

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

PAOLA FELIPPI COELHO

**POTENCIAL DO CLORIDRATO DE QUITOSANA COMO
INIBIDOR DA PRECIPITAÇÃO DO RITONAVIR**

Florianópolis
2019

Paola Felippi Coelho

**POTENCIAL DO CLORIDRATO DE QUITOSANA COMO
INIBIDOR DA PRECIPITAÇÃO DO RITONAVIR**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Bianca Ramos
Pezzini
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª Hellen
Karine Stulzer Koerich

Florianópolis
2019

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

Coelho, Paola Felippi

POTENCIAL DO CLORIDRATO DE QUITOSANA COMO
INIBIDOR DA PRECIPITAÇÃO DO RITONAVIR/ Paola Felippi Coelho.
Florianópolis, 2019. 103 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia,
2019.

1.Farmácia. 2. Fármacos de baixa solubilidade. 3.Supersaturação. 4.
Ritonavir. 5. Cloridrato de Quitosana

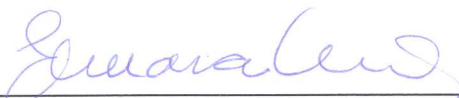
**“POTENCIAL DO CLORIDRATO DE QUITOSANA
COMO INIBIDOR DA PRECIPITAÇÃO DO
RITONAVIR”**

POR

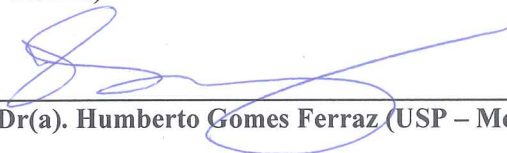
Paola Felippi Coelho

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

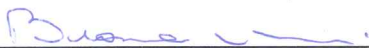
Banca Examinadora:



**Prof(a). Dr(a). Elenara Maria Teixeira Lemos Senna (UFSC –
Membro Titular)**



Prof(a). Dr(a). Humberto Gomes Ferraz (USP – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Bianca Ramos Pezzini (UFSC – Orientador(a))



**Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 27 de março de 2019.

Dedico esse trabalho a todos
os interessados na temática.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos, à UFSC por me receber, à minha mãe por todo o incentivo e suporte ao meu desenvolvimento profissional. Também aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia que de forma direta ou indireta contribuíram com o desenvolvimento desse projeto e pelos conhecimentos que compartilhamos nesses dois anos. E, por fim, agradeço aos meus amigos.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial do cloridrato de quitosana (CQ) como inibidor da precipitação do ritonavir (RTV), em comparação ao polímero polivinilpirrolidona vinil acetato (PVP-VA), empregando o método *solvent-shift*. Em uma etapa preliminar, uma dispersão sólida (DS) de RTV (polimorfo I) em CQ foi preparada e submetida à caracterização do estado sólido (TG, DSC, DRXP, FTIR), que indicou a amorfização parcial do fármaco, com uma fase cristalina remanescente; o CQ e o RTV I apresentaram miscibilidade; e não houve a formação de pontes de hidrogênio entre o fármaco e polímero. O ensaio de dissolução da DS em condições não *sink* foi empregado para confirmar se o fármaco seria adequado para a avaliação da atividade antiprecipitante do polímero. A DS gerou um estado de supersaturação que foi mantido até o final do ensaio, sugerindo que o CQ atuou como agente antiprecipitante e confirmando que o RTV poderia ser utilizado como fármaco modelo. Então, a solubilidade de equilíbrio do RTV II (polimorfo mais estável) e a solubilidade amorfa do fármaco foram determinadas em meios previamente selecionados (solução HCl 100 mM pH 2,2, tampão acetato pH 4,0 e 5,8, com e sem CQ e PVP-VA previamente dissolvidos). Os efeitos do CQ em soluções supersaturadas de RTV foram avaliados pelo método *solvent-shift*, em comparação ao PVP-VA, para a quantificação da atividade antiprecipitante e avaliação do tamanho e morfologia da fase coloidal formada. O CQ mostrou superioridade em comparação ao PVP-VA nos meios com pH 2,2 e 4,0, em que o fármaco estava parcialmente ionizado e não ionizado, respectivamente, quanto a atividade antiprecipitante. A análise de tamanho da fase coloidal do RTV mostrou que na presença do CQ, estas estruturas se formam com um tamanho maior do que na presença do PVP-VA e sem a presença dos polímeros. O impedimento da coalescência dos coloides de fármaco não foi observado em nenhum meio. A análise de microscopia de luz polarizada mostrou que o precipitado formado a partir da coalescência dessas estruturas foi amorfo em meio aquoso contendo CQ, e cristalino no meio com PVP-VA e na água.

Palavras-chave: Ritonavir. Cloridrato de quitosana. Supersaturação.

POTENTIAL OF CHITOSAN HYDROCHLORIDE AS PRECIPITATION INHIBITOR OF RITONAVIR

ABSTRACT

The goal of the present study was to evaluate the potential of chitosan hydrochloride (CH) as a precipitation inhibitor of ritonavir (RTV), in comparison to the polymer polyvinylpyrrolidone vinyl acetate (PVP-VA), using the solvent-shift method. In a preliminary step, a RTV (polymorph I) solid dispersion (SD) was prepared with CH and subjected to solid state characterization (TG, DSC, PXRD, FTIR), which indicated partial amorphization of RTV with a remaining crystalline phase; CH and RTV I were miscible; and no hydrogen bonding between the drug and polymer was detected. The dissolution test of the SD under non sink conditions was used to confirm whether the drug would be suitable for the evaluation of the antiprecipitant activity of the polymer. The SD generated a supersaturation state that was maintained until the end of the experiment, suggesting that CH acted as an antiprecipitant and confirming that RTV could be used as a model drug. Then, the equilibrium solubility of RTV II (the most stable polymorph) and amorphous solubility of the drug were determined in previously selected media (100 mM HCl pH 2.2, acetate buffer pH 4.0 and 5.8, with and without CH and PVP-VA previously dissolved). The effects of CH on supersaturated RTV solutions were evaluated by the solvent-shift method in comparison to PVP-VA, for the quantification of the antiprecipitant activity and evaluation of the size and morphology of the formed colloidal phase. CH showed superiority to PVP-VA at pH 2.2 and 4.0, where the drug was partially ionized and non-ionized, respectively, in antiprecipitant activity. The size analysis of the RTV colloidal phase showed that in the presence of CH these structures formed larger than in the presence of PVP-VA and without the presence of the polymers. The inhibition of coalescence of drug colloids was not observed in any medium. Polarized light microscopy analysis showed that the precipitate formed from the coalescence of these structures was amorphous for the aqueous medium containing CH, and crystalline for the medium with PVP-VA and for water.

Keywords: Ritonavir. Chitosan hydrochloride. Supersaturation.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exemplos de dispersões sólidas disponíveis comercialmente.....	36
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Energia termodinâmica envolvida no processo de solubilização (ΔG = energia livre de Gibbs).....	28
Figura 2 - Energia livre de Gibbs das moléculas presentes em uma solução supersaturada.....	33
Figura 3 - Transições de fase que podem ocorrer em uma solução supersaturada gerada pela dissolução de uma dispersão sólida.....	41
Figura 4 - Estrutura química do PVP-VA.....	42
Figura 5 - Estrutura química do RTV.....	43
Figura 6 - Predição da porcentagem de espécies ionizadas (anéis tiazólicos do RTV pKa - 1,8 e 2,6) em função do pH.....	44
Figura 7 - Estrutura química do poli(N-isopropilacrilamida).....	45
Figura 8 - Estruturas químicas da QT, da QTS e da QTS protonada.....	46
Figura 9 - Apresentação dos resultados de GS <i>versus</i> tempo. (A) Solubilidade de equilíbrio (GS = 1). (B) Perfil GS-tempo sem a presença de polímero. (C) Perfil GS-tempo na presença de polímero antiprecipitante.....	57
Figura 10 - Curva de titulação condutimétrica do CQ 2.....	59
Figura 11 - Método analítico A. (A) Retas de regressão $y = 29809x + 8299,4$ ajustada aos pontos experimentais relativos à área média dos cromatogramas conforme a concentração do analito (RTV). (B) Resíduos relativos ao ajuste da reta de regressão.....	60
Figura 12 - Método analítico B. (A) Retas de regressão $y = 35439x - 2334,1$ ajustada aos pontos experimentais relativos à área média dos cromatogramas conforme a concentração do analito (RTV). (B) Resíduos relativos ao ajuste da reta de regressão.....	61

Figura 13 - Complexo iônico entre o CQ e o citrato de sódio.....	62
Figura 14 - Método analítico B obtido na presença de FMc. (A) Retas de regressão $y = 33803x - 5598$ (obtida com FMc) ajustada aos pontos experimentais relativos à área média dos cromatogramas conforme a concentração do analito (RTV). (B) Resíduos relativos ao ajuste da reta de regressão.....	62
Figura 15 - Curvas TG e dTG do CQ 1, do RTV I e da DS RTV I-CQ 1.....	64
Figura 16 - Curvas DSC do CQ 1, do RTV I, do M RTV I, da MF RTV I-CQ 1 e da DS RTV I-CQ 1.....	65
Figura 17 - Difractogramas do RTV I e do CQ 1.....	67
Figura 18 - Difractogramas do RTV I e do M RTV I.....	68
Figura 19 - Difractogramas da DS RTV I-CQ 1 e do MF RTV I-CQ 1.....	69
Figura 20 - Espectros de infravermelho do RTV I e do CQ1.....	70
Figura 21 - Espectros de infravermelho do CQ 1, do RTV I, do M RTV I, da MF RTV I-CQ 1 e da DS RTV I-CQ 1.....	71
Figura 22 - Perfis de dissolução da DS RTV I-CQ 1, do M RTV I, do RTV I, e representação da solubilidade de equilíbrio do RTV II, em P80 1%.....	72
Figura 23 - (A) Solubilidade de equilíbrio e (B) Solubilidade amorfa do RTV em diferentes meios, com e sem a presença de polímeros pré-dissolvidos, a 37 ° C.....	74
Figura 24 - GS versus tempo do RTV e as respectivas AUC em pH 2,2, 4,0 e pH 5,8, com e sem a presença de polímeros pré-dissolvidos.....	77
Figura 25 - FS do RTV (A) e FGE (B) obtidos pelo método <i>solvente-shift</i> em pH 2,2, 4,0 e 5,8.....	78

Figura 26 - (A) Tamanho médio dos coloides de RTV em função do tempo. (B) Índice de polidispersão médio das estruturas coloidais em função do tempo.....81

Figura 27 - Micrografias de luz polarizada da fase dispersa do RTV em meio aquoso: com PVP-VA (A, B, C e D); com CQ 2 (E, F, G e H); sem polímero (I, J, K). As setas vermelhas indicam estruturas cristalinas, as setas pretas indicam estruturas amorfas e as setas azuis indicam a fase detectada na análise de tamanho.....83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físicos das formas cristalinas do RTV.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CQ 1 - Cloridrato de quitosana 1
CQ 2 - Cloridrato de quitosana 2
CYP 3A4 - Citocromo P-450 3A4
DRXP - Difração de raios-X de pó
DS RTV I-CQ 1 - Dispersão sólida ritonavir I-cloridrato de quitosana 1
DSC - Calorimetria exploratória diferencial
FDA - Food and Drug Administration
FGE - Fator de ganho de excipiente
FMc - Fase móvel com citrato de sódio
FS - Fator de supersaturação
FTIR - Infravermelho por transformada de Fourier
GS - Grau de supersaturação
HCl - Ácido clorídrico
HPC - Hidroxipropilcelulose
HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose
HPMCAS - Hidroximetilpropilcelulose acetato succinato
IS - Índice *sink*
L - Litro
LD - Limite de detecção
LQ - Limite de quantificação
M RTV - Ritonavir moído
m/m - Massa/massa
MF RTV I-CQ 1 - Mistura física ritonavir I-cloridrato de quitosana 1
min - Minuto
mM - Milimolar
NaOH - Hidróxido de sódio
P80 1% - Polissorbato 80 1%
PEG - Polietilenoglicol
PVP - Polivinilpirrolidona
PVP-VA - Polivinilpirrolidona vinil acetato
QT - Quitina
QTS - Quitosana
r - Coeficiente de correlação de Pearson
r² - Coeficiente de determinação
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
rpm - Rotações por minuto

RTV I - Ritonavir na forma polimórfica I
RTV II - Ritonavir na forma polimórfica II
SCB - Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SE - Solubilidade de Equilíbrio
SFL - Separação de fase líquido-líquido
TG - Termogravimetria
TGI - Trato gastrointestinal
v/v - Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS	25
1.1.1	Objetivo geral	25
1.1.2	Objetivos específicos	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	PROPRIEDADES BIOFARMACÊUTICAS DOS FÁRMACOS.....	26
2.1.1	Solubilidade	27
2.1.2	Tamanho de partícula	29
2.1.3	Polimorfismo	30
2.2	SISTEMAS SUPERSATURADOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	31
2.2.1	O processo de precipitação	32
2.3	DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS (DSA)	34
2.3.1	Obtenção de DSA	37
2.3.2	Caracterização de DSA	38
2.4	RITONAVIR.....	41
2.5	CLORIDRATO DE QUITOSANA COMO UM CARREADOR EM DISPERSÕES SÓLIDAS	45
3	METODOLOGIA	49
3.1	MATERIAIS	49
3.2	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DO CLORIDRATO DE QUITOSANA.....	49
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO RITONAVIR.....	50
3.3.1	Condições cromatográficas	50
3.3.1.1	Método analítico A.....	50
3.3.1.2	Método analítico B.....	50
3.3.1.2.1	<i>Padronização do pré-tratamento de amostras contendo cloridrato de quitosana</i>	50

3.3.2	Avaliação da adequação dos métodos cromatográficos...	51
3.3.2.1	Seletividade.....	51
3.3.2.2	Linearidade	51
3.3.2.3	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	52
3.4	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DISPERSÃO SÓLIDA DE RITONAVIR E CLORIDRATO DE QUITOSANA	53
3.4.1	Obtenção das amostras.....	53
3.4.2	Caracterização das amostras	53
3.4.2.1	Termogravimetria (TG)	53
3.4.2.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	53
3.4.2.3	Difração de raios-X de pó (DRXP).....	54
3.4.2.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	54
3.4.2.5	Estudo de dissolução.....	54
3.5	AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO RITONAVIR E DA ATIVIDADE ANTIPRECIPITANTE DO CLORIDRATO DE QUITOSANA	55
3.5.1	Preparo dos meios.....	55
3.5.2	Determinação da solubilidade de equilíbrio e amorfa	55
3.5.3	Avaliação da atividade antiprecipitante pelo método <i>solvent-shift</i>	56
3.5.4	Análise estatística.....	57
3.6	CARACTERIZAÇÃO DA FASE COLOIDAL POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DO CLORIDRATO DE QUITOSANA	58
4.2	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO RITONAVIR.....	59
4.2.1	Método analítico A.....	59
4.2.2	Método analítico B.....	60

4.2.2.1	Padronização do pré-tratamento de amostras contendo cloridrato de quitosana	61
4.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DISPERSÃO SÓLIDA DE RITONAVIR E CLORIDRATO DE QUITOSANA	63
4.3.1	Termogravimetria (TG).....	63
4.3.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	64
4.3.3	Difração de raios-X de pó (DRXP)	66
4.3.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	69
4.3.5	Estudo de dissolução	71
4.4	AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO RITONAVIR E DA ATIVIDADE ANTIPRECIPITANTE DO CLORIDRATO DE QUITOSANA	73
4.4.1	Determinação da solubilidade de equilíbrio e amorfa	73
4.4.2	Avaliação da atividade antiprecipitante pelo método <i>solvent-shift</i>.....	75
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA FASE COLOIDAL POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	80
5	CONCLUSÃO	89
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos contêm um (ou mais de um) fármaco associado a adjuvantes de formulação, em uma forma farmacêutica sólida, semissólida ou líquida devem ser administrados ao paciente por uma via adequada. As formas farmacêuticas sólidas de administração oral, tais como as cápsulas e os comprimidos, são as mais utilizadas devido às vantagens que apresentam (por exemplo, baixo custo de produção, elevada estabilidade, conforto e comodidade ao paciente), sendo responsáveis por grande parte do faturamento da indústria farmacêutica mundial (ANSEL; ALLEN JUNIOR; POPOVICH, 2013; ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014).

Uma forma farmacêutica, após a administração oral, deve possibilitar a dissolução do fármaco no trato gastrointestinal (TGI) para que ele seja absorvido, atinja a circulação sistêmica, seja distribuído ao local de ação e exerça o efeito farmacológico esperado. Nesse sentido, os fármacos de baixa solubilidade aquosa impõem grandes desafios ao desenvolvimento e à produção de medicamentos, dado o efeito negativo que essa propriedade exerce sobre a absorção e a biodisponibilidade. Considerando que aproximadamente 40% de todos os fármacos em comercialização e entre 80-90% das novas moléculas ainda em estágios de desenvolvimento são classificados como pouco solúveis, os problemas relacionados à solubilidade de fármacos são uma grande preocupação para a indústria farmacêutica (PRICE et al., 2019; TAMBOSI et al., 2018).

Entre as diversas tecnologias disponíveis para contornar as propriedades biofarmacêuticas deficientes de fármacos, as dispersões sólidas (dispersões, no estado sólido, de um fármaco em uma matriz hidrofílica, geralmente um carreador polimérico) se destacam por sua eficiência em aumentar a solubilidade e melhorar o perfil de dissolução de fármacos pouco solúveis, sendo consagradas pela presença de vários produtos no mercado (JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018; TAMBOSI et al., 2018; VO; PARK; LEE, 2013).

Os mecanismos através dos quais as dispersões sólidas podem exercer a sua atividade incluem a redução do tamanho de partícula, a dispersão do fármaco em nível molecular, o aumento da área de superfície e a melhora da molhabilidade (JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018; TAMBOSI et al., 2018; VO; PARK; LEE, 2013). Nos últimos anos, no entanto, o estudo de dispersões sólidas tem se voltado para as formulações capazes de gerar e estabilizar um estado de supersaturação, em que a concentração do soluto excede a sua solubilidade de equilíbrio.

Tal estado é altamente atrativo para fármacos com baixa solubilidade aquosa, uma vez que podem ser geradas concentrações artificialmente elevadas no TGI, favorecendo a absorção (PRICE et al., 2019). Entretanto, ainda são poucos os carreadores explorados para o desenvolvimento dessas formulações, sendo importante identificar novos candidatos com características desejáveis que satisfaçam as necessidades de diferentes fármacos (VAN DUONG; VAN DEN MOOTER, 2016a).

O cloridrato de quitosana (CQ), um derivado mais solúvel que a quitosana, é um polímero natural, renovável, obtido principalmente de resíduos da indústria pesqueira (exoesqueletos de camarões e caranguejos), de baixo custo, que apresenta propriedades desejáveis para o uso farmacêutico (segurança, atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade) (DIAS et al., 2013; LAURIENZO, 2010), e apresenta monografia na Farmacopeia Europeia (COUNCIL OF EUROPE, 2013). Sua efetividade como carreador em dispersões sólidas de fármacos pouco solúveis já foi demonstrada (PEZZINI et al., 2016; SHETE; YADAV; MURTHY, 2012), porém uma busca minuciosa na literatura não encontrou estudos sobre a sua atividade como inibidor de precipitação.

O fármaco ritonavir (RTV) foi selecionado para a realização do presente estudo em decorrência de suas características físico-químicas desafiadoras (massa molecular de 720,95 g/mol, solubilidade em água de 2,4 µg/mL e log P de 5,98 (ILEVBARE et al., 2012a; ILEVBARE; TAYLOR, 2013; ZHOU et al., 2007) e classificação como pertencente à classe II (PANDYA; MEHTA; GOHEL, 2015; PAS; VERGAUWEN; VAN DEN MOOTER, 2018; SINHA et al., 2010) ou IV (DENGALÉ et al., 2014b; DESHMUKH; KULKARNI, 2013; GHADI; DAND, 2017) do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).

Considerando o contexto apresentado, este trabalho avaliou o potencial do CQ (polímero catiônico) como um inibidor da precipitação do RTV, em meios com diferentes valores de pH, dentro da faixa fisiológica no TGI, em comparação ao polivinilpirrolidona vinil acetato (PVP-VA), um polímero não-iônico, com atividade antiprecipitante descrita na literatura (PUROHIT; TAYLOR, 2017) PRICE et al., 2019 e utilizado na formulação comercial de referência do RTV (Norvir® comprimidos).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do CQ como inibidor da precipitação do RTV.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o CQ quanto ao grau de desacetilação por condutimetria.
- Desenvolver métodos analíticos de quantificação do RTV por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Confirmar a adequabilidade do RTV como um fármaco modelo para o estudo da atividade antiprecipitante do CQ por meio da comparação do perfil de dissolução de uma dispersão sólida de RTV e CQ ao do fármaco puro.
- Realizar a caracterização no estado sólido do RTV, do CQ e da dispersão sólida por termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios-X de pó (DRXP) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).
- Avaliar o potencial do CQ (polímero catiônico) como inibidor da precipitação do RTV, em diferentes valores de pH, em comparação ao polímero não-iônico PVP-VA (agente antiprecipitante conhecido), empregando o método *solvent-shift*.
- Investigar o impacto do CQ no tamanho da fase coloidal de soluções supersaturadas de RTV, em comparação ao PVP-VA, por espalhamento de luz dinâmico e microscopia de luz polarizada, empregando o método *solvent-shift*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROPRIEDADES BIOFARMACÊUTICAS DOS FÁRMACOS

A administração de medicamentos pela via oral é conveniente, não invasiva, segura e facilita a adesão aos tratamentos pelos usuários. No entanto, para o desenvolvimento de formas farmacêuticas efetivas por essa via, aspectos físico-químicos dos fármacos, fatores relacionados às formulações e fatores fisiológicos devem ser observados (TAMBOSI et al., 2018).

A baixa solubilidade de fármacos em água influencia diretamente em parâmetros farmacocinéticos e é um dos maiores obstáculos ao desenvolvimento de novas moléculas terapeuticamente ativas (BERGSTRÖM; LARSSON, 2018). A solubilidade, o perfil de dissolução e a permeabilidade gastrointestinal são parâmetros que governam a absorção e a biodisponibilidade oral dos fármacos (KHADKA et al., 2014).

O SCB, introduzido por Amidon e colaboradores, divide os fármacos em quatro categorias, com base na solubilidade aquosa e na permeabilidade intestinal: classe 1, alta solubilidade e alta permeabilidade; classe 2, baixa solubilidade e alta permeabilidade; classe 3, alta solubilidade e baixa permeabilidade; classe 4, baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Segundo os autores, os fármacos das classes 1 e 3 dissolvem nos fluidos gastrointestinais com facilidade e rapidez, sendo a taxa de absorção limitada, respectivamente, pelo tempo de esvaziamento gástrico e pela permeação intestinal. Por outro lado, os fármacos de baixa solubilidade, das classes 2 e 4, apresentam absorção limitada pela baixa taxa de dissolução e, no caso da classe 4, também pela baixa permeabilidade intestinal (AMIDON et al., 1995; SHAH; AMIDON, 2014).

De acordo com o SCB, um fármaco é considerado de alta solubilidade quando a dose terapêutica máxima é solúvel em 250 mL de solução aquosa em toda a faixa de pH entre 1,2 e 6,8. É considerado de alta permeabilidade quando a extensão da absorção após a administração oral é maior que 85%. Caso contrário, é considerado de baixa solubilidade e baixa permeabilidade, respectivamente (AMIDON et al., 1995; SHAH; AMIDON, 2014).

Lipinski e coautores pontuaram características químicas relevantes na predição da solubilidade e da permeabilidade de fármacos através de análises de moléculas registradas em bases de dados de compostos já estudados em fase clínica. Segundo os autores, uma massa molecular

acima de 500 g/mol, um log de P acima de 5, a presença de mais de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (soma de grupos OH e NH), assim como mais de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (N e O), afetam negativamente a absorção. Essas características influenciam na energia de empacotamento do cristal, na energia de cavitação e de solvatação do fármaco e, por isso, afetam negativamente a solubilidade. Uma permeabilidade satisfatória impõe a necessidade de moderada lipofilicidade da molécula para permear a barreira lipídica das membranas celulares. Algumas exceções à “regra dos 5” foram relatadas para fármacos que são substratos de transportadores naturalmente ocorrentes no organismo, por exemplo, alguns antibióticos, antifúngicos, glicosídeos cardíacos e vitaminas (LIPINSKI et al., 1997).

2.1.1 Solubilidade

Uma análise realizada para os fármacos classificados como essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e os medicamentos orais mais vendidos, nos Estados Unidos, Grã-Bretanha, Espanha e Japão, revelou cerca de 30-40% de fármacos praticamente insolúveis em água (<0,1 mg/mL). Entre os compostos em desenvolvimento, em torno de 70% são praticamente insolúveis, com cerca de 65-70% pertencendo às classes II e IV do SCB. Entre as novas entidades moleculares, aproximadamente 90% pertence às classes II e IV do SCB (GÖKE et al., 2018). Essa prevalência faz com que a indústria farmacêutica invista grandes esforços em pesquisa para solucionar os desafios impostos pela baixa solubilidade de fármacos (JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018).

Entre os fármacos pouco solúveis em água, existem compostos cuja solubilidade é limitada principalmente pelas propriedades de estado sólido e substâncias com solubilidade limitada principalmente pela solvatação (GÖKE et al., 2018).

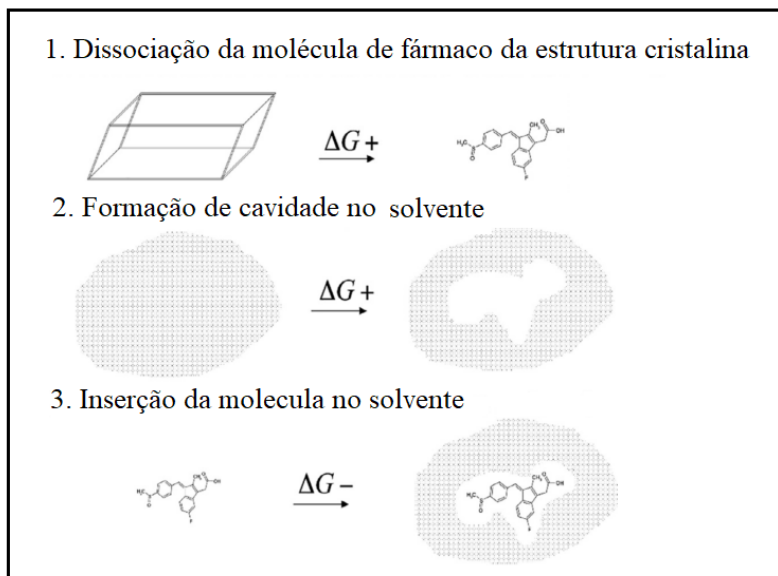
A maioria dos fármacos são sólidos cristalinos, ou seja, suas moléculas apresentam um arranjo periódico, que se repete regularmente nas três dimensões (PRADO; ROCHA, 2015). Para as moléculas de um fármaco entrarem em solução, elas devem se dissociar da rede cristalina em que estão inseridas. As interações intermoleculares que sustentam o cristal, quando são muito fortes, limitam a capacidade de dissociação do estado sólido. A temperatura de fusão dos fármacos é um indicativo da energia termodinâmica necessária para a quebra da rede cristalina. Para fármacos com ponto de fusão acima de 200 °C, a estrutura cristalina terá

grande influência na solubilidade (BERGSTRÖM; LARSSON, 2018; GÖKE et al., 2018).

A incorporação da molécula dissociada do cristal no solvente também demanda energia (energia de cavitação), que está relacionada com o tamanho da molécula do fármaco (quanto maior a massa molecular, maior o volume requerido da cavidade). Co-solventes, como o polietilenoglicol e o etanol, são exemplos de aditivos que diminuem a energia necessária para a cavitação no solvente, aumentando a solubilidade das moléculas de fármaco. A inserção da molécula de fármaco na cavidade do solvente (solvatação) é o passo final, e é influenciada pela capacidade da molécula em interagir com a água. A hidrofobicidade do fármaco afeta a sua capacidade de hidratação e, quando o logP é maior do que 2-3, a solubilidade é negativamente afetada (BERGSTRÖM; LARSSON, 2018; GÖKE et al., 2018).

Os eventos termodinâmicos envolvidos no processo de solubilização estão representados na Figura 1.

Figura 1 - Energia termodinâmica envolvida no processo de solubilização (ΔG = energia livre de Gibbs).



Fonte: Adaptado de BERGSTRÖM; LARSSON, 2018.

Os compostos com solubilidade limitada por propriedades de estado sólido, geralmente, são moléculas relativamente pequenas, planas e rígidas, com uma estrutura de anel estendida e elevada aromaticidade, características moleculares essas que levam à formação de uma rede cristalina mais estável. Para esses compostos, estratégias de formulação que alterem a forma cristalina, por exemplo, co-cristais ou sistemas amorfos, são úteis para aumentar a taxa de dissolução e atingir uma maior solubilidade aparente (BERGSTRÖM; LARSSON, 2018).

Por outro lado, os compostos limitados por solvatação são moléculas grandes, altamente lipofílicas, não possuem sistemas conjugados e apresentam um alto grau de flexibilidade. Para o desenvolvimento de formulações sólidas para a administração oral contendo esses fármacos, geralmente são usados vários excipientes diferentes, capazes de melhorar os processos de desintegração da forma farmacêutica, dispersão das partículas e solubilização do fármaco (BERGSTRÖM; LARSSON, 2018).

2.1.2 Tamanho de partícula

Cerca de 80% dos produtos farmacêuticos são formulações sólidas, manufaturadas a partir de partículas processadas em diversas etapas como cristalização, mistura, granulação, secagem, moagem, revestimento, compactação e transporte (WU et al., 2015). As propriedades das partículas do fármaco e dos excipientes influenciam diretamente na performance da formulação. A modificação dos pós e das propriedades das partículas de uma formulação visa melhorar o processamento industrial, e também as características de solubilidade e de dissolução nos fluidos gastrointestinais. A dissolução incompleta do fármaco, a partir da formulação, afeta negativamente a biodisponibilidade (KHADKA et al., 2014).

O controle do tamanho e da distribuição do tamanho de partículas é crucial para a obtenção de perfis de dissolução satisfatórios para fármacos de baixa solubilidade (ETZLER; UDDIN, 2013). A redução do tamanho das partículas aumenta a taxa de dissolução por meio do aumento da superfície de contato entre o sólido e o solvente, elevando a área de solvatação. Entretanto, como não há modificação nas propriedades do estado sólido do fármaco, a redução do tamanho de partícula influencia na solubilidade de saturação apenas quando tamanhos inferiores a 1 µm são atingidos (KHADKA et al., 2014).

Várias técnicas podem ser utilizadas para obter um fármaco com tamanho de partículas reduzido, desde métodos convencionais até novas

tecnologias de engenharia de partículas. Alguns exemplos são: processos mecânicos, como a moagem por jato de ar ou por esferas e a homogeneização a alta pressão; diferentes tipos de processos criogênicos de *spray*; engenharia de cristais, por meio da obtenção de co-cristais, polimorfos metaestáveis, formas amorfas de alta energia e partículas ultrafinas (KHADKA et al., 2014); e diversas técnicas de fluido supercrítico (FAHIM et al., 2014). Essas diferentes técnicas apresentam vantagens e desvantagens que devem ser analisadas individualmente, de acordo com a aplicação e a via de administração pretendidas (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

2.1.3 Polimorfismo

Polimorfismo é a habilidade de uma substância de existir em diferentes formas cristalinas, chamadas de polimorfos, que apresentam propriedades físicas e físico-químicas distintas, como ponto de fusão, solubilidade, densidade e taxa de dissolução. Os polimorfos apresentam diferenças no estado energético da matéria e tendência, termodinamicamente favorável, de liberar energia e passar da forma metaestável para o estado cristalino estável, de menor energia. As condições de armazenamento, a umidade e a temperatura afetam a estabilidade dos cristais (LÁNG et al., 2015; QI et al., 2018). A escolha dos excipientes e as formas de processamento do fármaco também podem levar a transições polimórficas. As diferentes formas cristalinas de um composto podem apresentar solubilidade de saturação e taxa de dissolução distintas, alterando drasticamente o perfil de dissolução e a biodisponibilidade da formulação (HADJITTOFIS et al., 2018). O polimorfismo pode afetar a qualidade, a segurança e a eficácia de produtos farmacêuticos e precisa ser monitorado durante o desenvolvimento de medicamentos (CENSI; DI MARTINO, 2015).

A modificação do estado cristalino através da obtenção de cristais com multicomponentes, que possuem proporções estequiométricas ou não estequiométricas de fármaco e solvente (solvatos, ou hidratos quando o solvente é a água), contra íons (sais) ou coformers (cocristais), é uma estratégia empregada pela indústria para contornar a baixa solubilidade de fármacos (BERRY; STEED, 2017). Outra estratégia é o uso de formas amorfas de fármacos (moléculas na forma desordenada, sem estrutura cristalina, no estado sólido), estabilizadas por carreadores. Esses sistemas são chamados de dispersões sólidas e estão entre os que mais se destacam para o aumento da solubilidade e do perfil de dissolução de fármacos, alcançando vários produtos no mercado (MISHRA et al., 2015).

2.2 SISTEMAS SUPERSATURADOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Fármacos de baixa solubilidade demandam o desenvolvimento de formulações estratégicas para que haja adequada biodisponibilidade. Após a administração via oral de um medicamento, a etapa de absorção só ocorre se o fármaco estiver solúvel, dessa forma, a concentração máxima atingida (solubilidade de saturação nos fluidos gastrointestinais) limita a absorção de fármacos pertencentes às classes II e IV do SCB (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

De fato, quando se administra um fármaco pouco solúvel na forma cristalina, as concentrações alcançadas no TGI são bastante baixas, resultando em baixa biodisponibilidade. Entretanto, quando o mesmo fármaco é veiculado em uma formulação estratégica, como um sistema supersaturado de liberação, capaz de produzir concentrações intraluminais acima da solubilidade de saturação (relativa ao polimorfo mais estável), um estado chamado de supersaturação é atingido, favorecendo a absorção (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009). O estado de supersaturação é termodinamicamente instável, devido ao maior potencial químico comparado a uma solução saturada estável, e o sistema tende a voltar ao equilíbrio pelo mecanismo de precipitação, em que o fármaco não estará mais disponível para a absorção. Sendo assim, é necessário estabilizar a supersaturação para que a absorção seja garantida, o que pode ser realizado pelo uso de excipientes inibidores de precipitação (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018).

Fármacos BCS II e IV formulados com co-solventes, tensoativos, agentes complexantes e/ou óleos, quando dissolvidos no TGI, podem gerar um estado supersaturado metaestável (NGUYEN; TRAN; HADINOTO, 2016; STILLHART; CAVEGN; KUENTZ, 2012; WILLIAMS et al., 2013). Formulações sólidas de alta energia ou rápida dissolução, como as dispersões sólidas, nanopartículas, carreadores baseados em sílica mesoporosa e cocristais, também geram estados supersaturados (ALMEIDA E SOUSA et al., 2016; JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018; MCCARTHY et al., 2016; NGUYEN; TRAN; HADINOTO, 2016).

A supersaturação pode ocorrer também com fármacos de baixa solubilidade classificados como bases fracas, mesmo quando administrados em sua forma cristalina. Esses fármacos atingem um estado de supersaturação quando passam pelo gradiente de pH do TGI. São protonados em meio ácido, no estômago, tendo uma maior solubilidade

nesse pH, e desprotonam ao chegarem no intestino delgado, sofrendo uma redução de solubilidade e gerando um estado de supersaturação transitório, antes de precipitarem, voltando ao estado sólido, indisponível para a absorção (PAS et al., 2018; XU et al., 2017).

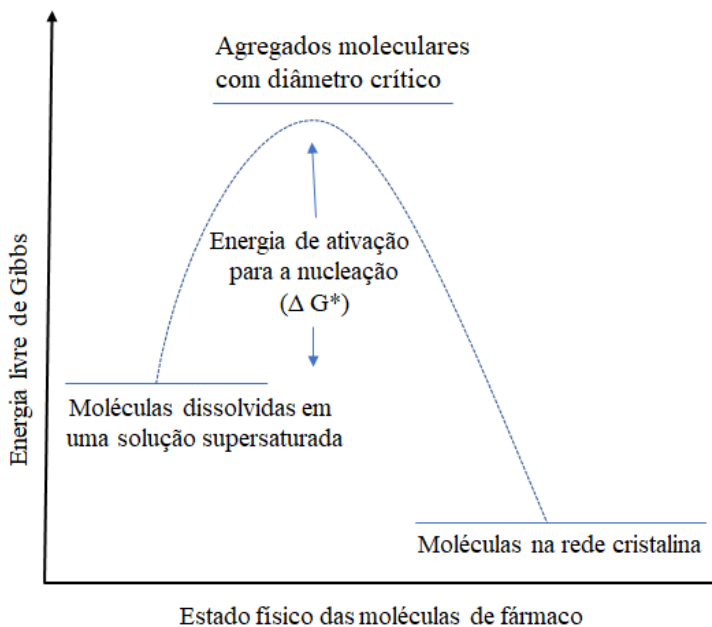
2.2.1 O processo de precipitação

Uma solução supersaturada possui um aumento em potencial químico, caracterizado pelo aumento da energia livre de Gibbs, quando comparado a uma solução saturada estável. Essa diferença no potencial químico é a força motriz para a precipitação. A precipitação a partir de um estado supersaturado é um processo termodinamicamente favorável levando à redução da energia livre de Gibbs. A precipitação pode ser dividida em dois passos: a nucleação e o crescimento cristalino (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; HADJITTOFIS et al., 2018).

Anterior ao crescimento cristalino, a nucleação é definida pela formação de um agregado molecular (núcleo), com um diâmetro crítico, abaixo do qual o processo é energeticamente desfavorável e os núcleos tendem a dissolver-se, e acima do qual eles crescem espontaneamente, capturando mais fármaco da solução (HADJITTOFIS et al., 2018). A etapa de nucleação necessita de energia de ativação, sendo que o aumento na energia livre de Gibbs dos agregados ocorre pela sua alta tensão interfacial. Quanto maior o nível de supersaturação atingido por um fármaco, maior é a tendência à nucleação, pois menor é a energia necessária para formar um agregado molecular com diâmetro crítico (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

Os fatores que influenciam a taxa de nucleação são o grau de supersaturação, a energia interfacial entre os agregados críticos e o solvente, a temperatura, a camada de adsorção entre o meio e o cristal e o nível de solvatação. Quando a barreira energética da nucleação é ultrapassada, o processo é irreversível e os agregados formados crescem, originando cristais maiores. O crescimento depende do grau de supersaturação, da viscosidade do solvente, da temperatura, da camada de adsorção entre o meio e o cristal e do nível de solvatação (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; HADJITTOFIS et al., 2018). A Figura 2 representa a energia envolvida na nucleação e no crescimento cristalino.

Figura 2 - Energia livre de Gibbs das moléculas presentes em uma solução supersaturada.



Fonte: Adaptado de BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009.

Algumas estratégias que podem ser utilizadas para manter o estado supersaturado são: o uso de tensoativos e de ciclodextrinas na formulação reduz o grau de supersaturação e melhora a solvatação das moléculas de fármaco; as formulações de liberação prolongada reduzem o grau de supersaturação; e os inibidores de precipitação poliméricos atuam diretamente nas taxas de nucleação e de crescimento cristalino (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

Os polímeros inibidores de precipitação reduzem as taxas de nucleação e de crescimento cristalino, em solução, pelo mecanismo de adsorção. Esses polímeros inibem a incorporação de moléculas de fármaco da solução para a estrutura cristalina por ocuparem os sítios de crescimento, atuando como uma barreira mecânica. As interações responsáveis pela adsorção podem ser de natureza química ou física. A adsorção física é usualmente reversível, ocorrendo por forças de Van der Waals e forças eletrostáticas. A adsorção química ocorre por ligações covalentes e é usualmente forte e irreversível. Vários fatores como hidrofobicidade, interação eletrostática e ligações de hidrogênio entre o

fármaco e o polímero contribuem no processo de adsorção física (ILEVBARE et al., 2012a).

O uso de liberação prolongada pode ser importante principalmente para fármacos que apresentam tendência à cristalização rápida. Dessa forma, baixos níveis de supersaturação são atingidos, podendo ser sustentados por mais tempo (ILEVBARE et al., 2013a)

2.3 DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS (DSA)

Atualmente, o termo “dispersão sólida” é principalmente aplicado a uma solução vítrea de um fármaco de baixa solubilidade em um carreador polimérico amorfo (VAN DUONG; VAN DEN MOOTER, 2016a). Nesses sistemas, os arranjos moleculares do fármaco são quebrados pela dispersão de suas moléculas nas cadeias do polímero, que atua como um estabilizador do estado amorfo do fármaco e, por isso, os sistemas são chamados de dispersões sólidas amorfas (DSA) (LAITINEN, R., PRIEMEL, P.A., SURWASE, S. et al., 2014).

O uso de DSA tem se mostrado a estratégia mais promissora no incremento das taxas de dissolução e da biodisponibilidade de fármacos. Os mecanismos envolvidos incluem a redução do tamanho das partículas do fármaco até o nível molecular, o aumento da molhabilidade do sistema, o aumento da solubilidade do fármaco na camada de difusão em torno das partículas, a formação de uma solução supersaturada e a inibição da precipitação do fármaco no meio (VAN DUONG; VAN DEN MOOTER, 2016a; VO; PARK; LEE, 2013). Essa vantagem ocorre, pois, a maior barreira energética para a solubilização é a dissociação das moléculas de fármaco da rede cristalina e, no estado amorfo, as moléculas encontram-se de forma desordenada (LIU et al., 2017).

As DSA são resultado do desenvolvimento da tecnologia de dispersões sólidas ao longo das últimas décadas. A primeira dispersão sólida, descrita em 1961, continha ureia como carreador para o sulfatiazol, formando uma mistura eutética (SEKIGUCHI; OBI, 1961). Esse foi o começo da primeira geração das dispersões sólidas, baseadas em carreadores cristalinos como a ureia, o sorbitol e o manitol. Mesmo sendo termodinamicamente estáveis, essas dispersões geram perfis de dissolução superiores aos das formulações convencionais, devido à redução no tamanho das partículas e melhora da molhabilidade do fármaco (MISHRA et al., 2015; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; YU et al., 2018).

O uso de carreadores poliméricos hidrofílicos, semicristalinos e amorfos, naturais e sintéticos, iniciou no final dos anos 60, possibilitando

a formação de DSA, caracterizando a segunda geração de dispersões sólidas. Na terceira geração, foi introduzida a utilização de tensoativos como adjuvantes a fim de melhorar aspectos de estabilidade e processamento, e também aumentar o perfil de dissolução. Entretanto, para alguns fármacos, há a necessidade de uma liberação controlada. Para esse propósito, polímeros insolúveis e intumescíveis em água passaram a ser adicionados à formulação (quarta geração), dando origem às dispersões sólidas de liberação prolongada (MISHRA et al., 2015; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; YU et al., 2018).

Alguns exemplos de produtos baseados na tecnologia de dispersões sólidas disponíveis no mercado são apontados no Quadro 1.

Quadro 1 - Exemplos de dispersões sólidas disponíveis comercialmente.

Nome comercial	Laboratório	Fármaco	Carreador
Afeditab CR	Actavis	Nifedipino	Poloxamer/PVP
Certican	Novartis	Everolimo	HPMC
Crestor	AstraZeneca	Rosuvastatina	HPMC
Fenoglide	Salix	Fenofibrato	PEG
Gris-PEG	Pedinol	Griseofulvina	PEG
Incivek	Vertex	Telaprevir	HPMCAS
Incivo	Janssen	Telaprevir	HPMCAS
Intelence	Tibotec	Etravirine	HPMC
Isoptin SR-E	Abbott	Verapamil	HPC/HPMC
Kaletra	Abbott	Lopinavir, ritonavir	PVP-VA
Kalydeco	Vertex	Ivacaftor	HPMCAS
Nimotop	Bayer	Nimodipino	PEG
Nivadil	Fugisawa	Nilvadipina	HPMC
Noxafil	Merck	Posaconazol	HPMCAS
Norvir	Abbott	Ritonavir	PVP-VA
Onmel	Stiefel	Itraconazol	HPMC
Prograf	Fugisawa	Tacrolimus	HPMC
Sporanox	Janssen	Itraconazol	HPMC
Zelboraf	Roche	Vemurafenibe	HPMCAS
Zortress	Novartis	Everolimu	HPMC
HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; HPMCAS: hidroximetilpropilcelulose acetato succinato; HPC: hidroxipropilcelulose; PEG: polietilenoglicol; PVP: polivinilpirrolidona; PVP-VA: polivinilpirrolidona vinil acetato;			

Fonte: Adaptado de TAMBOSI et al., 2018.

O polietilenoglicol (PEG) é o polímero semicristalino mais utilizado como carreador, porém, o número de publicações com esse polímero diminuiu nos últimos anos. Devido ao seu domínio semicristalino, a quantidade de fármaco incorporável na matriz e a manutenção da supersaturação após a dissolução são menores em relação aos polímeros amorfos. A forma de obtenção da dispersão sólida com PEG apresenta grande impacto na estabilidade, visto que os domínios cristalinos podem crescer e levar à separação de fases durante o processamento e armazenamento (VAN DUONG; VAN DEN MOOTER, 2016b).

Dentre os polímeros amorfos, a polivinilpirrolidona (PVP) foi mais empregada no começo dos anos 90 e, a partir da metade dessa década, os derivados de celulose (hidroxipropilcelulose, HPMC; hidroxipropilcelulose, HPC) e o PVP-VA passaram a ser mais frequentemente utilizados. Atualmente, os derivados acetato-succinato de HPMC (HPMCAS) são bastante utilizados. Ainda há um número limitado de carreadores adequados para o desenvolvimento de DSA e é importante identificar novos candidatos com características desejáveis que satisfaçam as necessidades para um determinado fármaco (VAN DUONG; VAN DEN MOOTER, 2016a).

2.3.1 Obtenção de DSA

O método de produção de uma DSA deve ser selecionado com base nas características do fármaco e do possível carreador. As formas de obtenção geralmente envolvem a solidificação de um sistema líquido, obtendo o fármaco disperso no carreador. Dentro desse contexto, pode-se utilizar os métodos da fusão, do solvente ou uma combinação de ambos, produzindo diferentes formas de energia para a conversão do líquido para o sólido, que influenciam na estrutura (morfologia e tamanho de partícula), no desempenho e na estabilidade da DSA. Quanto mais rápida a conversão do estado líquido para o sólido, mais homogêneo é o produto final (GURUNATH et al., 2013; YU et al., 2018).

No método da fusão, todos os componentes são aquecidos acima da temperatura de fusão ou transição vítrea, misturados e resfriados. As desvantagens estão relacionadas à degradação térmica, sublimação e possíveis alterações polimórficas. A miscibilidade entre o fármaco e o polímero no estado líquido também é um fator relevante. Uma vantagem é que não há solventes envolvidos no processo (JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009; MENG; GALA; CHAUHAN, 2015).

No método do solvente, a DSA é obtida pela evaporação de um solvente capaz de solubilizar o fármaco e o carreador. Encontrar um solvente comum pode ser uma dificuldade, considerando que há grande diferença de polaridade entre eles. É necessário evitar a recristalização do fármaco e a separação das fases durante a secagem, devido à grande mobilidade molecular que ocorre na solução. Uma vantagem em relação ao método de fusão é a maior variedade de opções de escolha de polímeros e a aplicabilidade para uma maior variedade de fármacos, visto que nesse sistema se trabalha com temperaturas mais baixas. Outras formas de processamento com solvente envolvem técnicas de

coprecipitação e fluido supercrítico (JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009; MENG; GALA; CHAUHAN, 2015).

A comoagem é uma técnica alternativa aos métodos tradicionais de fusão e de evaporação do solvente. No método da comoagem, o carreador e o fármaco são triturados conjuntamente em um moinho, por exemplo, o moinho de esferas. Esse método é vantajoso, pois dispensa o uso de solventes orgânicos e de aquecimento. A dispersão sólida se forma por ativação mecânica, reduzindo o tamanho das partículas do fármaco. Ainda, a superfície da estrutura submetida à moagem apresenta uma morfologia e rugosidade diferentes do original (anisotropia). As forças de atrito geram desordem na estrutura cristalina do fármaco, amorfizando-o completamente ou parcialmente (na superfície dos cristais). O uso de polímeros em comoagem pode auxiliar na estabilização da forma amorfa do fármaco, que é termodinamicamente mais energética e instável, por meio da formação de interações estáveis entre o fármaco e o polímero. As cadeias poliméricas inserem-se entre as partículas do fármaco, realizando impedimento estérico, dessa forma, evitando a reorganização das moléculas do fármaco em cristais (LOH; SAMANTA; SIA HENG, 2015)

2.3.2 Caracterização de DSA

As técnicas de caracterização das dispersões sólidas visam elucidar as interações entre o fármaco e o carreador, investigar a ocorrência de separação de fases durante o armazenamento, prever a estabilidade físico-química da formulação, entre outros objetivos. Para atingi-los, é necessário combinar técnicas analíticas qualitativas e quantitativas, que caracterizam os sistemas nos níveis molecular, partícula e pó, e são divididas em métodos que caracterizam o estado sólido e que caracterizam o comportamento em meio aquoso. Características como a miscibilidade entre o fármaco e o polímero, a mobilidade molecular do sistema e presença de cristalinidade residual, por exemplo, são fatores chaves para a estabilidade das dispersões sólidas (LIU et al., 2017).

As técnicas de microscopia caracterizam as partículas quanto ao tamanho, à morfologia, à cristalinidade e às propriedades de superfície. Os métodos utilizados são a microscopia de luz polarizada (MLP), a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a microscopia eletrônica de transmissão (MET), a microscopia de força atômica (MFA) e a espectroscopia de fotoelétrons excitados de raios-X (XPS) (LIU et al., 2017).

O método “ouro” para caracterizar o estado cristalino é a difração de raios-X (DRX), sendo muito utilizada para dispersões sólidas.

Materiais amorfos geralmente resultam em sinais de espalhamento amplos e difusos, enquanto os sinais para materiais cristalinos são bem definidos. A fase cristalina pode ser detectada em uma faixa de 1 – 5% m/m, dependendo do método. Algumas aplicações são: a triagem de polimorfos, a detecção do grau de cristalinidade, a identificação de materiais amorfos, a avaliação da miscibilidade fármaco-polímero e da cinética de recristalização (GURUNATH et al., 2013; LIU et al., 2017).

A análise térmica é utilizada para detectar eventos endotérmicos (transição vítrea e fusão) e exotérmicos (cristalização e degradação química), através da calorimetria exploratória diferencial (DSC), e a estabilidade térmica, por análise termogravimétrica (TG). As técnicas espectroscópicas possibilitam avaliar a existência de interações no nível molecular entre o fármaco e o carreador. Os mais utilizados são a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia Raman (LIU et al., 2017).

Além da estabilidade no estado sólido, é importante verificar o perfil de dissolução do fármaco a partir da dispersão sólida. Em dispersões sólidas poliméricas, o polímero é o modulador da liberação do fármaco. Suas características, como viscosidade, solubilidade, capacidade de formação de gel, além da proporção polímero-fármaco, são fatores determinantes do perfil de dissolução da formulação (VO; PARK; LEE, 2013).

A dissolução em condições *sink* (concentração do fármaco, quando completamente dissolvido na cuba, corresponde no máximo a um terço da solubilidade do fármaco no meio) pode ocorrer rapidamente para formulações com tamanhos de partícula reduzidos, visto que a taxa de dissolução para partículas inferiores a 2 µm aumenta consideravelmente. A realização de ensaios com menores taxas de dissolução, que gerem mais discriminação entre as formulações, são necessários para acompanhar o desenvolvimento de novas tecnologias farmacêuticas (LIU et al., 2013a).

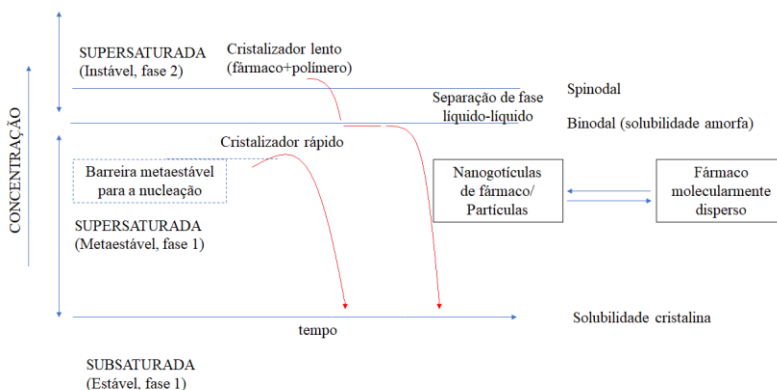
No âmbito das dispersões sólidas, é importante avaliar a capacidade dos excipientes em gerar e manter um estado de supersaturação do fármaco no meio de dissolução. É imprescindível o conhecimento da solubilidade cristalina do polimorfo mais estável do fármaco no meio de dissolução (C_s), do volume do meio (V) e da dose aplicada ao teste. Com base nesses parâmetros, calcula-se o Índice *Sink* (IS), representado pela Equação (1) (SUN; WEN; TAYLOR, 2016).

$$IS = \frac{C_s}{D/V} \quad (1)$$

Em uma condição com IS inferior a 1, a capacidade da formulação em gerar e manter a supersaturação pode ser observada. Em condições não *sink* extremas, a dissolução pode assumir um padrão “*spring-and-parachute*”. *Spring* refere-se ao comportamento de um fármaco em uma forma sólida de alta energia quando entra em solução, gerando a supersaturação. *Parachute* é o efeito exercido por um inibidor de precipitação, capaz de manter o estado supersaturado. Quanto maior a supersaturação gerada pela formulação, maior a taxa de nucleação, pois é diminuída a energia necessária para formar um agregado molecular com tamanho crítico para posterior crescimento. Quando a dissolução atinge uma liberação de fármaco a uma concentração de supersaturação acima da solubilidade amorfa do fármaco, também ocorre a separação de fases líquido-líquido (SFLL). A solubilidade amorfa é a concentração máxima de fármaco molecularmente disperso atingível em determinado meio. Nessa concentração, o sistema possui uma única fase (amorfa) em sua máxima atividade termodinâmica. Excedendo tal limite superior de fármaco livre em solução, ocorre uma SFLL, formando um novo domínio rico em fármaco, de estado coloidal, que coexiste com a fase amorfa, e a atividade termodinâmica permanece constante nas duas fases. Fármacos com um comportamento de cristalização lento, permanecem mais tempo em solução e cristalizam a partir do estado coloidal. Meios de dissolução contendo força iônica diminuem a solubilidade amorfa, enquanto os tensoativos geralmente aumentam (ILEVBARE; TAYLOR, 2013; SUN; WEN; TAYLOR, 2016; XU et al., 2017).

A Figura 3 ilustra as possíveis fases de um fármaco de baixa solubilidade quando uma DSA entra em contato com o meio aquoso. Se a concentração atingida está acima da solubilidade cristalina e abaixo da solubilidade amorfa, a cristalização pode ocorrer. Se a concentração exceder a solubilidade amorfa, e o fármaco for um cristalizador lento, a SFLL ocorre e forma uma segunda fase em solução, que permanece supersaturada com uma concentração correspondente à solubilidade amorfa, até a cristalização acontecer, momento em que a supersaturação é esgotada até que a solubilidade cristalina é alcançada (SUN; WEN; TAYLOR, 2016).

Figura 3 - Transições de fase que podem ocorrer em uma solução supersaturada gerada pela dissolução de uma DSA.



Fonte: Adaptado de SUN; WEN; TAYLOR, 2016.

Ainda que a geração de um sistema supersaturado tenda a precipitar em solução, esse precipitado se forma com um tamanho submicrométrico de partículas e em formas amorfas ou polimórficas de alta energia (VO; PARK; LEE, 2013).

Os valores de solubilidade acima do limite da solubilidade amorfa são determinados como “solubilidade aparente”. O ensaio de dissolução de DSA quando mensurado a partir de filtros de 1 μm ou com centrifugação leve, é significativamente maior do que a solubilidade amorfa, que é mensurada por ultracentrifugação. A solubilidade aparente é uma contribuição extra na solubilidade total. Fases amorfas nanoparticuladas (>500 nm) se formam durante a dissolução, oferecem uma rápida taxa de dissolução, que reabastecem a fase amorfa quando esta é absorvida (HARMON et al., 2016).

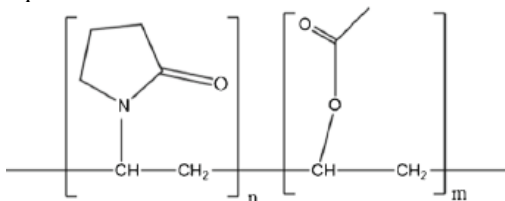
2.4 RITONAVIR

O RTV é um fármaco antirretroviral inibidor da protease, empregado no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida, sendo mais ativo contra o HIV-1 do que contra o HIV-2. Foi aprovado pelo FDA em março de 1996, com o nome comercial de Norvir®, formulado a partir do polimorfo I do RTV, pelo laboratório Abbott (BAUER et al., 2001; DESHMUKH; KULKARNI, 2013; ELLENBERGER et al., 2018). Em 1998, o Norvir® cápsulas moles foi

retirado do mercado devido à reprovação em testes de dissolução. A formulação mostrou-se instável durante o armazenamento devido à transição do polimorfo I para o II, mais termodinamicamente estável e, conseqüentemente, menos solúvel (BAUER et al., 2001; MORISSETTE et al., 2003). Uma nova formulação foi então lançada utilizando o polimorfo II (LU; ROHANI, 2009).

A partir de 2003, devido à atividade inibitória sobre a CYP3A4 e a glicoproteína-P, o RTV passou a ser mais utilizado em combinação com outros inibidores da protease, como o saquinavir, indinavir, amprenavir e lopinavir, atuando como um potencializador farmacocinético desses fármacos (ELLENBERGER et al., 2018; SEVRIUKOVA; POULOS, 2012). Em 2010, uma nova formulação do Norvir® foi lançada na forma de dispersão sólida, processada por *hot melt extrusion*, contendo PVP-VA e monolaurato de sorbitano (ELLENBERGER et al., 2018; HUANG; WILLIAMS III, 2018). Na Figura 4 está representada a estrutura química do PVP-VA.

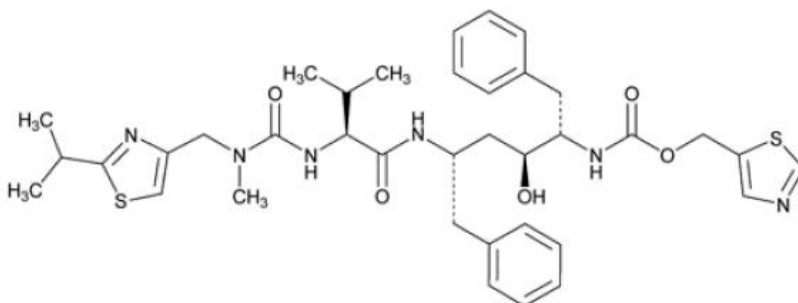
Figura 4 - Estrutura química do PVP-VA.



Fonte: PUROHIT; TAYLOR, 2017.

O RTV é classificado por alguns autores como BCS II (PANDYA; MEHTA; GOHEL, 2015; PAS; VERGAUWEN; VAN DEN MOOTER, 2018; SINHA et al., 2010), e como BCS IV por outros (DENGALÉ et al., 2014b; DESHMUKH; KULKARNI, 2013; GHADI; DAND, 2017). A baixa solubilidade do polimorfo mais estável (II) do fármaco em água (2,4 µg/mL - pH 7,4) é explicada por suas características físico-químicas, como a alta massa molecular de 720,95 g/mol e o log P de 5,98 (ILEVBARE et al., 2013a; ILEVARE; TAYLOR, 2013), além das maiores temperatura e energia de fusão do cristal, em relação às outras quatro formas polimórficas conhecidas (MORISSETTE et al., 2003). A estrutura química do RTV está representada na Figura 5 e as características físicas dos cinco polimorfos do fármaco estão resumidas na Tabela 1.

Figura 5 - Estrutura química do RTV.



Fonte: UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2017.

Tabela 1 - Parâmetros físicos das formas cristalinas do RTV.

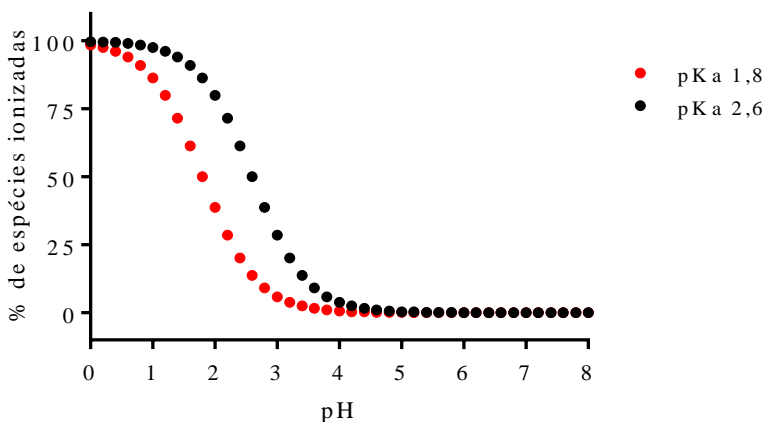
Forma	Temperatura de fusão (°C)	$\Delta H_{\text{fusão}}$ (J/g)	Estrutura no estado sólido
I	122	78,2	monocíclico
II	122	87,8	ortorrômbico
III	78-82	60,3	monocíclico
IV	116	59,8	indeterminada
V	97	32,0	monocíclico

Fonte: Adaptado de MORISSETTE et al., 2003.

O RTV é uma base fraca devido à presença de dois anéis tiazólicos de pKa 1,8 e 2,6, apresentando maior solubilidade em meio ácido do que em meio básico (ILEVBARE et al., 2013a; PAS et al., 2018; TZALLAS et al., 2001). A predição da porcentagem de espécies ionizadas dos anéis tiazólicos de RTV em função do pH está representada na Figura 6, de acordo com a Equação de Henderson-Hasselbalch para bases (2) (INDULKAR et al., 2015). A função ácida do fármaco não está representada, pois não ioniza em pH biorrelevante (PAS et al., 2018).

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log 10 \frac{[\text{B}]}{[\text{BH}^+]} \quad (2)$$

Figura 6 - Predição da porcentagem de espécies ionizadas (anéis tiazólicos do RTV pKa – 1,8 e 2,6) em função do pH.

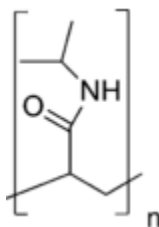


Existem diversos trabalhos na literatura sobre a obtenção de dispersões sólidas de RTV. Miller e colaboradores selecionaram o polímero aniônico HPMCAS no desenvolvimento de dispersões sólidas contendo o fármaco devido a dois fatores: fármacos bases fracas interagem fortemente com polímeros aniônicos por pontes de hidrogênio, promovendo a estabilização da dispersão sólida; o HPMCAS é insolúvel em meio ácido e, assim, não interfere na ação de agentes desintegrantes presentes na formulação, enquanto polímeros não iônicos, como o PVP-VA e o HPMC, formam gel em contato com meios aquosos, atrapalhando a ação dos desintegrantes e prolongando o tempo de desintegração da forma farmacêutica (MILLER et al., 2016).

Ilevbare e colaboradores estudaram a adsorção de 34 polímeros (disponíveis no mercado e novos derivados sintéticos da celulose) em testes de supersaturação com sementes cristalinas do polimorfo II do RTV em pH 6,8. Os resultados mostram que as propriedades desses polímeros que mais influenciaram na adsorção foram a hidrofobicidade semelhante à do fármaco (*solubility parameter*), a rigidez da estrutura do polímero (derivados da celulose semirrígidos mostraram-se mais efetivos que os sintéticos semiflexíveis, apesar de possuírem hidrofobicidade semelhante) e a anfifilicidade (polímeros que contêm mais substituintes de ácidos carboxílicos ionizáveis mostraram-se mais efetivos do que os menos substituídos e do que polímeros neutros). Esses parâmetros explicaram os resultados obtidos para a maioria dos polímeros, exceto

para o polímero sintético poli (N-isopropilacrilamida), que obteve o melhor desempenho. Os grupos funcionais do RTV, como os oxigênios da carbonila e nitrogênios de grupos tiazólicos, são muito eletronegativos e são as faces onde ocorre o crescimento cristalino. Essas estruturas podem interagir potencialmente através de pontes de hidrogênio dos grupos amida presentes nesse polímero (ILEVBARE et al., 2012a). Na Figura 7 está representada a estrutura química do poli(N-isopropilacrilamida).

Figura 7 - Estrutura química do poli(N-isopropilacrilamida).

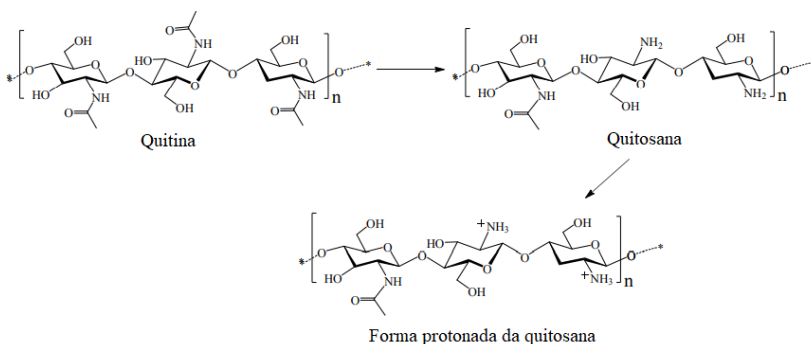


Fonte: ILEVARE et al., 2012b.

2.5 CLORIDRATO DE QUITOSANA COMO UM CARREADOR EM DISPERSÕES SÓLIDAS

A quitosana (QTS) é um aminopolissacarídeo linear, composto por unidades randomizadas de D-glucosamina e N-acetil-glucosamina unidas pela ligação glicosídica β (1-4). É um polímero de origem natural, extraído do exoesqueleto de crustáceos na forma de quitina (QT), através da desmineralização em meio ácido, desproteínação em meio alcalino e despigmentação com agentes como clorofórmio, peróxido de hidrogênio e acetona. A QT isolada é, então, parcialmente desacetilada em meio alcalino a alta temperatura, originando a QTS (TOKATL; DEMIRDÖVEN, 2017). Dentre os polissacarídeos com aplicação industrial, a QTS é o único polieletrólito catiônico de alto peso molecular. A maioria dos polissacarídeos são não iônicos ou aniônicos (BELLICH et al., 2016). As estruturas moleculares da QT e da QTS estão representadas na Figura 8.

Figura 8 - Estruturas químicas da QT, da QTS e da QTS protonada.



Fonte: SAHARIAH; MÁSSON, 2017.

A aplicação da QT é restrita devido à sua estrutura cristalina e às fortes interações intermoleculares e intramoleculares nas cadeias do polissacarídeo. A QT é encontrada na natureza em três formas polimórficas, α , β e γ . A forma cristalina α é a mais abundante e a mais estável, sendo insolúvel em água e soluções ácidas diluídas. A forma cristalina β intumescce em água e dissolve em ácido fórmico. Quando as cadeias poliméricas da QT são desacetiladas acima de 50%, o polímero passa a ser denominado como QTS, que apresenta uma forma semicristalina e solúvel em soluções ácidas diluídas (COSTA et al., 2015; RU et al., 2018).

As condições de obtenção da QTS afetam diretamente as características das cadeias poliméricas, como o grau de desacetilação, o padrão de desacetilação e a massa molecular. As unidades monoméricas acetiladas e desacetiladas do copolímero apresentam propriedades químicas diferentes, sendo as primeiras hidrofóbicas e as segundas de caráter catiônico (pKa 6,5). A distribuição das unidades acetiladas e desacetiladas altera as forças de agregação e repulsão que atuam na cadeia polimérica, afetando a conformação e a solubilidade. A caracterização e a reprodutibilidade são alguns dos problemas encontrados pelas agências regulatórias em aprovar o uso de produtos com QTS (BELLICH et al., 2016).

A QTS também pode ser obtida de fontes biotecnológicas através de organismos geneticamente modificados, permitindo produzir um polímero com estrutura pré-definida para a propriedade desejada. A produção de oligômeros de QTS ocorre a partir da glicose através da

enzima QT sintetase, e posteriormente outra enzima desacetila o polímero em posições estabelecidas, originando padrões de desacetilação e polimerizações reprodutíveis (SMETS; RÜDELSHEIM, 2018).

De acordo com o FDA, a QTS é classificada como um material “geralmente reconhecido como seguro” e apresenta diversas aplicações biomédicas e farmacêuticas. Como um composto bioativo, possui propriedades antitumorais, imunoestimulantes, antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes e cicatrizantes de feridas. Tem aplicações também em sistemas de liberação de fármacos, engenharia de tecidos, tecnologia de alimentos, implantes, carreamento de genes, entre outras (SHARIATINIA, 2018).

A QTS é utilizada como um material bioadesivo pela sua habilidade de formar ligações não covalentes com os tecidos biológicos, aumentando o tempo de permanência no TGI e, conseqüentemente, aumentando a absorção de fármacos. Partículas submicrométicas de QTS também possuem a propriedade de abrir as junções oclusivas que unem as células epiteliais, atuando como um potencializador da permeabilidade paracelular (WU; YANG; HUANG, 2016).

Devido à presença de grupamentos hidroxil e amina, há diversas possibilidades para a modificação de sua estrutura química. As mais comumente utilizadas para formar micropartículas, nanopartículas e filmes são a formação de ligações cruzadas com ligantes covalentes, iônicos, polieletrólitos e grupos hidrofóbicos (ELGADIR et al., 2014).

Devido à baixa solubilidade da QTS em meio neutro, a redução do peso molecular, por métodos físicos, químicos e enzimáticos, vem sendo uma estratégia para o aumento da solubilidade. A formação de sais em meio ácido com o grupo amino também aumenta a solubilidade aquosa do polímero (MINH; NGUYEN; SCHWARZ, 2018). A forma cloridrato, obtida de origem animal, foi incluída na farmacopeia europeia em 2013, sendo considerada fracamente solúvel em água (grau de desacetilação entre 70-95%; teor de cloretos entre 10-20%) (COUNCIL OF EUROPE, 2013).

No âmbito das dispersões sólidas, a QTS e as suas formas salinas já foram exploradas como carreadores para diferentes fármacos. Portero, Remuñán-López, Vila-Jato (1998) estudaram o perfil de dissolução de dispersões sólidas de nifedipino (SCB II), em meio ácido, a partir de formulações obtidas por diferentes métodos com QTS e glutamato de QTS (forma salina) de diversos pesos moleculares. Quanto menor o peso molecular da QTS e do glutamato de QTS, mais rápida foi a liberação do fármaco, devido à menor viscosidade do polímero em solução. Ainda,

devido à maior solubilidade, a forma salina do polímero gerou uma liberação mais rápida do fármaco do que a forma neutra.

Em decorrência da propriedade de entumescimento em meio alcalino, dispersões sólidas de QTS já foram exploradas para a liberação controlada de teofilina e de paracetamol (ASADA et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2005). Entre outros fármacos estudados para a obtenção de dispersões sólidas de QTS, estão a telmisartana (ZHONG et al., 2013), o aciclovir (NART et al., 2015), a tansinona IIA (LIU et al., 2013b) e o valdecoxibe (KUMAR; MISHRA, 2006).

Dispersões sólidas contendo CQ foram descritas para os fármacos felodipino (PEZZINI, 2016), indometacina (WU; YANG; HUANG, 2016) e carvedilol (SHETE; YADAV; MURTHY, 2012), sendo que, para o último, foi demonstrado que o CQ originou um perfil de dissolução mais rápido comparado à QTS.

O potencial da QTS em gerar e manter a supersaturação a partir de uma dispersão sólida foi demonstrado para a curcumina (BCS IV), em um estudo de dissolução em condições não-*sink* (HUANG et al., 2019). Não foram encontrados na literatura estudos sobre o potencial antiprecipitante do CQ.

3METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

Os polimorfos I e II do RTV foram doados pela indústria farmacêutica Cristália (Brasil). O CQ 1, com grau desacetilação de 84%, foi sintetizado no Laboratório QUITTECH, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O CQ 2, com peso molecular 161,158 g/mol, foi doado pela Aoxin Biotechnology (China). O Kollidon® VA 64 (PVP-VA) foi obtido da BASF (Alemanha). O metanol e a acetonitrila foram adquiridos da Dinâmica (Brasil) e da J. T. Baker (EUA), respectivamente. O acetato de sódio anidro foi obtido da CRQ (Brasil); o citrato de sódio dihidratado, o fosfato de potássio monobásico anidro e o fosfato de potássio dibásico da Vetec Química Fina (Brasil); o polissorbatos 80 (P80) da Isofar (Brasil); e o cloreto de potássio da Proquimios (Brasil). O ácido acético glacial 99,5%, o ácido clorídrico 37% e o hidróxido de sódio foram adquiridos da Química Moderna (Brasil). Os reagentes eram de grau “para análise” (P.A.) e os solventes orgânicos eram próprios para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DO CLORIDRATO DE QUITOSANA

O grau de desacetilação do CQ 2 foi determinado por titulação condutimétrica no condutivímetro MP-11p (MS Tecnopon, Brasil). O CQ 2 (100 mg) foi adicionado em água ultrapurificada (80 mL) e mantido sob agitação por 24 h, em temperatura ambiente, até a completa solubilização do polímero. Essa solução foi titulada com NaOH 0,05 M, sendo realizada a medida da condutividade do titulado a cada adição de titulante, conforme proposto por Signini e Campana Filho (1999). A condutividade da solução *versus* o volume de NaOH 0,05 M adicionado foram plotados em um plano cartesiano, respectivamente no eixo das ordenadas (y) e no eixo das abscissas (x). O ponto de equivalência da titulação foi determinado traçando uma regressão linear antes e depois da acentuação da curva, desconsiderando pontos próximos à inflexão. O ponto de equivalência corresponde ao ponto de mínima condutância antes da acentuação da curva. O volume de solução de NaOH consumido para titular a solução de CQ 2 foi utilizado para calcular o grau de

desacetilação do polímero, em porcentagem, de acordo com a Equação 3 (VARAN, 2017).

$$\text{Grau de desacetilação} = \frac{[\text{Vol NaOH (L)}] \times [\text{Concentração NaOH } (\frac{\text{mol}}{\text{L}})] \times [\text{PM CQ } (\frac{\text{g}}{\text{mol}})]}{\text{Massa CQ (g)}} \times 100 \quad (3)$$

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO RITONAVIR

3.3.1 Condições cromatográficas

3.3.1.1 Método analítico A

O método A de quantificação do RTV foi desenvolvido no cromatógrafo Series 200 com detector UV-Vis (Perkin Elmer, EUA), utilizando a coluna Luna C18, 5 μ , 150 x 4,6 mm, 110 Å (Phenomenex, EUA). A fase móvel isocrática, composta por metanol e tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7 (75:25, v/v), previamente filtrada em membrana Durapore PVDF 4,5 μ m (Millipore Sigma, EUA) e desgaseificada em banho de ultrassom, foi mantida a um fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 25 μ L e a detecção do RTV foi realizada em 235 nm.

3.3.1.2 Método analítico B

O método B de quantificação do RTV foi adaptado da literatura (BEVERNAGE et al., 2011; CLARYSSE et al., 2011), visando melhorar o limite de quantificação em relação ao método A. O cromatógrafo Series 200 com detector UV-Vis (Perkin Elmer, EUA) e a coluna analítica Luna C18, 5 μ , 150 x 4,6 mm, 110 Å (Phenomenex, EUA) foram utilizados. A fase móvel (metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio 25 mM pH 3,5 40:40:20 v/v), previamente filtrada em membrana Durapore PVDF 4,5 μ m (Millipore Sigma, EUA) e desgaseificada em banho de ultrassom, foi mantida a um fluxo de 1 mL/min, de forma isocrática. O volume de injeção foi de 50 μ L e o RTV foi detectado em 235 nm.

3.3.1.2.1 Padronização do pré-tratamento de amostras contendo cloridrato de quitosana

O pré-tratamento das amostras contendo CQ 2 consistiu em diluir essas amostras com a fase móvel adicionada de citrato de sódio dihidratado 500 μ g/mL (FMc), promovendo a precipitação do polímero,

com posterior centrifugação em uma microcentrífuga (MiniStar, Bélgica), a 6.200 rpm por 5 min, e separação do sobrenadante.

Para verificar se o pré-tratamento afetaria a concentração de RTV no sobrenadante, foram preparadas soluções de RTV II (1000 µg/mL em metanol) e CQ 2 (500 µg/mL em água). Efetuou-se a diluição da solução de RTV na solução de CQ 2 (1:49 v/v), seguida de diluição 1:1 (v/v) com a FMc, centrifugação e análise cromatográfica, em triplicata. A partir dessas diluições, obteve-se uma concentração teórica final de RTV de 10 µg/mL. As áreas dos cromatogramas das amostras pré-tratadas foram comparadas pelo teste T com as áreas de soluções de RTV de mesma concentração obtidas sem a presença do CQ 2 e sem pré-tratamento.

Além disso, foram preparadas três curvas analíticas, usando o mesmo procedimento descrito posteriormente no item (3.3.2.2), referente à curva analítica do método analítico B, usando FMc como diluente do RTV, visando verificar o efeito da mesma sobre a linearidade do método B. As inclinações (coeficientes angulares) das curvas analíticas obtidas com e sem a presença do citrato de sódio foram comparados pelo teste T.

3.3.2 Avaliação da adequação dos métodos cromatográficos

A adequação dos métodos cromatográficos A e B aos propósitos analíticos foi avaliada quanto à seletividade, à linearidade, ao limite de quantificação e ao limite de detecção. Os procedimentos adotados tiveram como base a resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017a), e o Guia nº 10, de 30 de agosto de 2017, que aborda o tratamento estatístico da validação analítica (BRASIL, 2017b), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.3.2.1 Seletividade

As possíveis interferências do diluente foi investigada através da sua injeção na ausência de RTV. Os cromatogramas foram verificados visualmente quanto à detecção de qualquer outra substância, que não o RTV, eluindo no tempo de retenção do fármaco ou próximo a ele.

3.3.2.2 Linearidade

A faixa de linearidade (2-100 $\mu\text{g/mL}$) do método A foi determinada para abranger as necessidades do ensaio de dissolução. A curva analítica foi preparada em triplicata, a partir de três soluções mãe de RTV I em metanol, com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. As soluções mãe foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL, utilizando a fase móvel como diluente, obtendo-se as concentrações de 2, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram, então, filtradas (Chromafil PA-45/25, Macherey–Nagel, Alemanha) e submetidas à análise cromatográfica pelo método A.

A faixa de linearidade (0,5-10 $\mu\text{g/mL}$) do método B foi determinada para abranger as necessidades dos ensaios de solubilidade e de supersaturação. A curva analítica foi preparada, em triplicata, a partir de três soluções mãe de RTV II em metanol, com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Diluições seriadas foram realizadas, diretamente em vials, utilizando uma pipeta automática e a fase móvel como diluente, obtendo-se as concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 100 $\mu\text{g/mL}$. As soluções mãe foram filtradas em filtro Chromafil® PA-45/25 (Macherey–Nagel, Alemanha) e a fase móvel (diluente) foi filtrada em membrana Durapore PVDF® 4,5 μm (Millipore Sigma, EUA) previamente à diluição.

Os dados de concentração de RTV e da resposta analítica obtida nos diferentes métodos foram plotados em um plano cartesiano, respectivamente no eixo das abscissas (x) e no eixo das ordenadas (y), juntamente com seus resíduos padronizados.

Foi realizada a análise de regressão sobre os dados, obtendo-se a equação de regressão e o coeficiente de determinação (r^2). Os resíduos padronizados relativos ao ajuste da reta de regressão foram avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e quanto à homocedacidade (teste de Cochran). A significância da regressão foi avaliada por análise de variância (ANOVA de uma via). Foi calculada a correlação entre as duas variáveis (área do cromatograma e concentração da solução de RTV), através do coeficiente de correlação de Pearson (r). Os testes estatísticos foram realizados com o nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada no *software* SPSS 22 (IBM, EUA).

3.3.2.3 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram calculados com base nos parâmetros da curva analítica através das Equações 4 e 5, em que IC é a inclinação da curva analítica e σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y das triplicadas das curvas analíticas.

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC} \quad (5)$$

3.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DISPERSÃO SÓLIDA DE RITONAVIR E CLORIDRATO DE QUITOSANA

3.4.1 Obtenção das amostras

A dispersão sólida DS RTV I-CQ 1 foi obtida em um moinho de esferas planetário PM 100 (Retsch, Alemanha), localizado na Universidade da Região de Joinville, por meio da comoagem do RTV I e do CQ 1 (1:6 m/m), a 360 rpm por 60 min. A forma polimórfica I foi selecionada com o intuito de atingir a amorfização completa do fármaco com maior facilidade, visando a obtenção de uma DSA. A proporção fármaco:polímero utilizada foi baseada em estudos prévios do grupo de pesquisa (PEZZINI et. al., 2016). Para fins de comparação, o RTV I foi isoladamente moído nas mesmas condições, originando o M RTV I. Também foi preparada uma mistura física entre o fármaco e o polímero (1:6 m/m), denominada MF RTV I-CQ 1, por espatulação simples em gral. As amostras foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar após o preparo e mantidas em dessecador.

3.4.2 Caracterização das amostras

3.4.2.1 Termogravimetria (TG)

As curvas TG foram obtidas em uma termobalança TGA-50 (Shimadzu, Japão), utilizando cadinhos de platina com aproximadamente 3 mg de amostra, na faixa de temperatura de 30 a 600 °C, empregando uma razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio de 100 mL/min. Os dados foram processados em *software* TA-60.

3.4.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu, Japão) utilizando cadinhos de alumínio fechados hermeticamente, contendo aproximadamente 2 mg de amostra. A faixa de temperatura

analisada foi de 30 a 200 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio de 100 mL/min. Os dados foram processados em *software* TA-60.

3.4.2.3 Difração de raios-X de pó (DRXP)

Os difratogramas foram obtidos em difratômetro θ - θ D2 Phaser (Bruker, EUA) com radiação de cobre $K\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operado em uma corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV. A detecção foi realizada através de um detector de cintilação unidimensional Lynxeye (Bruker, EUA). As análises foram realizadas à temperatura ambiente, através de varredura angular de 2θ na faixa de 5° a 50°, com *step* angular de 0.091°.

3.4.2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos em equipamento Frontier ATR-FTIR (Perkin Elmer, EUA), equipado com placa superior Frontier UATR Diamante/ZnSe (Perkin Elmer, EUA). Para cada espectro, dez *scans* na faixa de 4000-500 cm^{-1} , foram acumulados usando o *software* Spectrum versão 10.3.7 (Perkin Elmer, EUA).

3.4.2.5 Estudo de dissolução

Os perfis de dissolução do RTV I, do MRTV I e da DS-RTV I-CQ 1 foram avaliados em um aparelho de dissolução VK 7000/750D (Varian, EUA), em triplicata, utilizando o aparato 2 (50 rpm). Para o RTV I isolado foram empregados 30 mg de amostra, enquanto para a dispersão sólida foram usados 210 mg de amostra, correspondentes a 30 mg do fármaco. O polissorbato 80 1% (P80 1%) (500 mL), previamente desgaseificado, mantido a 37 °C, foi empregado como meio de dissolução. Alíquotas de 3 mL foram coletadas através de cânula e seringa, aos 5, 15, 30, 60 e 120 min após a adição das amostras diretamente às cubas, sem a reposição do meio de dissolução. Imediatamente após as coletas, as amostras foram filtradas (filtros Chromafil Xtra PA 4,5 mm 0,25 μm), diluídas 1:1 v/v com a fase móvel, e submetidas à análise cromatográfica (método analítico A) para a determinação dos percentuais de fármaco dissolvido.

Foi calculado o IS do ensaio de dissolução através da determinação da solubilidade de equilíbrio do RTV II em P80 1% com 180 $\mu\text{g/mL}$ CQ 1 predissolvido (correspondente a concentração de polímero presente na cuba de dissolução). Para a correta quantificação da supersaturação, a

solubilidade de equilíbrio do RTV II também foi determinada em P80 1%, sem a presença do polímero, para verificar possíveis efeitos solubilizante sobre o fármaco. Esses ensaios, bem como a determinação da solubilidade amorfa, foram conduzidos conforme descrito no item 3.5.2.

3.5 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO RITONAVIR E DA ATIVIDADE ANTIPRECIPITANTE DO CLORIDRATO DE QUITOSANA

3.5.1 Preparo dos meios

Os meios utilizados foram a solução de HCl 100 mM pH 2,2 e os tampões acetato 100 mM pH 4,0 e 5,8, com e sem polímero (CQ 2 ou PVP-VA) pré-dissolvido na concentração de 50 µg/mL. Para a solubilização do CQ 2, o polímero foi agitado vigorosamente nos meios no agitador magnético Di-01 (Dist, Brasil), a 200 rpm por 24 h. Os meios com o polímero não-iônico PVP-VA foram preparados para fins comparativos aos contendo CQ 2. Dada a elevada solubilidade do PVP-VA nos meios empregados, uma agitação de 20 min a 200 rpm foi suficiente para a solubilização completa do polímero.

3.5.2 Determinação da solubilidade de equilíbrio e amorfa

A solubilidade de equilíbrio do RTV II foi determinada adicionando excesso de fármaco cristalino em frascos de vidro âmbar contendo os meios descritos no item 3.5.1 e em P80 1%. Os frascos fechados foram submetidos à agitação constante de 240 rpm, a 37 °C, por 48 horas (incubadora shaker NT 715, Novatecnica, Brasil). Após esse período, o sobrenadante foi separado do fármaco sólido na amostra por ultracentrifugação (70.000 rpm – equivalente a 213.400 g; 45 min) na ultracentrifuga MAX-XP, equipada com o rotor TLA-120.1 (Beckman Coulter, EUA). O sobrenadante foi diluído com a fase móvel ou FMc, e a concentração determinada pelo método analítico B. O ensaio foi realizado em triplicata (ALHALAWEH; BERGSTRÖM; TAYLOR, 2016; ILEVBARÉ et al., 2013a).

Para a determinação da solubilidade amorfa, alíquotas de soluções metanólicas de RTV II foram adicionadas sob agitação à 10 mL dos meios descritos no item 3.5.1 e em P80 1% (10 mg/mL, 150 µL, no meio de pH 2,2; 5 mg/mL, 60 µL, no meio de pH 4,0 e 5,8; 20 mg/mL, 250 µL, no meio P80 1%), contidos em frascos de vidro âmbar e pré-aquecidos a 37

°C (incubadora shaker NT 715, Novatecnica, Brasil). As duas fases formadas em solução pela adição de fármaco (fase amorfa e fase coloidal), foram imediatamente separadas por ultracentrifugação (70.000 rpm – equivalente a 213.400 g; 45 min; 37 °C) na ultracentrífuga MAX-XP, equipada com o rotor TLA-120.1 (Beckman Coulter, EUA). A fase amorfa, presente no sobrenadante, foi diluída com a fase móvel ou FMc e a concentração determinada pelo método analítico B. Os testes foram realizados em triplicata (ILEVBARE; TAYLOR, 2013; TRASI; TAYLOR, 2015; TRES et al., 2018).

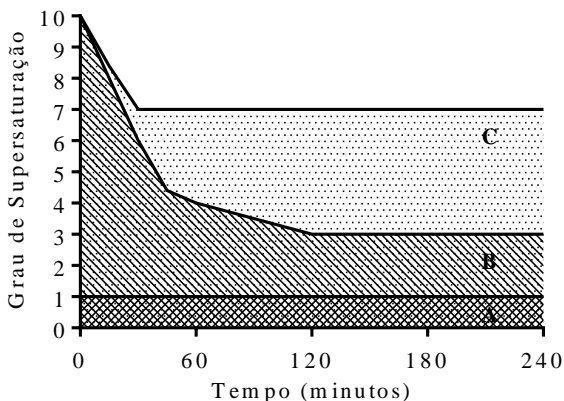
3.5.3 Avaliação da atividade antiprecipitante pelo método *solvent-shift*

A atividade antiprecipitante do CQ 2 e do PVP-VA (para fins de comparação) em soluções supersaturadas de RTV foi investigada em meios com diferentes valores de pH (item 3.5.1), empregando uma incubadora shaker NT 715 (Novatecnica, Brasil). Frascos de vidro âmbar fechados contendo 25 mL de cada meio foram pré-aquecidos à 37 ± 1 °C. Então, foi gerada a supersaturação pela adição de uma alíquota de solução metanólica de RTV II (10 mg/mL, 300 µL, nos meios de pH 2,2; 5 mg/mL, 100 µL, nos meios de pH 4,0 e 5,8). Os frascos foram agitados por 240 min à 240 rpm, e alíquotas de 500 µL foram retiradas em intervalos de tempo pre-estabelecidos (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 180, 240 min). As alíquotas foram submetidas à ultracentrifugação (120.000 rpm – equivalente a 627.000 g; 8 minutos) na ultracentrífuga MAX-XP, equipada com o rotor TLA-120.1 (Beckman Coulter, EUA), e os sobrenadantes quantificados pelo método analítico B. Devido ao uso da ultracentrifugação para remoção de partículas não dissolvidas, a atividade antiprecipitante dos polímeros foi avaliada em uma concentração inferior à solubilidade da fase amorfa (HARMON et al., 2016). Os testes foram realizados em triplicata.

Os perfis de supersaturação obtidos dos resultados experimentais foram avaliados conforme a metodologia proposta por Bevernage et al. (2011, 2013). Os resultados de concentração (µg/mL) foram convertidos para grau de supersaturação (GS) para normalizar os dados. O grau de supersaturação é calculado dividindo as concentrações de RTV mensuradas nos meios supersaturados ao longo tempo pela respectiva solubilidade de equilíbrio do fármaco no mesmo meio, sem a presença de polímero. Após essa transformação, a solubilidade de equilíbrio passa a representar o valor arbitrário de 1 e a supersaturação é representada como o número de vezes em que o fármaco está mais disponível em solução em

relação à solubilidade de equilíbrio, ao longo do tempo, conforme representado na Figura 9.

Figura 9 - Apresentação dos resultados de GS *versus* tempo. (A) Solubilidade de equilíbrio (GS = 1). (B) Perfil GS-tempo sem a presença de polímero. (C) Perfil GS-tempo na presença de polímero antiprecipitante.



Fonte: Adaptado de BEVERNAGE et al. (2011, 2013).

Tendo como referência a Figura 9, o GS do RTV em função do tempo nos diferentes meios, sem polímero, foi representado pelo Fator de Supersaturação (FS) calculado pelo emprego Equação 6.

$$FS = \frac{\text{área A} + \text{área B}}{\text{área A}} \quad (6)$$

Para quantificar a extensão da atividade antiprecipitante dos polímeros, foi calculado o Fator de Ganho de Excipiente (FGE), calculado pelo emprego da Equação 7.

$$FGE = \frac{\text{área A} + \text{área B} + \text{área C}}{\text{área A} + \text{área B}} \quad (7)$$

3.5.4 Análise estatística

Para determinar a significância ($p < 0,05$) do impacto dos polímeros na solubilidade do RTV e no FGE, foi realizado o teste ANOVA de uma

via, seguido do teste Dunnett (BEVERNAGE et al., 2011, 2013). A normalidade e homogeneidade da variância dos dados foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente ($p > 0,05$). A análise estatística foi realizada no *software* SPSS 22 (IBM, EUA), e as figuras plotadas no *software* Prism (Graphpad, EUA).

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA FASE COLOIDAL POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA.

Soluções supersaturadas de RTV foram geradas em triplicata, na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, a partir da adição de uma alíquota (60 μL) de solução metanólica de RTV II (10 mg/mL) em 10 mL de água, contendo os polímeros (PVP-VA ou CQ 2 à 50 $\mu\text{g/mL}$) e sem a presença dos polímeros. As soluções foram mantidas sob agitação no agitador magnético Di-01 (Dist, Brasil) a 200 rpm por 1 hora e, então, submetidas à análise do tamanho dos coloides (Z-average) a cada 5 min, por espalhamento de luz dinâmico no equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido), utilizando uma cubeta de poliestireno e detecção no ângulo 173° (ILEVBARE et al., 2013b; ILEVBARE; TAYLOR, 2013).

Para investigar a influência dos polímeros na cristalização dos coloides, as mesmas condições experimentais foram empregadas, e imagens de microscopia de luz polarizada foram capturadas durante o experimento. Um volume de 20 μL da fase dispersa nos meios foi adicionado em uma lâmina de vidro, que foi encoberta por uma lamínula para análise no microscópio Olympus CX41RF acoplado a polarizadores de transmissão U-POT e intensidade de luz transmitida U-ANT (Olympus, Japão) (ILEVBARE et al., 2013b; ILEVBARE; TAYLOR, 2013).

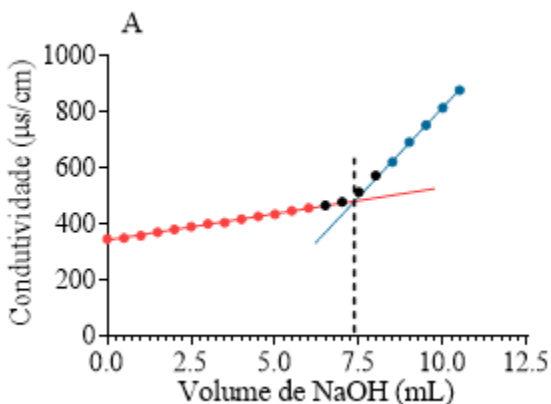
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DO CLORIDRATO DE QUITOSANA

O grau de desacetilação do CQ 1 (84%) foi informado pelo laboratório fornecedor (item 3.1) e, portanto, somente o CQ 2 foi analisado. A curva de titulação do CQ 2 (Figura 10) demonstra a neutralização dos prótons dos grupos amino (pontos em vermelho), aumentando a condutividade da solução com a adição de NaOH 0,5 M.

Após a neutralização do polímero, o excesso de NaOH adicionado ao meio gerou uma acentuação na curva de titulação (pontos representados em azul). O ponto de inflexão das regressões lineares, referentes aos pontos em vermelho e azul, está representado pela linha pontilhada.

Figura 10 - Curva de titulação condutimétrica do CQ 2.



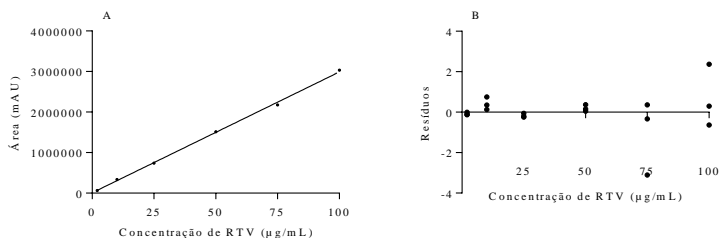
O ponto de equivalência na Figura 10 foi atingido com 7,25 mL de titulante (o ensaio foi realizado em triplicata e não houve variação nesse volume). Com base na Equação 3, o grau de desacetilação do CQ 2 é de 58,41%.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO RITONAVIR

4.2.1 Método analítico A

A curva analítica média do método analítico A de quantificação do RTV é apresentada na Figura 11. Os resíduos do modelo apresentaram distribuição normal ($p=0,051$) e homocedástica ($C=0,587$). A regressão linear simples foi significativa [$F(1,16) = 4045,58$; $p<0,05$; $r^2=0,996$]. O coeficiente de correlação de Pearson mostrou uma correlação positiva muito forte e significativa ($r=0,998$; $p<0,05$). Com base nessas análises, ficou demonstrado que o método A é linear.

Figura 11 - Método analítico A. (A) Reta de regressão $y = 29809x + 8299,4$ ajustada aos pontos experimentais relativos à área média dos cromatogramas conforme a concentração do analito (RTV). (B) Resíduos relativos ao ajuste da reta de regressão.

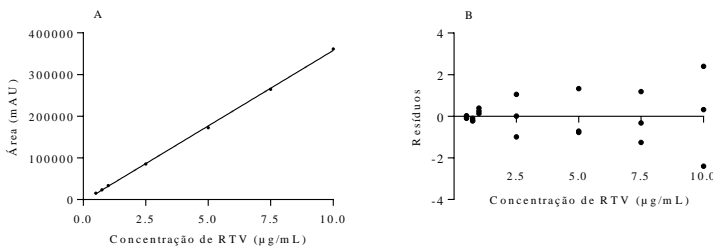


O método analítico A também se mostrou seletivo para o RTV frente à injeção de possíveis interferentes (P80 1% e CQ 1). Os limites de quantificação e de detecção foram, respectivamente, de 7,55 µg/mL e 2,49 µg/mL. Considerando os resultados obtidos, o método A foi considerado adequado aos propósitos analíticos pretendidos.

4.2.2 Método analítico B

A curva analítica média do método analítico B é apresentada na Figura 12. Os resíduos do modelo apresentaram distribuição normal ($p=0,435$) e homocedástica ($C=0,548$). A regressão linear simples foi significativa [$F(1,17) = 31009,14$; $p<0,05$; $r^2=0,999$]. O coeficiente de correlação de Pearson mostrou uma correlação positiva muito forte e significativa ($r=1$; $p<0,05$). Com base nestas análises, ficou demonstrado que o modelo é linear.

Figura 12 - Método analítico B. (A) Reta de regressão $y = 35439x - 2334,1$ ajustada aos pontos experimentais relativos à área média dos cromatogramas conforme a concentração do analito (RTV). (B) Resíduos relativos ao ajuste da reta de regressão.

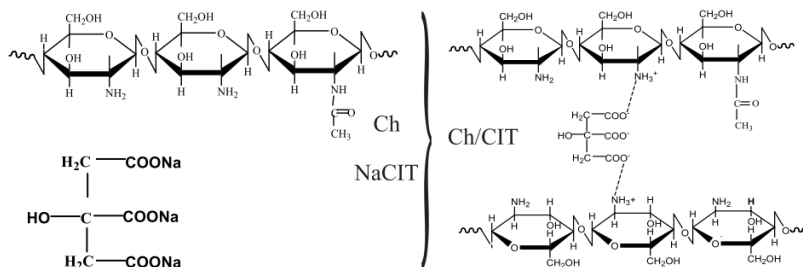


O método analítico B também se mostrou seletivo para o RTV frente à injeção de possíveis interferentes (citrato de sódio dihidratado, PVP-VA, HCl 100 mM pH 2,2, e tampões acetato 100 mM pH 4 e 5,8). Os limites de quantificação e de detecção foram, respectivamente, de 0,28 µg/mL e 0,095 µg/mL, mostrando maior sensibilidade do método B em relação ao A. Considerando os resultados obtidos, o método B foi considerado adequado aos propósitos analíticos pretendidos.

4.2.2.1 Padronização do pré-tratamento de amostras contendo cloridrato de quitosana

O CQ é um polímero catiônico, capaz de formar hidrogel na presença de um agente ligante iônico, como o citrato de sódio. O complexo iônico entre o CQ e o citrato de sódio é formado por interações eletrostáticas atrativas entre grupos amino do CQ e carboxílicos do citrato em solução (JÓŹWIAK et al., 2017), e está representado na Figura 13. O citrato de sódio também atua como um desidratador do polímero em solução, causando a sua precipitação (efeito *salting-out*) (DUPUIS; LEHOUX, 2007). Esse sal foi explorado para o desenvolvimento da técnica de precipitação do CQ 2, para a remoção do polímero antes da injeção das amostras no cromatógrafo. A adição da FMc nas amostras contendo CQ 2 (1:1 v/v), levou à formação de um precipitado macroscópico, facilmente separado do sobrenadante por centrifugação.

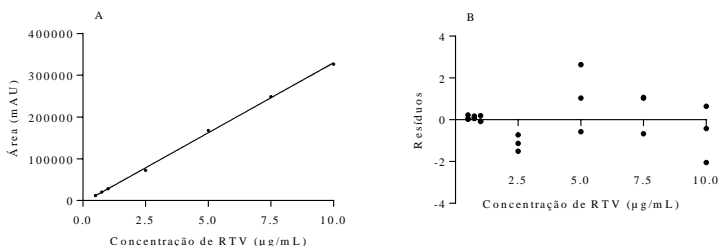
Figura 13 - Complexo iônico entre o CQ e o citrato de sódio.



Fonte: OSTROWSKA-CZUBENKO; PIERÓG, 2010.

A curva analítica média do método analítico B obtida com a utilização da FMc como diluente do RTV está representada na Figura 14. Os resíduos do modelo apresentaram distribuição normal ($p=0,379$) e homocedástica ($C=0,459$). A regressão linear simples foi significativa [$F(1,19)= 8947,07$; $p<0,05$; $r^2=0,998$]. O coeficiente de correlação de Pearson mostrou uma correlação positiva muito forte e significativa ($0,999$; $p<0,05$).

Figura 14 - Método analítico B obtido na presença de FMc (A) Reta de regressão $y = 33803x - 5598$ ajustada aos pontos experimentais relativos à área média dos cromatogramas conforme a concentração do analito (RTV). (B) Resíduos relativos ao ajuste da reta de regressão.



Os coeficientes angulares das curvas obtidas por diluição com FM e FMc foram comparados através do teste T. Os mesmos mostraram uma distribuição normal ($p=0,900$) e variâncias homogêneas ($p=0,866$). O teste T indicou que não há uma diferença estatística entre os coeficientes angulares ($p=0,085$). Dessa forma, foi confirmado que as curvas são iguais e que, portanto, não houve interferência do citrato de sódio na

linearidade do método B. Ou seja, a resposta do analito sempre será a mesma com ou sem o citrato de sódio, nesse meio.

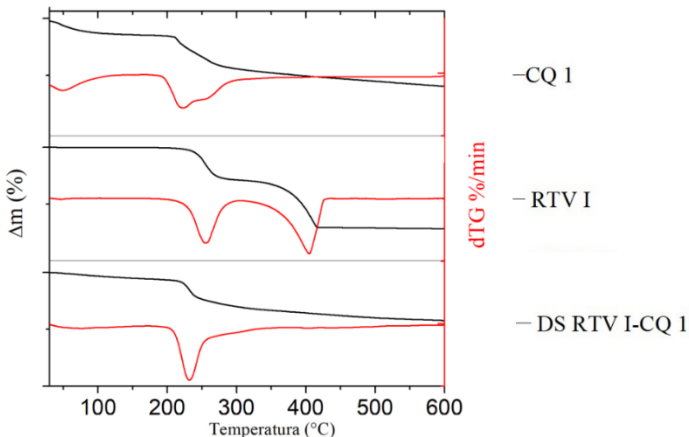
As áreas dos cromatogramas relativas às soluções contendo RTV e CQ 2, submetidas à precipitação com FMc, não mostraram diferença estatística quando comparadas às áreas de amostras de mesma concentração de RTV, sem CQ 2, diluídas com FM ($p=0,785$). Os testes realizados confirmaram que a técnica de precipitação do CQ 2 não interfere na concentração de RTV na solução, validando o pré-tratamento das amostras.

4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DISPERSÃO SÓLIDA DE RITONAVIR E CLORIDRATO DE QUITOSANA

4.3.1 Termogravimetria (TG)

Na Figura 15 são mostradas as curvas TG do CQ 1, do RTV I e da DS RTV I-CQ 1. O CQ 1 apresentou um evento de desidratação até 100 °C ($\Delta m=10,4\%$). O polímero demonstrou estabilidade térmica até 213 °C, ocorrendo um evento de degradação térmica dos anéis sacarídeos acima desta temperatura (Δm total = 51,2%) (HUANG et al., 2019). O RTV I apresenta dois eventos de perda de massa. O primeiro inicia em 240 °C ($\Delta m=44,1\%$) e o segundo em 270 °C (Δm total = 98%). Na DS RTV I-CQ 1 também ocorreu um evento de desidratação até 100 °C ($\Delta m=3,1\%$). Quando comparadas as curvas TG do RTV I, do CQ 1 da DS RTV I-CQ 1, há um aumento da resistência térmica do sistema na dispersão sólida, ocorrendo uma menor perda de massa (Δm total=42,2%). O evento de degradação inicia em 214 °C, não sendo observados os eventos característicos do RTV I. Isso indica uma maior estabilidade da formulação frente à indução de degradação térmica, em comparação ao fármaco e ao polímero isolados (PANDYA; MEHTA; GOHEL, 2015).

Figura 15 - Curvas TG e dTG do CQ 1, do RTV I e da DS RTV I-CQ 1.



4.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

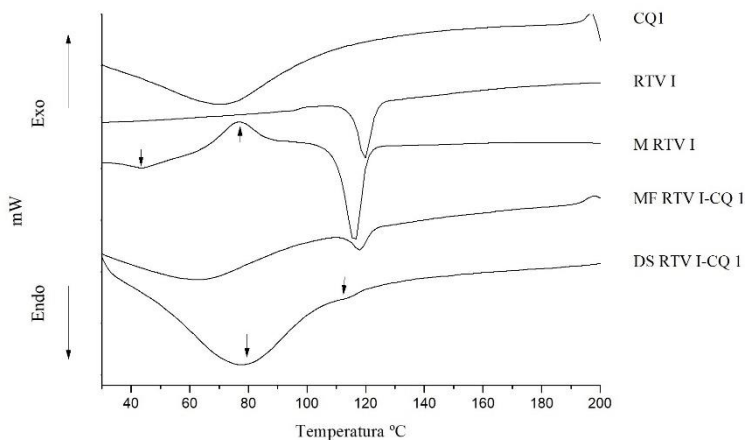
A análise térmica é essencial para a caracterização e a predição da estabilidade de dispersões sólidas. A temperatura de transição vítrea, a mobilidade molecular, a miscibilidade entre fármaco-polímero e o efeito da umidade sobre o sistema são fatores chaves (BAIRD; TAYLOR, 2012).

A curva DSC do CQ 1 (Figura 16) apresentou um evento endotérmico largo de desidratação até 100 °C. A transição vítrea da porção amorfa do polímero não foi observada. Segundo a literatura, a transição vítrea da quitosana ocorre em torno de 115 °C e é de difícil detecção devido ao baixo volume livre de suas cadeias rígidas. Fatores como o peso molecular, o grau de desacetilação, a cristalinidade, a fonte e a forma de extração influenciam nesse parâmetro (CRUCITTI et al., 2018).

O RTV I apresentou um único evento endotérmico de fusão em 120 °C (61,39 J/g), caracterizando o arranjo molecular cristalino do fármaco na forma polimórfica I (LAW et al., 2001). Na curva DSC do M RTV I, foram detectados três eventos térmicos: transição vítrea (endotérmico, $T_{\text{pico}} = 51$ °C), seguida de recristalização (exotérmico, $T_{\text{pico}} = 76$ °C) e fusão a uma temperatura mais baixa que o RTV I (endotérmico, $T_{\text{pico}} = 116$ °C, 69,5 J/g). Isso demonstra que a moagem do fármaco isolado levou a mudanças no comportamento térmico, devido à amorfização parcial. A recristalização também indica que o M RTV I

possui pouca estabilidade na fase amorfa e, considerando as temperaturas de fusão dos polimorfos do fármaco (Tabela 1), o RTV recrystalizou na forma polimórfica IV (metaestável) (MORISSETTE et al., 2003; RASK et al., 2019).

Figura 16 - Curvas DSC do CQ 1, do RTV I, do M RTV I, da MF RTV I-CQ 1 e da DS RTV I-CQ 1.



A curva DSC da MF RTV I-CQ 1 exibiu os eventos de desidratação e de fusão observados para o CQ 1 e o RTV I, respectivamente, em intensidades inferiores, devido à diluição em função da mistura. Entretanto, a temperatura de fusão da mistura física foi menor do que a do RTV I (117,9 e 120 °C, respectivamente). Esse resultado sugere que há miscibilidade entre o fármaco e o polímero. Essa interação leva à redução do potencial químico do cristal de fármaco e à diminuição da temperatura de fusão (RASK et al., 2019).

A DS RTV I-CQ 1 apresentou um evento endotérmico de baixa intensidade em 114 °C, que pode ser atribuído à transição vítrea do CQ 1, pois a moagem possivelmente reduziu o peso molecular do polímero, o que facilita a detecção do evento (CRUCITTI et al., 2018). Outra hipótese é a presença de uma fase cristalina residual de fármaco, significando que o tempo de moagem, a velocidade e a proporção entre o fármaco e o polímero não foram suficientes para uma amorfização total do fármaco. A redução observada no ponto de fusão pode ocorrer devido à redução no tamanho de partícula da fase cristalina (NART et al., 2015). Os dados também sugerem que o polímero impediu a recrystalização do fármaco na

DS RTV I-CQ 1, durante a análise, mesmo na presença das sementes cristalinas residuais, provavelmente devido à redução da mobilidade molecular do fármaco no sistema.

A transição vítrea característica do M RTV I não foi observada na curva DSC da DS RTV I-CQ 1. Há duas hipóteses para justificar esse resultado: (1) Não há domínios ricos em fármaco amorfo separados da matriz polimérica, demonstrando que a dispersão sólida é uma solução vítrea. (2) O evento de desidratação do CQ encobriu a transição vítrea do fármaco.

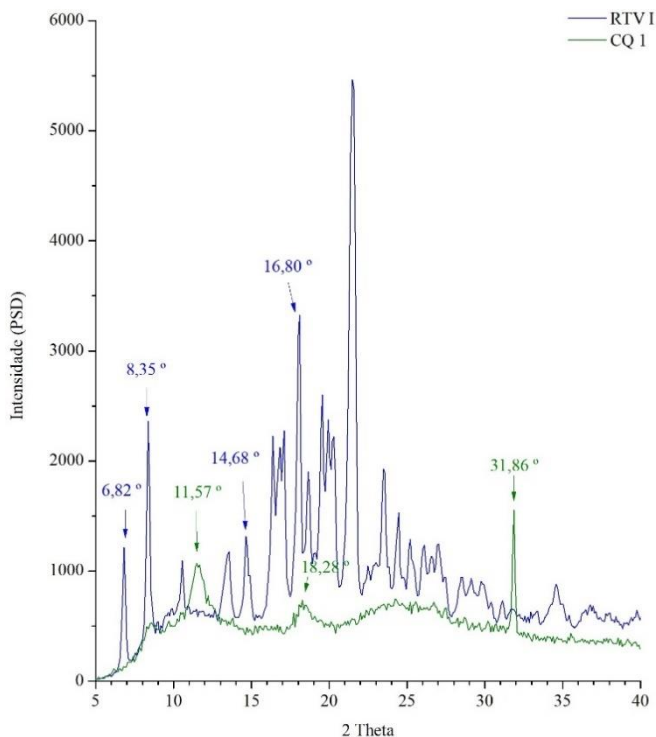
Considerando que a DS RTV I-CQ 1 é uma solução vítrea, era esperada a ocorrência de um evento de transição vítrea em temperatura intermediária às temperaturas de transição vítrea do fármaco ($T_{pico} = 51$ °C) e do polímero (~115 °C) (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016).

O evento endotérmico observado antes de 100 °C para o CQ 1 ocorreu com maior intensidade e em temperatura mais elevada para a dispersão sólida em relação à mistura física (DS RTV I-CQ 1 $T_{pico} = 77,5$ °C; MF RTV I-CQ 1 $T_{pico} = 61,9$ °C). As mudanças observadas podem sugerir um evento de transição vítrea da dispersão sólida ocorrendo na mesma faixa de temperatura que o evento de desidratação do CQ 1. Sabe-se que a presença de umidade pode reduzir a temperatura de transição vítrea, atuando como um plastificante e aumentando a mobilidade molecular. Dispersões sólidas com temperatura de transição vítrea superior à temperatura ambiente apresentam menor mobilidade molecular e maior estabilidade na temperatura de armazenamento (BAIRD; TAYLOR, 2012; DÉMUTH et al., 2016). Os dados sugerem que a DS RTV I-CQ 1 apresenta boa estabilidade física, uma vez que a temperatura de transição vítrea ocorre em temperatura relativamente elevada mesmo na presença de umidade.

4.3.3 Difração de raios-X de pó (DRXP)

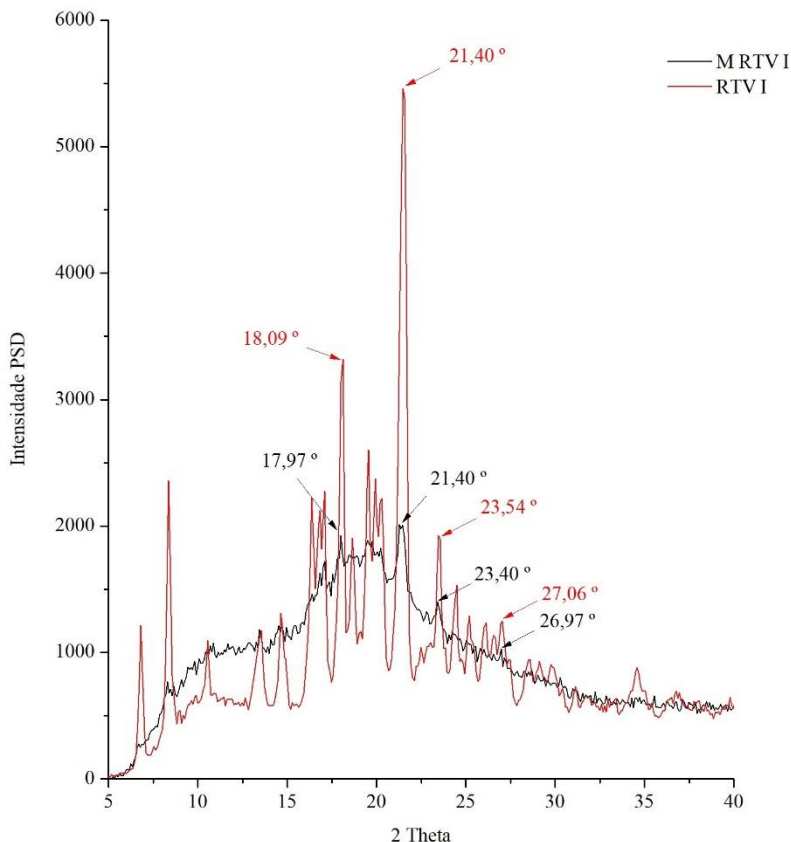
Na Figura 17 estão representados os difratogramas do RTV I e do CQ 1. O RTV I apresenta reflexões finas e de grande intensidade característicos da forma polimórfica I (6,82°, 8,35°, 14,68° e 16,80°) (BAUER et. al., 2014). O CQ 1 é um polímero semi-cristalino em que os domínios cristalinos são refletidos no ângulo de 18,28° e os domínios amorfos no ângulo de 11,57° (SIGNINI; CAMPANA, 2001). A reflexão cristalina em 31,86° é indicativo da presença de uma impureza na matéria-prima.

Figura 17 - Difratomogramas do RTV I e do CQ 1.



A sobreposição dos difratogramas do RTV I e do MRTV I (Figura 18) mostra que, nas condições empregadas, a moagem causou amorfização parcial do RTV I, uma vez que há a presença de um halo amorfo e de algumas reflexões de menor intensidade da forma cristalina I. As reflexões cristalinas que remanesceram no MRTV I encontram-se deslocadas em relação ao RTV I (indicado pelas setas) e com picos irregulares, indicando que esta fase cristalina possui alterações em relação ao RTV I causadas pela moagem, que possivelmente gerou uma rugosidade e anisotropia desta fase.

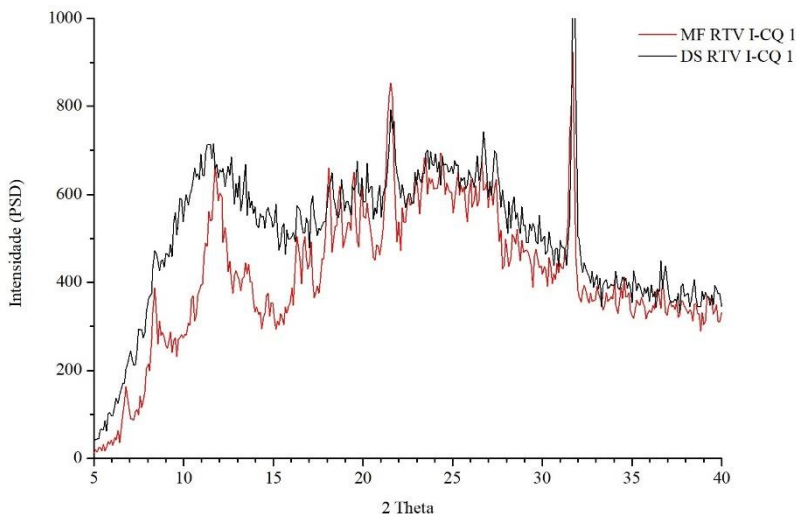
Figura 18 - Difratomogramas do RTV I e do MRTV I.



Na Figura 19 estão sobrepostos os difratogramas da MF RTV I-CQ 1 e da DS RTV I-CQ 1. A MF RTV I-CQ 1 apresentou as reflexões características do RTV I e do CQ 1, em intensidades inferiores aos compostos isolados devido à diluição da amostra. No difratograma da DS RTV I-CQ 1 pode-se observar um halo amorfo e a presença de algumas reflexões cristalinas referentes ao RTV, sugerindo amorfização parcial do fármaco. As reflexões referentes ao fármaco encontram-se menos intensas e deslocadas em relação aos picos da MF RTV I-CQ 1 (para a MF = 16,76°, 17,10°, 18,09°, 18,69°, 19,49°; para a DS = 16,84°, 17,20°, 18,26°, 18,80°, 19,70°). Esses resultados estão de acordo com a análise de DSC, em que uma fase amorfa e uma fase cristalina também foram detectadas. Também parecem ter ocorrido mudanças nos domínios

amorfos e cristalinos do CQ 1 na dispersão sólida, com redução da cristalinidade do polímero.

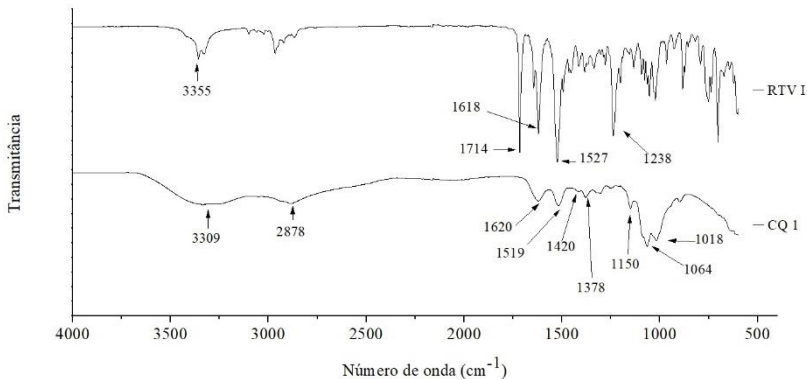
Figura 19 - Difratogramas do DS RTV I-CQ 1 e do MF RTV I-CQ 1.



4.3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

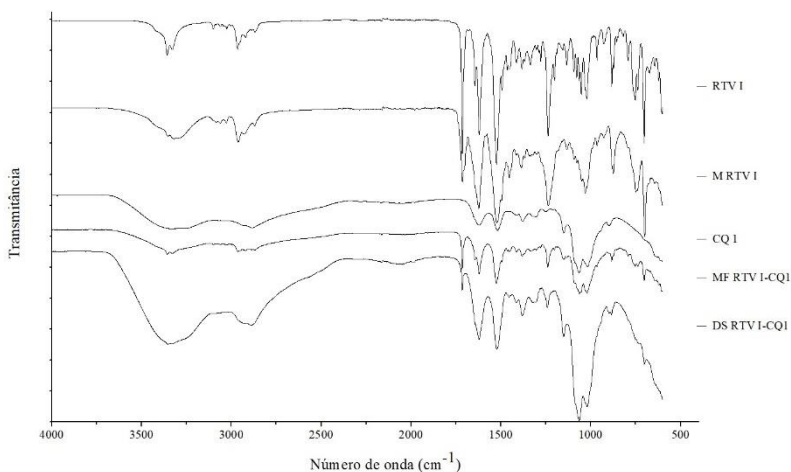
Os espectros de infravermelho foram analisados a fim de verificar as interações moleculares nas amostras. Na Figura 20, estão apresentados os espectros do RTV I e do CQ 1, juntamente com indicações das bandas características. Para o RTV I, são elas: 3355 cm^{-1} , estiramento amida secundária (N-H); 1714 cm^{-1} , estiramento da carbonila do éster (C=O); 1618 cm^{-1} , estiramento do anel aromático (C=C); 1527 cm^{-1} , dobramento da amida secundária (N-H); 1238 cm^{-1} , estiramento da amida secundária (C-N) (DENGALÉ et al., 2014a). E para o CQ 1 são: 3309 cm^{-1} , estiramento da hidroxila (O-H) sobreposto ao estiramento da amina primária e da amida secundária (N-H); 2878 cm^{-1} , estiramento dos carbonos alifáticos (C-H); 1620 cm^{-1} , estiramento da carbonila da amida secundária (C=O); 1519 cm^{-1} , dobramento da amida secundária (N-H); 1420 cm^{-1} , dobramento do carbono alifático CH_2 (C-H); 1378 cm^{-1} , deformação simétrica do carbono alifático CH_3 (C-H); 1150 cm^{-1} , estiramento assimétrico (C-O-C); 1064 e 1018 cm^{-1} , estiramento (C-O) (GE et al., 2018; QUEIROZ et al., 2014).

Figura 20 - Espectros de infravermelho do RTV I e do CQ1.



Na Figura 21, estão apresentados os espectros de FTIR do RTV I, do M RTV, do CQ 1, da MF RTV I-CQ 1 e da DS RTV 1-CQ 1. Comparando o espectro do M RTV I com o do RTV I, pode ser observado o alargamento de todas as bandas devido à amorfização parcial da amostra (DENGALÉ et al., 2015). Nenhum deslocamento de bandas foi observado. De forma similar, a comparação entre os espectros da mistura física e da dispersão sólida também mostrou um alargamento de todas as bandas para a dispersão sólida, e a sobreposição dos espectros não mostrou nenhum deslocamento de banda, sugerindo que não ocorreram ligações de hidrogênio entre o fármaco e o polímero (VASANTHAVADA et al., 2005). Esses resultados sugerem que a comoagem em moinho de esferas não seja uma boa forma de promover interações de hidrogênio entre o fármaco e o polímero.

Figura 21 - Espectros de infravermelho do CQ 1, do RTV I, do M RTV I, da MF RTV I-CQ 1 e da DS RTV I-CQ 1.



4.3.5 Estudo de dissolução

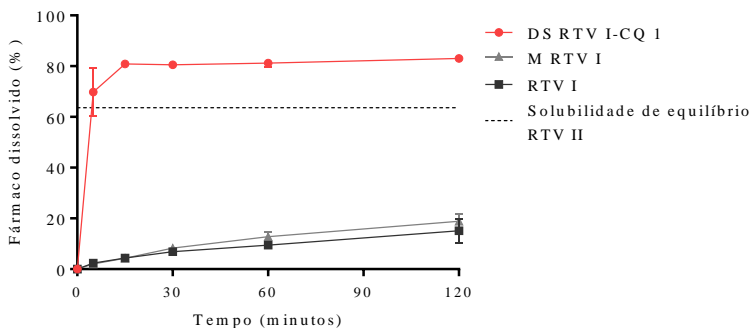
A solubilidade de equilíbrio do RTV II no P80 1% foi determinada para calcular o IS do teste de dissolução (Equação 1), sendo os resultados $42,62 \pm 2,64$ e $38,16 \mu\text{g/mL} \pm 1,58 \mu\text{g/mL}$ para o P80 1% com e sem o CQ 1 pré-dissolvido, respectivamente. Esses valores não apresentaram uma diferença estatística pelo teste T ($p=0,066$), indicando que o polímero não interferiu na solubilidade de equilíbrio do fármaco.

O IS calculado foi de 0,636, indicando uma condição não *sink* no teste de dissolução, uma vez que esse valor foi inferior à 3. Além disso, o IS inferior a 1 possibilita a ocorrência de supersaturação na cuba de dissolução. Nessa condição, quando a dissolução ultrapassa a concentração de equilíbrio da forma polimórfica mais estável (consequentemente de menor solubilidade), caracteriza-se a ocorrência de supersaturação (SUN; WEN; TAYLOR, 2016).

Os perfis de dissolução do RTV I, do M RTV I e da DS RTV I-CQ 1, em P80 1%, são apresentados na Figura 22, onde a solubilidade de equilíbrio (RTV II) está representada com uma linha pontilhada. O RTV I obteve uma dissolução de 15% e o M RTV I de 18%, ao final do experimento, indicando que a moagem do fármaco isolado não influenciou a sua dissolução. A DS RTV I-CQ 1 apresentou um perfil de liberação rápido (Figura 22), atingindo 80% de dissolução em 15 min

(“spring”), que se manteve até o final do experimento (“parachute”). Apesar da dispersão sólida obtida não apresentar a amorfização completa do RTV, os resultados de dissolução sugerem que ela atuou como um sistema supersaturado de liberação e que o CQ 1 atuou como inibidor de precipitação do RTV, qualificando o fármaco como adequado para o estudo da atividade antiprecipitante do polímero.

Figura 22 - Perfis de dissolução da DS RTV I-CQ 1, do M RTV I, do RTV I, e representação da solubilidade de equilíbrio do RTV II, em P80 1%.



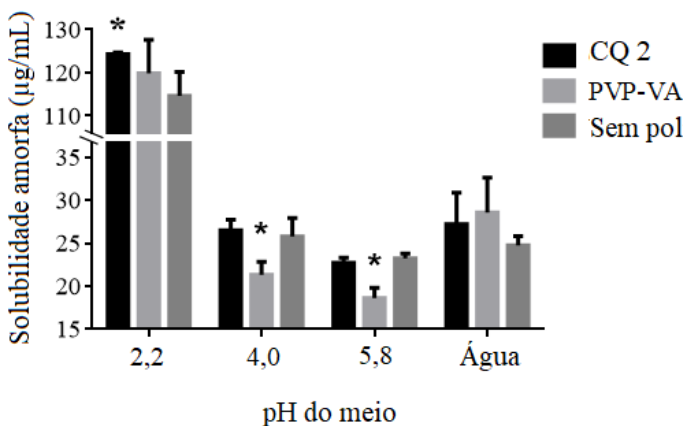
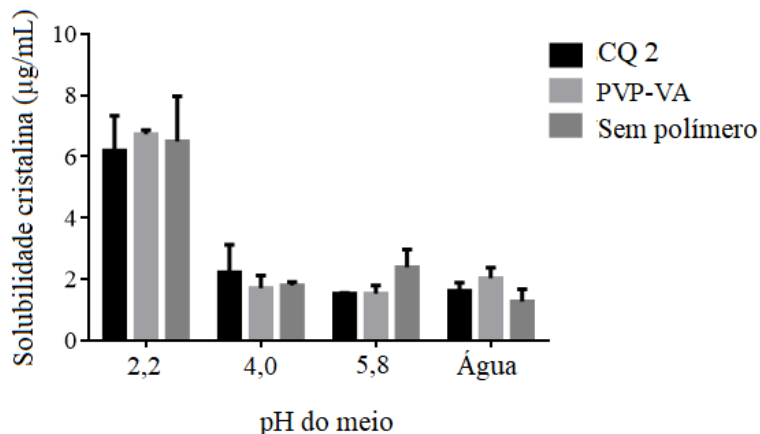
A solubilidade amorfa do RTV II, em P80 1%, foi de $405,06 \pm 14,21 \mu\text{g/mL}$, sendo 16 vezes superior à solubilidade amorfa do fármaco em água ($24,76 \mu\text{g/mL}$, conforme apresentado no item 4.4.1). O efeito do P80 em aumentar a solubilidade amorfa do RTV já foi demonstrado por outros autores (ILEVBARE; TAYLOR, 2013). O uso do tensoativo no meio foi importante para a avaliação da supersaturação gerada pela formulação, sem a ocorrência de SFL. A ocorrência de SFL pode atrapalhar a quantificação do fármaco na cuba de dissolução, pois dependendo do tamanho, as estruturas coloidais (que podem conter fármaco cristalizado) podem passar pelo ou aderir no filtro utilizado para remoção de partículas, levando à superestimação dos resultados de dissolução (SUN; WEN; TAYLOR, 2016).

4.4 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO RITONAVIR E DA ATIVIDADE ANTIPRECIPITANTE DO CLORIDRATO DE QUITOSANA

4.4.1 Determinação da solubilidade de equilíbrio e amorfa

A solubilidade de equilíbrio do RTV II foi determinada nos meios pré-selecionados, na presença e na ausência de CQ 2 e PVP-VA (Figura 23 A). O objetivo foi verificar se, na concentração utilizada (50 µg/mL), os polímeros exerceram qualquer efeito na solubilidade cristalina do fármaco. É bem reconhecido que, para avaliar o efeito de adsorção de um inibidor de precipitação à superfície de crescimento cristalino, é importante empregar uma concentração baixa do aditivo em estudo, que não exerça efeitos sobre a viscosidade da solução ou sobre a solubilidade de equilíbrio do fármaco (ILEVBARE et al., 2012b).

Figura 23 - (A) Solubilidade de equilíbrio e (B) Solubilidade amorfa do RTV em diferentes meios, com e sem a presença de polímeros pré-dissolvidos, a 37 °C.



*resultado estatisticamente diferente comparado ao respectivo meio sem o polímero ($p < 0,05$).

O RTV II se comportou como uma base fraca, mostrando uma solubilidade pH dependente. No pH 2,2, devido à ionização do fármaco, a solubilidade de equilíbrio foi maior em relação aos outros meios (água, pH 4,0 e pH 5,8), nos quais a solubilidade foi equivalente (Figura 23 A).

Quando avaliados os resultados para cada meio (água, pH 2,2, 4,0 e 5,8), a presença de CQ 2 e PVP-VA não interferiu estatisticamente ($p > 0,05$) na solubilidade de equilíbrio do fármaco, em relação ao respectivo meio sem polímero (Figura 23 A). Sendo assim, ficou demonstrado que a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ é adequada para avaliar a atividade antiprecipitante dos polímeros empregados (item 4.4.2), uma vez que não havendo alteração na solubilidade de equilíbrio do fármaco, qualquer impacto do polímero nas taxas de crescimento dos cristais não se deverá à alteração do grau de supersaturação. Além disso, é razoável assumir que a viscosidade dos meios contendo polímero, na baixa concentração utilizada, é essencialmente a mesma que os meios sem polímero, eliminando os efeitos de transporte de massa no crescimento cristalino (ILEVBARE et al., 2012a).

Para a determinação da solubilidade amorfa do RTV (Figura 23 B), foi induzida a supersaturação pela adição de uma solução metanólica do fármaco em cada meio estudado, gerando uma turbidez fracamente azulada, que confirmou que as concentrações adicionadas estavam acima da solubilidade amorfa e que ocorreu a SFL (ILEVBARE et al., 2013b). Então, após a ultracentrifugação das amostras, a solubilidade amorfa foi determinada como a concentração do fármaco na fase molecularmente dispersa. De forma semelhante à solubilidade de equilíbrio, a solubilidade amorfa do fármaco foi maior no pH 2,2 em comparação aos demais meios. Nos meios com pH 4,0, 5,8 e na água, ocorreu uma redução da solubilidade amorfa em relação ao pH 2,2, devido à não ionização da molécula do RTV. (ILEVBARE; TAYLOR, 2013).

Quando avaliados os resultados na presença de CQ 2, ocorreu uma diferença estatística na solubilidade amorfa do fármaco no meio com pH 2,2 (Figura 23 B), sendo maior na presença do CQ 2 em relação ao respectivo meio sem polímero ($p > 0,05$). No caso do PVP-VA, a solubilidade amorfa foi estatisticamente inferior nos meios de pH 4,0 e 5,8 contendo o polímero, em relação aos respectivos meios sem polímero. Isso pode ter ocorrido por limitações apresentadas pelo método da ultracentrifugação na determinação da solubilidade amorfa. Nos casos em que uma quantificação mais precisa é necessária, um conjunto de técnicas deve ser utilizado (PUROHIT; TAYLOR, 2017).

4.4.2 Avaliação da atividade antiprecipitante pelo método *solvent-shift*

Neste trabalho, foi comprovada a atividade antiprecipitante do CQ em soluções supersaturadas do RTV (Figuras 24 e 25 B). Para uma

melhor compreensão do trabalho, um fluxograma com os principais resultados é apresentado no Anexo A. O PVP-VA foi escolhido por ser um polímero não iônico (solúvel nos valores de pH selecionados para o presente estudo), com atividade antiprecipitante relatada na literatura (PRICE et al., 2019) e utilizado na formulação de referência do RTV (Norvir[®] comprimidos), na forma de dispersão sólida. Assim como o CQ, o PVP-VA é um copolímero com unidades hidrofílicas e hidrofóbicas.

A solubilidade de equilíbrio do RTV II, determinada nos meios sem polímero (Figura 23 A), foi utilizada para transformar os resultados de concentração ($\mu\text{g/mL}$) obtidos no método *solvente-shift* para GS (BEVERNAGE et al., 2011, 2013; PAS et al., 2018). Os gráficos de GS *versus* tempo, nos diferentes meios estudados, estão representados na Figura 24. Os valores de área sob a curva, obtidos a partir desses gráficos, foram utilizados para calcular os valores de FS (Equação 6) e de FGE (Equação 7), que são apresentados na Figura 25 (A e B, respectivamente). O experimento foi mantido por 240 min devido ao fato do RTV ser um fármaco cristalizador lento (ILEVBARE et al., 2013a). A baixa concentração dos polímeros ($50 \mu\text{g/mL}$) possibilitou a avaliação do efeito antiprecipitante dos polímeros pelo mecanismo de adsorção (ILEVBARE et al., 2012b), em que o polímero é adsorvido na superfície do cristal em crescimento, bloqueando o acesso das moléculas do fármaco em solução a essa superfície (PRICE et al., 2019).

Figura 24 - GS do RTV *versus* tempo e as respectivas AUC em pH 2,2, 4,0 e pH 5,8, com e sem a presença de polímeros pré-dissolvidos.

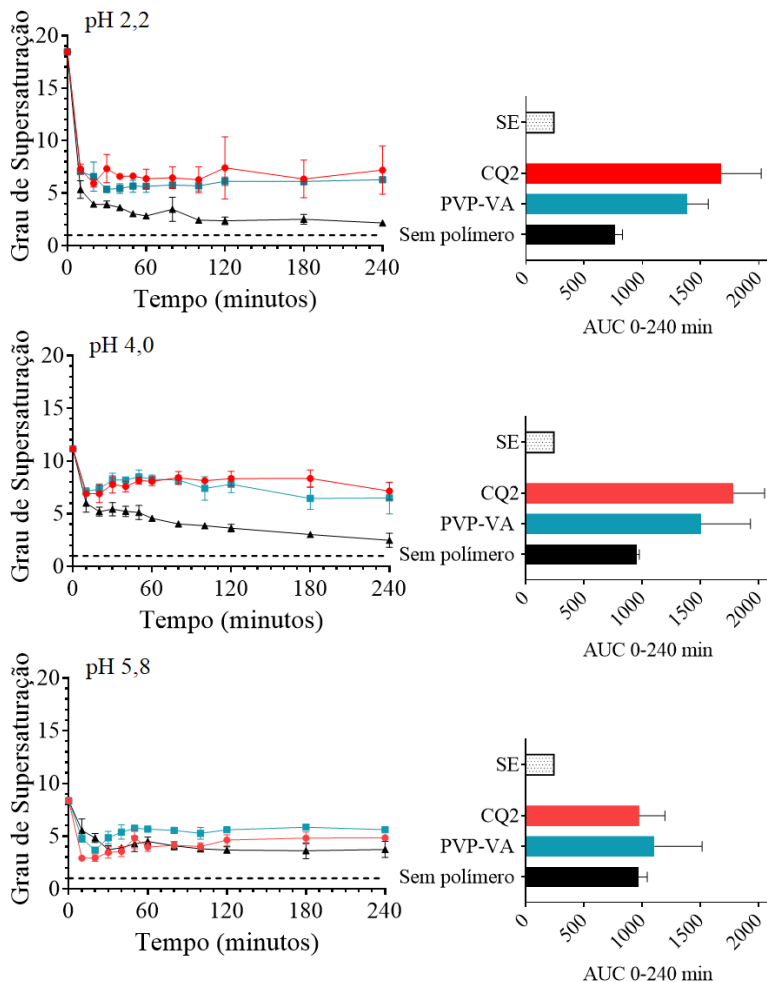
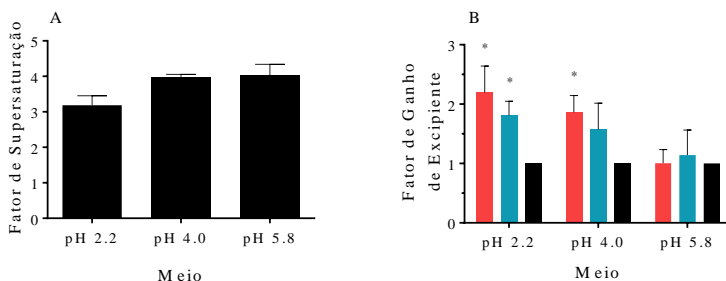


Figura 25 - FS do RTV (A) e FGE (B) obtidos pelo método *solvente-shift* em pH 2,2, 4,0 e 5,8.



*resultado estatisticamente diferente comparado ao respectivo meio sem o polímero ($p < 0,05$).

Na Figura 24, pode ser observado que o GS inicial de RTV induzido nos diferentes meios foi de 18,4 (pH 2,2), 11,1 (pH 4,0) e 8,38 (pH 5,8). Quanto maior o GS de RTV inicial induzido, menor foi o FS, que é um parâmetro obtido para os meios sem a presença dos polímeros (Figura 25 A). Tendo como base a teoria da supersaturação, quanto maior o GS gerado, maior a força motriz para a precipitação, justificando a obtenção de menores FS para meios com maior GS inicial (ILEVBARE et al., 2012b; SUN; WEN; TAYLOR, 2016).

A inibição da precipitação do RTV mediada pelos polímeros em diferentes valores de pH é apresentada na Figura 25 B, na forma de FGE. Os polímeros tiveram maior FGE ($p < 0,05$) no pH 2,2, exibindo um aumento de 2,19 (CQ 2) e 1,99 (PVP-VA) vezes na AUC do gráfico de GS *versus* tempo, em relação ao meio sem polímero, mesmo tendo sido induzido um maior GS inicial. Esse fato sugere que a ionização dos anéis tiazólicos do RTV no pH 2,2 pode levar à formação de ligações de hidrogênio iônicas com os polímeros em solução. Ligações de hidrogênio iônicas são forças intermoleculares fortes. Quando os anéis tiazólicos estão protonados, eles atuam como doadores de prótons (MEOT-NER, 2005). O PVP-VA possui somente grupos aceptores de prótons (TAYLOR; ZHANG, 2016), enquanto o CQ 2 possui grupos aceptores e doadores. Ambos têm potencial para formar ligações de hidrogênio iônicas com o RTV em pH 2,2, justificando uma melhor inibição da precipitação exercida pelos polímeros nesse pH.

No pH 4,0, as moléculas de RTV estão em um estado não ionizado. Na forma neutra, o anel tiazólico do fármaco é um potencial aceptor de prótons, devido à eletronegatividade do N presente no anel. Nesse meio, somente o CQ 2 apresentou FGE estatisticamente significativo, com um aumento de 1,86 vezes na AUC do gráfico de GS *versus* tempo, em relação ao meio sem polímero. Isso sugere que o CQ 2 também foi capaz de formar interações com os anéis tiazólicos, devido à presença de grupos doadores de prótons da amida e da amina em sua molécula. O PVP-VA só possui grupamentos aceptores de prótons, não sendo capaz de formar ligações de hidrogênio com o anel tiazólico do RTV na forma não ionizada (GILLI et al., 2009). Isso pode explicar o fato de o PVP-VA não ter demonstrado uma diferença estatisticamente significativa no FGE quando comparado com o meio sem polímero, enquanto o CQ 2 demonstrou.

No pH 5,8, mesmo com o menor GS inicial induzido, nenhum dos polímeros apresentou diferenças estatisticamente significativas no FGE quando comparados do meio sem polímero. O meio escolhido (tampão acetato de sódio) pode ter levado a um efeito *salting-out* nos polímeros, favorecendo interações hidrofóbicas intramoleculares nas cadeias poliméricas, diminuindo o espaço ocupado pelos polímeros na solução (DUPUIS; LEHOUX, 2007; SADEGHI; JAHANI, 2012), reduzindo a atividade antiprecipitante.

Além da interação entre o fármaco e o CQ 2 ou o PVP-VA por ligações de hidrogênio, a adsorção dos polímeros ao RTV, que dificulta a nucleação e o crescimento cristalino, com conseqüente inibição de precipitação em solução, pode também estar associada a outros fenômenos. A estrutura do polímero pode favorecer ou não a interação com o fármaco, visto que um esqueleto rígido polissacarídico, como o do CQ 2, pode permitir mais contato com a superfície cristalina do RTV em comparação ao PVP-VA, um polímero sintético e flexível, que forma “*loops*” que limitam o contato com a superfície cristalina (ILEVBARE et al., 2012a).

Os resultados apresentados indicam que o CQ 2 pode potencialmente ser um bom carreador em dispersões sólidas de RTV, devido à sua atividade antiprecipitante do fármaco, semelhante à do PVP-VA. Tanto em um estado de baixa ionização, como em um estado neutro, que representam os momentos críticos para a precipitação do fármaco.

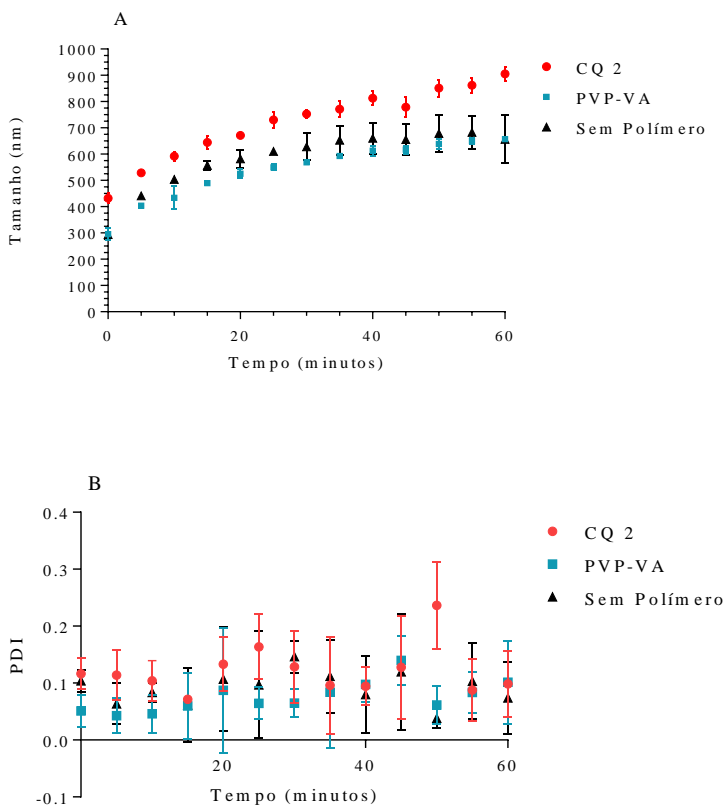
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA FASE COLOIDAL POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

É observado que para fármacos que cristalizam lentamente, quando em soluções supersaturadas a uma concentração acima da solubilidade amorfa, ocorre a SFLL, gerando domínios ricos em fármaco de estado coloidal, que coexistem com a fase molecularmente dispersa no solvente. O coloide é composto de fármaco amorfo e uma pequena porcentagem de água. Após a ingestão de uma dispersão sólida, esses domínios ricos em fármaco podem atuar como reservatórios de fármaco, liberando mais fármaco no meio, quando este é absorvido (INDULKAR et al., 2015). Polímeros são utilizados para estabilizar as dispersões coloidais e também podem servir como agentes inibitórios da nucleação e do crescimento cristalino. Existe também a hipótese de que essas estruturas coloidais podem ser absorvidas diretamente pelo sistema linfático quando possuem um tamanho inferior a 100 nm (ILEVBARE et al., 2013b).

Os efeitos do CQ 2 e do PVP-VA no tamanho da fase coloidal do RTV são mostrados na Figura 26. Os ensaios foram realizados em água devido à melhor qualidade do sinal obtido pelo equipamento. A adição de RTV na concentração de 60 µg/mL (acima da solubilidade amorfa), através do método *solvent-shift*, gerou uma cor azulada nos meios, confirmando que ocorreu a SFLL.

Na Figura 26 A, pode-se observar que os polímeros tiveram impactos diferentes no tamanho inicial e na estabilidade dos coloides. As estruturas aumentaram de tamanho ao longo do tempo, no experimento, caracterizando a coalescência. O tamanho inicial dos coloides formados na presença do CQ 2 foi maior do que na presença do PVP-VA e na água (432, 295 e 294 nm, respectivamente). Além disso, a coalescência foi maior na presença do CQ 2 do que na presença do PVP-VA e sem a presença dos polímeros. Os índices de polidispersão (PDI) inferiores a 0,3 mostram que as estruturas coloidais formadas são homogêneas (Figura 26 B).

Figura 26 - (A) Tamanho médio dos coloides de RTV em função do tempo. (B) Índice de polidispersão médio das estruturas coloidais em função do tempo.



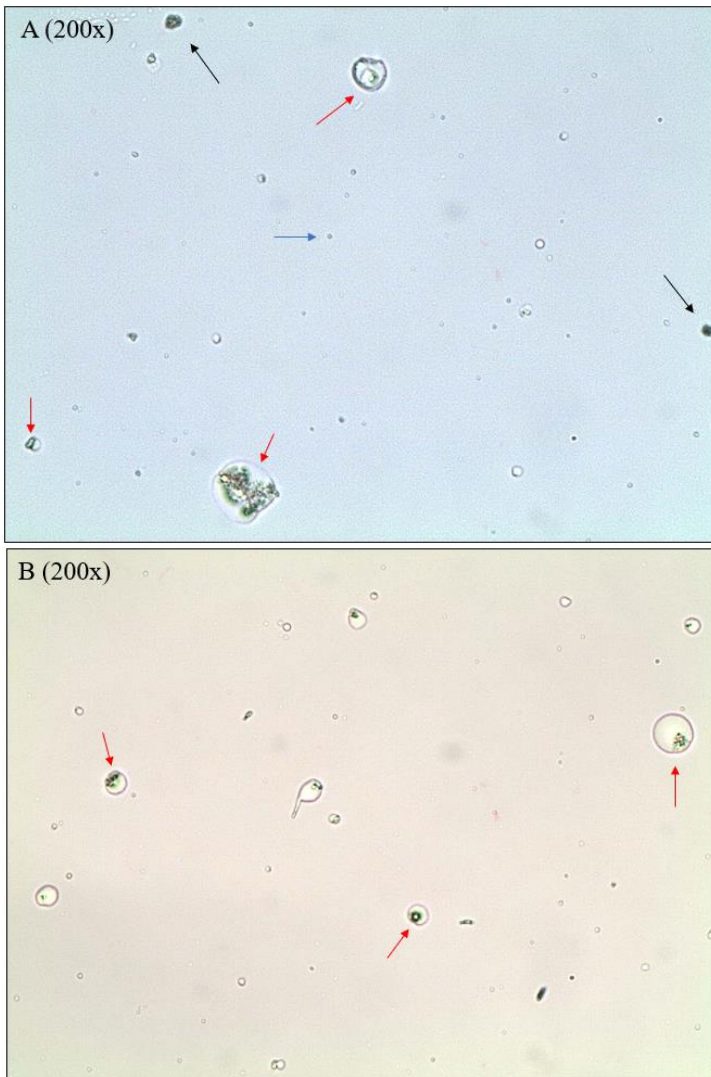
Para complementar a análise de tamanho e verificar os efeitos dos polímeros na inibição da cristalização a partir do estado coloidal, as amostras foram observadas por microscopia de luz polarizada, nas mesmas condições experimentais, ao final do experimento (Figura 27). As imagens mostram que os coloides caracterizados por espalhamento de luz dinâmico (Figura 26) apresentam tamanhos inferiores à resolução do microscópio de luz polarizada, aparecendo fracamente ao fundo das imagens (indicados pelas setas azuis na Figura 27). Entretanto, estruturas maiores e com tamanho heterogêneo foram também observadas, as quais

não foram detectadas na análise de tamanho (Figura 26 A) possivelmente devido à baixa quantidade presente em solução.

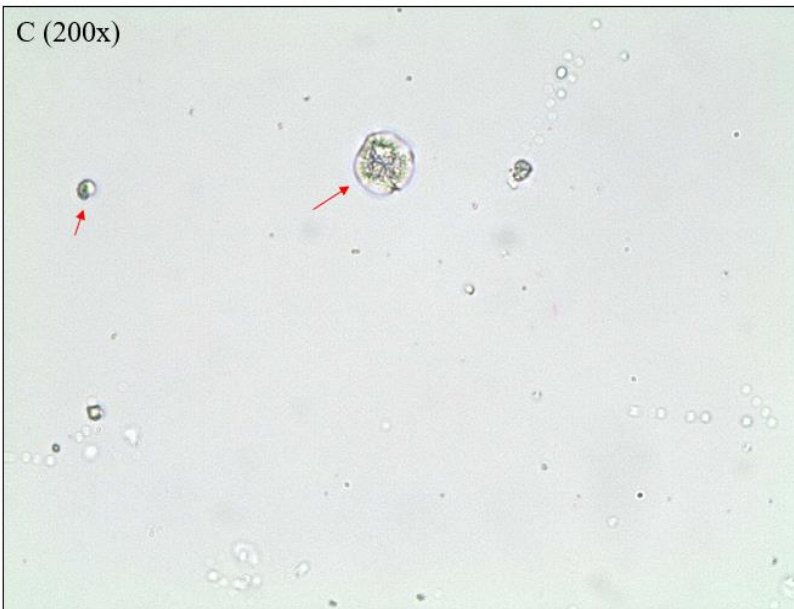
A maior coalescência dos coloides formados na presença de CQ 2 (Figura 26 A) é confirmada na Figura 27 F, que mostra a agregação das estruturas coloidais. Na Figura 27, E e G, podem ser vistos precipitados amorfos (não birrefringentes, indicados pelas setas pretas). Apesar da coalescência, não foram observados cristais no interior das estruturas coloidais no meio contendo CQ 2, na análise de microscopia de luz polarizada, sugerindo que o polímero pode se inserir dentro dessas estruturas e inibir a cristalização, embora não a coalescência. Esse fenômeno foi anteriormente relatado em um estudo com o RTV para o derivado de celulose HPMC (ILEVBARE et al., 2013b).

O PVP-VA não influenciou no comportamento da fase coloidal quando comparado com o meio sem polímero na análise de tamanho (Figura 26 A). As imagens de microscopia de luz polarizada (Figura 27 A, B, C, D) mostram que ocorreu a cristalização do RTV no interior dos coloides no meio contendo PVP-VA e no meio sem polímero, indicando que esse polímero tem pouco efeito sobre os coloides de RTV. As estruturas formadas em água sem polímero também apresentaram uma forma mais irregular quando comparado às estruturas formadas nos meios contendo o polímero (Figura 27 I).

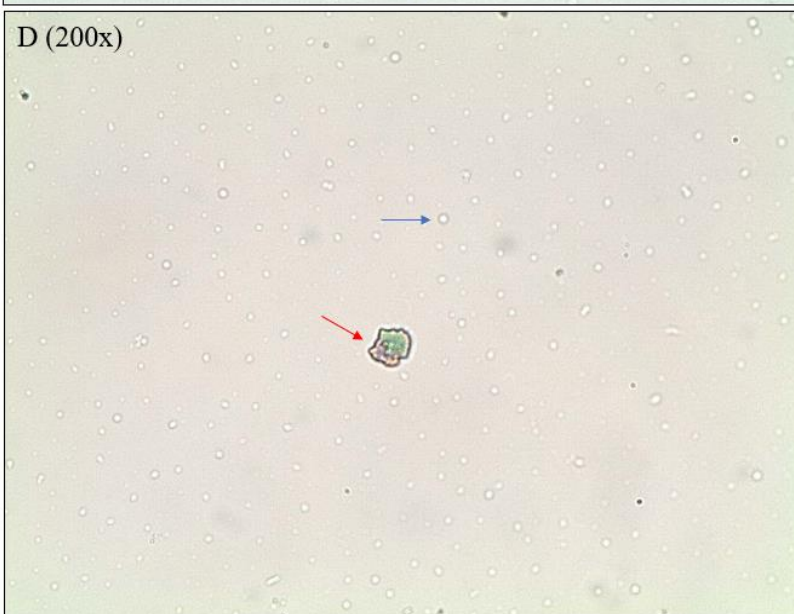
Figura 27 - Micrografias de luz polarizada da fase dispersa do RTV em meio aquoso: com PVP-VA (A, B, C e D); com CQ 2 (E, F, G e H); sem polímero (I, J, K). As setas vermelhas indicam estruturas cristalinas, as setas pretas indicam estruturas amorfas e as setas azuis indicam a fase detectada na análise de tamanho.

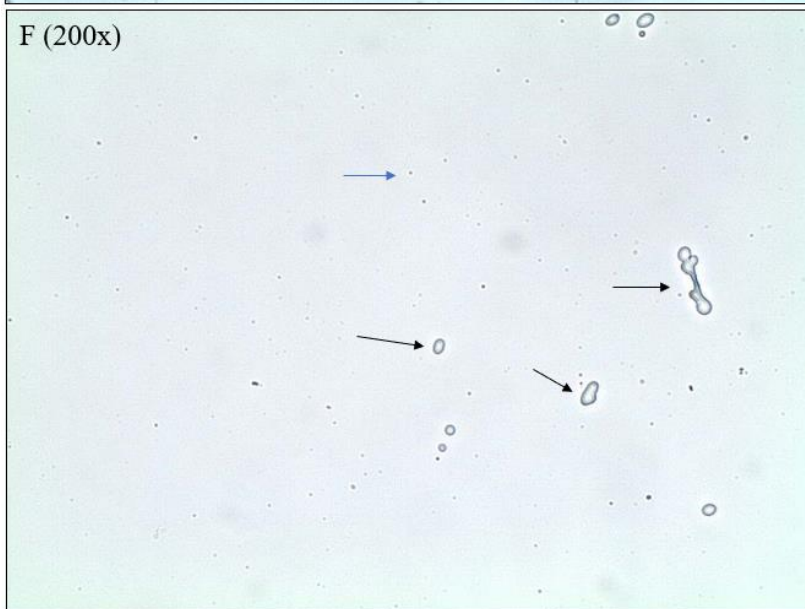
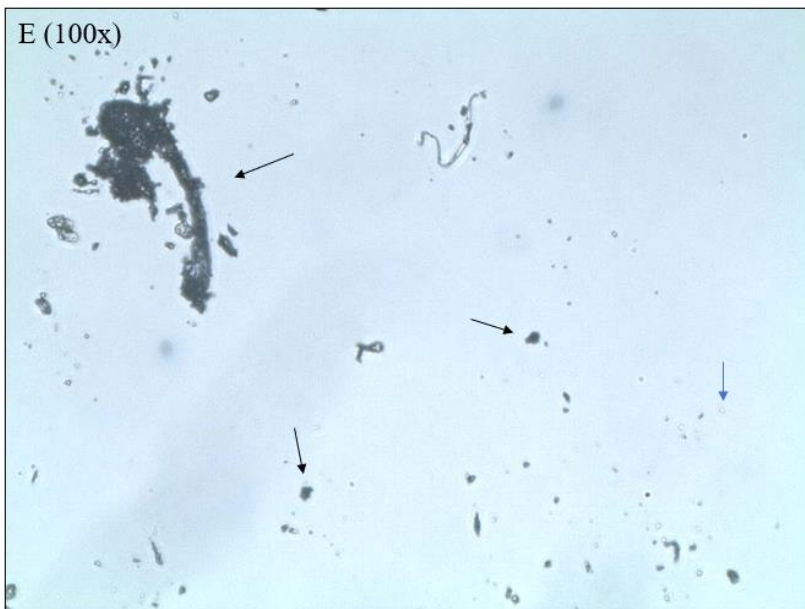


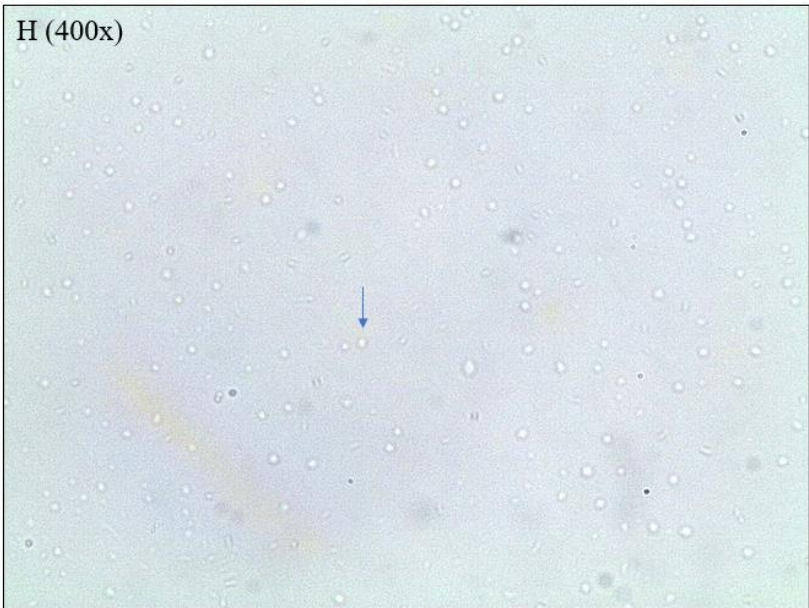
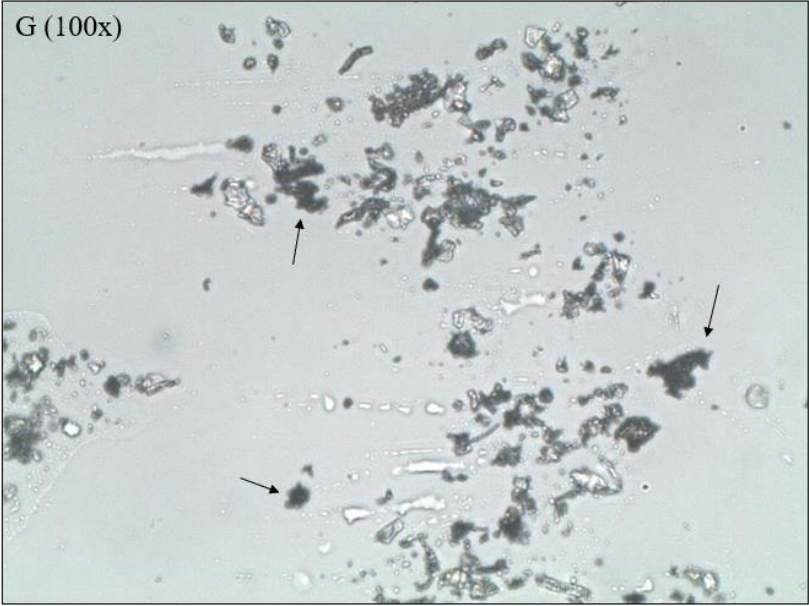
C (200x)

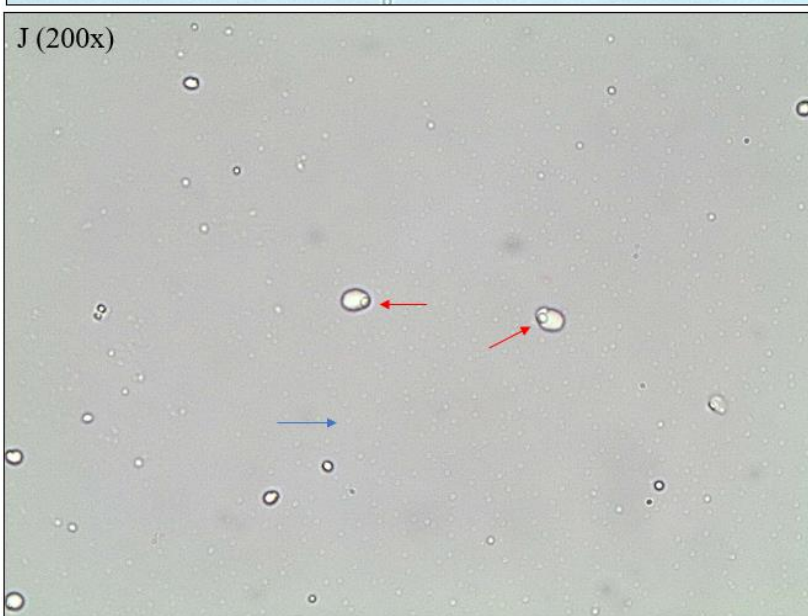
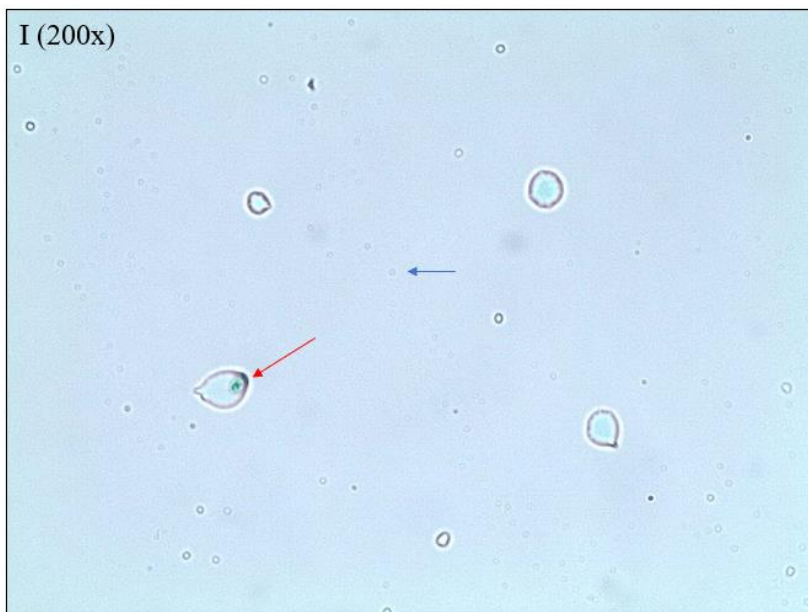


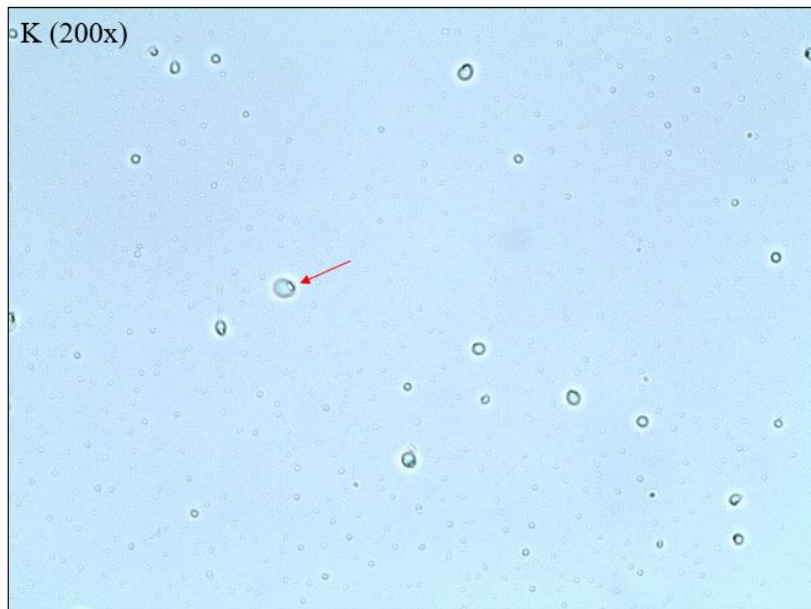
D (200x)











5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram investigados os efeitos do CQ como um carreador em dispersão sólida de RTV (polimorfo I) obtida pelo método da comoagem em moinho de esferas. As análises do estado sólido mostraram que ocorreu a formação de uma dispersão sólida com uma fase cristalina remanescente, indicando que as condições de moagem e/ou a proporção entre o fármaco e o polímero não foram suficientes para a total amorfização. A redução no ponto de fusão do RTV na presença de CQ demonstrou a boa miscibilidade entre o fármaco e o polímero. Entretanto, não foi evidenciada a formação de ligações de hidrogênio entre esses componentes, no estado sólido, indicando que a comoagem não favoreceu a formação deste tipo de interação. O perfil de dissolução da dispersão sólida mostrou gerar e manter a supersaturação do RTV sem a ocorrência de precipitação.

Os efeitos do CQ em soluções supersaturadas de RTV foram avaliados pelo método *solvent-shift*, em comparação ao polímero não iônico PVP-VA para a quantificação da atividade antiprecipitante e avaliação do tamanho e morfologia da fase coloidal. A atividade antiprecipitante do CQ foi superior à do PVP-VA nos pHs 2,2 e 4,0, em que o fármaco se encontra parcialmente ionizado e não ionizado, respectivamente. A fase coloidal do RTV formada em meio aquoso na presença do CQ mostrou-se maior do que a formada na presença do PVP-VA e sem a presença dos polímeros. Foi observada a coalescência dos coloides de fármaco tanto na ausência como na presença dos polímeros, entretanto o precipitado formado foi amorfo para o CQ 2, enquanto foi observada a cristalização do fármaco no meio contendo PVP-VA e na água.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHALAWEH, A.; BERGSTRÖM, C. A. S.; TAYLOR, L. S. Compromised in vitro dissolution and membrane transport of multidrug amorphous formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 229, p. 172–182, 2016.

ALMEIDA E SOUSA, L. et al. Supersaturation potential of salt, co-crystal, and amorphous forms of a model weak base. **Crystal Growth Desing**, v. 16, n. 2, p. 737–748, 2016.

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, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANSEL, H.C., ALLEN JUNIOR, L.V., POPOVICH, N.G., **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 9 ed: Porto Alegre, Artmed, 2013.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 15–28, 2014.

ASADA, M. et al. Theophylline particle design using chitosan by the spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 167–174, 2004.

BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Polymeric amorphous solid dispersions: A review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilization of biopharmaceutical classification system class II drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2527–2544, 2016.

BAIRD, J. A.; TAYLOR, L. S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 5, p. 396–421, 2012.

BAUER, J. et al. **Polymorph of a pharmaceutical**. U.S. Patent n. 8,674,112, 18 de março 2014.

BAUER, J. et al. Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 859–866, 2001.

BELLICH, B. et al. “The good , the bad and the ugly” of chitosans. **Marine Drugs**, v. 14, n. 99, p. 2–31, 2016.

BERGSTRÖM, C. A. S.; LARSSON, P. Computational prediction of drug solubility in water-based systems: Qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development setting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 540, n. 1–2, p. 185–193, 2018.

BERRY, D. J.; STEED, J. W. Pharmaceutical cocrystals, salts and multicomponent systems; intermolecular interactions and property based design. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 3–24, 2017.

BEVERNAGE, J. et al. Excipient-Mediated Supersaturation Stabilization in Human Intestinal Fluids. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 564–570, 2011.

BEVERNAGE, J. et al. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 25–35, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada n° 166, de 24 de julho de 2017**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25/07/2017. n° 141, Seção 1, p. 87.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica**. Guia n° 10, Versão 1, 30/08/2017. Disponível em < <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/357431>>.

BROUWERS, J.; BREWSTER, M. E.; AUGUSTIJNS, P. Supersaturating drug delivery systems: The answer to solubility-limited oral bioavailability? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 8, p. 2549–2572, 2009.

CENSI, R.; DI MARTINO, P. Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs. **Molecules**, v. 20, p. 18759–18776,

2015.

CLARYSSE, S. et al. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 260–269, 2011.

COSTA, C. N. et al. Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 245–250, 2015.

COUNCIL OF EUROPE. **European pharmacopoeia**. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2013. v.1, il. (European Treaty series, n.50), p. 1841-1842

CRUCITTI, V. C. et al. Intermolecular interactions and solid state characterization of abietic acid/chitosan solid dispersion possessing antimicrobial and antioxidant properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 125, p. 114–123, 2018.

DÉMUTH, B. et al. Detailed stability investigation of amorphous solid dispersions prepared by single-needle and high speed electrospinning. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 498, n. 1–2, p. 234–244, 2016.

DENGALE, S. J. et al. Preparation and characterization of co-amorphous Ritonavir-Indomethacin systems by solvent evaporation technique: Improved dissolution behavior and physical stability without evidence of intermolecular interactions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 57–64, 2014a.

DENGALE, S. J. et al. Fabrication , solid state characterization and bioavailability assessment of stable binary amorphous phases of Ritonavir with Quercetin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 1–9, 2014b.

DENGALE, S. J. et al. Fabrication, solid state characterization and bioavailability assessment of stable binary amorphous phases of Ritonavir with Quercetin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 329–338, 2015.

DESHMUKH, A.; KULKARNI, S. Solid self-microemulsifying drug delivery system of ritonavir. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 4, p. 477–487, 2013.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 184–191, 2013.

DUPUIS, G.; LEHOUX, J. Recovery of chitosan from aqueous acidic solutions by salting-out. Part 2: Use of salts of organic acids. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 287–294, 2007.

ELGADIR, M. et al. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 619–629, 2014.

ELLENBERGER, D. J. et al. Generation of a weakly acidic amorphous solid dispersion of the weak base ritonavir with equivalent in vitro and in vivo performance to Norvir tablet. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 5, p. 1985–1997, 2018.

ETZLER, F. M.; UDDIN, M. N. Powder technology and pharmaceutical development: Particle size and particle adhesion. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 30, p. 125–143, 2013.

FAHIM, T. K. et al. Particle formation and micronization using non-conventional techniques - review. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 86, p. 47–52, 2014.

GE, J. et al. Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 23–31, 2018.

GHADI, R.; DAND, N. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. **Journal of Controlled Release**, v. 248, p. 71–95, 2017.

GILLI, P. et al. Predicting hydrogen-bond strengths from acid-base molecular properties. The pKa slide rule: Toward the solution of a long-lasting problem. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 1, p. 33–44, 2009.

GÖKE, K. et al. Novel strategies for the formulation and processing of poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 126, p. 40–56, 2018.

GURUNATH, S. et al. Amorphous solid dispersion method for improving oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 4, p. 476–480, 2013.

HADJITTOFIS, E. et al. Influences of crystal anisotropy in pharmaceutical process development. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 100, p. 2–22, 2018.

HARMON, P. et al. Mechanism of dissolution-induced nanoparticle formation from a copovidone-based amorphous solid dispersion. **Molecular Pharmaceutics**, v. 23, p. 1467–1481, 2016.

HUANG, R. et al. Surfactant-free solid dispersion of BCS class IV drug in an amorphous chitosan oligosaccharide matrix for concomitant dissolution in vitro - permeability increase. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 130, p. 147–155, 2019.

HUANG, S.; WILLIAMS III, R. O. Effects of the preparation process on the properties of amorphous solid dispersions. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 5, p. 1971–1984, 2018.

ILEVBARE, G. A. et al. Understanding polymer properties important for crystal growth inhibition - Impact of chemically diverse polymers on solution crystal growth of ritonavir. **Crystal Growth Desing**, v. 12, p. 3133–3143, 2012a.

ILEVBARE, G. A. et al. Inhibition of solution crystal growth of ritonavir by cellulose polymers – factors influencing polymer effectiveness. **CrystEngComm**, v. 14, n. 20, p. 6503–6514, 2012b.

ILEVBARE, G. A. et al. Maintaining supersaturation in aqueous drug solutions: Impact of different polymers on induction times. **Crystal Growth and Design**, v. 13, n. 2, p. 740–751, 2013a.

ILEVBARE, G. A. et al. Influence of additives on the properties of nanodroplets formed in highly supersaturated aqueous solutions of

ritonavir. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 9, p. 3392–3403, 2013b.

ILEVBARE, G. A.; TAYLOR, L. S. Liquid-liquid phase separation in highly supersaturated aqueous solutions of poorly water-soluble drugs: Implications for solubility enhancing formulations. **Crystal Growth Design**, v. 13, n. 4, p. 1497–1509, 2013.

INDULKAR, A. S. et al. pH-Dependent liquid-liquid phase separation of highly supersaturated solutions of weakly basic drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 7, p. 2365–2377, 2015.

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

JERMAIN, S. V; BROUGH, C.; WILLIAMS, R. O. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery - An update. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 157–166, 2018.

JÓŹWIAK, T. et al. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye. **Reactive and Functional Polymers**, v. 114, p. 58–74, 2017.

KHADKA, P. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 304–316, 2014.

KUMAR, S. G. V; MISHRA, D. N. Preparation, characterization and in vitro dissolution studies of solid systems of valdecoxib with chitosan. **Chem Pharm Bull**, v. 54, n. 8, p. 1102–1106, 2006.

LÁNG, P. et al. Analysis of the polymorph changes of a drug candidate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 229–235, 2015.

LAITINEN, R., PRIEMEL, P.A., SURWASE, S. et al. Theoretical considerations in developing amorphous solid dispersions, In: SHAH, N., SANDHU, H., CHOI, D.S., et al., (eds), **Amorphous solid dispersions: Theory and practice**, 1st ed: New York, Springer, 2014.

LAURIENZO, P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2435–2465, 2010.

LAW, D. et al. Physicochemical considerations in the preparation of amorphous ritonavir-poly(ethylene glycol) 8000 solid dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 8, p. 1015–1025, 2001.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3–25, 1997.

LIU, P. et al. Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 748–756, 2013a.

LIU, Q. et al. Enhanced dissolution and oral bioavailability of tanshinone IIA base by solid dispersion system with low-molecular-weight chitosan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 839–846, 2013b.

LIU, X. et al. Characterization of amorphous solid dispersions. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 48, n. 1, p. 19–41, 2017.

LOH, Z. H.; SAMANTA, A. K.; SIA HENG, P. W. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 255–274, 2015.

LU, J.; ROHANI, S. Polymorphism and Crystallization of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs). **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 884–905, 2009.

MCCARTHY, C. A. et al. In vitro dissolution models for the prediction of in vivo performance of an oral mesoporous silica formulation. **Journal of Controlled Release**, v. 250, p. 86–95, 2016.

MENG, F.; GALA, U.; CHAUHAN, H. Classification of solid dispersions: correlation to (I) stability and solubility (II) preparation and characterization techniques. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 9, p. 1401–1415, 2015.

MEOT-NER, M. Update 1 of: The ionic hydrogen bond. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 1, p. 213–284, 2005.

MILLER, D. A. et al. Bioavailability enhancement of a BCS IV compound via an amorphous combination product containing ritonavir. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 678–691, 2016.

MINH, N. C.; NGUYEN, V. H.; SCHWARZ, S. Preparation of water soluble hydrochloric chitosan from low molecular weight chitosan in the solid state. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 718–726, 2018.

MISHRA, D. K. et al. Amorphous solid dispersion technique for improved drug delivery: basics to clinical applications. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, n. 6, p. 552–565, 2015.

MORISSETTE, S. L. et al. Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2180–2184, 2003.

NART, V. et al. Ball-milled solid dispersions of BCS Class IV drugs: Impact on the dissolution rate and intestinal permeability of acyclovir. **Materials Science and Engineering C**, v. 53, p. 229–238, 2015.

NGUYEN, M.; TRAN, T.; HADINOTO, K. Controlling the burst release of amorphous drug–polysaccharide nanoparticle complex via crosslinking of the polysaccharide chains. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 156–163, 2016.

OSTROWSKA-CZUBENKO, J.; PIERÓG, M. State of water in citrate crosslinked chitosan membrane. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives**, v. XV, p. 33–40, 2010.

PANDYA, R.; MEHTA, T.; GOHEL, M. Amalgamation of solid dispersion and adsorption technique: A case study of ritonavir. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 699–709, 2015.

PAS, T. et al. Ability of gelatin and BSA to stabilize the supersaturated state of poorly soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 131, p. 211–223, 2018.

PAS, T.; VERGAUWEN, B.; VAN DEN MOOTER, G. Exploring the feasibility of the use of biopolymers as a carrier in the formulation of amorphous solid dispersions – Part I: Gelatin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 47–58, 2018.

PEZZINI, B. R. *et al.* **Dispersão sólida, processo de obtenção de dispersão sólida, uso de dispersão sólida e composição farmacêutica.** Brasil. Patente n. 1020160239907, 14 de outubro de 2016

PORTERO, A.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L. Effect of chitosan and chitosan glutamate enhancing the dissolution properties of the poorly water soluble drug nifedipine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, n. 1, p. 75–84, 1998.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado Sólido na Indústria Farmacêutica: Uma Breve Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2080–2112, 2015.

PRICE, D. J. *et al.* Approaches to increase mechanistic understanding and aid in the selection of precipitation inhibitors for supersaturating formulations – a PEARL review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, p. 483–509, 2019.

PUROHIT, H. S.; TAYLOR, L. S. Phase Behavior of Ritonavir Amorphous Solid Dispersions during Hydration and Dissolution. **Pharm Res**, v. 34, n. 12, p. 2842–2861, 2017.

QI, S. *et al.* Characterization of Solid-State Drug Polymorphs and Real-Time Evaluation of Crystallization Process Consistency by Near-Infrared Spectroscopy. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 1–7, 2018.

QUEIROZ, M. F. *et al.* Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation. **Marine Drugs**, v. 13, p. 141–158, 2014.

RASK, M. B. *et al.* Comparison of two DSC-based methods to predict drug-polymer solubility. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 540, p. 98–105, 2019.

RU, G. *et al.* Inverse solubility of chitin/chitosan in aqueous alkali solvents at low temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 487–

492, 2018.

SADEGHI, R.; JAHANI, F. Salting-in and salting-out of water-soluble polymers in aqueous salt solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 17, p. 5234–5241, 2012.

SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure-activity relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846–3868, 2017.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

SEKIGUCHI, K.; OBI, N. Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 9, n. 11, p. 866–872, 1961.

SEVRIOUKOVA, I.; POULOS, T. L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: Recent advances and remaining problems. **Dalton Transaction**, v. 42, n. 9, p. 3116–3142, 2012.

SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. G. L. Amidon, H. Lennernas, V. P. Shah, and J. R. Crison. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability, *Pharm Res* 12, 413 – 420, 1995 — Backstory of BCS. **Pharm Res**, v. 16, n. 5, p. 894–898, 2014.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 131–194, 2018.

SHETE, A. S.; YADAV, A. V.; MURTHY, S. M. Chitosan and chitosan chlorhydrate based various approaches for enhancement of dissolution rate of carvedilol. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 1–9, 2012.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, p. 159–166, 1999.

SINHA, S. et al. Solid Dispersion as an Approach for Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drug Ritonavir. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 518–527, 2010.

SMETS, G.; RÜDELSHEIM, P. Biotechnologically produced chitosan for nanoscale products. A legal analysis. **New Biotechnology**, v. 42, p. 42–47, 2018.

STILLHART, C.; CAVEGN, M.; KUENTZ, M. Study of drug supersaturation for rational early formulation screening of surfactant/co-solvent drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 181–192, 2012.

SUN, D. D.; WEN, H.; TAYLOR, L. S. Non-Sink Dissolution Conditions for Predicting Product Quality and In Vivo Performance of Supersaturating Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2477–2488, 2016.

TAKAHASHI, H. et al. Acetaminophen Particle Design Using Chitosan and a Spray-Drying Technique. **Chem Pharm Bull**, v. 53, n. 1, p. 37–41, 2005.

TAMBOSI, G. et al. Challenges to improve the biopharmaceutical properties of poorly water-soluble drugs and the application of the solid dispersion technology. **Revista Matéria**, v. 23, n. 4, 2018.

TAYLOR, L. S.; ZHANG, G. G. Z. Physical chemistry of supersaturated solutions and implications for oral absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 101, p. 122–142, 2016.

TOKATL, K.; DEMIRDÖVEN, A. Optimization of chitin and chitosan production from shrimp wastes and characterization. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 48, n. 2, 2017.

TRASI, N. S.; TAYLOR, L. S. Thermodynamics of highly supersaturated aqueous solutions of poorly water-soluble drugs - impact of a second drug on the solution phase behavior and implications for combination products. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 8, p. 2583–2593, 2015.

TRES, F. et al. Mechanistic understanding of the phase behavior of supersaturated solutions of poorly water-soluble drugs. **International**

Journal of Pharmaceutics, v. 543, n. 1–2, p. 29–37, 2018.

TZALLAS, P. et al. Ionization/dissociation of thiazole and thiazolidine induced by strong laser fields. **Chemical Physics Letters**, v. 343, n. July, p. 91–98, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **United States Pharmacopeial the national Formulary**. 38th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2017.

VAN DUONG, T.; VAN DEN MOOTER, G. The role of the carrier in the formulation of pharmaceutical solid dispersions. Part II: amorphous carriers. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 12, p. 1681–1694, 2016a.

VAN DUONG, T.; VAN DEN MOOTER, G. The role of the carrier in the formulation of pharmaceutical solid dispersions. Part I: crystalline and semi-crystalline carriers. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 12, p. 1681–1694, 2016b.

VASANTHAVADA, M. et al. Phase behavior of amorphous molecular dispersions II: Role of hydrogen bonding in solid solubility and phase separation kinetics. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 3, p. 440–448, 2005.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23–24, p. 1068–1075, 2007.

VO, C. L.-N.; PARK, C.; LEE, B.-J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 799–813, 2013.

WILLIAMS, H. D. et al. Lipid-based formulations and drug supersaturation: harnessing the unique benefits of the lipid digestion/absorption pathway. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 12, p. 2976–2992, 2013.

WU, C. et al. Pharmaceutical Particle Technology. **Powder Technology**, v. 285, p. 1, 2015.

WU, H.; YANG, C.; HUANG, S. Dissolution enhancement of indomethacin-chitosan hydrochloride composite particles produced using supercritical assisted atomization. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 67, p. 98–105, 2016.

XU, H. et al. In Vitro Characterization of Ritonavir Drug Products and Correlation to Human in Vivo Performance. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 3801–3814, 2017.

YU, D. et al. Electrospun amorphous solid dispersions of poorly water-soluble drugs: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 292, p. 91–110, 2018.

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 – 551 2013.

ANEXO A - FLUXOGRAMA DO TRABALHO COM OS PRINCIPAIS RESULTADOS

