° a 50°, com 0.033 tamanho de passo e 19,7 segundos tempo do passo.

#### 2.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho do fármaco, carreadores, DS e as misturas físicas MFA e MFQ foram obtidos em aparelho PerkinElmer Spectrum, na faixa espectral de 4000-700  $cm^{-1}$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DA TELMISARTANA EM $\beta$ -CICLODEXTRINAS

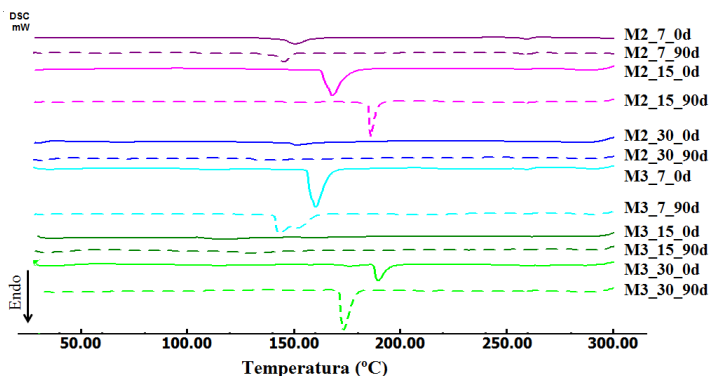
Todas as formulações foram submetidas aos estudos de estabilidade (CIM e DS) durante o período de 90 dias, exceto as DS do lote B, as quais não apresentaram resultados promissores. As formulações foram armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz. Não foram observadas modificações nas características organolépticas das formulações ao final do período de 90 dias. As características físico-químicas das formulações foram avaliadas através de técnicas do estado sólido no decorrer do estudo de estabilidade e, então, foram comparadas com seus respectivos resultados obtidos no tempo zero.

##### 3.1.1 DSC

As curvas de DSC referente aos CIM mantidos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz são mostradas na Figura 47.

Como pode ser observado, todas as formulações apresentaram alterações no perfil térmico, apresentando o evento de fusão em temperaturas inferiores ao tempo zero, sugerindo menor estabilidade termodinâmica em relação ao tempo zero (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001).

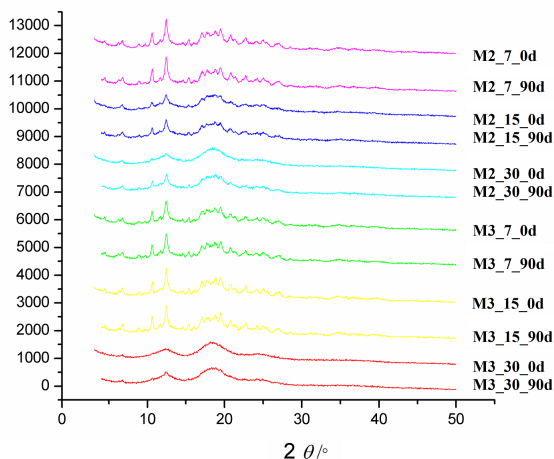
Figura 47: Curvas de DSC dos CIM em 0 e após 90 dias



### 3.1.2 DRX

O difratograma referente aos CIM, mantidos por 90 dias em temperatura ambiente e protegidas da luz está apresentado na Figura 48.

Figura 48: Difratogramas dos CIM em 0 e após 90 dias



Como pode ser observado, não houve mudança na cristalinidade de todas as formulações semicristalinas, as quais mantiveram os seus picos característicos estáveis após o período analisado. Contudo observou-se modificações na característica das formulações com maior grau de amorfização (M2\_30 e M3\_30), quando comparadas a sua característica inicial. Estas apresentaram o surgimento de picos onde eram encontrados inicialmente halos, sendo que M2\_30 demonstrou tendência mais pronunciada a recristalização do que M3\_30 ao final de 90 dias. Assim, M3\_30 demonstrou ser mais estável tanto por DRX, quanto por DSC, conforme mostrado anteriormente.

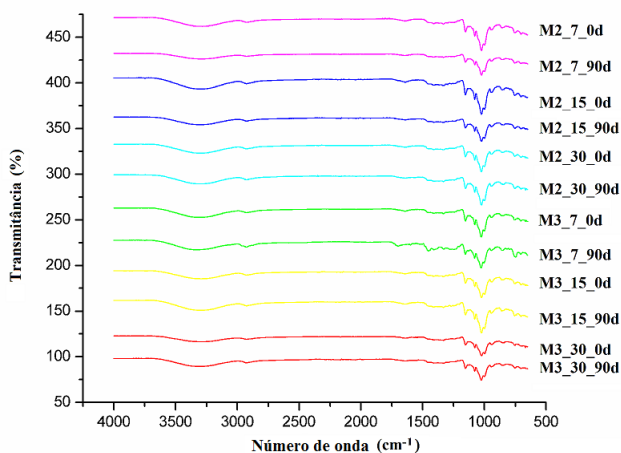
### 3.1.3 Espectroscopia na região do IV

O espectro de IV dos CIM após o período de 90 dias em temperatura ambiente e ao abrigo da luz estão apresentadas na Figura 49. Como pode ser observado, nenhuma das formulações apresentou deslocamento, aparecimento ou ausência de bandas características dos complexos em relação aos seus respectivos espectros de IV no tempo zero. Não houve aparecimento da banda característica do grupamento carbonila da TEL em  $1699\text{ cm}^{-1}$ , suge-



rindo que a ligação de hidrogênio se manteve estável entre hóspede e hospedeiro durante todo o período de tempo analisado. Neste contexto, pode-se afirmar que não houve modificações químicas entre hóspede e hospedeiro durante a armazenagem de todas as formulações em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. É importante ressaltar que os resultados obtidos por IV estão de acordo com os obtidos por DRX e DSC, demonstrando que os CIM obtidos e caracterizados no capítulo IV apresentam estabilidade química durante o período de armazenagem e nas condições analisadas.

Figura 49: Espectros de IV dos CIM em 0 e após 90 dias



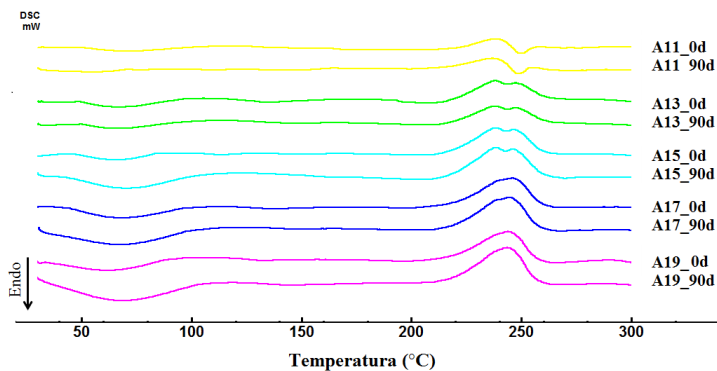
## 3.2 ANÁLISE DAS DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO ALGINATO DE SÓDIO (LOTE A)

### 3.2.1 DSC

As curvas de DSC referente às DS do lote A mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz são mostradas na Figura 50.

Como pode ser observado, não houveram alterações no perfil térmico das formulações do lote A das DS, sugerindo a manutenção da interação entre fármaco e carreador e suas características iniciais de amorfização. Observou-se apenas incremento no evento endotérmico referente a perda de água adsorvida, a qual já havia sido observada no perfil térmico das formulações em tempo zero.

Figura 50: Curvas de DSC as DS de AS em 0 e após 90 dias

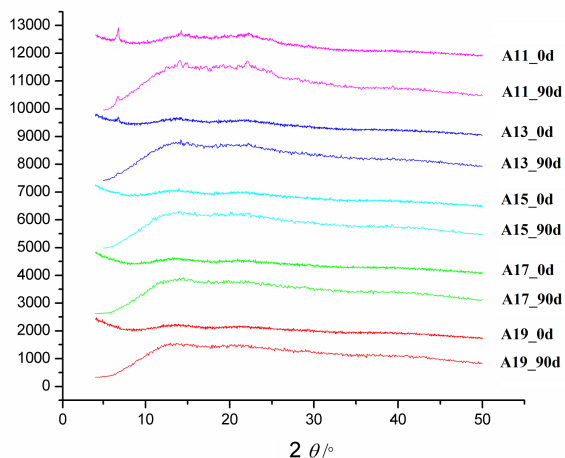


### 3.2.2 DRX

O difratograma das DS referentes ao lote A, mantidas por 90 dias em temperatura ambiente e protegidas da luz está apresentado na Figura 51. Como pode ser observado, todas as formulações apresentaram mudança na linha de base ao final de 90 dias, o qual pode estar relacionado a realização das análises de 90 dias em outro equipamento de DRX. Além disso, todas as DS do lote A não apresentaram alterações na cristalinidade quando comparadas a sua característica inicial. É possível observar sutis modificações no grau de amorfização da DS A11 e A13 ao final de 90 dias, contudo estas formulações exibiram traços de cristalinidade quando caracterizadas logo após a sua obtenção (presença do pico característico da TEL em  $2\theta 6.7^\circ$ ). Após o período de 90 dias foi observado um aumento tênue da característica cristalina nessas formulações, entretanto este aumento da cristalinidade não é considerado significativo. Assim, ficou demonstrado que a tecnologia de dispersão sólida foi empregada com sucesso na estabilização de fármacos com tendência a cristalização (estado mais estável). Vale ressaltar que os resultados obtidos nos estudos de estabilidade estão de acordo com diversos estudos descritos na literatura, os quais relatam que as DS são capazes de fornecer estabilidade física para fármacos na forma amorfa (HUANG; DAI, 2014; GUO; SHALAEV; SMITH, 2013; IVANISEVIC, 2010; LEUNER; DRESSMAN, 2000; SERAJUDDIN, 1999). Desse modo, pode-se inferir que o fármaco se manteve disperso na forma amorfa no carreador polimérico e que o AS desempenhou a função de inibidor da recristalização da TEL sob as condições analisadas, o qual é proporcional ao aumento de carreador na formulação. Vale ressaltar que a água adsorvida nas formulações observado pela técnica

de DSC não foi capaz de promover a recristalização destas durante o período de armazenamento avaliado. Assim, fica evidente que as condições de armazenamento das DS mantiveram as características físicas das DS do lote A.

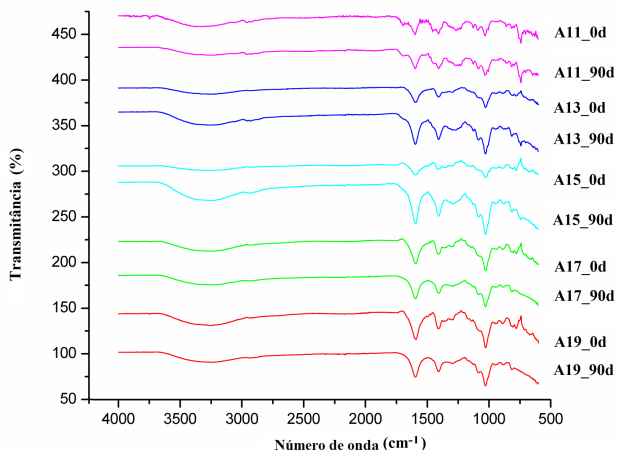
Figura 51: Digratogramas das DS de AS em 0 e após 90 dias



### 3.2.3 IV

O espectro de IV das DS após o período de 90 dias em temperatura ambiente e ao abrigo da luz são mostradas na Figura 52. Como pode ser observado, nenhuma das formulações apresentou o aparecimento da banda característica do grupamento carbonila da TEL em  $1699\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que a ligação de hidrogênio se manteve estável entre fármaco e carreador após o período de 90 dias. Neste contexto pode-se afirmar que não houve formação de interações químicas significativas entre hóspede e hospedeiro durante a armazenagem de todas as formulações de DS em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. É importante ressaltar que os resultados obtidos por IV estão de acordo com os obtidos por DRX e DSC, demonstrando que as DS obtidas e caracterizadas no capítulo V apresentam boa estabilidade física e química durante o período de armazenagem e nas condições analisadas.

Figura 52: Espectros de IV dos CIM em 0 e após 90 dias



#### 4 CONCLUSÕES

A avaliação da estabilidade dos CIM, mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz pelo período de 90 dias, demonstrou que os complexos de inclusão sofreram mudanças físicas com o passar do tempo, as quais puderam ser observadas pelas técnicas de DSC e DRX. Apesar de os CIM apresentarem uma sutil regressão no grau de amorfização, a análise de IV demonstrou que as ligações de hidrogênio entre hóspede e hospedeiro se mantiveram estáveis ao final dos estudos de estabilidade, conferindo estabilidade aos complexos.

As DS do lote A apresentaram-se estáveis fisicamente após o período de 90 dias em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As análises de DSC e DRX e IV demonstraram a preservação das características das formulações, não havendo modificações significativas na cristalinidade destas sob as condições analisadas. Foi observado a manutenção das ligações de hidrogênio entre fármaco e carreador nas DS do lote A, mantendo a característica das DS durante os 90 dias.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Primeiramente, a matéria prima da TEL foi avaliada quanto as suas propriedades físico-químicas, tais como a sua solubilidade, velocidade de dissolução intrínseca, pureza e forma cristalina a fim de assegurar a qualidade da matéria prima adquirida. Através da caracterização da TEL foi possível confirmar a identidade do fármaco e características importantes, como o grau de pureza (96%) e a sua forma polimórfica, a qual está relacionada com a forma A, considerada a forma mais estável da TEL.

Uma vez confirmada a identidade do fármaco, desenvolveu-se métodos analíticos quantitativos para a determinação da TEL matéria prima e do comprimido referência de TEL (Micardis<sup>®</sup>) através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectroscopia na região do ultravioleta (UV). Em ambas as técnicas a TEL matéria prima demonstrou estabilidade aceitável em solução de metanol, água e fase móvel durante o período de até 7.0 dias. Ambos os métodos foram desenvolvidos e validados de acordo com as recomendações da *Internacional Conference on Harmonization*, sendo considerados específicos, lineares, precisos, exatos e robustos. Assim, os métodos validados foram considerados boas alternativas para a quantificação da TEL e para o controle de qualidade de rotina da TEL matéria-prima e comprimidos Micardis<sup>®</sup>. Posteriormente, os métodos analíticos foram revalidados com o objetivo de quantificar o fármaco nos sistemas desenvolvidos: complexos de inclusão molecular em  $\beta$ -ciclodextrinas (CIM) e dispersões sólidas (DS).

Complexos de inclusão da TEL em  $\beta$ -ciclodextrinas (BCD) foram obtidos em diferentes proporções 1:2 e 1:3 (fármaco: $\beta$ -ciclodextrina) através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas após o período de 30 minutos. A estequiometria dos CIM foi confirmada através do estudo de solubilidade de fases e do método de variação contínua como sendo de ordem superior a 1:1(m/m), ou seja, complexos de TEL:BCD nas proporções 1:2 ou 1:3. Através da caracterização dos CIM em estado sólido observou-se incremento no caráter amorfo das formulações em função do tempo de moagem, onde as formulações moídas por 7 e 15 minutos se mostraram semicristalinas, enquanto aquelas moídas por 30 minutos apresentaram-se amorfas com apenas halos de cristalinidade. Foram observadas ligações de hidrogênio entre hóspede e hospedeiro, tanto pela técnica de infravermelho, quanto pelos estudos de modelagem molecular. As formulações apresentaram-se aglomeradas e com formas e tamanhos irregulares através das fotomicrografias.

Todos os CIM promoveram aumento na velocidade de dissolução *in vitro* da TEL em relação ao fármaco puro e a mistura física, sendo os melhores resultados observados para as formulações submetidas a maiores tempos

de moagem (M2\_30 e M3\_30). Os complexos M2\_30 e M3\_30 apresentaram perfil de dissolução e eficiência de dissolução (ED) promissores e muito próximos ao encontrado para os comprimidos referência da TEL, mesmo se tratando de sistemas, os quais ainda necessitam de formas farmacêuticas finais para serem administrados.

Os estudos *in vivo* demonstraram que todas as formulações M2\_30, M3\_30 e M0\_15 apresentaram efeito anti-hipertensivo rápido e eficaz frente a angiotensina II durante a totalidade do experimento e estatisticamente significativo em relação ao fármaco puro e ao controle nos primeiros 30 minutos. Em contrapartida, o fármaco puro começou a expressar efeito anti-hipertensivo estatisticamente significativo em relação ao controle apenas após o período de 120 min. Assim, fica evidente que as formulações avaliadas apresentaram melhor solubilidade/biodisponibilidade no trato gastrointestinal e, conseqüentemente, efeito anti-hipertensivo estatisticamente mais rápido em relação ao fármaco puro na primeira meia hora, período crítico na absorção do fármaco. Assim, todas as formulações são extremamente vantajosas, uma vez que desempenham melhor efeito terapêutico em relação ao fármaco puro.

A formulação M2\_30 foi considerada a melhor formulação dentre os complexos de inclusão molecular em  $\beta$ -ciclodextrinas. Esta formulação, além de apresentar resultados semelhantes a M3\_30 e M0\_15, destaca-se em relação a M3\_30 por apresentar menor quantidade de BCD na sua formulação e, dessa forma, viabiliza a produção de comprimidos de mesma eficácia, mais econômicos e de tamanho e peso reduzidos. Em relação a M0\_15 (TEL pura na forma amorfa, sem adição de excipiente), M2\_30 tende a apresentar melhor estabilidade física e, conseqüentemente, a manutenção das suas características biofarmacêuticas, devido a capacidade de excipientes/CIM em inibir a recristalização de compostos amorfos.

As dispersões sólidas de TEL foram obtidas em dois lotes, denominados lote A e lote B. O Lote A foi formado por 5 formulações com diferentes proporções fármaco:alginate de sódio (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9), enquanto o lote B foi formado por 5 formulações com diferentes proporções fármaco:cloridrato de quitosana (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9). Ambos os lotes foram obtidos através da técnica de ativação mecânica em moinho de bolas, sem adição de solvente e moídas pelo período de 45 minutos. Estas apresentaram-se amorfas, com interações de hidrogênio formadas entre fármaco e carreador. Apenas as DS A11 e A13 apresentaram traços de cristalinidade. Todas as DS promoveram aumento na velocidade de dissolução *in vitro* da TEL em relação ao fármaco puro e as misturas físicas MFA e MFQ, tendo os melhores resultados observados para o lote A.

Os melhores resultados do lote A foram observados para as formula-

ções contendo maiores proporções do carreador alginato de sódio (A15, A17 e A19), onde estas foram capazes de aumentar a solubilidade aquosa da TEL em aproximadamente 1.600%, além de promover mais de 80% de liberação da TEL em apenas 30 minutos em ensaio de dissolução *in vitro*. Estas apresentaram perfil de dissolução e eficiência de dissolução promissores e muito próximos ao encontrado para os comprimidos referência da TEL, mesmo se tratando de sistemas, os quais ainda necessitam de formas farmacêuticas finais para serem administrados. Todas as DS do lote B apresentaram-se amorfas e expressaram ligações de hidrogênio entre fármaco e carreador, exceto as formulações Q11 e Q13, as quais apresentaram traços de cristalinidade. O lote B também demonstrou bons valores de rendimento, teor e aumentou com sucesso a solubilidade aquosa da TEL. A formulação Q19 foi capaz de aumentar a solubilidade aquosa da TEL em 3.911%. Contudo, as DS contendo cloridrato de quitosana apresentaram perfil de dissolução insatisfatório em tampão fosfato monobásico pH 7.5 (ajustado com NaOH) e ED indesejável, limitando a biodisponibilidade do fármaco. Os excelentes resultados em termos de solubilidade, dissolução e ED observados para as DS A15 foram determinantes na escolha desta como a melhor formulação dentre as DS. Esta formulação, além de apresentar resultados semelhantes a A17 e A19 é considerada vantajosa por apresentar menor quantidade de AS em sua formulação, viabilizando a produção de comprimidos de mesma eficácia, mais econômicos e de tamanho e peso reduzidos.

Todas as formulações foram submetidas aos estudos de estabilidade (CIM e DS) durante o período de 90 dias, exceto as DS do lote B, as quais não apresentaram resultados promissores. As formulações foram armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz. Não foram observadas modificações nas características organolépticas das formulações ao final do período de 90 dias. As características físicas das formulações foram avaliadas através de técnicas do estado sólido no decorrer do estudo de estabilidade e comparadas com seus respectivos resultados obtidos no tempo zero. Os CIM demonstraram mudanças físicas ao final de 90 dias, contudo as ligações de hidrogênio entre hóspede e hospedeiro se mantiveram estáveis ao final dos estudos de estabilidade, conferindo estabilidade aos complexos. As DS do lote A apresentaram-se estáveis fisicamente após o período de 90 dias, sendo demonstrado a manutenção das ligações de hidrogênio entre fármaco e carreador durante os 90 dias.

Neste contexto, pode-se concluir que todas as formulações desenvolvidas alcançaram o objetivo inicial de aprimorar as características biofarmacêuticas da TEL, sendo que os excelentes resultados obtidos na velocidade de dissolução, eficiência de dissolução e, principalmente, o efeito anti-hipertensivo *in vivo* demonstrado para M2\_30 foram decisivos na escolha desta como a

melhor formulação dentre todas as formulações obtidas. Além disso, os dois sistemas demonstraram eficiência de dissolução semelhantes ao medicamento referência e dissolução pH independente, os quais estão relacionados apenas com a formação de CIM e DS amorfas de TEL. Dessa forma, estes sistemas distintos são considerados promissores, inovadores, viáveis e muito vantajosos por permitirem, ainda, o aperfeiçoamento do perfil de dissolução durante o desenvolvimento da forma farmacêutica final.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AALTONEN, J.; RADES, T. Towards physico-relevant dissolution testing: the importance of solid-state analysis in dissolution. *Dissolution Technologies*, v. 16, p. 47–54, 2009.
- AIGNER, Z. et al. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl-beta-cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Elsevier B.V., v. 57, p. 62–7, jan. 2012. ISSN 1873-264X.
- AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research.*, v. 12, p. 413–420, 1995.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 6 ed.. ed. São Paulo: [s.n.], 2000.
- ARAUJO, M. V. G. de et al. Characterization, phase solubility and molecular modeling of alpha-cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 72, n. 1, p. 165–70, 2009.
- ASBAHR, A. C. C. et al. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HPbetaCD and polymers: preparation and characterization. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 17, n. 7, p. 2718–23, abr. 2009. ISSN 1464-3391. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282187>>.
- AULTON, M. E. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. 2 ed.. ed. London: Churchill Livingstone, 2001. 704 p.
- BALANI, P. N. et al. Influence of polymer content on stabilizing milled amorphous salbutamol sulphate. *International journal of pharmaceuticals*, v. 391, n. 1-2, p. 125–136, 2010. ISSN 1873-3476.
- BARZEGAR-JALALI, M. et al. Cogrinding as an approach to enhance dissolution rate of a poorly water-soluble drug (gliclazide). *Powder Technology*, Elsevier B.V., v. 197, n. 3, p. 150–158, 2010. ISSN 00325910.
- BHUGRA, C.; PIKAL, M. J. Role of thermodynamic, molecular, and kinetic factors in crystallization from the amorphous state. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 97, p. 1329–1349, 2008.
- BRASIL. *Farmacopéia Brasileira*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA. *Telmisartan monograph*. I e ii. London: The Department of Health, 2012. 1–5 p.

BRITTAIN, H. G. Polymorphism and solvatomorphism. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 3611–3636, 2008.

BROWNLEE, I. A. et al. Applications of Alginates in Food. *Microbiology Monographs*, v. 13, p. 211–228, 2009.

BUCKLEY, K.; MATOUSEK, P. Recent advances in the application of transmission Raman spectroscopy to pharmaceutical analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Elsevier B.V., v. 55, n. 4, p. 645–52, jun. 2011. ISSN 1873-264X.

CAGIGAL, E. et al. pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 26, p. 477–486, 2001. ISSN 0731-7085.

CAI, Z.-s. et al. Preparation and characterization of ortho-biguanidinyl benzoyl chitosan hydrochloride and its antibacterial activities. *Polymer Bulletin*, v. 70, p. 1085–1096, 2012. ISSN 0170-0839.

CARRIER, R. L.; MILLER, L. a.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 123, n. 2, p. 78–99, nov. 2007. ISSN 1873-4995.

CERVERA, M. F. et al. Effects of spray drying on physicochemical properties of chitosan acid salts. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, n. 2, p. 637–649, 2011. ISSN 1530-9932.

CHOKSI, R. J. et al. Stabilization of low glass transition temperature indomethacin formulations: impact of polymer type and its concentration. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 97, p. 2286–2298, 2008.

CROWLEY, K. J.; ZOGRAFI, G. Cryogenic grinding of indomethacin polymorphs and solvates: assessment of amorphous phase formation and amorphous phase physical stability. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 91, p. 492–507, 2002.

CSD. Cambridge Structural Database. *The Cambridge Crystallographic Data Centre*. 2000.

DEL VALLE, E. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1033–1046, 2004.

DESTRO, M. et al. Telmisartan: just an antihypertensive agent? A literature review. v. 12, p. 2719–2735, 2011.

DINNEBIER, R. E. et al. Structural characterization of three crystalline modifications of telmisartan by single crystal and high-resolution X-ray powder diffraction. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 89, n. 11, p. 1465–1479, nov. 2000.

DUKECK, R.; SIEGER, P.; KARMWAR, P. Investigation and correlation of physical stability, dissolution behaviour and interaction parameter of amorphous solid dispersions of telmisartan: a drug development perspective. *European journal of pharmaceutical sciences*, Elsevier B.V., v. 49, n. 4, p. 723–31, jul. 2013. ISSN 1879-0720.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Chitosan hydrochloride - monograph. *European Pharmacopoeia 5.0*, p. 1248–1249, 2005.

FELIX, F. S. et al. Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 95, n. 3, p. 877–880, ago. 2008. ISSN 1388-6150.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3 ed.. ed. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2003. 29–65 p.

GACESA, P. Alginates. *Carbohydrate polymers*, v. 8, p. 161–182, 1988.

GALZERANO, D. et al. New standards in hypertension and cardiovascular risk management: focus on telmisartan. *Vascular Health and Risk Management*, v. 6, p. 113–133, 2010.

GANGOLA, R.; KAUSHIK, S.; SHARMA, P. Spectrophotometric Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Telmisartan in Combined Dosage Form. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 01, p. 46–49, 2011.

GENARO, A. R. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20. ed. London: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 2077 p.

GENARO, A. R. *Remington: The science and practice of pharmacy*. 21. ed. London: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 2393 p.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 114, n. 1, p. 1–14, ago. 2006. ISSN 0168-3659.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, v. 380, p. 123–151, 2001.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. Anti-hipertensivos e terapias farmacológica da hipertensão. In: *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2005. p. 674–675.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. 11 ed.. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2008.

GOROG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 48, n. 2, p. 247–53, set. 2008. ISSN 0731-7085.

GOSSE, P. A. A review of telmisartan in the treatment of hypertension: blood pressure control in the early morning hours. *Journal of Vascular Health and Risk Management*, v. 2, p. 195–201, 2006.

GOYAL, S. et al. Myocardial salvaging effect of telmisartan in experimental model of myocardial infarction. *European journal of pharmacology*, Elsevier B.V., v. 619, n. 1-3, p. 75–84, out. 2009. ISSN 1879-0712.

GRASSI, G.; QUARTI-TREVANO, F.; MANCIA, G. Review: Cardioprotective effects of telmisartan in uncomplicated and complicated hypertension. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, v. 9, p. 66–74, 2008.

GUINESI, L. S. et al. Adsorção de íons cobre (II) pela quitosana usando coluna em sistema sob fluxo hidrodinâmico. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 809–814, 2007.

GUO, Y.; SHALAEV, E.; SMITH, S. Physical stability of pharmaceutical formulations : solid-state characterization of amorphous dispersions. *Trends in Analytical chemistry*, v. 49, p. 137–144, 2013.

GUPTA, A.; CHARDE, R. M.; CHARDE, M. S. Determination of Telmisartan and forced degradation behavior by RP-HPLC in tablet dosage form. *Journal of Pharmacy Research*, v. 4, p. 1270–1273, 2011.

HANCOCK, B. C.; PARKS, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceutical. *Pharmaceutical Research.*, v. 17, p. 397–404, 2000.

- HE, D. et al. Molecular encapsulation of rifampicin as an inclusion complex of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Design; characterization and in vitro dissolution. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, v. 103, p. 580–585, 2013.
- HIGUCHI, T.; CONNORS, K. Phase solubility techniques. *Advances in analytical chemistry and instrumentation*, v. 4, p. 117–212, 1965.
- HINOI, T. et al. Telmisartan, an Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker, Improves Coronary Microcirculation and Insulin Resistance among Essential Hypertensive Patients without Left Ventricular Hypertrophy. *Hypertension Research*, v. 31, p. 615–622, 2008.
- HUANG, L.-F.; TONG, W.-Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Advanced drug delivery reviews*, v. 56, n. 3, p. 321–34, fev. 2004. ISSN 0169-409X.
- HUANG, R. Y. M.; PAL, R.; MOON, G. Y. Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures. *Journal of Membrane Science*, v. 160, n. 1, p. 101–113, 1999. ISSN 03767388.
- HUANG, Y.; DAI, W.-g. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 4, p. 18–25, 2014.
- ICH. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2(R1). *Validation of Analytical procedures: text and methodology*, 2005.
- ICH. *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology (Q2R1)*. Geneva: International Conference Harmonization, 2006. 1–15 p.
- ILLUM, L. Chitosan and its pharmaceutical use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 1326–1331, 1998.
- 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, p. 6–13, 2011.
- IVANISEVIC, I. Physical stability studies of miscible amorphous solid dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 9, p. 4005–4012, 2010.
- JANSSENS, S.; MOOTER, G. V. den. Review: physical chemistry of solid dispersions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, p. 1571–1586, 2009.

JOB, P. Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution et sur leur stabilité. *Annales de Chimie*, v. 9, p. 113–203, 1928.

JUN, S. W. et al. Cefuroxime axetil solid dispersions prepared using solution enhanced dispersion by supercritical fluids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 57, p. 1529–1537, 2005.

KAKUTA, H. et al. Telmisartan has the strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor: comparison with other angiotensin II type 1 receptor blockers. *International Journal of Clinical Pharmacology*, v. 25, p. 41–46, 2005.

KANE, R. N.; KUCHEKAR, B. S. Preparation, physicochemical characterization, dissolution and formulation studies of telmisartan cyclodextrin inclusion complexes. *Asian Journal of Pharmaceutics*, v. 4, p. 52–59, 2010.

KAUSALYA, J. et al. Solubility and Dissolution Enhancement Profile of Telmisartan using various techniques. *International Journal of pharmTech research*, v. 3, n. 3, p. 1737–1749, 2011.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. *International journal of pharmaceutics*, v. 410, p. 1–10, 2011.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. The concept of dissolution efficiency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 27, p. 48–49, 1975.

KIM, E.-J. et al. Preparation of a solid dispersion of felodipine using a solvent wetting method. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 64, p. 200–205, 2006. ISSN 0939-6411.

KOTHAWADE, S. N. et al. Formulation and characterization of telmisartan solid dispersions. *International Journal of PharmTech Research*, v. 2, n. 1, p. 341–347, 2010.

KUMAR, A. S. et al. An improved synthesis of Telmisartan: an antihypertensive drug. *Arkivoc*, p. 247–254, 2009.

LAITINEN, R. et al. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. *International journal of pharmaceutics*, Elsevier B.V., v. 453, n. 1, p. 65–79, 2013. ISSN 1873-3476.

LAITINEN, R. et al. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. *International journal of pharmaceutics*, Elsevier B.V., v. 453, p. 65–79, 2013. ISSN 1873-3476.

- LEPEK, P. et al. Effect of amorphization method on telmisartan solubility and the tableting process. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, Elsevier B.V., v. 83, n. 1, p. 114–21, jan. 2013. ISSN 1873-3441.
- LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 50, p. 47–60, 2000. ISSN 0939-6411.
- LIM, R. T. Y.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Dissolution enhancement of indomethacin via amorphization using co-milling and supercritical coprecipitation processing. *Powder Technology*, Elsevier B.V., v. 240, p. 79–87, maio 2013. ISSN 00325910.
- LIN, H.-L. et al. Mechanical grinding effect on thermodynamics and inclusion efficiency of loratadine: cyclodextrin inclusion complex formation. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 1, p. 512–517, jan. 2012. ISSN 01448617.
- LIN, S.-Y.; HSU, C.-H.; SHEU, M.-T. Curve-fitting FTIR studies of loratadine and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex induced by co-grinding process. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 53, n. 3, p. 799–803, nov. 2010. ISSN 1873-264X.
- LINDON, J. C.; NICHOLSONA, J. K.; WILSON, I. D. Directly coupled HPLC NMR and HPLC NMR MS in pharmaceutical research and development. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 748, p. 233–258, 2000.
- LOBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 50, p. 3–12, 2000.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. ESQUEMA PARA INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO Wilson Araújo Lopes\* e Miguel Fascio. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.
- MARASINI, N. et al. Fabrication and evaluation of pH-modulated solid dispersion for telmisartan by spray-drying technique. *International journal of pharmaceuticals*, v. 441, n. 1-2, p. 424–32, jan. 2013. ISSN 1873-3476.
- MARTINDALE, S. S. C. *The Complete Drug Reference. Thomson Reuters Micromedex®2.0 (Healthcare Series)*. 2013. Disponível em: <[http://www-thomsonhc-com.ez46.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian/ND/T/evidencexpert/ND\\_PR/evidencexpert/CS/294703/ND/](http://www-thomsonhc-com.ez46.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian/ND/T/evidencexpert/ND_PR/evidencexpert/CS/294703/ND/)>

\_AppProduct/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/0D7E80/ND\_PG/evidencexpert/ND\_B/evidencexpert/ND\_P/evidencexpert/PFActionId/evidencexpert.IntermediateToDocumentLink?docId=17450-x&contentSetId=30&title=Telmisartan&servicesTitle=Telmisartan&topicId=null)>.

MAXIMIANO, F. P. et al. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. *Química Nova*, v. 33, n. 8, p. 1714–1719, 2010.

MCCARTY, R. Stress, Behavior and Experimental Hypertension. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 7, p. 493–502, 1983.

MURAKAMI, F. S. et al. Comparative behavior studies of cinnamic acid using isothermal and nonisothermal kinetic methods. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 43, p. 716–720, 2009.

MURPHY, T. E. G. K.; Sudha Purna, T. S. S. R.; VIJAYAKUMAR, G. Studies on dissolution rate enhancement of telmisartan with hydroxy propyl beta-cyclodextrin complexes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 1, n. 2, p. 73–85, 2011.

MUZZARELLI, R. A. A. *Natural Chelating Polymers: Alginate Acid, Chitin and Chitosan*. 1. ed. Oxford: Pergamon Press, 1973. 254 p.

NAKAMURA, K. et al. TMA measurement of swelling behavior of polysaccharide hydrogels. *Thermochimica Acta*, v. 352-352, p. 171–176, 2000.

PARK, J. et al. Solubilization of the poorly water soluble drug, telmisartan, using supercritical anti-solvent (SAS) process. *International journal of pharmaceuticals*, Elsevier B.V., v. 441, n. 1-2, p. 50–5, jan. 2013. ISSN 1873-3476.

PATIL, K. R. et al. A Stability-Indicating LC Method for the Simultaneous Determination of Telmisartan and Ramipril in Dosage Form. *Chromatographia*, v. 67, n. 7-8, p. 575–582, fev. 2008. ISSN 0009-5893. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-008-0550-5>>.

PRABHU, C. et al. Determination of telmisartan by HPTLC - A stability indicating assay. *Journal of Planar Chromatography*, v. 6, p. 477–481, 2007.

RANG, H. P. et al. *Rang e Dale Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829 p.

RAO, R. N. et al. Development of a validated liquid chromatographic method for determination of related substances of telmisartan in bulk drugs and formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Elsevier B.V., v. 56, n. 3, p. 471–8, nov. 2011. ISSN 1873-264X.



- RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, A. N. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 1026–1031, 2007.
- RIBEIRO, J. M.; FLORÊNCIO, L. P. Bloqueio farmacológico do sistema renina- angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 7, p. 293–302, 2000.
- RIBEIRO, L. et al. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether beta-cyclodextrin binary and ternary complexes. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, v. 51, n. 8, p. 914–22, ago. 2003. ISSN 0009-2363.
- ROSCA, C. et al. Interaction of chitosan with natural or synthetic anionic polyelectrolytes. 1. The chitosan-carboxymethylcellulose complex. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 35–41, 2005. ISSN 01448617.
- SAETHER, H. V. et al. No Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 813–821, 2008.
- SAHU, K.; SAHU, S. Comparative Study of Forced Degradation Behavior of Telmisartan by UPLC and HPLC and Development of Validated Stability Indicating Assay Method According to ICH Guidelines. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, v. 03, n. 03, 2012. ISSN 21577064.
- SEGATO, M. P. *Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalino-terrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio*. 111 p. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2007.
- SEHIĆ, S. et al. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. *International journal of pharmaceuticals*, v. 386, n. 1-2, p. 77–90, 2010. ISSN 1873-3476.
- SERAJUDDIN, A. T. M. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 88, p. 1058–1066, 1999. ISSN 0022-3549.
- SERAJUDIDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, p. 613–616, 2007.
- SHAH, R. P.; SINGH, S. Identification and characterization of a photolytic degradation product of telmisartan using LC-MS/TOF, LC-MSn, LC-NMR and on-line H/D exchange mass studies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Elsevier B.V., v. 53, n. 3, p. 755–61, nov. 2010. ISSN 1873-264X.

SHAN-YANG, L.; CHUN-SEN. The effect of mechanical grinding on the formation and crystallinity changes of the inclusion complex of acetaminophen and beta-cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, v. 7, p. 477–479, 1989.

SHEN, J. et al. HPLC determination of telmisartan in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Pharmazie*, v. 60, p. 418–420, 2005.

SIGNINI, R.; Campana Filho, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. *Polímeros: ciência e tecnologia*, v. 8, n. 4, p. 63–98, 1998. ISSN 0104-1428.

SILVA, H. S. R. C.; KATIA, S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776–785, 2006.

SIMASAKI, M. et al. Pharmacokinetics of 14c-telmisartan. Absorption, distribution, and protein binding of 14c-telmisartan after a single oral administration to rats. *Drug metabolism pharmacokinetics*, v. 14, p. 425–431, 1999.

SINHA, S. K.; SHRIVASTAVA, P. K.; SHRIVASTAVA, S. K. Development and validation of a HPLC method for the simultaneous estimation of amlodipin and telmisartan in pharmaceutical dosage form. *Asian Pacific Journal of Tropical biomedicine*, v. 2, p. 312–315, 2012.

SOARES, J. P. et al. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, v. 29, n. 2, p. 53–56, 2004.

SOARES, M. F. L. R. et al. Métodos de Determinação do Ornidazol em Comprimidos Revestidos: Desenvolvimento, Validação e Comparação Estatística. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, p. 688, 2008.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 17, p. 64, 2010.

STEWART, P. J. J. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *Journal of Computational Chemistry*, v. 10, n. 2, p. 209–220, 1989.

STEWART, P. J. J. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *Journal of Molecular Modeling*, v. 19, n. 1, p. 1–32, 2013.

STORPIRTIS, S.; CHANG, C.; GONCALVES, J. E. *Biofarmacotécnica*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 352 p.

- SUKOR, N. Endocrine hypertension - Current understanding and comprehensive management review. *European Journal of Internal Medicine*, v. 22, p. 433–440, 2011.
- TABLET, C.; MATEI, I.; HILLEBRAND, M. The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods : Possibilities and Limitations. *Stoichiometry and Research - The importance of Quantity in Biomedicine*, InTech, v. 9, p. 47–76, 2012.
- TRAN, P. H. L.; TRAN, H. T. T.; LEE, B.-J. Modulation of microenvironmental pH and crystallinity of ionizable telmisartan using alkalizers in solid dispersions for controlled release. *Journal of controlled release*, v. 129, n. 1, p. 59–65, jul. 2008. ISSN 1873-4995.
- USP. *THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA*. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- USP. Material Safety Data Sheet 12601. *USP United States Pharmacopoeia*, p. 1–6, 2011.
- USP. Revision Bulletin - Telmisartan Tablets. *United States Pharmacopoeia*, p. 2–3, 2011.
- USP. *THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA*. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.
- VANKEIRSBILCK, T. et al. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 21, p. 869–877, 2002.
- VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*, v. 12, p. 1068–1075, 2007.
- VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. *As ciclodextrinas em tecnologia Farmacêutica*. 1. ed. Coimbra: MinervaCoimbra, 2006. 226 p.
- WANKHEDE, S. B. et al. RP-HPLC method for simultaneous estimation of telmisartan and hydrochlorothiazide in tablet dosage form. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, v. 69, p. 298–300, 2007.
- WATANABE, T. et al. Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 226, p. 81–91, 2001.
- WIENEN, W. et al. A Review on Telmisartan: A Novel, Long-Acting Angiotensin II-Receptor Antagonist. *Cardiovascular Drug Reviews*, v. 18, p. 127–154, 2000.

WONG, T. W. et al. Design of Controlled-Release Solid Dosage Forms of Alginate and Chitosan Using Microwave. *Journal of Controlled Release*, v. 84, p. 99–114, 2002.

YEOM, C. K.; LEE, K. H. Characterization of sodium alginate membrane crosslinked with glutaraldehyde in pervaporation separation. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 67, p. 209–219, 1998.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Review, Advanced Drug Delivery*, v. 48, p. 27–42, 2001.

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, fev. 2004. ISSN 03785173.

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. 102–6, set. 2009. ISSN 1873-3441.

ZHANG, Y. et al. Inclusion of telmisartan in mesocellular foam nanoparticles: drug loading and release property. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, Elsevier B.V., v. 76, n. 1, p. 17–23, set. 2010. ISSN 1873-3441.

ZHANG, Y. et al. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. *Journal of controlled release*, Elsevier B.V., v. 145, n. 3, p. 257–63, 2010. ISSN 1873-4995.

ZHONG, L. et al. Dissolution properties and physical characterization of telmisartan-chitosan solid dispersions prepared by mechanochemical activation. *AAPS PharmSciTech*, v. 14, n. 2, p. 541–50, jun. 2013. ISSN 1530-9932.