



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Maria Terezinha França

TESE DE DOUTORADO

ESTRATÉGIAS PARA A OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS SUPERSATURADOS DE  
LIBERAÇÃO DO FÁRMACO GRISEOFULVINA

Florianópolis

2021

Maria Terezinha França

ESTRATÉGIAS PARA A OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS SUPERSATURADOS DE  
LIBERAÇÃO DO FÁRMACO GRISEOFULVINA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para  
a obtenção do Grau de doutora em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Hellen Karine Stulzer

Florianópolis

2021

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

França, Maria Terezinha  
Estratégias para a estabilização de sistemas  
supersaturados do fármaco griseofulvina / Maria Terezinha  
França ; orientador, Hellen Karine Stulzer , 2021.  
160 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Sistemas amorfos. 3. Mistura eutética.  
4. Supersaturação. 5. Inibidores de precipitação. I. ,  
Hellen Karine Stulzer. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Maria Terezinha França

**Estratégias para a estabilização de sistemas supersaturados do fármaco griseofulvina**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alexandre Alexandre Luis Parizzi  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Mônica Felts de La Roca Soares  
Universidade Federal de Pernambuco

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmácia pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

---

Prof. Dr. Marcos Antonio Segatto Silva  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Dra. Hellen Karine Stulzer  
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, Bernadete e Sebastião.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Bernadete e Sebastião por seu amor e por sempre terem me incentivado a ir em busca dos meus objetivos. Agradeço aos meus irmãos Marcos, Pati, Zeca e Bia por todo amor, parceria e amizade, quem tem irmãos tem amigos para a vida inteira!

Agradeço ao Tadeu, meu amor, meu amigo, meu companheiro de todos os dias, pela paciência, carinho e por me apoiar nas minhas escolhas.

Uma pesquisa não é feita sem a contribuição de vários colaboradores e sem a troca de muito conhecimento técnico-científico através de intensas discussões.

Sou grata a minha orientadora Profa. Dra. Hellen Karine Stulzer por aceitar me orientar nesta jornada, me deixando livre para trilhar diversos caminhos, mas sempre me questionando sobre minhas escolhas para que eu não me perdesse.

Agradeço a Tatyane Martins Marcos, minha aluna de iniciação científica, minha filha de coração, pela amizade e pela valiosa contribuição, tanto na parte experimental como nas discussões científicas, ao longo do meu doutorado.

Agradeço aos professores do LabCQ Dra. Simone Gonçalves Cardoso e Dr. Marcos Segatto, pela amizade e por compartilharem comigo um pouco de seus conhecimentos de vida e da ciência.

Agradeço a Tatiane Cogo, Roberta Ramos, Paulo F.A. Costa, Giovana Bazzo, Thiago Caon, Adriana P. Gerola, Rafael N. Pereira, Natália Sutério, Gabriela Rauber, Kleyton Vinícius Freire, Cassiana Mendes, Rafael da Rosa, Ingrid Vicente Farias, Vitor Clasen Chaves, aos amigos, e aos colegas do laboratório LabCQ-UFSC, pela amizade, parceria, pela troca de conhecimento nas inúmeras discussões científicas e/ou ajuda nos experimentos.

I would like to thank Prof. Dr. Lynne Taylor, for accepting me as a visitor scholar in the Industrial and Physical Department at Purdue University. I was lucky to have the opportunity to work in Dr. Taylor's group, in which I learned so much in a such short time.

I am also grateful to Tze Ning Hiew, Clara Correa-Soto, Andres Lust, Hanh Thuy Nguyen, Tu van Duong, Qingqing Qi, Keisuke Ueda, Navya Sree, Pradnya Bapat, Sugandha Saboo, Alexandru Deac, Siddhi Hate, and Dana Moseson, for introducing me to the Taylor's lab, for friendship, for sharing good moments, a cup of coffee and part of your knowledge with me.

Agradeço à Profa. M.Sc. Melissa Zétola, ao Prof. Dr. Luciano Sores e em especial a técnica Aline Scheller da Univille, por possibilitarem o uso do moinho de bolas. Aos

professores Profa. Dra. Dirleise Colle (UFSC) e Prof. Dr. Marcos José Machado (UFSC) que possibilitaram a execução das análises de microscopia de luz polarizada, e ao Prof. Dr. Adailton Bortoluzzi (UFSC) que viabilizou a realização das análises de difração de raios-X, sou imensamente grata pelas suas contribuições, ambas as análises foram fundamentais para o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço à UFSC e ao PGFAR, pela infraestrutura, apoio técnico, administrativo e financeiro. Sou grata a agência de fomento CAPES, pelas bolsas de doutorado no Brasil e do estágio sanduíche na Purdue University.



*“Eu faço parte dos pensam que a Ciência é belíssima. Um cientista em um laboratório não é apenas um técnico, ele é também uma criança diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas.”*

*Marie Curie*



## RESUMO

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas administradas por via oral de fármacos de baixa solubilidade aquosa, como a griseofulvina (GSF), requer a aplicação de estratégias que possam melhorar a dissolução destes no trato gastrointestinal. Dentre estas estratégias destacam-se os sistemas supersaturados de liberação de fármacos, tais como sistemas amorfos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade de novos carreadores de baixa massa molar em estabilizar soluções supersaturadas de GSF, melhorar a sua dissolução e estabilizar sólidos amorfos deste fármaco. Dentre os 5 aminoácidos testados, somente o triptofano (TRYP) foi capaz de inibir a recristalização do fármaco em soluções supersaturadas, proporcionando um aumento de 12% na área sob curva (AUC) do perfil de precipitação em meio biorrelevante simulando o fluido intestinal em jejum (FaSSIF). Um sistema amorfo homogêneo de GSF e TRYP (GSF-TRYP BM), com um elevado valor de transição vítrea ( $T_g$ : 113 °C), foi obtido por moagem em moinho de bolas (proporção GSF:TRYP 1:1 M). Ensaio de espectroscopia no infravermelho indicaram a formação de interações intermoleculares de hidrogênio entre o fármaco e o carreador na amostra GSF-TRYP BM. Esse sistema melhorou a dissolução do fármaco (aumento na AUC de 89% em FaSSGF e 58% em FaSSIF) nos ensaios cinéticos de solubilidade e mostrou-se estável na forma amorfa por 1 ano em dessecador. Na etapa seguinte deste trabalho foi avaliada a capacidade de adoçantes em estabilizar soluções supersaturadas de GSF e melhorar a dissolução do fármaco. Dentre os adoçantes testados, sobressaíram-se a sacarina (SAC) e o ácido glicirrízico (GA). A SAC reduziu levemente o comportamento de dessupersaturação do fármaco em FaSSIF, proporcionando um aumento de 20 % na AUC do perfil de precipitação. Tanto uma formulação amorfa (GSF-SAC QC) quanto uma mistura eutética (GSF-SAC EM) desenvolvidas com esse carreador (proporção GSF:SAC 1:1 M) foram capazes de dissolver o fármaco em concentrações acima da sua solubilidade em FaSSIF, atingindo taxas de supersaturação de 4,14 e 3,15, respectivamente. Estudos de fluorescência mostraram uma leve alteração na hidrofobicidade do meio biorrelevante na presença da SAC, a qual favoreceu a dissolução do fármaco no meio. Nos estudos de estabilidade em temperatura ambiente, a formulação GSF-SAC QC permaneceu predominante amorfa por 150 semanas mostrando que a presença da SAC retardou a recristalização do fármaco apesar de sistema apresentar um valor de  $T_g$  (55 °C) menor que o do fármaco amorfo isolado (86 °C). O GA proporcionou uma inibição da precipitação efetiva do fármaco em soluções supersaturadas de GSF tanto em tampão pH 6,5 quanto em meio biorrelevante (aumento na AUC de 20 e 9 vezes, respectivamente). Estudos de solubilidade, fluorescência, espalhamento de luz dinâmico, e ressonância magnética nuclear mostraram que o GA interage com os componentes do meio biorrelevante e com o fármaco, alterando a solubilidade do fármaco no meio, a polaridade do microambiente e as características das espécies coloidais em solução. Foram desenvolvidas dispersões sólidas amorfas de GSF com GA, tanto na forma neutra do carreador (GSF-GA BM) quanto ionizada (pH 6,5, GSF-GAion BM), por moagem em moinho de bolas. As interações entre a GSF, o GA e o meio biorrelevante contribuirão para que altas concentrações de fármaco fossem atingidas durante os ensaios de dissolução de dispersões sólidas de GSF com GA, levando a uma separação de fases das soluções supersaturadas e formando agregados coloidais do fármaco em solução. No entanto, a forma ionizada do GA proporcionou uma maior liberação do fármaco em comparação a forma não ionizada. A formulação GSF-GAion BM atingiu concentrações de GSF de  $\cong 500 \mu\text{g mL}^{-1}$  em FaSSIF, além de proporcionar uma melhor estabilização dos coloides, mantendo-os com tamanho relativamente estáveis por 4 horas.

**Palavras-chave:** Griseofulvina. Sistemas amorfos. Mistura eutética. Supersaturação. Inibidores de precipitação. Aminoácidos. Sacarina. Ácido Glicirrízico.



## ABSTRACT

The development of pharmaceutical formulations for oral administration containing poorly water-soluble drugs, such as griseofulvin (GSF), requires the usage of strategies to improve drug dissolution in gastrointestinal fluids. Along with the strategies used stood out supersaturating drug delivery systems as amorphous systems. In this context, the aim of this work was to investigate the ability of new carriers of low molecular weight to stabilize supersaturated solutions of GSF, to improve its dissolution, as well as to stabilize amorphous systems containing GSF at the solid-state. Among the 5 amino acids evaluated, only tryptophan (TRYP) was able to delay drug's recrystallization in supersaturated solutions, affording an increase of 12% in the area under the curve (AUC) of the precipitation profile in FaSSIF. A homogeneous amorphous system of GSF and TRYP (GSF:TRYP BM), with high glass transition temperature ( $T_g$ : 113 °C), was developed by ball milling technique (GSF:TRYP proportion 1:1 M). Studies of infrared spectroscopy indicated the formation of hydrogen bonding intermolecular interactions between the drug and the carrier in the GSF-TRYP BM system. This formulation enhanced the drug dissolution (AUC increase of 89% in FaSSGF and 58% in FaSSIF) in the kinetic solubility studies and remained stable for 1 year in a desiccator. In the next step of this work, it was evaluated the sweetener's ability to stabilize supersaturated solutions of GSF and improve drug dissolution. Saccharin (SAC) and glycyrrhizic acid (GA) showed best results compared to other sweeteners tested. SAC slightly reduced drug desupersaturation behavior in biorelevant medium, affording an AUC increase of 20% in the drug precipitation profile. Either an amorphous formulation (GSF-SAC QC) or a eutectic mixture (GSF-SAC EM) developed with this carrier (GSF:SAC proportion 1:1 M) dissolved at concentrations above drug solubility in FaSSIF, achieving supersaturation ratios of 4.14 and 3.15, respectively. Fluorescence studies showed that the presence of SAC slightly changed the medium hydrophobicity in FaSSIF, turning it more favorable for the drug dissolution. In the stability studies at room temperature, the formulation GSF-SAC QC remained predominantly amorphous for 150 weeks, showing that the presence of SAC slowed down the drug's recrystallization even though the system has a lower  $T_g$  value (55 °C) than the neat amorphous drug (86 °C). The GA demonstrated a strong ability to inhibit drug precipitation in buffer pH 6.5 and biorelevant medium (AUC increase of 20 and 9 times, respectively). Studies of solubility, fluorescence, DLS and NMR revealed that GA interacts with the biorelevant medium components and the drug, which led to changes in the drug solubilization, the microenvironment polarity and the characteristic of solution colloidal species. Amorphous solid dispersions of GSF with GA were developed using the ball milling technique, either with the carrier in the neutral form (GSF-GA BM) or the ionized form (pH 6.5, GSF-GAion BM). The interactions between GSF, GA and biorelevant medium contributed to achieve high drug concentrations during the dissolution studies of the amorphous solid dispersions, leading to phase separation of the supersaturated solutions and forming colloidal aggregates of the drug in solution. However, the ionized form of GA provided a greater release of the drug compared to the non-ionized form. The formulation GSF-GAion BM reached GSF concentrations of  $\cong 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , in addition of providing better colloid stabilization, keeping them relatively stable in size for 4 hours in biorelevant medium.

**Keywords:** Griseofulvin. Amorphous systems. Eutectic mixture. Supersaturation. Precipitation inhibitors. Amino acids. Saccharin. Glycyrrhizic acid.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático que ilustra as estratégias de formulação comumente utilizadas contornar a baixa solubilidade de fármacos. ....	35
Figura 2. Ilustração esquemática das transições de fase que podem ocorrer em uma solução supersaturada gerada por um sistema supersaturado de liberação de fármaco.....	37
Figura 3. Estrutura química molecular da griseofulvina. ....	47
Figura 4. Difratoograma dos 3 polimorfos de griseofulvina reportados na literatura. ....	47
Figura 5. Estrutura química molecular do ácido glicirrízico .....	49
Figura 6. Perfis de concentração de GSF vs. tempo e suas respectivas AUC dos estudos de precipitação em soluções supersaturadas. ....	58
Figura 7. Solubilidade de equilíbrio da GSF cristalina em diferentes meios, a 37 °C. ....	60
Figura 8. Caracterização do estado sólido por A) XRPD, B) DSC, C) PLM e D) SEM. ....	61
Figura 9. Espectro de FTIR das amostras. GSFc, GSF QC, GSF-TRYP BM e TRYP.....	62
Figura 10. Estudos cinéticos de solubilidade (A e C) e suas respectivas AUC (B e C) da griseofulvina amorfa (GSF QC) e da amostra GSF-TRYP BM, em meio biorrelevante.....	64
Figura 11. Análises de A) XRPD e B) PLM das amostras de griseofulvina amorfa (GSF QC) e GSF-TRYP BM durante estudo de estabilidade.....	65
Figura 12. Estrutura química molecular da A) Griseofulvina, B) Maltitol, C) Isomalte e D) Sacarina. ....	68
Figura 13. Perfis de precipitação concentração de GSF vs. Tempo (A e D), suas respectivas AUC dos perfis (B e E) e solubilidade da GSF (C e F), a 37 °C.....	73
Figura 14. Difratoogramas (à esquerda) e imagens de PLM (à direita) das formulações. ....	75
Figura 15. A) Curvas DSC de griseofulvina cristalina (GSFc), dos adoçantes, das formulações obtidas por <i>quench cooling</i> (QC) e da mistura eutética de griseofulvina e sacarina na proporção 66:34 m/m (GSF-SAC EM). B) Curvas DSC das amostras de misturas eutéticas de GSF e SAC em diferentes proporções, C) diagrama de fases binário e D) Triângulo de Tamman.....	76
Figura 16. Espectros FTIR das matérias primas utilizadas, mistura eutética GSF-SAC EM e amostras obtidas por <i>quench cooling</i> (QC). ....	78

Figura 17. Fotomicrografias da griseofulvina cristalina (GSFc), griseofulvina obtida por <i>quench cooling</i> (GSF QC) e da mistura eutética de griseofulvina e sacarina (GSF:SAC EM).....	80
Figura 18. Estudos de solubilidade cinética e respectivas AUC em tampão pH 6,5 usando D1 (A e D) e em FaSSIF, D1 (B e E) e D2 (C e E).....	81
Figura 19. Diâmetro hidrodinâmico de soluções supersaturadas de griseofulvina (GSF) em A) tampão pH 6,5, B) FaSSIF, C) tampão pH 6,5 + sacarina (SAC) 20mmol L <sup>-1</sup> , e D) FaSSIF + SAC 20mmol L <sup>-1</sup> . E) Intensidade de fluorescência vs. concentração e F) espectros de fluorescência da GSF em soluções supersaturadas em FaSSIF e FaSSIF + SAC.....	84
Figura 20. Difractogramas da amostra GSF-SAC QC durante estudos de estabilidade. ....	86
Figura 21. Perfis de concentração vs. tempo da GSF nos ensaios de precipitação em tampão pH 6,5 (A e C) e em FaSSIF (B e D). ....	96
Figura 22. Dados de emissão de fluorescência da GSF em diferentes soluções (A e B). Representações gráficas do espalhamento de luz relativo no UV-Vis (450 nm), absorbância no UV (365 nm) e intensidade de fluorescência da GSF obtidas durante os estudos de separação de fase em C) tampão pH 6,5, D) FaSSIF, E) tampão pH 6,5 + GA 30 mmol L <sup>-1</sup> e F) FaSSIF + GA 30 mmol L <sup>-1</sup> .....	98
Figura 23. Diâmetro hidrodinâmico dos agregados/precipitado formados nas soluções supersaturadas de GSF, em A) tampão pH 6,5, B) FaSSIF, C) tampão pH 6,5 + GA 30 mmol L <sup>-1</sup> , e D) FaSSIF + GA 30 mmol L <sup>-1</sup> .....	99
Figura 24. Imagem de microscopia de luz polarizada (magnificação 200×) de duas diferentes concentrações de GSF (300 e 600 µg mL <sup>-1</sup> ) em soluções supersaturadas em tampão pH 6,5 FaSSIF, com ou sem a presença de GA 30 mmol L <sup>-1</sup> . ....	101
Figura 25. Valores de condutividade de soluções A) tampão pH 6,5, B) FaSSIF, D) tampão pH 6,5 + GSF e E) FaSSIF + GSF na presença de diferente concentrações de GA. C) Razão entre a intensidade de emissão de fluorescência dos picos I/III da sonda pireno em função da concentração do GA, e F) diâmetro hidrodinâmico dos sistemas coloidais de GA em diferentes meios, a 37 °C.....	104
Figura 26. Perfis da concentração de GSF permeada no compartimento acceptor vs. tempo a partir de uma solução supersaturada 150 µg mL <sup>-1</sup> (A) e uma solução supersaturada (B) em tampão pH 6,5 e FaSSIF, na presença ou ausência de 1800 µg mL <sup>-1</sup> de GA. Fluxo difusivo (C) e taxa de supersaturação (D) nas diferentes soluções.....	116



Figura 27. Difrátogramas (A), Curvas DSC (B) e Imagens de SEM (C, D, E e F) da griseofulvina cristalina (GSFc), griseofulvina amora (GSF-QC), ácido glicirrízico (GA), ácido glicirrízico ionizado (GAion) e das formulações GSF-GA e GSF-GAion obtidas por moagem em moinho de bolas.....	118
Figura 28. Espectro de FTIR da griseofulvina cristalina (GSFc), amorfa (GSF QC), ácido glicirrízico (GA), ácido glicirrízico ionizado (GAion) e as dispersões sólidas GSF-GA BM e GSF-GAion BM obtidas por moagem em moinho de bolas. ....	120
Figura 29. Perfis de dissolução concentração vs. tempo de GSF (A: 0-240 min, C: 2,5-15 min) e GA (B: 0-240 min, D: 2,5-15 min) nas diferentes formulações. Taxa de dissolução da GSF (E) e GA (F) nas diferentes formulações considerando o intervalo de dissolução linear de 2,5-15 min ( $R > 0,9$ ). ....	121
Figura 30. Difrátogramas das formulações GSF QC, GSF-GA BM e GSF-GAion BM após serem compactadas utilizando uma força de 0,5 tonelada por 60 segundos. ....	123
Figura 31. Análises DLS durante a dissolução de superfície normalizada das formulações amorfas e seus controles.....	125
Figura 32. Espectro de $^1\text{H}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da região correspondente aos sinais de GSF, GA e FaSSIF.....	126
Figura 33. Estruturas químicas moleculares da A) GSF, B) GA, C) Lecitina (L) e D) Taurocolato de sódio (TC) comas respectivas numerações utilizadas na atribuição de sinais de RMN de $^1\text{H}$ .....	127
Figura A 1. Capa do artigo publicado referente aos resultados apresentados no capítulo II desta tese.....	155
Figura A 2. Capa do artigo publicado referente aos resultados apresentados no capítulo IV desta tese. ....	156
Figura A 3. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da região correspondente aos sinais de GSF, GA, TC e L regiões 0,6-1,5 ppm e 3,1-3,8 ppm. ....	159
Figura A 4. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da região correspondente aos sinais de GSF, GA, TC e L regiões 3,8-4,3 ppm, 2,4-2,8 ppm e 5,5-6,5 ppm.....	160



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características da GSF e dos aminoácidos empregados neste estudo. ....	57
Tabela 2. Dados de solubilidade da GSF em diferentes meios contendo ou não GA. ....	114
Tabela A 1. Deslocamentos químicos nos espectros de $^1\text{H}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) de griseofulvina (GSF), ácido glicirrízico (GA) e meio biorrelevante (Taurocolato de Sódio (TC) e Lecitina (L)), obtidos de forma independente em tampão pH 6,5 ou em associação.....	157
Tabela A 2. Alterações detectadas nos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da GSF, GA e meio biorrelevante em associações, quando comparados aos espectros de cada componente independente. ....	158



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ASP	Ácido Aspártico
AUC	Área sob a curva, do inglês <i>area under the curve</i>
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
BM	Moagem de bolas, do inglês <i>ball milling</i>
CAC	Concentração de agregação crítica
CCS	Centro de Ciências da Saúde da UFSC
Centralcrom	Central de cromatografia multiusuária do Centro de Ciências da Saúde da UFSC
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D <sub>2</sub> O	Água deuterada ou Óxido de deutério
DLS	Espalhamento de luz dinâmico, do inglês <i>dynamic light scattering</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DSC	Calorimetria exploratória, do inglês <i>differential scanning calorimetry</i>
FaSSGF	Fluido gástrico simulado em jejum, do inglês <i>fasted state simulated gastric fluid</i>
FaSSIF	Fluido intestinal simulado em jejum, do inglês <i>fasted state simulated intestinal fluid</i>
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform infrared</i>
GA	Ácido glicirrízico, do inglês <i>glycyrrhizic acid</i>
GSF	Griseofulvina
ISO	Isomalte
LabCQ	Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da UFSC
LACFI	Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais da UFSC
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC
MALT	Maltitol
MM	Massa molar
mM	Milimolar
PLM	Microscopia de luz polarizada, do inglês <i>polarized light microscopy</i>
QC	<i>Quench cooling</i>

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAC	Sacarina
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>scanning electron microscopy</i>
SDDS	Sistemas supersaturados de liberação de fármacos, do inglês <i>supersaturating drug delivery systems</i>
SCBDF	Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
TRYP	Triptofano
XRPD	Difração de raios X de pó, do inglês <i>X-ray powder diffraction</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
1.1	OBJETIVOS .....	31
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>33</b>
2.1	A QUESTÃO BAIXA SOLUBILIDADE AQUOSA DE FÁRMACOS E SEU IMPACTO NA BIODISPONIBILIDADE ORAL DE MEDICAMENTOS .....	33
2.2	SOLUÇÕES SUPERSATURADAS .....	35
2.3	SISTEMAS AMORFOS.....	39
<b>2.3.1</b>	<b>Coamorfos .....</b>	<b>40</b>
2.4	TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE SISTEMAS AMORFOS.....	42
<b>2.4.1</b>	<b>Métodos de fusão.....</b>	<b>42</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Métodos de moagem .....</b>	<b>43</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Métodos de evaporação de solvente .....</b>	<b>44</b>
2.5	GRISEOFULVINA .....	44
<b>2.5.1</b>	<b>Uso terapêutico.....</b>	<b>44</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Absorção, distribuição e excreção .....</b>	<b>45</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Características físico-químicas .....</b>	<b>46</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Estratégias usadas para contornar a baixa solubilidade aquosa da griseofulvina.....</b>	<b>48</b>
2.6	ÁCIDO GLICIRRÍZICO .....	48
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II: INVESTIGAÇÃO DO IMPACTO DE AMINOÁCIDOS COMO CARREADORES DE BAIXA MASSA MOLAR EM SISTEMAS SUPERSATURADOS DE GRISEOFULVINA .....</b>	<b>51</b>
3.1	INTRODUÇÃO .....	51
3.2	METODOLOGIA.....	53
<b>3.2.1</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>53</b>

3.2.2.1	<i>Avaliação do impacto dos aminoácidos na precipitação da griseofulvina</i> .....	53
3.2.2.2	<i>Estudos de solubilidade de equilíbrio</i> .....	54
3.2.2.3	<i>Desenvolvimento dos sistemas amorfos</i> .....	54
3.2.2.3.1	Método de moagem em moinho de bolas (BM) .....	54
3.2.2.3.2	Método de <i>Quench Cooling</i> (QC) .....	54
3.2.2.4	<i>Caracterização do estado sólido</i> .....	55
3.2.2.4.1	Análises de difração de raios-X de pó (XRPD).....	55
3.2.2.4.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	55
3.2.2.4.3	Microscopia de luz polarizada (PLM) .....	55
3.2.2.4.4	Análises de tamanho de partícula .....	56
3.2.2.4.5	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier .....	56
3.2.2.5	<i>Estudos cinéticos de solubilidade</i> .....	56
3.2.2.6	<i>Estudos de estabilidade</i> .....	56
3.2.2.7	<i>Análises estatísticas</i> .....	57
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	57
3.3.1	<b>Avaliação do impacto dos aminoácidos na precipitação da griseofulvina</b> .....	57
3.3.2	<b>Estudos de solubilidade de equilíbrio</b> .....	59
3.3.3	<b>Caracterização das formulações desenvolvidas</b> .....	60
3.3.4	<b>Estudos cinéticos de solubilidade</b> .....	63
3.3.5	<b>Estudos de estabilidade</b> .....	65
3.4	CONCLUSÃO .....	66
4	<b>CAPÍTULO III: MISTURA EUTÉTICA E DISPERSÃO SÓLIDA AMORFA: DIFERENTES ABORDAGENS ENVOLVENDO O USO DE SACARINA PARA PROMOVER MELHORIAS NA DISSOLUÇÃO DE GRISEOFULVINA</b> .....	67
4.1	INTRODUÇÃO .....	67
4.2	METODOLOGIA .....	69
4.2.1	<b>Materiais</b> .....	69
4.2.2	<b>Métodos</b> .....	69



4.2.2.1	<i>Avaliação do perfil de precipitação do fármaco em soluções dos adoçantes</i> .....	69
4.2.2.2	<i>Estudos de solubilidade de equilíbrio</i> .....	70
4.2.2.3	<i>Desenvolvimento das formulações</i> .....	70
4.2.2.3.1	Método de moagem em moinho de bolas (BM) .....	70
4.2.2.3.2	Método de <i>Quench Cooling</i> (QC) .....	70
4.2.2.3.3	Mistura Eutética.....	71
4.2.2.4	<i>Caracterização do estado sólido</i> .....	71
4.2.2.4.1	Difração de raios-X de pó (XRPD) .....	71
4.2.2.4.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	71
4.2.2.4.3	Microscopia de luz polarizada (PLM) .....	71
4.2.2.4.4	Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	71
4.2.2.4.5	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	72
4.2.2.5	<i>Estudos cinéticos de solubilidade</i> .....	72
4.2.2.6	<i>Investigação de soluções supersaturadas de griseofulvina e sacarina</i> .....	72
4.2.2.7	<i>Estudos de estabilidade</i> .....	73
4.2.2.8	<i>Análises estatísticas</i> .....	73
4.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	73
4.3.1	<b>Avaliação do perfil de precipitação do fármaco em soluções dos adoçantes</b> .	73
4.3.2	<b>Estudos de solubilidade de equilíbrio</b> .....	74
4.3.3	<b>Caracterização das formulações desenvolvidas</b> .....	75
4.3.4	<b>Estudos cinéticos de solubilidade</b> .....	80
4.3.5	<b>Investigação de soluções supersaturadas de griseofulvina e sacarina</b> .....	83
4.3.6	<b>Estudos de estabilidade</b> .....	86
4.4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	87
5	<b>CAPÍTULO IV: O PAPEL DO ÁCIDO GLICIRRÍZICO EM FENÔMENOS COLOIDAIIS DE SISTEMAS SUPERSATURADOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS CONTENDO O ANTIFÚNGICO GRISEOFULVINA</b> .....	89
5.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	89

5.2	METODOLOGIA.....	90
<b>5.2.1</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>90</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>91</b>
5.2.2.1	<i>Efeito do ácido glicirrízico na solubilidade de equilíbrio da griseofulvina.....</i>	<i>91</i>
5.2.2.2	<i>Avaliação do impacto do ácido glicirrízico no perfil de precipitação da griseofulvina.....</i>	<i>91</i>
5.2.2.3	<i>Investigação do fenômeno de separação de fases em soluções supersaturadas de griseofulvina.....</i>	<i>91</i>
5.2.2.3.1	Método espectrofotométrico UV/Vis .....	92
5.2.2.3.2	Espectroscopia de fluorescência .....	92
5.2.2.3.3	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia de luz polarizada (PLM) ...	93
5.2.2.3.4	Investigação da solução coloidal de ácido glicirrízico .....	93
5.2.2.3.5	Estudos de condutividade .....	93
5.2.2.3.6	Medidas de viscosidade .....	93
5.2.2.3.7	Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	94
5.2.2.3.8	Espectroscopia de fluorescência .....	94
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	94
<b>5.3.1</b>	<b>Efeito do ácido glicirrízico na solubilidade de equilíbrio do fármaco .....</b>	<b>94</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Avaliação do impacto do ácido glicirrízico no perfil de precipitação da griseofulvina.....</b>	<b>95</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Investigação do fenômeno de separação de fases em soluções supersaturadas de griseofulvina.....</b>	<b>97</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Investigação da solução coloidal de ácido glicirrízico .....</b>	<b>103</b>
5.4	CONCLUSÃO.....	106
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO V: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS DO FÁRMACO GRISEOFULVINA COM ÁCIDO GLICIRRÍZICO.....</b>	<b>107</b>
6.1	INTRODUÇÃO.....	107
6.2	METODOLOGIA.....	108

<b>6.2.1</b>	<b> Materiais.....</b>	<b>108</b>
<b>6.2.2</b>	<b> Métodos.....</b>	<b>109</b>
6.2.2.1	<i> Determinação da solubilidade da griseofulvina.....</i>	<i>109</i>
6.2.2.2	<i> Estudo de difusão em célula de fluxo .....</i>	<i>110</i>
6.2.2.3	<i> Desenvolvimento dos sistemas amorfos.....</i>	<i>111</i>
6.2.2.3.1	Método de moagem em moinho de bolas (BM) .....	111
6.2.2.3.2	Método de <i>Quench Cooling</i> (QC) .....	111
6.2.2.4	<i> Caracterização do estado sólido .....</i>	<i>111</i>
6.2.2.4.1	Difração de raios-X de pó (XRPD) .....	111
6.2.2.4.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	111
6.2.2.4.3	Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	112
6.2.2.4.4	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	112
6.2.2.5	<i> Ensaios de dissolução de superfície normalizada .....</i>	<i>112</i>
6.2.2.6	<i> Análises de ressonância magnética nuclear em solução.....</i>	<i>113</i>
6.2.2.7	<i> Análises estatísticas.....</i>	<i>113</i>
6.3	<b> RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>114</b>
<b>6.3.1</b>	<b> Determinação de solubilidade da griseofulvina .....</b>	<b>114</b>
<b>6.3.2</b>	<b> Estudo de difusão em célula de fluxo .....</b>	<b>115</b>
<b>6.3.3</b>	<b> Caracterização das formulações desenvolvidas .....</b>	<b>117</b>
<b>6.3.4</b>	<b> Ensaios de dissolução de superfície normalizada .....</b>	<b>120</b>
<b>6.3.5</b>	<b> Análises de ressonância magnética nuclear em solução.....</b>	<b>125</b>
6.4	<b> CONCLUSÕES .....</b>	<b>128</b>
7	<b> CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>131</b>
	<b> REFERÊNCIAS.....</b>	<b>135</b>
	<b> APÊNDICE .....</b>	<b>155</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diferentes técnicas de *screening* tem favorecido a identificação de vários compostos bioativos com alta lipofilicidade e elevada massa molecular, os quais possuem uma solubilidade aquosa cada vez menor. Esta baixa solubilidade tem um grande impacto sobre a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. Dessa forma, é de suma importância desenvolver estratégias que melhorem a solubilidade e dissolução destes compostos. Nesse sentido, diversas estratégias têm sido desenvolvidas tais como sistemas amorfos, sais, cocrystalis, solubilização em surfactantes, complexação com ciclodextrinas, entre outras. Porém, muitas dessas abordagens apresentam ainda limitações como a diminuição da permeabilidade do fármaco através das membranas celulares, instabilidade na fase sólida ou rápida transição de fase no estado sólido ou em solução (ALMEIDA E SOUSA et al., 2016; BOYD et al., 2019; DAHAN et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que a manutenção de um estado temporário de supersaturação (quando a concentração do soluto dentro da solução é superior à solubilidade de equilíbrio termodinâmico) pode ser suficiente para promover uma melhor absorção desses fármacos pouco solúveis em água. Essa estratégia pode proporcionar um aumento da concentração de fármaco livre disponível para permear as membranas biológicas no trato gastrointestinal (TGI). Dessa forma, sistemas supersaturados de liberação de fármacos (SDDS, do inglês *supersaturating drug delivery systems*), capazes de formar soluções supersaturadas, são atualmente considerados promissores para permitir uma melhor absorção de fármacos pouco solúveis, quando esta condição for mantida por um tempo prologando (BEVERNAGE et al., 2013; BOYD et al., 2019; TAYLOR; ZHANG, 2016).

Dentre os sistemas capazes de gerar soluções supersaturadas durante a dissolução, destacam-se os sistemas amorfos. Contudo, devido à sua instabilidade física, sólidos amorfos geralmente necessitam ser associados a agentes carreadores que possam estabilizar essas formulações. Polímeros são frequentemente utilizados na estabilização de sistemas amorfos. No entanto, polímeros hidrofílicos podem apresentar alta higroscopicidade, levando a absorção/adsorção de umidade quando incorporados a esses sistemas. A água atua como plastificante reduzindo a temperatura de transição vítrea de sistemas amorfos, culminando muitas vezes em separação de fases e recristalização. Devido à solubilidade limitada de fármacos nos polímeros, frequentemente, grandes quantidades de carreador (es) se fazem necessárias para estabilizar sistema amorfos, conduzindo a grandes volumes de massa nas

formas farmacêuticas finais. Essa alta carga de polímero dificulta principalmente o uso desses carreadores com fármacos de alta dosagem, como é o caso da griseofulvina (GSF), fato que vêm dificultando a sua aplicação na terapêutica (LÖBMANN et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2016; WARREN et al., 2010).

A GSF, fármaco utilizado neste estudo, apresenta baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade, classificada pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) como classe II em ambos, devido baixa solubilidade aquosa e extensiva metabolização (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011). A GSF é um antifúngico de baixo custo utilizado no tratamento de micoses de pele, cabelo e unha, que demonstra eficácia e segurança na administração por via oral (MURDANDE et al., 2011; TEY; TAN; CHAN, 2011). As limitações biofarmacêuticas desse fármaco podem ser contornadas pelo uso de estratégias tecnológicas como a obtenção de SDDS. Uma adequada seleção de carreadores de baixa massa molar, bem como da proporção entre fármaco-carreadores, pode gerar sistemas amorfos que se mantenham estáveis durante um armazenamento a longo prazo, e que sejam capazes de promover uma condição de supersaturação intraluminal do fármaco.

Neste sentido, ressalta-se a importância de avaliar novos carreadores hidrofílicos em sistemas amorfos que tanto possam atuar na estabilização no estado sólido, na melhoria da dissolução do fármaco, quanto na inibição da precipitação do fármaco em condições supersaturadas.

Os resultados demonstrados nesta tese de doutorado foram decorrentes de experimentos e investigações realizados na a) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, campus de Florianópolis- SC), em diversos laboratórios de diferentes departamentos desta universidade; b) UNIVILLE (Joinville- SC) e c) Purdue University (Indiana- EUA). O projeto recebeu contribuição da agência de fomento CAPES na forma de bolsa de doutorado para a aluna/pesquisadora no Brasil, sob supervisão da profa. Dra. Hellen Karine Stulzer (UFSC), e de bolsa de estágio doutoral sanduíche de 6 meses, sob supervisão da profa. Dra. Lynne S. Taylor (Purdue University).

## 1.1 OBJETIVOS

Obter sistemas supersaturados de liberação do fármaco griseofulvina associado a carreadores de baixa massa molar que possuam a capacidade de promover condições de supersaturação e que proporcionem uma estabilidade física por um tempo prolongado.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar experimentalmente a solubilidade do fármaco cristalino em diferentes meios de dissolução, incluindo soluções contendo diferentes carreadores;
- Avaliar a capacidade dos diferentes carreadores em atuar como inibidores de precipitação em soluções supersaturadas de GSF através do método *solvent shift*;
- Selecionar o (s) carreador (es) com potencial para a obtenção de SDDS;
- Selecionar a técnica mais adequada para a obtenção dos SDDS levando em consideração características como solubilidade, ponto de fusão e estabilidade do fármaco e dos carreador (es);
- Obter SDDS contendo o fármaco isolado e em associação com diferentes carreadores;
- Caracterizar os sistemas obtidos por técnicas do estado sólido: difração de raios-X de pó (XRPD), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), microscopia de luz polarizada (PLM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a solubilidade cinética dos sistemas obtidos em tampão pH 6,5 e meios biorrelevantes em condição não *sink*;
- Analisar a estabilidade física dos sistemas amorfos por XRPD a fim de investigar a ocorrência de recristalização durante o armazenamento das amostras.





## 2 CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A QUESTÃO BAIXA SOLUBILIDADE AQUOSA DE FÁRMACOS E SEU IMPACTO NA BIODISPONIBILIDADE ORAL DE MEDICAMENTOS

Uma grande parcela dos compostos farmacêuticos contemporâneos possui propriedades físico-químicas que podem resultar em baixa estabilidade química no trato TGI, baixa solubilidade aquosa e/ou solubilidade variável nos fluidos gastrointestinais em jejum e no estado alimentado e, eventualmente, baixa permeabilidade intestinal. Estes fatos têm sido atribuídos ao uso de abordagens de modelagem molecular e de triagem em larga escala que levaram à descoberta de um número elevado de compostos com atividade terapêutica, porém requerendo algumas características específicas para que possam atingir ligantes endógenos, tais como a alta lipofilicidade de fármacos (BOYD et al., 2019; WEBSTER; JACKSON; BELL, 2017; WILLIAMS; WATTS; MILLER, 2016).

A alta lipofilicidade de fármacos e a sua conseqüente baixa solubilidade aquosa, geralmente, ocasionam lenta dissolução no TGI e podem prejudicar a absorção de fármacos, por vezes requerendo a utilização de uma maior dose do fármaco. No entanto, o uso de altas dosagens diárias do fármaco pode resultar em uma alta variabilidade na biodisponibilidade e aumentar o risco de toxicidade aos pacientes (KERNS; DI, 2008; WILLIAMS; WATTS; MILLER, 2016). Assim, a recorrente baixa solubilidade aquosa de fármacos tornou desafiador o desenvolvimento de formas farmacêuticas orais de novos medicamentos (WEBSTER; JACKSON; BELL, 2017; WILLIAMS; WATTS; MILLER, 2016).

A solubilidade de equilíbrio ou solubilidade termodinâmica é definida como a concentração de saturação de um soluto em solução, sob temperatura (T) e pressão constantes. É obtida através do equilíbrio entre a fase sólida e a solução saturada. Este equilíbrio balanceia a energia obtida através de interações de moléculas do solvente e do soluto entre si mesmos com a energia obtida através de interações do solvente e do soluto um com o outro. Para que um soluto se dissolva (Equação 1) é necessário que a energia livre do processo de solubilização ( $\Delta G_{\text{dissol}}$ ) seja negativa, considerando as parcelas de contribuição entálpica ( $\Delta H_{\text{dissol}}$ ) e entrópica ( $\Delta S_{\text{dissol}}$ ). A parcela de contribuição entálpica ( $\Delta H_{\text{dissol}}$ ) do processo refere-se às interações específicas entre solvente e soluto, considerando que para mover uma molécula de fármaco para uma solução aquosa devem ser quebradas as interações entre as suas moléculas no cristal (energia de rede) e as interações entre as moléculas do solvente aquoso num espaço

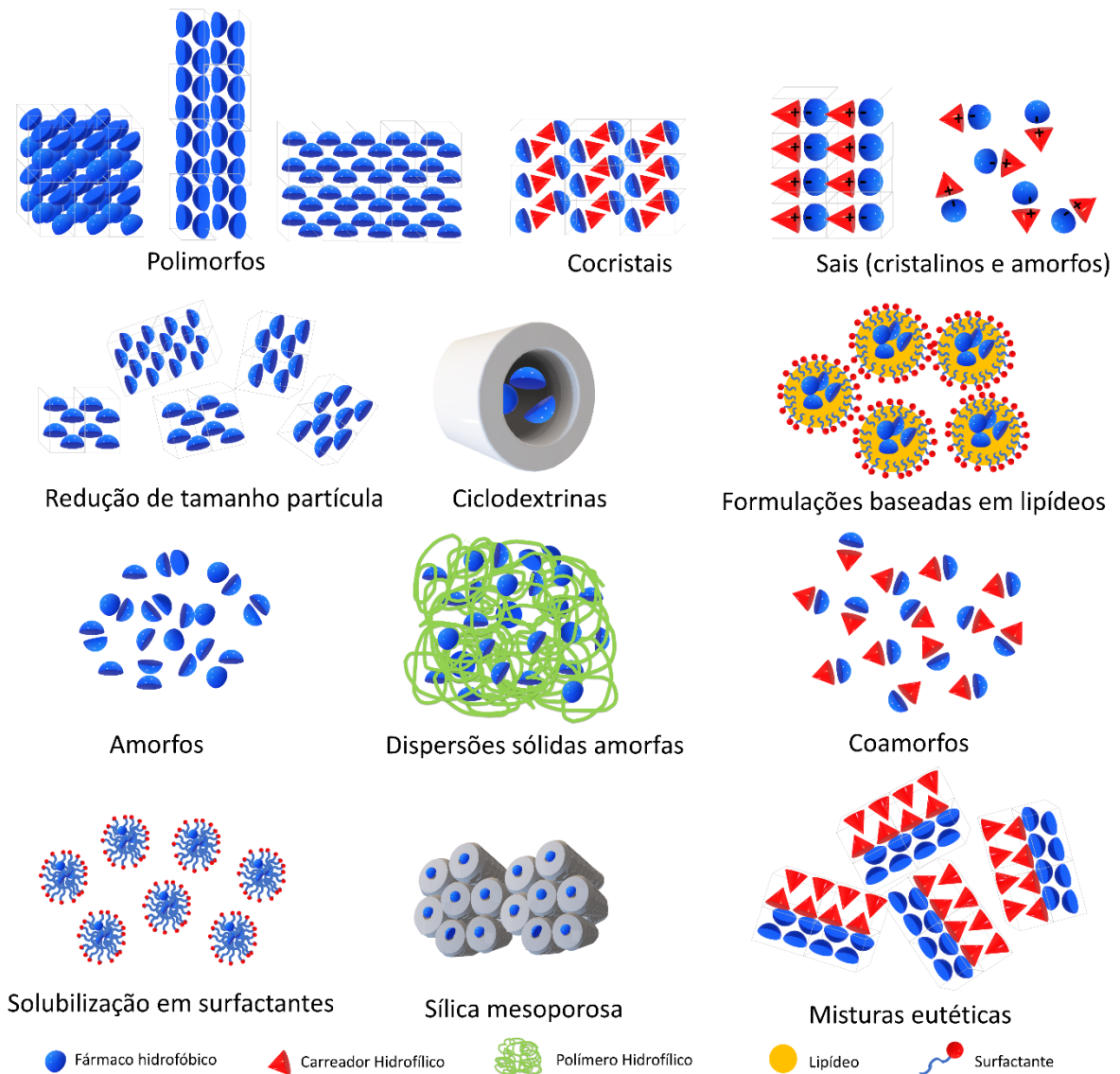
necessário para acomodar o soluto. Quando isso acontece, a entropia ( $\Delta S_{dissol}$ ) do sistema aumenta ligeiramente porque a rede ordenada de ligações de hidrogênio entre as moléculas de solvente foi interrompida. Porém, assim que as moléculas do fármaco são envolvidas pelo solvente aquoso, as interações formadas entre o soluto e o solvente (energia de solvatação) estabilizam o sistema. Assim, a parcela de contribuição entrópica ( $\Delta S_{dissol}$ ) para a dissolução de um soluto é decorrente dessa dispersão do soluto no solvente, a qual é acompanhada por um aumento no grau de desordem, e também do aumento no ordenamento do solvente em torno do soluto. Esse segundo fator ocorre, por exemplo, em soluções aquosas de compostos hidrofóbicos ou iônicos, nos quais as moléculas do solvente se organizam na forma de gaiola ou *cluster* ao redor de moléculas do soluto hidrofóbico, ou se organizam fortemente ao redor dos íons, respectivamente (NETZ; ORTEGA, 2002; WEBSTER; JACKSON; BELL, 2017).

$$\Delta G_{dissol} = \Delta H_{dissol} - T \cdot \Delta S_{dissol} \quad (\text{Equação 1})$$

Diversos outros fatores influenciam na solubilidade de fármacos, tais como a natureza do soluto e/ou do solvente, tipos de interações químicas entre estes, forma da molécula, área superficial, pH, entre outros (NETZ; ORTEGA, 2002; WEBSTER; JACKSON; BELL, 2017). Assim, uma ampla gama de abordagens químicas, físicas ou de formulação tem sido exploradas pela indústria farmacêutica para contornar a baixa solubilidade de fármacos (BABADI et al., 2021; BOYD et al., 2019; WILLIAMS et al., 2013), sendo as principais representadas na Figura 1).

Diversas dessas estratégias, incluindo o uso de polimorfos metastáveis, sais, cocristais e sistemas amorfos, são considerados sistemas supersaturados de liberação de fármacos (SDDS). Estes sistemas possuem o fármaco em formas de alta energia ou outras formas de dissolução rápida, que propiciam a geração de concentrações intraluminais acima da solubilidade de saturação (ALMEIDA E SOUSA et al., 2016; BEVERNAGE et al., 2013). Esta condição é temporária, porém, percebeu-se que quando soluções supersaturadas de fármacos (concentração de soluto em solução superior à solubilidade de equilíbrio termodinâmica) são mantidas por um tempo prologando no TGI, estas podem ser suficientes para promover uma melhor absorção de fármacos com baixa solubilidade aquosa (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; DAHAN et al., 2016; WEBSTER; JACKSON; BELL, 2017; WILSON et al., 2018).

Figura 1. Diagrama esquemático que ilustra as estratégias de formulação comumente utilizadas contornar a baixa solubilidade de fármacos.



Fonte: Elaborada pela autora.

## 2.2 SOLUÇÕES SUPERSATURADAS

A condição de supersaturação pode acontecer espontaneamente no TGI durante a dissolução de bases fracas. Devido a ionização em baixo pH, ocorre uma elevada solubilização de bases fracas no estômago, porém ao atingir o intestino delgado o valor de solubilidade desses compostos é reduzido devido ao aumento do pH do meio. Como consequência, as bases fracas podem estar solúveis em concentrações acima da sua solubilidade no intestino (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

Soluções supersaturadas possuem um potencial químico ( $\mu$ ) aumentado em comparação à condição de equilíbrio (solução saturada), sendo consideradas sistemas

metaestáveis visto que é bem estabelecido na termodinâmica que materiais ou sistemas com maior potencial químico tendem a converter-se na forma de menor potencial químico. Nesse contexto, os potenciais químicos de um fármaco no seu estado dissolvido e não dissolvido são de grande importância. O potencial químico de um fármaco, por exemplo, pode ser representado pela mudança na energia de Gibbs em função da alteração na sua quantidade, mantendo constantes todos os outros fatores (composição química restante, temperatura e pressão). A mudança de potencial químico para que um fármaco se dissolva pode ser dada pela Equação 2, na qual, quando o potencial químico do fármaco não dissolvido é maior que do fármaco dissolvido, a solução está abaixo da solubilidade de saturação e ocorrerá uma dissolução do fármaco. Por outro lado, se o potencial químico da forma dissolvida do fármaco for maior que o da forma não dissolvida, esta solução está supersaturada e uma precipitação pode ser favorecida (ATKINS; DE PAULA; KEELER, 2018; BELLANTONE, 2014).

$$\Delta\mu = (\mu_{\text{fármaco dissolvido}}) - (\mu_{\text{fármaco não dissolvido}}) \quad (\text{Equação 2})$$

Consequentemente, soluções supersaturadas são termodinamicamente instáveis e tendem a regressar ao equilíbrio (potencial químico mais baixo). Essa diferença de potencial químico entre as soluções supersaturadas e saturadas serve como força motriz para a nucleação e, conseqüente, precipitação de sólidos amorfos ou cristalinos (BEVERNAGE et al., 2013; DENGALÉ et al., 2016; LAITINEN et al., 2017; TAYLOR; ZHANG, 2016). As taxas de nucleação e precipitação, em relação à taxa de dissolução da formulação, são considerados parâmetros-chave para a manutenção de uma condição supersaturada (PRICE et al., 2018).

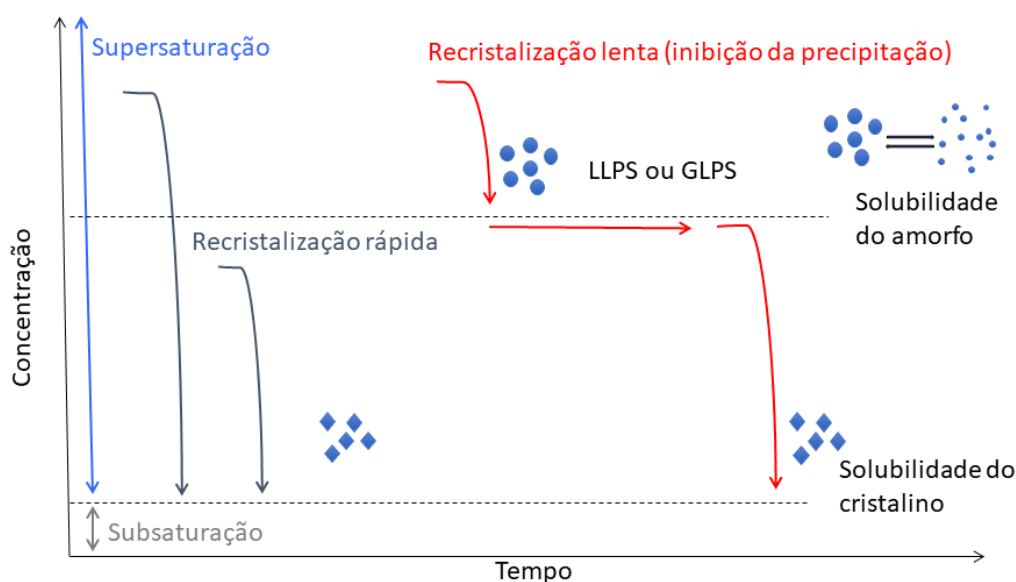
A energia de ativação necessária para a nucleação pode ser atribuída a alta tensão interfacial entre o solvente e pequenos aglomerados do fármaco com alta curvatura. Após essa barreira energética, os aglomerados podem crescer e formar cristais macroscópicos, provocando a redução da concentração em solução. Esse crescimento envolve a difusão das moléculas de uma solução supersaturada para a interface cristalina, e a integração dessas moléculas na estrutura do cristal (a qual é acompanhada pela dessolvatação dessa interface) (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; RODRÍGUEZ-HORNEDO; MURPHY, 1999).

Formulações supersaturadas bem-sucedidas, nas quais a nucleação e crescimento de cristais são inibidos ou retardados, podem se dissolver rapidamente e extrapolar uma concentração chamada de “solubilidade do amorfo”. A “solubilidade do amorfo” seria a máxima concentração livre do fármaco que é miscível em uma solução supersaturada, antes que uma separação de fases ocorra. Após essa concentração, uma separação de fase líquido-líquido

(LLPS) ou amorfo-líquido (GLPS) pode ser favorecida cineticamente, levando a separação de moléculas de fármaco em “gotículas” ricas de fármaco na fase aquosa. O sistema se separará espontaneamente através de uma decomposição espinodal, com uma menor alteração de energia (flutuação de concentração). Essa nova fase passa a existir em um pseudo-equilíbrio com o meio de dissolução, na forma de agregados coloidais do fármaco, ou de precipitado amorfo. Esses estados de LLPS ou GLPS têm uma energia menor que a solução supersaturada e, por isso, são favorecidos termodinamicamente, quando não ocorre uma recristalização rápida (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015; PRICE et al., 2018; PUROHIT, 2017).

O resumo das transições de fases que podem ocorrer durante a dissolução de um SDDS está ilustrado na Figura 2. Uma recristalização rápida pode ocorrer em uma concentração de fármaco acima da solubilidade cristalina, mas abaixo da solubilidade amorfa, como também acima da solubilidade do amorfo. Se a concentração exceder a solubilidade do amorfo e a taxa de recristalização do fármaco for lenta, uma separação de fases via LLPS ou GLPS pode gerar uma solução de 2 fases. A formação de LLPS ou GLPS contribui para que a solução permaneça supersaturada, com uma concentração correspondente à solubilidade do amorfo até que ocorra a recristalização. Com o tempo ocorre uma dessupersaturação da concentração em solução, até que a solubilidade cristalina seja alcançada (TAYLOR; ZHANG, 2016).

Figura 2. Ilustração esquemática das transições de fase que podem ocorrer em uma solução supersaturada gerada por um sistema supersaturado de liberação de fármaco.



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

Consequentemente, para que uma solução supersaturada seja mantida por um tempo suficiente para promover a absorção do fármaco, muitas vezes, necessita-se de carreadores/aditivos capazes de inibir ou retardar a precipitação em solução. Um inibidor de precipitação visaria evitar qualquer precipitação em uma solução supersaturada, no entanto, o efeito desse aditivo na sustentação de LLPS e GLPS também pode ser relevante. Assim sendo, os inibidores de precipitação ideais deveriam atuar impedindo os processos de recristalização, interrompendo a precipitação, ou mantendo a vida útil dos agregados amorfos obtidos (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; PRICE et al., 2018; TAYLOR; ZHANG, 2016; WARREN et al., 2010).

Geralmente, apenas a forma livre do fármaco em solução é capaz de permear através das membranas biológicas. Contudo, tem sido relatado que a formação desses agregados coloidais do fármaco, ou precipitados amorfos, em condições de supersaturação pode atuar como uma espécie de reservatório. Assim, estes poderiam repor a concentração de moléculas livre em solução à medida que o fármaco permeia através das membranas biológicas. Consequentemente, os processos de LLPS e GLPS prolongam a vida útil de altas concentrações de moléculas livres em solução, de tal forma que concentrações elevadas podem ser alcançadas por longos períodos. A medida que o tempo passa, as moléculas do fármaco presentes nesses agregados amorfos também tendem a recristalizar (JACKSON et al., 2016; PRICE et al., 2018; TAYLOR; ZHANG, 2016).

Os principais mecanismos de inibição de precipitação, frequentemente reportados, para polímeros e surfactantes são:

- redução do grau de supersaturação através do aumento da solubilidade (inibindo a nucleação e crescimento dos cristais);
- aumento da viscosidade do meio, levando a uma redução da mobilidade molecular (diminuindo a nucleação) e uma redução do coeficiente de difusão (diminuição do crescimento do cristal);
- aumento da energia interfacial entre aglomerado e o solvente (diminui a nucleação);
- alteração da camada de adsorção da interface cristalina, por exemplo, pela adsorção do carreador sobre a superfície do cristal impedindo assim o crescimento dos cristais. Este fato pode ser acompanhado de modificações de hábito cristalino;

- alteração do nível de solvatação da interface cristalina, afetando assim a integração das moléculas à estrutura cristalina (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; LIU; TAYLOR; EDGAR, 2015; PRICE et al., 2018; WARREN et al., 2010).

### 2.3 SISTEMAS AMORFOS

Dentre os diversos sistemas capazes de promover supersaturação do fármaco durante a dissolução no TGI destacam-se os sistemas amorfos. Estes sistemas são definidos pela ausência de ordem específica, enquanto sistemas cristalinos são descritos como tendo simetria tridimensional de longo alcance. A uma temperatura constante, o aumento da distância média entre as moléculas de um sistema amorfo reduz a magnitude das forças de atração fármaco-fármaco, reduzindo também o número de moléculas mais próximas, assim a energia de ativação necessária (a partir do solvente) para a dissolução do fármaco é reduzida. Dessa forma, esses sistemas promovem elevadas taxas de dissolução de fármacos, levando frequentemente a formação de soluções supersaturadas (BELLANTONE, 2014; PANDI et al., 2020; SUN; WEN; TAYLOR, 2016).

Sólidos amorfos possuem alta entalpia e energia livre, além de mobilidade molecular aumentada, em comparação aos seus homólogos cristalinos. Características essas que, por um lado, proporcionam um aumento da solubilidade aparente, da taxa de dissolução e supersaturação do fármaco. Por outro lado, desempenham um papel crucial na instabilidade desses sistemas, uma vez que, não estando em equilíbrio, a forma amorfa tende a relaxar em direção à baixa entalpia, sendo considerada uma forma metaestável (BELLANTONE, 2014; TAYLOR; ZHANG, 2016).

Sistemas amorfos são equivalentes a formas vítreas, seu padrão molecular pode ser comparado a um líquido congelado com alta viscosidade, no qual a viscosidade aumenta à medida que a temperatura diminui. Abaixo da sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), o volume, a capacidade calorífica e a viscosidade mudam abruptamente. Um aumento na viscosidade de 6 ordens de magnitude ou mais ocorre em uma faixa de temperatura 5-10 °C abaixo da  $T_g$ . O armazenamento de um sistema amorfo 50 °C abaixo da sua  $T_g$ , geralmente, assegura sua estabilidade física, devido a mobilidade molecular reduzida a esta temperatura. No entanto, esta regra nem sempre se aplica e a recristalização ainda pode ocorrer a temperaturas muito abaixo da  $T_g$  para alguns compostos (HUANG et al., 2017; WILLIAMS et al., 2013; YOSHIOKA; HANCOCK; ZOGRAFI, 1994).

Devido à sua instabilidade física, sólidos amorfos geralmente necessitam ser associados a carreadores/excipientes que possam estabilizar essas formulações, formando assim dispersões sólidas amorfas. Neste sentido, polímeros hidrofílicos têm sido amplamente utilizados nessas formulações farmacêuticas (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). Porém, diversas limitações ainda são encontradas para o uso destes carreadores na estabilização de dispersões sólidas, tais como uma elevada carga de polímero necessária na formulação para promover a liberação ou inibir a recristalização de alguns fármacos de alta dosagem, como é o caso da GSF (500 mg). Desta forma, moléculas de baixa massa molar, não poliméricas, têm sido investigadas como estratégias tecnológicas para a estabilização de compostos farmacêuticos amorfos (DENGALÉ et al., 2016; HAN et al., 2020; LAITINEN et al., 2017; NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018).

### **2.3.1 Coamorfos**

Coamorfos são dispersões sólidas amorfas compostas por dois ou mais componentes de baixa massa molar que formam um sistema homogêneo em uma única fase amorfa. Estes sistemas visam superar os problemas associados aos materiais amorfos através da substituição das usuais combinações entre fármacos e polímeros hidrofílicos por carreadores de baixa massa molar. Assim, as vantagens de sistemas amorfos em aumentar a solubilidade e a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis em água poderiam ser mantidas, assim como uma alta estabilidade física poderia ser alcançada sem o uso de grandes quantidades de carreador (DENGALÉ et al., 2016). (DENGALÉ et al., 2016; LÖBMANN et al., 2014; OJARINTA et al., 2017).

Os sistemas coamorfos podem envolver duas combinações: fármaco-fármaco e fármaco-carreador. No primeiro caso, coamorfos podem ser obtidos utilizando dois fármacos já utilizados em combinação na terapêutica, a fim de obter a estabilização destes na forma amorfa. No segundo caso, carreadores de baixa massa molar (excipientes da formulação que não possuem atividade terapêutica) são utilizados para preparar sistemas de coamorfos estáveis que promovam uma rápida dissolução do fármaco (LÖBMANN et al., 2014; WU et al., 2021).

Os mecanismos relatados para a estabilização destes sistemas são: a solubilização no estado sólido por meio da formação de uma única fase amorfa, a alta miscibilidade entre o fármaco e excipiente, a formação de interações intermoleculares de hidrogênio ou iônicas (formação de sais amorfos) e o aumento da temperatura de transição vítrea. A dissolução de sistemas coamorfos tem se apresentado superior ao fármaco cristalino ou amorfo isolado. A taxa de dissolução do fármaco fracamente solúvel é dependente da solubilidade do carreador e das interações moleculares fármaco-carreador. Algumas formulações coamorfos demonstraram



capacidade de gerar uma estado de supersaturação do fármaco, sendo que as interações moleculares contribuem para a prevenção da recristalização induzida por solvente nas soluções supersaturadas e para uma liberação sincronizada dos componentes da mistura coamorfa (DENGALÉ et al., 2016; JENSEN et al., 2016).

Existe uma busca por novos carreadores, sem atividade biológica, que sejam seguros para o uso em seres humanos e sejam capazes de estabilizar sistemas amorfos. Outras características desejáveis são: baixa higroscopicidade, boa solubilidade aquosa, que apresentem elevada transição vítrea e que sejam capazes de atuar como inibidores de precipitação em condições de supersaturação (DENGALÉ et al., 2016; LAITINEN et al., 2017; LÖBMANN et al., 2014; NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018).

Resultados promissores na obtenção e estabilização de sólidos coamorfos foram previamente reportados através da adição de carreadores como: aminoácidos, tais como arginina e triptofano, ácidos carboxílicos fracos, tais como ácido cítrico, tartárico e ácido succínico, bases fracas, tais como meglumina, flavonóides, a quercetina, bem como sacarina e nicotinamida. Estes sistemas oferecem uma oportunidade para estabilizar fármacos sob a forma amorfa, sem a adição de grandes quantidades de excipiente, mantendo assim o volume global da formulação tão baixa quanto possível. Proporções molares de 1:1 são geralmente preferidas em sistemas coamorfos (DENGALÉ et al., 2016; JENSEN et al., 2015; LÖBMANN et al., 2014; WU et al., 2021).

Aminoácidos são pequenas moléculas que desempenham um papel essencial no organismo, sendo utilizados na síntese proteínas, enzimas e receptores. Aminoácidos são um dos principais componentes da alimentação diária humana (na forma de proteínas) e, por conseguinte, há um interesse no uso destes como carreadores na obtenção de sistemas amorfos. Pesquisas envolvendo o uso de aminoácidos em coamorfos demonstraram melhorias na solubilidade de fármacos, boa habilidade em formar sistemas amorfos e capacidade para atuar na formação de interações iônicas (formação de sais) ou via ligações de hidrogênio em baixas proporções molares (HAN et al., 2020; LÖBMANN et al., 2014; NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018).

Há poucos relatos na literatura sobre o uso dos açúcares ou adoçantes como carreadores em sistemas coamorfos, os quais além de poder melhorar a palatabilidade de formulações farmacêuticas, ainda possuem grupamentos capazes de formar ligações de hidrogênio com os fármacos (GAO et al., 2013; UEDA et al., 2018). Diversos açúcares e adoçantes são considerados seguros, tendo seu uso recomendado pelo *Food and Drug*

*Administration* (FDA), e ainda fornecem menos calorias que o açúcar, com menor efeito sobre a glicemia do que outros carboidratos (SUPPLEMENTS; SERVICES; NUTRITION, 2013; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020). Dessa forma, o uso destas moléculas de baixa massa molar como carreadores em formulação de sistemas coamorfos pode ser considerado interessante.

## 2.4 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE SISTEMAS AMORFOS

A seleção do processo mais adequado para a obtenção de sistemas amorfos depende das propriedades físico-químicas do fármaco e do carreador (solubilidade, estabilidade térmica, ponto de fusão e  $T_g$ ), visto que cada processo possui suas vantagens e limitações. O processo de obtenção de dispersões sólidas amorfas impacta diretamente na complexidade de processamento posterior (por exemplo, tamanho de partícula e densidade aparente) e nas propriedades do medicamento acabado (por exemplo, estabilidade e dissolução). Critérios adicionais que devem ser considerados são: a disponibilidade do equipamento, a robustez do processo de fabricação, o impacto no custo dos bens (consumo de energia e dos equipamentos)(BOYD et al., 2019; PAGE; MAURER; WYTTENBACH, 2016).

As principais rotas para obtenção de sistemas amorfos incluem um resfriamento rápido após fusão (métodos de fusão), ruptura mecânica da rede cristalina (métodos de moagem) e precipitação em solução ou secagem (métodos de evaporação de solvente) (TAYLOR, 2015).

### 2.4.1 Métodos de fusão

Os métodos de fusão compreendem a fusão dos componentes, ou solubilização do fármaco em um carreador/polímero fundido, seguida de uma solidificação do material fundido através de resfriamento rápido. Os métodos de fusão laboratoriais podem ser extremamente simples. A técnica de *quench cooling (QC)* ou *melt quenching* é uma técnica de fusão bastante conhecida para a produção de pequenas quantidades de sistemas amorfos de fármacos termoestáveis para fins de estudo destas formulações. Sistemas amorfos podem ser obtidos através da fusão dos componentes em uma placa quente ou banho de água. Em seguida, a massa fundida homogênea pode ser rapidamente solidificada (i) usando um banho de gelo, (ii) colocando-a em um freezer, (iii) espalhando-a como uma camada fina sobre uma superfície de aço inoxidável e aplicando uma corrente de ar frio, (iv) espalhando-a em placas colocadas sobre gelo seco, (v) por imersão em nitrogênio líquido ou trituração do material em nitrogênio líquido (crio-moagem), ou (vi) despejando-a em placas de Petri colocadas a temperatura ambiente dentro de um dessecador. Após a solidificação, a mistura precisa ser pulverizada para facilitar o manuseio (CHAVAN et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2016).

A técnica de extrusão por fusão, do inglês *hot melt extrusion* (HME) tem sido explorada como um procedimento de larga escala para produzir dispersões sólidas ou sistema amorfos pelo método de fusão. Esta técnica consiste na extrusão do fármaco e do (s) carreador (es), previamente misturados, em alta velocidade de rotação, sob a temperatura de fusão por um pequeno período. O produto resultante é então coletado após resfriamento à temperatura ambiente e moído na forma de pós ou grânulos (SIMÕES; PINTO; SIMÕES, 2019; VASCONCELOS et al., 2016).

#### 2.4.2 Métodos de moagem

A técnica de moagem é um processo de alta energia utilizado principalmente para a redução do tamanho de partículas que, dependendo do composto, pode resultar em um produto de menor tamanho e de reduzida cristalinidade. A redução do tamanho das partículas ocorre por meio da colisão das partículas com as superfícies do equipamento e também entre si. Dependendo da estrutura do cristal, a moagem pode produzir cristais de tamanhos de partícula pequenos ou os cristais podem perder sua estrutura completamente e formar um sistema amorfo. Os dois principais mecanismos pelos quais um composto sofre amorfização durante a moagem são a formação gradual de defeitos nos cristais, que se acumulam até a perda total da ordem de longo alcance, e a possibilidade de fusão do composto devido às altas temperaturas locais produzidas durante a moagem. O processo de amorfização ocorre se a temperatura de operação estiver abaixo da  $T_g$  da forma amorfa, dado que se a temperatura de processamento estiver acima da  $T_g$  o estado amorfo temporariamente formado tende a se transformar novamente na fase cristalina estável (TRASI; BOERRIGTER; BYRN, 2010). Essa descoberta forneceu base para a utilização da crio-moagem de fármacos com baixa  $T_g$ , em que o nitrogênio líquido é usado para reduzir a temperatura de processamento (CHAVAN et al., 2016).

Os métodos de moagem em moinho de bolas e crio-moagem têm sido amplamente utilizados em escala laboratorial devido à facilidade de manuseio. As propriedades do produto final dependem da temperatura de moagem, da estabilidade térmica do fármaco e de sua  $T_g$ . Os benefícios do moinho de bolas incluem baixa degradação química e alta recuperação em comparação com outros métodos de preparação. A técnica de moagem em moinho de bolas é uma alternativa que comprovou sua escalabilidade para sistemas amorfos de um único componente. No entanto, esta técnica ainda enfrenta desafios no desenvolvimento de dispersões sólidas amorfas em escala industrial devido à dificuldade de obtenção de uma mistura homogênea no processo em larga escala. A temperatura de moagem é um parâmetro operacional

chave para o desenvolvimento de sistemas amorfos por esta técnica, pois os resultados do processo e do produto dependem dela. O calor gerado durante a moagem pode afetar a estabilidade do produto, uma vez que o fármaco tende a recristalizar se a temperatura de processamento subir acima de sua  $T_g$ . Além disso, uma elevação da temperatura aumenta a mobilidade molecular do fármaco, o que pode resultar em separação de fases (BOYD et al., 2019; CHAVAN et al., 2016).

### 2.4.3 Métodos de evaporação de solvente

O processo de obtenção de sistemas amorfos através da evaporação de solvente consiste na solubilização tanto do fármaco quanto do(s) carreador(es) em solventes comuns ou mistura de solventes, seguido pela rápida remoção do solvente. Devido a característica hidrofóbica dos fármacos de baixa solubilidade aquosa, geralmente, o uso de solventes orgânicos é requerido. Um dos processos laboratoriais utilizados para produzir sistema amorfos é a rotaevaporação. Neste processo, o solvente ou a mistura de solventes é removido (a) sob vácuo, permitindo um processamento rápido da amostra e/ou o uso de solventes com maior ponto de ebulição. Posteriormente, o produto final é retirado do frasco volumétrico e pulverizado (CHAVAN et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2016).

Em escala industrial, a técnica de secagem por atomização, conhecida como *spray drying* é amplamente utilizada e recebe destaque entre as técnicas utilizadas na obtenção de sistemas amorfos. Nesta técnica, uma solução contendo fármaco e carreador(es) é bombeada para dentro da câmara de secagem através de um atomizador. As gotículas da solução atomizada entram em contato com o fluido de secagem, gás quente (muitas vezes ar), evaporando o solvente no interior da câmara de secagem e em seguida o material seco é separado do meio de secagem através de um ciclone, sendo recolhido num dispositivo coletor (ALSHEHRI et al., 2020; SINGH; VAN DEN MOOTER, 2016).

## 2.5 GRISEOFULVINA

### 2.5.1 Uso terapêutico

A GSF, fármaco modelo usado neste trabalho, é um antifúngico de uso humano e veterinário que atua na inibição da função dos microtúbulos do fungo, interrompendo assim o fuso mitótico. A GSF é utilizada para o tratamento de doenças micóticas da pele, cabelo e unhas, devido a *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. A GSF também é eficaz para micoses de pele, barba, tinea cruris, tinea pedis e tinea corporis causadas por fungos destes gêneros. A GSF é um dos principais fármacos de escolha no tratamento de tinea capitis em crianças,

enquanto o itraconazol e a terbinafina são preferidos no tratamento de onicomicoses. A terapia tópica mostra-se efetiva na maioria dos casos de infecções fúngicas, no entanto a terapia sistêmica é requerida no tratamento de tinea capitis ou infecções fúngicas de base folicular (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2013; MAY et al., 2019; MIKAEILI et al., 2019; MORIELLO et al., 2017). Enquanto que a maior parte dos antifúngicos é conhecida por ocasionar como desvantagem a toxicidade hepática, a GSF apresenta uma incidência de reações graves muito baixa (ALWIN C. POWERS; ALESSIO, 2011). A GSF demonstra eficácia e segurança na administração por via oral, além de ser um fármaco de baixo custo comparado com outros antifúngicos (TEY; TAN; CHAN, 2011).

Apesar de ainda ser amplamente recomendada em diretrizes e consensos que abordam o tratamento de dermatofitoses, as formas farmacêuticas de GSF foram descontinuadas no mercado de diversos países por razões econômicas, problemas de formulação e redução da susceptibilidade antifúngica, os quais requeriam o uso doses maiores no tratamento ou tratamentos mais prolongados, etc. (BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2002; ELY; ROSENFELD; STONE, 2014; FULLER et al., 2014; GUPTA; COOPER, 2008; MAYSER et al., 2020; MOCHIZUKI et al., 2020). No entanto, a frequente resistência fúngica a múltiplos fármacos (como terbinafina e itraconazol) em dermatofitoses mostram que a GSF pode ser ainda uma das alternativas no tratamento dessas infecções (DE OLIVEIRA et al., 2020; SINGH et al., 2019; TAGHIPOUR et al., 2020). Nas últimas décadas, estudos envolvendo o reposicionamento de fármacos demonstraram resultados promissores quanto ao uso de GSF no tratamento da infecção parasitária esquistossomose (SARHAN et al., 2020), de hepatite viral (BEHNAM et al., 2020) e como antitumoral, tanto isolada quanto em associação com outros fármacos, ou outras terapias (BEHNAM et al., 2020; HO et al., 2001; YUAN et al., 2020).

Altas dosagens diárias de GSF são recomendadas, variando de 2,3 mg/kg (até 500 mg) para crianças e de 500-1000 mg para adultos. Este fármaco é classificado pelo SCB e pelo SCBDF como classe II, apresenta baixa solubilidade aquosa, alta permeabilidade e extensiva metabolização. A sua baixa solubilidade aquosa proporciona uma baixa biodisponibilidade oral, sendo esta dependente da formulação utilizada (ALWIN C. POWERS; ALESSIO, 2011; BOGNER et al., 2010; RANG, 2016).

### **2.5.2 Absorção, distribuição e excreção**

A administração oral de uma dose de 500 mg de GSF produz concentrações plasmáticas máximas de  $\sim 1 \mu\text{g mL}^{-1}$  em cerca de 4 horas. Os níveis plasmáticos desse fármaco

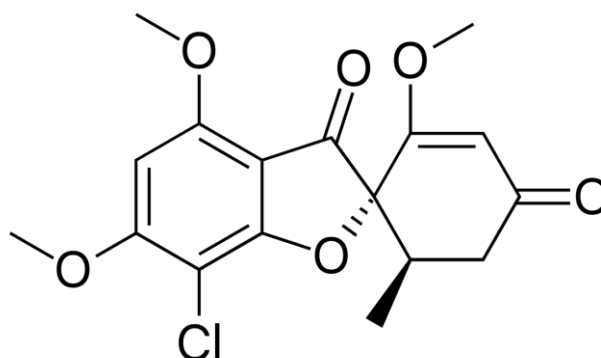
são bastante variáveis após administração por via oral. É reportado que a absorção da GSF pode ser aumentada quando administrada juntamente com alimentos gordurosos de acordo com a quantidade ingerida, além disso a fração de fármaco absorvida também pode variar de 28-100% dependendo da dose e do tipo de formulação administrados. A absorção da GSF ocorre principalmente no intestino delgado (duodeno > jejuno e íleo), com baixo percentual de absorção no estômago e valores insignificantes de absorção no cólon. A GSF tem um  $t_{1/2}$  plasmático de ~ 1 dia. Após administração oral de GSF em humanos, foi observado que o percentual de fármaco excretado na urina variou de 17-44% em 24 h e de 28-66% em 72 h, dependendo do tipo de formulação administrada e que o percentual de fármaco excretado nas fezes foi em torno de 36 % em 96 h. A GSF é excretada na urina principalmente na forma de metabólitos, e nas fezes na forma inalterada. Estudos indicam que essa metabolização do fármaco ocorre principalmente no fígado (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2013; LIN; SYMCHOWICZ, 1975).

A GSF se deposita nas células precursoras da queratina; e mesmo após a diferenciação celular este fármaco permanece ligado a queratina, proporcionando resistência prolongada à invasão fúngica e fazendo com que unhas e cabelos sejam os primeiros a estarem livres da infecção fúngica. O suor e a perda de fluido transepidermico desempenham um papel importante na transferência desse fármaco para o estrato córneo, uma vez que este fármaco é excretado também através das glândulas sudoríparas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2013; LIN; SYMCHOWICZ, 1975).

### **2.5.3 Características físico-químicas**

A GSF, cuja estrutura molecular está exposta na Figura 3, é um fármaco neutro (pH 0-14) que apresenta somente grupamentos aceptores de hidrogênio (6), seu pKa teórico (ácido) predito seria de 17,69. A massa molar (MM) da GSF é de 352.77 g mol<sup>-1</sup> e o log P é 2,1 (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2020). A GSF possui baixa solubilidade em água e é solúvel em solventes orgânicos como acetona, clorofórmio, dimetilformamida (MOFFAT; OSSELTON; BRIAN WIDDOP, 2011; MURDANDE et al., 2011).

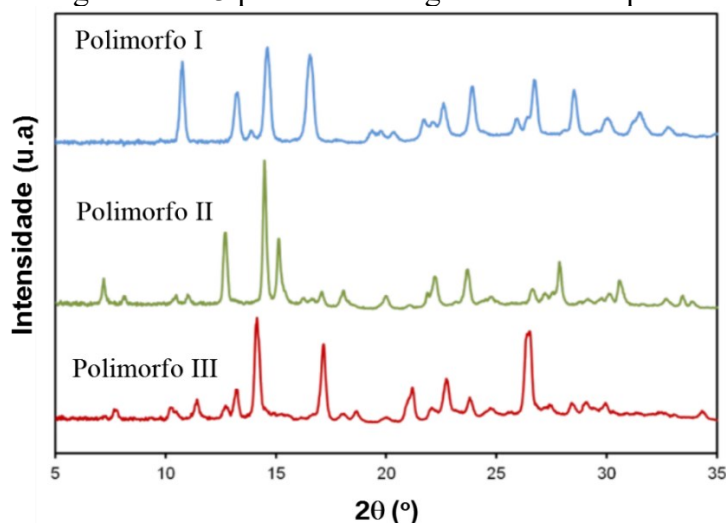
Figura 3. Estrutura química molecular da griseofulvina.



Fonte: USP, 2016.

São reportados na literatura 3 polimorfos da GSF (Figura 4) e a forma amorfa obtida por QC, dentre os quais a forma mais estável é o polimorfo I (AMHARAR et al., 2016; SU et al., 2018). Um estudo investigou a solubilidade do fármaco cristalino (forma I) e amorfo (LLPS) em tampão fosfato a 25 °C encontrando valores de 11.55  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e  $\sim 356 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Assim, este estudo reporta que a taxa de supersaturação máxima é de 31 vezes a solubilidade da GSF cristalina (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015).

Figura 4. Difratograma dos 3 polimorfos de griseofulvina reportados na literatura.



Fonte: Adaptado de SU et al., 2018.

Estudos envolvendo a investigação do comportamento da GSF em soluções supersaturadas mostraram que este fármaco recristaliza rapidamente mesmo na presença de polímeros, com baixa tendência a gerar uma condição de supersaturação durante a dissolução de SDDS. A GSF exibe alta tendência de recristalização também no estado sólido quando na forma amorfa, mesmo apresentando um valor de temperatura de transição vítrea relativamente alto (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015; BLAABJERG et al., 2018; CHEN et al., 2015a, 2015b; OHYAGI et al., 2017; ZHOU et al., 2008).

#### 2.5.4 Estratégias usadas para contornar a baixa solubilidade aquosa da griseofulvina

Ao longo dos anos, diversas estratégias de formulações foram utilizadas na tentativa de melhorar a solubilidade e taxa de dissolução da GSF, dentre os quais citam-se: dispersões sólidas (CHEN et al., 2015b; OHYAGI et al., 2017; PAS et al., 2018; SARODE et al., 2013; ZHENG et al., 2019), cocristais (AITIPAMULA et al., 2012), complexação com ciclodextrinas (HBAIEB; KALFAT; CHEVALIER, 2012), formulações lipídicas (ALSKÄR et al., 2018), autonanoemulsionáveis (YE et al., 2019), micro e nanopartículas (LI et al., 2018b; SHAH et al., 2016), e diversas outras estratégias (AHMED; ABOUL-EINIEN, 2007; TAN et al., 2018).

Golberg e colaboradores (1965) reportaram a formação de uma mistura eutética entre a GSF e o ácido succínico (proporção 55:45 m/m) a qual levou a um aumento na velocidade de dissolução do fármaco atingindo concentrações acima da solubilidade do fármaco isolado, tanto para formulações na proporção eutética como também utilizando uma maior proporção de carreador (GOLDBERG; GIBALDI; KANIG, 1966). Resultados semelhantes com relação a melhoria de dissolução proporcionada por dispersões sólidas de GSF e ácido succínico foram obtidos por Chiou e Niazi (1976), nos quais a velocidade de dissolução foi mais acentuada em dispersões sólidas contendo menor carga de fármaco (CHIOU; NIAZI, 1976). É reportado na literatura que a apresentação de GSF presente no mercado dos EUA (GRIS-PEG<sup>®</sup>) é uma dispersão sólida monotética utilizando uma proporção de 5% de GSF e 95% (m/m) de Polietilenoglicol (PEG) (BROWN et al., 2014; LAW et al., 2002).

O principal desafio no desenvolvimento de sistemas supersaturados de GSF tem sido encontrar uma abordagem que estabilize o fármaco tanto no estado sólido por um longo período de armazenamento, contornando a sua rápida tendência de recristalização em sistema amorfo, quanto estabilize o fármaco em soluções supersaturadas, tudo isso sem utilizar uma alta carga de carreador na formulação. Considerando a complexidade de estabilização de sistemas supersaturados de GSF, o uso desse fármaco para investigar novos carreadores para dispersões sólidas amorfas é considerado interessante, promissor e inovador. Nenhum estudo de sistemas coamorfos com esse fármaco foi reportado na literatura previamente a este estudo e no mercado farmacêutico brasileiro não existe uma forma farmacêutica amorfa de GSF para que os pacientes possam se beneficiar desses sistemas.

## 2.6 ÁCIDO GLICIRRÍZICO

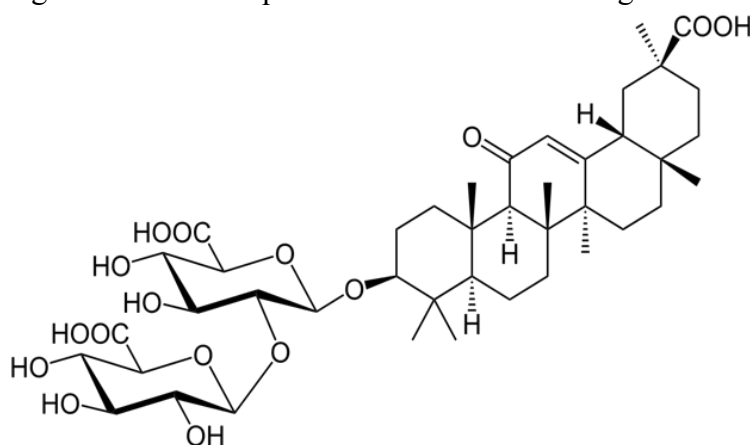
A licorice, raiz da planta *Glycyrrhiza* spp, da qual se obtém o ácido glicirrízico (GA), tem sido utilizada desde os tempos antigos por egípcios, gregos e romanos no Ocidente e desde



o século 2 a.C. por chineses no Oriente, sendo um dos produtos botânicos mais frequentemente empregados em alimentos e na medicina tradicional (SHIBATA S, 2000; SUI et al., 2012). O GA é um adoçante natural obtido principalmente a partir das raízes de *Glycyrrhiza glabra* L. Este composto é utilizado em diversos países em formulações cosméticas, em tônicos capilares, também como expectorante, anti-inflamatório, hepatoprotetor, no tratamento de gastrite, etc. (MATSUOKA et al., 2016). Ainda, uma recente revisão da literatura abordou a atividade antiproliferativa do GA, reportada por diversos estudos em diferentes tipos tumorais como leucemia, glioma maligno, câncer de pulmão, de cólon, etc. (SU et al., 2017).

O uso do GA é considerado seguro, sendo aprovado pelas agências regulatórias FDA e *European Food Safety Authority* (EFSA). A dosagem diária de GA recomendada é de 100 mg, a qual se deve à ausência de informações toxicológicas associadas ao consumo de altas doses ou ao uso do GA por períodos prolongados (FOOD; AUTHORITY, 2015; WALTERS, 2013).

Figura 5. Estrutura química molecular do ácido glicirrízico



Fonte: METELEVA et al., 2019.

A estrutura química molecular do GA (Figura 5) é composta por um triterpeno, associado a dois glucosídeos. Dois de seus grupamentos carboxílicos situam-se nos seus fragmentos glucurônicos (pKa1: 4,4 e pKa2: 5,3), enquanto o terceiro grupo carboxílico situa-se no triterpeno (pKa3: 6,9). A ionização de seu ácido fraco do triterpeno tem influência nas propriedades de superfície e formação de agregados do GA. Em pH menor que 5, o GA possui uma baixa solubilidade aquosa e pode formar tanto gel quanto micelas, em pH entre 5-6 micelas/agregados coloidais são formados, enquanto que em pHs acima 7 o GA apresenta-se na forma de monômeros em solução (MATSUOKA et al., 2016; PETROVA et al., 2017).

A capacidade do GA em formar micelas e agregados coloidais tem aumentado o interesse de comunidade científica em investigar o seu potencial na melhoria da solubilidade

de compostos pouco solúveis em água. Recentemente, alguns estudos têm investigado a aplicação do GA e/ou seu sal dissódico em sistemas de liberação de fármacos de baixa solubilidade aquosa para melhorar a dissolução destes, citam-se estudos para os fármacos candersartana cilexetila (LU et al., 2019), atorvastatina cálcica (KONG et al., 2018), curcumina (KONG et al., 2018), praziquantel (METELEVA et al., 2019), celecoxibe (MARGULIS-GOSHEN et al., 2011) e itraconazol (FERNÁNDEZ-RONCO et al., 2015). Foi reportado que o sal dissódico do GA ( $\text{Na}_2\text{GA}$ ) sofre hidrólise em soluções aquosas, convertendo-se para a forma livre de GA, oferecendo como vantagem o fato de formar soluções com menor viscosidade (METELEVA et al., 2019). Estudos envolvendo ao uso do GA na estabilização de nanoemulsões também têm sido reportados (LIAO et al., 2020; TROTTA et al., 2003).

### **3 CAPÍTULO II: INVESTIGAÇÃO DO IMPACTO DE AMINOÁCIDOS COMO CARREADORES DE BAIXA MASSA MOLAR EM SISTEMAS SUPERSATURADOS DE GRISEOFULVINA**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Sistemas supersaturados de liberação de fármacos (SDDS), como os sistemas amorfos, são considerados estratégias interessantes para elevar a biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade aquosa. Estes sistemas são altamente energéticos e podem dissolver-se rapidamente, proporcionando uma liberação do fármaco em concentrações acima de sua solubilidade aquosa (saturação) no TGI (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009). Essa condição de supersaturação deve ser mantida por um tempo prolongado durante a dissolução de SDDS para proporcionar a melhoria na absorção oral de fármacos de baixa solubilidade, SCB classes II e IV. No entanto, soluções supersaturadas e sólidos amorfos são considerados termodinamicamente instáveis. Carreadores/excipientes necessitam ser incluídos nesses sistemas a fim de estabilizá-los no estado sólido e estabilizar as soluções supersaturadas geradas durante a dissolução destes, evitando a recristalização do fármaco em ambas as situações. O uso de polímeros como inibidores de precipitação/recristalização tem sido bastante estudado e aplicado em sistemas amorfos. No entanto, grandes quantidades de polímero podem ser requeridas para estabilizar sistemas contendo fármacos com alta tendência à recristalização ou ainda para promover a dissolução de fármacos com alta hidrofobicidade. Neste contexto, a aplicação de polímeros pode se tornar inviável em formas farmacêuticas de fármacos de alta dosagem, requerendo uma investigação de novas alternativas que possam contribuir para a redução da quantidade de carreador necessária (CHEN et al., 2015b; LAITINEN et al., 2017; LIU; TAYLOR; EDGAR, 2015; NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018; SABOO et al., 2019).

A aplicação de aminoácidos na estabilização de sistemas amorfos tem sido recentemente explorada na forma de sistemas coamorfos. Estes sistemas compreendem a combinação de dois ou mais componentes de baixa massa molar, os quais formam um sistema amorfo homogêneo de fase única. O uso de aminoácidos, como carreadores no desenvolvimento de sais coamorfos, demonstrou resultados promissores quanto a estabilização no estado sólido de fármacos ionizáveis (DENGALÉ et al., 2016; KASTEN et al., 2016; LAITINEN et al., 2017; OJARINTA et al., 2017; WU et al., 2021). Entretanto, poucos estudos investigaram o uso de aminoácidos em soluções supersaturadas, bem como a habilidade de sistemas coamorfos em

proporcionar e manter a condição de supersaturação em soluções aquosas (LAITINEN et al., 2017; NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018; OJARINTA et al., 2017; WU et al., 2021).

O fármaco de baixa solubilidade aquosa utilizado nesse trabalho foi a GSF. Este fármaco é um antifúngico considerado como primeira escolha no tratamento de infecções fúngicas causadas por tinea capitis, sendo mais comumente utilizado em crianças devido ao seu custo-benefício e fácil acessibilidade. A baixa solubilidade a GSF prejudica a absorção oral desse fármaco, fazendo com que esta possua uma alta variação da concentração plasmática de acordo com a ingestão alimentar do paciente (BOGNER et al., 2010; GUPTA et al., 2018). Ao longo dos anos, diversas estratégias de formulações foram utilizadas na tentativa de melhorar a solubilidade e taxa de dissolução da GSF. A alta tendência de recristalização da GSF tanto em solução quanto em sólidos amorfos ainda representa um desafio no desenvolvimento de SDDS deste fármaco. Ainda busca-se um carreador que atue como inibidor de recristalização efetivo durante a dissolução do SDDS de GSF, a fim de gerar altas concentrações do fármaco em solução e manter essa concentração por um período prolongado nos fluidos gastrointestinais (AITIPAMULA et al., 2012; ALSKÄR et al., 2018; CHEN et al., 2015b; HBAIEB; KALFAT; CHEVALIER, 2012; LI et al., 2018b; OHYAGI et al., 2017; PAS et al., 2018; SARODE et al., 2013; SHAH et al., 2016; TAN et al., 2018; ZHENG et al., 2019). Embora a aplicação de aminoácidos em sistemas amorfos tenha se destacado como uma tendência nos últimos anos, não foram reportados estudos prévios na literatura envolvendo o desenvolvimento de sistemas amorfos de GSF com aminoácidos.

Neste contexto, esta etapa deste trabalho teve como objetivo investigar a viabilidade do uso de aminoácidos, como carreadores hidrofílicos de baixa massa molar, no desenvolvimento de sistemas supersaturados de GSF, bem como avaliar a sua capacidade de estabilizar sólidos amorfos de GSF. Adicionalmente, foi investigada a influência de diferentes aminoácidos na solubilidade aquosa e no perfil de precipitação do fármaco, em solução tampão e meio biorrelevante.

Cabe mencionar que os resultados deste capítulo já se encontram publicados no periódico *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, sendo o manuscrito intitulado *Could the small molecules such as amino acids improve aqueous solubility and stabilize amorphous systems containing Griseofulvin?* (Figura A 1, na seção APÊNDICE).

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Materiais

O fármaco GSF e os aminoácidos DL-metionina (MET) foram adquiridos da empresa Pharmanostra. O ácido L-aspartico (ASP) e a L-valina (VAL) foram gentilmente doados pela empresa Valdequímica Produtos Químicos LTDA. Os aminoácidos L-lisina (LYS) e triptofano (TRYP) foram adquiridos da empresa Maria Rocha Farmácia de Manipulação. O meio biorrelevante FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF<sup>®</sup> foi adquirido da empresa Biorelevant (Surrey, RU). A preparação do fluido gástrico simulado em jejum (FaSSGF) e do fluido intestinal simulado em jejum (FaSSIF) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (KLEIN, 2010). A água ultrapura foi obtida através de sistema MilliQ<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, EUA). Todos os demais reagentes químicos utilizados foram de grau analítico ou de grau para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### 3.2.2 Métodos

#### 3.2.2.1 Avaliação do impacto dos aminoácidos na precipitação da griseofulvina

O impacto dos carreadores no perfil de precipitação da GSF em soluções supersaturadas foi investigado pelo método de *solvent shift* (BEVERNAGE et al., 2013). O fármaco foi solubilizado em um solvente orgânico miscível em água (80 mg mL<sup>-1</sup> dissolvido em dimetilformamida (DMF)) e uma alíquota desta solução estoque (equivalente a uma concentração final 100 µg mL<sup>-1</sup>) foi adicionada à 50 mL de meio. Estudos preliminares de solubilidade de equilíbrio foram realizados para garantir que a concentração de solvente orgânico presente na solução não interferisse na solubilidade aquosa da GSF. Os meios utilizados foram tampão fosfato pH 6,5 (o mesmo utilizado para o preparo de FASSIF, sem a adição dos sais biliares), ou FaSSIF, contendo ou não a presença de aminoácidos previamente solubilizados (30 mmol L<sup>-1</sup>, aproximadamente 1000 vezes a solubilidade do fármaco). Os estudos foram conduzidos em triplicata, em Shaker NT 715 (NovaTécnica), no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LabCQ), da UFSC. A temperatura foi mantida constante a 37 °C, sob agitação de 240 rpm, durante 240 min (dobro do tempo mínimo considerado fisiologicamente relevante (FOTAKI et al., 2014)). Alíquotas foram coletadas em tempos pré-determinados, filtradas através de membrana de poliamida de 0,45 µm (Chromaphil<sup>®</sup> Xtra), imediatamente diluídas em metanol:água (50/50 v/v) e analisadas por CLAE.

A determinação quantitativa foi conduzida em cromatógrafo Series 200 (PerkinElmer), na Centralcrom, central de cromatografia multiusuária do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFSC. A detecção UV à 254 nm, em metodologia adaptada de Townley e Roden (TOWNLEY; RODEN, 1980). A fase móvel utilizada foi metanol:água (50:50, v/v) e a fase estacionária foi uma coluna C18 (Kinetex<sup>®</sup> 110A, 5 µm, 150×4,6 mm). O fluxo de fase móvel foi mantido em 1 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura de 25 °C, com volume de injeção de 20 µL. As curvas padrão demonstraram boa linearidade ( $R > 0,99$ ) no intervalo de concentração relevante. Valores de área sob a curva (AUC) dos perfis de precipitação da GSF nos diferentes meios foram calculados usando o suplemento DD Solver<sup>®</sup> no software Microsoft Excel<sup>®</sup>.

### 3.2.2.2 Estudos de solubilidade de equilíbrio

Os estudos de solubilidade de equilíbrio do fármaco foram determinados em água, tampão pH 6,5 (branco do FaSSIF), FaSSIF, pH 1,6 (branco do FaSSGF) e FaSSGF. Amostras em triplicata, contendo excesso de fármaco cristalino, foram agitadas a 240 rpm, 37 °C, em Shaker NT 715 (NovaTécnica, disponível no LabCQ-UFSC), até atingir o equilíbrio (24- 72 h). Em tempos pré-determinados, alíquotas foram coletadas, filtradas em membrana de poliamida 0,45 µm e quantificadas por metodologia de CLAE previamente descrita no item 3.2.2.1. O impacto dos aminoácidos (30 mmol L<sup>-1</sup>) na solubilidade de equilíbrio da GSF também foi investigado em tampão pH 6,5 e FaSSIF.

### 3.2.2.3 Desenvolvimento dos sistemas amorfos

#### 3.2.2.3.1 Método de moagem em moinho de bolas (BM)

As formulações foram obtidas em moinho planetário de alta energia PM200 (RETSCH), no laboratório de Biotecnologia da UNIVILLE, utilizando cadinho e 3 bolas de aço inoxidável (massa total  $\cong$  97 g). Amostras de massa total de 2,5 g (de GSF, ou de GSF associada aos aminoácidos ASP, LYS, MET, TRYP e VAL, na proporção 1:1 molar) foram moídas por 6 h, a 560 rpm, com pausa de 0,5 min e inversão de rotação a cada 30 min. As condições experimentais foram definidas e otimizadas de acordo com testes preliminares.

#### 3.2.2.3.2 Método de *Quench Cooling* (QC)

A amostra GSF QC foi preparada por meio da fusão de 2 g da GSF cristalina em recipiente de alumínio mantido a 220 °C, em mufla Fornitec, no Laboratório de Farmacognosia da UFSC. Após a completa fusão da amostra (1-2 min), o recipiente foi removido da mufla e colocado por alguns segundos sobre um bloco de gelo para que a amostra fosse resfriada rapidamente. Em seguida, a amostra foi armazenada em dessecador contendo sílica em gel, a

fim de prevenir a adsorção de umidade, até a sua moagem em grau e pistilo e utilização nas análises.

#### 3.2.2.4 Caracterização do estado sólido

##### 3.2.2.4.1 Análises de difração de raios-X de pó (XRPD)

As análises de difração de raios-X de pó (XRPD) foram realizadas em difratômetro de raios-X  $\theta$ - $\theta$  D2 Phaser (Bruker), no Departamento de Química da UFSC. O equipamento operou com radiação de cobre  $K\alpha$  ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ), corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV. A detecção foi conduzida em detector de cintilação unidirecional LYNXEYE. As medidas foram obtidas a temperatura ambiente, através de varredura  $2\theta$  na faixa de  $5^\circ$  a  $40^\circ$ , com intervalo angular de  $0,089^\circ$  a cada 0,5 s.

##### 3.2.2.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As medidas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas em célula de DSC-60 (Shimadzu), disponível no LabCQ-UFSC, utilizando temperatura entre  $25$ – $300^\circ\text{C}$ . As amostras foram pesadas ( $\cong 5 \text{ mg}$ ), seladas em cadinho de alumínio e submetidas a uma razão de aquecimento de  $5^\circ\text{C min}^{-1}$ , sob uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de  $100 \text{ mL min}^{-1}$ . O equipamento foi previamente calibrado usando padrões de índio e zinco.

Análises de DSC modular (mDSC) foram realizadas em equipamento Q2000 (TA Instruments) de  $0$  a  $200^\circ\text{C}$ , sob uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . Aproximadamente  $3 \text{ mg}$  de amostra foram pesadas, seladas em cadinho de alumínio e aquecidas a uma razão de aquecimento de  $5^\circ\text{C min}^{-1}$ , utilizando uma amplitude de modulação de  $0,53^\circ\text{C}$  a cada  $40 \text{ s}$  para alcançar uma separação razoável de eventos reversíveis e não reversíveis (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2018).

##### 3.2.2.4.3 Microscopia de luz polarizada (PLM)

Análises de microscopia de luz polarizada (PLM) foram realizadas em microscópio Olympus CX41RF equipado com analisador de luz transmitida U-ANT e polarizador de luz transmitida U-POT, no Laboratório de Bioquímica Clínica II da UFSC. Pequenas quantidades de amostras em pó foram colocadas sobre lâminas de vidro e analisadas utilizando uma magnificação de  $200\times$  (Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

#### 3.2.2.4.4 Análises de tamanho de partícula

Análises de tamanho de partícula foram realizadas utilizando imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) obtidas em microscópio Jeol (modelo JSM6390LV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, sob voltagem de aceleração de 10kV. As amostras foram fixadas em *stubs*, utilizando fita de carbono dupla face, e foram recobertas com ouro em recobridora Leica EM SCD 500 antes das análises. A distribuição do tamanho de partícula das formulações foi estimada por meio da determinação do diâmetro de Feret de 850 partículas, selecionadas randomicamente, utilizando o software Image J (NIH, EUA).

#### 3.2.2.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidas em espectrômetro FT-IR/NIR Frontier (PerkinElmer), equipado com acessório de amostragem Universal ATR, disponível no LabCQ-UFSC. As amostras foram adicionadas sobre o acessório e foram adquiridas 16 varreduras em uma faixa espectral de 4000–600  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ , a temperatura ambiente.

#### 3.2.2.5 Estudos cinéticos de solubilidade

Estudos cinéticos de solubilidade foram avaliados em condição não *sink*<sup>1</sup> considerando a solubilidade do fármaco cristalino, em Shaker NT 715 (NovaTécnica, Brasil), a temperatura de 37 °C, 240 rpm. Quantidades de amostra dos sistemas amorfos (equivalentes a concentrações finais de GSF de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D1) e 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D2)) foram pesadas e adicionadas aos meios FaSSGF e FaSSIF. Em tempos pré-determinados, alíquotas foram coletadas e filtradas em membrana de poliamida de 0,45  $\mu\text{m}$  (Chromaphil® Xtra). As amostras foram imediatamente diluídas em metanol:água (50/50 v/v) e quantificadas por metodologia CLAE previamente descrita (item 3.2.2.1). Os valores de AUC dos perfis de solubilidade cinética *in vitro* foram calculados utilizando o suplemento DD Solver® do software Microsoft Excel®.

#### 3.2.2.6 Estudos de estabilidade

O estudo de estabilidade das amostras GSF QC e GSF-TRYP BM foi realizado com objetivo de investigar a ocorrência de recristalização da GSF durante o armazenamento em

<sup>1</sup> A condição *sink* é definida pela *United States Pharmacopoeia* (USP, 2016) como uma condição com volume de meio equivalente a no mínimo três vezes o volume de meio necessário para formar uma solução saturada do fármaco.



dessecador à vácuo contendo sílica gel (13-32% de umidade relativa, RH), a temperatura ambiente (23-28 °C). Análises de XRPD e PLM foram realizadas no dia de preparo da amostra (0D), após sete dias (7D), seis meses (6M) e doze meses (12M).

### 3.2.2.7 Análises estatísticas

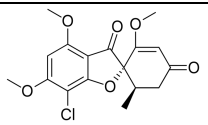
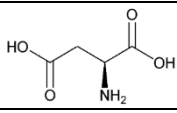
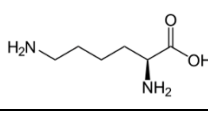
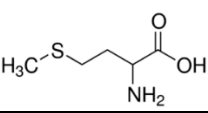
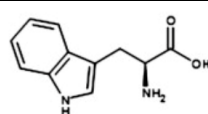
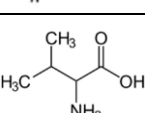
Análises de variância (ANOVA) de uma ou duas vias e testes de comparações múltiplas de Tukey foram realizados a fim de verificar a significância estatística ( $p < 0,05$ , com um intervalo de confiança de 95%) das comparações entre as amostras e seus controles.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.3.1 Avaliação do impacto dos aminoácidos na precipitação da griseofulvina

Cinco aminoácidos (Tabela 1) foram pré-selecionados, de acordo com suas propriedades físico-químicas, para investigar o impacto destes no perfil de precipitação da GSF e na formação de sistemas amorfos com o fármaco.

Tabela 1. Principais características da GSF e dos aminoácidos empregados neste estudo.

Composto	Estrutura Química	Solubilidade aquosa termodinâmica a 25 °C (mol L <sup>-1</sup> )	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	LogP	Ponto Isoelétrico
GSF		0,0024 <sup>a</sup>	352,77 <sup>a</sup>	-	2,18 <sup>c</sup>	-
ASP		0,038 <sup>b</sup>	133,10 <sup>b</sup>	1,94 3,71 9,63 <sup>b</sup>	-3,70 <sup>d</sup>	2,77 <sup>b</sup>
LYS		1,687 <sup>b</sup>	146,18 <sup>b</sup>	2,15 9,16 10,67 <sup>b</sup>	-2,82 <sup>d</sup>	9,74 <sup>b</sup>
MET		0,375 <sup>b</sup>	149,21 <sup>b</sup>	2,13 9,28 <sup>b</sup>	-1,87 <sup>d</sup>	5,74 <sup>b</sup>
TRYP		0,065 <sup>b</sup>	204,22 <sup>b</sup>	2,46 9,41 <sup>b</sup>	-1,06 <sup>d</sup>	5,89 <sup>b</sup>
VAL		0,501 <sup>b</sup>	117,14 <sup>b</sup>	2,35 9,62 <sup>b</sup>	-2,10 <sup>d</sup>	5,97 <sup>b</sup>

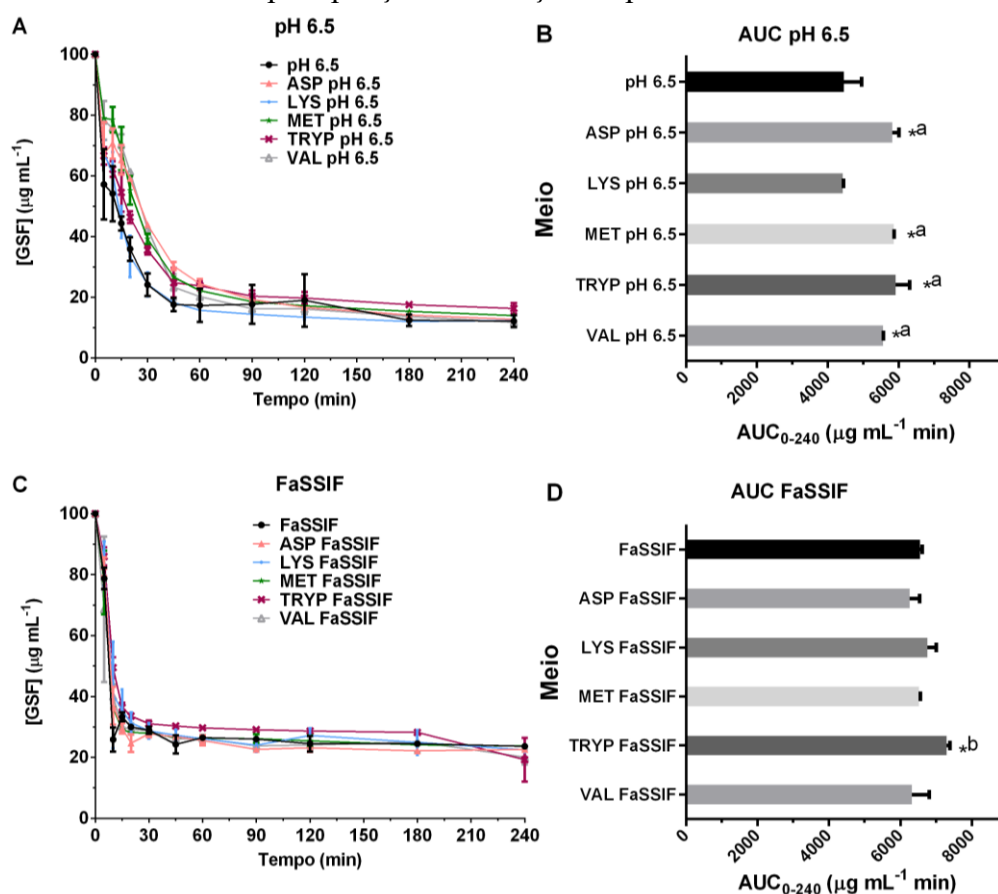
\*Dados obtidos de <sup>a</sup> (BOGNER et al., 2010), <sup>b</sup> (TILBORG; NORBERG; WOUTERS, 2014), <sup>c</sup> (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011) e <sup>d</sup> (NAEF, 2015).

Os resultados dos estudos de precipitação do fármaco em soluções supersaturadas contendo os aminoácidos estão demonstrados na Figura 6. Os valores de AUC foram calculados

a fim de entender melhor como os aminoácidos impactaram na precipitação *in vitro* da GSF, visto que a AUC representa o grau e a extensão da supersaturação.

A presença dos aminoácidos ASP, MET, TRYP e VAL em solução postergou suavemente a precipitação da GSF em pH 6,5, aumentando os valores de AUC (Figura 6B). Em pH 6,5, as moléculas de ASP em solução apresentam apenas cargas negativas, já os demais aminoácidos exibem moléculas que possuem tanto cargas positivas quanto negativas, embora em diferentes proporções (MET, TRYP e VAL: negativas > positivas; LYS: negativas < positivas) (TILBORG; NORBERG; WOUTERS, 2014). Todos os aminoácidos que promoveram uma maior AUC nos estudos de precipitação da GSF em tampão pH 6,5 encontram-se acima do seu ponto isoelétrico em solução (TILBORG; NORBERG; WOUTERS, 2014), sugerindo que a ionização destes aminoácidos, com maior predominância da presença de cargas elétricas negativas, poderia estar contribuindo para a inibição da precipitação da GSF.

Figura 6. Perfis de concentração de GSF vs. tempo e suas respectivas AUC dos estudos de precipitação em soluções supersaturadas.



Legenda: Os meios utilizados foram tampão fosfato pH 6,5 ou FaSSIF, com ou sem a presença de 30 mmol L<sup>-1</sup> de aminoácidos. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, a 37 °C, sob agitação de 240 rpm.

\*Estatisticamente diferente ( $p < 0.05$ ) vs. a pH 6.5 e b FaSSIF. Fonte: Elaborado pela autora.

Em meio biorrelevante, o perfil de precipitação do fármaco foi acelerado quando comparado com o resultado obtido em tampão pH 6,5 (Figura 6C). Este fato, provavelmente, deve-se a presença da lecitina, visto que em um estudo anterior a presença de taurocolato de sódio retardou a precipitação da GSF (CHEN et al., 2015a), e já foi reportado que a lecitina diminuiu efeito de sais biliares na inibição de precipitação de do fármaco telaprevir (LU et al., 2017). O TRYP foi o único aminoácido que proporcionou um aumento na AUC dos perfis de precipitação da GSF (Figura 6D) em comparação com o meio FaSSIF ( $p < 0,05$ ), contudo este incremento foi relativamente pequeno (12,0%). Embora, todos os aminoácidos possuam grupos doadores e aceptores de hidrogênio, a baixa capacidade de interação em solução entre a GSF e os aminoácidos pode estar relacionada com as características de lipofilicidade ( $\log P$ ) destes compostos. Os aminoácidos são compostos altamente hidrofílicos e o TRYP é o aminoácido que possui maior coeficiente de partição octanol/água dentre os compostos testados. Considerando essa característica, o TRYP seria o aminoácido que possui condições mais favoráveis para interagir com o fármaco lipofílico GSF.

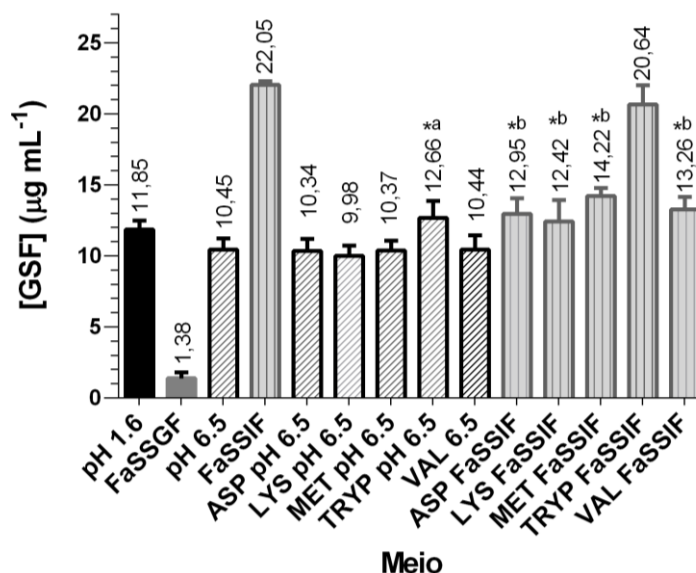
### 3.3.2 Estudos de solubilidade de equilíbrio

Os resultados dos estudos de solubilidade de equilíbrio da GSF cristalina (GSFc) confirmam a sua baixa solubilidade aquosa em pH 1,6 e pH 6,5 (Figura 7). Em FaSSGF, a adição dos sais biliares abaixo de sua concentração micelar crítica ao meio pH 1,6 proporcionou uma redução na solubilidade da GSF, enquanto em FaSSIF a presença dos sais biliares proporcionou um aumento da solubilidade do fármaco por meio da solubilização micelar. Embora a presença de sais biliares em solução frequentemente aumente a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis, o efeito oposto também já foi observado para alguns fármacos básicos e neutros em um estudo envolvendo diversos fármacos. Além da concentração de sais biliares em solução, outras características como a ionização dos componentes do meio e mudanças na osmolaridade também podem afetar a solubilidade de fármacos pouco solúveis (BRINKMANN-TRETTENES; BAUER-BRANDL, 2014; KHADRA et al., 2015).

A adição de 30 mmol L<sup>-1</sup> de aminoácidos em tampão pH 6,5 não impactou na solubilidade de equilíbrio da GSFc, com exceção do TRYP, o qual proporcionou um aumento de 19,6% na solubilidade do fármaco neste meio. Em FaSSIF, a adição desses mesmos aminoácidos diminuiu a solubilidade de equilíbrio da GSFc, enquanto a presença do TRYP, não interferiu na solubilização do fármaco nesse meio. Alguns estudos na literatura já reportaram que grupos amina e hidroxila de aminoácidos podem interagir com sais biliares e

surfactantes (ARUTYUNYAN et al., 2008; EUSTON et al., 2013; HUIJGHEBAERT; HOFMANN, 1986; IMAI et al., 2013; ZHOU; LIU, 2009). Assim, sugere-se que interações entre os aminoácidos e os sais biliares podem ser responsáveis pela alteração da capacidade de solubilização do fármaco pelas micelas do meio biorrelevante.

Figura 7. Solubilidade de equilíbrio da GSF cristalina em diferentes meios, a 37 °C.



Legenda: \*Estatisticamente diferente ( $p < 0.05$ ) vs. <sup>a</sup> pH 6,5 e <sup>b</sup> FaSSIF. Fonte: Elaborado pela autora.

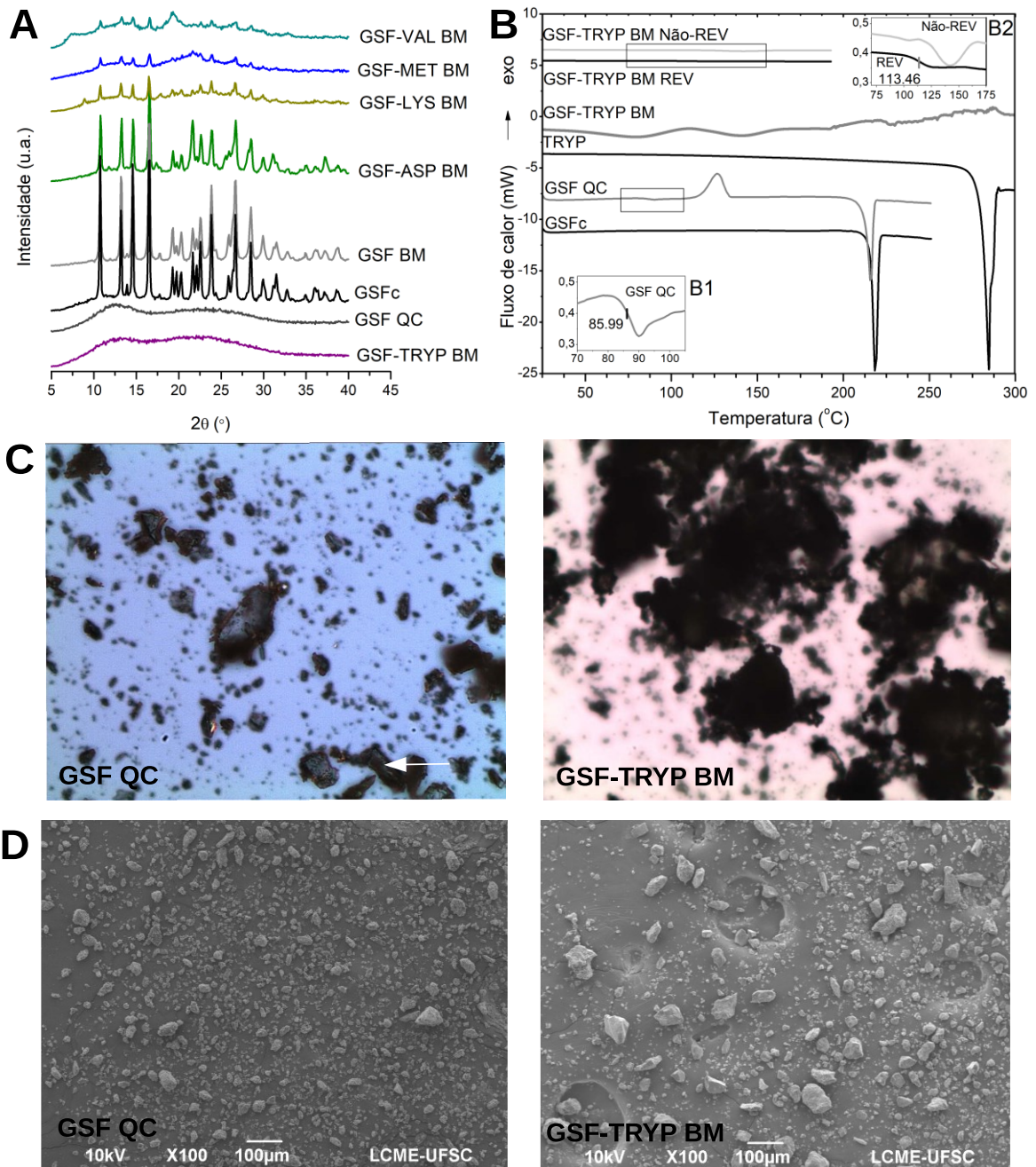
O baixo desempenho dos aminoácidos ASP, MET e VAL na inibição da precipitação da GSF em FaSSIF, quando comparado com os dados obtidos em pH 6,5, foi possivelmente em decorrência dessa redução na solubilidade da GSF no meio. O grau de supersaturação de uma solução supersaturada é alterado quando há uma mudança na solubilidade do fármaco, a diferença de potencial químico entre a solução saturada e a supersaturada é aumentada quando a solubilidade do fármaco é reduzida, aumentando assim a instabilidade da solução supersaturada e acelerando a precipitação do fármaco (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

### 3.3.3 Caracterização das formulações desenvolvidas

A caracterização do estado sólido da GSFc demonstra padrão de difração de raios-X (Figura 8A) e evento endotérmico de fusão ( $T_m$ : 218,49 °C,  $\Delta H$ : 110,67 J g<sup>-1</sup>, Figura 8B) de acordo com os dados reportados para a forma polimorfo I da GSF (SU et al., 2018). A amostra GSF QC apresenta um diâmetro de partícula médio de  $8,8 \pm 11,68$  µm e difratograma com halo difuso sem a presença de picos de Bragg, indicando a sua amorfização. No entanto, resultados complementares de análises de PLM (C) e DSC (Figura 8B) revelam a presença de pequenas quantidades residuais da forma cristalina do fármaco na amostra. A temperatura de transição vítrea da GSF QC ( $T_g$ : 85,99 °C, Figura 8B/B1) é menor que o valor reportado na literatura para

a GSF amorfa (AMHARAR et al., 2016), indicando que uma pequena quantidade de umidade pode estar presente nessa amostra. As pequenas partículas cristalinas birrefringentes, observadas por PLM, agem como sementes para que o processo de recristalização ocorra em temperaturas acima da temperatura de transição vítrea do fármaco, como observado na análise de DSC da GSF QC.

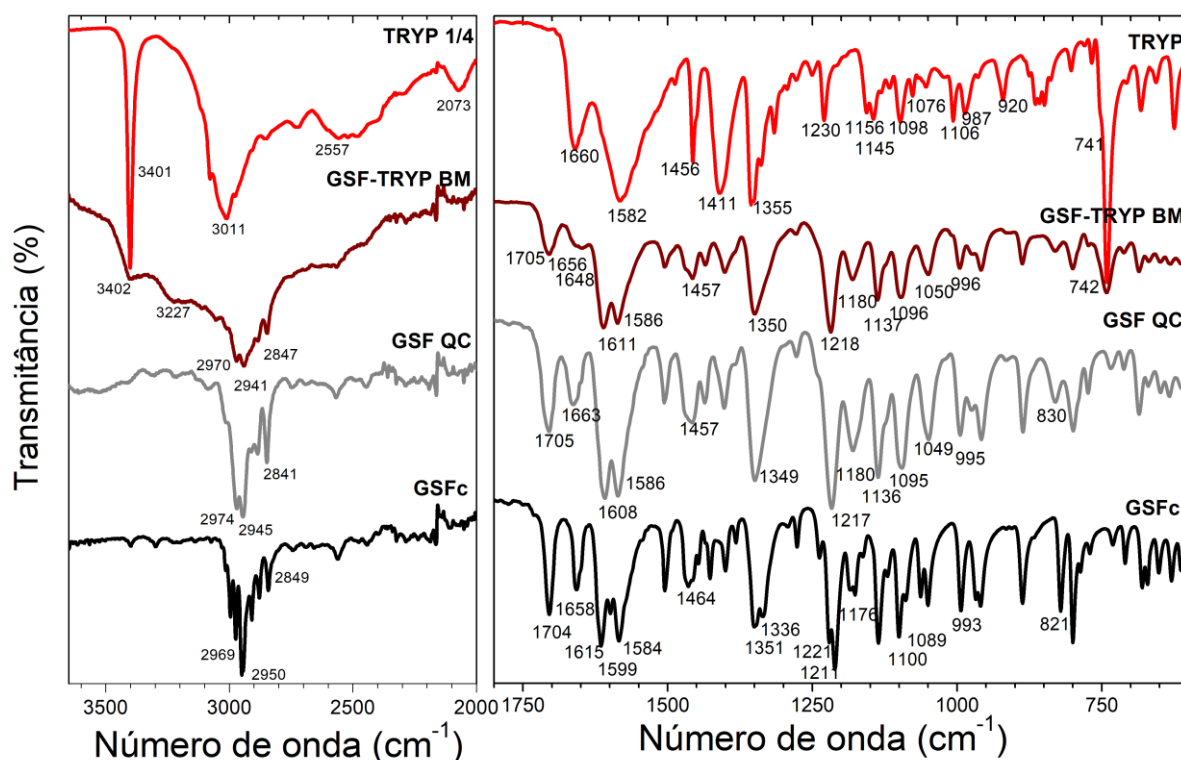
Figura 8. Caracterização do estado sólido por A) XRPD, B) DSC, C) PLM e D) SEM.



Legenda: GSFc (fármaco cristalino), da GSF QC (fármaco amorfo) e formulações produzidas por moagem em moinho de bolas (BM). Visualização detalhada da curva de DSC da GSF QC (B1) e das curvas reversível (REV) e não reversível (Não-REV) de GSF-TRYP BM (B2). Fonte: Elaborada pela autora.

Nas análises de mDSC (Figura 8B/B2), a separação de eventos reversíveis (GSF-TRYP BM REV) e não reversíveis (GSF-TRYP BM Não-REV), a detecção de um evento de transição ( $T_g$ : 113.46 °C), o qual estava sobreposto a eventos de perda de água e/ou relaxamento. A presença de apenas um evento de transição vítrea e o elevado valor de  $T_g$  para a amostra de GSF-TRYP BM indicam que esta amostra possui uma alta miscibilidade entre os componentes do sistema e possui uma maior estabilidade na forma amorfa quando comparada com a GSF QC.

Figura 9. Espectro de FTIR das amostras. GSFc, GSF QC, GSF-TRYP BM e TRYP.



Legenda: GSFc (fármaco cristalino), da GSF QC (fármaco amorfo), TRYP (triptofano) e GSF-TRYP BM (formulação de GSF:TRYP 1:1 M produzida por moagem em moinho de bolas). 1/4 indica que a intensidade de transmitância foi dividida por 4. Fonte: Elaborado pela autora.

Estudos recentes envolvendo 6 fármacos de baixa solubilidade aquosa e 20 aminoácidos reportaram que o TRYP possui uma boa co-formabilidade, habilidade de formar sistemas coamorfo, através do processo de moagem em moinho de bolas. Este estudo sugeriu também que o TRYP deveria ser incluído preferencialmente na triagem de sistemas amorfo de fármacos básicos ou neutros (KASTEN et al., 2016, 2019), como é o caso da GSF. O TRYP tem demonstrado uma excelente contribuição na estabilização de sistemas amorfo de fármacos de baixa solubilidade aquosa, a qual é atribuída ao seu elevado valor de  $T_g$  (140 °C) e a sua alta habilidade de formar ligações intermoleculares, tanto via ligações de hidrogênio quanto através de interações  $\pi\pi$  (JENSEN et al., 2014)

O espectro de infravermelho da GSFc (Figura 9) mostra suas principais bandas de acordo com a literatura (MAH et al., 2017; TOWNLEY; EDWARD R. TOWNLEY, 1979). O espectro da amostra GSF QC, apresentou diferenças quando comparado ao espectro do fármaco cristalino. Essas alterações são esperadas uma vez que materiais amorfos possuem um diferente rearranjo das interações intermoleculares do fármaco. Como previamente reportado (MAH et al., 2017), foram observados deslocamentos de bandas correspondentes ao estiramento da ligação C=O do ciclo-hexeno de  $1658\text{ cm}^{-1}$  para  $1663\text{ cm}^{-1}$ , ao estiramento da ligação C=C de 3 bandas (em  $1615\text{ cm}^{-1}$ ,  $1599\text{ cm}^{-1}$  e  $1584\text{ cm}^{-1}$ ) para 2 bandas (em  $1608\text{ cm}^{-1}$  e  $1586\text{ cm}^{-1}$ ), alargamento e sobreposição de bandas correspondentes a ligação C-O aril-metoxil em  $1216\text{ cm}^{-1}$ , e bandas em  $1350\text{ cm}^{-1}$  e  $1049\text{ cm}^{-1}$ .

As principais bandas do TRYP cristalino são observadas em  $3401\text{ cm}^{-1}$  (estiramentos de vibrações N-H e O-H),  $3011\text{ cm}^{-1}$  (estiramentos C-H),  $2557\text{ cm}^{-1}$  (ligação de hidrogênio intermolecular entre os ácido carboxílicos),  $1660\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O do ácido carboxílico) e  $1582\text{ cm}^{-1}$  (deformações vibracionais N-H e  $\text{NH}_2$ )(SURESH; SUGARAJ SAMUEL; JANARTHANAN, 2018). O espectro de GSF-TRYP BM mostrou alargamentos e ampliações de bandas de correspondente a vibrações de NH/OH e CH, e o aparecimento de uma nova banda em  $3227\text{ cm}^{-1}$ . Quando comparados os espectros da GSF QC e GSF-TRYP QC, observa-se um pequeno deslocamento na banda correspondente a C=O de  $1663\text{ cm}^{-1}$  para  $1648\text{ cm}^{-1}$ . Estas alterações e deslocamentos em bandas correspondentes ao fármaco e ao TRYP, observados no espectro de GSF-TRYP BM, indicam a formação de interação intermolecular de hidrogênio entre ambos os componentes, possivelmente envolvendo grupamentos aromáticos.

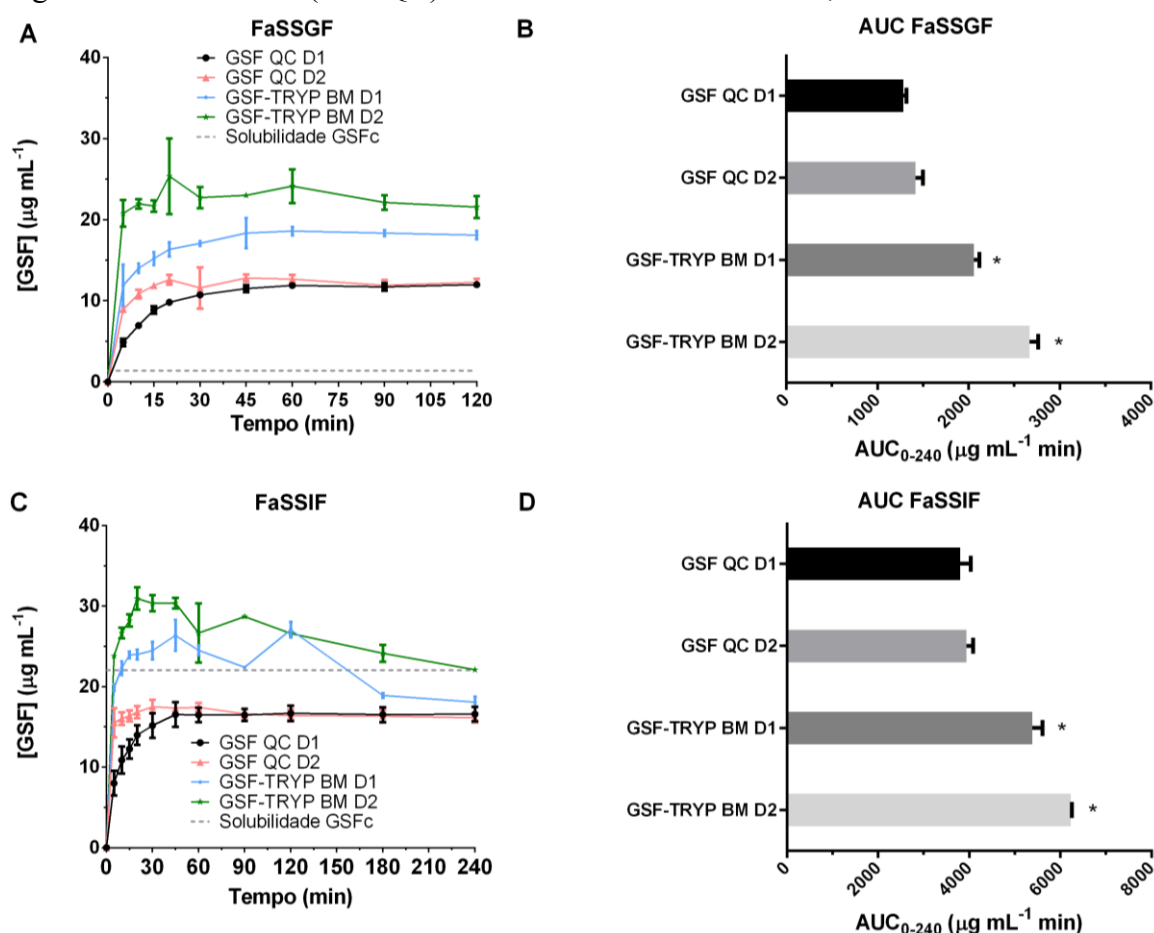
### 3.3.4 Estudos cinéticos de solubilidade

Os resultados dos estudos cinéticos de solubilidade das amostras GSF QC e GSF-TRYP BM em FaSSGF e FaSSIF estão presentes na Figura 10. A presença do TRYP no sistema amorfo de GSF (proporção GSF:TRYP 1:1 M ou 63,2: 36,8 m/m, respectivamente) impactou positivamente na liberação do fármaco de acordo com a quantidade do aminoácido em solução, sendo o aumento na liberação do fármaco observado em ambas as dosagens testadas. O sistema amorfo GSFTRYP BM proporcionou aumento na AUC equivalente a 88.6% e 58.2%, em FaSSGF e FaSSIF, respectivamente, quando comparado com os valores de AUC obtidos na liberação da GSF amorfa (GSF QC), na maior dose testada (D2).

Embora as modificações no estado sólido encontradas em sistemas amorfos possam reduzir as forças de atração intermoleculares e promover melhorias na dissolução de fármacos,

a rápida taxa de recristalização da GSF mediada pelo ambiente aquoso atua como um fator limitante para que altas concentrações do fármaco sejam atingidas em solução. A presença de um segundo componente na formulação, como moléculas hidrofílicas do aminoácido, em um sistema binário altamente miscível pode reduzir a diferença de energia livre entre uma forma amorfo e cristalina, em comparação com o fármaco amorfo isolado. Como consequência, a cinética de solubilização do fármaco é facilitada (NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018), permitindo que concentrações acima da solubilidade de equilíbrio do fármaco (supersaturação) sejam atingidas durante estudos de liberação do fármaco, como foi observado para a amostra GSF-TRYP BM.

Figura 10. Estudos cinéticos de solubilidade (A e C) e suas respectivas AUC (B e C) da griseofulvina amorfa (GSF QC) e da amostra GSF-TRYP BM, em meio biorrelevante.



Legenda: FaSSGF (fluido gástrico simulado em jejum) e FaSSIF (fluido intestinal simulado em jejum). Duas diferentes doses de GSF no meio foram investigadas: D1 (equivalente a 100 μg mL<sup>-1</sup>) e D2 (equivalente a 300 μg mL<sup>-1</sup>), em triplicata a 37 °C, 240 rpm. \*AUC estatisticamente diferente vs. GSF QC na mesma dosagem (p < 0,05). Fonte: Elaborado pela autora.

Um estudo prévio envolvendo o monitoramento de espectros de emissão de fluorescência de resíduos de TRYP, em peptídeos e proteínas de albumina humana sérica, durante a adição de sais biliares em solução revelou que interações intermoleculares entre estes

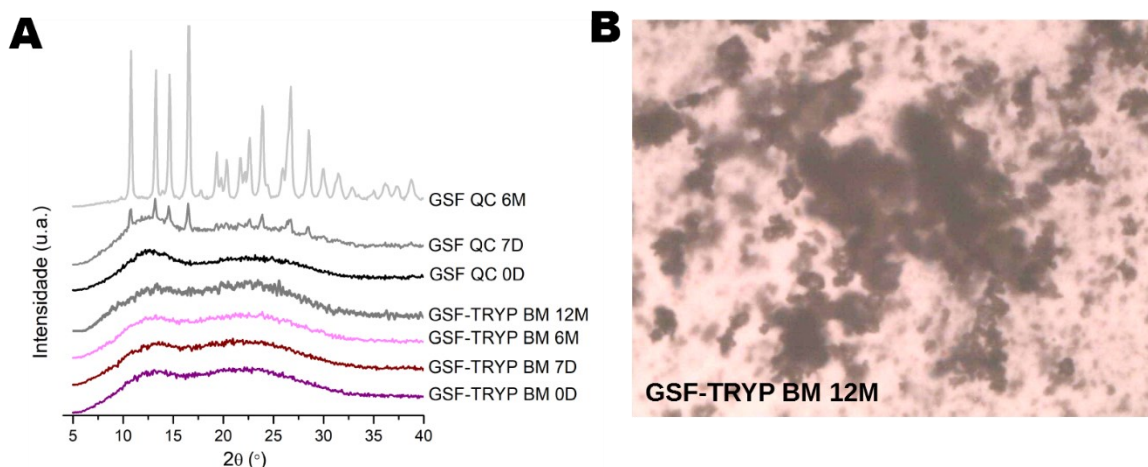


compostos podem ocorrer de diversas formas. Abaixo da concentração micelar crítica, como no meio FaSSGF, podem ocorrer interações envolvendo as cargas negativas das cadeias laterais dos monômeros de sais biliares ( $\text{SO}_3^-$ ) e as cargas positivas dos aminoácidos ( $\text{NH}_3^+$ ) na formação pontes de sal, além de interações polares e interações hidrofóbicas. Acima da concentração micelar crítica, como no meio FaSSIF, as moléculas do fluoróforo TRYP detectam um ambiente mais hidrofóbico na presença dos sais biliares em comparação com aquele na sua ausência, essas alterações são atribuídas a interações entre as porções hidrofóbicas dos sais biliares e do TRYP, deixando assim os resíduos de TRYP menos expostos ao solvente polar (GHOSH; MONDAL; MUKHERJEE, 2015; GUERIN et al., 2016).

### 3.3.5 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade (Figura 11) demonstraram que a GSF amorfa (GSF QC) apresenta rápida recristalização (em 7 dias) também no estado sólido. É reportado na literatura que, diferentemente da maioria dos fármacos, a recristalização da GSF amorfa pode ocorrer em temperaturas abaixo da sua  $T_g$ . Temperatura na qual a mobilidade molecular é reduzida bruscamente, havendo um controle da difusão das moléculas e evitando a recristalização na maior parte dos sistemas amorfos (SHI; CAI, 2016).

Figura 11. Análises de A) XRPD e B) PLM das amostras de griseofulvina amorfa (GSF QC) e GSF-TRYP BM durante estudo de estabilidade.



Legenda: Análises obtidas no dia da preparação (0D), após 7 dias (7D), 6 meses (6M) e 12 meses (12M) em dessecador à vácuo, a temperatura ambiente. Fonte: Elaborado pela autora.

Em contraste, não foi detectada a recristalização do fármaco na amostra de GSF-TRYP BM por um período de 12 meses. O TRYP atuou como um forte agente antiplastificante, provavelmente devido a formação de ligação de hidrogênio entre o fármaco e o aminoácido. Como resultado dessa interação intermolecular, a amostra de GSF-TRYP BM

mostrou uma elevada temperatura de transição vítrea em comparação com o fármaco amorfo isolado, mantendo a GSF na forma amorfa por um período prolongado de armazenamento.

### 3.4 CONCLUSÃO

Aminoácidos podem ser considerados carreadores de baixa massa molar interessantes na estabilização de sistemas amorfos considerando sua segurança de uso comprovada e baixo custo. Neste trabalho, o uso do TRYP como carreador na formulação de GSF obtida por moagem em moinho de bolas proporcionou a amorfização da amostra GSFTRYP BM, enquanto o fármaco isolado permaneceu semicristalino quando submetido ao mesmo processo sob as mesmas condições.

A alta solubilidade aquosa do TRYP impactou positivamente na cinética de liberação do fármaco a partir do sistema amorfo GSFTRYP BM quando comparado a amostra de GSF QC, sem o requerimento de uma grande percentual de massa do carreador na formulação (36,8 %). Este fato é de extrema importância no desenvolvimento de formulações de GSF visto que o fármaco possui baixa solubilidade aquosa e uma alta dosagem é utilizada na terapêutica. Esse aumento na liberação do fármaco mostrou-se dependente da concentração do aminoácido em solução, proporcionando a liberação de uma maior concentração de fármaco na maior dose testada.

Quanto a estabilidade de sistemas amorfos de GSF no estado sólido, enquanto a forma amorfa de GSF apresentou instabilidade e tendência de recristalização rápida (menor que 7 dias), o sistema GSFTRYP BM manteve-se estável por um período de armazenamento prolongado (1 ano).

Dentre vários aminoácidos testados neste estudo, o aminoácido TRYP foi o único capaz de proporcionar melhorias no processo de obtenção de sistemas amorfos, na inibição de precipitação do fármaco em solução e na estabilidade de sistemas amorfos de GSF no estado sólido. Os resultados obtidos podem contribuir para o desenvolvimento de formulações amorfas de GSF que proporcionem uma melhor cinética de liberação do fármaco e permaneçam estáveis por um período prolongado durante o armazenamento.

## **4 CAPÍTULO III: MISTURA EUTÉTICA E DISPERSÃO SÓLIDA AMORFA: DIFERENTES ABORDAGENS ENVOLVENDO O USO DE SACARINA PARA PROMOVER MELHORIAS NA DISSOLUÇÃO DE GRISEOFULVINA**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

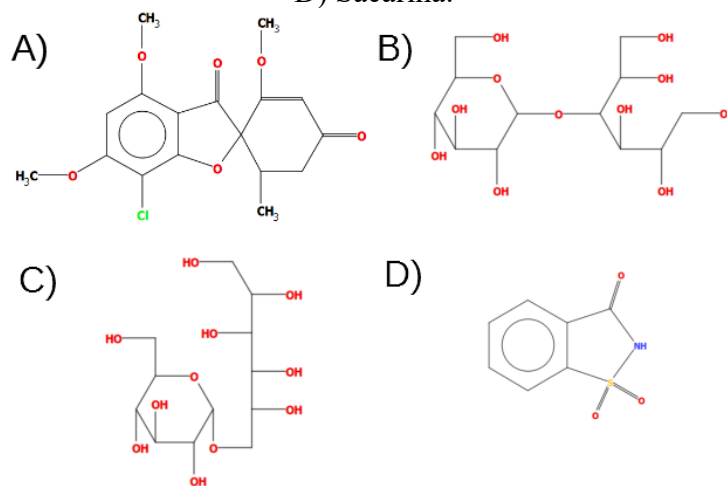
O termo “dispersão sólida” inclui um ampla gama de formulações, todas contendo um fármaco disperso em um carreador inerte, (tipicamente açúcares, polímeros ou tensoativos emulsificantes com alta solubilidade aquosa) utilizadas como abordagens para promover melhorias na solubilidade e dissolução de fármacos. Nas dispersões sólidas, o fármaco pode estar na forma amorfa ou cristalina, suspenso (duas fases) ou molecularmente disperso (uma fase homogênea) no carreador, da mesma forma o carreador pode ser amorfo ou cristalino (TRAN; TRAN, 2020; WILLIAMS et al., 2013). Misturas eutéticas são compostas por dois componentes, usualmente um fármaco de baixa solubilidade aquosa e um carreador hidrofílico, totalmente miscíveis no estado líquido (fundido), porém com limitada miscibilidade no estado sólido. Em misturas eutéticas ambos os componentes se encontram na forma cristalina (BAZZO; PEZZINI; STULZER, 2020a; WILLIAMS et al., 2013). Soluções sólidas ou suspensões sólidas amorfas são formulações nas quais o fármaco está molecularmente disperso em proporções não estequiométricas ou o fármaco está sua forma amorfa suspenso em um carreador cristalino, respectivamente. Por outro lado, soluções vítreas (soluções sólidas amorfas ou sistemas coamorfos) e suspensões vítreas amorfas são formadas por um fármaco molecularmente disperso ou na forma amorfo suspenso em um carreador amorfo, respectivamente (WILLIAMS et al., 2013).

Dispersões sólidas amorfas são geralmente a abordagem de formulação preferida devido às propriedades termodinâmicas mais elevadas dos sistemas amorfos (excesso de energia livre, entalpia e entropia) em comparação a seus homólogos cristalinos, podendo promover melhorias na dissolução e biodisponibilidade de fármacos (BELLANTONE, 2014; PANDI et al., 2020). No entanto, instabilidade termodinâmica é a principal preocupação em relação aos sistemas amorfos, acarretando em risco de desvitrificação (recristalização) durante o processamento, dissolução e/ou armazenamento (HAN et al., 2020). Estudos prévios reportaram que a GSF (Figura 12A) é classificada com um fármaco de recristalização rápida, tanto no estado sólido quanto em meio aquoso, usualmente requerendo um alto percentual de alta concentração de polímero para estabilizar o fármaco em sistemas amorfos e soluções supersaturadas (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015; BLAABJERG et al., 2018; CHEN et al.,

2015b; FRANÇA et al., 2020b; OHYAGI et al., 2017; ZHOU et al., 2008). Nos últimos anos, alguns estudos têm investigado o uso de carreadores hidrofílicos de baixa massa molar (compostos não poliméricos) ao invés do tradicional uso de polímeros, a fim de reduzir a quantidade de carreador necessária para estabilizar dispersões sólidas amorfas (FRANÇA et al., 2020a; HAN et al., 2020; KASTEN et al., 2016; NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018).

Adoçantes e álcoois de açúcares são excipientes farmacêuticos hidrofílicos usados para mascarar o sabor de fármacos, além de possuírem grupamentos capazes de formar ligações de hidrogênio entre a substância ativa e o carreador. Estes excipientes também podem ser usados no desenvolvimento de dispersões sólidas e em formulações de liberação modificada (JULURI et al., 2016; PURI et al., 2017). Considerando que a GSF é principalmente prescrita para crianças, um mascarador de sabor é geralmente utilizado na formulação para melhorar a sua palatabilidade. Neste contexto, foi investigado o impacto do uso de adoçantes em dispersões sólidas amorfas de GSF, a possibilidade de formação de uma mistura eutética entre o fármaco e um adoçante, bem como o impacto deste na solubilidade cinética do fármaco.

Figura 12. Estrutura química molecular da A) Griseofulvina, B) Maltitol, C) Isomalte e D) Sacarina.



Fonte: Adaptado de (LICHTENTHALER; LINDNER, 1981; LIGHT; SIDDIQUI; BROWN, 2016; PUTTARAJA et al., 1982; SCHOUTEN et al., 1999).

Duas hipóteses foram investigadas nesta etapa do trabalho: 1) Se uma formulação amorfa de GSF com um carreador que forma uma mistura eutética poderia promover uma vantagem na liberação do fármaco (GSF: Sacarina, 66:34 m/m) em comparação com outros carreadores (Isomalte ou Maltitol), e 2) Se uma mistura eutética, assim como a sua formulação amorfa correspondente, poderia levar a formação de soluções supersaturadas de GSF durante estudos cinéticos de liberação.

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Materiais

A GSF (MM 352,8 g mol<sup>-1</sup>) e sacarina (SAC, MM 183,19 g mol<sup>-1</sup>, Figura 12D) foram adquiridos das empresas Pharmanostra e Vetec, respectivamente. Isomalte (ISO, MM 344,31 g mol<sup>-1</sup>, Figura 12B) e Maltitol (MALT, MM 344,31 g mol<sup>-1</sup>, Figura 12C) foram gentilmente doados pelas empresas SweetMix e Elofar, respectivamente.

O meio biorrelevante foi obtido da empresa Biorelevant (Surrey, RU), e o FaSSIF (fluido intestinal simulado em jejum) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. A água ultrapura utilizada nos experimentos foi obtida através de um sistema MilliQ® (Millipore, Bedford, EUA). Todos os demais reagentes químicos utilizados foram de grau analítico ou grau para CLAE.

### 4.2.2 Métodos

#### 4.2.2.1 Avaliação do perfil de precipitação do fármaco em soluções dos adoçantes

Para contornar o problema da baixa solubilidade aquosa do fármaco, é desejável que carreadores hidrofílicos possam impulsionar a liberação do fármaco a partir de formulações amorfas, atingindo concentrações acima da solubilidade do fármaco e que possam manter essa solução supersaturada por um período prolongado. Assim, o método de *solvent shift* foi usado para investigar o perfil de precipitação do fármaco em solução na presença dos adoçantes. O fármaco foi solubilizado em um solvente orgânico miscível em água (80 mg mL<sup>-1</sup> dissolvido em DMF) e uma alíquota foi adicionada à 50 mL de meio tampão pH 6,5 ou 25 mL de meio biorrelevante. A baixa quantidade de solvente orgânico utilizada não impacta na solubilidade aquosa da GSF. A quantidade de adoçante em solução utilizada foi de 30 mmol L<sup>-1</sup> (aproximadamente 1000 vezes a solubilidade do fármaco) para todas as amostras, exceto para a SAC que foi 20 mmol L<sup>-1</sup> (devido a sua solubilidade aquosa inferior aos demais adoçantes). Os estudos foram conduzidos em Shaker NT 715 (NovaTécnica, Brasil), no LabCQ- UFSC, sob agitação de 240 rpm, a 37 °C, por 240 min, em triplicata. Alíquotas foram coletadas em tempos pré-determinados, filtradas em membrana de poliamida de 0,45 µm (Chromaphil® Xtra) e analisados por CLAE.

A quantificação de GSF foi conduzida em cromatógrafo PerkinElmer Series 200 equipado com um detector UV ajustado em 254 nm, na CentralCrom- UFSC. O método isocrático utilizou metanol: água (50:50, v/v) como fase móvel e uma coluna analítica C18 (Kinetex®

110A, 5  $\mu\text{m}$ , 150 $\times$ 4,6 mm) como fase estacionária. A temperatura ajustada em 25 °C, o fluxo foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ . A curva padrão apresentou boa linearidade ( $R > 0,99$ ) na faixa de concentração relevante.

#### 4.2.2.2 Estudos de solubilidade de equilíbrio

A solubilidade de equilíbrio foi avaliada adicionando um excesso do fármaco cristalino em cada solução e equilibrando as suspensões obtidas (24 -72 h), sob agitação de 240 rpm, a 37 °C, em Shaker NovaTécnica NT 715 (Brasil), disponível no LabCQ-UFSC. O efeito dos adoçantes na solubilidade da GSF foi avaliado através da solubilização destes (30 mmol L<sup>-1</sup> de ISO ou MALT, ou 20 mmol L<sup>-1</sup> de SAC) no meio (tampão pH 6,5 ou FaSSIF) a fim de comparar com os estudos de precipitação. Ensaio adicionais de solubilidade de equilíbrio foram conduzidos com a amostra GSF-SAC EM e com o fármaco cristalino em meios contendo a SAC solubilizada, nas mesmas concentrações empregadas em estudos cinéticos de solubilidade, para fins de comparação. Em tempos pré-determinados, alíquotas das amostras foram coletadas, filtradas através de uma membrana de poliamida 0,45  $\mu\text{m}$  e quantificadas por metodologia CLAE descrita anteriormente na seção 4.2.2.1.

#### 4.2.2.3 Desenvolvimento das formulações

##### 4.2.2.3.1 Método de moagem em moinho de bolas (BM)

O efeito dos adoçantes na amorfização do fármaco foi avaliado utilizando condições experimentais do estudo prévio realizado (FRANÇA et al., 2020a). As amostras foram pesadas (2.5 g de GSF, ou de GSF associada aos adoçantes ISO, MALT e SAC, na proporção 1:1 molar) e moídas por 6 h, em moinho planetário de alta energia PM200 (RETSCH), no laboratório de Biotecnologia da UNIVILLE, utilizando um cadinho de aço inoxidável com 3 esferas de aço inoxidável (massa total de aproximadamente 97 g). A velocidade de rotação foi de 560 rpm, com inversão de rotação a cada 30 min, após pausa de 0,5 min.

##### 4.2.2.3.2 Método de *Quench Cooling* (QC)

As amostras foram preparadas através da fusão das amostras em recipiente de alumínio à temperatura de 220 °C, em mufla Fornitec, no Laboratório de Farmacognosia da UFSC. Em seguida procedeu-se resfriamento rápido ao depositar o recipiente de alumínio sobre um bloco de gelo por alguns segundos. Foram utilizados 2 g do fármaco cristalino ou a mistura física de GSF com os adoçantes (proporção molar 1:1). O tempo de fusão variou de 60 a 120 segundos, de acordo com a amostra. Esse tempo foi otimizado em testes preliminares a fim de garantir a

fusão completa da amostra e evitar a caramelização dos açúcares, embora resultados de análises de termogravimetria não indicassem degradação dos açúcares nessa temperatura (dados não mostrados). As amostras frescas foram imediatamente armazenadas em dessecador com sílica gel para prevenir a adsorção de umidade. As formulações obtidas foram moídas em grau e pistilo, tamisadas (tamanho de partícula  $\leq 250 \mu\text{m}$ ) e em seguida utilizadas nas análises.

#### 4.2.2.3.3 Mistura Eutética

A mistura eutética (EM) de GSF:SAC foi preparada através da mistura do fármaco e o carreador por 2 min usando grau e pistilo.

#### 4.2.2.4 Caracterização do estado sólido

##### 4.2.2.4.1 Difração de raios-X de pó (XRPD)

As medidas de XRPD foram obtidas em um difratômetro de raios  $\theta$ - $\theta$  D2 Phaser, (Bruker), no Departamento de Química da UFSC. O equipamento é equipado com detector de cintilação unidimensional LYNXEYE, operando com radiação de cobre  $K\alpha$  ( $\lambda = 1.5418$ ), corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV. As análises foram obtidas a temperatura ambiente, utilizando varredura angular a  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $40^\circ$ , com intervalo angular de  $0,089^\circ$  a cada 0,5 s.

##### 4.2.2.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises DSC foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu), disponível no LabCQ-UFSC, na faixa de temperatura de 25 a 250  $^\circ\text{C}$ . Amostras de aproximadamente 4 mg foram pesadas, seladas em cadinhos de alumínio e aquecidas a uma razão de aquecimento de  $5^\circ\text{C min}^{-1}$ , sob uma atmosfera dinâmica de nitrogênio de  $100 \text{ mL min}^{-1}$ . O equipamento foi previamente calibrado utilizando índio e zinco como padrões.

##### 4.2.2.4.3 Microscopia de luz polarizada (PLM)

Imagens de PLM foram adquiridas em microscópio Olympus CX41RF, equipado com analisador de luz transmitida U-ANT e polarizador de luz transmitida U-POT, no Laboratório de Bioquímica Clínica II da UFSC. Pequenas quantidades de amostras em pó foram colocadas sobre lâminas de vidro e analisadas utilizando uma magnificação de  $200\times$ .

##### 4.2.2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A avaliação da morfologia e do tamanho das partículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura em microscópio Jeol, modelo JSM6390LV, no LCME-UFSC, sob

voltagem de aceleração de 10 kV. As amostras foram previamente preparadas com fita adesiva dupla face em *stubs* e recobertas com ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD 500.

#### 4.2.2.4.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Espectros de FTIR na região de 4000–600  $\text{cm}^{-1}$  foram obtidos usando espectrômetro PerkinElmer FT-IR/NIR Frontier disponível no LabCQ-UFSC. O equipamento é equipado com acessório de amostragem Universal ATR com uma resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.2.5 Estudos cinéticos de solubilidade

Estudos cinéticos de solubilidade dos sistemas amorfos e da mistura eutética foram avaliados em condição não *sink* em Shaker NT 715 (NovaTécnica, Brasil), a 37,0 °C, 240 rpm. Quantidades das amostras em pó, equivalentes a duas doses (D1:100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e D2:1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram pesadas e adicionadas aos meios. Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados, filtradas em membrana de poliamida 0,45  $\mu\text{m}$  (Chromaphil® Xtra), diluídas em metanol:água (50/50 v/v) e posteriormente quantificadas por CLAE, de acordo com metodologia descrita na seção 4.2.2.1.

#### 4.2.2.6 Investigação de soluções supersaturadas de griseofulvina e sacarina

Análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram empregadas para monitorar o tamanho dos sistemas coloidais em cada meio (pH 6.5 e FaSSIF, contendo ou 20 mM de SAC) em várias concentrações do fármaco (através da adição de alíquotas de uma solução estoque de GSF 50  $\text{mg mL}^{-1}$  em DMF), a 37,0 °C. As medições DLS foram feitas em ângulo de espalhamento de 90°, no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI) do Departamento de Química da UFSC.

Como a GSF é uma molécula fluorescente, previamente utilizada como uma sonda de fluorescência sensível ao microambiente (FRANÇA et al., 2020b; TAKAHASHI; YAMAGUCHI, 1991a), a fluorescência do fármaco foi investigada em soluções supersaturadas no meio FaSSIF, contendo ou não 20 mM de SAC, a 37 °C. As diferentes concentrações de GSF foram obtidas através da adição de uma solução estoque de GSF 80  $\text{mg mL}^{-1}$  em DMF. O comprimento de onda máximo e a intensidade dos espectros de emissão de GSF, de 320 a 580 nm, foram obtidos em fluorímetro Varian Cary Eclipse, no LACFI- UFSC, usando excitação em 295 nm.



#### 4.2.2.7 Estudos de estabilidade

A estabilidade da GSF-SAC QC na forma amorfa foi acompanhada durante o armazenamento em dessecador à vácuo contendo sílica gel a temperatura ambiente com objetivo de investigar a ocorrência de recristalização do fármaco. Análises de XRPD foram de acordo com metodologia descrita no item 4.2.2.4.1 no dia de preparo da amostra (0D), após dezoito (18S), quarenta e três (43S) e cento e cinquenta (150S) semanas.

#### 4.2.2.8 Análises estatísticas

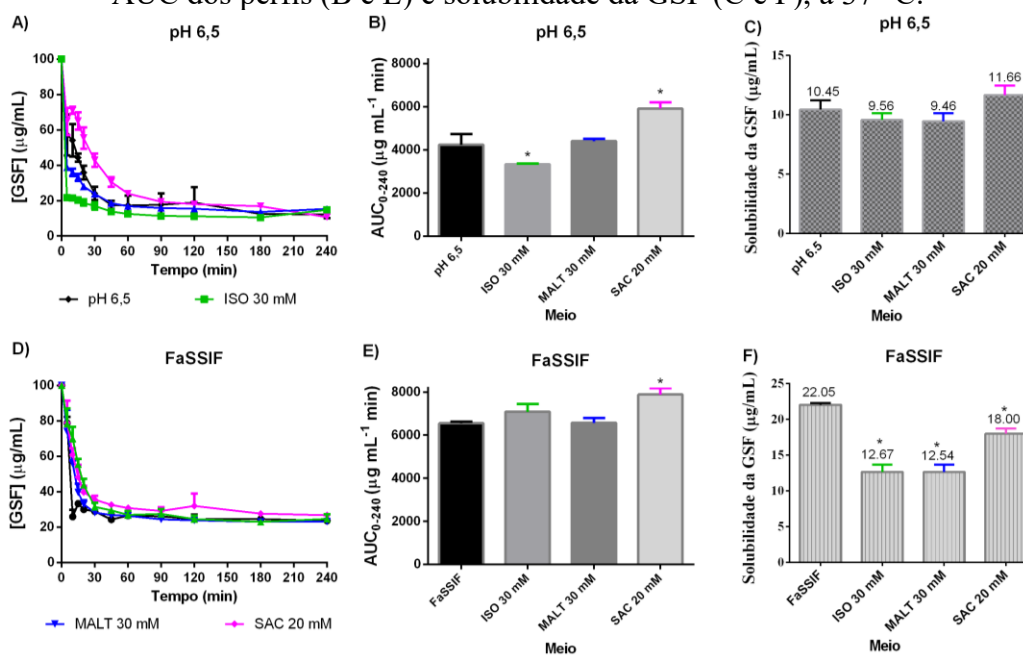
ANOVA de uma ou duas vias e testes de comparações múltiplas de Tukey foram aplicados para verificar a significância estatística ( $p < 0,05$  com intervalo de confiança de 95%) das comparações entre as amostras e com seus respectivos controles.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 4.3.1 Avaliação do perfil de precipitação do fármaco em soluções dos adoçantes

Como a GSF é um fármaco que recristaliza rapidamente em meio aquoso, foi primeiramente investigado se os adoçantes ISO, MALT ou SAC poderiam retardar ou inibir a recristalização do fármaco em solução.

Figura 13. Perfis de precipitação concentração de GSF vs. Tempo (A e D), suas respectivas AUC dos perfis (B e E) e solubilidade da GSF (C e F), a 37 °C.



Legenda: Os meios utilizados foram tampão fosfato pH 6,5 e FaSSiF na presença ou ausência de adoçantes previamente solubilizados no meio (30 mM de isomalte (ISO) ou maltitol (MALT), ou 20 mM de sacarina (SAC)). \*Estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) vs. seu respectivo meio puro. Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados presentes na Figura 13 mostram que a presença de ISO em tampão pH 6,5 acelera o perfil de dessupersaturação da GSF (Figura 13B) e não tem impacto na precipitação da GSF em FaSSIF (Figura 13E). O MALT não influenciou no comportamento de precipitação do fármaco em nenhum dos meios avaliados (Figura 13B e E), enquanto a SAC retardou a precipitação da GSF em ambos os meios, proporcionando AUC superiores (1,2-1,3 vezes) às AUC obtidas nos meios puros (Figura 13B e E).

#### 4.3.2 Estudos de solubilidade de equilíbrio

Os resultados de solubilidade de equilíbrio mostraram que a presença dos adoçantes não afetou a solubilidade da GSF em tampão pH 6,5 (Figura 13C). O grau de supersaturação ou taxa de supersaturação (SR) foi estimado de acordo com a Equação 3, visto que este afeta uma série de processos cinéticos, incluindo a nucleação e crescimento de cristais. Como soluções supersaturadas possuem um potencial químico ( $\mu$ ) aumentado em comparação às soluções saturadas correspondentes, essa diferença de potencial químico atua como uma força motriz para a precipitação (PALMELUND et al., 2016; SUN; WEN; TAYLOR, 2016).

$$SR = \frac{\text{Concentração máxima de supersaturação}}{\text{concentração de saturação ou solubilidade de equilíbrio}} \quad (\text{Equação 3})$$

Observou-se que os valores de SR foram similares entre todas as amostras (SR:~10) durante os estudos de precipitação em tampão pH 6,5. Consequentemente, a diferença de potencial químico entre as soluções saturadas e supersaturadas foram similares entre os carreadores, reforçando que impactos positivos ou negativos na precipitação do fármaco foram relacionados às características dos carreadores.

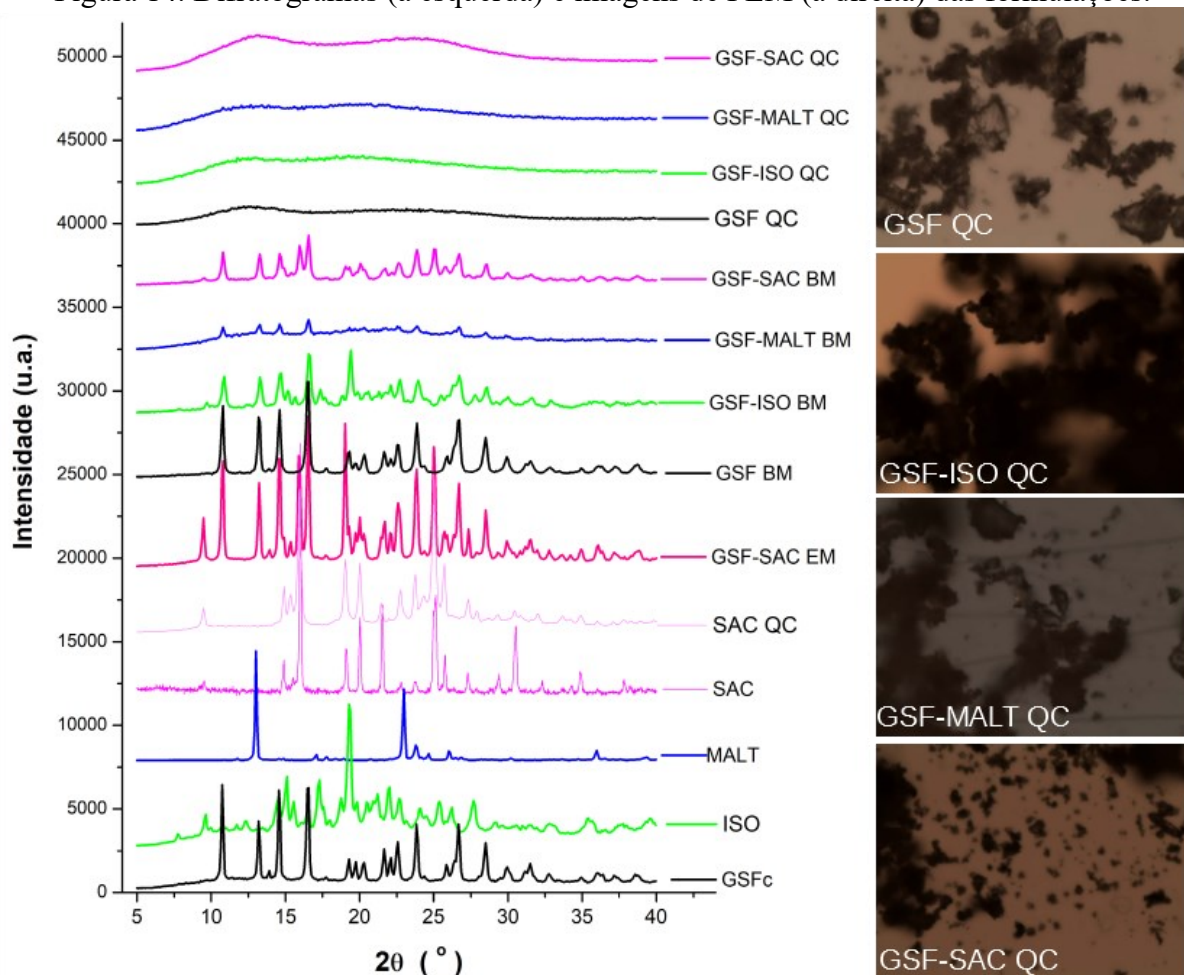
Em FaSSIF, a solubilidade da GSF foi aumentada, diminuindo a SR (4,5). Por outro lado, a presença dos adoçantes impactou negativamente na solubilidade do fármaco em meio biorrelevante (Figura 13F). Enquanto o ISO (SR: 7,9) e o MALT (SR: 8,0) diminuíram a solubilidade da GSF em meio biorrelevante para valores similares aos em tampão pH 6,5, a SAC (SR: 5,6) manteve-o em um meio termo entre os valores de solubilidade da GSF em FaSSIF e tampão pH 6,5. Através dos resultados em meio biorrelevante nota-se que as diferenças de potencial químico entre as soluções saturadas e supersaturadas foram divergem em todas as condições avaliadas, sendo menor em FaSSIF sem a presença de carreadores. Considerando esta perspectiva, mesmo com maior SR, todos os carreadores proporcionaram perfis de dessupersaturação com AUC similares (ISO e MALT), ou maior (SAC) aos em meio FaSSIF. No entanto, o aumento na AUC proporcionado pela SAC comparada a ISO e MALT

pode estar relacionado às diferenças de potencial químico entre as soluções. Assim, todos os adoçantes foram utilizados no desenvolvimento das formulações de GSF.

### 4.3.3 Caracterização das formulações desenvolvidas

Os resultados de XRPD (Figura 14) das formulações obtidas por moagem em moinho de bolas mostram a sobreposição de picos referentes às formas cristalinas do fármaco e dos carreadores, sendo esta técnica pouco efetiva para o desenvolvimento de sistemas amorfos da GSF isolada ou associada aos adoçantes. Cabe mencionar, porém, que dispersões sólidas de GSF com o aminoácido triptofano foram desenvolvidas com sucesso utilizando a mesma metodologia (FRANÇA et al., 2020a).

Figura 14. Difratogramas (à esquerda) e imagens de PLM (à direita) das formulações.

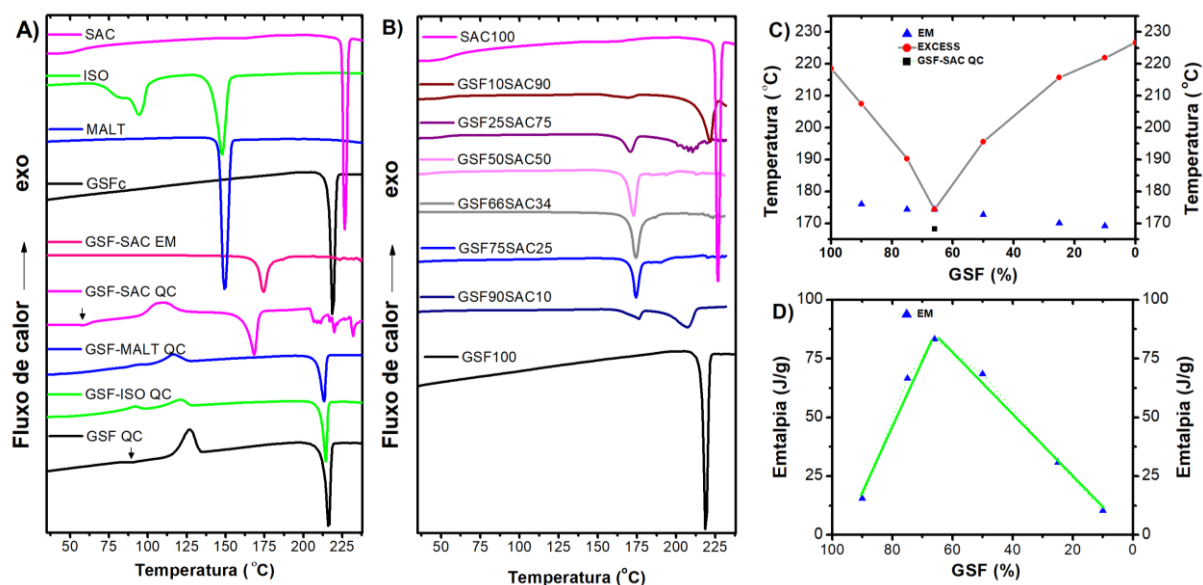


Legenda: Griseofulvina cristalina (GSFC), isomalte (ISO), maltitol (MALT), sacarina (SAC), mistura eutética (GSF-SAC EM) e formulações obtidas por moagem em moinho de bolas (BM) e por *quench cooling* (QC).

Fonte: Elaborado pela autora.

Por outro lado, os difratogramas das formulações de GSF obtidas por QC (Figura 14) não exibiram os picos característicos das matérias-primas cristalinas e apresentaram um halo amorfo típico, sugerindo que o fármaco e os carreadores foram amorfizados. As imagens de PLM, sem a presença de partículas birrefringentes, confirmam a amorfização de todas as formulações de GSF obtidas pela técnica QC. No entanto, não foi possível obter uma amostra de SAC amorfa por QC, uma vez que o difratograma da SAC QC apresenta reflexos característicos do material cristalino. A formulação cristalina do fármaco e SAC (GSF-SAC EM) apresenta sobreposição de picos característicos das estruturas cristalinas dos componentes.

Figura 15. A) Curvas DSC de griseofulvina cristalina (GSFc), dos adoçantes, das formulações obtidas por *quench cooling* (QC) e da mistura eutética de griseofulvina e sacarina na proporção 66:34 m/m (GSF-SAC EM). B) Curvas DSC das amostras de misturas eutéticas de GSF e SAC em diferentes proporções, C) diagrama de fases binário e D) Triângulo de Tamman.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados de DSC (Figura 15A) mostram que a GSFc apresenta endoterma de fusão (218,49 °C) de acordo com dados na literatura, assim como os dados de transição vítrea ( $T_g$ : 85,99 °C), evento de recristalização (127,09 °C) e ponto de fusão (215,79 °C) da amostra GSF QC (FRANÇA et al., 2020a; SU et al., 2018). Nas curvas DSC do ISO, dois eventos endotérmicos foram detectados (em 94,18 e 147,92 °C) correspondentes ao ponto de fusão de seus dois estereoisômeros e desidratação (ROWE et al., 2009). MALT e SAC exibiram eventos de fusão em 149,14 e 226,65 °C, respectivamente. Três eventos foram identificados nas curvas DSC das amostras de GSF-ISO QC (91,75, 120,79 e 214,41 °C) e GSF-MALT (93,12, 116,03

e 213,35). Os primeiros dois eventos exotérmicos podem estar relacionados a recristalização dos componentes e/ou degradação dos açúcares, enquanto o terceiro evento corresponde a endoterma de fusão do fármaco.

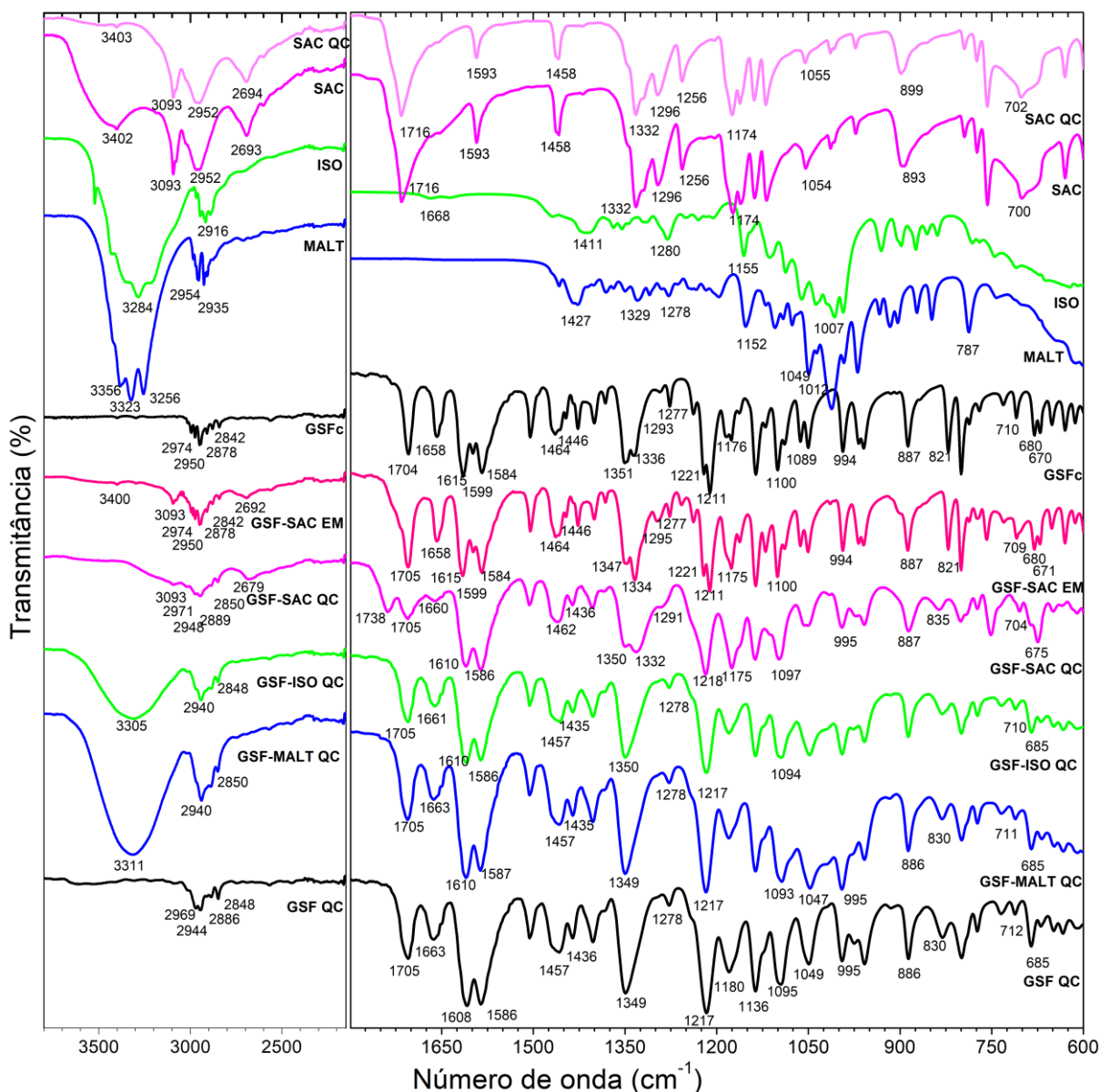
A amostra GSF-SAC QC (Figura 15A) mostra três eventos, em 55,38 °C, 110,15 e 168,34, provavelmente correspondentes a  $T_g$ , exoterma de recristalização e ponto de fusão da amostra. A baixa transição vítrea do sistema em comparação com a amostra GSF-TRYP QC (3.3.3) justifica a não amorfização pelo processo de moagem. Embora a temperatura da amostra mensurada durante o processo de moagem tenha sido de ~30 °C, temperaturas locais ainda mais altas foram produzidas durante o processo, as quais facilitaram a recristalização imediata da amostra.

Considerando que o ponto de fusão distinto da GSF-SAC QC pode estar relacionado a formação de uma mistura eutética, uma amostra GSF-SAC EM foi preparada com os componentes cristalinos, a qual apresentou um único evento endotérmico em 174.37 °C. Análises de DSC adicionais, como as reportadas por Bazzo e colaboradores (BAZZO et al., 2019; BAZZO; PEZZINI; STULZER, 2020a), foram realizadas para identificar o ponto eutético, ponto no qual não existe excesso de nenhum dos componentes na mistura eutética. As curvas DSC das amostras contendo diferentes proporções de GSF e SAC (Figura 15B) permitiram construir o diagrama de fases binário de GSF-SAC (Figura 15C) e o triângulo de Tamman (Figura 15D) para a determinação do ponto eutético (proporção entre os componentes na qual apenas uma temperatura de fusão é detectada visto que não há excesso entre os componentes (BAZZO; PEZZINI; STULZER, 2020b)), a qual corresponde a proporção de 66:34 % (m/m) ou 1:1 (M) de GSF e SAC, respectivamente.

A investigação das interações intermoleculares no estado sólido entre a GSF e os carreadores foi realizada através de análises de FTIR (Figura 16). Os espectros de GSFc e GSF QC (fármaco amorfo), presentes na Figura 16, mostram as principais bandas de acordo com dados da literatura (FRANÇA et al., 2020a; MAH et al., 2017; TOWNLEY; EDWARD R. TOWNLEY, 1979). Ao comparar o espectro da forma cristalina com o espectro do fármaco amorfo (GSF QC) são detectados deslocamentos nas principais bandas, como bandas  $\nu$ C-H (2969, 2944, 2886 e 2848  $\text{cm}^{-1}$ ), bandas  $\nu$ C=O do ciclohexeno (1663  $\text{cm}^{-1}$ ), bandas  $\nu$ C=C de insaturação aromática e cíclica (1608 e 1586  $\text{cm}^{-1}$ ), alargamento e sobreposição de bandas  $\nu$ C-O do grupo aril-metoxil (1217  $\text{cm}^{-1}$ ), e em bandas em 1349, 1278, 1049 e 830  $\text{cm}^{-1}$ . Na forma cristalina, polimorfo 1, as moléculas de GSF são mantidas juntas por forças de van der Waals (relativamente fracas), envolvendo principalmente interações intermoleculares entre

grupos carbonila e grupos metil (de ciclohexeno-dionas), nas quais cada molécula de GSF interage com outras duas moléculas (PUTTARAJA et al., 1982). Como a forma amorfa tem um empacotamento molecular diferente da forma cristalina, as mudanças no espectro de FTIR são ocasionadas pelos diferentes modos de vibração dos grupos moleculares envolvidos no rearranjo das interações moleculares intermoleculares.

Figura 16. Espectros FTIR das matérias primas utilizadas, mistura eutética GSF-SAC EM e amostras obtidas por *quench cooling* (QC).



Fonte: Elaborado pela autora.

O ISO e o MALT apresentaram espectros com suas principais bandas correspondentes a  $\nu_{OH}$  (em  $3284\text{ cm}^{-1}$  para o ISO e em  $3323$  e  $3256\text{ cm}^{-1}$  para o MALT) e  $\nu_{C-H}$  (em  $2916\text{ cm}^{-1}$  para o ISO, e em  $2954$  e  $2925\text{ cm}^{-1}$  para o MALT), de acordo com a literatura (ANTAL et al.,

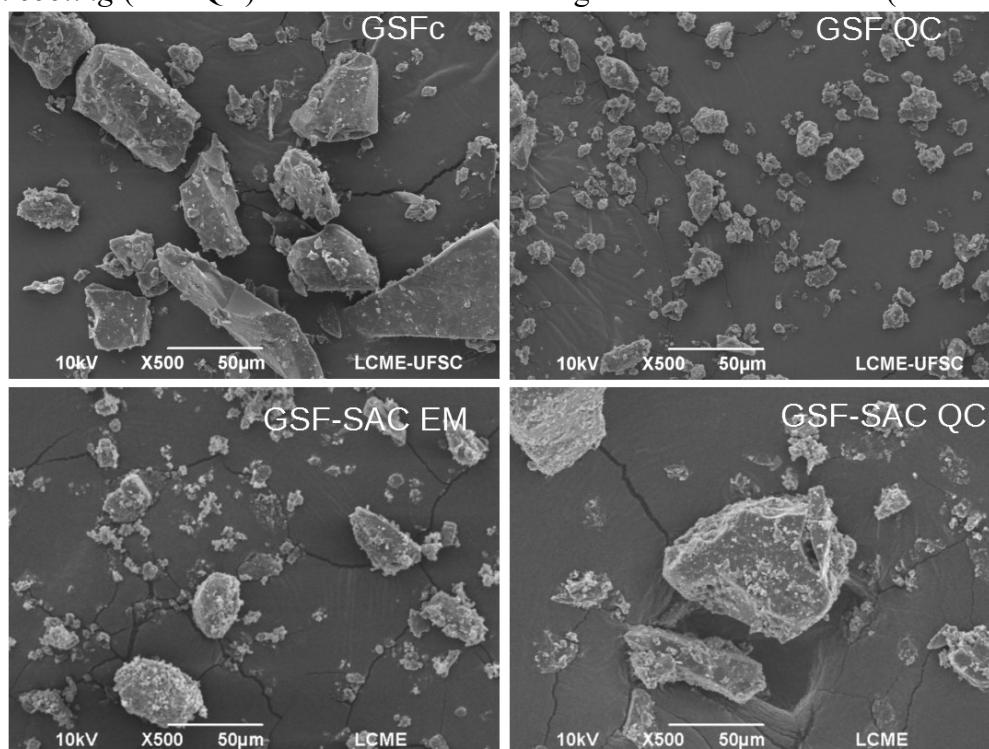
2013; SAHINER, 2018). As análises de FTIR das formulações GSF-ISO QC e GSF-MALT QC mostraram uma sobreposição das bandas da GSF QC com as bandas dos açúcares, com exceção de alargamentos e sobreposição de bandas  $\nu\text{OH}$  dos açúcares (em  $3305$  e  $3311\text{ cm}^{-1}$  para o ISO e MALT, respectivamente). Estas mudanças nas bandas de ISO e MALT podem estar relacionadas ao processo de amorfização dos açúcares, uma vez que não foram observados deslocamentos nas principais bandas do fármaco.

O espectro da SAC cristalina (Figura 16) mostra suas principais bandas em  $3402$  ( $\nu\text{N-H}$ ) e  $3093$  ( $\nu\text{C-H}$ ),  $2952$  ( $\nu\text{C-H}$ ),  $2693$  ( $\nu\text{N-H}$ ),  $1716$  ( $\nu\text{C=O}$ ),  $1332$  e  $1174$  ( $\nu_{\text{as}}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{SO}_2$ ),  $893$ , e  $700\text{ cm}^{-1}$  ( $\gamma\text{N-H}$ ) (BARBOSA, 2007; BINEV; STAMBOLIYSKA; VELCHEVA, 1996; ZHANG; LIN; LIN, 2012). Na estrutura cristalina, as moléculas de SAC mantêm-se unidas através de três ligações intermoleculares relativamente fortes envolvendo os grupamentos  $\text{C=O}$  como aceptores de hidrogênio e grupamentos  $\text{N-H}$  e  $\text{C-H}$  (benzeno) como doadores de hidrogênio (WARDELL; LOW; GLIDEWELL, 2006). O espectro da SAC QC mostra apenas pequenas alterações com relação ao espectro da SAC, exceto a redução de intensidade e leve deslocamento de bandas, como em  $3403\text{ cm}^{-1}$  e  $899\text{ cm}^{-1}$ , provavelmente em decorrência da não amorfização total da amostra, a qual mantém ainda suas características cristalinas. A avaliação do espectro da GSF-SAC EM (66:34, w/w) mostrou apenas sobreposição das bandas correspondentes aos componentes cristalinos (GSF e SAC), com maior predominância das bandas da GSF e nenhum deslocamento significativo, confirmando que a formulação é uma mistura eutética, sem nenhuma interação intermolecular forte entre os dois componentes.

Por outro lado, o espectro de GSF-SAC QC mostra alargamentos e deslocamentos das bandas de  $\nu\text{N-H}$  comparado com a SAC QC, bem como um deslocamento e alteração da intensidade da banda de  $\nu\text{C=O}$  (para  $1737\text{ cm}^{-1}$ ) e alteração na frequência e formato da banda  $\gamma\text{N-H}$  ( $704\text{ cm}^{-1}$ ). Deslocamentos e alterações na intensidade das bandas correspondentes a GSF foram relativamente menores que para a SAC, no entanto essas pequenas diferenças foram observadas em todo o espectro da GSF-SAC QC (em  $2948$ ,  $1660$ ,  $1610$ ,  $1291$ ,  $1218$ ,  $835$  e  $675\text{ cm}^{-1}$ , etc.). Neste contexto, duas situações podem estar acontecendo: a) os desvios hipsocrômicos (para a esquerda) em relação às bandas da SAC, especialmente para a banda  $\nu\text{C=O}$ , foram detectados devido à interrupção das interações intermoleculares de ligação de hidrogênio SAC-SAC, e/ou b) ambos os componentes podem estar interagindo através de interações intermoleculares relativamente fracas na fase amorfa, tais como interações de hidrogênio envolvendo os grupamentos  $\text{C-H}$  de anéis aromáticos.

A análises morfológicas obtidas por SEM (Figura 17) revelam que todas as amostras são compostas por partículas de tamanho e formato irregulares, não mostrando diferenças substanciais entre si.

Figura 17. Fotomicrografias da griseofulvina cristalina (GSFc), griseofulvina obtida por *quench cooling* (GSF QC) e da mistura eutética de griseofulvina e sacarina (GSF:SAC EM)



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.3.4 Estudos cinéticos de solubilidade

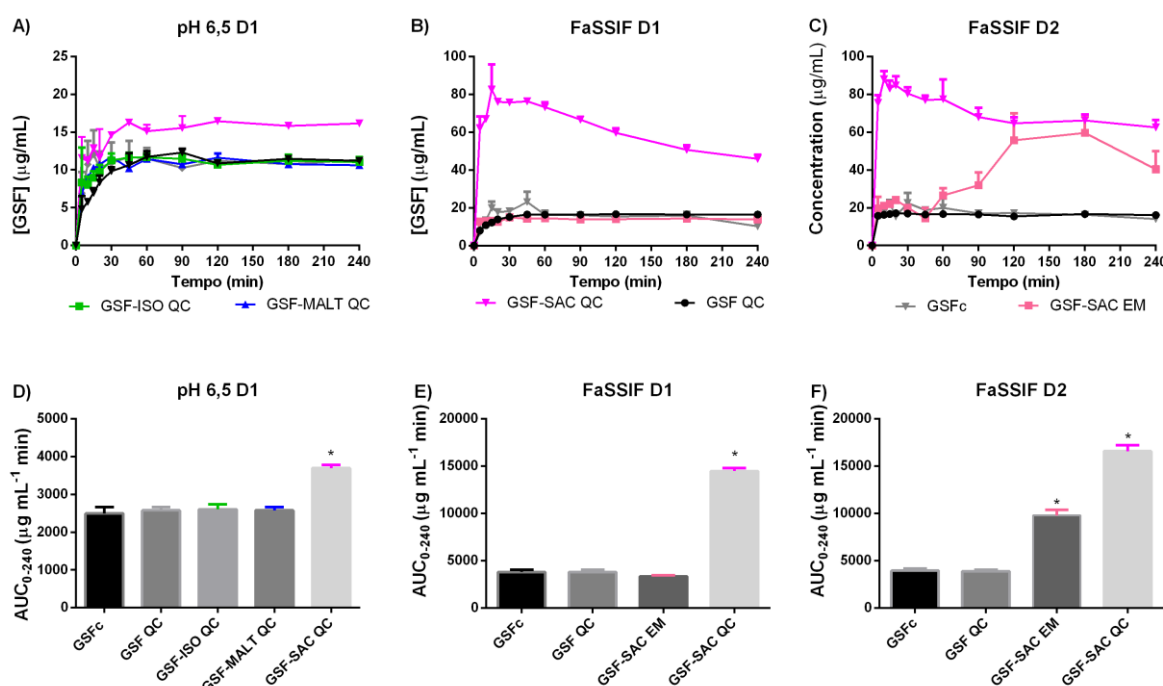
A cinética de solubilização de todas as formulações obtidas por QC, na menor dose utilizada (D1, Figura 18A e D), foi relativamente baixa em tampão pH 6,5, com AUC comparáveis a GSFc e a GSF QC, exceto para a amostra GSF-SAC QC. A GSF SAC QC promoveu uma maior liberação do fármaco, conferindo um aumento na AUC de 43% em comparação as amostras GSFc e GSF QC e gerando uma solução supersaturada. Quando a SAC foi previamente solubilizada no meio, a mesma concentração de SAC em solução não interferiu na solubilidade termodinâmica do fármaco.

No intuito de mimetizar melhor as condições gastrointestinais durante a dissolução de fármacos administrados por via oral, a solubilidade cinética das formulações GSF-SAC QC e GSF-SAC EM foram investigadas em meio biorrelevante (FaSSIF). Como a solubilidade da GSF é maior em FaSSIF que em tampão, a cinética de solubilização da GSFc e GSF QC (Figura 18B e 7E) também foi aumentada. A presença do adoçante hidrofílico na GSF-SAC EM na



dose D1 não melhorou a dissolução do fármaco. A AUC desta amostra foi comparável com o fármaco isolado (GSF<sub>c</sub> e GSF QC), embora a solubilidade de equilíbrio do fármaco nesta amostra seja ligeiramente menor ( $17,28 \pm 1,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que em FaSSIF. Em contraste, a GSF-SAC QC (D1) proporcionou uma alta na cinética de liberação do fármaco em FaSSIF (SR: 3,69), conferindo uma vantagem na AUC de 280% em comparação às AUC da GSF<sub>c</sub> e da GSF QC (Figura 18E). O resultado da solubilidade de equilíbrio da GSF em solução de SAC previamente solubilizado em FaSSIF ( $22,35 \pm 1,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi semelhante ao observado no meio puro, mostrando que a melhora na liberação não foi decorrente de aumento na solubilidade de equilíbrio. As diferenças observadas na liberação da GSF entre a formulação amorfa (GSF-SAC QC) e cristalina (GSF-SAC EM) podem estar relacionadas a diferença na cinética de solubilização do fármaco nos dois sistemas (amorfo ou cristalino), visto que a concentração final de carreador em solução é a mesma.

Figura 18. Estudos de solubilidade cinética e respectivas AUC em tampão pH 6,5 usando D1 (A e D) e em FaSSIF, D1 (B e E) e D2 (C e E).



Legenda: Griseofulvina cristalina (GSF<sub>c</sub>), griseofulvina amorfa (GSF QC), isomalte (ISO), maltitol (MALT), sacarina (SAC) e formulações obtidas pela técnica de *quench cooling* (QC). D1 e D2 correspondem a diferentes quantidades de amostra (doses) adicionadas para atingir as concentrações de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  em solução, respectivamente. \*Estatisticamente diferente ( $p < 0.05$ ) vs. GSF<sub>c</sub> e GSF QC.

O aumento da dose (D2) de fármaco nos estudos cinéticos de solubilidade (Figura 18C e F) não proporcionou diferenças significativas na AUC da GSF<sub>c</sub> e GSF QC. No entanto, um aumento de 14 % foi observado para a AUC de GSF-SAC QC e uma SR de 4,14 foi atingida.

A alteração da concentração de SAC previamente solubilizada no meio não alterou a solubilidade de equilíbrio do fármaco ( $21,21 \pm 1,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A liberação de GSF-SAC EM na dose D2 proporcionou concentrações acima da solubilidade do fármaco (SR: 3,15), bem como um incremento na AUC de 193% (Figura 18C e F). A solubilidade de equilíbrio do fármaco na amostra de GSF-SAC EM não foi alterada ( $18,90 \pm 0,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na dose D2.

Mesmo não alterando a solubilidade termodinâmica do fármaco, a GSF-SAC EM aumentou a cinética de liberação da GSF, permitindo atingir concentrações acima da solubilidade de saturação do fármaco. Até o presente momento, este estudo é o primeiro a relatar que a liberação de uma EM resultou em uma solução supersaturada, e que este sistema também pode ser considerado como um sistema de liberação de fármaco supersaturado (SDDS). Essa vantagem de dissolução do fármaco proporcionada pela EM é importante, visto que o fármaco que possui alta tendência à cristalização no estado sólido, dificultando sua estabilização na forma amorfa. Nos EUA, a formulação de GSF em comprimido disponível no mercado é uma dispersão sólida cristalina contendo 5% do fármaco e 95% do polímero polietilenoglicol (PEG). Esta formulação forma um sistema monotético e é obtida por pela técnica de *hot melt extrusion*, um método de fusão. Sistemas monotéticos podem ser considerados sistemas eutéticos cujo ponto eutético é próximo à proporção zero de um dos componentes (BROWN et al., 2014; LAW et al., 2002).

A solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis pode ser limitada por suas propriedades do estado sólido (interações intermoleculares fármaco-fármaco fortes na rede cristalina) e/ou por sua fraca afinidade para solvatação no meio (interações fármaco-solvente fracas) (WILLIAMS et al., 2013). Em sistemas amorfos, a distância média entre as moléculas é aumentada devido à ausência de simetria de ordem de longo alcance, reduzindo a extensão das forças de atração das moléculas de estado sólido e facilitando a remoção das moléculas do meio sólido para o aquoso. No entanto, como os sistemas amorfos são metaestáveis, especialmente um sistema amorfo puro (como GSF QC), quando as moléculas do solvente interagem com as moléculas do fármaco na superfície do sólido, a recristalização também pode ocorrer, levando a perda da vantagem de dissolução da forma amorfa (BELLANTONE, 2014).

Em dispersões sólidas amorfas (como a GSF-SAC QC), carreadores hidrofílicos são inseridos entre as moléculas do fármaco a fim reduzir a energia para dispersar essas moléculas no solvente. A dissolução do fármaco pode ser aumentada por ter interações fármaco-carreador mais fracas do que as interações fármaco-fármaco, reduzindo a energia necessária para a dissolução, ou por ter interações carreador-água mais fortes do que as interações fármaco-água,

aumentando a energia obtida através das interações carreador-água para dissolver moléculas do fármaco. Desta forma a dispersão sólida amorfa GSF-SAC QC promoveu uma maior liberação do fármaco e quando presente no meio, a SAC atuou retardando a precipitação do fármaco em solução.

Considerando que a temperatura de fusão de um composto fornece uma estimativa razoável das interações intermoleculares soluto-soluto no estado sólido (WILLIAMS et al., 2013), presumivelmente, o ponto de fusão inferior da EM em comparação com o fármaco cristalino pode significar que a presença da SAC neste sistema enfraquece as interações intermoleculares fármaco-fármaco no estado sólido, facilitando a dissolução da GSF. Um estudo prévio envolvendo a comparação de uma EM de benznidazol e posaconazol com sua formulação amorfa correspondente mostrou uma vantagem na liberação da EM comparada aos fármacos cristalinos e uma melhoria adicional foi proporcionada pela formulação amorfa em comparação com a EM (FIGUEIRÊDO et al., 2017). Porém, em nosso estudo a vantagem proporcionada pela mistura eutética só foi observada na maior dose testada. Embora a quantidade de SAC não impacte na solubilidade cristalina do fármaco, a presença de uma maior concentração do carreador no meio parece ser necessária para atingir uma melhoria na liberação do fármaco, quando a formulação não é amorfa.

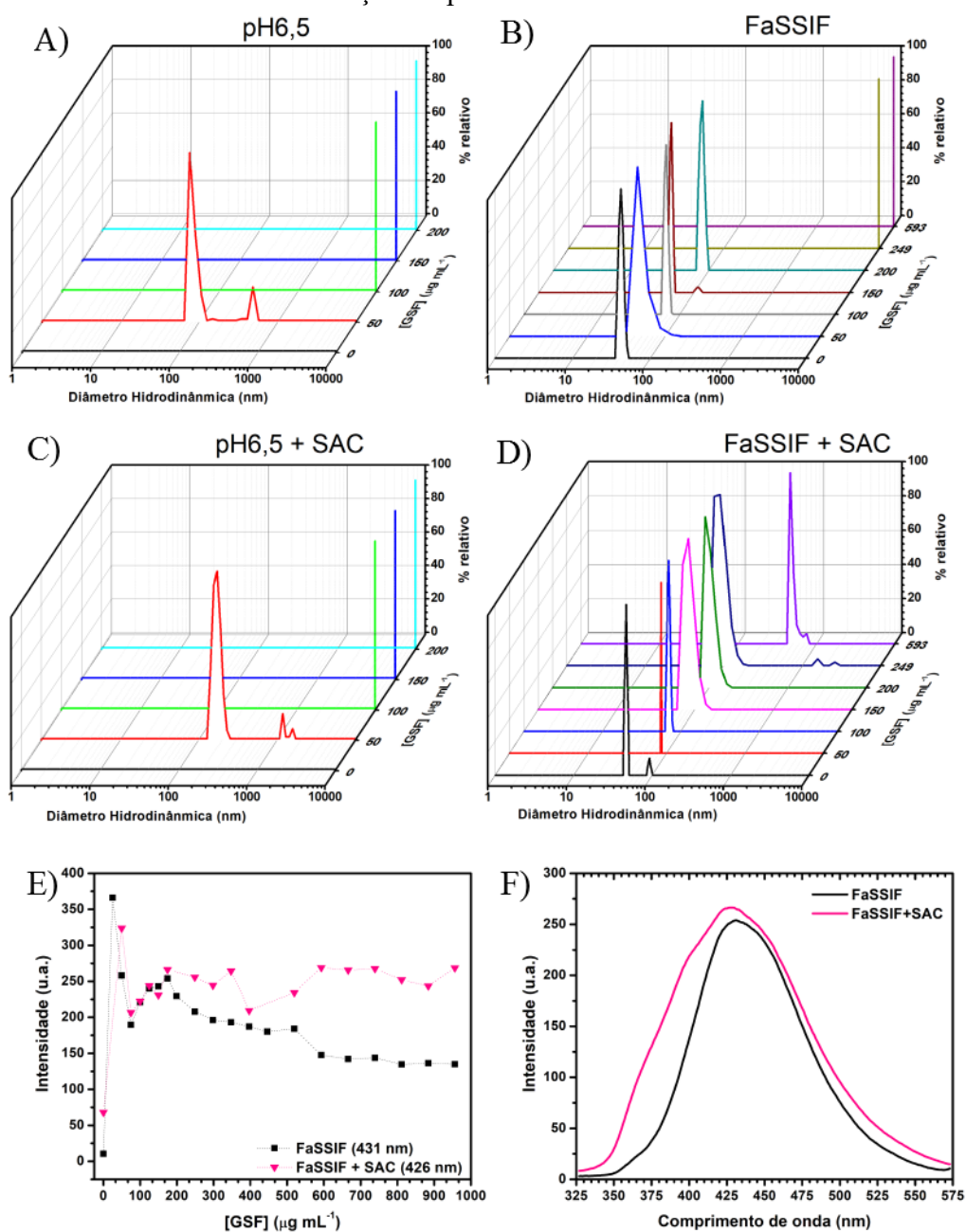
A presença de um carreador altamente hidrofílico na formulação altera a energia de superfície do sistema, alterando potencialmente o nível de solvatação do fármaco (WARREN et al., 2010) tanto na formulação GSF-SAC QC quanto na GSF-SAC EM devido a rápida dissolução da SAC em ambas as formulações. É relatado que os componentes de uma mistura eutética têm uma miscibilidade limitada no estado sólido, mas são completamente miscíveis no estado líquido (BAZZO; PEZZINI; STULZER, 2020a; LEUNER; DRESSMAN, 2000). Portanto, devido a sua alta afinidade no estado líquido, quando dissolvida primeiramente no meio biorrelevante, após atingir uma determinada concentração (como observado em D2) a SAC parece tornar o meio mais propício para a solubilização do fármaco, facilitando a liberação da GSF. Desta forma, essa alteração nas características do meio foi investigada.

#### **4.3.5 Investigação de soluções supersaturadas de griseofulvina e sacarina**

Através das análises de DLS foi avaliado a possibilidade de formação de agregados/precipitados em soluções supersaturadas de GSF em tampão pH 6,5 e FaSSIF, com ou sem a presença de SAC 20 mM (Figura 19A e C). Em tampão pH 6,5 tanto na presença quanto na ausência de SAC foram detectados pequenos agregados na concentração de

50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  que parecem crescer rapidamente, formando precipitados maiores com o aumento da concentração de fármaco. Sugerindo assim, uma rápida recristalização em ambos os meios e corroborando com os resultados obtidos nos estudos de precipitação e cinética de solubilização em tampão pH 6,5.

Figura 19. Diâmetro hidrodinâmico de soluções supersaturadas de griseofulvina (GSF) em A) tampão pH 6,5, B) FaSSIF, C) tampão pH 6,5 + sacarina (SAC) 20mmol  $\text{L}^{-1}$ , e D) FaSSIF + SAC 20mmol  $\text{L}^{-1}$ . E) Intensidade de fluorescência vs. concentração e F) espectros de fluorescência da GSF em soluções supersaturadas em FaSSIF e FaSSIF + SAC.



Legenda: As soluções supersaturadas foram obtidas através de titulação de uma solução estoque de GSF (50  $\text{mg mL}^{-1}$  em DMF) no meio, a 37 °C. Fonte: Elaborado pela autora.

Em FaSSIF (Figura 19B), foram detectadas partículas com diâmetro hidrodinâmico em torno de 42 nm correspondentes às micelas mistas do meio biorrelevante. Conforme a concentração de GSF é aumentada, o tamanho das partículas detectadas permanece o mesmo até  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A partir dessa concentração partículas maiores são detectadas, indicando a recristalização do fármaco em solução. As medidas DLS das soluções supersaturadas FASSIF + SAC (Figura 19D) mostraram uma distribuição de padrão bimodal, sendo o tamanho das partículas afetado pela presença do carreador em solução, mostrando diâmetros hidrodinâmicos em torno de 47 e 92 nm. Com a adição do fármaco na solução houve um aumento na população de diâmetro hidrodinâmico em torno de 90 nm, que continuou sendo a única população detectada até a concentração de  $249 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nesta concentração agregados maiores começaram a ser detectados, o que parece indicar a recristalização do fármaco, a qual foi levemente postergada pela presença da SAC no meio biorrelevante.

Moléculas fluorescentes, como a GSF, podem ser sensíveis ao ambiente em que estão situadas. Deste modo, a fluorescência da GSF em soluções supersaturadas FaSSIF e FaSSIF + SAC foi investigada. Analisando os resultados da Figura 19 observa-se uma diminuição inicial da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração do fármaco até  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguida de um aumento da intensidade até  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  em meio biorrelevante com ou sem a adição de SAC. Após essa concentração, a GSF apresentou um comportamento diferente em cada meio. Uma diminuição contínua na intensidade da fluorescência foi detectada em FASSIF, provavelmente devido a recristalização e consequente diminuição da concentração em solução. Nas soluções FaSSIF + SAC a intensidade de fluorescência da GSF permaneceu relativamente a mesma, embora com algumas flutuações, provavelmente devido a manutenção da concentração de fármaco solúvel no meio, mesmo após a adição contínua de fármaco na solução supersaturada.

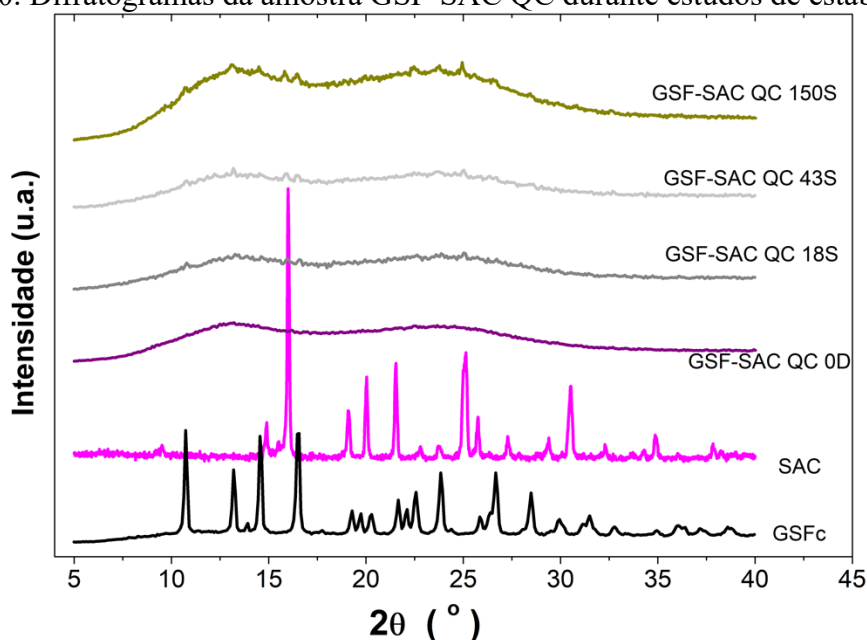
Um deslocamento hipsocrômico no comprimento de onda máximo também foi detectado nos espectros de fluorescência da GSF (Figura 19F) em FASSIF + SAC (426 nm) em comparação com o detectado em FaSSIF (431 nm). Esse deslocamento no comprimento de onda máximo no espectro de emissão da GSF indica que o fármaco está detectando uma mudança na polaridade do microambiente, ocasionada pela presença da SAC no meio biorrelevante. É reportado que em um ambiente apolar os espectros de emissão de um fluoróforo mostram um máximo deslocado para o azul (deslocamento hipsocrômico) em comparação com o máximo de espectros obtidos em um ambiente polar (ALBANI, 2008). Interações intermoleculares de hidrogênio entre as moléculas de SAC, envolvendo seus

grupamentos polares amina ou carboxila, com os componentes dos sais biliares, envolvendo seus grupamentos sulfato, fosfato ou colina, podem estar ocorrendo, levando possivelmente a incorporação da SAC à superfície das micelas. Desta forma, as moléculas de GSF detectaram um ambiente mais hidrofóbico ao seu redor quando uma alta concentração de SAC foi adicionada em FaSSIF, tornando o meio mais favorável para a solubilização do fármaco, como foi observado nos estudos cinéticos de solubilidade.

#### 4.3.6 Estudos de estabilidade

Através do monitoramento de análises de XRPD durante o armazenamento da amostra GSF-SAC QC foi possível detectar traços de recristalização da amostra a partir de 18 semanas (Figura 20). No entanto, mesmo após um tempo prolongado de armazenamento (150S), a formulação permaneceu predominante amorfa, diferentemente do comportamento observado para a GSF QC (item 3.3.5).

Figura 20. Difratogramas da amostra GSF-SAC QC durante estudos de estabilidade.



Legenda: Análises obtidas no dia da preparação (0D), e após 18 (18S), 43 (43S) e 150 (150S) semanas em dessecador à vácuo, a temperatura ambiente. Fonte: Elaborado pela autora.

Este é um fato interessante, uma vez que a GSF-SAC QC apresenta um menor valor de  $T_g$  que o fármaco amorfo isolado. Um estudo prévio investigou os mecanismos de recristalização da GSF em sistemas monotéticos amorfos contendo óxido de polietileno (PEO), os quais apresentavam valores de  $T_g$  inferior ao fármaco isolado. Este estudo mostrou que embora a  $T_g$  seja um indicativo da mobilidade global de um sistema amorfo, após a adição de um carreador que atua como plastificante, este parâmetro não seria suficiente para explicar seu

impacto na cinética de recristalização do fármaco. Quando ocorria uma separação de fases, uma camada rica no carreador era formada na interface dos cristais de GSF. Esse enriquecimento da fase amorfa circundante aos cristais pelo carreador (PEO) levava a uma modificação no mecanismo de crescimento rápido dos cristais, observando-se uma desaceleração na recristalização da GSF por meio do aprisionamento desses domínios pelo carreador (ZHANG et al., 2019).

#### 4.4 CONCLUSÃO

O uso de adoçantes (ISO, MALT e SAC) como carreadores hidrofílicos não impactou na solubilidade da GSF em tampão, levou a uma redução da solubilidade do fármaco em meio biorrelevante, e não afetou (ISO e MALT) ou teve um impacto modesto (SAC) no comportamento de precipitação da GSF em soluções supersaturadas. A associação da GSF com adoçantes possibilitou o desenvolvimento de diferentes dispersões sólidas, formulações amorfas e uma mistura eutética, com sucesso.

A formulação amorfa de GSF com SAC, o carreador que forma uma mistura eutética com o fármaco, proporcionou um aumento na cinética de liberação da GSF quando comparada com os sistemas amorfos dos demais carreadores testados em tampão pH 6,5. Em meio biorrelevante, a GSF-SAC QC forneceu uma melhoria na dissolução do fármaco em comparação a GSF amorfa, cristalina e a mistura eutética em ambas as doses testadas.

Os estudos cinéticos de solubilidade mostraram que a EM forneceu uma vantagem na liberação do fármaco em meio biorrelevante em comparação com o fármaco amorfo e cristalino, quando uma alta dose foi testada (D2), levando a formação de uma solução supersaturada. Estudos de fluorescência mostraram que a presença da SAC no meio biorrelevante alterou a micropolaridade do meio detectada pela GSF, assim a SAC tornou o meio mais propício para a liberação do fármaco. O fato de a liberação do fármaco a partir das formulações contendo SAC levar a concentrações acima da solubilidade de saturação em ambos tanto num sistema amorfo (GSF-SAC QC) ou como em um sistema cristalino (GSF-SAC EM) pode ser considerado um resultado importante para contornar as limitações biofarmacêuticas deste fármaco.





## 5 CAPÍTULO IV: O PAPEL DO ÁCIDO GLICIRRÍZICO EM FENÔMENOS COLOIDAIIS DE SISTEMAS SUPERSATURADOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS CONTENDO O ANTIFÚNGICO GRISEOFULVINA

### 5.1 INTRODUÇÃO

A modulação das propriedades de solubilidade de fármacos tem sido explorada por meio de muitas estratégias de formulação, como sistemas supersaturados de liberação de fármacos (SDDS), no intuito de melhorar a dissolução e biodisponibilidade de fármaco hidrofóbicos. Estes sistemas podem dissolver-se rapidamente, levando a uma condição de supersaturação do fármaco nos fluidos gastrointestinais (FRANÇA et al., 2019; PRICE et al., 2018). No entanto, como as soluções supersaturadas têm um potencial químico aumentado (em comparação com as soluções saturadas ou insaturadas), estas são consideradas instáveis e tendem a precipitar, perdendo a vantagem de dissolução desses sistemas (KAUR; NARANG; BANSAL, 2018; PALMELUND et al., 2016). A capacidade dos SDDS em resistir a recristalização mediada por solventes depende da propensão de recristalização inerente ao fármaco e da capacidade de seus constituintes em inibir e postergar os processos de nucleação e crescimento de cristais (NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018).

É reportado que a composição dos fluidos gastrointestinais pode afetar a solubilidade e a precipitação de fármacos hidrofóbicos (CALAFATO; PICÓ, 2006; YEAP et al., 2019). Uma contribuição dos sais biliares na manutenção da supersaturação foi observada, porém esta geralmente não é suficiente para evitar a recristalização. O efeito contrário também já foi observado para alguns fármacos. Assim, a aplicação do meio biorrelevante em estudos de supersaturação é frequentemente recomendada a fim de melhorar a correlação *in vitro-in vivo* (INDULKAR et al., 2016; KAUR; NARANG; BANSAL, 2018; PINTO et al., 2018). A necessidade de aplicação de inibidores de precipitação para estabilizar sistemas supersaturados tem levado a exploração de novas abordagens como o uso de moléculas de baixa massa molar, quando o uso de polímeros é considerado inviável ou inadequado (LAITINEN et al., 2017; NEWMAN; REUTZEL-EDENS; ZOGRAFI, 2018; OJARINTA et al., 2017). Dessa forma, a descoberta de novos inibidores de precipitação eficazes é desejável, especialmente moléculas de baixa massa molar para fármacos de alta dosagem, como a GSF (Figura 3).

O ácido glicirrízico (GA, Figura 5) é o principal composto bioativo extraído das raízes de alcaçuz. É um material seguro e atóxico que tem sido aplicado como aromatizante e adoçante

(POLYAKOV, 2011; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020). Devido à sua estrutura molecular anfifílica, contendo uma porção hidrofílica (dois resíduos glucurônicos) e uma porção hidrofóbica (aglicona), este composto apresenta ação tensoativa em solução aquosa. Também é relatado que o GA pode se autoassociar em complexos ou agregados coloidais/micelas para solubilizar compostos hidrofóbicos pela reorientação de seus fragmentos hidrofóbicos e hidrofílicos em um ambiente aquoso (KORNIEVSKAYA; KRUPPA; LESHINA, 2008; MATSUOKA et al., 2016; METELEVA et al., 2019; POLYAKOV, 2011; POLYAKOV et al., 2006). No contexto da supersaturação, poucos estudos envolvendo o GA são relatados. Uma patente relatou o uso do GA como ativo principal pouco solúvel em um sistema de liberação de fármacos autoemulsionante (YU et al., 2006), enquanto dois outros estudos relataram que o GA poderia interferir nas propriedades de recristalização de nanopartículas de celecoxibe e itraconazol amorfo, quando esses sistemas estavam dispersos em água (FERNÁNDEZ-RONCO et al., 2015; MARGULIS-GOSHEN et al., 2011). Embora este composto seja de interesse farmacêutico, o efeito do GA em soluções supersaturadas de GSF não foi investigado até o momento, nem o desempenho do GA em meio biorrelevante.

Neste contexto, foi hipotetizado que o ácido glicirrízico poderia agir como um inibidor de precipitação em soluções supersaturadas de griseofulvina. Neste trabalho também foi investigado o impacto do meio biorrelevante na formação coloidal do ácido glicirrízico e como o meio afeta a separação de fases em condições de supersaturação.

Cabe mencionar que os resultados deste capítulo já se encontram publicados no periódico *Journal of Molecular Liquids*, sendo o manuscrito intitulado *The role of glycyrrhizic acid in colloidal phenomena of supersaturation drug delivery systems containing the antifungal drug griseofulvin* (Figura A 2, na seção APÊNDICE).

## 5.2 METODOLOGIA

### 5.2.1 Materiais

A GSF foi adquirida da empresa Inner Mongolia Glint Pharmaceutical CO Ltd. (China). O GA e o pireno (adequado para fluorescência, pureza  $\geq 99,0\%$ ) foram adquiridos das empresas Galena<sup>®</sup> (Brasil) e Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Brasil), respectivamente. A água ultrapura utilizada nos experimentos foi obtida através de sistema Milli-Q (EUA). Outros reagentes químicos utilizados foram de grau para CLAE ou de grau analítico. O meio biorrelevante foi adquirido da empresa Biorelevant.com (RU). O tampão fosfato de sódio pH 6,5 e o FaSSIF foram preparados de acordo com as recomendações disponíveis no site Biorelevant.com.

## 5.2.2 Métodos

### 5.2.2.1 Efeito do ácido glicirrízico na solubilidade de equilíbrio da griseofulvina

Os estudos de solubilidade foram determinados utilizando Shaker Nova Técnica NT-715 (Brasil), no LabCQ- UFSC. Um excesso de GSF cristalina foi adicionado a 25 mL de tampão fosfato pH 6,5 ou 10 mL de FaSSIF, com ou sem a presença de GA 30 mmol L<sup>-1</sup> (aproximadamente 1000 vezes a solubilidade do fármaco). As amostras foram agitadas a 240 rpm, a temperatura de 37,0 °C, até atingirem o equilíbrio (48 h), em triplicata. Em tempos pré-determinados, alíquotas das amostras foram retiradas, filtradas através de membrana de poliamida de 0,45 µm (Chromaphil<sup>®</sup> Xtra), diluídas em metanol:água (50:50, v/v) e quantificadas por CLAE.

A quantificação do fármaco foi realizada em cromatógrafo PerkinElmer Series 200 da CentralCrom-UFSC, utilizando detecção UV em 254 nm, fase móvel metanol:água (50:50, v/v), com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, a 25 °C e volume de injeção de 20 µL. A fase estacionária utilizada foi uma coluna C18 (Kinetex<sup>®</sup> 110A, 5 µm, 150×4.6 mm). A curva padrão apresentou boa linearidade ( $R > 0,99$ ) na faixa de concentração relevante.

### 5.2.2.2 Avaliação do impacto do ácido glicirrízico no perfil de precipitação da griseofulvina

Os estudos cinéticos de precipitação da GSF foram conduzidos em 50 mL de tampão pH 6,5 e 25 mL de FaSSIF, com ou sem a presença de 30 mmol L<sup>-1</sup> de GA. As amostras foram mantidas a 37,0 °C, 240 min em Shaker Nova Técnica NT 715 no LabCQ-UFSC, sob agitação constante de 240 rpm. A quantificação da concentração de GSF em diferentes tempos foi realizada por metodologia CLAE descrita na seção 5.2.2.1. As soluções supersaturadas foram geradas através do métodos de *solvent shift* (PINTO et al., 2018), adicionando pequenas alíquotas de uma solução estoque de GSF (80 mg mL<sup>-1</sup> dissolvida em DMF) aos meios, a fim de atingir 4 concentrações diferentes (100, 300, 600 e 1200 µg mL<sup>-1</sup>). A concentração do solvente orgânico DMF foi inferior a 1,5%, a qual foi previamente checada que não interfere na solubilidade aquosa do fármaco. A AUC de cada perfil de concentração vs. tempo foi calculada utilizando o suplemento DD Solver<sup>®</sup> no software Microsoft Excel<sup>®</sup>.

### 5.2.2.3 Investigação do fenômeno de separação de fases em soluções supersaturadas de griseofulvina

Estes estudos foram conduzidos a fim de avaliar a concentração máxima de fármaco livre que é miscível nos diferentes meios até que uma separação de fases ocorra (solubilidade

do amorfo ou LLPS), adaptando a metodologia previamente descrita na literatura (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015; MOSQUERA-GIRALDO; TAYLOR, 2015). As soluções supersaturadas foram geradas através da titulação de uma solução estoque de GSF (50 mg mL<sup>-1</sup> dissolvida em DMF) a 2 mL de meio em cubetas de quartzo, seguidas de homogeneização da amostra (10 vezes). O meio utilizado foi tampão pH 6,5 ou FaSSIF, com ou sem a presença de GA 30 mmol L<sup>-1</sup>, mantido a temperatura de 37,0 °C. Após cada adição da solução estoque as amostras foram investigadas por espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia de luz polarizada (PLM).

#### 5.2.2.3.1 Método espectrofotométrico UV/Vis

A concentração máxima de fármaco atingida em uma solução homogênea pode ser determinada através do monitoramento do espectro UV-Vis do fármaco em um comprimento de onda que este absorve e um que não absorve. Com o aumento do fármaco livre em solução, a intensidade de absorbância do fármaco é aumentada, até atingir a concentração em que uma nova fase é formada em solução (agregados coloidais ou precipitados cristalinos). Com o aumento da formação da nova fase, um espalhamento de luz no comprimento de onda não absorvente é observado, exibido como um aumento na linha de base (INDULKAR et al., 2018). O espalhamento de luz relativo e intensidade de absorbância no UV-Vis das soluções supersaturadas foram monitorados de 320-600 nm em espectrômetro Varian Cary 50 Bio UV/Vis, equipado com sistema Agilent PCB 1500 Water Peltier para controle da temperatura, no LACFI- UFSC. Os experimentos foram realizados em triplicata e a temperatura foi mantida a 37,0 °C. A absorbância em 365 nm foi plotada após correção da linha de base com o espalhamento de luz relativo observado em 450 nm.

#### 5.2.2.3.2 Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência das soluções supersaturadas de GSF foram monitorados a fim de determinar a concentração em que a GSF forma agregados ricos em fármacos, a 37,0 °C. Como a GSF é uma molécula fluorescente, o fármaco foi usado como uma sonda de fluorescência sensível ao ambiente. O comprimento de onda máximo e a intensidade dos espectros de emissão da GSF foram investigados mudando a polaridade do ambiente local através do uso de misturas etanol/água na faixa de 0-99% (v/v), a fim de comparar com os sistemas coloidais. Os espectros de fluorescência foram adquiridos usando um fluorímetro Varian Cary Eclipse, no LACFI- UFSC. As amostras foram excitadas em 295 nm e os espectros de emissão foram registrados no intervalo de 320-580 nm.

#### 5.2.2.3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia de luz polarizada (PLM)

As análises de DLS foram conduzidas para estimar o tamanho de partícula de agregados/precipitados formados durante a titulação das soluções supersaturadas de GSF. O diâmetro hidrodinâmico foi determinado usando a opção de dimensionamento de partículas do DLS ZetaPlus da Brookhaven, no LACFI- UFSC, em quintuplicata. As medições foram feitas utilizando ângulo de espalhamento de 90° e temperatura de 37,0 °C. Antes das análises, os meios foram filtrados usando membrana de 0,45 µm (Chromaphil® Xtra) e preenchidos em cubetas de quartzo.

Nas análises de PLM, os agregados formados nas soluções supersaturadas foram avaliados com base em sua birrefringência, visto que cristais e partículas amorfas são observados como birrefringentes e não birrefringentes, respectivamente. Após as titulações, alíquotas da solução supersaturada (37 °C) foram retiradas, colocadas em lâminas de vidro e investigadas imediatamente em microscópio Olympus CX41RF, com aumento de 200x. O equipamento, disponível no Laboratório de Bioquímica Clínica II da UFSC, possui analisador de luz transmissor U-ANT e polarizador de luz transmitida U-POT (Japão).

#### 5.2.2.3.4 Investigação da solução coloidal de ácido glicirrízico

As soluções de GA foram investigadas através de estudos de condutividade, medições de viscosidade, análises de DLS e espectroscopia de fluorescência a fim de avaliar os agregados coloidais formados em tampão pH 6,5 + GA 30 mmol L<sup>-1</sup>, meio biorrelevante FaSSIF e FaSSIF + GA 30 mmol L<sup>-1</sup>.

#### 5.2.2.3.5 Estudos de condutividade

A determinação da concentração de agregação crítica (CAC) do GA foi realizada através da titulação de uma solução estoque de GA em tampão pH 6,5 e FaSSIF. O impacto da presença de GSF (100 µg mL<sup>-1</sup>) na CAC do GA foi investigado através da adição de uma alíquota de uma solução estoque de GSF (10 mg mL<sup>-1</sup> em DMF) ao meio, antes de começar a titulação com a solução estoque de GA. As medidas de condutividade foram realizadas em condutivímetro Metrohm 712, no LACFI-UFSC, utilizando 20 mL de meio, mantido a 37 °C.

#### 5.2.2.3.6 Medidas de viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas viscosímetro Brookfield LV DV-II + Pro, acoplado a banho termostático TE-2005 Tecinal, utilizando *spindle* SV18, no LabCQ- UFSC.

As análises foram realizadas em duplicata, utilizando 20 mL de meio e velocidade de 150-200 rpm, com controle de temperatura a 37,0 °C.

#### 5.2.2.3.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico dos agregados coloidais de GA formados nas soluções tampão pH 6,5 e FaSSIF foram determinados usando a opção de dimensionamento de partículas do equipamento ZetaPlus de Brookhaven, no LACFI- UFSC, em quintuplicata. As medições DLS foram feitas em ângulo de espalhamento de 90° e temperatura de 37,0 °C. Antes da análise, os meios foram filtrados usando membrana de poliamida de 0,45 µm (Chromaphil® Xtra) e preenchidos em cubetas de quartzo.

#### 5.2.2.3.8 Espectroscopia de fluorescência

A avaliação da micropolaridade local foi realizada utilizando pireno, uma sonda de fluorescência hidrofóbica de polaridade comumente usada. Esta sonda pode detectar mudanças na polaridade do microambiente do meio pela razão entre a intensidade de suas duas bandas fluorescentes características: banda I e banda III (GEROLA et al., 2017). Os espectros de emissão de pireno (0,5 µmol L<sup>-1</sup>) foram obtidos em um fluorímetro Varian Cary Eclipse, no LACFI- UFSC. A amostra foi excitada em 334 nm, e os espectros de emissões foram registrados na faixa de comprimento de onda de 350 a 600 nm após a titulação de uma solução concentrada de GA (200 mmol L<sup>-1</sup> dissolvida em tampão pH 6,5) aos meios. A polaridade do microambiente foi avaliada a partir do cálculo da razão entre as bandas do pireno I e III, em 373 e 385 nm, respectivamente.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 5.3.1 Efeito do ácido glicirrízico na solubilidade de equilíbrio do fármaco

A presença do GA em tampão pH 6,5 proporcionou um aumento solubilidade de equilíbrio do fármaco ( $85,82 \pm 3,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) equivalente a 8 vezes a solubilidade da GSF no meio sem a presença do carreador ( $10,45 \pm 0,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Este fato deve-se a habilidade do GA em formar complexos ou agregados coloidais com capacidade de solubilização de fármacos hidrofóbicos já reportada na literatura (POLYAKOV, 2011).

Em meio biorrelevante (FaSSIF), a solubilidade da GSF foi aumentada 2 vezes ( $22,05 \pm 0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em comparação à solubilidade em tampão pH 6,5, como resultado da solubilização micelar promovida pelo taurocolato de sódio e pela lecitina (PAS et al., 2018). No entanto, em meio biorrelevante na presença do GA o valor de solubilidade do fármaco

( $9,83 \pm 0,69 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi similar ao encontrado em tampão pH 6,5, sem a presença dos sais biliares e do carreador. Este resultado demonstra que capacidade de solubilização do GA foi fortemente alterada pela presença dos sais biliares no meio biorrelevante. Recentemente, foi reportado que o meio biorrelevante pode interagir com alguns polímeros e surfactantes alterando suas propriedades solubilizantes e/ou de inibição de precipitação de fármacos em soluções supersaturadas (INDULKAR et al., 2018; LU et al., 2017; PINTO et al., 2018). Desta forma, o impacto do meio biorrelevante na inibição de precipitação do fármaco e na formação de agregados coloidais em solução foi investigada.

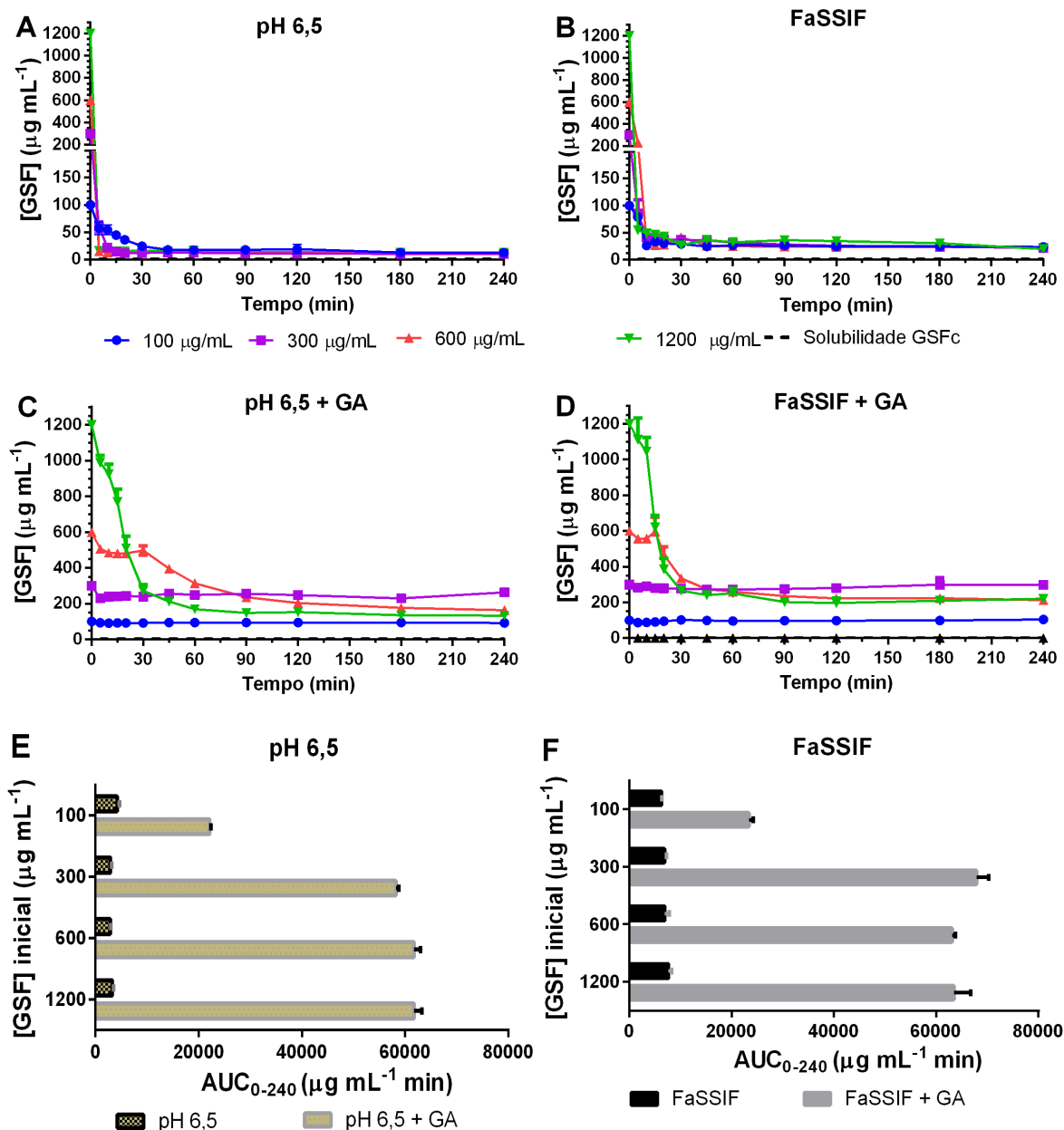
### **5.3.2 Avaliação do impacto do ácido glicirrízico no perfil de precipitação da griseofulvina**

Estudos cinéticos de precipitação foram realizados a fim de avaliar a capacidade do GA em manter a condição de supersaturação de GSF, quando diferentes concentrações do fármaco foram adicionadas em tampão pH 6,5 e FaSSIF. Como pode ser observado nos perfis de concentração vs. tempo (Figura 21) e suas respectivas AUC, a GSF precipitou quase completamente dentro de 5 min nas concentrações mais altas, tanto em pH 6,5 quanto em FaSSIF. Esses resultados mostraram que a presença de sais biliares no meio biorrelevante não foi capaz de retardar a precipitação do GSF. Esses dados estão de acordo com diversos estudos da literatura que relatam que a GSF é um fármaco de recristalização rápida e tem baixa propensão a formar soluções supersaturadas de alto grau. Em decorrência da sua cinética de recristalização rápida, a concentração de “LLPS” ou “solubilidade do amorfo” teórica da GSF nunca foi alcançada durante a dissolução de um sistema amorfo (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015; BLAABJERG et al., 2018; BOGNER et al., 2010; OZAKI et al., 2012).

Em contraste, a presença do GA retardou a precipitação da GSF nos dois meios testados. Valores de AUC equivalentes a 21 e 9 vezes (Figura 21E e F) foram obtidos em comparação com os obtidos em tampão pH 6,5 e FaSSIF, respectivamente, sem a presença do carreador. Entretanto, uma mesma concentração induz a uma taxa de supersaturação (SR) menor em tampão pH 6,5 + GA que em FaSSIF + GA, devido a maior solubilização do fármaco no primeiro meio. É esperado que em baixas SR, a taxa de nucleação a partir de soluções supersaturadas seja praticamente zero. Contudo, quando a SR aumenta e atinge um certo valor em que a nucleação é diferente de zero, qualquer pequeno aumento na supersaturação pode intensificar drasticamente a taxa de nucleação (BECKMANN, 2013). As concentrações de supersaturação mantidas em ambos os meios foram comparáveis, conforme demonstrado por

seus valores de AUC equivalentes (Figura 21E e F), mesmo com uma menor diferença de potencial químico entre a solução supersaturada e a saturada e uma reduzida força motriz para precipitação em tampão pH 6,5 + GA que em FaSSIF + GA. Este resultado pode ser decorrente dos valores de “solubilidade amorfa” do fármaco nos dois meios contendo o GA, ou devido a uma capacidade de inibição de precipitação mais elevada do GA em FaSSIF.

Figura 21. Perfis de concentração vs. tempo da GSF nos ensaios de precipitação em tampão pH 6,5 (A e C) e em FaSSIF (B e D).





Cabe mencionar que as concentrações de supersaturação de GSF mantidas em nosso estudo de precipitação, em ambos os meios, foram superiores às concentrações obtidas anteriormente empregando alguns polímeros em condições semelhantes, como HPMC e metilcelulose (HONG; NOWAK; WAH, 2018), e HPMC-AS e PVP-VA (CHEN et al., 2015b). Esses resultados demonstram o potencial do GA como um carreador de baixa massa molar (não polimérico) como um inibidor de precipitação em sistemas supersaturados de fármacos hidrofóbicos, como a GSF.

### **5.3.3 Investigação do fenômeno de separação de fases em soluções supersaturadas de griseofulvina**

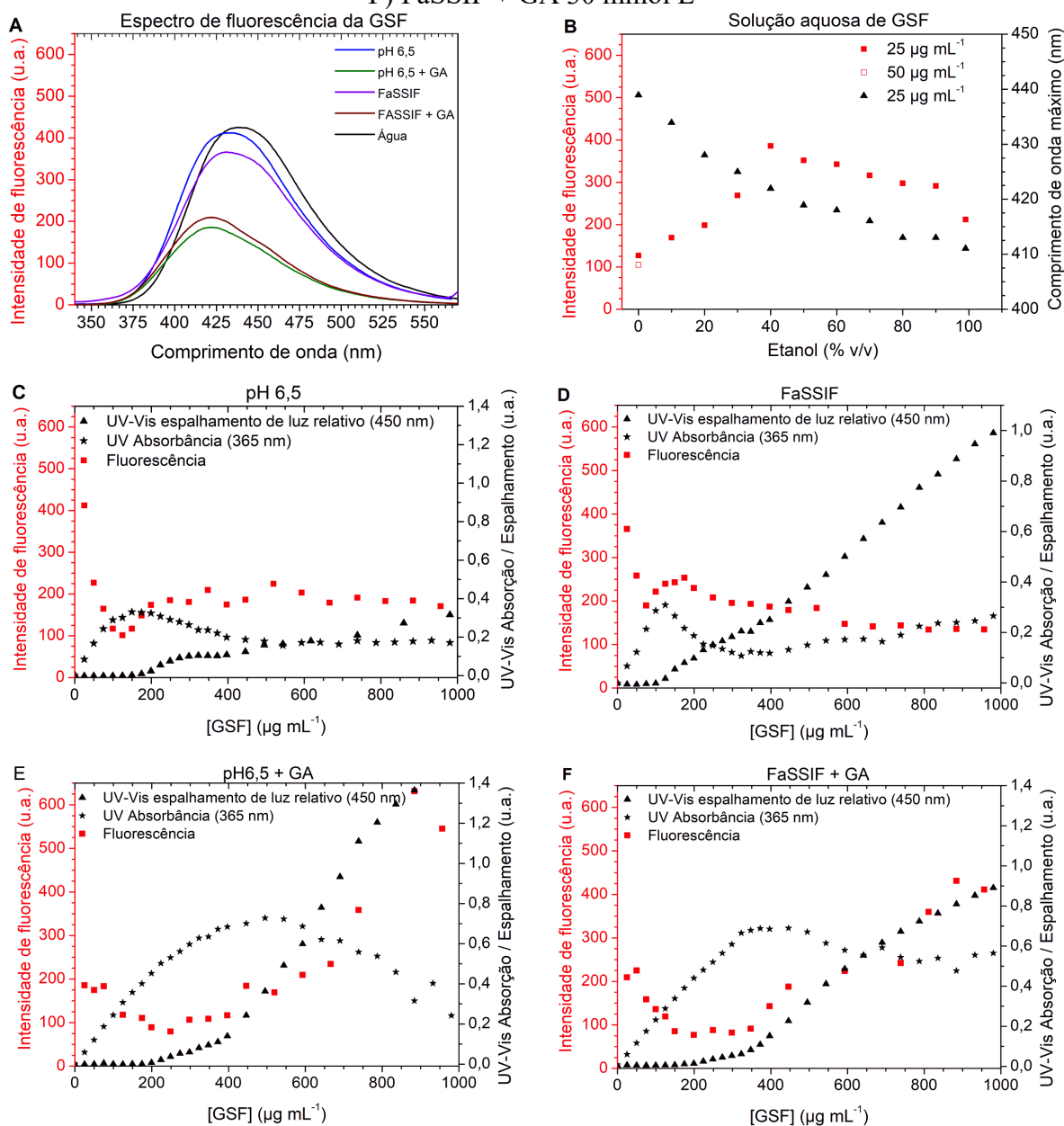
O fenômeno de separação de fases foi investigado a fim de entender o efeito do GA na precipitação do fármaco nos diferentes meios (Figura 22). Os resultados de espectroscopia de fluorescência da GSF em soluções etanol/água (0% a 99% de etanol) mostraram deslocamentos para o azul (hipsocrômicos) no comprimento de onda máximo dos espectros de emissão (Figura 22B) quando a polaridade do meio é alterada para um ambiente de menor polaridade. Além disso, diferenças na intensidade de picos foram detectadas em meios distintos e concentrações diferentes em solução, corroborando com os dados da literatura de que o GSF pode ser usada como uma sonda de fluorescente (CALAFATO; PICÓ, 2006; TAKAHASHI; YAMAGUCHI, 1991b).

É possível observar que quando a concentração foi aumentada em tampão pH 6,5 (Figura 22C) e em FaSSIF (Figura 22D), a intensidade de fluorescência do pico de GSF diminuiu, provavelmente devido a um processo autossupressão de fluorescência (do inglês *self-quenching*). Quando há um número de moléculas acima da solubilidade em solução, as colisões moleculares do fármaco podem ser aumentadas, reduzindo a intensidade de fluorescência através do fenômeno de autossupressão de fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

À medida que a taxa de supersaturação aumentou, o espectro de UV-Vis mostrou um aumento na linha de base em comprimentos de onda que o fármaco não absorve (450 nm) e uma descontinuidade no incremento de intensidade em um comprimento de onda absorvente (365 nm). Essas mudanças indicam a formação de uma nova fase em solução nas concentrações de  $129,11 \pm 25,40 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $93,84 \pm 14,46 \mu\text{g mL}^{-1}$  em tampão pH 6,5 (Figura 22C) e em FaSSIF (Figura 22D), respectivamente. A competição entre as forças atrativas e repulsivas, em soluções supersaturadas levam a junção e desprendimento de moléculas, podendo formar pequenos aglomerados que tanto podem se desintegrar (se dissolver novamente) ou podem se

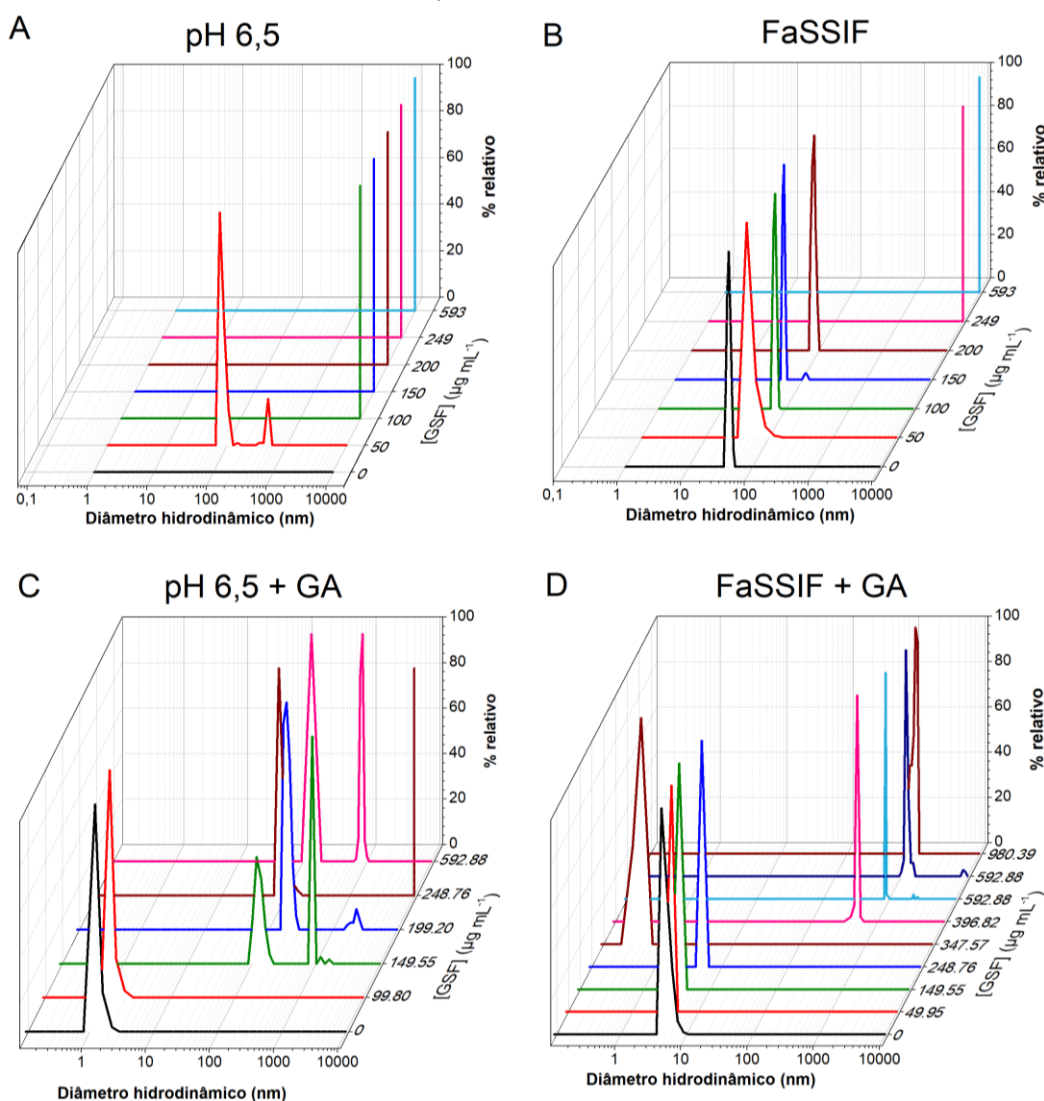
tornar núcleos que crescem ainda mais a fim de reduzir a energia livre do sistema (BECKMANN, 2013; LEWIS et al., 2015). A supressão do movimento molecular, nestes pequenos aglomerados provavelmente levou ao pequeno aumento na intensidade de fluorescência observada (TAKAHASHI; YAMAGUCHI, 1991b).

Figura 22. Dados de emissão de fluorescência da GSF em diferentes soluções (A e B). Representações gráficas do espalhamento de luz relativo no UV-Vis (450 nm), absorvância no UV (365 nm) e intensidade de fluorescência da GSF obtidas durante os estudos de separação de fase em C) tampão pH 6,5, D) FaSSIF, E) tampão pH 6,5 + GA 30 mmol L<sup>-1</sup> e F) FaSSIF + GA 30 mmol L<sup>-1</sup>



Legenda: As soluções supersaturadas foram obtidas através de titulação de uma solução estoque de GSF, a 37 °C. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 23. Diâmetro hidrodinâmico dos agregados/precipitado formados nas soluções supersaturadas de GSF, em A) tampão pH 6,5, B) FaSSIF, C) tampão pH 6,5 + GA 30 mmol L<sup>-1</sup>, e D) FaSSIF + GA 30 mmol L<sup>-1</sup>.



Legenda: As análises foram feitas em quintuplicata, 37,0 °C. Fonte: Elaborado pela autora.

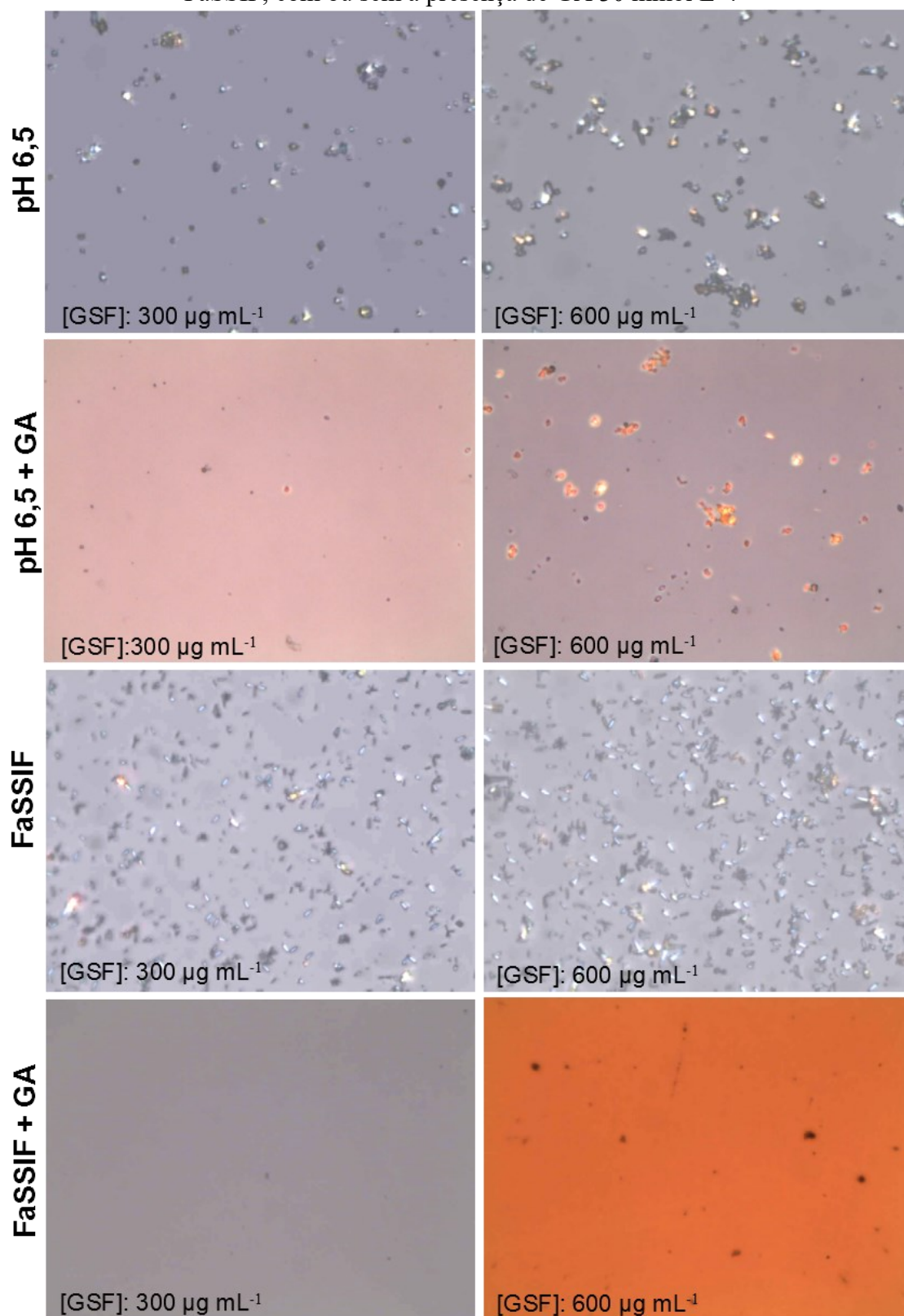
Posteriormente, o espalhamento de luz relativo permaneceu aumentando em um comprimento de onda não absorvente, enquanto a absorvância no UV-Vis e a intensidade de fluorescência reduziram, indicando uma diminuição na concentração do fármaco devido à recristalização em solução. As análises de DLS da nova fase formada mostraram partículas com elevado diâmetro hidrodinâmico (Figura 23A e B) e partículas birrefringentes nas imagens de PLM (Figura 24), confirmam a presença de precipitados cristalinos do fármaco em tampão pH 6,5 e em FaSSIF. Nas soluções supersaturadas, a adição de mais moléculas aos aglomerados vai tornando-se cada vez mais favorável energeticamente, até que estes atinjam um tamanho mínimo que seja estável e não se dissolvam novamente. Acima desse tamanho, todos os núcleos

tendem a crescer, uma vez que a energia livre do sistema só pode ser diminuída através do atrelamento de novas moléculas (BECKMANN, 2013; LEWIS et al., 2015).

Em tampão pH 6,5 + GA, a intensidade de fluorescência permaneceu relativamente constante abaixo da solubilidade da GSF no meio ( $\cong 85 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Figura 22E). Acima dessa concentração, o ambiente aquoso provavelmente favoreceu o processo autossupressão de fluorescência do fármaco hidrofóbico (ABUIN; LISSI, 1993) e a intensidade de fluorescência reduziu, de forma similar aos resultados obtidos em tampão pH 6,5. Em  $287,59 \pm 103,93 \mu\text{g mL}^{-1}$ , um aumento no espalhamento de luz relativo em 450 nm indicou um outro ponto de transição. Uma concomitante elevação na intensidade de emissão de fluorescência do fármaco foi detectada (Figura 22E), sugerindo que o fármaco poderia estar particionando em outro microambiente no qual estaria protegido contra processos de supressão de fluorescência, como uma fase coloidal (COSTA et al., 2019). Quando a recristalização é adequadamente inibida ou retardada durante a dissolução de um sistema de supersaturado de liberação, a solubilidade do amorfo (máxima concentração de fármaco livre miscível em uma solução supersaturada) pode ser excedida. Acima dessa concentração, uma separação de fase líquido-líquido (LLPS) pode ser cineticamente favorecida, levando à formação de (nano ou micro) agregados na fase aquosa, que podem permanecer em pseudo-equilíbrio com a solução supersaturada (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015; BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; PRICE et al., 2018; TAYLOR; ZHANG, 2016).

As medidas de DLS (Figura 23C) mostraram uma distribuição de tamanho de partículas bimodal, com estruturas em torno de 100 nm e outras maiores que  $1 \mu\text{m}$  próximas a esta concentração de transição. Embora estivesse ocorrendo a formação de uma fase coloidal, a recristalização do fármaco aconteceu concomitantemente, visto que partículas cristalinas foram também detectadas nas análises de PLM em pH 6,5 + GA (Figura 24). Com o aumento da concentração da solução supersaturada observou-se uma redução na absorbância UV-Vis do fármaco (365 nm), indicando a depleção da concentração do fármaco em solução decorrente da recristalização do fármaco (Figura 22E). O notável aumento da solubilidade proporcionado pelo GA em tampão pH 6,5 e a conseqüente redução da taxa de supersaturação, provavelmente, retardaram a precipitação do fármaco e facilitaram a separação/formação de uma fase coloidal do fármaco (aumento significativo da intensidade da fluorescência do fármaco) (Figura 22E). No entanto, o GA foi capaz apenas de postergar, mas não evitar completamente, a recristalização do fármaco em tampão pH 6,5.

Figura 24. Imagem de microscopia de luz polarizada (magnificação 200×) de duas diferentes concentrações de GSF (300 e 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em soluções supersaturadas em tampão pH 6,5 FaSSIF, com ou sem a presença de GA 30  $\text{mmol L}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pela autora.

No meio FaSSIF + GA, houve redução na intensidade de fluorescência em baixas concentrações de GSF, similar aos resultados encontrados em tampão pH 6,5 + GA (Figura 22F). Uma interrupção nesse declínio da intensidade de fluorescência foi detectada com o aumento da concentração de GSF, indicando um diferente rearranjo em solução. O subsequente aumento na intensidade de fluorescência e resultados de espalhamento de luz relativo e absorvância no UV-Vis indicaram que separação de fases ocorreu em torno de  $313,96 \pm 21,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ , concentração similar ao valor de solubilidade do amorfo da GSF ( $\approx 356 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) previamente reportado (ALMEIDA E SOUSA et al., 2015). Em concentrações abaixo deste ponto de inflexão no meio FaSSIF + GA, os agregados coloidais monodispersos detectados (antes mesmo da adição de fármaco no meio) permaneceram com diâmetro hidrodinâmico relativamente constante à medida que a concentração aumentou (Figura 23D). Contudo, após esse ponto de inflexão, agregados com diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 500 nm foram detectados por DLS, os quais aumentaram gradativamente de tamanho em concentração de fármaco mais altas. A maior intensidade de fluorescência, obtida com o aumento da concentração, indica que os movimentos moleculares da GSF poderiam estar sendo limitados nos agregados formados em FaSSIF + GA. A incorporação de moléculas a agregados coloidais, como os detectados neste trabalho, leva a intensificação de sua luminescência devido a proteção contra processos de autossupressão de fluorescência entre outros, que poderiam ocorrer em solução (POLYAKOV et al., 2006).

As análises de PLM (Figura 24) obtidas em FaSSIF + GA mostraram que os precipitados de diâmetros maiores, formados em concentrações mais altas, não apresentaram birrefringência, sendo predominantemente amorfos. As concentrações de separação de fase entre os dois meios foram similares, a qual limita que uma maior SR seja atingida em tampão. As diferentes taxas de supersaturação alcançadas (SR pH 6,5: 3,4 e SR FaSSIF: 31) mostram que o GA é mais efetivo na inibição de precipitação em meio FaSSIF. A combinação FaSSIF + GA pareceu favorecer a interação do GA com a GSF em solução fazendo com que altas concentrações do fármaco livre fossem atingidas antes que ocorresse uma separação de fases, sem que o fármaco recristalizasse (já que não foram detectados precipitados cristalinos neste meio). Estes dados indicam que o GA pode interferir no processo de nucleação e/ou crescimento dos cristais da GSF em meio biorrelevante

A precipitação simboliza a formação de uma nova fase após atingir uma concentração de fármaco livre crítica em uma solução supersaturada. Porém, enquanto a formação de precipitados cristalinos é considerada uma consequência negativa durante a dissolução de

sistemas supersaturados de liberação, a formação de uma fase coloidal ou precipitados amorfos pode favorecer a redissolução do fármaco nos fluidos gastrointestinais. Alguns estudos demonstraram que essa fase amorfa rica em moléculas do fármaco se comporta como um reservatório, repondo a concentração de fármaco livre que poderia reduzir à medida que este permeia através das membranas biológicas. Assim, uma alta concentração de fármaco livre é mantida por um tempo maior durante a dissolução de sistemas supersaturados de liberação de fármacos (INDULKAR et al., 2016; RAINA et al., 2014; WILSON et al., 2018).

### 5.3.4 Investigação da solução coloidal de ácido glicirrízico

As diferenças entre os sistemas de GA formados em tampão pH 6,5 e FaSSIF foram investigadas visto que estas impactaram na solubilização do fármaco, inibição de precipitação e fenômeno de separação de fases de soluções supersaturadas de GSF. Medidas de condutividade (Figura 25A) mostraram um ponto de inflexão na concentração de  $0,00164 \text{ mmol L}^{-1}$  de GA em tampão pH 6,5, o qual corresponde a CAC do GA, similar a resultados reportados na literatura em água (WANG et al., 2016). Em FaSSIF + GA, a CAC do carreador foi detectada em  $0,00497 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 25B).

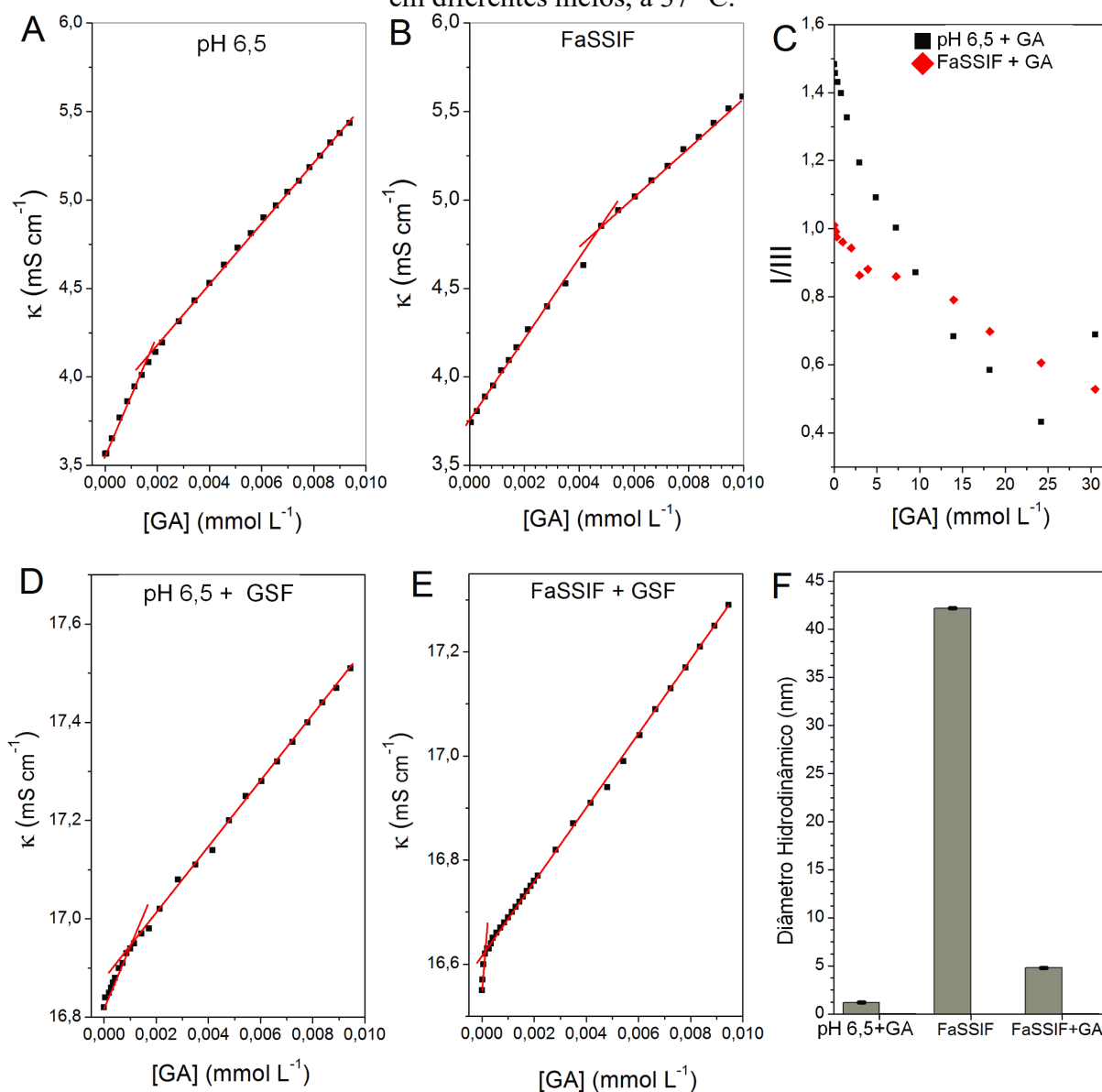
A presença da GSF no meio provocou uma redução nas concentrações de agregação críticas de GA para  $0,00101$  (Figura 25D) e  $0,00014 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 25E) em tampão pH 6,5 e FaSSIF, respectivamente. A literatura tem reportado que a presença de fármacos hidrofóbicos em água pode induzir a agregação pré-micelar de surfactantes, alterando seus valores de CAC (CHAUHAN; SINGH; SUNDARESAN, 2018; COSTA et al., 2019; PELLOSI et al., 2013).

Os dados de viscosidade de todas as soluções mostraram que estas comportam-se como fluídos newtonianos, não apresentando variação conforme a taxa de cisalhamento aplicada ou o tempo. Em tampão pH 6,5, foram obtidos valores de viscosidade de  $0,86 \pm 0,03$  e  $0,87 \pm 0,01 \text{ cP}$  na ausência e na presença de  $30 \text{ mM}$  de GA, respectivamente. Resultados similares foram obtidos em FaSSIF ( $0,86 \pm 0,03 \text{ cP}$ ) e FaSSIF + GA  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $0,88 \pm 0,00 \text{ cP}$ ), os quais indicam que o GA não afetou a viscosidade desses meios na concentração utilizada.

Medidas de espalhamento de luz dinâmico foram empregadas para estimar o tamanho dos agregados coloidais de GA nos diferentes meios. A solução de GA em tampão pH 6,5 mostrou a presença de agregados monodispersos com diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente  $1 \text{ nm}$  (Figura 25F). Agregados de GA com tamanho de partículas entre  $1,5\text{-}21 \text{ nm}$  foram relatados na literatura, com diferentes formas e tamanhos de acordo com

variações de solvente e de pH meio. O GA pode formar gel ou agregados micelares dependendo da ionização de seus três grupos de ácido carboxílico. Presume-se que a agregação/formação de micelas seja decorrente de interações intermoleculares hidrofóbicas dos fragmentos de triterpeno das moléculas de GA, ao invés de a partir de ligações de hidrogênio entre seus fragmentos glucurônicos (MATSUOKA et al., 2016; METELEVA et al., 2019; PETROVA et al., 2017).

Figura 25. Valores de condutividade de soluções A) tampão pH 6,5, B) FaSSIF, D) tampão pH 6,5 + GSF e E) FaSSIF + GSF na presença de diferentes concentrações de GA. C) Razão entre a intensidade de emissão de fluorescência dos picos I/III da sonda pireno em função da concentração do GA, e F) diâmetro hidrodinâmico dos sistemas coloidais de GA em diferentes meios, a 37 °C.



Fonte: Elaborado pela autora.



Em FaSSIF, os sais biliares taurocolato e lecitina levam à formação de agregados coloidais mistos (Figura 25F), com diâmetros de aproximadamente 42 nm. Porém, a presença de GA 30 mmol L<sup>-1</sup> em FaSSIF proporcionou uma redução expressiva no diâmetro hidrodinâmico dessas micelas monodispersas para valores em torno de 4 nm. Este resultado indica fortemente a formação de agregados coloidais mistos envolvendo os sais biliares e o GA, sendo estes resultados consistentes com as diferenças nas concentrações de agregação crítica obtidas nos ensaios de condutividade.

As razões entre a intensidade de emissão de fluorescência dos picos I e III da sonda pireno em tampão pH 6,5 + GA estão apresentadas na Figura 25C. Os resultados mostram valores iniciais em torno de 1,5, os quais reduziram para aproximadamente 0,4 na concentração de 25 mmol L<sup>-1</sup> de GA, e atingiram o valor de aproximadamente 0,8 na concentração de 30 mmol L<sup>-1</sup> de GA. As variações detectadas indicam que a agregação do GA leva a geração de microambientes hidrofóbicos para os quais as moléculas de pireno são particionadas (WU et al., 2018). Por outro lado, em meio FaSSIF, a razão de intensidade entre os picos I e III do pireno inicial detectada foi em torno de 1,0, e esta diminuiu continuamente com o aumento da concentração de GA, atingindo o valor de 0,5 na concentração de GA de 30 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 25D). É fato que o meio FaSSIF constitui um microambiente mais apolar que o tampão pH 6,5 em função da presença de sais biliares, justificando sua capacidade de solubilizar fármacos hidrofóbicos. Porém, os valores de razão de intensidade de fluorescência dos picos I/III do pireno mostraram uma redução substancial na polaridade do microambiente em meio FaSSIF + GA 30 mM, obtendo valores similares aos detectados para o solvente orgânico ciclohexano (0,7) (NDOU; VON WANDRUSZKA, 1990). Apesar de estar em um meio aquoso, as moléculas da sonda pireno detectam um microambiente altamente hidrofóbico sem adição de solvente orgânico, provavelmente devido a formação de agregados coloidais mistos de GA e meio biorrelevante, os quais estão situados ao redor das moléculas de pireno.

Essas mudanças significativas nas espécies coloidais formadas em FaSSIF + GA levaram a uma capacidade melhorada de inibição da precipitação em soluções supersaturadas de GSF. Vários mecanismos de inibição de precipitação podem estar envolvidos nos efeitos do GA + FaSSIF, como: mudanças nas propriedades da solução *bulk*, na camada de adsorção fármaco-solução, na capacidade de solvatação do fármaco, bem como na redução da taxa de difusão do fármaco para os núcleos dos aglomerados (PRICE et al., 2018; WARREN et al., 2010). Os agregados coloidais mistos formados parecem ser importantes para evitar a

recristalização do GSF, beneficiando a formação de agregados amorfos nessas soluções supersaturadas, que pode ter impacto direto na biodisponibilidade oral do fármaco.

#### 5.4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram a capacidade do GA de atuar como um inibidor de precipitação eficaz em soluções supersaturadas de GSF em tampão pH 6,5 e FaSSIF. A combinação FaSSIF + GA levou a formação de um sistema coloidal misto que exibiu menor diâmetro hidrodinâmico que o meio FaSSIF e apresentou polaridade de microambiente semelhante a solventes orgânicos em meio aquoso. Essa fase coloidal aumenta a capacidade do sistema de resistir à recristalização do fármaco em soluções supersaturadas. Apesar da alta tendência de recristalização da GSF em uma solução supersaturada, não foi detectada recristalização do fármaco em meio FaSSIF + GA.

Esses achados colocam o GA como uma alternativa promissora de molécula não polimérica para estabilizar a condição de supersaturação em SDDS. Além disso, foi demonstrada a importância da aplicação de meio biorrelevante em estudos de precipitação para melhor estimar o comportamento *in vivo*, considerando que os resultados obtidos em meio biorrelevante foram notavelmente diferentes daqueles obtidos em tampão pH 6,5.

## 6 CAPÍTULO V: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS DO FÁRMACO GRISEOFULVINA COM ÁCIDO GLICIRRÍZICO

### 6.1 INTRODUÇÃO

Fármacos com baixa solubilidade aquosa geralmente apresentam duas principais características limitantes para o seu processo de dissolução: a) possuem uma rede cristalina formada por interações intermoleculares fortes dificultando a dissociação da sua forma sólida (fármacos com elevado valor de temperatura de fusão) e b) fármacos com valor de coeficiente de partição ( $\log P$ ) que possuem afinidade reduzida com solventes aquosos. Quando os compostos exibem um elevado valor de  $\log P$  e alto ponto de fusão, estes possuem sua solubilidade limitada tanto por suas propriedades do estado sólido quanto pelo seu poder de solvatação (BOYD et al., 2019). Diversas outras características podem também influenciar na dissolução de sólidos farmacêuticos, tais como o pH do meio, hidrodinâmica dos fluidos, solubilidade do fármaco na camada de difusão, tamanho das partículas do sólido, área superficial exposta ao solvente, coeficiente de difusão do fármaco, o qual depende do tamanho das moléculas, espessura da camada de difusão, da viscosidade, entre outros (FLORENCE; ATTWOOD, 2006). Estes aspectos tornam a melhoria das propriedades de dissolução de fármacos com baixa solubilidade aquosa uma etapa complexa durante o desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

O desenvolvimento de dispersões sólidas amorfas, contendo um fármaco e um carreador hidrofílicos, pode contornar tanto a limitação do estado sólido quanto de solvatação de fármacos com baixa solubilidade aquosa. No entanto, o desenvolvimento de dispersões sólidas bem sucedidas depende da seleção adequada de carreador que possa promover uma melhoria na dissolução do fármaco e atuar como um inibidor de precipitação/recristalização para estabilizar tanto no estado sólido quanto em solução (BOYD et al., 2019). Estudos recentes tem mostrado que carreadores de intermediária ou elevada hidrofobicidade tem demonstrado uma maior efetividade que carreadores mais hidrofílicos na inibição de precipitação de fármacos de baixa solubilidade aquosa. Porém, o uso de carreadores mais hidrofóbicos pode levar uma redução na capacidade de solvatação da formulação, dificultando a dispersão do polímero/carreador em água e alterando a capacidade de intumescimento do carreador, a qual pode postergar ou até mesmo neutralizar a dissolução de fármacos (FRANK; MATZGER, 2019; KNOPP et al., 2016; PINTO et al., 2018; SARABU et al., 2020).

Estudos recentes investigando os mecanismos de dissolução de dispersões sólidas têm reportado que durante a dissolução de sistemas contendo uma alta dose de fármaco hidrofóbico pode ocorrer uma liberação incongruente entre o fármaco e o carreador. Nestes casos, o contato com o meio aquoso poderia levar a uma separação de fases, ou uma taxa de dissolução inicial do carreador mais elevada, em comparação ao fármaco. Estas situações podem induzir a um acúmulo do fármaco na superfície do comprimido a ser dissolvido e, até mesmo, reduzir velocidade de dissolução do carreador, dependendo da carga de fármaco utilizada na dispersão sólida (SABOO et al., 2019, 2020a, 2020b).

Alguns polímeros e surfactantes, frequentemente utilizados como inibidores de precipitação, podem ainda reduzir/alterar a concentração máxima de fármaco livre que pode ser atingida em soluções supersaturadas (solubilidade do amorfo). Esta alteração pode levar a uma diminuição no fluxo de difusão do fármaco através de membranas, o que pode potencialmente interferir na sua biodisponibilidade do fármaco a partir de formulações contendo esses carreadores (UEDA; HATE; TAYLOR, 2020; UEDA; TAYLOR, 2020, 2021).

Considerando a complexidade do impacto de carreadores na dissolução de dispersões sólidas, esta etapa do trabalho teve como objetivo realizar uma investigação adicional da influência do GA na concentração de LLPS da GSF e no fluxo do fármaco durante um ensaio de difusão a fim garantir que possíveis efeitos desfavoráveis ocasionados pela presença de carreadores hidrofílicos não se sobreporão às vantagens proporcionadas pelo GA nas formulações de GSF. Para tal, foram utilizadas concentrações de carreador similares às que podem ser geradas durante a dissolução de uma dispersão sólida. Por conseguinte, dispersões sólidas contendo o fármaco e o carreador na sua forma neutra e ionizada foram desenvolvidas. Essas formulações foram caracterizadas através de técnicas do estado sólido e avaliadas quanto ao seu potencial em melhorar o perfil de dissolução da GSF e levar a formação de agregados coloidais em solução.

## 6.2 METODOLOGIA

### 6.2.1 Materiais

A GSF foi adquirida da empresa Inner Mongolia Glint Pharmaceutical CO., Ltd. (China). A água ultrapura utilizada nos experimentos foi obtida através de sistema Milli-Q (EUA). Os solventes deuterados utilizados foram DMSO (DMSO-*d*<sub>6</sub>, Sigma Aldrich, EUA) e óxido de deutério/água deuterada (D<sub>2</sub>O) contendo 0,01 % de DSS-DS como padrão interno (Tedia, Brasil). Outros reagentes químicos utilizados foram de grau para CLAE ou de grau

analítico. O meio biorrelevante foi adquirido da empresa Biorelevant.com (Reino Unido). O tampão fosfato de sódio pH 6,5 e o meio biorrelevante simulando o fluido intestinal em jejum (FaSSIF) foram preparados de acordo com as recomendações disponíveis no site Biorelevant.com. O polímero hidropropilmetilcelulose acetato succinato (HPMCAS) de grau HF (alta hidrofobicidade) foi obtido da empresa Shin-Etsu Chemical Co. Ltd. (Japão).

O GA foi adquirido da empresa Galena<sup>®</sup> (Brasil). O ácido glicirrízico ionizado (GAion) foi obtido através da secagem de uma solução aquosa de GA 20 mM pH 6,5, em Mini Spray Dryer Buchi B-290 (Suíça) sob temperatura do ar de entrada de 100 °C, fluxo da solução de aproximadamente 4 mL min<sup>-1</sup>, fluxo de ar 500 L h<sup>-1</sup> e aspiração a 100%.

## 6.2.2 Métodos

### 6.2.2.1 Determinação da solubilidade da griseofulvina

A solubilidade de equilíbrio da griseofulvina foi avaliada através da adição de um excesso do fármaco cristalino em diferentes concentrações de GA em tampão pH 6,5 e FaSSIF. As suspensões foram equilibradas (48 h), sob agitação de 1150 rpm em agitador magnético, utilizando uma célula para manter a temperatura a 37 °C. Em tempos pré-determinados, alíquotas das amostras foram coletadas e centrifugadas a 35 000 rpm por 30 min a 37 °C em centrífuga Cinan OptimaL-100 XP (Beckman Coulter, EUA) equipada com um rotor SW 41Ti. O sobrenadante foi diluído em metanol:água (50:50, v/v). A quantificação foi realizada em cromatógrafo Agilent HP1260, utilizando uma coluna C18 Phenomenex (4,6 mm × 250 mm, 5 µm) e detecção em 290 nm. A fase móvel utilizada foi acetonitrila: água (60:40 v/v). O volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo da fase móvel foi mantido constante em 1,1 mL min<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em triplicata, utilizando os equipamentos disponíveis no *Department of Industrial and Physical Pharmacy da Purdue University* (EUA).

A solubilidade do amorfo foi estimada utilizando uma bomba de infusão de seringa Advance 1200 (EUA) para adicionar continuamente uma solução estoque do fármaco no meio. A solução estoque de GSF em dimetilsulfóxido (50 mg mL<sup>-1</sup>) foi adicionada a um fluxo contínuo de 40 µL min<sup>-1</sup> a 40 mL de meio, mantido a 37 °C, sob agitação constante de 400 rpm. A intensidade da luz espalhada foi medida a cada 10 segundos em espectrômetro UV/Vis SI Photonics (EUA), acoplado a uma sonda de fibra ótica com caminho ótico de 10 mm, monitorando um comprimento de onda no qual o fármaco não absorve (400 nm). As análises foram realizadas em triplicata, no *Department of Industrial and Physical Pharmacy da Purdue University* (EUA). A formação de uma nova fase em solução, como resultado do LLPS, resulta

em um aumento no espalhamento de luz relativo e a concentração onde ocorre essa transição (solubilidade do amorfo) pode ser determinada pela intersecção entre as duas linhas de tendência obtidas, Equação 4.

$$a_1 \cdot x + b_1 = a_2 \cdot x + b_2 \rightarrow a_1 \cdot x - a_2 \cdot x = b_2 - b_1 \rightarrow x = \frac{b_2 - b_1}{a_1 - a_2} \quad (\text{Equação 4})$$

#### 6.2.2.2 Estudo de difusão em célula de fluxo

Os ensaios de difusão para o fármaco cristalino e em soluções supersaturadas foram realizados em triplicata, em célula de fluxo lado a lado (PermeGear, EUA), no *Department of Industrial and Physical Pharmacy* da *Purdue University* (EUA). O equipamento possui um compartimento doador, separado de um compartimento receptor por uma membrana de diálise de celulose Spectra/Por® 1RC de 6 a 8 kD, com área de superfície da membrana disponível para transporte de massa de 7,07 cm<sup>2</sup>. Foram utilizados 34 mL de meio (tampão pH 6,5 ou FaSSIF contendo ou não o carreador GA pré-dissolvido) em cada compartimento, mantidos sob agitação e temperatura de 37 °C constantes durante todo o experimento. Um quantidade de HPMCAS HF equivalente a 100 µg mL<sup>-1</sup> foi pré-dissolvida aos meios a fim de evitar a recristalização do fármaco durante os experimentos. As soluções supersaturadas foram geradas através da adição de uma alíquota de solução estoque (GSF 50 mg mL<sup>-1</sup> em dimetilsulfóxido) equivalente à concentração final de 150 µg mL<sup>-1</sup> foi adicionada ao compartimento doador. Para os ensaios do fármaco cristalino, uma solução saturada de GSF contendo excesso de fármaco (equilibrada previamente por 48-72 h) foi adicionada ao compartimento doador. A concentração de fármaco permeada para o compartimento receptor foi monitorada retirando alíquotas de 100 µL em tempos pré-determinados. As amostras foram diluídas e quantificadas por CLAE, através de metodologia descrita acima no item 6.2.2.1. O fluxo difusivo (*J*), que por definição é a taxa de transferência de massa por unidade de superfície, é dado pela Equação 5 abaixo:

$$J = \frac{dm}{A \cdot dt} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde,  $\frac{dm}{dt}$  é a taxa de transferência de massa e *A* é a área seccional da membrana. Portanto, *J* pode ser obtido ao dividir o valor de uma inclinação da reta (obtido através de um gráfico concentração *versus* tempo) pela área de superfície da membrana.

### 6.2.2.3 Desenvolvimento dos sistemas amorfos

#### 6.2.2.3.1 Método de moagem em moinho de bolas (BM)

A moagem foi realizada em moinho planetário de alta energia PM200 (RETSCH), no laboratório de Biotecnologia da UNIVILLE, utilizando cadinho e 3 bolas de aço inoxidável (massa total  $\cong$  97 g). Amostras de massa total de 2,5 g (GSF:GA 30:70 m/m ou 1:1 molar) foram moídas por 6 h, a 560 rpm, com pausa de 0,5 min e inversão de rotação a cada 30 min. As condições experimentais foram definidas e otimizadas de acordo com testes preliminares.

#### 6.2.2.3.2 Método de *Quench Cooling* (QC)

A amostra GSF QC foi preparada por meio da fusão de 2 g da GSF cristalina em recipiente de alumínio mantido a 220 °C, em mufla Fornitec, no Laboratório de Farmacognosia da UFSC. Após a completa fusão da amostra (1-2 min), o recipiente foi removido da mufla e resfriado rapidamente. Em seguida, a amostra foi armazenada em dessecador contendo sílica em gel, a fim de prevenir a adsorção de umidade, até a sua moagem em grau e pistilo e utilização nas análises.

### 6.2.2.4 Caracterização do estado sólido

#### 6.2.2.4.1 Difração de raios-X de pó (XRPD)

As medidas de XRPD foram obtidas em um difratômetro de raios  $\theta$ - $\theta$  D2 Phaser, (Bruker), com radiação de cobre  $K\alpha$  ( $\lambda = 1,5418$ ), operando com uma corrente de 10 mA, voltagem de 30 kV. O equipamento, disponível no Departamento de Química da UFSC, é equipado com detector de cintilação unidimensional LYNXEYE. Todas as amostras foram obtidas a temperatura ambiente, através de uma varredura angular a  $2\theta$  de 5° a 40°, com intervalo angular de 0,089° a cada 0,5 s.

#### 6.2.2.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises DSC foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu) disponível no LabCQ-UFSC, na faixa de temperatura de 25 a 250 °C. Amostras de aproximadamente 4 mg foram pesadas, seladas em cadinhos de alumínio e aquecidas a uma razão de aquecimento de 5 °C  $\text{min}^{-1}$ , sob um atmosfera dinâmica de nitrogênio de 100 mL  $\text{min}^{-1}$ . O equipamento foi previamente calibrado utilizando índio e zinco como padrões.

Análises de DSC modular (mDSC) foram realizadas em equipamento Q2000 (TA Instruments), do *Department of Industrial and Physical Pharmacy da Purdue University*

(EUA). A faixa de temperatura avaliada foi de 25 a 250 °C, sob uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. Aproximadamente 4 mg de amostra foram pesadas, seladas em cadinho de alumínio e aquecidas a uma razão de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup>, utilizando uma amplitude de modulação de 0.53 °C a cada 40 s para alcançar uma separação razoável de eventos reversíveis e não reversíveis (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2018).

#### 6.2.2.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A avaliação da morfologia e do tamanho das partículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura em microscópio Jeol, modelo JSM6390LV, no LCME-UFSC, sob voltagem de aceleração de 10 kV, em diferentes aumentos. As amostras foram previamente preparadas fixadas com fita adesiva dupla face em *stubs* e recobertas com ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD 500.

#### 6.2.2.4.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Espectros de FTIR na região de 4000–600 cm<sup>-1</sup> foram obtidos usando espectrômetro PerkinElmer FT-IR/NIR Frontier, do LabCQ-UFSC, equipado com acessório de amostragem Universal ATR com uma resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 6.2.2.5 Ensaios de dissolução de superfície normalizada

A dissolução de superfície normalizada de comprimidos das amostras foi realizada utilizando aparato de dissolução intrínseca Woods (aparato do disco rotatório) com cavidade de 8 mm de diâmetro (área superficial de 0,5 cm<sup>2</sup>), acoplado ao aparato II (USP), disponível no LabCQ-UFSC. A metodologia foi adaptada de Saboo e colaboradores (SABOO et al., 2020a). Quantidades de pós (partículas ≤ 250 μm) foram pesadas (100 mg de GSF-GA e GSF-GAion, 30 mg de GSF QC e 70 mg das amostras GA e GAion) e compactados em prensa Asta<sup>®</sup>, aplicando-se uma força de 0,5 tonelada por 60 segundos. Análises de XRPD foram realizadas com as amostras compactadas de GSF para avaliar eventuais conversões dos sólidos amorfos em decorrência da força aplicada. O ensaio de dissolução foi realizado em condição não *sink*, utilizando 25 mL de meio FaSSIF, velocidade de rotação de 100 rpm, a 37 °C, por 4 horas. Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados, com reposição de meio, filtradas em filtro de 8 μm e diluídas imediatamente em metanol: solução aquosa de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50, v/v). O pH do meio foi verificado ao final do experimento.

A quantificação da GSF e do GA foi obtida por CLAE, em cromatógrafo Series 200 (PerkinElmer), da CentralCrom- UFSC, com detecção UV à 254 nm. A fase móvel utilizada foi



acetonitrila: solução aquosa de ácido fosfórico pH 2,5 (36:64, v/v) e a fase estacionária foi coluna C18 (Kinetex® 110A, 5 µm, 250×4,6 mm. Foram utilizados fluxo de 1,3 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25 °C e volume de injeção de 50 µL. As curvas padrão demonstraram boa linearidade ( $R > 0,99$ ) no intervalo de concentração relevante.

Análises de DLS foram realizadas em tempo pré-determinados a fim de confirmar a formação de agregados coloidais em solução durante a dissolução das dispersões sólidas amorfas. A distribuição de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e a taxa de contagem derivada (do inglês, *derived count rate*) foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, RU), da CentralCrom- UFSC. As análises foram realizadas em triplicata, em cubetas de poliestireno, com ângulo de detecção de 173° e a temperatura de 37,0 °C.

#### 6.2.2.6 *Análises de ressonância magnética nuclear em solução*

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) foram obtidas em equipamento Bruker® modelo Fourier 300 (<sup>1</sup>H 300 MHz, <sup>13</sup>C, 75 MHz), no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN), estrutura multiusuária do CCS da UFSC. Para cada amostra, foram adquiridas 1024 varreduras, à temperatura de 37 °C. Os dados adquiridos foram processados em software TopSpin 4.1.1 (Bruker®), e os resultados foram comparados com dados disponíveis na literatura.

As soluções de tampão pH 6,5, tampão pH 6,5 + GA 1800 µg mL<sup>-1</sup>, FaSSIF e FaSSIF + GA 1800 µg mL<sup>-1</sup> foram preparadas em D<sub>2</sub>O contendo DSS-SS como padrão interno ( $\delta = 0,0$  ppm). O ajuste de pH foi realizado com solução de hidróxido de sódio concentrada preparada em D<sub>2</sub>O. A solução estoque de GSF (20 mg mL<sup>-1</sup>) foi preparada em DMSO-*d*<sub>6</sub>. As soluções supersaturadas do fármaco (concentração final de 200 µg mL<sup>-1</sup>) s foram preparadas através da adição de uma alíquota da solução estoque nos diferentes meios minutos antes das análises. Estas foram então agitadas por alguns segundos em vórtex, e homogeneizadas em banho de ultrassom por 2 min.

#### 6.2.2.7 *Análises estatísticas*

ANOVA de uma ou duas vias e testes de comparações múltiplas de Tukey foram aplicados para verificar a significância estatística ( $p < 0,05$  com intervalo de confiança de 95%) das comparações entre as amostras e com seus respectivos controles.

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.3.1 Determinação de solubilidade da griseofulvina

Os dados de solubilidade da GSF cristalina (de equilíbrio) e solubilidade do amorfo na presença concentrações de GA passíveis de serem atingidas durante a dissolução de sistemas amorfos com esse carreador foram avaliados. Os resultados estão representados na Tabela 2. A presença do GA em concentrações entre 1000-3600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  impacta na solubilidade do fármaco cristalino tanto em tampão pH 6,5 (aumentado a solubilidade da GSF) quanto em meio biorrelevante, reduzindo a solubilidade do fármaco na menor concentração. Embora o valor de solubilidade do amorfo da GSF reportado para o tampão fosfato pH 6,8 seja de  $\sim 356 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com SR de 31 vezes, sem a presença de um inibidor de precipitação a GSF recristaliza abaixo da solubilidade do amorfo, atingindo SR de 10 em tampão pH 6,5. Em FaSSIF, uma SR equivalente a 6,9 vezes foi obtida, corroborando com resultados anteriores de que a presença do meio biorrelevante acelera a precipitação do fármaco em soluções supersaturadas.

Tabela 2. Dados de solubilidade da GSF em diferentes meios contendo ou não GA.

Meio	Solubilidade de equilíbrio ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Solubilidade do amorfo ou LLPS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Taxa de supersaturação (SR)
pH 6,5	$11,18 \pm 0,57$	$113,74 \pm 3,78^*$	$10,18 \pm 0,51$
pH 6,5 + GA 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$12,06 \pm 0,50$	$253,46 \pm 1,69$	$21,03 \pm 0,72$
pH 6,5 + GA 1800 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$17,75 \pm 0,84$	$362,08 \pm 2,12$	$20,43 \pm 0,80$
pH 6,5 + GA 3600 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$20,48 \pm 0,14$	$485,42 \pm 9,07$	$23,70 \pm 0,39$
FaSSIF	$21,30 \pm 1,31$	$147,32 \pm 12,42^*$	$6,93 \pm 0,59$
FaSSIF + GA 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$16,73 \pm 0,64$	$182,01 \pm 11,05$	$10,89 \pm 0,64$
FaSSIF + GA 1800 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$18,50 \pm 0,96$	$213,31 \pm 7,77$	$11,55 \pm 0,60$
FaSSIF + GA 3600 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$23,76 \pm 0,67$	$252,84 \pm 23,38$	$10,65 \pm 0,84$

Legenda: \*Sem a presença de inibidores de precipitação a GSF recristaliza abaixo da solubilidade do amorfo nestes meios, mostrando valores subestimados.

Na presença do GA, a solubilidade do amorfo da GSF corresponde a uma SR de aproximadamente 20 vezes, nas três concentrações de GA utilizadas. Por outro lado, em meio biorrelevante a solubilidade do amorfo da GSF corresponde a uma SR de aproximadamente 10 vezes. Esses resultados foram diferentes dos observados nos ensaios utilizando uma maior concentração de GA (item 5.2.2.2), nos quais os valores de solubilidade do amorfo corresponderam a uma SR de 3,4 e 31 vezes, em pH 6,5 e FaSSIF, respectivamente. Estes resultados foram provavelmente impulsionados pelas diferenças das espécies coloidais

formadas nas diferentes concentrações e meios, e pela formação de microambientes muito mais hidrofóbicos com o aumento da concentração de GA.

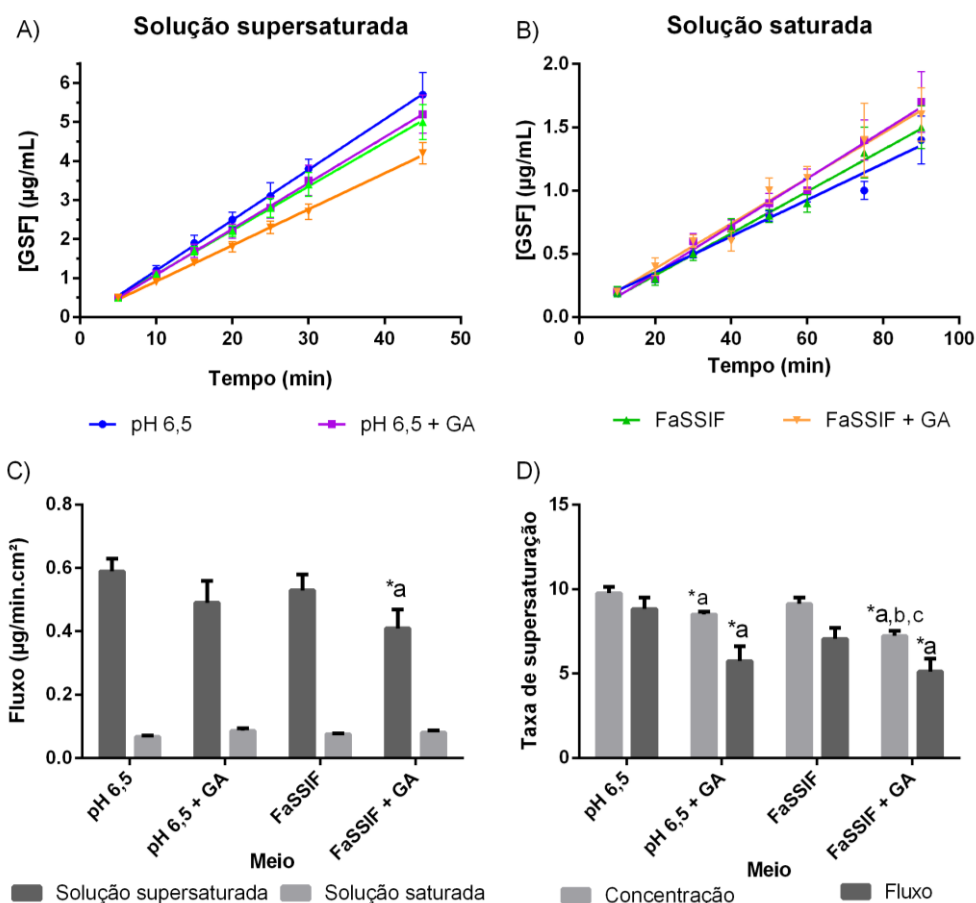
### 6.3.2 Estudo de difusão em célula de fluxo

Estudos de difusão em célula de fluxo foram conduzidos a fim de verificar se a presença do GA em solução poderia influenciar na concentração de fármaco permeada através de uma membrana semipermeável. A correlação entre a diminuição da concentração máxima de fármaco livre miscível em uma solução supersaturada, solubilidade do amorfo, e a redução do fluxo difusivo através das membranas biológicas nem sempre existe, sendo muitas vezes não observada em meios mais complexos (ELKHABAZ et al., 2019). Os resultados presentes na Figura 26C mostram que não houve alteração significativa na permeabilidade aparente do fármaco (J) das soluções saturadas (fármaco cristalino) contendo ou não o carreador, tanto em tampão pH 6,5 quanto em FaSSIF. Diferenças no fluxo difusivo da GSF também não foram observadas em tampão e meio FaSSIF quando concentrações abaixo da solubilidade de saturação foram utilizadas num estudo prévio (FISCHER et al., 2012). Os fluidos intestinais contêm micelas e outras espécies coloidais que possibilitam a associação de moléculas do fármaco com os surfactantes do meio ou a incorporação do fármaco a essas micelas. Assim, ocorre um equilíbrio dinâmico entre as duas populações de moléculas de fármacos, aquelas associadas às micelas e as moléculas de fármaco livre em solução. Portanto, quando a solubilidade de equilíbrio de moléculas pequenas é aumentada, isso nem sempre representa um aumento na concentração de fármaco livre não ionizada em solução, as quais são capazes de ser particionadas e transportadas através das membranas por difusão passiva (DAHAN et al., 2016; ELKHABAZ et al., 2019; FRANK et al., 2012).

Em soluções supersaturadas (Figura 26C), a presença dos sais biliares não alterou o fluxo difusivo da GSF, embora estudos prévios com outros fármacos já tenham reportado tanto a diminuição quanto a não influência do meio biorrelevante nos estudos de transporte através de membranas (ELKHABAZ et al., 2019; FRANK et al., 2012; LI et al., 2018a). Quando adicionado ao tampão pH 6,5, o GA não impactou no valor de permeabilidade aparente do fármaco na solução supersaturada, embora uma redução na SR tenha sido detectada (Figura 26D). Em meio FaSSIF, adição do GA não alterou significativamente o fluxo difusivo do fármaco quando comparada ao meio puro ou ao GA em pH 6,5 (Figura 26C). Porém, quando a comparação é feita com os valores de fluxo obtidos em tampão pH 6,5 houve uma redução de aproximadamente 20%, bem como uma redução na SR, tanto levando em consideração o fluxo

quanto as concentrações de saturação e supersaturação (Figura 26C e D). Essa diferença pode ser devido ao somatório das interferências do GA e FASSIF isolados, os quais não induziram a diferenças estatisticamente significativas nos valores de permeabilidade da GSF, mas mostraram uma leve tendência à redução desses valores. Embora uma diminuição na SR considerando a concentração nem sempre tenha significado uma redução nos valores de permeabilidade aparente (J) do fármaco no meio, esta é indicativa do efeito proporcionado pela adição do GA em soluções supersaturadas de GSF. Considerando que a diminuição dos valores de solubilidade do amorfo de GSF reduziram também as taxas de SR entre as soluções supersaturadas e saturadas de GSF, a presença do GA nestas pode impactar numa redução do fluxo de fármaco livre através das membranas biológicas.

Figura 26. Perfis da concentração de GSF permeada no compartimento acceptor vs. tempo a partir de uma solução supersaturada  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  (A) e uma solução saturada (B) em tampão pH 6,5 e FaSSIF, na presença ou ausência de  $1800 \mu\text{g mL}^{-1}$  de GA. Fluxo difusivo (C) e taxa de supersaturação (D) nas diferentes soluções.



Legenda: Os valores de taxa de supersaturação (D) foram calculados considerando as concentrações de solubilidade do amorfo e cristalino obtidos (Concentração) e os valores de fluxo das soluções saturadas e não saturadas obtidas (fluxo). \*Estatisticamente diferente ( $p < 0.05$ ) vs. <sup>a</sup>pH 6,5, <sup>b</sup>FaSSIF e <sup>c</sup>pH 6,5 + GA.

Fonte: Elaborado pela autora.

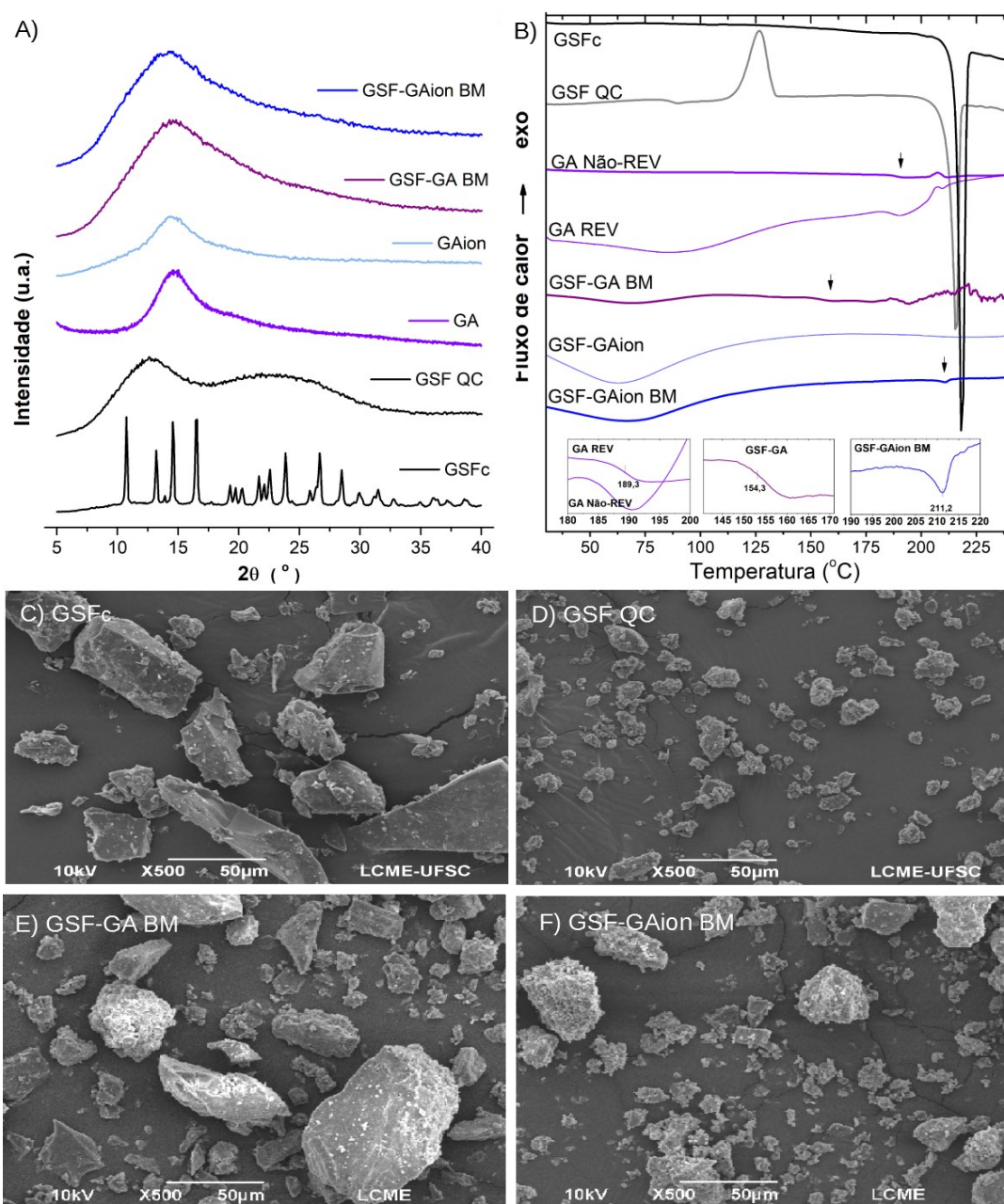
Um aumento na concentração de fármaco em soluções supersaturadas representa uma elevação na quantidade de fármaco livre em relação a sua solubilidade de equilíbrio. Porém tanto polímeros quanto surfactantes, bem como a presença de alguns sais biliares podem interferir no fluxo difusivo de fármacos através de membranas a partir de soluções supersaturadas (DAHAN et al., 2016; ELKHABAZ et al., 2019; UEDA; HATE; TAYLOR, 2020). Um estudo prévio demonstrou que o polímero HPMC-AS pode afetar a solubilidade amorfa de fármacos, o tamanho da fase coloidal formada após LLPS e a permeabilidade aparente do atazanavir, clozapina, nifedipina e cetoconazol. A hidrofobicidade do polímero impactou na extensão da diminuição da solubilidade do amorfo devido a sua distribuição na fase coloidal rica no fármaco. Embora a presença de uma quantidade maior de carreador na fase rica em fármaco forneça uma vantagem em termos de inibição da recristalização nesta fase, a depleção da solubilidade amorfa é desvantajosa do ponto de vista da sua permeabilidade aparente. Assim, a seleção do inibidor de precipitação deve ser baseada na tendência deste em se distribuir na fase rica em fármaco, mas considerando também a concentração de carreador que será alcançada após a dissolução da formulação, visto que ambos os fatores impactarão na extensão em que a solubilidade do amorfo é reduzida. O estudo ressalta que dependendo da janela de absorção do fármaco gerada pela manutenção de uma solução supersaturada, através do uso de um inibidor de precipitação que distribui-se na fase coloidal rica em fármaco, a vantagem da presença desse carreador pode superar sua redução no fluxo difusivo do fármaco (UEDA; HATE; TAYLOR, 2020). Embora a permeabilidade aparente do fármaco possa ser maior em uma solução supersaturada deste isolado, comparada com uma na presença do carreador, a presença do carreador pode ser vantajosa e justificada quando a dissolução de uma formulação do fármaco amorfo isolado não for capaz de formar uma solução supersaturada com concentração equivalente.

### **6.3.3 Caracterização das formulações desenvolvidas**

A caracterização das amostras por XRPD (Figura 27A) mostra a presença de um halo amorfo característicos para a GSF QC, o GA, o GAion e para as dispersões sólidas GSF-GA BM e GSF-GAion BM. As curvas DSC das amostras ((Figura 27B) da GSFc, GSF QC mostram seus os eventos característicos para forma cristalina e amorfa do fármaco (FRANÇA et al., 2020a; SU et al., 2018). A ausência de endoterma de fusão e presença de evento de  $T_g$  em 189,3 °C confirmam que o GA se encontra na forma amorfa. Oscilações no perfil térmico acima de 204 °C indicam a degradação térmica do GA em ácido glicirretínico (aglicona) (SUI et al.,

2012). Devido à alta  $T_g$  do carreador a dispersão sólida amorfa GSF-GA BM apresenta o evento de  $T_g$  em 154,3 °C, temperatura superior ao fármaco amorfo isolado, sem a presença de evento de fusão, confirmando a amorfização da amostra. Eventos de possível degradação da amostra GSF-GA foram detectados em temperaturas acima de 190 °C, indicando que a formulação com GSF reduz a temperatura de degradação do GA.

Figura 27. Difratogramas (A), Curvas DSC (B) e Imagens de SEM (C, D, E e F) da griseofulvina cristalina (GSFc), griseofulvina amora (GSF-QC), ácido glicirrízico (GA), ácido glicirrízico ionizado (GAion) e das formulações GSF-GA e GSF-GAion obtidas por moagem em moinho de bolas.



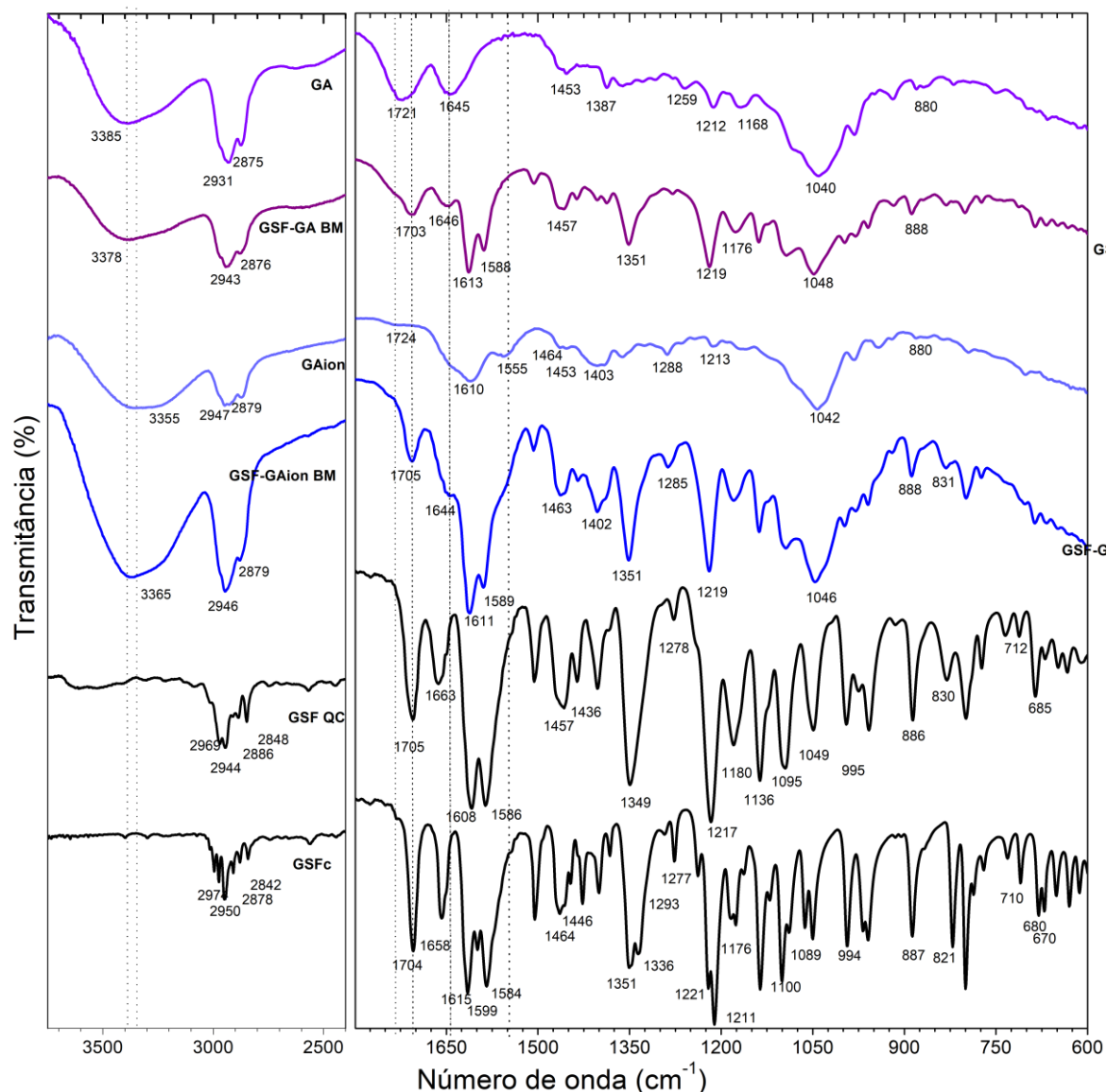
Fonte: Elaborado pela autora.

A caracterização do GAion não apresenta endoterma de fusão, corroborando com os dados de XRPD que o carreador está na forma amorfa, embora não tenha sido possível determinar o evento de  $T_g$  dessa amostra. Por outro lado, a amostra GSF-GAion BM apresenta um evento endotérmico em 211,2 °C, possivelmente, devido a presença de um resíduo cristalino de fármaco, não detectados por XRPD, ou devido a degradação térmica do GA facilitada pela presença do fármaco na formulação, similar ao observado em estudo prévio (SUI et al., 2012). Presume-se um elevado valor de  $T_g$  também para a amostra GSF-GAion BM, assim como obtido para a GSF-GSA BM, uma vez que não foram obtidos alterações nos difratogramas de ambas as amostras após armazenamento em dessecador a temperatura ambiente por 86 e 136 semanas, respectivamente (dados não mostrados). As imagens de SEM (Figura 27C-F) revelam partículas de tamanhos variados e formas irregulares em todas as amostras.

As análises de FTIR (Figura 28) da GSF e GSF QC revelam as bandas características do fármaco cristalino e amorfo de acordo com a literatura (FRANÇA et al., 2020a; MAH et al., 2017; TOWNLEY; EDWARD R. TOWNLEY, 1979). O GA apresenta suas principais bandas em 3385  $\text{cm}^{-1}$  (vO-H), 2943, 2875  $\text{cm}^{-1}$  (vC-H), 1721 e 1645  $\text{cm}^{-1}$  (vC=O), 1453  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>), 1387  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub>), 1212  $\text{cm}^{-1}$  (C-O acetato), 1040  $\text{cm}^{-1}$  (C-O álcool cíclico secundário)(WU et al., 2017). O espectro do GAion apresenta o deslocamento das bandas características de O-H e C=O para menores número de onda, indicando a formação de ânions carboxilatos (BARBOSA, 2007). No entanto, uma pequena banda correspondente ao grupo C=O ainda pode ser visualizada em 1724  $\text{cm}^{-1}$ , uma vez que a ionização do GA foi parcial.

Os espectros FTIR das dispersões sólidas GSF-GA BM e GSF-GAion BM mostram deslocamento nas bandas correspondentes aos grupamentos O-H do GA, bem como deslocamentos e sobreposição das bandas C=O do fármaco e do GA, indicando a formação de interação intermolecular de hidrogênio entre moléculas do fármaco e do carreador. Estes resultados corroboram com estudos recentes da literatura que têm demonstrado a capacidade do GA e o seu sal dissódico (Na<sub>2</sub>GA) em interagir com fármacos hidrofóbicos em formulações em dispersões sólidas (KONG et al., 2017; LU et al., 2019; WU et al., 2017).

Figura 28. Espectro de FTIR da griseofulvina cristalina (GSFc), amorfa (GSF QC), ácido glicirrízico (GA), ácido glicirrízico ionizado (GAion) e as dispersões sólidas GSF-GA BM e GSF-GAion BM obtidas por moagem em moinho de bolas.



Fonte: Elaborado pela autora.

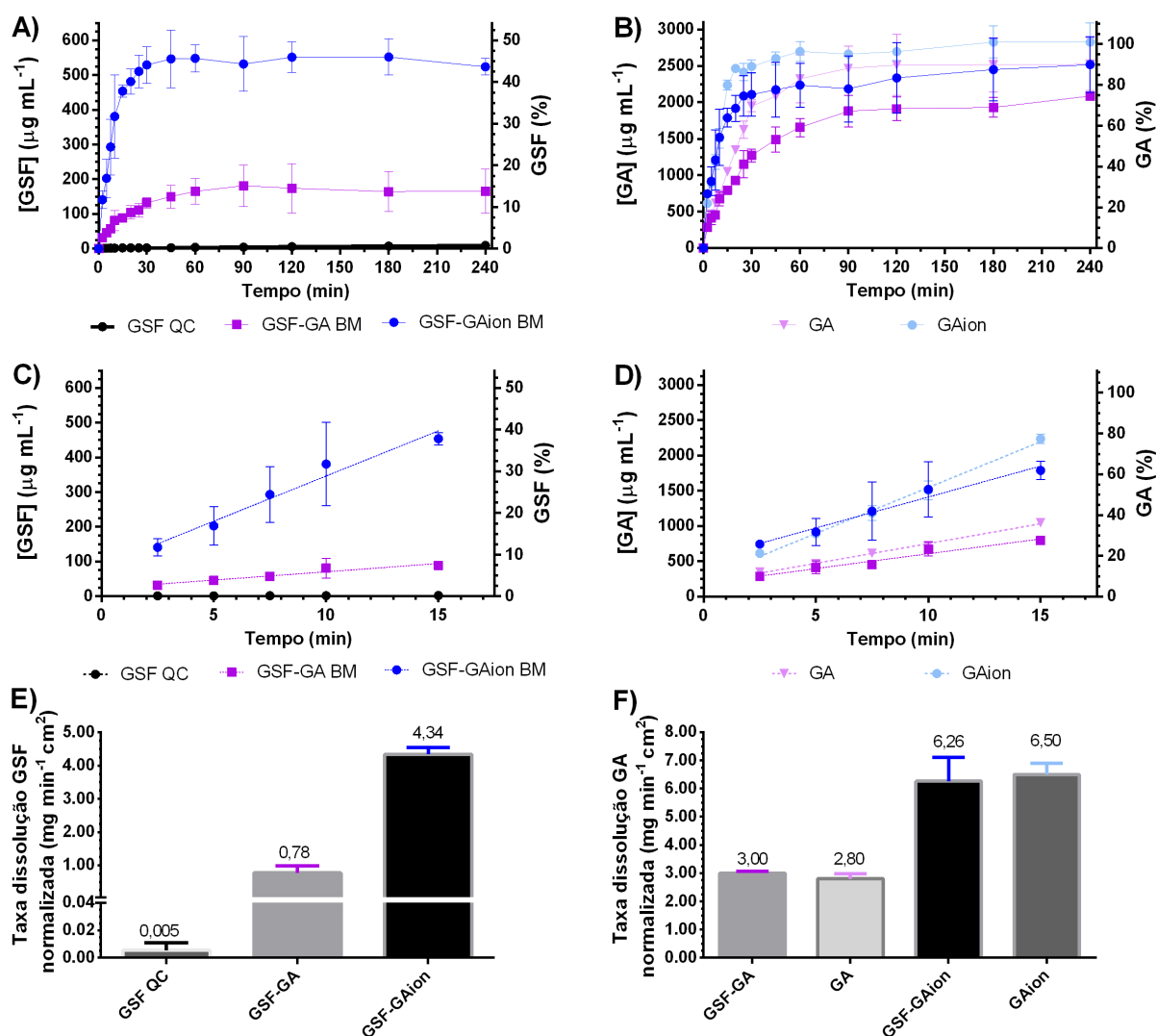
### 6.3.4 Ensaios de dissolução de superfície normalizada

Os perfis de liberação da GSF e GA nas diferentes formulações estão representados na Figura 29. Como esperado, a baixa solubilidade aquosa da GSF acarretou uma baixa taxa de dissolução do fármaco, proporcionando a uma liberação de apenas 1% da dose após 4 horas. Estes dados confirmam os estudos já descritos na literatura, os quais afirmam que a simples amorfização de fármacos hidrofóbicos nem sempre é suficiente para promover uma melhoria na sua dissolução que possa impactar no aumento da biodisponibilidade, principalmente quando são utilizadas altas doses desses fármacos (SABOO et al., 2019, 2020b). Análises de



XRPD da amostra de GSF QC pós compressão mostram que a fase força aplicada para comprimir a pastilha induziu a recristalização parcial da amostra devido à alta propensão de recristalização do fármaco, a qual pode ter contribuído também para a dissolução reduzida da amostra.

Figura 29. Perfis de dissolução concentração vs. tempo de GSF (A: 0-240 min, C: 2,5-15 min) e GA (B: 0-240 min, D: 2,5-15 min) nas diferentes formulações. Taxa de dissolução da GSF (E) e GA (F) nas diferentes formulações considerando o intervalo de dissolução linear de 2,5-15 min ( $R > 0,9$ ).



Fonte: Elaborado pela autora.

Por outro, a presença do GA nas formulações amorfas de GSF melhorou significativamente a dissolução do fármaco. Após 4 horas, foram liberadas concentrações de fármaco equivalentes a 14 e 44% das amostras de GSF-GA BM e GSF-GAion BM, respectivamente.

As taxas de dissolução ( $A$ ,  $\mu\text{g min}^{-1} \text{cm}^2$ ) do fármaco e do carreador nas diferentes formulações foram calculadas para fins comparativos, a partir da Equação 6 descrita por Saboo e colaboradores (SABOO et al., 2020b):

$$A = \frac{k \times V}{S \times N} \quad (\text{Equação 6})$$

onde  $k$  é a inclinação da linha de regressão da concentração vs. Tempo, não incluindo tempo zero,  $V$  é o volume do meio de dissolução (25 mL),  $S$  é a área de superfície do comprimido ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) e  $N$  é a fração de peso do componente na formulação.

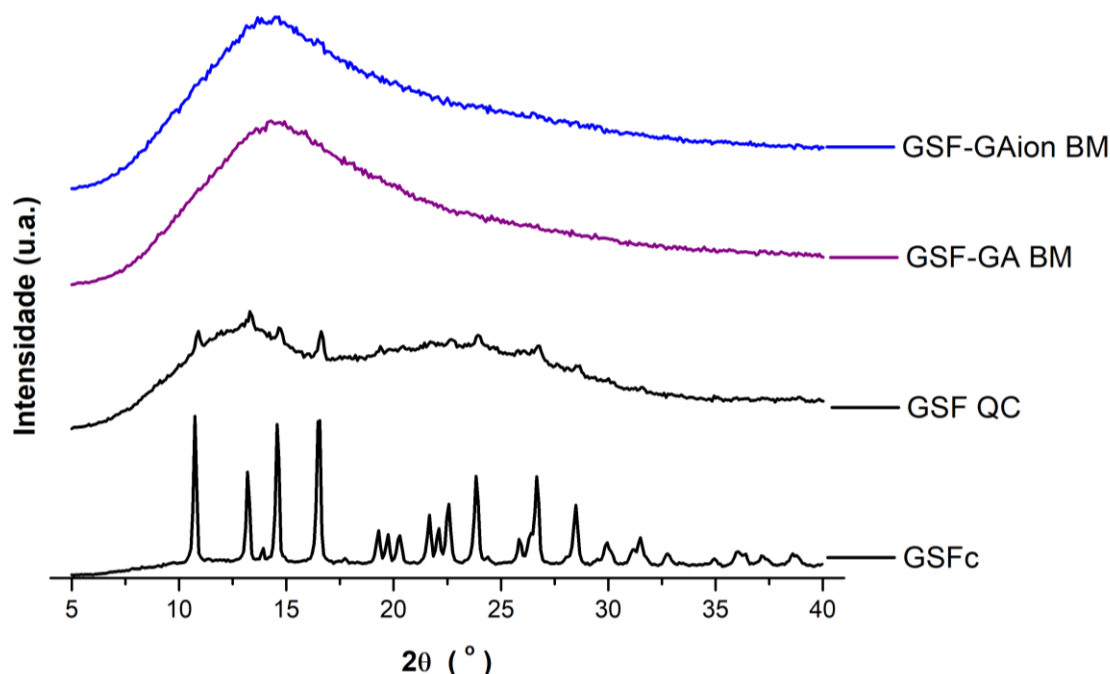
A maior taxa de dissolução do GAion (equivalente a 2 vezes) em comparação ao GA promoveu um aumento mais acentuado na taxa de dissolução do fármaco na amostra GSF-GAion BM em comparação com a amostra GSF-GA BM (Figura 29D e E). Nota-se que o fármaco e o carreador obtiveram velocidades de dissolução distintas nas duas formulações amorfas testadas, não obtendo uma liberação congruente entre os componentes da formulação. As velocidades de dissolução do GA e GAion isolados foram diferentes entre si, porém ambas as formas do carreador não tiveram sua velocidade de dissolução alterada nas dispersões sólidas.

Estudos recentes investigando diferentes proporções fármaco-polímero têm reportado que parece existir uma correlação entre uma liberação congruente entre os componentes das dispersões sólidas amorfas e uma liberação acima da solubilidade do amorfo, contribuindo para a formação de agregados em solução. A redução na taxa de dissolução do carreador a partir das dispersões sólidas incongruentes pode ocorrer através do acúmulo do fármaco hidrofóbico na superfície do comprimido (INDULKAR; LOU; TAYLOR, 2019; QUE et al., 2019; SABOO et al., 2019, 2020a, 2020b). No entanto, mesmo com uma liberação incongruente entre fármaco e carreador, concentrações acima da solubilidade do amorfo da GSF foram atingidas durante a dissolução da GSF-GAion QC.

As análises de pH final dos experimentos de dissolução mostraram que o GA, tanto na amostra GSF-GA BM quanto isolado, provocou uma diminuição no pH da solução de 6,50 para 6,28 e 6,29, respectivamente. Por outro lado, as soluções resultantes da dissolução da amostra GSF-GAion BM e do GAion isolado mostraram um leve aumento no pH para 6,52 e 6,66, respectivamente. Essa redução no pH das soluções contendo o GA indicam que, assim como reportado para outros carreadores ácidos, este pode estar reduzindo o pH da camada de difusão durante a dissolução das amostras. Esse tipo de alteração já foi usada para promover uma

melhoria na dissolução de um fármaco básico, o cetoconazol, por Fung e colaboradores (FUNG; BĚRZIŇŠ; SURYANARAYANAN, 2018a).

Figura 30. Difratogramas das formulações GSF QC, GSF-GA BM e GSF-GAion BM após serem compactadas utilizando uma força de 0,5 tonelada por 60 segundos.



Fonte: Elaborado pela autora.

O fármaco usado em nosso estudo é neutro, e embora a ionização do fármaco não seja alterada com a mudança pH, uma alteração da viscosidade da camada de difusão ao redor dos sólidos não dissolvidos pode ter ocorrido devido a capacidade do GA em formar gel em soluções aquosas de pHs  $\leq 5$  (PETROVA et al., 2017). Em um estudo conduzido por Takano e colaboradores foi investigado o uso de sais inorgânicos em dispersões sólidas contendo HPMC. Este preveniu a formação de gel, levando a uma rápida desintegração do comprimido e melhoria na dissolução do fármaco. Quando expostos ao meio aquoso, os polímeros hidrofílicos tendem a intumescer e formar matrizes de gel, podendo assim alterar a cinética de dissolução de formas farmacêuticas de liberação imediata fazendo com que este processo seja mais lento, similar a um processo de liberação por erosão da matriz, ou até mesmo levar a recristalização do fármaco na matriz hidratada. As modificações na viscosidade do meio proporcionadas pelo carreador, mesmo que no microambiente, são consideradas importantes no efeito de inibição de precipitação. À medida que a viscosidade de uma solução supersaturada aumenta, a mobilidade molecular do fármaco diminui em solução, aumentando a energia necessária para a sua difusão através da solução. Quando a recristalização ocorre na matriz do comprimido, um rápido crescimento dos cristais pode ocorrer a partir do material amorfo remanescente não dissolvido

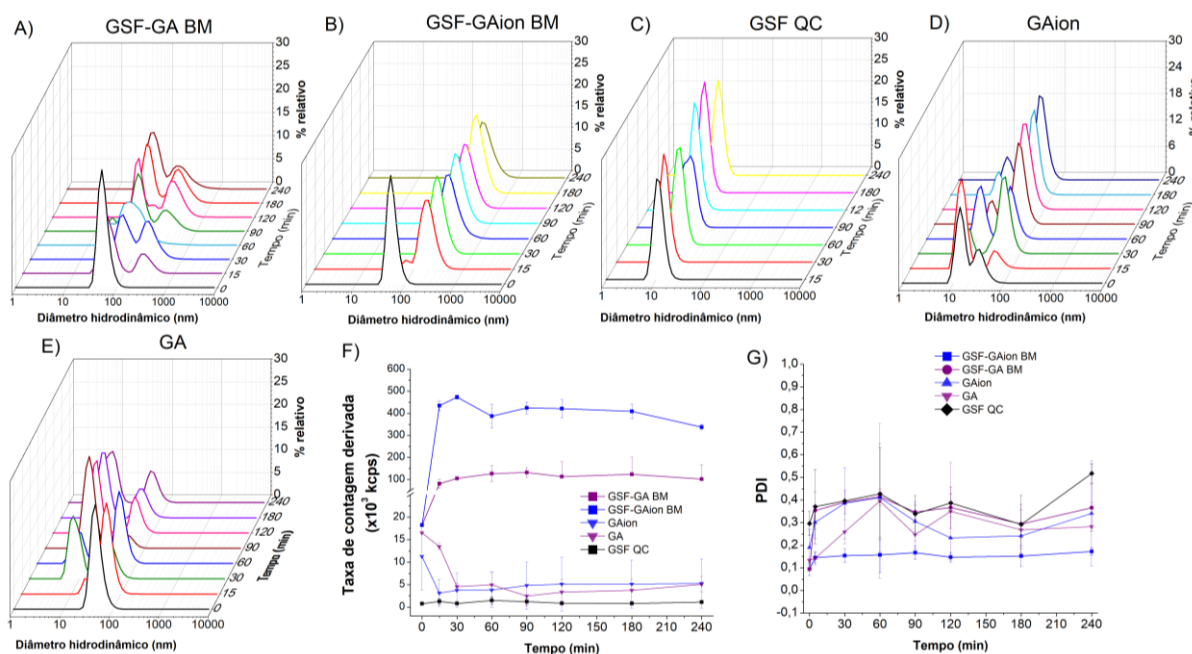
ou através do consumo da supersaturação alcançada durante os estágios iniciais de dissolução (SUN; WEN; TAYLOR, 2016; TAKANO et al., 2020). Dessa forma, a utilização do GA ionizado obteve uma liberação mais rápida comparado ao GA, contribuindo para uma melhoria na dissolução do fármaco e prevenção de recristalização rápida da GSF.

Análises de DLS (Figura 31) foram realizadas a fim de confirmar a formação de agregados coloidais durante a dissolução. Durante a dissolução da GSF-Gaion BM em FaSSIF, foram detectados agregados coloidais do fármaco com diâmetro hidrodinâmico em torno de 200 nm. Estes permanecem com tamanho relativamente estável durante o intervalo de tempo analisado, e mostraram um baixo índice de polidispersão (Figura 31G). Um estudo prévio relatou um efeito positivo na estabilização de nanoemulsões de GSF através do uso de lecitina de soja e o sal glicirrizinato dipotássico, possibilitando que partículas com baixo índice de polidispersão fossem obtidas (TROTTA et al., 2003). Partículas com tamanho semelhante às detectadas para a GSF-GAion BM também foram observadas durante a dissolução da GSF-GA BM, porém com um alto índice de polidispersão (Figura 31G) e uma menor taxa de contagem derivada (Figura 31F), indicando uma maior instabilidade dessas partículas em solução. A taxa de contagem derivada exibe o número de fótons detectados por segundo. Este parâmetro serve como um indicativo da qualidade e da concentração da amostra, enquanto um aumento na taxa de contagem derivada pode indicar a formação de agregados, a sua diminuição pode indicar a sedimentação da amostra (OHUE; OHTAKE, 2013). Cabe lembrar que as amostras foram filtradas em membrana com tamanho de poro de 8  $\mu\text{m}$ , para separar os agregados em solução de precipitados com tamanhos partícula maiores.

As análises de DLS mostraram que o meio FaSSIF puro apresenta micelas com raio hidrodinâmico variável, com distribuição de tamanho bimodal em torno de 55 e 10, nas diferentes amostras (Figura 31). Micelas com diferentes tamanho foram reportadas na literatura para o meio FaSSIF (4.6 nm (PINTO et al., 2020), 7nm (XIE et al., 2014), 42 nm (FRANÇA et al., 2020b), 49 nm (INDULKAR et al., 2018), 70 nm (WIEST et al., 2018), 90 nm (LEHTO et al., 2011)). Diferenças no tamanho das hidrodinâmico e carga superficial das partículas têm sido associadas às diferentes espécies coloidais presentes no meio (micelas puras de taurocolato de sódio (TC) e micelas mistas de TC e lecitina (L)) e à instabilidade desses coloides em solução (WIEST et al., 2018; XIE et al., 2014). A dissolução tanto do GA quanto do GAion provocou alteração no tamanho das micelas do meio FaSSIF. A redução no raio hidrodinâmico das micelas na presença do carreador isolado confirmam que os agregados formados durante a dissolução das dispersões sólidas ( $\cong 200$  nm) são decorrentes da agregação

coloidal/precipitação do fármaco. A dissolução da GSF QC não interferiu no tamanho das micelas do meio.

Figura 31. Análises DLS durante a dissolução de superfície normalizada das formulações amorfas e seus controles.



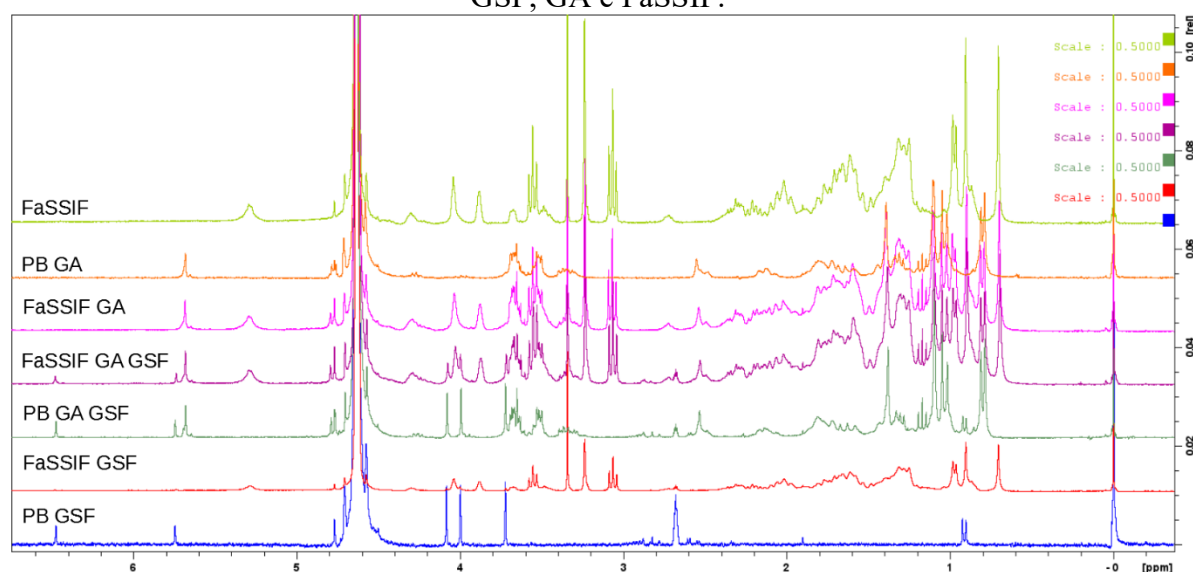
### 6.3.5 Análises de ressonância magnética nuclear em solução

Análises de RMN em solução foram conduzidas a fim de investigar possíveis interações intermoleculares do GA e da GSF com meio biorrelevante na estabilização de soluções supersaturadas do fármaco. Para fins comparativos os espectros das soluções de GSF e GA isolados ou em combinação foram obtidos tanto em tampão pH 6,5 sem a adição do meio biorrelevante quanto no FaSSIF. Os sinais nos espectros de RMN 1H (Figura 32) para a GSF, GA, taurocolato de sódio (TC) e lecitina (L) foram atribuídos aos seus respectivos hidrogênios (Tabela A 1, na seção APÊNDICE), seguindo a representação numérica dos grupamentos da Figura 33.

Os resultados obtidos neste trabalho (Tabela A 2) mostram que quando a GSF foi adicionada ao meio biorrelevante (FaSSIF), foram detectadas modificações nos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de sinais correspondentes ao fármaco (GSF6, GSF11) e ao meio biorrelevante (TC3), comparados com os espectros do fármaco em tampão pH 6,5 e com o meio FaSSIF sem a adição do mesmo. Detalhes são apresentados na Figura A 3 e na Figura A 4. Em análises de RMN, quando um campo magnético é aplicado sobre a nuvem eletrônica dos elementos químicos, esta se movimenta constantemente. Essa força aplicada induz a movimentação desses

elétrons no sentido do campo magnético, gerando um pequeno campo magnético que blindava seus núcleos. Essa blindagem eletrônica é alterada de acordo com o ambiente químico ao qual o elemento está submetido (como por exemplo, se o composto está solvatado ou não), podendo ocorrer em maior ou menor intensidade e influenciar o deslocamento químico obtido (LIMA, 2013). Assim, essas alterações nos deslocamentos químicos detectadas para a GSF podem ser decorrentes tanto da incorporação/adsorção do fármaco nas micelas do meio biorrelevante, quanto o meio poderia estar simplesmente modificando o ambiente químico e/ou capacidade de solvatação da GSF.

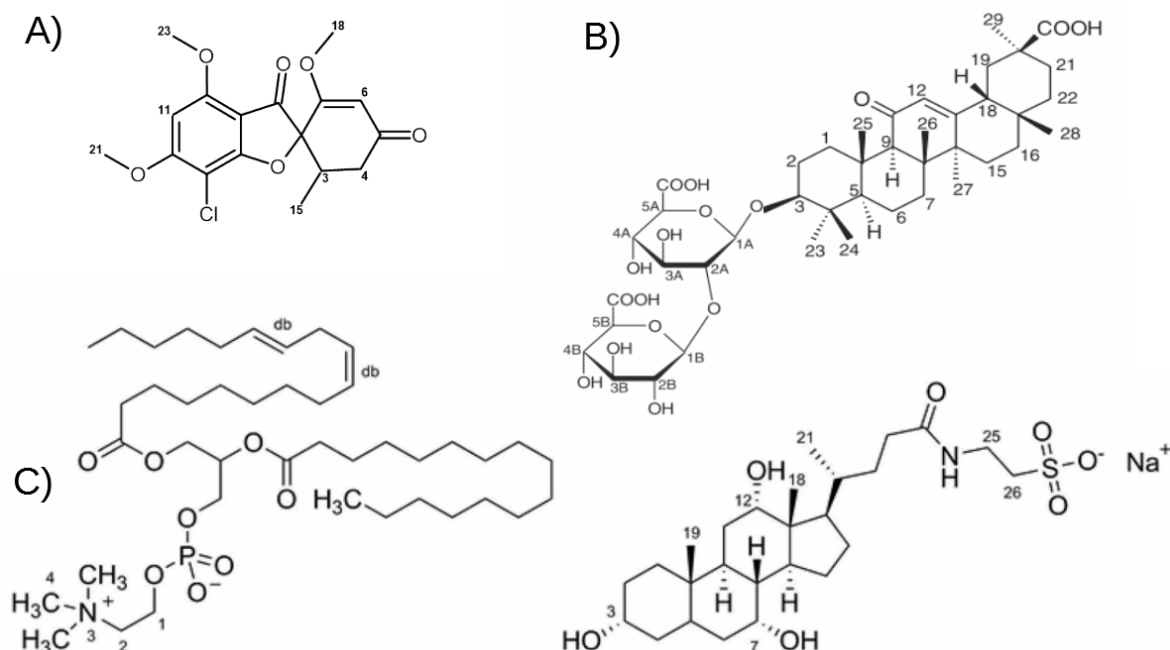
Figura 32. Espectro de  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da região correspondente aos sinais de GSF, GA e FaSSIF.



Fonte: Elaborado pela autora.

A adição de GSF a uma solução pH 6,5 contendo GA acarretou o deslocamento de sinais (Tabela A 2) correspondentes aos hidrogênios do GA (GA 27, GA 26, GA 9), indicando houve uma alteração no ambiente químico mais próximo das regiões correspondente a esses sinais através da adição da GSF, indicando a incorporação ou adsorção do fármaco nos agregados de GA. Estudos prévios mostraram que sinais dessas regiões são correspondentes aos hidrogênios da aglicona, porção hidrofóbica do GA, a qual possui um papel importante na formação de micelas/agregados desse carreador. Ainda que ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila e O-H do triterpeno e resíduos glucurônicos do GA possam ocorrer, é reportado que a formação de forma micelas ou agregados coloidais de GA é decorrente, principalmente, de interações hidrofóbica na aglicona (PETROVA et al., 2017; TYKARSKA; GDANIEC, 2013).

Figura 33. Estruturas químicas moleculares da A) GSF, B) GA, C) Lecitina (L) e D) Taurocolato de sódio (TC) comas respectivas numerações utilizadas na atribuição de sinais de RMN de  $^1\text{H}$ .



Fonte: Adaptado de PETROVA et al., 2017; WIEST et al., 2018.

A adição do GA ao meio FaSSIF possibilitou a detecção de deslocamentos em sinais (Tabela A 2) correspondentes aos grupamentos do GA (GA9) e do meio FaSSIF (TC18, TC12, LH1). Os deslocamentos químicos foram intensificados quando a GSF foi adicionada a mistura FaSSIF + GA, sendo observados tanto em sinais correspondentes ao GA (GA 27, GA 26 e GA 9), meio biorrelevante (TC18, e TC19, TC7, TC12 e LH1), quanto ao fármaco (GSF21 e GSF6). Deslocamentos na frequência de ressonância desse grupo de hidrogênios do meio biorrelevante (do TC e da L) para maior campo magnético (deslocamento para a esquerda) similares aos detectados nesse trabalho foram também observados por Wiest e colaboradores na presença de outro fármaco, o imatinib, usado como quimioterápico em leucemia e outros tipos de tumores. Após uma investigação detalhada envolvendo também análises NMR bidimensionais foi sugerido neste estudo prévio que os deslocamentos observados foram decorrentes de interações hidrofóbicas envolvendo os grupos metila do TC com os grupamentos arila do imatinib, provendo um diferente rearranjo na estrutura das micelas/vesículas do GA (WIEST et al., 2018).

O meio biorrelevante possui uma estrutura coloidal complexa, formada pelo TC, uma molécula anfifílica que possui um grupamento sulfato e cadeia planar (grupamentos hidroxila localizados em uma face do plano, e grupamentos metila no lado oposto), e pela lecitina (L), um surfactante que possui uma parte hidrofóbica composta por 2 cadeias carbônicas longas e

uma parte hidrofílica composta por uma porção de colina e um grupamento fosfato. Em FaSSIF, há a formação de micelas de TC, por meio da interação de moléculas de TC entre si (ligações de hidrogênio entre faces hidrofílicas e ligações hidrofóbicas na outra face), e também há a formação de micelas mistas, quando a lecitina é adicionada a solução micelar de TC, esta insere suas longas cadeias apolares entre as camadas hidrofóbicas do TC (XIE et al., 2014). Considerando a estrutura dos coloides formados em meio FaSSIF puro e os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do nosso trabalho sugere-se que, de forma similar ao estudo de Wiest e colaboradores, o GA está interagindo com o meio biorrelevante (principalmente com o TC), através de interações entre suas porções hidrofóbicas.

Essas interações foram capazes de alterar a hidrofobicidade dos agregados coloidais em solução, afetando também o seu tamanho. Tais interações tornaram o ambiente químico mais favorável para que uma interação com fármaco ocorresse, levando a GSF a interagir com os agregados coloidais mistos e fazendo com que a CAC do GA fosse também alterada na sua presença.

Análises adicionais de NMR, como análises bidimensionais, ainda são necessárias para chegar a conclusões mais específicas sobre a interação dos compostos em solução. Diversas limitações foram encontradas durante a obtenção e processamento das análises de NMR, tais como: alta complexidade dos sistemas analisados (fármaco, carreador e dois surfactantes), baixa solubilidade aquosa do fármaco, levando a utilização de uma baixa concentração do fármaco nas análises, além da baixa intensidade de campo magnético gerado pelo equipamento (300 MHz), a qual influencia na resolução dos espectros obtidos.

#### 6.4 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou a aplicabilidade do GA como um carreador em dispersões sólidas de GSF. A presença do GA em solução alterou a solubilidade do fármaco cristalino, a máxima concentração de fármaco livre que poderia ser atingida em uma solução supersaturada e ainda reduziu a permeabilidade aparente do fármaco a partir de soluções supersaturadas em meio biorrelevante. Dispersões sólidas amorfas com o GA foram obtidas com sucesso pela técnica de moagem utilizando o carreador na sua forma ácida e ionizada. Os ensaios de dissolução em meio biorrelevante destas formulações mostraram uma melhoria na dissolução proporcionada pela presença do carreador quando comparada ao fármaco amorfo isolado. Ambas as formulações levaram a formação de espécies coloidais em solução. No entanto, a forma ionizada do GA proporcionou uma maior liberação do fármaco comparada a forma não ionizada



e proporcionou uma melhor estabilização desses coloides, mantendo-os com tamanho relativamente estável por 4 horas. Interações intermoleculares complexas parecem estar ocorrendo em solução envolvendo o fármaco, o GA e os componentes do meio biorrelevante (taurocolato de sódio e lecitina). Tais interações tornaram o meio mais propício para a dissolução da GSF e proporcionaram uma maior inibição de precipitação do fármaco em soluções supersaturadas.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi investigado o papel de diferentes aminoácidos e adoçantes em atuar como inibidores de precipitação da GSF. Esse fármaco apresenta rápida cinética de cristalização em solução. Os resultados obtidos mostraram uma efetividade relativamente baixa na inibição da precipitação pelos aminoácidos, um impacto intermediário no perfil de dessupersaturação do fármaco pela presença da SAC e uma inibição de precipitação consistente em soluções supersaturadas contendo o GA. Essas diferenças na manutenção dos sistemas supersaturados foram provavelmente decorrentes das diferentes interações intermoleculares em solução, em consequência das características físico-químicas dos carreadores.

Ainda, o aminoácido TRYP demonstrou ser uma alternativa excelente para a estabilização de sistemas amorfos de GSF no estado sólido. Fato este de alta relevância, visto que sistemas amorfos desse fármaco apresentam alta cinética de recristalização e alta instabilidade no estado sólido, levando a uma conversão para a forma cristalina mais estável durante o seu armazenamento. Durante o estudo de estabilidade do sistema amorfo de GSF com SAC, foi detectada uma recristalização em 18 semanas, provavelmente devido ao baixo valor de transição vítreo do sistema. Porém, a alta afinidade da GSF com o carreador SAC proporcionou também a formação de uma mistura eutética, a qual não apresenta como limitação conversão no estado sólido durante armazenamento.

Dispersões sólidas amorfas podem promover melhorias na dissolução por meio das alterações no estado sólido e pela inserção de moléculas hidrofílicas nestes sistemas, facilitando a separação média entre as moléculas e reduzindo as forças de atração intermolecular entre moléculas do fármaco e alterando a sua solvatação. No entanto, a separação de fase proporcionada pela presença de umidade em sólidos amorfos e as transformações de fase mediadas pelo ambiente aquoso no meio de dissolução limitam que ocorram altas concentrações do fármaco em solução (BELLANTONE, 2014; BOGNER et al., 2010; CHEN et al., 2018; KLEPPE; HASKELL; BOGNER, 2018). Assim como em outros estudos envolvendo o uso de aminoácidos uma capacidade modesta na melhoraria de dissolução do fármaco neutro foi observada e a GSF recristalizou rapidamente em soluções supersaturadas contendo os aminoácidos. Embora as proporções GSF-TRYP MB poderiam ainda ser otimizadas, no intuito de melhorar essa taxa de dissolução e gerar soluções supersaturadas, o aumento na velocidade

de dissolução através do uso de aminoácidos parece estar relacionado com a formação de ligações iônicas com compostos ionizáveis (KASTEN et al., 2019; LAITINEN et al., 2017).

Foi observado que presença da SAC tanto na mistura eutética como na formulação amorfa, promoveu uma melhoria na dissolução, levando a formação de soluções supersaturadas. É relatado que componentes de misturas eutéticas são altamente miscíveis no estado líquido, fato este que pode ter justificado as melhorias na dissolução do fármaco. Embora a SAC não tenha sido um eficiente inibidor de precipitação/recristalização do fármaco, a SAC foi capaz de tornar o ambiente mais favorável para a sua dissolução, modulando levemente a hidrofobicidade do meio. Alguns estudos têm testado a incorporação do fármaco e do carreador de baixa massa molar à carreadores poliméricos durante a obtenção de sistemas amorfos, no intuito de conseguir uma melhor estabilização desses sistemas no estado sólido, melhorar a performance de dissolução e reduzir a quantidade de polímero necessária na formulação (FUNG; BĚRZIŇŠ; SURYANARAYANAN, 2018b; LENZ et al., 2017; TELANG; MUJUMDAR; MATHEW, 2009).

As vantagens proporcionadas pelas formulações amorfas GSF-TRYP BM e GSF-SAC QC quanto a estabilização da GSF na forma amorfa e melhorias na dissolução mostram que esses carreadores são potencialmente promissores para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de GSF no tratamento de dermatofitoses. No entanto, sistemas contendo a GSF e esses carreadores de baixa massa molar podem ainda ser aprimorados através da sua associação com carreadores poliméricos, visando uma inibição de precipitação mais efetiva, visto uma baixa carga de TRYP e SAC foi utilizada nas formulações desenvolvidas. A obtenção um sinergismo entre as vantagens proporcionadas por carreadores de baixa massa molar e por carreadores poliméricos poderia demandar uma menor carga de carreador na formulação para proporcionar as melhorias de formulação requeridas.

O uso do GA como uma novo carreador/inibidor de precipitação não polimérico foi testado para a GSF devido a sua maior hidrofobicidade em comparação aos aminoácidos e demais adoçantes. O GA foi capaz de alterar a solubilidade e inibir a precipitação da GSF em soluções supersaturadas quando previamente dissolvido no meio. Porém, quando foram desenvolvidas dispersões sólidas amorfas desse carreador, a forma não ionizada do carreador proporcionou uma menor vantagem de dissolução quando comparada com a forma ionizada (pH 6,5), provavelmente devido a modulação do pH do microambiente e a formação de gel. A maior velocidade de dissolução do GAion impulsionou a dissolução do fármaco, a qual pareceu ser essencial para levar a formação de uma fase coloidal de GSF no meio. Embora agregados

nas soluções supersaturadas também tenham sido detectados também para a dispersão sólida de GA, a recristalização do fármaco pareceu estar ocorrendo concomitantemente.

O uso do meio biorrelevante nos ensaios realizados alterou a solubilidade do fármaco quando associado com diferentes carreadores e alterou a cinética de precipitação do fármaco, tanto acelerando quanto retardando o perfil de dessupersaturação do fármaco. Alterações na hidrofobicidade do meio na presença dos carreadores, e nas características das espécies coloidais existentes no meio levaram também a modificações na cinética de dissolução do fármaco. Os dados obtidos neste trabalho ressaltam a importância de utilização de meios que mimetizem os fluidos gastrointestinais no intuito de tentar prever o comportamento *in vivo* de dissolução e precipitação de formulações farmacêuticas quando submetidas ao complexo ambiente proporcionado pelo TGI.

Os sistemas desenvolvidos neste trabalho são inovadores e considerados interessantes do ponto de vista da estabilização de sistemas supersaturados de GSF, tanto no estado sólido quanto em solução, especialmente a formulação GSF-GAion BM. Ressalta-se que valores similares ou maiores que a concentração máxima atingida durante a dissolução da GSF-GAion BM nunca foram antes reportados na literatura para este fármaco, devido a sua alta propensão a recristalização. Os resultados obtidos nesse trabalho também contribuem para um melhor entendimento do impacto do uso de carreadores de baixa massa molar em sistemas supersaturados de fármacos com baixa solubilidade aquosa.



## REFERÊNCIAS

ABUIN, Elsa B.; LISSI, Eduardo A. Quenching rate constants in aqueous solution: influence of the hydrophobic effect. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 263–267, 1993. DOI: 10.1016/1010-6030(93)85008-V.

AHMED, Iman Saad; ABOUL-EINIEN, Mona Hassan. In vitro and in vivo evaluation of a fast-disintegrating lyophilized dry emulsion tablet containing griseofulvin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 58–68, 2007. DOI: 10.1016/j.ejps.2007.05.114.

AITIPAMULA, Srinivasulu; VANGALA, Venu R.; CHOW, Pui Shan; TAN, Reginald B. H. H. Cocrystal hydrate of an antifungal drug, griseofulvin, with promising physicochemical properties. **Crystal Growth and Design**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 5858–5863, 2012. DOI: 10.1021/cg3012124.

ALBANI, Jihad René. **Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1002/9780470692059.

ALMEIDA E SOUSA, Luis; REUTZEL-EDENS, Susan M.; STEPHENSON, Gregory A.; TAYLOR, Lynne S. Assessment of the amorphous “solubility” of a group of diverse drugs using new experimental and theoretical approaches. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 484–495, 2015. DOI: 10.1021/mp500571m.

ALMEIDA E SOUSA, Luis; REUTZEL-EDENS, Susan M.; STEPHENSON, Gregory A.; TAYLOR, Lynne S. Supersaturation Potential of Salt, Co-Crystal, and Amorphous Forms of a Model Weak Base. **Crystal Growth and Design**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 737–748, 2016. DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01341.

ALSHEHRI, Sultan; IMAM, Syed Sarim; HUSSAIN, Afzal; ALTAMIMI, Mohammad A.; ALRUWAILI, Nabil K.; ALOTAIBI, Fahad; ALANAZI, Abdullah; SHAKEEL, Faiyaz. Potential of solid dispersions to enhance solubility, bioavailability, and therapeutic efficacy of poorly water-soluble drugs: newer formulation techniques, current marketed scenario and patents. **Drug Delivery**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 1625–1643, 2020. DOI: 10.1080/10717544.2020.1846638.

ALSKÄR, Linda C.; KEEMINK, Janneke; JOHANNESSON, Jenny; PORTER, Christopher J. H. H.; BERGSTRÖM, Christel A. S. S. Impact of Drug Physicochemical Properties on Lipolysis-Triggered Drug Supersaturation and Precipitation from Lipid-Based Formulations. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 4733–4744, 2018. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00699.

ALWIN C. POWERS; ALESSIO, David D'. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic. In: **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. [s.l: s.n.]. p. 1237–1275. DOI: 10.1036/0071443436.

AMHARAR, Youness; CURTIN, Vincent; GALLAGHER, Kieran H.; O'SIOCHRU, Eoin; O'CONNELL, Peter; HEALY, Anne Marie. Mitigating unwanted amorphisation: A screening method for the selection of suitable excipients. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 81, p. 181–188, 2016. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.10.016.

ANTAL, István; KÁLLAI, Nikolett; LUHN, Oliver; BERNARD, Jörg; NAGY, Zsombor Kristóf; SZABÓ, Barnabás; KLEBOVICH, Imre; ZELKÓ, Romána. Supramolecular

elucidation of the quality attributes of microcrystalline cellulose and isomalt composite pellet cores. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.04.026.

ARUTYUNYAN, N. G.; ARUTYUNYAN, L. R.; GRIGORYAN, V. V.; ARUTYUNYAN, R. S. Effect of aminoacids on the critical micellization concentration of different surfactants. **Colloid Journal**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 666–668, 2008. DOI: 10.1134/S1061933X08050177.

ATKINS, P. W.; DE PAULA, J.; KEELER, James. Atkins' Physical Chemistry, 8th Ed.; Oxford University Press. **Oxford University Press**, [S. l.], 2018.

BABADI, Delaram; DADASHZADEH, Simin; OSOULI, Mahraz; ABBASIAN, Zahra; DARYABARI, Maryam Sadat; SADRAI, Sima; HAERI, Azadeh. Biopharmaceutical and pharmacokinetic aspects of nanocarrier-mediated oral delivery of poorly soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], p. 102324, 2021. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102324.

BAGHEL, Shrawan; CATHCART, Helen; O'REILLY, Niall J. Understanding the generation and maintenance of supersaturation during the dissolution of amorphous solid dispersions using modulated DSC and 1H NMR. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 536, n. 1, p. 414–425, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.056.

BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, 2007.

BAZZO, Giovana Carolina; MOSTAFA, Dina; FRANÇA, Maria Terezinha; PEZZINI, Bianca Ramos; STULZER, Hellen Karine. How tenofovir disoproxil fumarate can impact on solubility and dissolution rate of efavirenz? **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], p. 118597, 2019. DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2019.118597.

BAZZO, Giovana Carolina; PEZZINI, Bianca Ramos; STULZER, Hellen Karine. Eutectic mixtures as an approach to enhance solubility, dissolution rate and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 588, n. May, p. 119741, 2020. a. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119741.

BAZZO, Giovana Carolina; PEZZINI, Bianca Ramos; STULZER, Hellen Karine. Eutectic mixtures as an approach to enhance solubility, dissolution rate and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 588, n. August, p. 119741, 2020. b. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119741. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119741>.

BECKMANN, Wolfgang. Mechanisms of Crystallization. *In: Crystallization: Basic Concepts and Industrial Applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 7–33. DOI: 10.1002/9783527650323.

BEHNAM, Mahsa; ZARRINFAR, Hossein; NAJAFZADEH, Mohammad Javad; NASERI, Ali; JARAHI, Lida; NOVAK BABIČ, Monika. Low in vitro activity of sertaconazole against clinical isolates of dermatophyte. **Current Medical Mycology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 36–41, 2020. DOI: 10.18502/cmm.6.1.2507.

BELLANTONE, Robert A. Fundamentals of Amorphous Systems: Thermodynamic Aspects. *In: SHAH, Navnit; SANDHU, Harpreet; CHOI, Duk Soon; CHOKSHI, Hitesh; MALICK, A. Waseem (org.). Amorphous solid dispersions : theory and practice*. 1. ed. [s.l.] : Springer New York, 2014. p. 3–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-1598-9\_1.

BENET, Leslie Z.; BROCCATELLI, Fabio; OPREA, Tudor I. BDDCS applied to over 900



drugs. **The AAPS journal**, [*S. l.*], v. 13, n. 4, p. 519–47, 2011. DOI: 10.1208/s12248-011-9290-9.

BEVERNAGE, Jan; BROUWERS, Joachim; BREWSTER, Marcus E.; AUGUSTIJNS, Patrick. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 453, n. 1, p. 25–35, 2013. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.11.026.

BINEV, Ivan G.; STAMBOLIYSKA, Bistra A.; VELCHEVA, Evelina A. The infrared spectra and structure of o-sulfobenzimide (saccharin) and of its nitranion: An ab initio force field treatment. **Spectrochimica Acta - Part A Molecular Spectroscopy**, [*S. l.*], v. 52, n. 9 PART A, p. 1135–1143, 1996. DOI: 10.1016/0584-8539(95)01648-1.

BLAABJERG, Lasse Ingerslev; LINDENBERG, Eleanor; LÖBMANN, Korbinian; GROHGANZ, Holger; RADES, Thomas. Is there a correlation between the glass forming ability of a drug and its supersaturation propensity? **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 538, n. 1–2, p. 243–249, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.01.013.

BOGNER, Robin H.; MURDANDE, Sharad B.; PIKAL, Michael J.; SHANKER, Ravi M. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: II. application of quantitative thermodynamic relationships for prediction of solubility enhancement in structurally diverse insoluble pharmaceuticals. **Pharmaceutical Research**, [*S. l.*], v. 27, n. 12, p. 2704–2714, 2010. DOI: 10.1007/s11095-010-0269-5.

BOYD, Ben J. et al. Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 137, n. May, p. 104967, 2019. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.104967.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dermatologia na Atenção Básica de Saúde. *In: Cadernos de Atenção Básica n 9*. [s.l: s.n.]. p. 142.

BRINKMANN-TRETTENES, Ulla; BAUER-BRANDL, Annette. Solid phospholipid nanoparticles: Investigations into formulation and dissolution properties of griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 467, n. 1–2, p. 42–47, 2014. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.03.023.

BROUWERS, Joachim; BREWSTER, Marcus E.; AUGUSTIJNS, Patrick. **Supersaturating drug delivery systems: The answer to solubility-limited oral bioavailability?** **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2009. DOI: 10.1002/jps.21650.

BROWN, Chad et al. Hot-Melt Extrusion for Solid Dispersions: Composition and Design Considerations. *In: Amorphous Solid Dispersions Theory and Practice*. [s.l.]: Springer, 2014. p. 197–230. DOI: 10.1007/978-1-4939-1598-9\_6.

BRUNTON, Laurence; CHABNER, Bruce; KNOLLMAN, Bjorn. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. [s.l: s.n.]. v. 53 DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

CALAFATO, N. R.; PICÓ, Guillermo. Griseofulvin and ketoconazole solubilization by bile salts studied using fluorescence spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [*S. l.*], v. 47, n. 2, p. 198–204, 2006. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2005.01.007.

CHAUHAN, S.; SINGH, Kuldeep; SUNDARESAN, C. N. Physico-chemical characterization of drug–bio-surfactant micellar system: A road for developing better pharmaceutical

formulations. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 266, p. 692–702, 2018. DOI: 10.1016/J.MOLLIQ.2018.07.008.

CHAVAN, Rahul B.; THIPPARABOINA, Rajesh; KUMAR, Dinesh; SHASTRI, Nalini R. Co amorphous systems: A product development perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 515, n. 1–2, p. 403–415, 2016. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.10.043.

CHEN, Huijun et al. Moisture-Induced Amorphous Phase Separation of Amorphous Solid Dispersions: Molecular Mechanism, Microstructure, and Its Impact on Dissolution Performance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 107, n. 1, p. 317–326, 2018. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.10.028.

CHEN, Jie; MOSQUERA-GIRALDO, Laura I.; ORMES, James D.; HIGGINS, John D.; TAYLOR, Lynne S. Bile salts as crystallization inhibitors of supersaturated solutions of poorly water-soluble compounds. **Crystal Growth and Design**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 2593–2597, 2015. a. DOI: 10.1021/acs.cgd.5b00392.

CHEN, Yuejie; LIU, Chengyu; CHEN, Zhen; SU, Ching; HAGEMAN, Michael; HUSSAIN, Munir; HASKELL, Roy; STEFANSKI, Kevin; QIAN, Feng. Drug-polymer-water interaction and its implication for the dissolution performance of amorphous solid dispersions. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 576–589, 2015. b. DOI: 10.1021/mp500660m.

CHIOU, Win L.; NIAZI, Sarfaraz. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems: Dissolution of griseofulvin–succinic acid eutectic mixture. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 65, n. 8, p. 1212–1214, 1976. DOI: 10.1002/jps.2600650820.

COSTA, Paulo F. A.; GEROLA, Adriana P.; PEREIRA, Paulo C. S.; SOUZA, Bruno S.; CAETANO, Wilker; FIEDLER, Haidi D.; NOME, Faruk; HIOKA, Noboru. Chlorophylls B formulated in nanostructured colloidal solutions: Interaction, spectroscopic, and photophysical studies. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 274, p. 393–401, 2019. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.10.143.

DAHAN, Arik; BEIG, Avital; LINDLEY, David; MILLER, Jonathan M. The solubility–permeability interplay and oral drug formulation design: Two heads are better than one. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 101, p. 99–107, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.018.

DE OLIVEIRA, Josenildo Cândido; DE VASCONCELOS PINTO, Anderson; DE MEDEIROS, César Augusto Costa; PONTE, Hellen Aparecida Silva; PEREIRA, Fillipe de Oliveira. The Sensitivity Modifying Activity of Nerolidol and  $\alpha$ -Bisabolol Against Trichophyton spp. **Indian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 505–510, 2020. DOI: 10.1007/s12088-020-00895-2.

DENGALE, Swapnil Jayant; GROHGANZ, Holger; RADES, Thomas; LÖBMANN, Korbinian; LÖBMANN, Korbinian. Recent advances in co-amorphous drug formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 100, p. 116–125, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2015.12.009.

ELKHABAZ, Ahmed; MOSESON, Dana E.; BROUWERS, Joachim; AUGUSTIJNS, Patrick; TAYLOR, Lynne S. Interplay of Supersaturation and Solubilization: Lack of Correlation between Concentration-Based Supersaturation Measurements and Membrane Transport Rates in Simulated and Aspirated Human Fluids. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 576–589, 2015. b. DOI: 10.1021/mp500660m.

*l.*], v. 16, n. 1, p. 5042–5053, 2019. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00956.

ELY, John W.; ROSENFELD, Sandra; STONE, Mary Seabury. Diagnosis and management of tinea infections. **American Family Physician**, [*S. l.*], v. 90, n. 10, p. 702–710, 2014.

EUSTON, Stephen R.; BAIRD, William G.; CAMPBELL, Lydia; KUHNS, Martin. Competitive adsorption of dihydroxy and trihydroxy bile salts with whey protein and casein in oil-in-water emulsions. **Biomacromolecules**, [*S. l.*], v. 14, n. 6, p. 1850–1858, 2013. DOI: 10.1021/bm4002443.

FERNÁNDEZ-RONCO, María P.; SALVALAGLIO, Matteo; KLUGE, Johannes; MAZZOTTI, Marco. Study of the preparation of amorphous itraconazole formulations. **Crystal Growth and Design**, [*S. l.*], v. 15, n. 6, p. 2686–2694, 2015. DOI: 10.1021/cg501892j.

FIGUEIRÊDO, Camila Bezerra Melo; NADVORNY, Daniela; DE MEDEIROS VIEIRA, Amanda Carla Quintas; SOARES SOBRINHO, José Lamartine; ROLIM NETO, Pedro José; LEE, Ping I.; DE LA ROCA SOARES, Monica Felts. Enhancement of dissolution rate through eutectic mixture and solid solution of posaconazole and benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 525, n. 1, p. 32–42, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.021.

FISCHER, Sarah Maud; BUCKLEY, Stephen Timothy; KIRCHMEYER, Wiebke; FRICKER, Gert; BRANDL, Martin. Application of simulated intestinal fluid on the phospholipid vesicle-based drug permeation assay. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 422, n. 1–2, p. 52–58, 2012. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.026.

FLORENCE, Alexander T.; ATTWOOD, David. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. 4. ed. [s.l.] : Pharmaceutical Press, 2006.

FOOD, European; AUTHORITY, Safety. Scientific Opinion on the safety and efficacy of glycyrrhizic acid ammoniated (chemical group 30, miscellaneous substances) when used as a flavouring for all animal species. **EFSA Journal**, [*S. l.*], v. 13, n. 1, p. 1–20, 2015. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.3971.

FOTAKI, Nikoletta; LONG, Chiau Ming; TANG, Kin; CHOKSHI, Hitesh. Dissolution of Amorphous Solid Dispersions: Theory and Practice. *In*: SHAH, Navnit; SANDHU, Harpreet; CHOI, Duk Soon; CHOKSHI, Hitesh; MALICK, A. Waseem (org.). **Amorphous solid dispersions : theory and practice**. 1. ed. [s.l.] : Springer New York, 2014. p. 487–514. DOI: 10.1007/978-1-4939-1598-9\_15. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1598-9\\_15](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1598-9_15). Acesso em: 22 nov. 2016.

FRANÇA, Maria Terezinha; MARCOS, Tatyane Martins; PEREIRA, Rafael Nicolay; STULZER, Hellen Karine. Could the small molecules such as amino acids improve aqueous solubility and stabilize amorphous systems containing Griseofulvin? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 143, n. December 2019, p. 105178, 2020. a. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105178.

FRANÇA, Maria Terezinha; MARTINS MARCOS, Tatyane; PAULO, Paulo F.; P. GEROLA, Adriana; STULZER, Hellen Karine. The role of glycyrrhizic acid in colloidal phenomena of supersaturation drug delivery systems containing the antifungal drug griseofulvin. **Journal of Molecular Liquids**, [*S. l.*], v. 301, p. 112336, 2020. b. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.112336.

FRANÇA, Maria Terezinha; O'REILLY BERINGHS, André; NICOLAY PEREIRA, Rafael;

MARTINS MARCOS, Tatyane; BAZZO, Giovana Carolina; STULZER, Hellen Karine. The role of sodium alginate on the supersaturation state of the poorly soluble drug chlorthalidone. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 209, p. 207–214, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.007.

FRANK, Derek S.; MATZGER, Adam J. Effect of Polymer Hydrophobicity on the Stability of Amorphous Solid Dispersions and Supersaturated Solutions of a Hydrophobic Pharmaceutical. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 682–688, 2019. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00972.

FRANK, Kerstin J.; ROSENBLATT, Karin M.; WESTEDT, Ulrich; HÖLIG, Peter; ROSENBERG, Jörg; MÄGERLEIN, Markus; FRICKER, Gert; BRANDL, Martin. Amorphous solid dispersion enhances permeation of poorly soluble ABT-102: True supersaturation vs. apparent solubility enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 437, n. 1–2, p. 288–293, 2012. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.08.014.

FULLER, L. C.; BARTON, R. C.; MOHD MUSTAPA, M. F.; PROUDFOOT, L. E.; PUNJABI, S. P.; HIGGINS, E. M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of tinea capitis 2014. **British Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 171, n. 3, p. 454–463, 2014. DOI: 10.1111/bjd.13196.

FUNG, Michelle; BĒRZIŅŠ, Kārlis; SURYANARAYANAN, Raj. Physical Stability and Dissolution Behavior of Ketoconazole-Organic Acid Coamorphous Systems. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 1862–1869, 2018. a. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00035.

FUNG, Michelle; BĒRZIŅŠ, Kārlis; SURYANARAYANAN, Raj. Physical Stability and Dissolution Behavior of Ketoconazole-Organic Acid Coamorphous Systems. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 1862–1869, 2018. b. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00035.

GAO, Yuan; LIAO, Jiao; QI, Xuan; ZHANG, Jianjun. Coamorphous repaglinide-saccharin with enhanced dissolution. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 450, n. 1–2, p. 290–295, 2013. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.032.

GHOSH, Narayani; MONDAL, Ramakanta; MUKHERJEE, Saptarshi. Hydrophobicity is the governing factor in the interaction of human serum albumin with bile salts. **Langmuir**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 1095–1104, 2015. DOI: 10.1021/la504270a.

GOLDBERG, Arthur H.; GIBALDI, Milo; KANIG, Joseph L. Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures III: Experimental evaluation of griseofulvin—succinic acid solid solution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 55, n. 5, p. 487–492, 1966. DOI: 10.1002/jps.2600550508.

GUERIN, Justine; KRIZNIK, Alexandre; RAMALANJAONA, Nick; LE ROUX, Yves; GIRARDET, Jean Michel. Interaction between dietary bioactive peptides of short length and bile salts in submicellar or micellar state. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 209, p. 114–122, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.047.

GUPTA, A. K. K.; MAYS, R. R. R.; VERSTEEG, S. G. G.; PIRACCINI, B. M. M.; SHEAR, N. H. H.; PIGUET, V.; TOSTI, A.; FRIEDLANDER, S. F. F. Tinea capitis in children: A systematic review of management. **Journal of the European Academy of Dermatology and**

- Venereology**, [*S. l.*], v. 32, n. 12, p. 2264–2274, 2018. DOI: 10.1111/jdv.15088.
- GUPTA, Aditya K.; COOPER, Elizabeth A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, [*S. l.*], v. 166, n. 5–6, p. 353–367, 2008. DOI: 10.1007/s11046-008-9109-0.
- HAN, Jiawei; WEI, Yuanfeng; LU, Yan; WANG, Runze; ZHANG, Jianjun; GAO, Yuan; QIAN, Shuai. Co-amorphous systems for the delivery of poorly water-soluble drugs: Recent advances and an update. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [*S. l.*], v. 0, n. 0, 2020. DOI: 10.1080/17425247.2020.1796631.
- HBAIEB, Souhaira; KALFAT, Rafik; CHEVALIER, Yves. Loading antifungal drugs onto silica particles grafted with cyclodextrins by means of inclusion complex formation at the solid surface. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 439, n. 1, p. 234–245, 2012. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.035.
- HO, Yuan Soon et al. Griseofulvin potentiates antitumorigenesis effects of nocodazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. **International Journal of Cancer**, [*S. l.*], v. 91, n. 3, p. 393–401, 2001. DOI: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1070>3.0.co;2-%23.
- HONG, Shiqi; NOWAK, Steven A.; WAH, Chan Lai. Impact of Physicochemical Properties of Cellulosic Polymers on Supersaturation Maintenance in Aqueous Drug Solutions. **AAPS PharmSciTech**, [*S. l.*], v. 19, n. 4, p. 1860–1868, 2018. DOI: 10.1208/s12249-018-0999-y.
- HUANG, Chengbin; RUAN, Shigang; CAI, Ting; YU, Lian. Fast Surface Diffusion and Crystallization of Amorphous Griseofulvin. **Journal of Physical Chemistry B**, [*S. l.*], v. 121, n. 40, p. 9463–9468, 2017. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b07319.
- HUIJGHEBAERT, S. M.; HOFMANN, A. F. Influence of the amino acid moiety on deconjugation of bile acid amidates by cholylglycine hydrolase or human fecal cultures. **Journal of Lipid Research**, [*S. l.*], v. 27, n. 7, p. 742–752, 1986.
- IMAI, Miko; HASHIZAKI, Kaname; TAGUCHI, Hiroyuki; SAITO, Yoshihiro; MOTOHASHI, Shigeyasu. A new reverse worm-like micellar system from a lecithin, multivalent carboxylic acid and oil mixture. **Journal of Colloid and Interface Science**, [*S. l.*], v. 403, p. 77–83, 2013. DOI: 10.1016/J.JCIS.2013.04.033.
- INDULKAR, Anura S.; GAO, Yi; RAINA, Shweta A.; ZHANG, Geoff G. Z.; TAYLOR, Lynne S. Exploiting the Phenomenon of Liquid-Liquid Phase Separation for Enhanced and Sustained Membrane Transport of a Poorly Water-Soluble Drug. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 13, n. 6, p. 2059–2069, 2016. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00202.
- INDULKAR, Anura S.; GAO, Yi; RAINA, Shweta A.; ZHANG, Geoff G. Z.; TAYLOR, Lynne S. Crystallization from Supersaturated Solutions: Role of Lecithin and Composite Simulated Intestinal Fluid. **Pharmaceutical Research**, [*S. l.*], v. 35, n. 8, 2018. DOI: 10.1007/s11095-018-2441-2.
- INDULKAR, Anura S.; LOU, Xiaochun; TAYLOR, Lynne S. Insights into the Dissolution Mechanism of Ritonavir – Copovidone Amorphous Solid Dispersions: Importance of Congruent Release for Enhanced Performance. [*S. l.*], 2019. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01261.
- JACKSON, Matthew J.; KESTUR, Umesh S.; HUSSAIN, Munir A.; TAYLOR, Lynne S. Dissolution of Danazol Amorphous Solid Dispersions: Supersaturation and Phase Behavior as a Function of Drug Loading and Polymer Type. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 13, n. 1, p. 223–231, 2016. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00652.

JENSEN, Katrine Tarp; LARSEN, Flemming Hofmann; CORNETT, Claus; LÖBMANN, Korbinian; GROHGANZ, Holger; RADES, Thomas. Formation Mechanism of Coamorphous Drug-Amino Acid Mixtures. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 2484–2492, 2015. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00295.

JENSEN, Katrine Tarp; LARSEN, Flemming Hofmann; LÖBMANN, Korbinian; RADES, Thomas; GROHGANZ, Holger. Influence of variation in molar ratio on co-amorphous drug-amino acid systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 107, p. 32–39, 2016. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.06.020.

JENSEN, Katrine Tarp; LÖBMANN, Korbinian; RADES, Thomas; GROHGANZ, Holger. Improving co-amorphous drug formulations by the addition of the highly water soluble amino Acid, proline. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 416–35, 2014. DOI: 10.3390/pharmaceutics6030416.

JULURI, Abhishek; POPESCU, Carmen; ZHOU, Leon; MURTHY, Reena N.; GOWDA, Vanaja K.; P, Chetan Kumar; PIMPARADE, Manjeet B.; REPKA, Michael A.; MURTHY, S. Narasimha. Taste Masking of Griseofulvin and Caffeine Anhydrous Using Kleptose Linecaps DE17 by Hot Melt Extrusion. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 99–105, 2016. DOI: 10.1208/s12249-015-0374-1.

KASTEN, Georgia; GROHGANZ, Holger; RADES, Thomas; LÖBMANN, Korbinian. Development of a screening method for co-amorphous formulations of drugs and amino acids. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 95, p. 28–35, 2016. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.08.022.

KASTEN, Georgia; LÖBMANN, Korbinian; GROHGANZ, Holger; RADES, Thomas. Co-former selection for co-amorphous drug-amino acid formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 557, p. 366–373, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.036.

KAUR, Navpreet; NARANG, Ajit; BANSAL, Arvind Kumar. **Use of biorelevant dissolution and PBPK modeling to predict oral drug absorption** **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2018. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.05.024.

KERNS, Edward H.; DI, Li. Chapter 7. Solubility. *In: Drug Like Properties: Concept, Structure, Design and Methods, from ADME to Toxicity Optimization*. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1016/B978-012369520-8.50008-5.

KHADRA, Ibrahim; ZHOU, Zhou; DUNN, Claire; WILSON, Clive G.; HALBERT, Gavin. Statistical investigation of simulated intestinal fluid composition on the equilibrium solubility of biopharmaceutics classification system class II drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 67, p. 65–75, 2015. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.10.019.

KLEIN, Sandra. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. **The AAPS journal**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 397–406, 2010. DOI: 10.1208/s12248-010-9203-3.

KLEPPE, Mary S.; HASKELL, Roy J.; BOGNER, Robin H. Biorelevant Media Slows the Solution-Mediated Phase Transformation of Amorphous Spironolactone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 107, n. 1, p. 426–435, 2018. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.10.041.

KNOPP, Matthias Manne; CHOURAK, Nabil; KHAN, Fauzan; WENDELBOE, Johan; LANGGUTH, Peter; RADES, Thomas; HOLM, René Ren?? Effect of polymer type and drug dose on the in vitro and in vivo behavior of amorphous solid dispersions. **European Journal**

of **Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [*S. l.*], v. 105, p. 106–114, 2016. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.05.017.

KONG, Ruiping et al. Enhanced solubility and bioavailability of simvastatin by mechanochemically obtained complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 534, n. 1–2, p. 108–118, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.011.

KONG, Ruiping; ZHU, Xingyi; METELEVA, Elizaveta S.; POLYAKOV, Nikolay E.; KHVOSTOV, Mikhail V.; BAEV, Dmitry S.; TOLSTIKOVA, Tatjana G.; DUSHKIN, Alexander V.; SU, Weike. Atorvastatin calcium inclusion complexation with polysaccharide arabinogalactan and saponin disodium glycyrrhizate for increasing of solubility and bioavailability. **Drug Delivery and Translational Research**, [*S. l.*], v. 8, n. 5, p. 1200–1213, 2018. DOI: 10.1007/s13346-018-0565-x.

KORNIJEVSKAYA, V. S.; KRUPPA, A. I.; LESHINA, T. V. NMR and photo-CIDNP investigations of the glycyrrhizic acid micelles influence on solubilized molecules. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, [*S. l.*], v. 60, n. 1–2, p. 123–130, 2008. DOI: 10.1007/s10847-007-9360-x.

LAITINEN, Riikka; LÖBMANN, Korbinian; GROHGANZ, Holger; PRIEMEL, Petra; STRACHAN, Clare J.; RADES, Thomas. Supersaturating drug delivery systems: The potential of co-amorphous drug formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 532, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.123.

LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006. DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4.

LAW, Devalina; WANG, Weili; SCHMITT, Eric A.; LONG, Michelle A. Prediction of poly(ethylene) glycol-drug eutectic compositions using an index based on the van't Hoff equation. **Pharmaceutical Research**, [*S. l.*], v. 19, n. 3, p. 315–321, 2002. DOI: 10.1023/A:1014499119549.

LEHTO, Paula; KORTEJÄRVI, Hanna; LIIMATAINEN, Anni; OJALA, Krista; KANGAS, Heli; HIRVONEN, Jouni; TANNINEN, Veli Pekka; PELTONEN, Leena. Use of conventional surfactant media as surrogates for FaSSiF in simulating in vivo dissolution of BCS class II drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [*S. l.*], v. 78, n. 3, p. 531–538, 2011. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.02.007.

LENZ, Elisabeth; LÖBMANN, Korbinian; RADES, Thomas; KNOP, Klaus; KLEINEBUDDE, Peter. Hot Melt Extrusion and Spray Drying of Co-amorphous Indomethacin-Arginine With Polymers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 106, n. 1, p. 302–312, 2017. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.09.027.

LEUNER, Christian; DRESSMAN, Jennifer. **Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions** **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2000. DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00076-X.

LEWIS, Alison Emslie; SECKLER, Marcelo Martins; KRAMER, Herman; VAN ROSMALEN, Gerda. **Industrial crystallization: Fundamentals and applications**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1017/CBO9781107280427.

LI, Jane; TSINMAN, Konstantin; TSINMAN, Oksana; WIGMAN, Larry. Using pH Gradient Dissolution with In-Situ Flux Measurement to Evaluate Bioavailability and DDI for Formulated Poorly Soluble Drug Products. **AAPS PharmSciTech**, [*S. l.*], v. 19, n. 7, p. 2898–2907, 2018. a. DOI: 10.1208/s12249-018-1164-3.

LI, M.; ALVAREZ, P.; ORBE, P.; BILGILI, E. Multi-faceted Characterization of Wet-milled Griseofulvin Nanosuspensions for Elucidation of Aggregation State and Stabilization Mechanisms. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 1789–1801, 2018. b. DOI: 10.1208/s12249-018-0993-4.

LIAO, Yanmei; ZHONG, Li; LIU, Luona; XIE, Long; TANG, Hailong; ZHANG, Linlin; LI, Xiaofang. Comparison of surfactants at solubilizing, forming and stabilizing nanoemulsion of hesperidin. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 281, p. 110000, 2020. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2020.110000.

LICHTENTHALER, Frieder W.; LINDNER, Hans J. The Preferred Conformations of Glycosylalдитols. **Liebigs Annalen der Chemie**, [S. l.], v. 1981, n. 12, p. 2372–2383, 1981. DOI: 10.1002/jlac.198119811221.

LIGHT, Mark E.; SIDDIQUI, Waseeq Ahmad; BROWN, Richard C. D. CCDC 1476110: Experimental Crystal Structure Determination. [S. l.], 2016. DOI: 10.5517/ccdc.csd.cc1lk0gm.

LIMA, Daniel Inácio De. **Identificação de compostos orgânicos na química de produtos naturais por técnicas de RMN**, 2013.

LIN, C.; SYMCHOWICZ, S. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of griseofulvin in man and animals. **Drug Metabolism Reviews**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 75–95, 1975. DOI: 10.3109/03602537508993749.

LIU, Haoyu; TAYLOR, Lynne S.; EDGAR, Kevin J. The role of polymers in oral bioavailability enhancement; A review. **Polymer**, [S. l.], v. 77, p. 399–415, 2015. DOI: 10.1016/j.polymer.2015.09.026.

LÖBMANN, Korbinian et al. Amino acids as co-amorphous stabilizers for poorly water soluble drugs - Part 1: Preparation, stability and dissolution enhancement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 85, n. 3 PART B, p. 873–881, 2013. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.03.014.

LÖBMANN, Korbinian; JENSEN, Katrine Tarp; LAITINEN, Riikka; RADES, Thomas; STRACHAN, Clare J.; GROHGANZ, Holger. Stabilized Amorphous Solid Dispersions with Small Molecule Excipients. *In*: [s.l.] : Springer New York, 2014. p. 613–636. DOI: 10.1007/978-1-4939-1598-9\_21.

LU, J.; ZHENG, M.; KONG, R.; PANG, J.; ZHU, X. Enhancing Solubility of Candesartan Cilexetil by Co- milling ; Preparation of Candesartan Cilexetil-glycyrrhizic Acid Composite. [S. l.], v. 81, n. May 2018, p. 211–218, 2019.

LU, Jennifer; ORMES, James D.; LOWINGER, Michael; MANN, Amanda K. P. P.; XU, Wei; PATEL, Sanjaykumar; LITSTER, James D.; TAYLOR, Lynne S. Compositional effect of complex biorelevant media on the crystallization kinetics of an active pharmaceutical ingredient. **CrystEngComm**, [S. l.], v. 19, n. 32, p. 4797–4806, 2017. DOI: 10.1039/c7ce01128h.

MAH, Pei T.; NOVAKOVIC, Dunja; SAARINEN, Jukka; VAN LANDEGHEM, Stijn; PELTONEN, Leena; LAAKSONEN, Timo; ISOMÄKI, Antti; STRACHAN, Clare J. Elucidation of Compression-Induced Surface Crystallization in Amorphous Tablets Using Sum Frequency Generation (SFG) Microscopy. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 957–970, 2017. DOI: 10.1007/s11095-016-2046-6.

MARGULIS-GOSHEN, Katrin; WEITMAN, Michal; MAJOR, Dan Thomas; MAGDASSI,



Shlomo. Inhibition of crystallization and growth of celecoxib nanoparticles formed from volatile microemulsions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 100, n. 10, p. 4390–4400, 2011. DOI: 10.1002/jps.22623.

MATSUOKA, Keisuke; MIYAJIMA, Ryusuke; ISHIDA, Yudai; KARASAWA, Seigo. Aggregate formation of glycyrrhizic acid. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [*S. l.*], v. 500, p. 112–117, 2016.

MAY, Philippa J.; TONG, Steven Y. C.; STEER, Andrew C.; CURRIE, Bart J.; ANDREWS, Ross M.; CARAPETIS, Jonathan R.; BOWEN, Asha C. Treatment, prevention and public health management of impetigo, scabies, crusted scabies and fungal skin infections in endemic populations: a systematic review. **Tropical Medicine and International Health**, [*S. l.*], v. 24, n. 3, p. 280–293, 2019. DOI: 10.1111/tmi.13198.

MAYSER, Peter et al. S1 guidelines: Tinea capitis. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, [*S. l.*], v. 18, n. 2, p. 161–179, 2020. DOI: 10.1111/ddg.14026.

METELEVA, Elizaveta S. et al. Disodium salt of glycyrrhizic acid – A novel supramolecular delivery system for anthelmintic drug praziquantel. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [*S. l.*], v. 50, n. November 2018, p. 66–77, 2019. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.01.014.

MIKAEILI, Ali; KAVOUSSI, Hossein; HASHEMIAN, Amir Hosein; GHESHTEMI, Mahdokht Shabandoost; KAVOUSSI, Reza. Clinico-mycological profile of tinea capitis and its comparative response to griseofulvin versus terbinafine. **Current Medical Mycology**, [*S. l.*], v. 5, n. 1, p. 15–20, 2019. DOI: 10.18502/cmm.5.1.532.

MOCHIZUKI, Takashi et al. Guidelines for the management of dermatomycosis (2019). **Journal of Dermatology**, [*S. l.*], n. August, p. 1–31, 2020. DOI: 10.1111/1346-8138.15618.

MOFFAT, Anthony C.; OSSELTON, MDavid; BRIAN WIDDOP. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. **Clarke's Analysis and Poisons**, [*S. l.*], p. 323–333, 2011.

MORIELLO, Karen A.; COYNER, Kimberly; PATERSON, Susan; MIGNON, Bernard. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats.: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. **Veterinary Dermatology**, [*S. l.*], v. 28, n. 3, p. 266–268, 2017. DOI: 10.1111/vde.12440.

MOSQUERA-GIRALDO, Laura I.; TAYLOR, Lynne S. Glass-liquid phase separation in highly supersaturated aqueous solutions of telaprevir. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 12, n. 2, p. 496–503, 2015. DOI: 10.1021/mp500573z.

MURDANDE, Sharad B.; PIKAL, Michael J.; SHANKER, Ravi M.; BOGNER, Robin H. Aqueous solubility of crystalline and amorphous drugs: Challenges in measurement. **Pharmaceutical development and technology**, [*S. l.*], v. 16, n. March 2010, p. 187–200, 2011. DOI: 10.3109/10837451003774377.

NAEF, Rudolf. A generally applicable computer algorithm based on the group additivity method for the calculation of seven molecular descriptors: Heat of combustion, LogP o/w , LogS, refractivity, polarizability, toxicity and LogBB of organic compounds; scope and limits. **Molecules**, [*S. l.*], v. 20, n. 10, p. 18279–18351, 2015. DOI: 10.3390/molecules201018279.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 441140, Griseofulvin**. 2020. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Griseofulvin>.

NDOU, T. T.; VON WANDRUSZKA, R. Pyrene fluorescence in premicellar solutions: The effects of solvents and temperature. **Journal of Luminescence**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 33–38, 1990. DOI: 10.1016/0022-2313(90)90079-Q.

NETZ, Paulo A.; ORTEGA, George G. **Fundamentos de Físico-Química: Uma Abordagem Conceitual para as Ciências Farmacêuticas**. [s.l.] : Artmed Editora, 2002.

NEWMAN, Ann; REUTZEL-EDENS, Susan M.; ZOGRAFI, George. Coamorphous Active Pharmaceutical Ingredient–Small Molecule Mixtures: Considerations in the Choice of Cofomers for Enhancing Dissolution and Oral Bioavailability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 107, n. 1, p. 5–17, 2018. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.09.024.

OHUE, Kenji; OHTAKE, Kohhei. **Zetasizer Nano User Manual** Malvern Instruments Ltd., 2013.

OHYAGI, Naoko; UEDA, Keisuke; HIGASHI, Kenjirou; YAMAMOTO, Keiji; KAWAKAMI, Kohsaku; MORIBE, Kunikazu. Synergetic Role of Hypromellose and Methacrylic Acid Copolymer in the Dissolution Improvement of Amorphous Solid Dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 4, p. 1042–1050, 2017. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.12.005.

OJARINTA, Rami; HEIKKINEN, Aki T.; SIEVÄNEN, Elina; LAITINEN, Riikka. Dissolution behavior of co-amorphous amino acid-indomethacin mixtures: The ability of amino acids to stabilize the supersaturated state of indomethacin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 112, p. 85–95, 2017. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.11.023.

OZAKI, Shunsuke; KUSHIDA, Ikuo; YAMASHITA, Taro; HASEBE, Takashi; SHIRAI, Osamu; KANO, Kenji. Evaluation of drug supersaturation by thermodynamic and kinetic approaches for the prediction of oral absorbability in amorphous pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1002/jps.23306.

PAGE, Susanne; MAURER, Reto; WYTTENBACH, Nicole. Structured development approach for amorphous systems. In: **AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-42609-9\_8.

PALMELUND, Henrik; MADSEN, Cecilie Maria; PLUM, Jakob; MÜLLERTZ, Anette; RADES, Thomas. Studying the Propensity of Compounds to Supersaturate: A Practical and Broadly Applicable Approach. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 10, p. 3021–3029, 2016. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.06.016.

PANDI, Palpandi; BULUSU, Raviteja; KOMMINENI, Nagavendra; KHAN, Wahid; SINGH, Mandip. Amorphous solid dispersions: An update for preparation, characterization, mechanism on bioavailability, stability, regulatory considerations and marketed products. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 586, n. May, p. 119560, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119560.

PAS, Timothy; STRUYF, Alina; VERGAUWEN, Bjorn; VAN DEN MOOTER, Guy. Ability of gelatin and BSA to stabilize the supersaturated state of poorly soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 131, p. 211–223, 2018. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.08.003.

PELLOSI, Diogo Silva; ESTEVÃO, Bianca Martins; FREITAS, Camila Fabiano; TSUBONE, Tayana Mazin; CAETANO, Wilker; HIOKA, Noboru. Photophysical properties

- of erythrosin ester derivatives in ionic and non-ionic micelles. **Dyes and Pigments**, [S. l.], v. 99, n. 3, p. 705–712, 2013. DOI: 10.1016/j.dyepig.2013.06.026.
- PETROVA, Svetlana S.; SCHLOTGAUER, Anna A.; KRUPPA, Alexander I.; LESHINA, Tatyana V. Self-Association of Glycyrrhizic Acid. NMR Study. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, [S. l.], v. 231, n. 4, p. 839–855, 2017. DOI: 10.1515/zpch-2016-0845.
- PINTO, Juliana Munari Oliveira; LEÃO, Aline Franciane; RIEKES, Manoela Klüppel; FRANÇA, Maria Terezinha; STULZER, Hellen Karine. HPMCAS as an effective precipitation inhibitor in amorphous solid dispersions of the poorly soluble drug candesartan cilexetil. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 184, p. 199–206, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.052.
- PINTO, Juliana Munari Oliveira; RENGIFO, Andrés Felipe Chamorro; MENDES, Cassiana; LEÃO, Aline Franciane; PARIZE, Alexandre Luis; STULZER, Hellen Karine. Understanding the interaction between Soluplus® and biorelevant media components. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 187, n. November 2019, p. 110673, 2020. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110673.
- POLYAKOV, N. E. Glycyrrhizic Acid as a Novel Drug Delivery Vector: Synergy of Drug Transport and Efficacy. **The Open Conference Proceedings Journal**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 64–72, 2011. DOI: 10.2174/2210289201102010064.
- POLYAKOV, Nikolay E.; LESHINA, Tatyana V.; SALAKHUTDINOV, Nariman F.; KISPERT, Lowell D. Host-guest complexes of carotenoids with  $\beta$ -glycyrrhizic acid. **Journal of Physical Chemistry B**, [S. l.], v. 110, n. 13, p. 6991–6998, 2006. DOI: 10.1021/jp056038l.
- PRICE, Daniel 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**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1111/jphp.12927.
- PURI, Vibha; BRANCAZIO, Dave; DESAI, Parind M.; JENSEN, Keith D.; CHUN, Jung Hoon; MYERSON, Allan S.; TROUT, Bernhardt L. Development of Maltodextrin-Based Immediate-Release Tablets Using an Integrated Twin-Screw Hot-Melt Extrusion and Injection-Molding Continuous Manufacturing Process. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 11, p. 3328–3336, 2017. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.06.020.
- PUROHIT, Hitesh S. **Phase behavior of amorphous solid dispersions during hydration and dissolution**. 2017. Purdue University, [S. l.], 2017.
- PUTTARAJA; NIRMALA, K. A.; SAKEGOWDA, D. S.; DUAX, William L. Crystal structure of griseofulvin. **Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 415–423, 1982. DOI: 10.1007/BF01161404.
- QUE, Chailu; LOU, Xiaochun; ZEMLYANOV, Dmitry Y.; MO, Huaping; INDULKAR, Anura S.; GAO, Yi; ZHANG, Geoff G. Z. Z.; TAYLOR, Lynne S. **Insights into the Dissolution Behavior of Ledipasvir-Copovidone Amorphous Solid Dispersions: Role of Drug Loading and Intermolecular Interactions**. [s.l.: s.n.]. v. 16 DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01025.
- RAINA, Shweta A.; ZHANG, Geoff G. Z.; ALONZO, David E.; WU, Jianwei; ZHU, Donghua; CATRON, Nathaniel D.; GAO, Yi; TAYLOR, Lynne S. Enhancements and limits in drug membrane transport using supersaturated solutions of poorly water soluble drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 103, n. 9, p. 2736–2748, 2014. DOI: 10.1002/jps.23826.

RANG, Humphrey P. **Rang and Dale's pharmacology**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.

RIBEIRO, Maria E. N. P. et al. Solubilisation capacity of Brij surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 436, n. 1–2, p. 631–635, 2012. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.032.

RODRÍGUEZ-HORNEDO, Nair; MURPHY, Denette. Significance of controlling crystallization mechanisms and kinetics in pharmaceutical systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 88, n. 7, p. 651–660, 1999. DOI: 10.1021/js980490h.

ROWE, Raymond C. RC; SHESKEY, PJ Paul J.; OWEN, Siân C.; AMERICAN PHARMACISTS ASSOCIATION.; WELLER, PJ. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6. ed. London: Pharmaceutical press, 2009.

SABOO, Sugandha; KESTUR, Umesh S.; FLAHERTY, Daniel P.; TAYLOR, Lynne S. Congruent Release of Drug and Polymer from Amorphous Solid Dispersions: Insights into the Role of Drug-Polymer Hydrogen Bonding, Surface Crystallization, and Glass Transition. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 1261–1275, 2020. a. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01272.

SABOO, Sugandha; MOSESON, Dana E.; KESTUR, Umesh S.; TAYLOR, Lynne S. Patterns of drug release as a function of drug loading from amorphous solid dispersions: A comparison of five different polymers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 155, n. July, p. 105514, 2020. b. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105514.

SABOO, Sugandha; MUGHEIRBI, Naila A.; ZEMLYANOV, Dmitry Y.; KESTUR, Umesh S.; TAYLOR, Lynne S. Congruent release of drug and polymer: A “sweet spot” in the dissolution of amorphous solid dispersions. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 298, n. February, p. 68–82, 2019. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.01.039.

SAHINER, Nurettin. One step preparation of polymeric maltitol particles, from a sugar molecule, maltitol for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.msec.2018.04.017.

SARABU, Sandeep; KALLAKUNTA, Venkata Raman; BANDARI, Suresh; BATRA, Amol; BI, Vivian; DURIG, Thomas; ZHANG, Feng; REPKA, Michael A. Hypromellose acetate succinate based amorphous solid dispersions via hot melt extrusion: Effect of drug physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 233, n. December 2019, p. 115828, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115828.

SARHAN, R. M.; THABET, H. S.; NAZEER, J. T.; WILLIAM, S. The impact of cinnarizine and griseofulvin on juvenile and adult stages of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**, [S. l.], v. 94, 2020. DOI: 10.1017/S0022149X19000178.

SARODE, Ashish L.; SANDHU, Harpreet; SHAH, Navnit; MALICK, Waseem; ZIA, Hossein. Hot melt extrusion (HME) for amorphous solid dispersions: Predictive tools for processing and impact of drug-polymer interactions on supersaturation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 371–384, 2013. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.12.012.

SCHOUTEN, Arie; KANTERS, Jan A.; KROON, Jan; LOOTEN, Philippe; DUFLOT, Pierrick; MATHLOUTHI, Mohamed. A redetermination of the crystal and molecular structure of maltitol (4-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-glucitol). **Carbohydrate Research**, [S. l.], v. 322, n. 3–4, p. 298–302, 1999. DOI: 10.1016/S0008-6215(99)00235-9.

- SHAH, Dhaval A.; PATEL, Manan; MURDANDE, Sharad B.; DAVE, Rutesh H. Influence of spray drying and dispersing agent on surface and dissolution properties of griseofulvin micro and nanocrystals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S. l.], v. 42, n. 11, p. 1842–1850, 2016. DOI: 10.1080/03639045.2016.1178770.
- SHI, Qin; CAI, Ting. Fast Crystal Growth of Amorphous Griseofulvin: Relations between Bulk and Surface Growth Modes. **Crystal Growth and Design**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 3279–3286, 2016. DOI: 10.1021/acs.cgd.6b00252.
- SHIBATA S. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. **Yakugaku Zasshi**, [S. l.], v. 120, n. 10, p. 849–862, 2000.
- SIMÕES, Marta F.; PINTO, Rui M. A.; SIMÕES, Sérgio. Hot-melt extrusion in the pharmaceutical industry: toward filing a new drug application. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 1749–1768, 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.013.
- SINGH, Abhishek; VAN DEN MOOTER, Guy. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 100, p. 27–50, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2015.12.010.
- SINGH, Ashutosh et al. A unique multidrug-resistant clonal Trichophyton population distinct from Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale complex causing an ongoing alarming dermatophytosis outbreak in India: Genomic insights and resistance profile. **Fungal Genetics and Biology**, [S. l.], v. 133, n. June, p. 103266, 2019. DOI: 10.1016/j.fgb.2019.103266.
- SU, Xitong; WU, Lei; HU, Mingming; DONG, Wenxiang; XU, Meng; ZHANG, Peng. Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 95, n. July, p. 670–678, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.123.
- SU, Yuan; XU, Jia; SHI, Qin; YU, Lian; CAI, Ting. Polymorphism of griseofulvin: Concomitant crystallization from the melt and a single crystal structure of a metastable polymorph with anomalously large thermal expansion. **Chemical Communications**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 358–361, 2018. DOI: 10.1039/c7cc07744k.
- SUI, Xiaoyu; WEI, Wei; YANG, Lei; ZU, Yuangang; ZHAO, Chunjian; ZHANG, Lin; YANG, Fengjian; ZHANG, Zhonghua. Preparation, characterization and in vivo assessment of the bioavailability of glycyrrhizic acid microparticles by supercritical anti-solvent process. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 423, n. 2, p. 471–479, 2012. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.12.007.
- SUN, Dajun D.; WEN, Hong; TAYLOR, Lynne S. Non-Sink Dissolution Conditions for Predicting Product Quality and In Vivo Performance of Supersaturating Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 9, p. 2477–2488, 2016. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.03.024.
- SUPPLEMENTS, Dietary; SERVICES, Human; NUTRITION, Applied. Guidance for Industry A Food Labeling Guide A Food Labeling Guide. **FDA**, [S. l.], n. 01, 2013. Disponível em: [www.fda.gov/FoodLabelingGuide](http://www.fda.gov/FoodLabelingGuide).
- SURESH, P.; SUGARAJ SAMUEL, R.; JANARTHANAN, S. An Investigation on the Growth and Characterization of: L-Tryptophan Single Crystal. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 14225–14229, 2018. DOI: 10.1016/j.matpr.2018.03.002.
- TAGHIPOUR, Simin et al. Emergence of terbinafine resistant trichophyton mentagrophytes

in iran, harboring mutations in the squalene epoxidase (Sqle) gene. **Infection and Drug Resistance**, [*S. l.*], v. 13, p. 845–850, 2020. DOI: 10.2147/IDR.S246025.

TAKAHASHI, Tadahito; YAMAGUCHI, Michihiro. Host-Guest Interactions between Swelling Clay Minerals and Poorly Water-Soluble Drugs Complex Formation with a Swelling Clay Mineral OCH. **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry**, [*S. l.*], v. 10, p. 283–297, 1991. a.

TAKAHASHI, Tadahito; YAMAGUCHI, Michihiro. Host-guest interactions between swelling clay minerals and poorly water-soluble drugs. II. Solubilization of griseofulvin by complex formation with a swelling clay mineral. **Journal of Colloid And Interface Science**, [*S. l.*], v. 146, n. 2, p. 556–564, 1991. b. DOI: 10.1016/0021-9797(91)90219-X.

TAKANO, Ryusuke; MAURER, Reto; JACOB, Laurence; STOWASSER, Frank; STILLHART, Cordula; PAGE, Susanne. Formulating Amorphous Solid Dispersions: Impact of Inorganic Salts on Drug Release from Tablets Containing Itraconazole-HPMC Extrudate. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 17, n. 8, p. 2768–2778, 2020. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01109.

TAN, Songwen; JIANG, Tingting; EBRAHIMI, Amirali; LANGRISH, Timothy. Effect of spray-drying temperature on the formation of flower-like lactose for griseofulvin loading. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 111, n. August 2017, p. 534–539, 2018. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.10.040.

TAYLOR, Lynne S. Physical Stability and Crystallization Inhibition. *In*: NEWMAN, Ann (org.). **Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions**. 1. ed. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2015. p. 175–217.

TAYLOR, Lynne S.; ZHANG, Geoff G. Z. Physical chemistry of supersaturated solutions and implications for oral absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [*S. l.*], v. 101, p. 122–142, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.006.

TELANG, Chitra; MUJUMDAR, Siddhartha; MATHEW, Michael. Improved physical stability of amorphous state through acid base interactions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 98, n. 6, p. 2149–2159, 2009. DOI: 10.1002/jps.21584.

TEY, Hong Liang; TAN, Andy Soon Leong; CHAN, Yui Chew. Meta-analysis of randomized, controlled trials comparing griseofulvin and terbinafine in the treatment of tinea capitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [*S. l.*], v. 64, n. 4, p. 663–670, 2011. DOI: 10.1016/j.jaad.2010.02.048.

TILBORG, Anaëlle; NORBERG, Bernadette; WOUTERS, Johan. Pharmaceutical salts and cocrystals involving amino acids: A brief structural overview of the state-of-art. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [*S. l.*], v. 74, p. 411–426, 2014. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.11.045.

TOWNLEY, Edward R.; EDWARD R. TOWNLEY. Griseofulvin. *In*: FLOREY, Klaus (org.). **Analytical profiles of drug substances**. 8. ed. [s.l.] : Academic Press, 1979. v. 8p. 219–249. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60119-7](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60119-7).

TOWNLEY, Edward; RODEN, Paul. High-performance liquid chromatographic analysis of griseofulvin in drug substance and solid dosage forms: separation of impurities and metabolites. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 69, n. 5, p. 523–526, 1980. DOI: 10.1002/jps.2600690512.

TRAN, Thao T. D.; TRAN, Phuong H. L. Molecular interactions in solid dispersions of

poorly water-soluble drugs. **Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 12, n. 8, p. 1–12, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080745.

TRASI, Niraj S.; BOERRIGTER, Stephan X. M.; BYRN, Stephen Robert. Investigation of the milling-induced thermal behavior of crystalline and amorphous griseofulvin.

**Pharmaceutical Research**, [*S. l.*], v. 27, n. 7, p. 1377–1389, 2010. DOI: 10.1007/s11095-010-0129-3.

TROTTA, Michele; GALLARATE, Marina; CARLOTTI, Maria Eugenia; MOREL, Silvia. Preparation of griseofulvin nanoparticles from water-dilutable microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 254, n. 2, p. 235–242, 2003. DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00029-2.

TYKARSKA, Ewa; GDANIEC, Maria. Toward better understanding of isomorphism of glycyrrhizic acid and its mono- and dibasic salts. **Crystal Growth and Design**, [*S. l.*], v. 13, n. 3, p. 1301–1308, 2013. DOI: 10.1021/cg301768h.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Generally Recognized as Safe (GRAS) database**. 2020. Disponível em: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031071217/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/default.htm>.

UEDA, Keisuke; HATE, Siddhi S.; TAYLOR, Lynne S. Impact of Hypromellose Acetate Succinate Grade on Drug Amorphous Solubility and In Vitro Membrane Transport. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 109, n. 8, p. 2464–2473, 2020. DOI: 10.1016/j.xphs.2020.04.014.

UEDA, Keisuke; KANAYA, Harunobu; HIGASHI, Kenjirou; YAMAMOTO, Keiji; MORIBE, Kunikazu. Molecular-level elucidation of saccharin-assisted rapid dissolution and high supersaturation level of drug from Eudragit® E solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 538, n. 1–2, p. 57–64, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.12.050.

UEDA, Keisuke; TAYLOR, Lynne S. Polymer Type Impacts Amorphous Solubility and Drug-Rich Phase Colloidal Stability: A Mechanistic Study Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 17, n. 4, p. 1352–1362, 2020. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00061.

UEDA, Keisuke; TAYLOR, Lynne S. Partitioning of surfactant into drug-rich nanodroplets and its impact on drug thermodynamic activity and droplet size. **Journal of Controlled Release**, [*S. l.*], v. 330, n. December 2020, p. 229–243, 2021. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.12.018.

USP. **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**. 39. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

VASCONCELOS, Teófilo; MARQUES, Sara; DAS NEVES, José; SARMENTO, Bruno. Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [*S. l.*], v. 100, p. 85–101, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.01.012.

VASCONCELOS, Teófilo; SARMENTO, Bruno; COSTA, Paulo. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, [*S. l.*], v. 12, n. 23–24, p. 1068–1075, 2007. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.09.005.

WALTERS, D. Eric. Glycyrrhizin. *In: The Sweetener Book*. [s.l.] : Gale Walters Publishing, 2013. Disponível em: [https://sweetenerbook.com/glycyrrhizin\\_2.html](https://sweetenerbook.com/glycyrrhizin_2.html).

WANG, Yatian; ZHAO, Boxin; WANG, Shengqi; LIANG, Qianying; CAI, Yun; YANG, Fuheng; LI, Guofeng. Formulation and evaluation of novel glycyrrhizic acid micelles for transdermal delivery of podophyllotoxin. **Drug Delivery**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 1623–1635, 2016. DOI: 10.3109/10717544.2015.1135489.

WARDELL, James L.; LOW, John N.; GLIDEWELL, Christopher. Saccharin, redetermined at 120 K: A three-dimensional hydrogen-bonded framework. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, [S. l.], v. 61, n. 6, 2006. DOI: 10.1107/S1600536805016600.

WARREN, Dallas B.; BENAMEUR, Hassan; PORTER, Christopher J. H.; POUTON, Colin W. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility. **Journal of drug targeting**, [S. l.], v. 18, n. 10, p. 704–31, 2010. DOI: 10.3109/1061186X.2010.525652.

WEBSTER, Gregory K.; JACKSON, J. Derek.; BELL, Robert G. **Poorly Soluble Drugs: Solution and Drug Release**. [s.l.] : Pan Stanford Publishing, 2017.

WIEST, Johannes; SAEDTLER, Marco; BÖTTCHER, Bettina; GRÜNE, Marvin; REGGANE, Maude; GALLI, Bruno; HOLZGRABE, Ulrike; MEINEL, Lorenz. Geometrical and Structural Dynamics of Imatinib within Biorelevant Colloids. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 4470–4480, 2018. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00469.

WILLIAMS, Hywel D.; TREVASKIS, Natalie L.; CHARMAN, Susan A.; SHANKER, Ravi M.; CHARMAN, William N.; POUTON, Colin W.; PORTER, Christopher J. H. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 315–499, 2013. DOI: 10.1124/pr.112.005660.

WILLIAMS, R. O.; WATTS, A. B.; MILLER, D. A. **Formulating Poorly Water Soluble Drugs**. 2. ed. [s.l.] : AAPS Press, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-42609-9.

WILSON, Venecia; LOU, Xiaochun; OSTERLING, Donald J.; STOLARIK, Deanne F.; JENKINS, Gary; GAO, Wenqing; ZHANG, Geoff G. Z.; TAYLOR, Lynne S. Relationship between amorphous solid dispersion In Vivo absorption and In Vitro dissolution: phase behavior during dissolution, speciation, and membrane mass transport. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 292, n. November, p. 172–182, 2018. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.11.003.

WU, Mingfang et al. Resveratrol-loaded glycyrrhizic acid-conjugated human serum albumin nanoparticles wrapping resveratrol nanoparticles: Preparation, characterization, and targeting effect on liver tumors. **Journal of Biomaterials Applications**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 191–205, 2017. DOI: 10.1177/0885328217713357.

WU, Tuoqi; OAKE, Jessy; LIU, Zhongde; BOHNE, Cornelia; BRANDA, Neil R. **Probing the Microenvironments in a Polymer-Wrapped Core-Shell Nanoassembly Using Pyrene Chromophores** **ACS Omega**, 2018. DOI: 10.1021/acsomega.8b00953.

WU, Wenqi; GROHGANZ, Holger; RADES, Thomas; LÖBMANN, Korbinian. Comparison of co-former performance in co-amorphous formulations: Single amino acids, amino acid physical mixtures, amino acid salts and dipeptides as co-formers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 156, n. June 2020, p. 105582, 2021. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105582.

XIE, Xiaoyu; CARDOT, Jean Michel; GARRAIT, Ghislain; THERY, Vincent; EL-HAJJI, Mohamed; BEYSSAC, Eric. Micelle dynamic simulation and physicochemical characterization of biorelevant media to reflect gastrointestinal environment in fasted and fed



states. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [*S. l.*], v. 88, n. 2, p. 565–573, 2014. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.05.020.

YE, Jingyi et al. Comparisons of in vitro Fick's first law, lipolysis, and in vivo rat models for oral absorption on BCS II drugs in SNEDDS. **International Journal of Nanomedicine**, [*S. l.*], v. 14, p. 5623–5636, 2019. DOI: 10.2147/IJN.S203911.

YEAP, Yan Yan; LOCK, Jaclyn; LERKVIKARN, Sean; SEMIN, Tanner; NGUYEN, Nicholas; CARRIER, Rebecca L. Intestinal mucus is capable of stabilizing supersaturation of poorly water-soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, [*S. l.*], v. 296, p. 107–113, 2019. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.11.023.

YOSHIOKA, Minoru; HANCOCK, Bruno C.; ZOGRAFI, George. Crystallization of indomethacin from the amorphous state below and above its glass transition temperature. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], 1994. DOI: 10.1002/jps.2600831211.

YU, Lifang; XIE, Baoyuan; LU, Weigen; CHEN, Qinghua; GONG, Mingtao. **Supersaturated cationic self-emulsified drug delivery system and its preparation method** 2006.

YUAN, Siwen; GOPAL, Jannu Vinay; REN, Shuya; CHEN, Litong; LIU, Lan; GAO, Zhizeng. Anticancer fungal natural products: Mechanisms of action and biosynthesis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [*S. l.*], v. 202, p. 112502, 2020. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112502.

ZHANG, Gang Chun; LIN, Hong Liang; LIN, Shan Yang. Thermal analysis and FTIR spectral curve-fitting investigation of formation mechanism and stability of indomethacin-saccharin cocrystals via solid-state grinding process. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [*S. l.*], v. 66, p. 162–169, 2012. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.03.039.

ZHANG, Jie; SHI, Qin; TAO, Jun; PENG, Yayun; CAI, Ting. Impact of Polymer Enrichment at the Crystal-Liquid Interface on Crystallization Kinetics of Amorphous Solid Dispersions. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 16, n. 3, p. 1385–1396, 2019. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01331.

ZHENG, Kai; LIN, Zhixing; CAPECE, Maxx; KUNNATH, Kuriakose; CHEN, Liang; DAVÉ, Rajesh N. Effect of Particle Size and Polymer Loading on Dissolution Behavior of Amorphous Griseofulvin Powder. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 108, n. 1, p. 234–242, 2019. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.11.025.

ZHOU, Deliang; ZHANG, Geoff G. Z.; LAW, Devalina; GRANT, David J. W.; SCHMITT, Eric A. Thermodynamics, molecular mobility and crystallization kinetics of amorphous griseofulvin. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 5, n. 6, p. 927–936, 2008. DOI: 10.1021/mp800169g.

ZHOU, Li; LIU, Chunli. Enthalpies of transfer of amino acids from water to aqueous solutions of N-methylacetamide and N,N-dimethylacetamide at T = 298.15 K. **Thermochimica Acta**, [*S. l.*], v. 482, n. 1–2, p. 72–74, 2009. DOI: 10.1016/j.tca.2008.10.011.



## APÊNDICE

Figura A 1. Capa do artigo publicado referente aos resultados apresentados no capítulo II desta tese.



## Could the small molecules such as amino acids improve aqueous solubility and stabilize amorphous systems containing Griseofulvin?



Maria Terezinha França, Tatyane Martins Marcos, Rafael Nicolay Pereira, Hellen Karine Stulzer\*

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Co-amorphous systems. Amino acids. Solubility. Supersaturation. Griseofulvin. Poorly soluble drugs

### ABSTRACT

Griseofulvin (GSF) is an antifungal drug that has low aqueous solubility and low oral bioavailability. Amorphous systems are capable to promote rapid drug dissolution, usually affording concentrations above drug solubility in the gastrointestinal tract (supersaturation) in order to promote better absorption. Thus, the aim of this work was to evaluate the ability of amino acids, as hydrophilic carriers, to improve drug kinetic solubilization and to stabilize GSF supersaturated solutions, as well as to stabilize GSF amorphous systems at solid-state. The effect of 5 amino acids on GSF precipitation behavior was investigated by solvent shift method. Amorphous systems were developed by ball milling (GSF + amino acid 1:1 M ratio) and Quench Cooling (to obtain GSF QC) techniques. The samples were characterized by solid-state techniques, submitted to *in vitro* kinetic solubility studies and evaluated under stability tests. Aspartic acid, methionine, valine and tryptophan demonstrated similar anti-precipitant abilities in phosphate buffer pH 6.5. However, in FaSSIF biorelevant medium, tryptophan was only one able to slow down the drug precipitation. The characterization of milled samples showed that an amorphous system was obtained just using the combination of the drug with tryptophan (GSF-TRYP BM). At the higher dose tested (0.850 mmol L<sup>-1</sup>) during *in vitro* kinetic solubility studies, this amorphous system increased the AUC in FaSSGF (88.6%) and FaSSIF (58.2%) media when compared to GSF QC. Thus, the ability of this amino acid to inhibit GSF precipitation appears to be dependent on its concentration in solution and could be optimized. During the stability study, TRYP inhibited GSF recrystallization in the solid-state for a period of 12 months, whereas GSF QC recrystallized in 1 week.

### 1. Introduction

Supersaturating drug delivery systems (SDDS), such as amorphous systems, are very attractive strategies to improve drug absorption, once this high energetic system could dissolve quickly and achieve concentrations above drug solubility in the gastrointestinal tract (Brouwers et al., 2009). This condition, known as supersaturation, may improve drug oral absorption when maintained for an extended time interval during BCS II drug dissolution. However, supersaturated solutions, as well as amorphous systems at solid-state, are thermodynamic unstable. Commonly, pharmaceutical formulations require the addition of excipients that could stabilize a drug above its solubility concentration in supersaturated solutions and in amorphous systems at solid-state, in order to retard recrystallization in both situations. In

these cases, the use of polymers has been extensively studied. However, sometimes, large polymer amounts are required in amorphous formulations to stabilize fast-crystallizing drugs (Chen et al., 2015; Laitinen et al., 2017; Liu et al., 2015; Newman et al., 2018), making polymer application difficult in final dosage forms of drugs with high dose.

Recent studies have been introducing the application of amino acids on the stabilization of amorphous systems, as a form of co-amorphous systems. These systems comprise a combination of two or more low molecular weight components that could form a homogeneous amorphous single-phase system. Small molecules, like amino acids, demonstrated promising results about the solid-state stabilization of ionizable drugs, when used as carriers in co-amorphous salts development (Dengale et al., 2016; Kasten et al., 2016; Laitinen et al., 2017;

**Abbreviations:** AUC, Area Under the Curve; BM, Ball milling; BCS, Biopharmaceutics Classification System; DSC, Differential Scanning Calorimetry; FaSSGF, Fasted State Simulated Gastro Fluid; FaSSIF, Fasted State Simulated Intestinal Fluid; FTIR, Fourier Transform Infrared; GSF, Griseofulvin; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; ASP, L-aspartic acid; LYS, L-lysine; VAL, L-valine; mDSC, Modulated DSC; QC, Quench Cooling; SEM, Scanning Electron Microscopy; SDDS, Supersaturating drug delivery systems; TRYP, Tryptophan; UV, Ultraviolet; XRPD, X-ray Powder Diffraction

\* Corresponding author.

E-mail address: [hellen.stulzer@ufsc.br](mailto:hellen.stulzer@ufsc.br) (H.K. Stulzer).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105178>

Received 30 July 2019; Received in revised form 25 November 2019; Accepted 4 December 2019


Available online 05 December 2019

0928-0987/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Figura A 2. Capa do artigo publicado referente aos resultados apresentados no capítulo IV desta tese.

Journal of Molecular Liquids 301 (2020) 112336

---




ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

**Journal of Molecular Liquids**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molliq](http://www.elsevier.com/locate/molliq)




---

## The role of glycyrrhizic acid in colloidal phenomena of supersaturation drug delivery systems containing the antifungal drug griseofulvin

Maria Terezinha França<sup>a</sup>, Tatyane Martins Marcos<sup>a</sup>, Paulo F. A. Costa<sup>b</sup>,  
Adriana P. Gerola<sup>b</sup>, Hellen Karine Stulzer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Pharmaceutical Sciences Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 880-40-900, SC, Brazil  
<sup>b</sup> Chemistry Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 880-40-900, SC, Brazil



---

**ARTICLE INFO**

*Article history:*  
Received 17 September 2019  
Received in revised form 10 December 2019  
Accepted 16 December 2019  
Available online 19 December 2019

*Keywords:*  
Glycyrrhizic acid  
Precipitation inhibitor  
supersaturation  
Poorly soluble drug  
phase separation  
Griseofulvin.

**ABSTRACT**

The ability of carriers to inhibit precipitation may determine supersaturating drug delivery systems capability of improving poorly soluble drugs bioavailability. It was hypothesized that glycyrrhizic acid (GA), a potential drug solubility enhancer, could act as a precipitation inhibitor in supersaturated solutions of the poorly soluble drug griseofulvin. Also, it was investigated the effect of biorelevant medium on GA colloidal formation and on drug phase separation. Phase separation studies were monitored by UV-Vis relative light scattering, UV absorbance, drug fluorescence intensity, dynamic light scattering and polarized light microscopy. The impact of biorelevant medium on GA colloidal properties was evaluated by conductivity, dynamic light scattering and pyrene fluorescence. GA maintained high drug supersaturated solution concentration in buffer pH 6.5 ( $>0.38 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and FaSSiF ( $>0.60 \text{ mmol L}^{-1}$ ) for 4 h. The FaSSiF + GA combination provided a colloidal microenvironment polarity similar to organic solvents even in aqueous medium, increasing the maximum free drug concentration ( $0.89 \text{ mmol L}^{-1}$ ) before phase separation and impacting on precipitation type. Amorphous aggregates, obtained under these conditions, can sustain high free drug concentrations in gastrointestinal tract. The significance of this paper is to show the use of GA as an effective tool to overcome the biopharmaceutical limitations of a poorly soluble drug, such as GSF, enlightening the GA ability to form aggregates/micelles at biorelevant medium that could act as precipitation inhibitor.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

---

**1. Introduction**

Over the last decades, the implementation of new technologies on pharmaceutical industry's screening methods has been affording the discovery of a large number of new active pharmaceutical compounds with high lipophilicity. Consequently, these drugs also exhibit poor aqueous solubility, which usually entails dissolution and bioavailability impairments when they are orally administered [1,2].

The modulation of drug solubility properties has been explored through many formulation strategies, such as supersaturating drug delivery systems. By dissolving quickly, such systems lead to a prominent drug supersaturation (temporary drug concentrations above its saturation solubility) in gastrointestinal fluids [3,4]. However, supersaturated solutions have an increased chemical potential (compared to corresponding saturated or unsaturated solutions), making this condition

thermodynamically unstable. Thus, precipitations can occur in supersaturated solutions, reducing drug concentration and losing the advantages of these systems [5,6]. Besides the inherent recrystallization propensity of the drug, the ability of supersaturating drug delivery systems to hold out recrystallization facilitated by the solvents, over a desired time, also depends on the ability of their constituents to postpone nucleation and crystal grow process [7]. Current *in vitro* and *in vivo* researches have shown that during dissolution of supersaturating systems, the reached drug concentration might surpass the limit of free drug miscible in an aqueous medium, when recrystallization is effectively inhibited. Thereafter, a phase separation might cause formation of drug colloidal aggregation, as well as amorphous precipitation. Although these amorphous aggregates are not able to permeate through biological membranes, they can quickly dissolve, maintaining supersaturation at high concentration levels through replenishing absorbed drug fraction [8–10].

The gastrointestinal fluid composition affects hydrophobic drug solubility and precipitation [11,12]. Nevertheless, the bile salts contribution on supersaturation maintenance is usually not enough to avoid recrystallization and, sometimes, even have the opposite effect for some drugs. Biorelevant media application in supersaturation studies

---

Abbreviations: DLS, dynamic light scattering; FaSSiF, fasted state simulated intestinal fluid; GSF, griseofulvin; GA, glycyrrhizic acid; PBpH6.5, phosphate buffer pH 6.5; PLM, polarized light microscopy.  
\* Corresponding author.  
E-mail address: [hellen.stulzer@ufsc.br](mailto:hellen.stulzer@ufsc.br) (H.K. Stulzer).

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112336>  
0167-7322/© 2019 Published by Elsevier B.V.

Tabela A 1. Deslocamentos químicos nos espectros de  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) de griseofulvina (GSF), ácido glicirrízico (GA) e meio biorrelevante (Taurocolato de Sódio (TC) e Lecitina (L)), obtidos de forma independente em tampão pH 6,5 ou em associação.

Código grupamento correspondente	Deslocamento químico ( $\delta$ , ppm)						
	GSF+ pH 6,5	GA + pH 6,5	GA + GSF + pH 6,5	FaSSIF	GA + FaSSIF	GA + GSF + FaSSIF	GSF + FaSSIF
TC 18 (s)	-	-	-	0,7062	0,7005	0,6956	0,7054
GA 24 (s)	-	0,7899	0,7871	-	0,7920	0,7895	-
GA 28 (s)	-	0,8112	0,8109	-	0,8152	0,8130	-
GA 5 (s)	-	0,8595	0,8566		S	S	-
TC19 (s)	-	-	-	0,9054	0,9005	0,8971	0,9050
GSF 15 (d)	0,9148	-	0,9128	-	-	S	S
TC 21 (d)	-	-	-	0,9754	0,9772	0,9734	0,9741
GA 23	-	1,0196	1,0179	-	1,0224	1,0197	-
GA 29	-	1,0492	1,0483	-	1,0531	1,0511	-
GA 25	-	1,0992	1,0965	-	1,1007	1,0982	-
GA 27	-	1,1054	1,0965	-	1,1069	1,0982	-
GA 26	-	1,3919	1,3812	-	1,3919	1,3856	-
GA 9 (s)	-	2,5536	2,5350	-	2,5400	2,5315	-
GSF 4 <sup>a</sup> (dd)	2,5726	-	S	-	-	BI	BI
GSF 3 e 4b (m)	2,74- 3,05	-	2,76-3,00	-	-	BI	BI
TC 26 (t)	-	-	-	3,0672	3,0686	3,0652	3,0642
L 4	-	-	-	3,2394	3,2374	3,2353	3,2385
GA 3 e 2B	-	3,2994- 3,3994	3,2860- 3,3941	-	S*	S*	S
TC 3 (m)	-	-	-	3,4809	S*	S*	3,4874
GA 4 <sup>a</sup> , 4B, 3B	-	3,5032- 3,5570	3,5011- 3,5527	-	S*	S*	-
TC 25 (t)	-	-	-	3,5573	3,5572	3,5543	3,5554
GA 5A, 5B, 3A, 2 <sup>a</sup> (m)	-	3,6304- 3,6911	3,6294- 3,6947	-	3,6304- 3,6979	S*	-
L 2	-	-	-	3,6742	S*	S*	3,6763
GSF 18 (s)	3,7235	-	3,7230	-	-	3,7186	3,7215
TC 7	-	-	-	3,8829	3,8789	3,8731	3,8804
GSF 23 (s)	3,9984	-	3,9949	-	-	3,9980	4,0020
TC 12	-	-	-	4,0421	4,0366	4,0295	4,0399
GSF 21 (s)	4,0847	-	4,0882	-	-	4,0765	4,0830
LH1	-	-	-	4,3009	4,2930	4,2893	4,2993
L db	-	-	-	5,2945	5,2970	5,2940	5,2929
GA 12 (s)	-	5,6824	5,6811	-	5,6848	5,6826	-
GSF 6 (s)	5,7464	-	5,7451	-	-	5,7392	5,7408
GSF 11 (s)	6,4750	-	6,4749	-	-	6,4794	6,4803

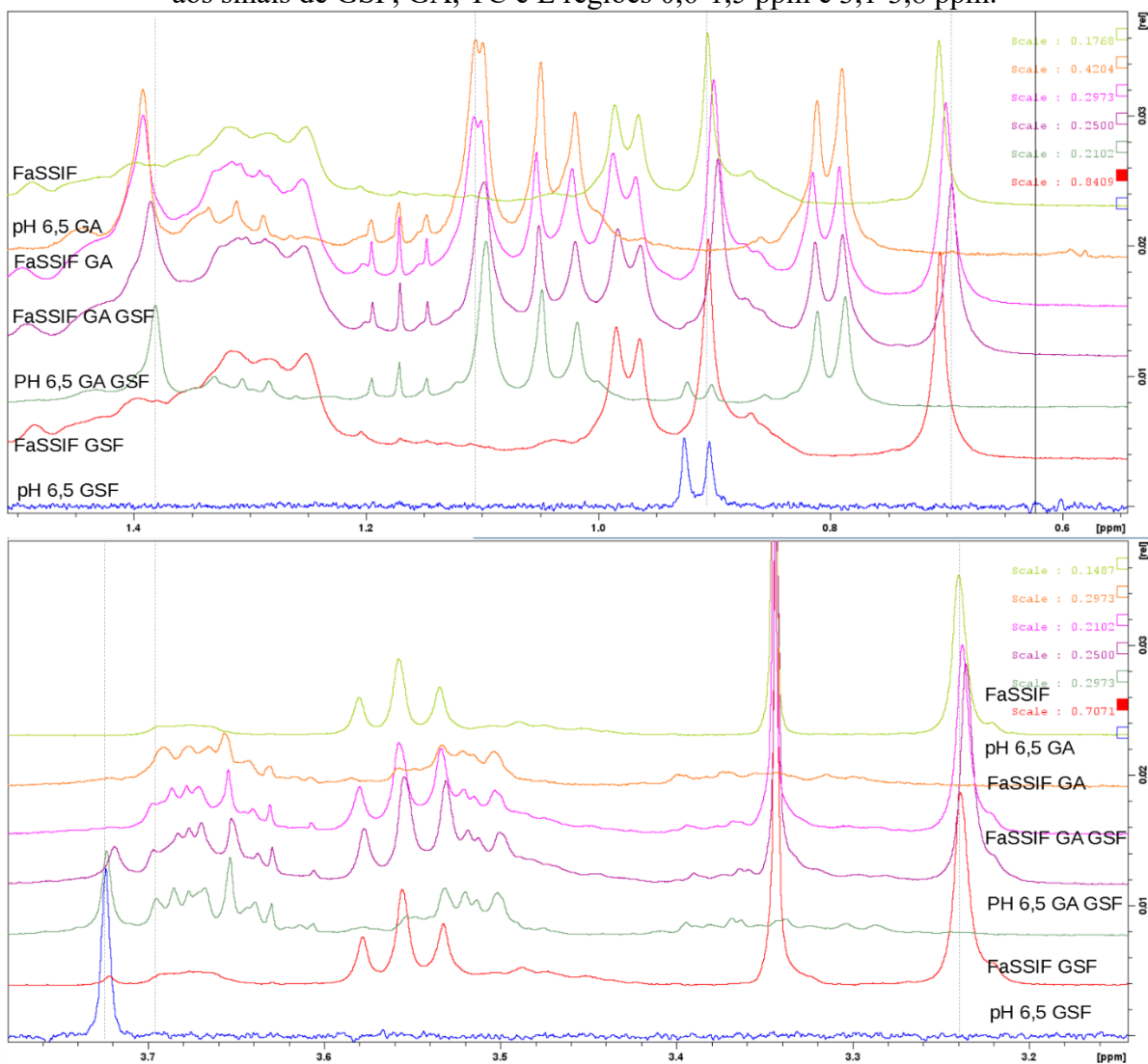
Legenda: \*O deslocamento químico de alguns próton não foi determinado devido a sobreposição de picos (S) ou baixa intensidade do pico (BI). As atribuições dos grupamentos correspondentes à cada deslocamento químico foi realizada por comparação com dados existente na literatura ((GSF, RIBEIRO et al., 2012)(GA, PETROVA et al., 2017) (TC e L, WIEST et al., 2018)).

Tabela A 2. Alterações detectadas nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da GSF, GA e meio biorrelevante em associações, quando comparados aos espectros de cada componente independente.

Código grupamento correspondente	Alterações no deslocamento químico de prótons ( $\Delta\delta$ , ppm) em comparação a cada componente independente em cada meio. *			
	GA + GSF + pH 6,5	GA + FaSSIF	GA + GSF + FaSSIF	GSF + FaSSIF
TC 18 (s)	-	1,71	3,18	-
TC19 (s)	-	-	2,49	-
GA 27	2,67	-	2,16	-
GA 26	3,21	-	2,49	-
GA 9 (s)	5,58	4,08	6,63	-
TC 3 (m)	-	-	-	1,95
TC 7	-	-	2,94	-
TC 12	-	1,65	3,78	-
GSF 21 (s)	-	-	2,46	-
LHI	-	2,37	3,48	-
GSF 6 (s)	-	-	2,16	1,68
GSF 11 (s)	-	-	-	1,59

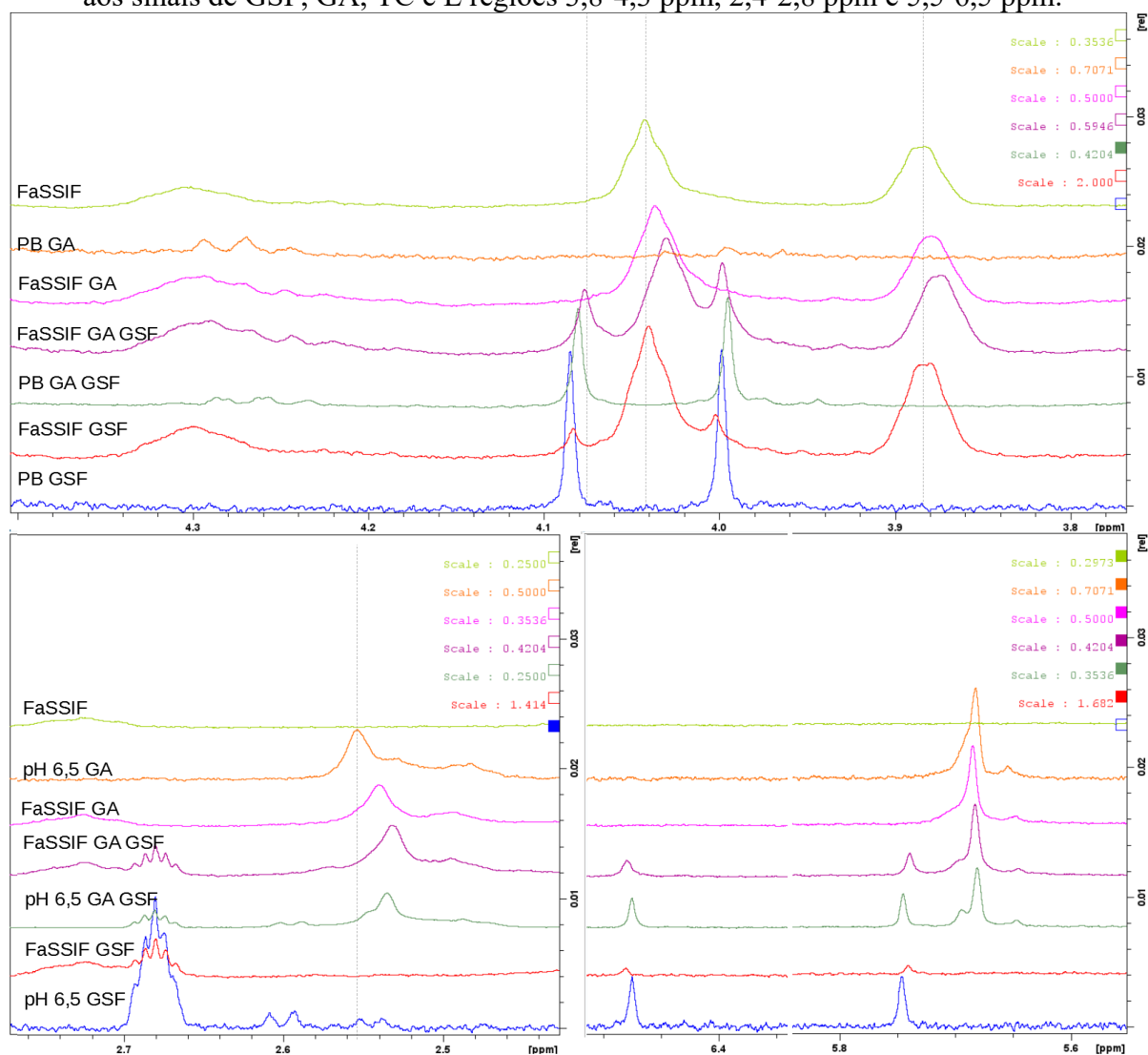
Legenda: \*Foram descritas na tabela apenas  $\Delta\delta$  superiores a 1,5 Hz.

Figura A 3. Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da região correspondente aos sinais de GSF, GA, TC e L regiões 0,6-1,5 ppm e 3,1-3,8 ppm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura A 4. Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da região correspondente aos sinais de GSF, GA, TC e L regiões 3,8-4,3 ppm, 2,4-2,8 ppm e 5,5-6,5 ppm.



Fonte: Elaborado pela autora.