

Ana Carolina de Melo Miranda

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS GASTRORRETENTIVOS  
DO TIPO DOME MATRIX CONTENDO BENZNIDAZOL E  
ESTRATÉGIAS PARA MELHORIA DA SOLUBILIDADE  
AQUOSA E REDUÇÃO DA TOXICIDADE**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Doutor em  
Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio  
Segatto Silva

Coorientadora: Profa Dra. Bianca  
Ramos Pezzini

Florianópolis  
2016



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

Miranda, Ana Carolina de Melo  
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS GASTRORETENTIVOS DO TIPO  
DOME MATRIX CONTENDO BENZNIDAZOL E ESTRATÉGIAS PARA  
MELHORIA DA SOLUBILIDADE AQUOSA E REDUÇÃO DA TOXICIDADE /  
Ana Carolina de Melo Miranda ; orientador, Marcos Antônio  
Segatto Silva ; coorientadora, Bianca Ramos Pezzini. -  
Florianópolis, SC, 2016.  
210 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Benznidazol. 3. Dome Matrix®. 4.  
Sistemas binários comoídos. 5. Cocristais. I. Segatto  
Silva, Marcos Antônio. II. Ramos Pezzini, Bianca. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Farmácia. IV. Título.



Este trabalho é dedicado aos pacientes  
chagásicos que aguardam o alívio para  
sua condição.



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcos Segatto pela orientação, por todo apoio, confiança e muito rock'n'roll nesta empreitada.

A professora Bianca Pezzini pela orientação e esforço para que o nosso trabalho fosse feito da melhor forma possível.

As professoras Simone Cardoso e Silvia Cuffini, por trazerem dias mais leves com a alegria contagiante e amizade.

Ao professor Mario Steindel e a pós doutoranda Milene Moraes, pelo apoio e ensinamentos fundamentais na realização deste trabalho.

Aos amigos pela parceria que vai muito além da ciência Tati, Juli, Aline “bolchevique”, Thais, Vivi, Jessica, Robs, Gis, Gabi, Pablito, Andrea Koroishi e Costa Rica, Camila, Lari, Paulo, Rafa, Cinira, Thiaguinho, Hellen, Brenda, Fabiana, Paola, Amarilis, Maria, Jadel e Daia. Obrigada pela amizade e por sempre estarem por perto.

Ringrazio il Professor Paolo Colombo e la Professoressa Alessandra Rossi per avermi dato la possibilità di svolgere parte del mio lavoro di tesi nel loro laboratorio di ricerca (Dipartimento di farmacia, Università di Parma, Italia), contribuendo ad arricchirmi sia sul piano professionale che umano, grazie ai loro consigli.

Un ringraziamento speciale ai miei amici Andrea, Enrico, Anna Giulia, Giulia, Ilaria, Davide, Paula, Valeria, Carolina, Catarina, Irene, Elena, Veronica, Francesco Martinelli e Francesco Guarneri, Marica, Thais e Serena che hanno reso questa esperienza indimenticabile e per avermi permesso di lavorare in un ambiente accogliente.

A minha mãe Nelci, irmã Adriana e avó Antônia, minha querida família que me dá amor e suporte em todos os momentos da vida. .

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

À UFSC e PGFAR por viabilizarem o projeto.

E a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.





“Assim como casas são feitas de pedras, a ciência é feita de fatos. Mas uma pilha de pedras não é uma casa e uma coleção de fatos não é, necessariamente, ciência”.  
(Jules Henri Poincaré)



## RESUMO

O fármaco Benznidazol (BNZ) apresenta baixa solubilidade aquosa, o que pode comprometer a sua biodisponibilidade oral, trazendo a necessidade de utilização de tecnologias que melhorem a suas características farmacocinéticas. A estabilidade do BNZ foi avaliada, indicando que o fármaco é fotolábil, suscetível a hidrólise alcalina, a oxidação e degradação por moagem de alta energia. O método indicativo de estabilidade por CLAE mostrou ser capaz de separar o BNZ de seus produtos de degradação, sendo validado e considerado específico, linear, sensível, preciso, exato e robusto. Os comprimidos de liberação prolongada flutuantes do tipo Dome Matrix<sup>®</sup> contendo BNZ desenvolvidos demonstraram que um maior percentual de HPMC K15M (30%) leva a uma liberação mais lenta do fármaco. Maiores quantidades do polímero HPMC L3LV influenciaram positivamente na velocidade de dissolução de BNZ. Entretanto, quantidades superiores a 20% deste polímero promoveram a rápida desintegração dos comprimidos. Com a finalidade de aprimorar a dissolução do fármaco em meio ácido, foram produzidas formulações com os carreadores de Eudragit<sup>®</sup> EPO, L100 e PVPVA. O aumento da velocidade de dissolução do BNZ pode ser atribuído ao somatório da redução do tamanho de partícula e ao efeito carreador dos polímeros selecionados, sendo que as formulações que continham Eudragit<sup>®</sup> EPO e PVPVA apresentaram o melhor desempenho. A formação de novos sólidos cristalinos foi observada com os ácidos dicarboxílicos, planares de cadeia ímpar: fumárico, succínico, maleico e oxálico.2H<sub>2</sub>O. Os cocristais obtidos exibiram mudanças positivas nas propriedades físico-químicas do fármaco, como maior estabilidade de luz e aumento da concentração de supersaturação em meio aquoso. Os produtos obtidos neste trabalho: DSMBPVPVA, DSMBEPO, COMAL, COSUCC e COOX se mostraram promissores para o tratamento da doença de Chagas. A redução da CI<sub>50</sub> e o aumento do IS, aliados a baixa toxicidade celular, trazem boas perspectivas para a melhoria da efetividade de BNZ.

**Palavras-chave:** Benznidazol, estabilidade, Dome Matrix<sup>®</sup>, sistemas binários comoídos, cocristais.



## ABSTRACT

Benznidazole (BNZ) has poor water solubility, which can compromise the oral bioavailability, for this reason it is necessary, the use of pharmaceutical technology to improve pharmacokinetics characteristics of the drug. The stability was evaluated and it indicated that the drug is photosensitive, susceptible to alkaline hydrolysis, oxidation and degradation by high-energy milling. The stability-indicating HPLC method was able to separate BNZ from degradation products, which was validated and showed to be specific, linear, sensitive, precise, accurate and robust. The prolonged release floating tablets, Dome Matrix<sup>®</sup> type, was developed and it showed that a higher percentage of HPMC K15M (30%) reduces the BNZ releases. In addition, larger amounts of HPMC L3LV polymer improve BNZ dissolution rate. However, amounts greater than 20%, promoted the rapid disintegration of tablets. In order to enhance the drug dissolution rate in acid medium, formulations were produced with the carrier Eudragit<sup>®</sup> (EPO, L100) and PVPVA. The BNZ increased dissolution rate can be attributed to the sum of effects from particle size reduction of the drug and the selected polymers type. The formulations containing Eudragit<sup>®</sup> EPO and PVPVA achieved the best performance. The formation of novel crystalline materials was observed with dicarboxylic acids, odd planar chains: fumaric, succinic, maleic and oxálico.2H<sub>2</sub>O. The cocrystals obtained showed positive changes in the physicochemical properties of the drug, such as greater light stability and increased supersaturation concentration in an aqueous medium. The products obtained in this study: DSMBPVPVA, DSMBEPO, COMAL, COSUCC and COOX have proved themselves promising for the treatment of Chagas disease. The reduction and increase of IC<sub>50</sub>, SI, coupled with low cell toxicity, which brings good prospect for improving the effectiveness of BNZ.

**Keywords:** Benznidazole, stability, Dome Matrix<sup>®</sup>, co-ground binary systems, cocrystals.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do fármaco BNZ.....	37
Figura 2: Quadro representativo do SCB e critérios de elegibilidade de fármacos para testes de bioequivalência <i>in vivo</i> .....	40
Figura 3: Mudanças macroscópicas em sistemas matriciais que intumescem e sofrem erosão adaptado de .....	42
Figura 4: Estrutura química do HPMC. O radical R indica os substituintes que podem ser: $-\text{CH}_3$ , $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ ou um átomo de hidrogênio (SIEPMANNA e PEPPAS, 2001).....	43
Figura 5: Configurações dos módulos e montagem do sistema Dome Matrix® .....	44
Figura 6: Moinho planetário de bolas. Fonte: Manual Fritsch Pulverisette .....	50
Figura 7: Estrutura dos monômeros dos polímeros Eudragit® E L100 (a) e E PO (b) .....	52
Figura 8: N-Vinil-2-pirrolidona e acetato de vinila (PVP/VA S 630®) 54	
Figura 9: Representação esquemática de sólidos cristalinos multicomponentes. Solvato; cocristal; sal, respectivamente. API-ingrediente ativo farmacêutico .....	55
Figura 10: Esquema da abordagem <i>Spring</i> e <i>Parachute</i> que promove e mantém a supersaturação de fármacos em solução, respectivamente ...	56
Figura 11: Exemplos de síntons supramoleculares homosíntons na porção superior e heterosíntons na inferior .....	57
Figura 12: Diagrama esquemático de uma onda construtiva segundo a lei de Bragg .....	60
Figura 13: DRXP de $\text{PbTiO}_3$ submetidos a diferentes tempos de moagem em moinho de bolas (5mm) .....	61
Figura 14: Desenho esquemático da prensa e do aparato para dissolução intrínseca em disco rotatório .....	66
Figura 15: Percentual de BNZ quantificado nas amostras após teste de degradação forçada.....	78
Figura 16- Perfis de dissolução dos comprimidos do tipo Dome Matrix® contendo BNZ, $T=37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$ , HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL. ....	92
Figura 17- Solubilidade aquosa de BNZ, das misturas físicas fármaco: polímero 1:1(m/m), método <i>shake-flask</i> , 150 rpm, $37 \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ , pelo período de 48h.....	107
Figura 18: Perfis de dissolução das formulações obtidas por LAG, $T=37 \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$ , HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL. ....	108

Figura 19: Perfis de dissolução das SBMB contendo EPO, T=37 ±0,5°C, HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL. ....	111
Figura 20: Perfil de dissolução das SBMB contendo PVPVA, T=37°C ±0,5°C, HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL. ....	112
Figura 21: Gráficos % probabilidade <i>Half-Normal</i> em função do efeito padronizado-DoE DSMBPVPVA.....	116
Figura 22: Padrões de DRXP de BNZ matéria-prima (BNZMP) e simulado a partir do DRX do monocristal (BNZCALC); formulações obtidas por LAG contendo os polímeros L100, EPO e PVPVA.....	118
Figura 23: Padrões de DRXP de BNZ matéria-prima (BNZMP) e os SBMB contendo o polímero EPO.....	118
Figura 24: Padrões de DRXP de BNZ matéria-prima (BNZMP) e os SBMB contendo o polímero PVPVA. ....	119
Figura 25: Fotomicrografias obtidas por MEV referentes as amostras: BNZMP, EPO, PVPVA, LAGL100, LAGEPO e LAGPVPVA. Aumento 500X.....	121
Figura 26: Fotomicrografias obtidas por MEV referentes as amostras SBMB –EPO F2-F9. Formulações 2, 3, 5 e 8, proporção fármaco: polímero1:1 (m/m) e 4, 6, 7 e 9 - 2:1 (m/m). ....	122
Figura 27: Fotomicrografias obtidas por MEV referentes as amostras SBMB - PVPVA F2-F9. Formulações 2, 3, 5 e 8, proporção fármaco: polímero1:1 (m/m) e 4, 6, 7 e 9 - 2:1 (m/m). ....	123
Figura 28: Curvas de DSC relativos a BNZ, MF polímeros e suas respectivas SBMB: EPO; PVPVA. MF e formulações 2, 3, 5 e 8, proporção fármaco: polímero1:1 (m/m) e 4, 6, 7 e 9 - 2:1 (m/m). ....	125
Figura 29: Curvas de TG relativas a BNZ, MF polímeros e suas respectivas SBMB: EPO; PVPVA e curvas de. MF e formulações: F5 proporção fármaco: polímero1:1 (m/m) e F6 e F9 - 2:1 (m/m).....	126
Figura 30: Representação da célula unitária do monocristal de BNZ e suas respectivas ligações de H intermoleculares, linhas tracejadas. ....	127
Figura 31: Espectros de IV de BNZMP, EPO, MF e sua respectiva SBMB .....	128
Figura 32- Espectros de IV de BNZMP, PVPVA, MF e sua respectiva SBMB. ....	128
Figura 33: Comparação dos ângulos de contato formados por gotas de água (destilada) em comprimidos de: BNZMP, SBMBEPO e SBMBPVPVA .....	130
Figura 34: Mapa das interações mais favoráveis de BNZ (regiões mais escuras da figura), gerado pelo programa Mercury 3.5 (plataforma CSD). ....	139



Figura 35: Cadeias de BNZ formadas pelas interações amida intermoleculares, gerado pelo programa Mercury 3.5 (plataforma CSD). .....	140
Figura 36: Estrutura molecular dos <i>coformers</i> utilizados na triagem..	141
Figura 37: Comparação-resumo dos difratogramas dos cocristais contendo BNZ obtidos durante a triagem.....	142
Figura 38: Comparação-resumo das curvas DSC dos novos materiais cristalinos contendo BNZ obtidos durante a triagem. ....	143
Figura 39: Fotomicrografias dos novos materiais cristalinos obtidos e dos materiais de partida. ....	146
Figura 40: Comparação dos padrões de difração calculado e experimental do cocristal de BNZ com ácido succínico (COSUC). ....	148
Figura 41: Comparação das celas unitárias de BNZ e COSUC. ....	149
Figura 42: Interações supramoleculares observadas em COSUC, destacando-se sua unidade assimétrica.....	150
Figura 43: Empacotamento das moléculas observado em COSUC, destacando-se os domínios BNZ- <i>coformer</i> -BNZ e a orientação dos “ <i>motifs</i> ” em zig-zag. “A” representa o plano ao longo das ligações de hidrogênio amida-amida; “B” representa o plano perpendicular às ligações de hidrogênio amida-amida.....	151
Figura 44: Morfologia calculada para COSUC, gerado pelo programa Mercury 3.5 (plataforma CSD), método <i>Bravais-Friedel-Donnay-Harker</i> . ....	152
Figura 45: Esquema-resumo dos resultados obtidos durante <i>screening</i> de cocristais contendo BNZ. ....	153
Figura 46: Curvas de solubilidade dos cocristais de BNZ, solução HCl 0,1 M, pH 1,2 e tampão acetato de amônio, pH 7,5, 150 rpm.....	157
Figura 47: Atividade tripanocida dos sistemas de liberação de BNZ (50 µM) e de seus excipientes sobre amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> pelo método colorimétrico .....	166



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Termos descritivos de solubilidade e seus significados, adaptada .....	64
Tabela 2- Resultados relativos a precisão do método indicativo de estabilidade proposto.....	74
Tabela 3-Resultados relativos a exatidão do método indicativo de estabilidade proposto.....	75
Tabela 4-Condições cromatográficas e variações investigadas para o teste de robustez .....	75
Tabela 5- Adequação do sistema do método indicativo de estabilidade proposto.....	76
Tabela 6- Composição das formulações dos módulos Dome Matrix <sup>®</sup> , Ø=9,2 mm, para comprimidos de BNZ-100mg.....	83
Tabela 7- Resultados da análise de variância (MANOVA) dos perfis de dissolução dos comprimidos de BNZ.....	93
Tabela 8- Análise descritiva e dados de dissolução dos comprimidos de BNZ (n=10) - ANOVA .....	94
Tabela 9- Parâmetros dos modelos matemáticos e regressão estatísticas descritivas para os dados de dissolução dos comprimidos contendo BNZ. ....	96
Tabela 10- Fatores de similaridade ( <i>f2</i> ) x de diferença ( <i>f1</i> ) para os dados de dissolução dos comprimidos contendo BNZ. ....	97
Tabela 11: Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> .....	103
Tabela 12 - Valores médios dos parâmetros cinéticos (desvios-padrão derivados dos perfis de dissolução dos SBMBEPO).....	110
Tabela 13 - Valores médios dos parâmetros cinéticos (desvios-padrão derivados dos perfis de dissolução dos SBMPVPVA. ....	112
Tabela 14- Análise de variância do modelo PVPVA (resposta AUC). Soma parcial de quadrados - Tipo III.....	114
Tabela 15- Análise de variância do modelo PVPVA (resposta DE). Soma parcial de quadrados - Tipo III.....	114
Tabela 16- Lista dos efeitos padronizados e porcentagem de contribuição Margem de erro (ME) e margem de erro simultânea (SME) no DoE SBMBPVPVA.....	115
Tabela 17- Atribuição das bandas de absorção IV de BNZ, polímeros e SBMB.....	129
Tabela 18- Componentes da síntese de cocristais pelo método de reação .....	135

Tabela 19- Resumo das bandas de absorção IV dos produtos de cocristalização de BNZ. ....	144
Tabela 20- Parâmetros de cela e informações cristalográficas da estrutura do cocristal de BNZ com ácido succínico (COSUC) resolvida. ....	147
Tabela 21- Resultados relativos a % de recuperação de BNZ pós experimentos de fotodegradação.....	159
Tabela 22 - Atividade dos sistemas de liberação de BNZ sobre amastigotas de <i>T. cruzi</i> expressando $\beta$ -gal (método colorimétrico) e citotoxicidade para células THP-1. ....	168
Tabela 23- Citotoxicidade dos excipientes sobre células THP-1. ....	168

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ângstrons
Ac	Acetona
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BNZ	Benznidazol
BT	Banho-termostático
C	Celsius
CEFAR	Coordenação de Equivalência Farmacêutica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetros
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
<i>C<sub>max</sub></i>	Concentração plasmática máxima
CSD	“Cambridge Structural Database”
d	Distância
DNDi	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DPR	Desvio padrão relativo
DRXMC	Difração de raios-X de monocristal
DRXP	Difração de raios-X de pó
DS	Dispersões Sólidas
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Derived Thermogravimetric analysis
EL100	Eudragit L100
EPO	Eudragit PO
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
g	Grama
h	Hora
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
J	Joule
K	Kelvin
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
kJ	Quilojoule
kV	Quilovolt
L	Litro

LAFEPE	Laboratório Federal de Pernambuco
LAG	“ <i>Liquid Assisted Grinding</i> ” ou Moagem Assistida.
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Massa
mA	Miliampére
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
mg	Miligramma
min	Minuto
mJ	Milijoule
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MW	Micro-ondas
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PEG	Polientilenoglicol
PVP/VA	Polivípirrolidona Acetato de Vinila
Q	Velocidade de Dissolução
RDC	Resolução diretoria colegiada
Tg	Glass transition
TGA	Thermogravimetric analysis
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	23
1 INTRODUÇÃO .....	29
1.1 OBJETIVO GERAL.....	31
1.1.1 Objetivos específicos.....	31

## REVISÃO DE LITERATURA

1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS .....	33
1.1.2 Benznidazol.....	36
2 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO.....	39
2.1 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA	39
2.2 FORMAS FARMACÊUTICAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA .....	41
2.2.1 Sistemas de liberação prolongada gastrorretentivos do tipo Dome Matrix® .....	43
2.3 DISPERSÕES SÓLIDAS COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTO DA SOLUBILIDADE AQUOSA DE FÁRMACOS. ..	45
2.4 OBTENÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS .....	47
2.4.1 Técnicas de moagem .....	49
2.4.2 Carreadores.....	50
2.4.3 Copolímeros de metacrilato.....	51
2.4.4 Copovidona .....	53
2.5 COCRISTAIS.....	54
2.5.1 Solubilidade dos cocristais .....	55
2.5.2 Síntese de cocristais farmacêuticos .....	56
2.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO ESTADO SÓLIDO .....	58

2.6.1	Espectroscopia vibracional infravermelho (IV) .....	58
2.6.2	Difratometria de raio-X de pó (DRXP).....	59
2.6.3	Técnicas termoanalíticas .....	61
2.6.4	Microscopia eletrônica de varredura .....	63
2.6.5	Solubilidade .....	63
2.6.6	Dissolução.....	64
2.6.7	Velocidade de dissolução intrínseca (VDI).....	65

## **CAPÍTULO I- DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O FÁRMACO BENZNIDAZOL.**

1	Introdução .....	67
2	Metodologia .....	68
2.1	Materiais.....	68
2.2	Instrumentação e condições cromatográficas .....	68
2.3	Preparação das amostras para a análise de LC .....	69
2.4	Validação do método de LC .....	69
2.5	Adequação do sistema ( <i>system suitability</i> ).....	70
2.6	Preparação das soluções de trabalho .....	70
2.7	Preparação de amostras submetidas a degradação forçada... 71	
2.8	Estudos de degradação forçada .....	71
1.1.1	Fotodegradação .....	71
2.9	Preparação dos sistemas binários comoídos.....	72
3	Resultados .....	73
3.1	Otimização de análise CLAE-UV .....	73
3.2	Validação de método .....	74
3.3	Adequação do sistema ( <i>system suitability</i> ) .....	75
3.4	Estudos de degradação forçada .....	76



4	Conclusão.....	79
---	----------------	----

## **CAPÍTULO II- INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO POLIMÉRICA DE MATRIZES DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DO TIPO DOME MATRIX® NO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE BNZ EM MEIO ÁCIDO.**

1	Introdução .....	81
2	Metodologia .....	82
2.1	Materiais.....	82
2.2	Preparação dos módulos Dome Matrix® .....	82
2.3	Avaliação do perfil de dissolução de BNZ de matrizes de liberação prolongada em meio ácido.....	84
2.4	Aplicação de métodos estatísticos de comparação dos perfis de dissolução.....	84
2.4.1	Métodos baseados em análise de variância .....	84
2.4.2	Métodos modelo dependente.....	85
2.4.3	Fator de diferença $f_1$ e fator de similaridade $f_2$ .....	88
3	Resultados e discussão .....	90
3.1	Preparação dos módulos Dome Matrix® .....	90
3.2	Avaliação do perfil de dissolução de BNZ de matrizes de liberação prolongada em meio ácido.....	90
3.3	Aplicação de métodos estatísticos de comparação dos perfis de dissolução.....	93
3.3.1	Métodos modelo dependentes .....	94
4	CONCLUSÃO .....	97

## **CAPÍTULO III- ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS POLÍMEROS NA DISSOLUÇÃO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL EM MISTURAS SÓLIDAS COMOÍDAS**

1	Introdução .....	99
2	Metodologia .....	100

2.1	Materiais.....	100
2.2	Impacto de polímeros hidrofílicos na solubilidade aquosa do BNZ	100
2.3	Preparação dos sistemas binários co-móidos .....	101
2.4	Design Experimental (DoE).....	101
2.5	Avaliação do perfil de dissolução das formulações.....	103
2.6	Caracterização físico-químicas das formulações obtidas ...	104
2.6.1	Espectroscopias vibracionais na região do infravermelho (IV)	104
2.6.2	Determinação da cristalinidade .....	104
2.6.3	Morfologia das partículas.....	105
2.6.4	Avaliação do comportamento termoanalítico.....	105
2.6.5	Molhabilidade .....	105
2.7	Avaliação da estabilidade das SBMB.....	106
3	Resultados e discussão .....	106
3.1	Impacto dos polímeros hidrofílicos na solubilidade aquosa e dissolução de BNZ em meio ácido.....	106
3.2	Avaliação do perfil de dissolução dos sistemas binários obtidos em moinho de bolas (SBMB).....	109
3.3	Design Experimental (DoE).....	113
3.4	Caracterização físico-químicas das formulações obtidas ...	117
3.4.1	Determinação da cristalinidade .....	117
3.4.2	Morfologia das partículas.....	119
3.4.3	Avaliação do comportamento termoanalítico.....	124
3.4.4	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	126
3.4.5	Molhabilidade .....	129
4	Conclusão.....	132

## CAPÍTULO IV- COCRISTAIS: UMA ALTERNATIVA PARA MELHORIA DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FÁRMACO BENZNIDAZOL

1	Introdução .....	133
2	METODOLOGIA .....	134
2.1	Materiais .....	134
2.2	Avaliação da tendência de cocristalização do fármaco BNZ 134	
2.3	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) 135	
2.4	Difratometria de raios X de pó (DRXP).....	135
2.5	Morfologia das partículas .....	136
2.6	Avaliação do comportamento termoanalítico .....	136
2.7	Doseamento do conteúdo de BNZ nos cocristais .....	137
2.8	Solubilidade dos cocristais de BNZ.....	137
2.9	Fotodegradação.....	137
3	Resultados .....	138
3.1	Estudos preliminares: avaliação das potenciais interações supramoleculares de BNZ e seleção dos <i>coformers</i> para <i>screening</i>	138
3.2	Triagem e caracterização no estado sólido .....	142
3.2.1	Caracterização dos materiais obtidos .....	142
3.2.2	Análise da estrutura do cocristal com ácido succínico (COSUC).....	147
3.2.3	Tendência de cocristalização de BNZ .....	152
3.3	Doseamento do conteúdo de BNZ nos materiais cristalinos 155	
3.4	Solubilidade dos cocristais de BNZ.....	156
3.5	Fotodegradação dos cocristais de BNZ .....	159
4	Conclusão .....	160

## **CAPÍTULO V: POTENCIALIDADE TERAPÊUTICA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE BENZNIDAZOL DESENVOLVIDOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: AVALIAÇÃO *IN VITRO*.**

1	Introdução .....	161
2	METODOLOGIA .....	162
2.1	Preparo dos sistemas de liberação de BNZ .....	162
2.2	Triagem dos compostos frente a formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> expressando Beta-galactosidase na linhagem celular THP-1.....	162
2.2.1	Cultivo de células e indução da diferenciação de células THP-1	162
2.2.2	Infecção das células THP-1 com <i>T. cruzi</i> .....	163
2.2.3	Ensaio de citotoxicidade .....	164
3	Resultados e discussão .....	165
3.1	Aplicação do teste colorimétrico para avaliação da atividade tripanocida dos sistemas de liberação de BNZ e excipientes.....	165
4	Conclusão.....	169
1	Discussão Geral .....	171
	Síntese dos resultados .....	175
2	Referências.....	177
	APÊNCICE A.....	197
	APÊNCICE B .....	201

## 1 INTRODUÇÃO

Durante a última década, a proporção de candidatos à fármaco com propriedades biofarmacêuticas relativamente pobres, tem aumentado significativamente. A análise química combinatória e os processos de triagem de novos fármacos, tem resultado em candidatos com solubilidade aquosa baixa (KAWABATA, KOICHI, *et al.*, 2011). Deste modo, as chamadas *enabling formulations*, ou seja, formulações que tornarão o fármaco biodisponível, têm cada vez mais ganhado atenção (BUCKLEY, FRANK, *et al.*, 2013). O aumento na absorção *in vivo* de princípios ativos com o auxílio de formulações continua sendo um desafio, como ilustrado pelo número muito limitado de exemplos de sucesso atualmente no mercado (ARAYA, TOMITA e HAYASHI, 2005). Ao projetar uma formulação oral, várias questões devem ser respondidas, como por exemplo: Qual é o perfil *in vivo* desejado para a formulação proposta? O que se sabe atualmente sobre a absorção *in vivo* e dissolução características do fármaco de interesse? Quais são os dados disponíveis a respeito da farmacocinética dos medicamentos já existentes? E quais são as características esperadas do produto inovador (JORGENSEN e BHAGWAT, 1998). A finalidade do desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos é a melhoria da biodisponibilidade dos fármacos, conseqüentemente o aumento do efeito farmacológico, redução de efeitos colaterais e de dosagem (BARROCAS, SANTOS, *et al.*, 2007).



## 1.1 OBJETIVO GERAL

Explorar estratégias para a melhoria da solubilidade e redução da toxicidade do fármaco Benznidazol, e desenvolver comprimidos gastrorretentivos de liberação prolongada do tipo Dome Matrix®.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- Estudar as características físico-químicas e a estabilidade do fármaco Benznidazol.
- Desenvolver sistema gastrorretentivo flutuante - Dome Matrix®.
- Avaliar o perfil de dissolução dos sistemas.
- Aplicar modelos matemáticos para descrever a cinética e o mecanismo de liberação do fármaco.
- Desenvolver sistemas baseados em Dispersões Sólidas para o incremento da solubilidade aquosa do fármaco.
- Sintetizar cocristais que impactem na biodisponibilidade do fármaco.
- Realizar estudos *in vitro* com a finalidade de avaliar a capacidade tripanocida dos produtos gerados.





## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças ditas tropicais apresentam um histórico de negligência por não despertarem o interesse de grandes centros mundiais em realizar pesquisas, que visem melhorar a terapêutica de doenças consideradas não lucrativas (COHEN, DIBNER e PRADO, 2010). As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo crônico, debilitante, de infecções parasitárias, bacterianas, e alguns casos virais e fúngicas, que estão entre as principais causas de enfermidades de pessoas pobres que vivem nos países em desenvolvimento (HOTEZ, MOLYNEUX, *et al.*, 2007).

A problemática reflete o desinteresse da indústria farmacêutica no investimento em medicamentos para o tratamento de doenças negligenciadas, além da falta de comprometimento dos governos em países endêmicos. Os esforços têm sido concentrados em pequenos ensaios clínicos, não randomizados, que muitas vezes representam apenas estudos de caso através esforços isolados de pesquisadores subfinanciados. As perspectivas estão melhorando com as parcerias público-privadas, com instituições como Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) criada em 2003 para atuar como uma organização virtual de pesquisa farmacêutica ligando as equipes em torno do mundo e atraindo novos investimentos (EISAI AND DNDI, 2009).

Dezessete Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) são priorizadas pela Organização Mundial da Saúde das quais onze ocorrem de forma endêmica no Brasil (WHO, 2006). O Brasil está entre os países com a maior ocorrência de DTNs. As doenças diferem por região do país e seu impacto está diretamente relacionado às áreas de maior pobreza e menor desenvolvimento socioeconômico, como as regiões Norte e Nordeste (HOTEZ, BOTTAZZI, *et al.*, 2008).

A doença de Chagas (DC), leishmaniose, hanseníase, oncocercose, filariose linfática, esquistossomose e dengue podem ser destacadas como mais prevalentes no país. Altas taxas de morbidade e mortalidade humana estão relacionadas as doenças parasitárias no Brasil, sendo estas responsáveis pela geração de altos custos para o Sistema Público de Saúde (SUS). As dificuldades no controle vetorial, associadas à complexidade ecoepidemiológica, a ausência de vacinas, além do escasso arsenal quimioterápico disponível são fatores que contribuem para a prevalência destas doenças no nosso país. O tratamento medicamentoso disponível

atualmente possui limitada eficácia, além dos efeitos colaterais e do surgimento de parasitos resistentes aos quimioterápicos, que representam problemas de ordem global (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e, mesmo com os avanços no controle em países endêmicos, ainda se mantém como um processo mórbido relevante para a saúde pública, fazendo parte do contexto de DTN. O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e envolve um inseto vetor e hospedeiros mamíferos e não-mamíferos. Primeiramente o inseto adquire os tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados, os parasitas se diferenciam em epimastigotas no intestino delgado, onde se multiplicam por fissão binária. Na porção retal do intestino do inseto o parasita se diferencia em tripomastigota metacíclico (forma infectiva) (PEREZ, LYMBERY e THOMPSON, 2014). Os indivíduos são infectados, enquanto dormem, durante o repasto do inseto. O contato com as fezes do inseto, que contém tripomastigotas metacíclicos, se dá devido a abrasão provocada pela sua picada e assim esse material atravessa a pele do hospedeiro. Após a infecção das células do hospedeiro os parasitas se diferenciam em amastigotas e se replicam por fissão binária. O *T. cruzi* se diferencia novamente em tripomastigota, rompe a células do hospedeiro e ficam livres na corrente sanguínea. Neste momento os parasitas podem infectar outras células do hospedeiro ou o vetor. A transmissão do *T. cruzi* ocorre principalmente por intermédio do vetor triatomíneo, conhecido popularmente pelos nomes de barbeiro, fincão e chupança, entre outros. Cinco espécies de triatomíneos têm maior relevância epidêmica na doença de Chagas, o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* e *T. brasiliensis*, existindo uma correlação entre a cepa de *T. cruzi* e a espécie do vetor (PATTERSON e GUHL, 2010).

Atualmente, muitos casos de transmissão oral de *T. cruzi* têm sido relatados, manifestando a fase aguda da doença após a invasão de tripomastigotas metacíclicos na mucosa gástrica. Estes casos podem estar relacionados a ingestão de alimentos contaminados pela secreção anal de marsupiais infectados da espécie *Didelphis* spp., que contém em suas glândulas anais o parasito em todos os estágios (epi, tripo e amastigota). Além disso, triatomíneos também podem processados juntamente com os alimentos liberando o *T. cruzi*. A pasteurização destes produtos, por exemplo, pode ser um processo aliado na inativação do parasito, tornando-os mais seguros. Sendo assim, a qualidade dos alimentos deve ser garantida pela intensa fiscalização pelos órgãos responsáveis (DIAS, 2011). Outras formas importantes de transmissão da

doença de Chagas são o transplante de órgãos, transfusão de sangue e a forma congênita mãe-feto, assim como por ingestão de carne crua ou malcozida de caça, ou mesmo por meio de hábitos primitivos de ingestão de triatomíneos (BRENER, 2000).

A infecção humana resulta em sintomas clínicos que surgem a partir da deposição inicial dos tripomastigotas, que ocasionalmente acarretam a formação de um chagoma, ou inchaço no local de entrada do parasito (WHO, 2002). O desenvolvimento da doença de Chagas varia entre indivíduos e sua localização geográfica, o que sugere que diferenças genéticas estão diretamente ligadas a essas manifestações. Além disso *T. cruzi* isolados diferem entre si em virulência, infecciosidade, tropismo pelo tecido, na progressão da doença e a suscetibilidade aos fármacos (PEREZ, LYMBERY e THOMPSON, 2015). Na fase aguda da DC podem ocorrer alguns sintomas inespecíficos como febre, reações alérgicas e mais raramente insuficiência cardíaca e meningoencefalite (WILLIAMS-BLANGERO, VANDEBERG, *et al.*, 2012). A fase aguda pode ser fatal para crianças, mas a maioria dos pacientes sobrevivem e entram em uma prolongada fase assintomática, na qual os parasitas atingem órgão importantes formando reservatórios de amastigotas. Como consequência, pode-se observar lesões no coração, nos órgãos do aparelho digestivo como esôfago e intestino grosso (ESTANI, SEGURA, *et al.*, 1998). Em alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, podem estar associados a quadros meníngeos graves e de insuficiência cardíaca (IC), chegando a ocorrer óbito. Uma outra porcentagem de indivíduos infectados evolui com manifestações da doença, por exemplo, a miocardite grave com cardiomegalia, megaesôfago e megacólon, entre outras (PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, 2009).

Embora avanços no controle da transmissão vetorial tenham sido conseguidos nas últimas décadas, a complexidade das formas de transmissão, aliado a ausência de uma vacina, fazem da quimioterapia um importante método de controle da DC (COURA e VIÑAS, 2010) O Programa Nacional de Controle da DC (1983) reduziu drasticamente as populações do vetor o *T. infestans*, principal vetor doméstico do *T. cruzi* (SILVA, RODRIGUES, *et al.*, 2011). Além disso, houve também uma redução significativa na transmissão transfusional e por transplante de órgãos com um intensivo controle nos bancos de sangue e pré-operatórios. Entretanto, estima-se que ainda existem entre 2-3 milhões de pacientes chagásicos sem tratamento adequado da doença, com em torno de 6.000 mortes anuais (MARTINS-MELO, RAMOS-JR, *et al.*, 2014). Observa-se atualmente a prevalência da doença entre indivíduos

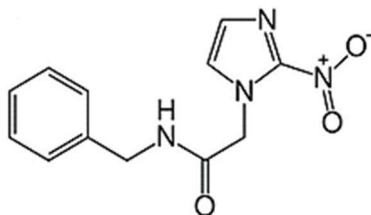
em faixas etárias mais avançadas, o que traz novos desafios aos profissionais de saúde, devido à associação ou interação com outras doenças crônicas, como diabetes mellitus e hipertensão. Questões inerentes à doença ainda devem ser discutidas nas políticas nacionais que orientam a estruturação de ações de vigilância e controle. O tratamento terapêutico disponível é restrito a dois fármacos, o Benznidazol (BNZ) e o Nifurtimox com eficácia comprovada apenas na fase aguda, e variável frente às diferentes seis unidades de digitação discretas de *T. cruzi*, sendo apenas o BNZ utilizado no Brasil (BUCKNER e NAVABI, 2010). Além disso, a resistência aos fármacos disponíveis e toxicidade do tratamento, que produz sérios efeitos colaterais, emergem como um obstáculo a ser transposto (HIDE, MOTTRAM, *et al.*, 1997). Desta forma os tratamentos devem ser racionalizados para garantir que fármacos disponíveis tenham a sua atividade maximizada.

### 1.1.2 Benznidazol

O fármaco BNZ apresenta atividade significativa na fase aguda da DC, com eliminação quase total dos parasitas em pacientes infectados por transmissão congênita e entre 60-85% nos demais casos. Entretanto, para fase crônica estes resultados estão em torno de 15-40% (BERN, 2011). A cura da doença é definida por um resultado negativo para todos os testes parasitológicos e sorológicos sendo eles: visualização do parasito direta ou indiretamente, presença de IgM-anti *T. cruzi* no soro, imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e enzimas-Elisa (RASSI-JR e MARIN-NETO, 2000).

O BNZ, 2-Nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida (figura 1) é um nitroimidazol totalmente absorvido por via digestiva, as concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 2 a 4 h, com tempo de meia-vida de eliminação plasmática de 12-15h, volume de distribuição aparente de 0,56 L/Kg e seus metabólitos são eliminados rapidamente pela urina e pelas fezes (BRASIL, 2010).

Figura 1: Estrutura química do fármaco BNZ adaptado de (SOARES-SOBRINHO, CUNHA-FILHO, *et al.*, 2008)



O mecanismo de ação do fármaco ainda não é bem esclarecido mas pode ser relacionado a sua influência sobre a síntese de macromoléculas, por estresse redutivo, através de uma ligação covalente com componentes celulares, como o DNA, por intermediários nitroredutores, ocasionando a perda da capacidade de multiplicação do parasito (BUCKNER e NAVABI, 2010).

Em 2004, ocorreu a transferência de tecnologia do BNZ da empresa suíça Roche para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). E, os comprimidos de 100mg foram registrados no Brasil pela ANVISA como um “medicamento novo” em 2006. A versão pediátrica, comprimidos de 12,5mg, foi desenvolvida pela instituição em parceria com a DNDi (iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas) e registrada na ANVISA em 2011 (LAFEPE, 2012). Os comprimidos de liberação imediata de BNZ são produzidos pelo LAFEPE e distribuídos pelo SUS.

O esquema terapêutico é dividido em 2 ou 3 doses diárias, de 5 mg/kg/dia para adultos, entre de 5-10 mg/kg/dia para crianças e 10mg para lactentes, durante 60 dias (BRASIL, 2010). Informações sobre a farmacocinética do fármaco são limitadas. Estudos de biodisponibilidade demonstraram que os comprimidos de 100mg de BNZ, atualmente disponíveis, apresentaram resultados próximos a 100% de absorção do fármaco. Enquanto os comprimidos pediátricos (12,5 mg) atingiram concentrações plasmáticas máximas (C<sub>max</sub>) em torno de um terço da dose administrada, quando testados em coelhos, testes ainda devem ser conduzidas em crianças para avaliar se esse C<sub>max</sub> é adequado para alcançar os efeitos clínicos esperados (DAVANÇO, CAMPOS, *et al.*, 2016). Doses de 5 mg/kg/dia de BNZ resultam em concentrações séricas de 3-6 µg/ml do fármaco independente da fase da doença, está

concentração é considerada adequada para a manutenção da atividade tripanocida e concentrações séricas superiores a 20 µg/ml são consideradas tóxicas (PINAZO, GUERRERO, *et al.*, 2013). A maior causa da interrupção do tratamento com BNZ está ligada a severidade dos efeitos adversos, que atinge em torno de 15% dos pacientes tratados. A despeito das restrições em relação BNZ, o fármaco continua sendo a melhor opção de tratamento para doença de Chagas (MOLINA, SALVADOR, *et al.*, 2015). Os efeitos adversos mais notórios são as manifestações cutâneas, como hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas e edema generalizado, febre, linfadenopatia, dor articular e muscular (MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, 2016).

Soy e colaboradores propuseram a otimização do regime terapêutico com redução da dose de BNZ para 2,5mg/Kg/dia, como garantia de um tratamento mais eficaz e seguro (SOY, ALDASORO, *et al.*, 2015). Em estudos com pacientes que receberam BNZ durante 30 dias (7mg/kg/dia, duas vezes por dia) foi demonstrado que o C<sub>max</sub> reduz ao longo dos dias, atingindo uma média de 20% após primeira administração após 25 dias, sugerindo um aumento no metabolismo ou excreção do fármaco com o seu uso crônico. Portanto, a saturação do sistema biotransformação de BNZ em humanos pode ser dependente da frequência de administração e a oscilação concentração plasmática, níveis elevados de fármaco (DAVANÇO, CAMPOS, *et al.*, 2016).

A classificação Biofarmacêutica de BNZ é incerta, devido à falta de informações experimentais. O fármaco já foi classificado na classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) por Kasim, que apresentou dados de solubilidade em água de 0,4 mg/mL e ClogP 0,9 (KASIM, WHITEHOUSE, *et al.*, 2004) e na classe II- baixa solubilidade e alta permeabilidade (SOARES-SOBRINHO, MEDEIROS, *et al.*, 2007 ). Maximiano propôs a inclusão do fármaco na classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade), trazendo valores de LogP<sub>ow</sub> de 0,772 e dados de solubilidade aquosa em torno de 0,236 mg/mL e para fluidos biológicos gástrico e entéricos: 0,236 mg/mL e 0,244 mg /mL, respectivamente (MAXIMIANO, COSTA, *et al.*, 2010).

As propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do fármaco, como baixa solubilidade em fluidos aquosos, podem ser fatores limitantes para a sua biodisponibilidade. Além disso, as altas doses necessárias de fármaco e a duração do tratamento, podem contribuir para os efeitos adversos comumente observados. Por esse motivo, alternativas tecnológicas devem ser exploradas a fundo para obtenção de formas farmacêuticas mais seguras e eficazes contendo BNZ. É primordial a melhoria da solubilidade aquosa do fármaco. Além disso, comprimidos

de liberação prolongada podem ser uma boa alternativa para contornar o problema de picos plasmáticos são comuns em comprimidos de liberação imediata. A liberação constante de fármaco e aumento da residência do mesmo no corpo, podem promover a redução dos efeitos adversos ligados a terapia. Por conseguinte, a melhoria da aderência dos pacientes pode ser alcançada com redução do número de administrações diárias, da dose e do tempo total do tratamento (MAXIMIANO, 2011).

## 2 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

Os IFAs (Insumos Farmacêuticos Ativos) são raramente administrados isoladamente, em geral, fazem parte de uma formulação que pode ser composta por uma variedade de componentes não medicinais. A seleção dos componentes não medicinais ou excipientes produzem formas farmacêuticas variadas. Os ingredientes farmacêuticos têm a função de solubilizar, suspender, espessar, diluir, emulsionar, estabilizar, preservar, dar cor e sabor, tornando a forma farmacêutica eficaz e atraente (AULTON, 2010). Cada formulação tem características físico-químicas e biofarmacêuticas únicas. Os componentes da formulação devem ser compatíveis entre si para produzir um medicamento estável, eficiente, atraente, fácil de administrar e seguro, sendo necessária a avaliação dos processos de obtenção destes produtos farmacêuticos (ANSEL, ALLEN e POPOVICH, 2013).

Os estudos de pré-formulação são essenciais para caracterização físico-química de fármaco, excipientes e da formulação final. A escolha dos componentes está diretamente ligada à via de administração, forma farmacêutica, ação terapêutica desejada, processos de produção, compatibilidade e propriedades funcionais dos excipientes. Conhecer os impactos do processo na estabilidade dos componentes da formulação é parte fundamental do processo. Sendo assim, se faz necessário estabelecer os pontos críticos da produção e os mecanismos mais adequados de avaliação com a finalidade de garantir a segurança e eficácia dos medicamentos (STORPIRTIS, GONÇALVES, *et al.*, 2009).

### 2.1 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) divide os fármacos em classes com base na sua solubilidade aquosa e a

permeabilidade intestinal. Alta solubilidade significa que a maior dose de medicamento deve ser solúvel em 250 ml de água na faixa de pH 1,0 a 7,5 em 37 °C. No caso do IFA, altamente permeável significa que mais de 90% da dose administrada de fármaco deve passar através das membranas de absorção, de acordo com a figura 2 (HOSEY, CHAN e BENET, 2016).

Figura 2: Quadro representativo do SCB e critérios de elegibilidade de fármacos para testes de bioequivalência *in vivo* adaptado de (WHO A, 2006)

D:S 250mL  
↓

85% ABS ⇒	<b>CLASSE I</b> Altamente permeável Altamente solúvel  Elegível	<b>CLASSE II</b> Altamente permeável Pouco solúvel  Elegível somente se a proporção D:S seja 250 mL ou menor no pH 6.8
	<b>CLASSE III</b>  Pouco permeável Altamente solúvel  Elegível se for rapidamente dissolvido.	<b>CLASSE IV</b>  Pouco permeável Pouco solúvel  Não Elegível.

D:S proporção dose:solubilidade  
ABS quantidade absorvida da dose

A permeabilidade dos fármacos por transporte passivo pode ser avaliada por estudos farmacocinéticos, como por exemplo, estudos de balanço de massas ou por métodos de que avaliam a permeabilidade intestinal, como perfusão intestinal em seres humanos, modelos animais, linhagens celulares Caco 2 ou outras linhagens celulares adequadamente validadas (WHO A, 2006).

Mais de 40% de novas entidades químicas e 27,70% dos medicamentos essenciais pertencem a classe II e classe IV do SCB. Tais fármacos devem ser administrados em doses elevadas por via oral para garantir que as quantidades necessárias cheguem ao sítio de ação, o que pode levar a problemas de toxicidade. Este é um desafio que pode ser resolvido pelas várias técnicas formulação (BAGHEL, CATHCART e O'REILLY, 2016)



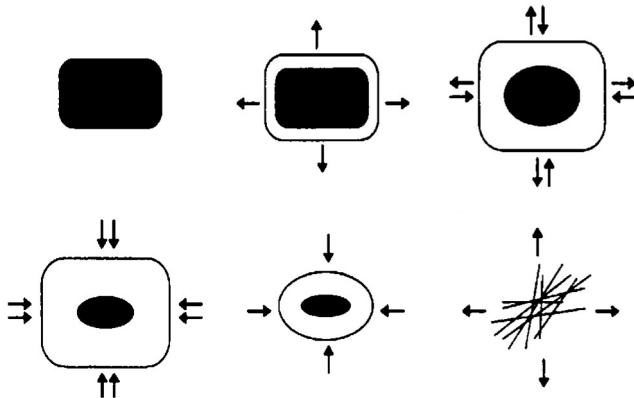
## 2.2 FORMAS FARMACÊUTICAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

Os sistemas de liberação modificada são produzidos com a finalidade de controlar a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução. Estes sistemas possibilitam tornar a forma farmacêutica gastrorresistente, prolongar o efeito farmacológico, liberar o fármaco num sítio específico do trato gastrointestinal ou após um período de tempo pré-definido (COSTA e LOBO, 1999)

Sistemas de liberação prolongada utilizam uma espécie de barreira química ou física para o controle da velocidade da liberação do IFA. As técnicas de obtenção destas formas farmacêuticas sólidas incluem a utilização de revestimentos, incrustação do fármaco em matriz de cera ou plástica, microencapsulação, ligação química, resinas de troca iônica e incorporação em bomba osmótica (AULTON, 2010).

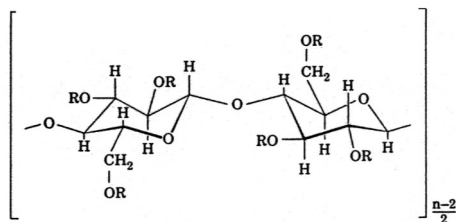
A utilização de diversos tipos de polímeros vem como uma opção interessante para obtenção de formulações orais de liberação prolongada por possuir vantagens como versatilidade, eficácia e baixo custo. A sua produção recorre a equipamentos e técnicas convencionais, além de permitir a incorporação de quantidades relativamente elevadas de fármacos (PEZZINI, SILVA e FERRAZ, 2007). O mecanismo de liberação do fármaco em matrizes poliméricas hidrofílicas se inicia quando os poros mais próximos à superfície da matriz absorvem pequenas quantidades de água, em contato com o meio aquoso. A liberação passa a ser controlada pela sua dissolução e difusão do fármaco no meio aquoso interno, até o exterior da matriz. A alta viscosidade da dispersão polimérica nos poros reduz a velocidade de transporte do fármaco através da formação de uma camada de gel. As matrizes hidrofílicas sofrem uma hidratação seguida de gelificação (figura 3), produzindo uma barreira que pode reduzir a liberação do fármaco a depender da composição da formulação (JIMENEZ-CASTELLANOS *et al.*, 1993; LEE & CHIEN, 1996).

Figura 3: Mudanças macroscópicas em sistemas matriciais que intumescem e sofrem erosão adaptado de (MANADAS, PINA e VEIGA, 2002)



O hidroxipropilcelulose-HPMC (figura 4) é um dos mais importantes polímeros utilizado na obtenção de comprimidos de liberação prolongada. Possui alta taxa de intumescimento, o que tem um efeito significativo no controle da liberação dos fármacos (NOVAKA, ŠPORARA, *et al.*, 2012). A difusão, o intumescimento e a erosão são os mecanismos que definem a taxa de liberação dos fármacos (MADERUELO, ZARZUELO e LANAÑO, 2011). Para comprimidos compostos por HPMC, a difusão do fármaco depende diretamente do conteúdo de água no sistema (VIRIDÉN e LARSSON, 2010). Os fatores que influenciam a liberação dos fármacos de matrizes hidrofílicas incluem o grau de substituição e comprimento da cadeia polimérica, a viscosidade, a distribuição de tamanho de partículas do polímero, a proporção do polímero e fármaco, o tipo polímero ou a utilização de misturas de diferentes tipos de HPMC na formulação, a pressão de compressão, a espessura do comprimido, o tamanho de partícula do fármaco, o ar aprisionado nos comprimidos, a solubilidade do fármaco, a composição de excipientes, e o modo de incorporação destas substâncias (VELASCO, FORD, *et al.*, 1999).

Figura 4: Estrutura química do HPMC. O radical R indica os substituintes que podem ser:  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$  ou um átomo de hidrogênio (SIEPMANNA e PEPPAS, 2001).



### 2.2.1 Sistemas de liberação prolongada gastrorretentivos do tipo Dome Matrix<sup>®</sup>

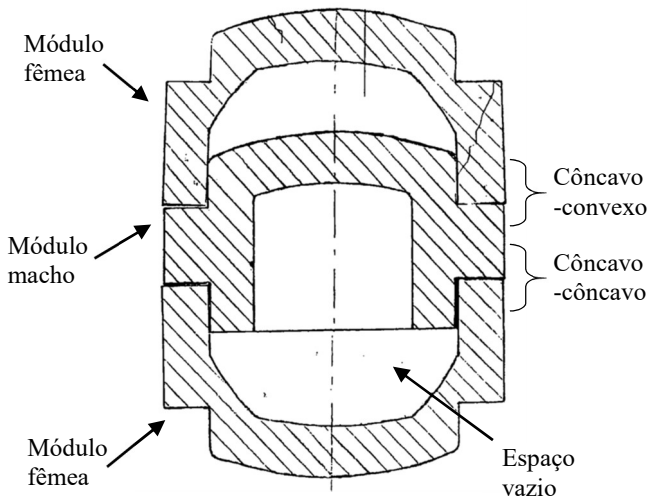
A tecnologia da Dome Matrix<sup>®</sup> (figura 5) é baseada numa plataforma modular, que permite a obtenção de comprimidos com características de liberação imediata ou prolongada de fármacos (STRUSI, SONVICO, *et al.*, 2008). A configuração modular permite a administração contemporânea de diferentes IFAs, diferentes doses e em um local específico. A versatilidade do acoplamento dos módulos permite uma ampla gama de conformações dos comprimidos, obtendo-se assim formas farmacêuticas melhor adaptadas às necessidades do paciente (LOSI, BETTINI, *et al.*, 2006).

Os módulos são obtidos por compressão direta de pó (ou outro método apropriado), dando origem a compactos porosos com forma apropriada para montagem. Os comprimidos apresentam forma cilíndrica com paredes laterais, que formam um espaço oco, com uma cúpula, sendo diferenciados por sua base macho ou fêmea. O módulo macho é formado por uma saliência anular que se estende a partir da base e o módulo fêmea possui uma reentrância que permite o correto encaixe formando o sistema. Graças ao seu design especial, dois ou mais módulos podem ser montados por pressão, clique ou atrito. Devido a estas características morfológicas, diferentes configurações de sistema podem ser obtidas. Assim, dois módulos podem ser montados em duas configurações básicas: com espaço interno oco (côncavo/côncavo) ou empilhada (côncavo/convexo) figura. Esta abordagem permite uma combinação personalizada de

diferentes fármacos ou diferentes dosagens do mesmo IFA, em cada módulo ou no espaço oco. O espaço vazio formado pela configuração côncavo/côncavo possibilita comportamento gastrorretentivo dos comprimidos em seres humanos, devido à presença de uma câmara de ar no interior do conjunto de dois módulos (COLOMBO, SANTI, *et al.*, 2008).

Em comparação com formas farmacêuticas convencionais, os sistemas de liberação de fármacos com retenção gástrica são concebidos para permanecer no estômago por um tempo prolongado pré-definido. Por consequência, residência gástrica estendida melhora a biodisponibilidade dos IFA, que tem absorção ou ação no estômago ou na porção inicial do intestino delgado (EBERLE, SCHOELKOPF, *et al.*, 2014). O sistema flutuante do tipo Dome Matrix<sup>®</sup> pode permanecer no estômago durante um período de tempo de 2 à 5 h, dependendo da formulação, sexo do indivíduo e o do regime alimentar (STRUSI, SONVICO, *et al.*, 2008).

Figura 5: Configurações dos módulos e montagem do sistema Dome Matrix<sup>®</sup> adaptado de (COLOMBO, SANTI, *et al.*, 2008).



Alguns exemplos de aplicação com base na tecnologia do sistema Dome Matrix<sup>®</sup> são descritos a seguir. O comprimido multi-cinética e local-específico, contendo artesunato e clindamicina, fármacos antimaláricos oral (MKS\_DDS), foi desenvolvido. O sistema de

MKS\_DDS foi composto por quatro módulos, sendo: dois de liberação controlada contendo 80 mg de fosfato de clindamicina, cada um, dois de liberação imediata contendo 50 mg de artesunato e os restantes 80 mg de fosfato de clindamicina. Os sistemas foram construídos com os módulos de liberação controlada no centro e de liberação imediata externamente formando uma configuração de vazão na porção central para, assim, assegurar o comportamento gastrorretentivo. O valioso potencial terapêutico está relacionado ao fato de que o sistema obtido pode ser adaptado como uma dose única diária, o que é altamente recomendada pela OMS (STRUSI, BARATA, *et al.*, 2010).

Matrizes hidrofílicas flutuantes do tipo Dome Matrix<sup>®</sup> contendo norfloxacino (NFX), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e poli (óxido de etileno) (PEO) foram desenvolvidas. O sistema de liberação de NFX foi prolongado e linear em fluido gástrico simulado. Além disso, a característica gastrorretentiva dos comprimidos pode proporcionar a liberação específica do fármaco no estômago, o que pode aumentar a biodisponibilidade do fármaco mais solúvel em pH ácido (OLIVEIRA, BERNARDI, *et al.*, 2011). Um outro exemplo da aplicação do sistema, foi no desenvolvimento de comprimidos de Riboflavina, onde utilizou-se copolímeros de tapioca-etilmetacrilato(TSEMA) e tapioca hidroxipropilamido-etilmetacrilato(THSEMA). Os estudos de liberação do fármaco demonstraram que formulação possuía propriedades gastrorretentivas e de liberação prolongada do fármaco. A permanência da riboflavina no estômago por um longo período aumenta a sua absorção, promovendo uma melhora da biodisponibilidade do fármaco que possui uma janela de terapêutica estreita (CASAS, STRUSI, *et al.*, 2011).

### 2.3 DISPERSÕES SÓLIDAS COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTO DA SOLUBILIDADE AQUOSA DE FÁRMACOS.

Algumas ferramentas farmacotécnicas estão disponíveis para modular a biodisponibilidade oral de fármacos enquadrados na Classe II do SCB. O intuito destas tecnologias é promover a dissolução mais adequada dos fármacos nos fluidos fisiológicos contidos no trato gastrointestinal, favorecendo sua absorção. Com essa finalidade, podemos destacar as técnicas de redução de partícula por micronização, dispersões sólidas, complexos de inclusão em ciclodextrinas, seleção da forma polimórfica mais adequada a formulação, amorfização, entre outros

(STORPIRTIS, GONÇALVES, *et al.*, 2009). O termo dispersão sólida (DS) se refere a um grupo de produtos sólidos composto por ao menos dois componentes, geralmente um polímero hidrofílico e um fármaco hidrofóbico. O fármaco é molecularmente disperso na matriz que pode ser amorfa ou cristalina (BAGHEL, CATHCART e O'REILLY, 2016).

A dispersão do fármaco em um carreador pode se apresentar na forma de misturas eutéticas simples e solução sólida. A mistura eutética simples é formada por dois compostos que são totalmente miscíveis no estado líquido, o mesmo não ocorre no estado sólido. São geralmente preparadas pelo rápido resfriamento do produto da fusão de dois compostos, com o objetivo de obter cristais muito finos dos dois componentes, na forma de cocrystalos (JANSSENS e VAN DEN MOOTER, 2009) A solução sólida é comparável a líquida, composta por uma única fase de componentes indistintos. As partículas do fármaco são reduzidas a tamanhos moleculares e a velocidade de dissolução intrínseca (VDI) das DS é determinada pelo carreador, que está na fase cristalina. Soluções vítreas são sistemas formados por carreadores amorfos onde o fármaco está molecularmente disperso ou na forma de um precipitado amorfo no seu veículo, que poderá eventualmente cristalizar-se com o tempo (DRESSMAN, 2000).

Os fármacos amorfos possuem vantagens em relação as suas correspondentes formas cristalinas como uma maior solubilidade, alta taxa de dissolução e algumas vezes melhores características de compressibilidade (MARSAC e LI, 2009). Entretanto, na sua maioria são físico-quimicamente instáveis, sendo suscetíveis à degradação ou à recristalização. As blendas polímero-fármaco podem contribuir para formação de sistemas amorfos mais estáveis (POKHARKAR, MANDPE e PADAMWAR, 2006).

O mecanismo pelo qual a DS promove incremento da solubilidade do fármaco ocorre quando esta é exposta a um meio aquoso. O carreador hidrofílico se dissolve e a liberação do fármaco ocorre em finas partículas coloidais, onde uma porção do fármaco se dissolve imediatamente supersaturando o fluido do trato gastrointestinal e o excesso de fármaco precipita. Por outro lado, tanto o carreador quanto os fatores biológicos, tais como sais biliares e ácidos graxos, podem influenciar o comportamento *in vivo* de precipitação ou solubilização do fármaco (VAN DROOGE, HINRICHS, *et al.*, 2006).

Os sistemas multicomponentes, que compõem as DS, são conjuntos de composto moleculares de um IFA e uma molécula complementar neutra ou carregada. Estas supermoléculas no estado

sólido são montadas a partir de interações específicas não-covalentes, incluindo ligações de hidrogênio, iônicas, van der Waals e interações  $\pi$ - $\pi$ . Assim, as interações intermoleculares podem ser usadas como elementos chave de reconhecimento molecular, no desenho de sistemas de múltiplos amorfos ou cristalinos e na caracterização das estruturas. É importante reconhecer que os sólidos amorfos e cristalinos compartilham as mesmas ligações intermoleculares e diferem principalmente no grau de desordem (RODRIGUEZ-SPONG, PRICE, *et al.*, 2004).

A estabilização cinética ou efeito antiplastificante visa prevenir a separação de fases ou a cristalização do fármaco, por meio da imobilização dos fármacos supersaturados em uma matriz altamente viscosa. Essa estabilização pode ocorrer quando a mobilidade molecular de um sólido amorfo é diminuída. Problemas que limitam a aplicação comercial das DS envolvem principalmente o método de preparação, a reprodutibilidade, incorporação nas formas farmacêuticas, transposição de escala processos de fabricação e a estabilidade físico-químicas do fármaco e do veículo (JANSSENS e VAN DEN MOOTER, 2009).

## 2.4 OBTENÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS

O método de fusão *hot-melt* baseia-se no aquecimento da mistura dos componentes da formulação a uma temperatura acima do ponto eutético, seguido de um rápido resfriamento. O sólido obtido é moído para redução do tamanho de partícula. O resfriamento do sistema leva a sua supersaturação e a solidificação faz com que o fármaco disperso fique retido no interior da matriz do carreador. Fatores como a estabilidade térmica e miscibilidade dos componentes devem ser levados em consideração. Devido a limitações da metodologia para fármacos termolábeis, algumas tecnologias foram introduzidas, como a fusão com rotação, que reduz o tempo de aquecimento da mistura. No método de fusão com extrusão, a mistura é simultaneamente fundida, homogeneizada e, em seguida, sofre extrusão e é moldada na forma de comprimidos, grânulos, pellets, placas, palitos ou pó (LEUNER e DRESSMAN, 2000). O método facilita a interação fármaco-polímero que conduz ao aumento da solubilidade em água de fármacos pouco solúveis, mascara o sabor amargo dos ativos e forma dispersões sólidas estáveis. Entretanto, tem como desvantagens a possível degradação térmica, sublimação e modificações polimórficas (MANIRUZZAMAN, MORGAN, *et al.*, 2013).

Na fusão com rotação, a mistura é submetida ao aquecimento em um curto espaço de tempo, sob intensa agitação no mesmo aparato, na sequência é dispersa em ar frio ou em gás inerte resfriado em uma torre. Uma redução na temperatura de processamento pode ser conseguida pela associação com do dióxido carbono (CO<sub>2</sub>) como um plastificante (BREITENBACH, 2002).

No método de evaporação de solvente a mistura fármaco/carreador é dissolvida em um solvente comum. A solução formada é evaporada à vácuo em rota- evaporador. Os componentes devem ser suficientemente solúveis no solvente de escolha, as temperaturas de evaporação devem estar na faixa de 23-65°C. As variáveis da técnica estão relacionadas principalmente com o método de secagem. O solvente pode também ser removido por *spray-drying* ou liofilização. Na secagem por *spray-drying*, a solução de fármaco-polímero é atomizada e dispersa em gás quente, o que faz com que o solvente se evapore e conduz para a produção de partículas esféricas (LEUNER e DRESSMAN, 2000).

A liofilização é uma técnica em que a solução contendo fármaco-polímero é congelada e o solvente é sublimado sob pressão reduzida. O congelamento da solução pode ser feito em banho de nitrogênio. No caso de utilização de solventes orgânicos, a remoção deve ser mais cuidadosa por conta da sua toxicidade e da capacidade plastificante dos solventes residuais (JANSSENS e VAN DEN MOOTER, 2009).

Novas técnicas de obtenção de DS estão sendo utilizadas, como o fluido supercrítico e a coprecipitação. Na técnica do fluido supercrítico, as substâncias existem como uma única fase fluida acima da sua temperatura e pressão crítica, formando uma fina dispersão do fármaco hidrófobo no veículo hidrofílico. O CO<sub>2</sub> é o solvente mais comumente utilizado por ser quimicamente inerte, não-tóxico e não-inflamável. Esta técnica consiste em dissolver o fármaco e o carreador num solvente comum, que é introduzido num recipiente de formação de partículas através de um bocal, simultaneamente com o CO<sub>2</sub>. Quando a solução é pulverizada, o solvente é rapidamente extraído pelo fluido supercrítico resultando na precipitação da DS nas paredes e fundo do recipiente. O processo reduz o tamanho das partículas, o teor de solvente residual, a degradação e muitas vezes resulta em alto rendimento (BREITENBACH, 2002).

No método de coprecipitação um antissolvente é adicionado a mistura fármaco/carreador, sob constante agitação, ocorrendo assim a coprecipitação dos componentes em micropartículas. A suspensão de



micropartículas resultante é filtrada e seca (VASCONCELOS, e COSTA, 2007).

### **2.4.1 Técnicas de moagem**

A moagem é utilizada com frequência na redução do tamanho de partículas de IFAs, e também tem sido aplicada com sucesso para obtenção de DS e cocristsais. Durante o processo de moagem uma energia mecânica é aplicada e quebra fisicamente partículas grosseiras em partículas mais finas (RABINOW, 2004). Nestas operações, o material pode ser cortado por lâminas afiadas (moinho de facas), impactado por martelos ou esmagados/comprimido pelo com aplicação de pressão (moinho de rolos, pistilo e almofariz) ou sofrer atrito e impacto (moinho de bolas) (AULTON, 2010).

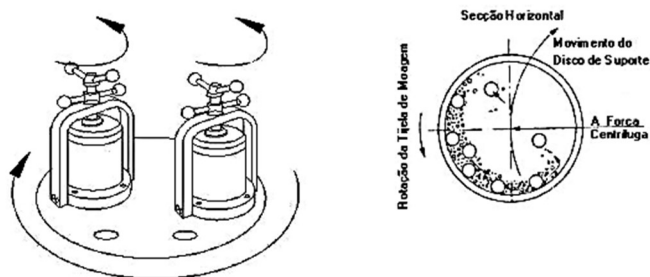
Os avanços tecnológicos dos equipamentos de moagem agora permitem a produção de materiais ultrafinos com partículas de dimensões micrométricas ou nanométricas (LOH, SAMANTA e HENG, 2015 ). Além do tamanho, moagem também altera a rugosidade da superfície e a forma das partículas. A transferência contínua de energia mecânica para o material conduz à acumulação de defeitos na estrutura cristalina e o seu desordenamento, podendo provocar o desaparecimento do ordenamento inicial, alterando as posições das moléculas (BOLDYREV, 2004). Estes defeitos podem manifestar-se ao longo de todo o cristal resultando na amorfização completa do fármaco ou serem restritos à sua superfície. No caso de pós finos, uma camada amorfa (desordenada) pode ser formada em torno de um núcleo cristalino (ordenado) (LOH, SAMANTA e HENG, 2015 ).

#### **2.4.1.1 Moinho de bolas**

Este tipo de moinho funciona pela combinação das técnicas atrito e impacto, consistindo em um cilindro oco que gira sob o seu eixo horizontal. O equipamento conta a utilização de bolas, que serão responsáveis pelo emprego da energia mecânica (figura 6). As bolas devem ocupar em torno de 30-50% do volume interno do cilindro, de maneira tal, a viabilizar a produção de atrito entre elas (AULTON, 2010). Entre os fatores que influenciam a eficiência da moagem na obtenção de produtos farmacêuticos, por este método, podemos destacar a velocidade de rotação, a quantidade de material e o tamanho das bolas. A velocidade

de rotação ideal equivale a  $2/3$  da velocidade angular crítica. Velocidades muito baixas fazem com que as bolas acompanhem a rotação do tambor, e velocidades muito altas fazem com que as mesmas fiquem projetadas sobre as paredes por ação da força centrífuga (COLOMBO, GRASSI e GRASSI, 2009). Quantidades excessivas de material podem provocar o efeito amortecedor, reduzindo a abrasão entre os dispositivos internos e o material. A relação adequada entre a massa de material e número de bolas, além da utilização de bolas de tamanhos variáveis, melhoram a eficiência do processo (LOH, SAMANTA e HENG, 2015 ).

Figura 6: Moinho planetário de bolas. Fonte: Manual Fritsch Pulverisette



## 2.4.2 Carreadores

Existe uma grande variedade de carreadores disponíveis no mercado, onde a seleção adequada é imprescindível para obtenção dos resultados esperados, pois suas características influenciam de maneiras diversas na dissolução do composto farmacêutico. Os carreadores podem influenciar na dissolução do fármaco por efeitos distintos, por exemplo, pelo aumento da molhabilidade via solubilização direta, por formar partículas com alta porosidade ou pelo efeito de cosolvência (BAGHEL, CATHCART e O'REILLY, 2016).

Os carreadores devem ser inertes e reconhecidamente seguros, possuir estabilidade térmica e termoplástica para o método de fusão, solubilidade em solventes orgânicos para o método de evaporação de solvente e solubilidade em água. A presença de grupos funcionais, doadores ou receptores de ligações de hidrogênio, pode aumentar a solubilidade sólida do fármaco no seu veículo e, também, parecem

desempenhar um papel importante inibindo a separação de fases e a cristalização de um fármaco a partir de uma solução vítrea (DRESSMAN, 2000). A maioria dos sistemas fármaco/carreador são parcialmente miscíveis, ocorrendo a separação de fases à medida que se aumenta a proporção de fármaco. Dessa forma, o fármaco pode formar aglomerados tanto na forma cristalina como na amorfa, o que influencia diretamente na redução da solubilidade aparente e na dissolução do sistema (JANSSENS e VAN DEN MOOTER, 2009).

O tipo de interação formada pelos complexos poliméricos nas dispersões sólidas normalmente depende de muitos fatores, como a natureza, a configuração, o grau de substituição e o comprimento da cadeia polimérica. As ligações de H podem ser mais proeminentes em polímeros de cadeia lateral longa, onde, um maior número de grupos está disponível para a interação ocorrer (MANIRUZZAMAN, MORGAN, *et al.*, 2013).

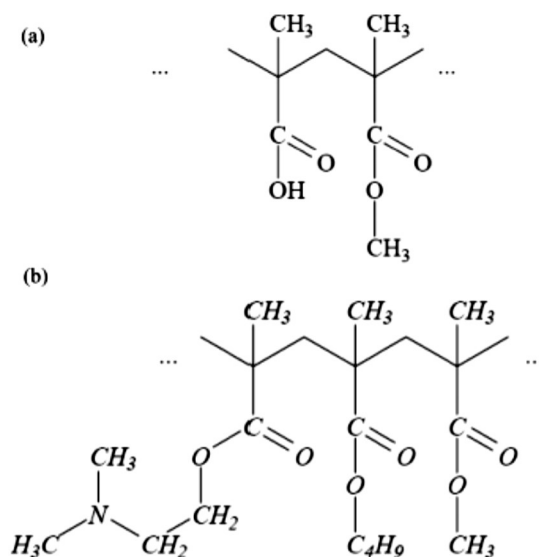
#### **2.4.3 Copolímeros de metacrilato**

Os copolímeros de metacrilato fabricados sob o nome de marca Eudragit<sup>®</sup> são utilizados na fabricação de comprimidos, grânulos, partículas micro e nanométricas, como revestimentos ou como agentes ligantes na fase de granulação para preparar matriz de comprimidos. Como consequência de sua plasticidade, devido à baixa temperatura de transição vítrea dos polimetacrilatos, alguns Eudragit<sup>®</sup> permitem a utilização do método de fusão *hot-melt*. A sequência de grupos hidrofóbicos intercalada por “defeitos” carregados eletricamente é responsável pela hidrofiliçidade do polímero. São solúveis em valores de pH diferentes, por exemplo o Eudragit E em pH < 4; Eudragit L 100 a pH > 6 e os Eudragit S e FS são solúveis em pH > 7 (MOUSTAFINE, BUKHOVETS, *et al.*, 2013).

O Eudragit<sup>®</sup> EPO (figura 7) é um polímero catiônico, baseado em dimetilaminoetil metacrilato e outros ésteres de ácido metacrílico neutros. É solúvel em fluido gástrico em pH < 5,0, tampões fracamente ácidos, cetonas e álcoois. Mostra-se como um pó branco de fluxo livre, com ao menos 95% de polímero seco. O polímero aniônico Eudragit<sup>®</sup> L100 é produto de copolimerização de ácido metacrílico e do metacrilato de metila, e possui a proporção de grupos carboxila livres para os ésteres de aproximadamente 1: 1. Este polímero é facilmente solúvel em pH neutro e a condições fracamente alcalinas (pH 6-7), forma sais com álcalis, permitindo a formação de camadas de filme que são resistentes ao meio

gástrico, com uma rápida dissolução na parte superior do intestino. Pode ser utilizado na granulação de fármacos para liberação controlada e para liberação de princípio ativo no intestino por combinação com outros Eudragit® (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Figura 7: Estrutura dos monômeros dos polímeros Eudragit® E L100 (a) e E PO (b) figura adaptada de (MOUSTAFINE, BUKHOVETS, *et al.*, 2013)



Uma maior supersaturação das soluções e consequente aumento da dissolução foi alcançada para os fármacos indometacina, intraconazol, e griseofulvina em DS contendo Eudragit EPO, HPMCAS-LF e Eudragit L-100-55, respectivamente (SARODE, HARPREET, *et al.*, 2013). A interação fármaco: polímero, no caso das DS dipiridamol: Eudragit L100, também proporcionou a inibição da precipitação do fármaco e a estabilização do seu estado amorfo (CHAUHAN, HUI-GU e ATEF, 2013). Um aumento considerável na velocidade de dissolução do ácido mefenâmico, atribuível as interações intermoleculares específicas formadas entre fármaco e EPO, foi explicada com a formação e

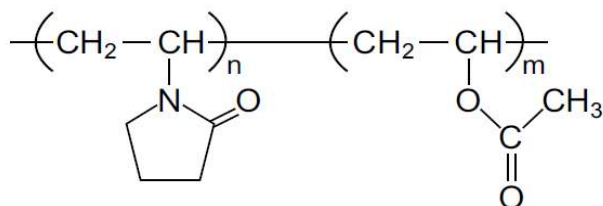
estabilidade da solução supersaturada formada (KOJIMA, HIGASHI, *et al.*, 2012).

#### **2.4.4 Copovidona**

As copovidonas são amplamente utilizadas em formulações farmacêuticas e geralmente consideradas como não tóxicas. São utilizadas como aglutinantes na granulação por via úmida, ligantes em comprimidos obtidos por compressão direta, como formadoras de película e parte do material da matriz em formulações de liberação controlada. O PVP/VA S 630 (figura 8) é um composto não-iônico, formado por 60% de polivinilpirrolidona hidrofílica e 40% de acetato de vinila hidrofóbico, que o tornam um agente tensoativo e estabilizante. É um excelente ligante para comprimidos, matrizes poliméricas para dispersões sólidas e formadores de filmes para aplicação tópica.

O anel pirrolidona proporciona uma excelente solubilidade em água e em uma variedade de solventes orgânicos, assim como propriedades adesivas e formadoras de filme, solubilização e inibição de cristalização de fármacos. A porção vinil acetato proporciona uma diminuição na temperatura de transição vítrea (109°C), uma vez comparada aos homopolímeros de PVPs (165°C), além de reduzir a higroscopicidade. Essa combinação única do PVP/VA permite que ele colabore para o aumento da solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos poucos solúveis em água, através da formação de dispersões sólidas (ASHLAND, 2013).

Figura 8: N-Vinil-2-pirrolidona e acetato de vinila (PVP/VA S 630<sup>®</sup>) adaptada de (ASHLAND, 2013).

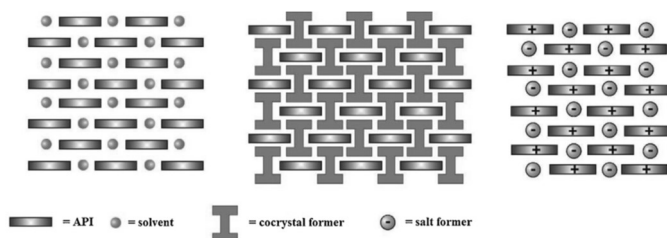


## 2.5 COCRISTAIS

Cocristais são materiais cristalinos sólidos compostos por dois ou mais componentes em uma única fase. Estes componentes podem ser moleculares e/ou iônicos geralmente presentes numa proporção estequiométrica, excluindo os solvatos e sais simples (ALMARSSON e ZAWOROTKO, 2004). A distinção de um cocrystal (figura 9) molecular dos demais sólidos multicomponentes pode ser feita pelo reconhecimento dos conjuntos direcionais e robustos de interações não-covalentes complementares, como ligações de hidrogênio ou halogênio (FRIŠCIC e JONES, 2010).

Cocristais iônicos são sustentados por ligações de hidrogênio com transferência de carga e/ou ligações de coordenação em presença de cátions metálicos (DUGGIRALA, PERRY, *et al.*, 2016). A modificação do estado sólido significa a mudança das propriedades físico-químicas dos fármacos sem alterar a sua estrutura química e sua atividade farmacológica. A síntese de cocristais de fármaco pode trazer melhoria para a sua biodisponibilidade como aumento da sua solubilidade (CHADHA, SAINI, *et al.*, 2012), velocidade de dissolução (MCNAMARA, CHILDS, *et al.*, 2006), estabilidade (REDDY, BETHUNE, *et al.*, 2009) e melhoria de propriedades mecânicas (NEHM, RODRIGUEZ-SPONG e RODRIGUEZ-HORNEDO, 2006).

Figura 9: Representação esquemática de sólidos cristalinos multicomponentes. Solvato; cocrystal; sal, respectivamente. API-ingrediente ativo farmacêutico (FRIŠCIC e JONES, 2010).

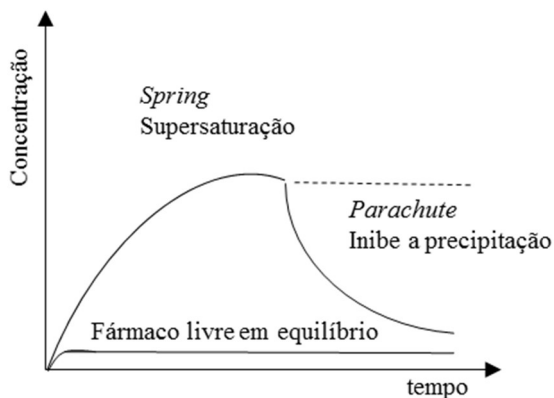


### 2.5.1 Solubilidade dos cocristais

A solubilidade está entre as propriedades físico-químicas mais importantes dos sistemas farmacêuticos, impactando diretamente na biodisponibilidade dos princípios ativos. Esta propriedade pode ser limitada pelo grau de estabilidade da estrutura cristalina ou pela capacidade de o material ser solvatado (interação soluto-solvente). A solubilidade do *coformer* pode ser correlacionada à solubilidade do cocrystal, onde este comportamento pode ser atribuído à diminuição da barreira de solvatação no sistema formado (SERAJUDDIN, 2007). Alguns dos processos envolvidos são dissociação, complexação, ionização, solubilização micelar em água e em meios biorelevantes (ROY, LIPERT e RODRIGUEZ-HORNEDO, 2012).

A rápida dissolução é promovida pelo *spring* (Figura 10), cocrystal ou forma de alta energia, que fornece a força motriz para solubilização do fármaco em concentrações superiores à sua solubilidade em equilíbrio. Este efeito frequentemente aumenta a taxa ou a extensão da absorção do fármaco, mas o rápido retorno a forma mais estável, o torna menos solúvel o que pode limitar esse efeito. A combinação com excipientes (polímeros) pode retardar ou inibir a precipitação. Tais excipientes podem ser considerados como *parachute*, pois diminuem a velocidade de descida das altas para as baixas formas de energias do fármaco (GUZMAN, TAWA, *et al.*, 2007).

Figura 10: Esquema da abordagem *Spring* e *Parachute* que promove e mantém a supersaturação de fármacos em solução, respectivamente (GUZMAN, TAWA, *et al.*, 2007).



### 2.5.2 Síntese de cocrystal farmacêuticos

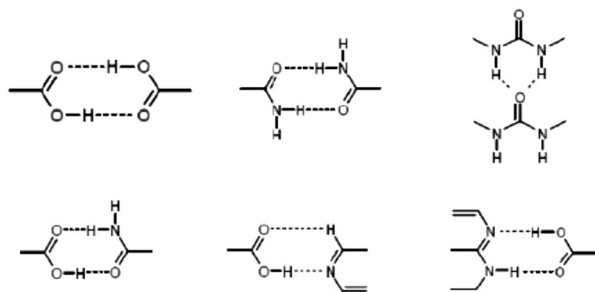
A complexidade das estruturas dos fármacos requer a compreensão das interações intermoleculares em um ambiente competitivo. A química supramolecular do estado sólido é uma ferramenta importante para o design de cocrystal farmacêuticos (DUGGIRALA, PERRY, *et al.*, 2016). O primeiro passo é definir quais são as interações que sustentam e direcionam o empacotamento cristalino (KITAGAWA, KITAURA e NORO, 2004). Segundo as regras de Etter, os melhores doadores de prótons irão interagir com os melhores aceptores e interações intramoleculares de anéis de seis membros são favoráveis (ETTER e REUTZEL, 1991).

Os cocrystal podem ser formados utilizando-se o design por síntons. Estes grupamentos supramoleculares dirigem o reconhecimento, a orientação e a associação do empacotamento das moléculas no estado sólido (ALLEN, HOWARD, *et al.*, 1996). Os síntons são classificados em dois tipos homo e heterosíntons, dependendo dos grupos funcionais que estão interagindo (figura 11). Sendo os homosíntons grupos complementares semelhantes e os heterogrupos complementares diferentes (GOOD e RODRIGUEZ-HORNEDO, 2010). Os potenciais eletrostáticos de superfície molecular e os cálculos da densidade



funcional (DFT) também são ferramentas úteis para apoiar o design de um novo cocrystal. Outra abordagem para prever a formação dos cocrystal é a análise da propensão das interações entre as moléculas de fármaco e o *coformer*, a partir das informações contidas na *Cambridge Structural Database*, CSD (ALLEN, 2002).

Figura 11: Exemplos de sítios supramoleculares homosíntons na porção superior e heterosíntons na inferior (GOOD e RODRIGUEZ-HORNEDO, 2010).



### 2.5.2.1 Métodos de cocrystalização

Diferentes técnicas de obtenção de cocrystal são utilizadas como evaporação de solvente, moagem (a seco ou assistida por líquido), método de reação, fluido supercrítico e ultrassonicador. Na técnica de evaporação de solvente fármaco e *coformer* são dissolvidos em proporções equimolares em um solvente comum. Em seguida, a solução é levada a evaporação lenta (BHATT, AZIM, *et al.*, 2009). A utilização do fluido supercrítico emerge como uma excelente alternativa na obtenção de cocrystal. *Coformer* e fármaco são misturados por agitação magnética e submetidos à pressão por CO<sub>2</sub> supercrítico, este atuará como antissolvente promovendo a precipitação do cocrystal (SEKHON, 2013).

Na técnica de ultrassonicação, uma solução de fármaco e *coformer* é preparada a uma temperatura adequada e submetida à sonicação até a formação de turbidez. A solução é submetida posteriormente a evaporação lenta (AHER, DHUMAL, *et al.*, 2010). A moagem consiste na mistura de quantidades estequiométricas de fármaco e *coformer*, os quais são submetidos à moagem, podendo esta ser manual, com auxílio de gral e pistilo ou mecânica em moinho de bolas ou vibratório.

No caso da moagem assistida (LAG, *Liquid Assisted Grinding*) pequenas quantidades de solvente são adicionadas ao processo (JONES,

MOTHERWELL e TRASK, 2006). A reação ou precipitação de cocrystalização é processada pela mistura não estequiométrica de fármaco e *coformer* em um solvente comum. Para tal, satura-se o solvente com *coformer* e, em seguida, um excesso de fármaco é adicionado, sob agitação constante. O precipitado formado é filtrado e o cocrystal recuperado (RODRIGUEZ-HORNEDO, NEHM, *et al.*, 2006).

## 2.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO ESTADO SÓLIDO

A grande maioria dos produtos farmacêuticos está no estado sólido, e são formulados e produzidos a partir de pós. Uma rigorosa caracterização física dos componentes da formulação pode prevenir problemas relacionados a variações inesperadas (BRITAIN, 1995). A estabilidade dos componentes frente aos processos de manufatura dos produtos como mistura, granulação, secagem, compressão, revestimento e embalagem, também deve receber atenção especial por parte do controle de qualidade. A caracterização adequada do estado sólido implica na utilização de uma série de técnicas combinadas (STORPIRTIS, GONÇALVES, *et al.*, 2009).

### 2.6.1 Espectroscopia vibracional infravermelho (IV)

A radiação de IV abrange a faixa de 10000 a 100  $\text{cm}^{-1}$ , sendo comumente é utilizada a região média do IV entre 4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ . Essa radiação é absorvida e convertida pelas moléculas orgânicas em energia vibracional molecular. A energia absorvida é quantificada e o espectro vibracional aparece em forma de bandas. A frequência ou comprimento de onda depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos. As intensidades das bandas podem ser representadas pela transmitância (T) ou pela Absorbância (A). A transmitância é a razão entre a força radiante transmitida e a força incidente na amostra e a absorbância é representada pela equação:  $A = \log_{10}(1/T)$  (SILVERSTEIN, 2005).

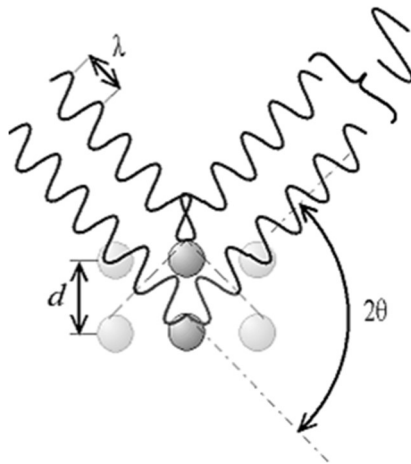
O método de infravermelho por transformada de fourier (FTIR) faz o uso simultâneo de todas as frequências produzidas por uma fonte, assim proporcionando um grande enriquecimento na razão sinal: ruído, quando comparado com o instrumento dispersivo. A intensidade com a qual a banda absorve a radiação vai depender do momento dipolo da ligação, relacionado à diferença de eletronegatividade dos átomos

envolvidos. O IV possui capacidade limitada para elucidação de moléculas desconhecidas, funcionando como uma “impressão digital” de moléculas já descritas, em geral observando-se bandas que aparecem em frequências superiores a  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Pode ser útil no monitoramento de formulação por apresentar correlações entre a absorção do IV e algumas características como tamanho de partícula, quantidade de IFA, polimorfismo, quantidade de água e uniformidade das misturas de componentes da formulação. Variações de deslocamento das bandas do espectro padrão podem ser indicativos de rompimento ou formação interações inter ou intramoleculares (BRITTAIN, 1995).

### **2.6.2 Difractometria de raio-X de pó (DRXP)**

A radiação eletromagnética de raios-X se encontra entre as radiações gama e ultravioleta, sendo expressa em unidades de angstrom ( $\text{\AA}$ ), que equivale a  $10^{-8}\text{ cm}$ . Quando o raio-X incide em um sólido cristalino, ele interage como os elétrons dos átomos presentes e é espalhado em todas as direções, caracterizando o fenômeno da difração. Algumas destas ondas estão em fase, formando uma onda construtiva, que reforçam a sua intensidade formando as reflexões, observadas no difratograma. Os átomos que compõem os sólidos cristalinos se dispõem de forma ordenada em planos cristalinos separados entre si por distâncias interplanares ( $d$ ). O difratograma apresenta uma série de reflexões características da amostra, sendo identificadas pelo ângulo ( $2\Theta$ ) ou pela distância interplanar ( $d$ ) contra a sua intensidade. A lei de Bragg descreve as condições nas quais isso pode ocorrer,  $n\lambda = 2d \sin$ , figura 12 (CASTRO, 2010).

Figura 12: Diagrama esquemático de uma onda construtiva segundo a lei de Bragg adaptado de (CASTRO, 2010).



A determinação da estrutura cristalina de uma substância possibilita analisar as interações intra e intermoleculares, assim como o empacotamento e a conformação moleculares. O padrão de difração para cada forma cristalina de um composto é único, o que faz desta técnica adequada para identificação de diferentes polimorfos, solvatos e anidros.

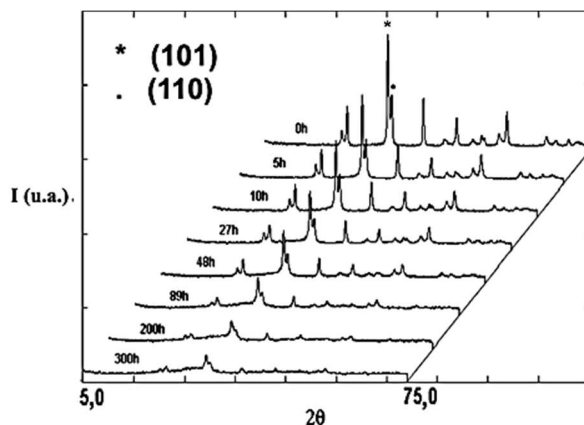
O método possui limitações para identificação de substâncias não-cristalinas (amorfos), por apresentar um difratograma com máxima difusão. A técnica pode também ser utilizada para os excipientes, formulações e para identificação de impurezas, por meio de comparação com bancos de dados que contenham os difratogramas padrão dessas amostras (BRITAIN, 1995).

Os difratogramas são geralmente obtidos em condições ambiente, mas existe a possibilidade de desenvolvimento dos testes com ou sem resfriamento, onde os padrões de difração podem trazer informações de transições de fase influenciadas pela temperatura. O grau de cristalinidade das substâncias também pode ser avaliado pelo DRXP e é definido pelo nível de organização da sua rede molecular, sendo os mais desordenados considerados amorfos (CARREÑO, GARCIA, *et al.*, 2008).

O exemplo da figura 13 demonstra a diminuição das intensidades das reflexões no DRXP, o que é um indicativo da diminuição da cristalinidade da amostra como aumento do tempo de

moagem. O nível de cristalinidade de uma molécula também pode ser medido por outras técnicas como IV, DSC e densidade (BRITAIN, 1995).

Figura 13: DRXP de  $\text{PbTiO}_3$  submetidos a diferentes tempos de moagem em moinho de bolas (5mm) adaptado de (CARREÑO, GARCIA, *et al.*, 2008)



### 2.6.3 Técnicas termoanalíticas

Os métodos de análise térmica podem ser definidos como as técnicas nas quais as propriedades físico-químicas do analito são determinadas a partir da aplicação de um programa de temperatura e uma atmosfera controlados. Os processos que geralmente podem ser observados são endotérmicos (fusão, evaporação, sublimação, desolvatação, transição de fase sólida, degradação química, etc.) ou exotérmicos (cristalização, decomposição oxidativa, etc.). As técnicas têm ampla utilização em estudos relacionados à estabilidade térmica e caracterização de materiais, mecanismos e cinética de decomposição térmica, otimização de condições de síntese de novos materiais, determinação do grau de pureza e composição de algumas misturas. A análise térmica pode ser muito útil para os estudos de pré-formulação para

indicação de possíveis interações entre fármaco-excipiente, definindo a sua compatibilidade e também para determinação da umidade (STORPIRTIS, GONÇALVES, *et al.*, 2009).

Na calorimetria exploratória diferencial (DSC) a amostra e o material de referência são mantidos sob as mesmas condições de temperatura e razão de aquecimento. A variação na entalpia dos processos durante o aquecimento é registrada, sendo que a área de um evento de DSC é diretamente proporcional ao calor absorvido. A medida da endoterma de fusão da amostra pode ser utilizada para avaliar a sua pureza, caracterização de polimorfos, estudo da estabilidade e determinação da entalpia de desidratação. Outros fatores além da pureza que podem afetar a resposta do equipamento são razão de aquecimento, tamanho de partícula, cadinho, vedação do sistema, massa e condutividade térmica da amostra, atmosfera e a natureza da reação (BYRN, PFEIFFER e STOWELL, 1999).

Em geral, os valores de razão de aquecimento tendem a deslocar os eventos térmicos a temperaturas mais elevadas, onde razões mais baixas tornam os eventos mais nítidos, aumentando o tempo de análise. O formato do cadinho, se fechado, aberto ou parcialmente vedado para ventilação de gases também altera a curva DSC (WATSON, 2012).

A termogravimetria (TGA) mede o ganho ou perda de massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo. O instrumento baseia-se em uma microbalança conectada a um porta amostra situado em um forno, com controle de temperatura. Permite determinar a temperatura em que os materiais começam a se decompor, o acompanhamento de reações de desidratação, avaliação da equivalência composicional, caracterização de polimorfos, oxidação e combustão, entre outras. A atmosfera de nitrogênio é mais comumente utilizada, porém outros gases também podem ser usados (BYRN, PFEIFFER e STOWELL, 1999).

A TGA pode ser executada de forma isotérmica, onde a temperatura é mantida constante por um determinado tempo; quase isotérmica, onde a amostra é aquecida em uma razão linear enquanto não ocorre variação de massa, depois é mantida constante; e de forma dinâmica, na qual a temperatura varia em função de uma razão de aquecimento ou resfriamento linear. Os mesmos fatores que afetam o DSC podem impactar a TGA. A termogravimetria derivada (DTG) é uma ferramenta que facilita a avaliação dos resultados obtidos na TGA, com picos que delimitam as áreas proporcionais às variações de massa, por meio de uma derivada de primeira ordem. As aplicações das curvas DTG compreendem a separação de reações sobrepostas, análise

quantitativa por medida da altura do pico e distinção de eventos térmicos (STORPIRTIS, GONÇALVES, *et al.*, 2009).

#### **2.6.4 Microscopia eletrônica de varredura**

A técnica baseia-se em um feixe fino de elétrons sobre a superfície da amostra. A interação entre o feixe e a superfície da amostra provoca a emissão de radiações de elétrons secundários, elétrons retrodispersados, elétrons Auger, fótons, raios-X, etc. As imagens de alta resolução são geradas pela captação dos elétrons secundários e demonstram a topografia da superfície da amostra. Os aumentos podem chegar até 300.000 vezes, podendo ser utilizadas escalas entre nanômetros e micrômetros (WATSON, 2012).

#### **2.6.5 Solubilidade**

Em nota técnica o CEFAR (Coordenação de Equivalência Farmacêutica) recomenda o *shake-flask* como método de escolha para avaliação da solubilidade de fármacos conforme preconizado pela RDC nº 31/2010 (BRASIL, 2010). A resolução determina que a solubilidade dos fármacos em equilíbrio a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , deve ser avaliada em no mínimo 3 meios diferentes em pH fisiológico na faixa de 1,2-6,8, levando em consideração o pKa do mesmo. Quantidades crescentes do fármaco devem ser adicionadas para obtenção de uma solução saturada, com agitação (geralmente de 24-48 h) e temperaturas controladas. Os termos descritivos de solubilidade podem ser visualizados na tabela 1 (BRASIL, 2010).

Tabela 1- Termos descritivos de solubilidade e seus significados, adaptada (BRASIL, 2010).

Termos Descritos	Quantidades aproximadas do solvente, em mililitros, para um grama da substância
Muito solúvel	Menos de 1
Facilmente solúvel	De 1 a 10
Solúvel	De 10 a 30
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100
Pouco solúvel	De 100 a 1.000
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10.000
Praticamente insolúvel	Mais de 10.000

### 2.6.6 Dissolução

A dissolução é o processo pelo qual uma substância sólida dissolve em um determinado solvente para formar uma solução. A avaliação da dissolução é indispensável nas várias etapas dos processos de produção de medicamentos, sendo uma ferramenta indispensável para estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e assuntos regulamentares. O desenvolvimento de métodos que possam prever de forma mais eficaz o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas, reduz custos e tempo necessários de produção (MANADAS, PINA e VEIGA, 2002).

As condições do teste de dissolução como tipo de equipamento, composição e volume, devem garantir que o método seja discriminativo, robusto, exato e transferível. O teste de dissolução é método indicado para detectar diferenças na formulação, processos de fabricação e variações nas características físico-químicas do medicamento. Para definição das características do meio de dissolução é necessário conhecer a solubilidade do fármaco em relação ao pH. A garantia das condições *sink* também é fundamental para o experimento, para tal o volume de meio deve ser no mínimo 3 vezes maior que o volume necessário para se obter uma solução saturada, sendo que algumas literaturas preconizam 10 vezes (HOSEY, CHAN e BENET, 2016).

O meio deve ser biorrelevante compreendendo a faixa de pH fisiológico entre 1-6,8 para formas farmacêuticas de liberação imediata e



1-7,5 para liberação prolongada. A capacidade tamponante do meio deve ser avaliada durante todo o ensaio. A utilização de tensoativos deve ser justificada, como tipo e concentração. A desgaseificação do meio é fundamental para evitar que as bolhas atuem como uma barreira para o contato do meio de dissolução com a amostra interferindo no perfil de dissolução. O resultado é expresso em porcentagem da quantidade declarada no rótulo (BRASIL, 2010).

A aparelhagem selecionada para os métodos vai variar de acordo com a forma farmacêutica. Por exemplo, os cestos (método1) são utilizados na avaliação de cápsulas e comprimidos que flutuam ou adaptados por âncoras que os mantenha no fundo da cuba caso se utilize as pás (método 2). São ainda descritos pela USP,2011, os aparelhos de cilindros recíprocos, utilizados principalmente para comprimidos de liberação modificada; célula de fluxo, para formas farmacêuticas de liberação prolongada e também indicada para formas contendo fármacos pouco solúveis; pá sobre disco e cilindro, para adesivos transdérmicos; suporte recíproco, no caso de adesivos transdérmicos e comprimidos que não desintegram, tipo bomba osmótica (USP, 2011).

## 2.6.7 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI)

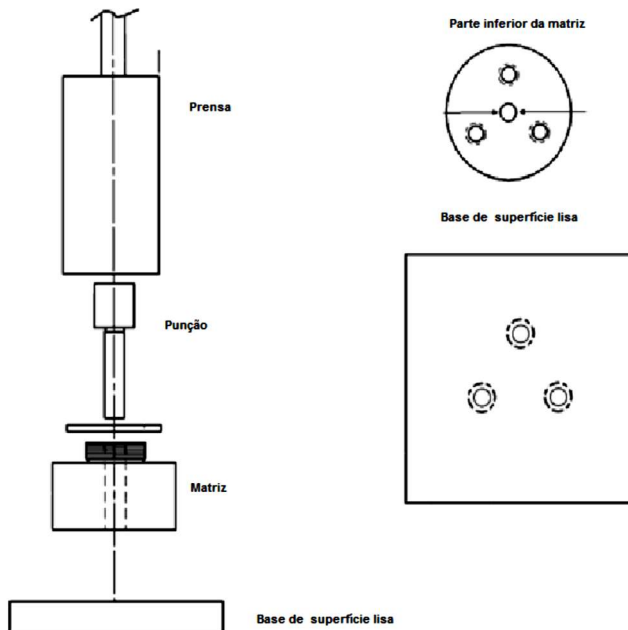
Uma área definida da superfície da amostra (0,5 cm<sup>2</sup>) entra em contato com o meio de dissolução apropriado e é mantida sob rotação, temperatura e pH constantes, assim podendo ser definida a VDI. Os resultados são expressos na forma em  $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , obtidos pela regressão linear dos pontos. As condições *sink* do ensaio deverão ser observadas e a área da superfície da pastilha deverá manter-se constante (ISSA e FERRAZ, 2011).

A USP, 2011 descreve dois aparatos para dissolução intrínseca: disco rotatório e disco estacionário, adaptáveis em dissolutores padrão. No aparato de disco rotatório (figura 14) o fluxo é gerado pela rotação da matriz e o fluido fica em repouso, enquanto que para o disco estacionário a pá ou outro dispositivo de agitação é a fonte do fluxo do fluido (USP, 2011).

Os aparatos utilizam uma pastilha não desintegrável, que fica em um ponto fixo na cuba, diminuindo as variações hidrodinâmicas. As pastilhas são obtidas por compressão direta do pó, em punção de superfície lisa. A pressão de obtenção da pastilha deve ser avaliada para garantir se não houve modificação na estrutura cristalina do fármaco, que

deve ser acompanhado por outras técnicas como DRXP ou IV (ZAKERI-MILANIA, BARZEGAR-JALALIA, *et al.*, 2009).

Figura 14: Desenho esquemático da prensa e do aparato para dissolução intrínseca em disco rotatório, adaptado da USP, 2011.



Com a finalidade de mimetizar as condições *in vivo*, o meio de dissolução é normalmente aquoso com pH dentro da faixa fisiológica e temperatura constante de 37°C. O teste deve ser conduzido preferencialmente em condições *sink*, por que a aproximação da condição de saturação poderia causar uma diminuição da VDI artificialmente. A formação de bolhas impede que a pastilha entre em contato com o meio de dissolução, o mesmo deve ser desgaseificado antes do início do ensaio. O soluto pode alterar o pH na região próxima ao compacto, deixando-o diferente do restante do meio, sendo importante o controle constante do pH (ROSA, 2012).

# CAPÍTULO I- DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O FÁRMACO BENZNIDAZOL.

## 1 INTRODUÇÃO

O monitoramento da estabilidade de produtos farmacêuticos é fundamental para o estabelecimento de recomendações de condições de armazenamento e validade dos mesmos (GIL, 2010). A degradação destes produtos pode gerar perda de atividade terapêutica e toxicidade, acarretando danos aos pacientes. De forma geral, os fármacos são suscetíveis a algum tipo de decomposição, e algumas classes químicas tendem a se decompor em condições brandas de reação (SINGH e BAKSHI, 2000). Os estudos de estabilidade devem avaliar então a estrutura e propriedades físico-químicas das substâncias, para prever prováveis rotas de degradação das mesmas (PATEL, NAREGALKAR e PATEL, 2015). A otimização dos processos de degradação facilita o acompanhamento da estabilidade, isolamento, caracterização de produtos degradados, estabelecimento dos mecanismos e cinética de degradação (CARSTENSEN, e RHODES, 2000).

Evidências sobre como o fármaco ou produto farmacêutico se comporta sob a influência de uma variedade de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz em função do tempo, são fundamentais (RAILLARD, BERCU, *et al.*, 2010). O estabelecimento de metodologias analíticas indicadoras de estabilidade é primordial para produção de medicamentos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV-Vis está entre as técnicas mais utilizadas para testes indicadores de estabilidade (OLIVEIRA, YOSHIDA, *et al.*, 2013). Estes detectores permitem observar desvios em espectros de absorvância do analito como o aparecimento de impurezas. Sendo considerado um dos métodos mais adequados para análise de rotina de medicamentos (KUMINEK, TAGLIARI, *et al.*, 2010). O objetivo deste capítulo é trazer o desenvolvimento e validação de um método CLAE-UV indicativo de estabilidade, que permita quantificar BNZ em sistemas binários comidos, consistindo de BNZ: Ac-Di-Sol<sup>®</sup>, assim como estimar o fármaco presença de seus produtos de degradação.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 MATERIAIS

O BNZ matéria-prima foi gentilmente fornecido por NORTEC Química (Rio de Janeiro, Brasil), cetoconazol (KTZ) padrão foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A croscarmelose de sódica (Ac-Di-Sol<sup>®</sup>) foi fornecida pelo BH Schilling (Milão, Itália). Os solventes acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) grau CLAE foram adquiridos da J.T. Baker (Phillipsburg, Estados Unidos). Ácido acético (grau de pureza > 85%) foi comprado de Riedel-De Haen (Calgary, Canadá) e acetato de amônio (97% de pureza) da Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemanha). A água destilada e deionizada foi obtida através do sistema de A10 de elemento Milli-Q (Millipore, San Francisco, EUA). Os solventes e outros produtos químicos utilizados possuíam grau reagente analítico, e foram utilizados como recebido sem qualquer purificação preliminar.

### 2.2 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Os testes foram realizados no laboratório de Controle de Qualidade (UFSC) e no laboratório “Farmaceutico Tecnológico Aplicativo” (UNIPR-Itália). Foram utilizados dois equipamentos diferentes para a análise de cromatografia líquida, o primeiro um Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-10AD, unidade de controle SCL-10A, VP e detector UV/VIS SPD-10AVVP. O segundo equipamento, um LC-UV Agilent 1200, equipado com bandeja, desgaseificador, bomba isocrática, amostrador automático FC/ALS therm e computador com Chem Station. Os dados cromatográficos foram processados utilizando-se os softwares Class-VP Shimadzu<sup>®</sup> V 6.14. e Agilent 1200. Os detectores de UV-VIS foram fixados no comprimento de onda de 220 nm. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, CA, EUA). A fase móvel consistiu em solução acetato de amônio (pH 6,5, 26 mM)-ACN, (65:35 v/v). A separação foi executada no modo de isocrático, fluxo de 0,5 mL/min, volume de injeção de 20 µL e temperatura de coluna de 25 °C.

## 2.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A ANÁLISE DE LC

Alíquotas de amostra (cerca de 1 mL) foram coletadas a partir do meio de reação após experimentos de degradação forçada. As amostras submetidas ao meio hidrolítico foram neutralizadas pela adição de soluções ácidas ou básicas, na mesma concentração molar, em quantidade suficiente a atingir pH 7. Para as amostras de fotodegradação do pó, cerca de 10 mg de fármaco foram pesados com exatidão e preparados como a solução de trabalho, item 2.6. Em seguida, as amostras foram diluídas com o intuito de obter concentrações de BNZ em torno de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , com a fase móvel. As soluções foram preparadas com auxílio de balão volumétrico de 20 mL, agitadas manualmente e filtradas em membrana de nylon  $0,45 \mu\text{m}$ . O mesmo tratamento foi utilizado para preparar as amostras do branco. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

## 2.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE LC

Os parâmetros precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, robustez, estabilidade e recuperação foram avaliados (FDA, 2015). A especificidade do método foi determinada através da análise de BNZ em presença de produtos de degradação, obtidos por meio de condições de estresse, descritas no item 2.5. Para avaliar a linearidade, cinco amostras no intervalo de concentração de  $10\text{-}60 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas em triplicata, em três dias diferentes. A análise de regressão linear e análise de variância (ANOVA), intervalo de confiança de 95%, foram utilizadas para demonstrar a linearidade do método (ICH, 2005). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através das equações 1 e 2, respectivamente (BRAZIL, 2003).

$$\text{LD} = \frac{3.3 \sigma}{s} \tag{1}$$

$$\text{LQ} = \frac{(10 \sigma)}{s} \tag{2}$$

Onde,

$\sigma$  = desvio-padrão do branco ( $n = 10$ )

$S$  = inclinação da curva de calibração

Para a precisão (inter e intra-corridas) e ensaios de robustez, sextuplicatas de soluções de BNZ, correspondentes à concentração ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram analisadas. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) da média das concentrações determinado experimentalmente. Os testes de precisão intercorridas foram realizados em 3 dias por analistas diferentes. Para avaliação da reprodutibilidade a precisão entre dois laboratórios (lab) foi realizada. A exatidão do método foi avaliada pela porcentagem, aplicando-se a também a metodologia ao padrão de referência KTZ. A amostras foram avaliadas em 3 concentrações, baixa ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), média ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e alta ( $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em triplicata. Sendo as porcentagens de recuperação calculadas a partir da comparação dos resultados analíticos das amostras, áreas do padrão e do analito. Além disso, para avaliar a robustez, pequenas e deliberadas alterações no método foram realizadas da seguinte forma: temperatura do forno ( $23, 25$  e  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ), fluxo da fase móvel ( $0,4; 0,5$  e  $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ ), composição da fase móvel ACN:solução de acetato de amônio ( $\text{pH } 6,5, 26 \text{ mM}$ ) ( $63:37; 65:35$  e  $67:33, \text{ v/v}$ ). A avaliação estatística dos resultados foi realizada utilizando o software GraphPad prism 5.

## 2.5 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA (*SYSTEM SUITABILITY*)

A adequação do sistema foi realizada para avaliar a resolução e a reprodutibilidade do método para a análise. Foram feitas sextuplicatas dos padrões BNZ e KTZ, com concentrações correspondentes a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os parâmetros avaliados foram tempo de retenção, assimetria do pico e número de pratos teóricos.

## 2.6 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Para preparo das soluções estoque de KTZ (padrão) e BNZ (padrão secundário),  $10 \text{ mg}$  de cada fármaco foram precisamente pesados, e então transferidos para um balão volumétrico calibrado ( $10 \text{ mL}$ ) e o volume ajustado com metanol.

## 2.7 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS SUBMETIDAS A DEGRADAÇÃO FORÇADA

As amostras do BNZ, submetidas a estudos de degradação forçada, foram preparadas da mesma forma da solução de trabalho, exceto pelo o solvente utilizado. No caso das degradações alcalinas, ácidas e oxidativas, o fármaco foi dissolvido primeiramente em metanol, e em seguida foi adicionado o meio de degradação em quantidade suficiente para manter a proporção de 30:70, v/v, respectivamente.

## 2.8 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os meios de degradação utilizados nos estudos de degradação forçada foram preparados conforme descrito a seguir. Para a avaliação dos processos de hidrólise alcalina e ácida o fármaco foi exposto a soluções de diferentes molaridades 0,1 e 1M, para ambos NaOH e HCl. A oxidação de BNZ foi avaliada em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 5%. As amostras foram acondicionadas em balão de fundo redondo, conectado a um condensador de refluxo e imerso em banho termostático a 40 °C, sendo avaliadas por CLAE nos tempos de 8, 12 e 24h.

### 2.8.1 Fotodegradação

As soluções orgânicas contendo BNZ foram expostas à radiação UV (lâmpada Philips® UVC, 30 W) instalado em uma caixa revestida internamente com superfície espelhada, em 254 nm. As amostras foram preparadas dissolvendo-se 3 mg de BNZ em 3 mL de solvente e acondicionadas em uma cubeta de quartzo, sendo avaliados os solventes orgânicos ACN, clorofórmio e metanol, individualmente. Alíquotas das soluções foram coletadas após 15 e 120 minutos de ensaio. Para a avaliação da matéria-prima, 50 mg de BNZ foram pesadas em um vidro de relógio e avaliadas em intervalos de 24 h. As cubetas e os vidros de relógio contendo as amostras foram posicionados a uma distância de 10 cm da lâmpada UVC, cuja intensidade foi testada com auxílio do luxímetro calibrado (modelo Mimipa® MLM 1011, São Paulo, Brasil). O

procedimento de fotodegradação está de acordo com o guia ICH Q1B (ICH, 1996).

## 2.9 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS COMOÍDOS

Para avaliação do impacto do processo de moagem na preparação de formulações contendo BNZ, foram preparados sistemas binários, consistindo de BNZ: Ac-Di-Sol<sup>®</sup>. Foram moídos em três diferentes proporções de fármaco: polímero, a saber, 1:1, 1:2 e 1:3 (m/m). Os dois componentes foram pesados precisamente e misturados em um almofariz de ágata, por um tempo padronizado de 3 min e então introduzidos nos jarros de trituração. O processo de moagem foi realizado em um moinho vibracional-Retsch MM400 (Retsch GmbH, Haan, Alemanha) equipado por 2 jarros de óxido de zircônio do tipo parafuso, cada um com uma capacidade de 35 mL. Três esferas com um diâmetro de 15 mm foram usadas e o processo foi realizado nas frequências de 30 Hz e 20 Hz, com um tempo de moagem de 1 h. As formulações foram obtidas com a colaboração da Professora Beatrice Perissutti da Università degli Studi di Trieste (Itália).



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 OTIMIZAÇÃO DE ANÁLISE CLAE-UV

O método indicativo de estabilidade foi desenvolvido por CLAE testando condições cromatográficas diferentes. A fase móvel foi otimizada pela avaliação das misturas dos solventes: ACN-solução acetato de amônio pH 6,5, ACN-água ou metanol-água, em proporções diferentes. A temperatura da coluna foi testada em um intervalo de 20 a 35 °C. Como fase estacionária foram avaliadas diferentes colunas: coluna de fase reversa C18 Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, CA, EUA) e Phenomenex C18 de Gemini, 5µ (lotes: 473210-4 e 507294-13). Além disso, o comprimento de onda do detector UV/Vis foi examinado na faixa de 220-324nm. Desta forma, as condições que geraram a melhor resolução na separação do fármaco dos seus produtos de degradação foram escolhidas. A identificação de BNZ baseou-se na comparação dos tempos de retenção dos picos presentes no cromatograma, com padrões de trabalho do fármaco coeluídos. E, a separação de compostos foi determinada com base na resolução do pico BNZ. A quantificação foi realizada pelo padrão interno KTZ (padrão de referência). Por fim, as curvas de calibração foram estabelecidas pelos padrões de trabalho de BNZ, em concentrações que variaram na faixa de 10 a 60 µg.mL<sup>-1</sup>.

A área do pico BNZ foi integrada de acordo com a amplitude máxima em relação à linha de base. O método por CLAE foi considerado específico para a quantificação do BNZ, uma vez que nenhuma sobreposição entre os picos do fármaco e seus produtos de degradação foi observada. Além disso, não foram detectados picos na injeção em branco. Por esta razão, o método foi definido de tal forma que permita a visualização de ambos o fármaco e os produtos de degradação. A simetria de pico ( $tf= 0,99$ ) e resolução ( $R > 2$ ) foram consideradas. Os parâmetros que atendem a esses requisitos foram  $\lambda = 220$  nm, fase móvel ACN-acetato de amônio- (pH 6,5, 26mM) (65:35 v/v) em condições de isocrática, com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min e volume de injeção da amostra de 20 µl.

### 3.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

A avaliação dos parâmetros precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, robustez, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação do método indicativo estabilidade proposto, demonstraram estar de acordo com os guias de validação. O método apresentou um coeficiente de correlação linear superior 0,999 no intervalo 10-60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A equação da reta obtida a partir da curva de calibração foi  $y = 27005x - 219338$ , o teste *t-Student* no intercepto demonstrou que as médias não são significativamente diferentes (DPR = 0,08%,  $P > 0,05$ ). A análise estatística de ANOVA permitiu observar que a correlação positiva entre as variáveis, com significante regressão linear ( $P > 0,05$ ) e o desvio da linearidade não foi significativo ( $P > 0,05$ ). Os LQ e LD calculados do fármaco foram 0,11  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,04  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, garantindo excelente sensibilidade do método, apropriada para a aplicação no estudo proposto.

Os resultados expressos na tabela 2, indicam que o método é preciso, por apresentar DPR inferiores a 1,5%. Pouca variação foi observada no teste de exatidão (tabela 3), para as três concentrações distintas avaliadas os montantes recuperados de BNZ e KTZ estão muito próximos de 100%. As variáveis avaliadas no teste de robustez não influenciaram significativamente os resultados da análise (tabela 3). Não foi observada nenhuma diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os resultados obtidos, avaliados pelo teste *t-Student*.

Tabela 2- Resultados relativos a precisão do método indicativo de estabilidade proposto.

C média de BNZ (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) *	DPR (%)	C média de BNZ (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) *	DPR (%)
<b>Dia 1</b> (analista I, lab I)	0,36	<b>Manhã</b>	1,28
<b>Dia 2</b> (analistaII, labI)	1,06	<b>Tarde</b>	1,06
<b>Dia 3</b> (analista I, labII)	0,57	<b>Noite</b>	1,01
<b>Média entre dias</b>	0,66	<b>Média intradia</b>	1,12

\*Sextuplicata

Tabela 3-Resultados relativos a exatidão do método indicativo de estabilidade proposto

<b>Solução de trabalho (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>) *</b>	<b>(%) Recuperada de BNZ<sup>a</sup></b>	<b>(%) Recuperada de KTZ<sup>a</sup></b>
<b>40</b>	98,43 $\pm$ 1,83	99,2 $\pm$ 0,58
<b>50</b>	100,5 $\pm$ 0,36	101,2 $\pm$ 0,83
<b>60</b>	99,5 $\pm$ 0,32	100,1 $\pm$ 0,06

\*Triplicata

Tabela 4-Condições cromatográficas e variações investigadas para o teste de robustez

<b>Variáveis</b>	<b>Intervalo</b>	<b>(%) de BNZ Recuperada<sup>a</sup></b>
<b>Composição da fase móvel</b> (ACN: Solução acetato de amônio pH 6,5)	63:37	98,52 $\pm$ 1,19
	65:35	98,68 $\pm$ 0,69
	67:33	98,37 $\pm$ 0,98
<b>Temperatura do forno (°C)</b>	23	100,76 $\pm$ 0,75
	25	98,68 $\pm$ 0,92
	27	99,37 $\pm$ 0,56
	0,4	99,23 $\pm$ 0,75
<b>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	0,5	98,69 $\pm$ 0,94
	0,6	100,37 $\pm$ 1,40

<sup>a</sup>Desvio padrão relativo

### 3.3 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA (SYSTEM SUITABILITY)

Os parâmetros avaliados para a adequação do sistema como tempo de retenção, assimetria e pratos teóricos, não apresentaram variação significativa ( $P > 0,05$ ) conforme descrito na tabela 5. Portanto, os resultados são valiosos para demonstrar a eficiência e a reprodutibilidade do método.

Tabela 5- Adequação do sistema do método indicativo de estabilidade proposto

Parâmetros	Solução de trabalho 50µg.mL <sup>-1</sup>	
	BNZ	KTZ
Número de pratos teóricos	5089,80±0,94	7873,58±0,87
Simetria de pico	1,39±0,50	1,29±0,23
Tempo de retenção (min)	4,12±0,05	6,48±0,06

<sup>a</sup> Desvio padrão relativo

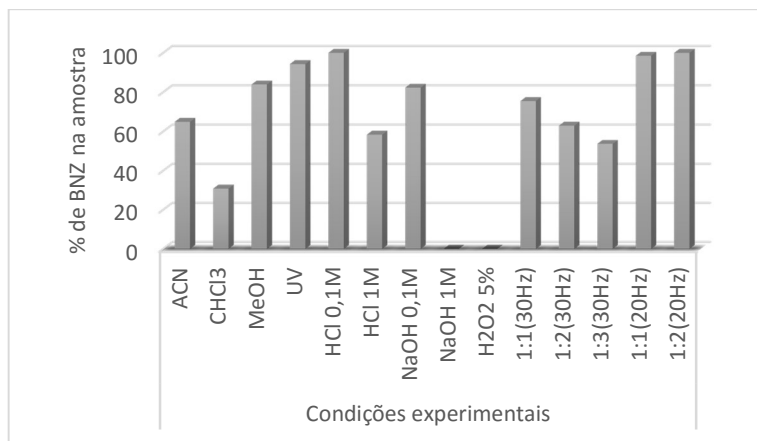
### 3.4 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O método indicativo de estabilidade demonstrou-se adequado para a detecção e quantificação do fármaco, uma vez que houve a total separação do fármaco de seus produtos de degradação. Alguns processos de degradação de BNZ foram verificados como oxidação, hidrólise e fotólise. A avaliação da estrutura do fármaco permite verificar a presença de grupos suscetíveis a essas reações como, a amida que pode ser facilmente hidrolisada, o grupo nitro que pode sofrer fotodegradação e as ramificações no anel benzênico oxidação. Os produtos formados podem variar de acordo com o ambiente de degradação e como observados nos cromatogramas como picos adicionais ao pico de BNZ (figura 1, APÊNDICE A). A identificação e quantificação do BNZ após os testes de degradação forçada foram realizadas por comparação dos cromatogramas das amostras e do padrão de BNZ. Os percentuais de BNZ presentes nas amostras pós-teste de degradação forçada (figura 15) indicam que BNZ sofre degradação em diferentes níveis. A fotodegradação do fármaco pareceu ser mais severa em CHCl<sub>3</sub>, apresentando um decaimento de BNZ de em torno de 70%, e menor para os solventes ACN- 35% e MeOH-20%, no caso da avaliação do fármaco no estado sólido foi observado um decaimento em torno de 5%, somente. Nos estudos de hidrólise, o fármaco demonstrou-se mais suscetível a hidrólise básica, uma vez que foi totalmente degradado em NaOH 1M frente a um pouco mais de 40% em HCl na mesma concentração molar. BNZ exibiu alta estabilidade em HCl 0,1M, não apresentando degradação e decaiu em torno de 20% em NaOH 0,1M. A estabilidade do fármaco em meio ácido (HCl 0,1M) é muito importante, por este ser o meio

preconizado para ensaios de dissolução *in vitro* pelas farmacopeias, por mimetizarem as características de pH encontrados no estômago humano (USP, 2011).

No caso de BNZ a moagem de alta energia (30 Hz) acarretou a mudança de cor na formulação e uma perda de massa de fármaco por possíveis processos de degradação. A proporção do polímero Ac-Di-Sol pode contribuir para a degradação de BNZ, uma vez que porcentagens menores de fármacos foram observadas conforme se aumentava a quantidade de polímero. As formulações obtidas por moagem a uma frequência de 20Hz, não apresentaram mudança cor comparada de material de partida. Além disso, foi possível dosear em torno de 100% de fármaco para ambas as formulações independente da proporção dos componentes. Estes resultados podem indicar que a moagem a frequências de 20 Hz ou menores são mais seguras para produção de formulações contendo BNZ. Os resultados também ressaltam importância do acompanhamento do processo de produção de uma nova formulação uma vez que a possível perda da atividade fármaco ou geração de produtos tóxicos pode ser prejudicial aos pacientes mesmos (BOLDYREV, 2004). A moagem é uma ferramenta eficaz na redução de tamanho de partículas a escalas nano e/ou micrométricas. A técnica envolve a quebra de grãos grandes em grãos finos pela aplicação de energia mecânica. Esta transformação física frequentemente melhora a capacidade de processamento ou solubilidade dos fármacos, mas deve ser acompanhada com cautela para garantir a segurança dos produtos obtidos (LOH, SAMANTA e HENG, 2015).

Figura 15: Percentual de BNZ quantificado nas amostras após teste de degradação forçada.



Métodos CLAE-UV disponíveis na literatura para BNZ são restritos ao quantificação do fármaco em tecidos biológicos como, plasma (GUERRERO, PINAZO, *et al.*, 2011), leite humano (MARSÓN, PADRÓ, *et al.*, 2013), plasma e urina humanos (MARSÓN, DANA, *et al.*, 2013), plasma murino (SILVA, OLIVEIRA, *et al.*, 2012) e plasma e urina (MORILLA, BENAVIDEZ, *et al.*, 2003), estes estudos não se dedicaram a demonstrar os produtos de degradação de BNZ restringindo a sua aplicação. Santos e colaboradores, 2015 apresentam o único método indicativo de estabilidade de BNZ por CLAE-MS/MS, entretanto este se limita a fotodegradação do fármaco no estado sólido, além de apresentar um tempo de análise de 25 min, muito superior ao método proposto com 8 min (SANTOS, ROLIM, *et al.*, 2015). Além disso, os métodos até então descritos não permitem a quantificação de BNZ em uma grande diversidade de produtos de degradação, conforme o método indicativo de estabilidade desenvolvido. A investigação da estabilidade intrínseca do fármaco é primordial no processo de obtenção de formulações. Este conhecimento proporciona a seleção adequada de técnicas, indica tipo de adjuvantes e o acondicionamento necessários para a garantia da integridade dos princípios ativos. Garantindo assim a segurança e eficácia dos tratamentos (AULTON, 2010).

## 4 CONCLUSÃO

Um novo e simples método CLAE-UV/Vis foi desenvolvido e validado com êxito para a estimativa de BNZ em sistemas binários, consistindo de BNZ: Ac-Di-Sol<sup>®</sup> comoídos. Além disso, este método demonstrou ser adequado para quantificação do fármaco em meio aos seus produtos de degradação química e física. O método indicativo de estabilidade exibiu excelente precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade, de acordo com diretrizes ICH, comprovado estatisticamente. Assim, a análise de rotina de BNZ, matéria-prima e em nas formulações apresentadas, podem ser realizadas de forma rápida e eficaz sem qualquer interferência de produtos de degradação e componentes da formulação.





## **CAPÍTULO II- INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO POLIMÉRICA DE MATRIZES DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DO TIPO DOME MATRIX® NO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE BNZ EM MEIO ÁCIDO.**

### **1 INTRODUÇÃO**

O desenvolvimento de um novo medicamento exige estudos que vão da atividade farmacológica do princípio ativo à garantia da chegada do fármaco em concentração adequada ao local de ação a partir da sua administração e, para tal, é de suma importância o desenvolvimento da forma farmacêutica apropriada (PANDIT, 2008). Os sistemas de liberação modificada são produzidos com a finalidade de controlar a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução (PEZZINI, SILVA e FERRAZ, 2007). Estes sistemas trazem possibilidades como tornar a forma farmacêutica gastrorresistente, prolongar o efeito farmacológico do princípio ativo, liberar o fármaco em um sítio específico do trato gastrointestinal ou após um período definido de tempo (COSTA e LOBO, 1999).

A utilização de diversos tipos de polímeros vem como uma opção interessante para obtenção de formulações orais de liberação prolongada por possuir vantagens como versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais, além de permitir a incorporação de quantidades relativamente elevadas de fármacos (LOPES, LOBO e COSTA, 2005). O sistema modular gastrorretentivo flutuante Dome Matrix® permite uma maior permanência gástrica dos comprimidos, tornando os princípios ativos mais disponíveis para absorção (OLIVEIRA, BERNARDI, *et al.*, 2011).

A veiculação de BNZ em um comprimido de liberação prolongada pode promover a redução da toxicidade, graças à manutenção dos níveis plasmáticos do fármaco (SOARES-SOBRINHO, MEDEIROS, *et al.*, 2007). O presente capítulo tem como objetivo demonstrar o desenvolvimento e a avaliação de formas de liberação prolongada do tipo Dome Matrix® contendo BNZ, investigando a influência da sua composição na dissolução do fármaco em meio ácido.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 MATERIAIS

O BNZ foi doado pela empresa NORTEC Química, Rio de Janeiro, Brasil. Os polímeros Methocel<sup>®</sup> K15M (HPMC K15M) e HPMC Methocel<sup>®</sup> E3 premium LV EP (HPMC E3 LV) foram gentilmente fornecidos pela empresa Colorcon, Dartford, England. Os outros componentes foram dióxido de silício coloidal-SiO<sub>2</sub> (Aerosil<sup>®</sup> 200), Pharma, Rheinfelden, Germany; Celulose microcristalina (Avicel<sup>®</sup> PH 102), Brussels, Belgium; Estearato de Magnésio, ACEF-spa, Fiorenzuola D'Arda (PC), Italy; PEG 6000 (Polietileno glicol), Fluka, Steinheim, Germany e etanol, VWR International SAS, Prolabo, Fontenay-sous-bois, France. Os demais reagentes necessários foram adquiridos com grau de pureza adequado.

### 2.2 PREPARAÇÃO DOS MÓDULOS DOME MATRIX<sup>®</sup>

O módulo macho (espessura de  $6 \pm 0,2$  mm) e fêmea ( $7,5 \pm 0,2$  mm), foram desenvolvidos por compressão direta. As formulações foram preparadas pelo método de granulação por via úmida. Para a obtenção dos grânulos, o fármaco e os excipientes celulose microcristalina, EPO e manitol nas proporções descritas na tabela 6, foram homogeneizados em grau de porcelana com adição de 2 mL de uma solução hidroalcoólica 50:50 (v/v) de PEG 6000 5%. A mistura obtida foi disposta em um granulador oscilante (Erweka AR400, Düsseldorf, Alemanha), equipado com uma malha de 0,8 mm.

Os grânulos foram secos em estufa durante cerca de 5 h a 40 °C. Em seguida, os grânulos foram misturados aos outros componentes da fórmula em misturador Turbula<sup>®</sup> (Nova York, EUA) durante 20 minutos. A mistura final foi comprimida em compressora excêntrica com punção única EKO Korsch<sup>®</sup> (Berlim, Alemanha), equipada com punção cilíndrica de 9,2 mm de diâmetro, tendo uma superfície de ponta convexa ou côncava. O peso médio dos comprimidos foi de 150 mg.



## 2.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE BNZ DE MATRIZES DE LIBERAÇÃO PROLONGADA EM MEIO ÁCIDO.

Os testes de dissolução foram desenvolvidos em dissolutor Erweka DT6R, Apeldoorn, Holanda. A duração do ensaio foi de 360 min, a uma temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C e meio de dissolução composto de uma solução HCl 0,1 M, pH 1,2 ou tampão fosfato de potássio monobásico, pH 4,5, volume de 900 mL, aparato 2 com agitação de 100 rpm. Os testes foram realizados em triplicata. Alíquotas de 5 mL foram coletadas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 min, e filtradas em filtro Millipore®-0,45µm. Os comprimidos foram avaliados quanto ao teor de princípio ativo por espectrofotometria de UV/VIS, espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 25 (Milão, Itália).

## 2.4 APLICAÇÃO DE MÉTODOS ESTATÍSTICOS DE COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

Os perfis de dissolução do fármaco foram comparados pelos métodos: de análise de variância (ANOVA e MANOVA) e métodos modelo dependentes.

### 2.4.1 Métodos baseados em análise de variância

O teste de MANOVA avalia o ponto onde as porcentagens liberadas do fármaco variam significativamente a cada tempo. O pós-teste de Bonferroni também foi aplicado para comparar as colunas. Em seguida foi realizado o teste de ANOVA que avaliou as porcentagens dissolvidas separadamente a cada tempo, para verificar se haviam diferenças entre as formulações. O teste de Tukey foi aplicado como pós-teste para as comparações dos pares de formulações (WANG, SNEE, *et al.*, 2015).

## 2.4.2 Métodos modelo dependente

A cinética liberação de BNZ dos comprimidos obtidos foi avaliada com a utilização dos modelos matemáticos de Ordem Zero, 1º ordem, Higuchi, Korsmeyers-Peppas, Hisxson-Crowell, Weibull e Baker-Lonsdale, equações de 3 a 11 (KALLIOPI, HATZIAVRAMIDIS e HATZIAVRAMIDIS, 2015). A comparação entre os perfis de dissolução das formulações se deu por meio dos fatores de diferença ( $f_1$ ) e de similaridade ( $f_2$ ) (SIEPMANN e SIEPMANN, 2013). Os cálculos estatísticos e a aplicação dos modelos matemáticos foram desenvolvidos com auxílio dos programas Graphpad prism 5.0 e DDSolver, respectivamente.

### 2.4.2.1 Modelo de ordem zero

O modelo de ordem zero representa a liberação controlada de fármacos a partir de formas farmacêuticas que não desagregam. Desde que a área da matriz não se modifique e que não se atinjam condições de equilíbrio, podendo ser calculado pela equação 3.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (3)$$

Onde,

$Q_t$  é a quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$

$Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco dissolvido na solução (a maioria das vezes  $Q_0 = 0$ )

$K_0$  é a constante de liberação de ordem zero

### 2.4.2.2 Modelo de 1º ordem

Este modelo, equação (4), representa o perfil de liberação de fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas, que liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior. A quantidade de fármaco liberada diminui por unidade de tempo.

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2,303} \quad (4)$$

Onde,

$Q_t$  é a quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$

$Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco na solução

$K_1$  é a constante de liberação de primeira ordem

#### 2.4.2.3 Modelo de Higuchi

O modelo descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de *Fick*, equação 5. É aplicado à dissolução de fármacos a partir de diversas formas farmacêuticas como sistemas transdérmicos e comprimidos matriciais com fármacos hidrossolúveis.

$$f_t = K_H t^{1/2} \quad (5)$$

Onde,

$K_H$  é a constante de dissolução de Higuchi

$f_t$  é a fração de fármaco liberada em um tempo  $t$

#### 2.4.2.4 Modelo de Korsmeyer-Peppas

O modelo pode ser utilizado para analisar a liberação de formas farmacêuticas baseados em matrizes poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando possam estar envolvidos mais do que um tipo de mecanismos de liberação. O valor  $n$  caracteriza diferentes mecanismos de liberação, desde que ocorra de modo unidimensional e que o sistema possua uma relação largura/espessura ou comprimento/espessura de pelo menos 10. Para avaliação dos valores de  $n$  foram utilizadas as porcentagens de liberação acumulada entre 5-60% de liberação. Segundo os critérios do modelo, quando:  $n=0,45$  a difusão é fickiana;  $0,45 < n < 0,89$  tem-se a difusão anômala ou não fickiana (difusão + erosão) e com  $n \geq 0,89$ , o caso-2 relaxação (erosão da cadeia polimérica) ou caso 2 transporte, equação 6.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \quad (6)$$

Onde,

$a$ : é uma constante

$n$ : é o expoente de liberação

$M_t/M_\infty$ : fração do fármaco liberada

#### 2.4.2.5 Hixson-Crowell (Lei da raiz cúbica)

Considera a diminuição da área superficial de uma partícula esférica em função do tempo, equação 7. Descreve assim, a relação linear entre a raiz cúbica da massa restante da partícula e o tempo. A concentração do fármaco dissolvida no meio não muda significativamente durante o tempo, sob condições *sink*.

$$\frac{dM}{dt} = -K' \cdot S_t \cdot (c_s - c_t) \quad (7)$$

Onde,

$dM$  é a quantidade de substância que se dissolve no intervalo de tempo  $dt$ ;  $K'$  é uma constante positiva

$c_s$  é solubilidade do fármaco no solvente

$c_t$  a concentração do fármaco dissolvido no tempo  $t$

#### 2.4.2.6 Weibull

No modelo de Weibull os parâmetros descrevem os tipos de dissolução. Exprime a fração cumulativa do fármaco ( $m$ ) na solução ao tempo  $t$ . O parâmetro  $b$  descreve a forma da curva, como: exponencial ( $b=1$ ; Caso 1), sigmoide-forma de S ( $b>1$ ; Caso 2) ou parabólica ( $b<1$ ; Caso 3), equação 8.

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t - T_i)^b}{a}\right] \quad (8)$$

Onde,

$m$  = fração cumulativa do fármaco

$a$  = a escala temporal do processo

$T_i$  = intervalo de tempo antes do início do processo de dissolução ou de liberação (na maioria das vezes é igual a zero)

$b$  = o parâmetro de forma que caracteriza a curva

#### 2.4.2.7 Baker-Lonsdale

Desenvolvido a partir do modelo de Higuchi, descreve a liberação controlada do fármaco a partir de uma matriz esférica, equação 9.

$$\frac{3}{2} \left[ 1 - \left( 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = \frac{3D_m C_{ms}}{r_0^2 C_0} t \quad (9)$$

Onde,

$M_t$  = quantidade de fármaco liberado ao tempo  $t$

$M_\infty$  = quantidade de fármaco liberada a um tempo infinito

$D_m$  = coeficiente de difusão

$C_{ms}$  = solubilidade do fármaco na matriz

$r_0$  = raio da matriz esférica

$C_0$  = concentração inicial do fármaco na matriz.

#### 2.4.3 Fator de diferença $f_1$ e fator de similaridade $f_2$

As equações demonstram as relevâncias entre as diferenças dos perfis de dissolução. Comparam a porcentagem de fármaco dissolvida/unidade de tempo para os produtos teste e referência. O fator  $f_2$  é definido pelo FDA como uma transformação logarítmica recíproca da raiz quadrada da soma do erro quadrado (FDA, 1997). Indica a média da similaridade entre os dois perfis. E o fator  $f_1$  é proporcional a média da



diferença entre dois perfis de dissolução, equação 10. Valores de  $f_1$  entre 0-15 e valores de  $f_2$  (equação 11) entre 50-100, indicam similaridade entre os perfis de liberação (SERRA e STORPIRTIS, 2007).

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n (Rt - Tt)}{\sum_{i=1}^n Rt} \right\} \cdot 100 \quad (10)$$

Onde,

$n$  = número de pontos de amostragem (tempos de amostragem)

$Rt$  = % dissolução do medicamento referência ou pré-mudança no tempo  $t$

$Tt$  = % dissolução do medicamento teste ou pós-mudança no tempo  $t$

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{i=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (11)$$

Onde,

$n$  = número de pontos de amostragem (tempos de amostragem)

$Rt$  = % dissolução do medicamento referência ou pré-mudança no tempo  $t$

$Tt$  = % dissolução do medicamento teste ou pós-mudança no tempo  $t$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PREPARAÇÃO DOS MÓDULOS DOME MATRIX®

Além da baixa solubilidade aquosa de BNZ, as suas propriedades de fluxo e de compressibilidade são muito deficientes, o que se tornou um desafio na obtenção dos comprimidos (MAXIMIANO, COSTA, *et al.*, 2010). O formato delicado e preciso dos módulos Dome Matrix®, exigiu muitos ajustes de composição para alcançar a formulação ideal. As formulações deveriam garantir o perfeito formato e encaixe dos módulos macho e fêmea, além da flutuação do sistema e a liberação de quantidades constantes de fármaco. Para tal, 10 formulações discutidas neste capítulo foram escolhidas inicialmente por obterem o melhor desempenho frente a compressão, num universo 48 formulações. Em seguida estas formulações foram avaliadas quanto a flutuação e % de liberação do fármaco, em pH ácido por um período de 6 h, levando em consideração a composição das mesmas.

#### 3.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE BNZ DE MATRIZES DE LIBERAÇÃO PROLONGADA EM MEIO ÁCIDO.

O pH e tempos de residência da forma farmacêutica no meio de dissolução simularam o trato gástrico humano em jejum no pH 1,2 (BORST, UGWU e BECKETT, 1997). A primeira característica observada foi que quantidades de diluente superiores a 30% promoveram a rápida desintegração dos comprimidos. Por essa razão, as quantidades de celulose microcristalina não ultrapassaram este valor e as quantidades de polímero não variaram de 30%, garantindo a manutenção das proporções da composição da fórmula. A composição das formulações F1, F2 e F3 diferiu somente no tipo de diluente, sendo que para F2 e F3 foram utilizados manitol e EPO, respectivamente. Esta substituição foi feita com a intenção de aumentar a entrada de água nos comprimidos, e assim aumentar a velocidade de dissolução do fármaco (WELLS e RUBINSTEIN, 1993).

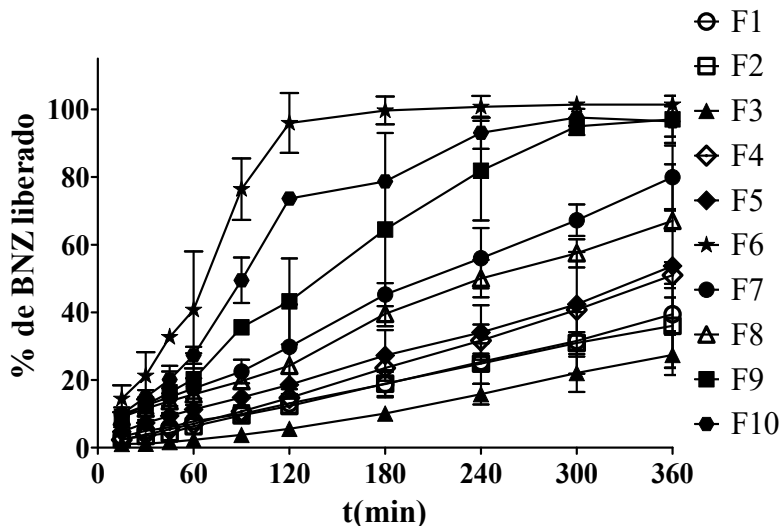
Os perfis de dissolução (figura 16) de F1 e F2 mostram-se praticamente sobreponíveis, sendo que F3 apresenta um desempenho pior

em relação as outras duas formulações. Isso pode indicar que estes excipientes não influenciaram a liberação de BNZ, sendo que o EPO também atribuiu uma maior dificuldade de compressão da formulação. Os comprimidos flutuaram durante todo o experimento, tendo sido observado um núcleo seco, o que pode explicar a liberação parcial do fármaco, em torno de 40% para F1 e F2, e de 30% para F3, ao fim da análise.

Nas formulações F4 e F5 observou-se uma discreta melhora na velocidade de dissolução do fármaco, o que pode ser atribuído a redução das quantidades de HPMC K15M (20%), que está diretamente ligado a diminuição da viscosidade do sistema (SIEPMANN e PEPPAS, 2001). A presença de Manitol e do EPO, nestas formulações também pode ter contribuído positivamente para essa melhora. Os perfis de dissolução de BNZ foram muito similares, os comprimidos flutuaram por 5 h e depois desintegraram parcialmente, alcançando em torno de 50% de liberação do fármaco. A formulação F6 possui uma quantidade 5 vezes maior de PEG 6000, uma redução em torno de 7% da quantidade de celulose microcristalina e uma combinação de HPMC K15M e E3LV que somava 17%. Esta composição mostrou-se inadequada uma vez que os comprimidos começaram a se desintegrar em torno de 20 min, sendo que em 60 min não flutuavam mais. Por este motivo a rápida dissolução de BNZ foi observada, acima de 95% em 2 h, não mantendo as características de liberação constante.

A partir da formulação F7 variam-se apenas as proporções da combinação dos HPMC K15M e E3 LV, num total de 30% de polímero. Observou-se que quanto menor a quantidade de HPMC K15M, conseqüentemente uma maior quantidade de HPMC E3 LV, maior era a velocidade de dissolução do fármaco. Os comprimidos F10 não flutuavam mais após 60 min e desintegraram em 90 min, podendo-se comprovar a rápida liberação de BNZ. Tal comportamento pode indicar que quantidades mínimas de 10% de HPMC K15M são importantes para manutenção das características de liberação prolongada deste sistema. As formulações F7, F8 e F9 flutuaram por 2 h e se desintegraram após 4 h de análise. Estas formulações mantiveram quantidades constantes de liberação de fármaco, e alcançando maiores velocidades de dissolução do mesmo, com quantidades em torno de 80% para F7, 70% para F8 e de 95% para F9, no tempo de análise de 6h. O perfil de dissolução de F9 avaliado em pH 4,5 foi totalmente sobreponível ao obtido em pH 1,2, no mesmo tempo de análise, indicando que o pH não influencia a liberação do fármaco, não apresentando diferenças significativas pelo teste de ANOVA ( $p > 0,05$ ).

Figura 16- Perfis de dissolução dos comprimidos do tipo Dome Matrix<sup>®</sup> contendo BNZ, T=37 °C ±0,5 °C, HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL.



A avaliação dos perfis de dissolução das diferentes formulações permitiu observar o impacto da composição das mesmas na liberação de BNZ. As formulações F7, F8 e F9 foram as que apresentaram as maiores velocidades de dissolução de BNZ, atribuindo-se o resultado às suas composições poliméricas (MASON, CAMPIÑEZ, *et al.*, 2015). Polímeros de menor peso molecular como HPMC E3 LV, tendem a facilitar a liberação do fármaco por se tratarem de uma barreira menos resistente a difusão de meio para o interior dos sistemas matriciais (ZHOU, LAW, *et al.*, 2014). Solubilizando mais rapidamente o fármaco no meio e facilitando a sua posterior difusão pela matriz. Para fármacos com baixa solubilidade aquosa como BNZ a dissolução é uma etapa limitante a sua biodisponibilidade (SAFFARI, EBRAHIMI e LANGRISH, 2016). O equilíbrio entre as características dos polímeros do tipo HPMC deve ser pesado de forma cautelosa durante o processo de design das formulações. De tal forma, que o fármaco seja liberado em quantidades que garantam a manutenção de sua atividade farmacológica e em quantidades constantes. O sistema modular Dome Matrix<sup>®</sup>

demonstrou-se como uma excelente alternativa de forma farmacêutica para o controle da liberação de BNZ. Além do mais, as características de gastroretenção podem ser alcançadas sem a necessidade de utilização de compostos geradores de gás, como o bicarbonato de sódio e ácido cítrico ou tartárico. O tempo de latência de contato dos comprimidos com o fluido gástrico para o início da flutuação dos mesmos, também não é necessário para o Dome Matrix<sup>®</sup>, o que torna a composição da formulação mais simples e fácil de controlar (BARROCAS, SANTOS, *et al.*, 2007).

### 3.3 APLICAÇÃO DE MÉTODOS ESTATÍSTICOS DE COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

De acordo com os resultados de MANOVA (tabela 7), as porcentagens dissolvidas de BNZ foram consideradas significativamente diferentes a cada tempo ( $P < 0,0001$ ) e entre as formulações ( $P < 0,0001$ ), o que implica em uma interação  $t \times$  formulação extremamente significativa. Os perfis de dissolução não foram paralelos. Essa interação indica que as médias de liberação do fármaco das formulações não foram iguais a cada 2 tempos. O pós-teste de Bonferroni (NETER, WASSERMAN e KUTNER, 1996) indicou que não houveram diferenças significativas entre as formulações de F1 a F5 até 120 min. As porcentagens de liberação não se diferem significativamente até 30 min, nas formulações F5xF7, F5xF9, F7xF10 e F8xF10. Após 45 min pode-se observar diferenças significativas entre F9xF10, F8xF9 após 60 min, F8xF5 em 120min, F7xF8-240min e F7xF10 em 120min.

Tabela 7- Resultados da análise de variância (MANOVA) dos perfis de dissolução dos comprimidos de BNZ.

<b>Fonte de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>SQ</b>	<b>Média Q</b>	<b>F</b>
<b>Interação</b>	81	33990	419,6	59,50
<b>Fator de coluna</b>	9	104900	11660	1653
<b>% liberação de BNZ</b>	9	124100	13780	1954
<b>Resíduo</b>	200	1411	7,053	

Os resultados de ANOVA (tabela 8) também demonstraram que as formulações eram significativamente diferentes em termos de % de liberação do fármaco a cada tempo ( $P < 0,0001$ ). O pós-teste de multicomparação de pares de Tukey (BARROS-NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010) demonstrou que as médias das curvas são significativamente diferentes para: F1x (F6 e F10), F2x (F6 e F10), F3x (F6, F9 e F10), F4x (F6 e F10), F6x (F5 e F8).

Tabela 8- Análise descritiva e dados de dissolução dos comprimidos de BNZ (n=10) - ANOVA

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Mínimo	3,243	2,537	1,090	2,310	4,697	14,46	9,750	9,043	8,987	9,927
25% Percentil	5,758	4,168	1,548	5,040	8,866	29,82	14,35	13,19	15,44	18,83
Média	11,50	10,96	4,688	12,72	16,72	86,20	26,16	21,94	39,42	61,57
75% Percentil	26,90	26,40	17,39	33,93	36,16	100,9	58,82	51,85	85,16	93,91
Maximum	39,44	36,00	27,43	51,02	53,71	101,4	79,94	67,08	97,05	97,61
Média	16,02	14,94	9,105	19,11	22,36	68,48	35,55	30,81	47,55	56,13
Desvio Padrão	12,40	12,12	9,541	16,99	16,49	36,82	25,02	21,08	34,56	35,79
Erro Padrão	3,920	3,832	3,017	5,374	5,213	11,64	7,913	6,665	10,93	11,32
Inferior 95% CI	7,155	6,272	2,280	6,950	10,57	42,14	17,65	15,73	22,82	30,53
Superior 95% CI	24,89	23,61	15,93	31,26	34,15	94,82	53,45	45,89	72,27	81,73

### 3.3.1 Métodos modelo dependentes

Os critérios coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e o critério de informação Akaike (AIC) foram utilizados para seleção do modelo que mais se adequava aos perfis de dissolução (tabela 9). O critério AIC é a medida da qualidade de ajuste com base na máxima verossimilhança. O modelo com menor valor de AIC é considerado como o de melhor ajuste dentro do conjunto de modelos (COSTA e LOBO, 2001). Com exceção de F6, F9 e F10, as curvas se adequaram ao modelo de ordem zero. Isso é um indicativo que o fármaco é liberado da forma farmacêutica de forma lenta sem a desintegração da mesma. Assumindo que a área do comprimido não sofre alterações, e as condições de equilíbrio não são alcançadas, as formas farmacêuticas que possuem esse perfil liberam as mesmas quantidades de fármaco por unidade de tempo, sendo ideal para o prolongamento da atividade farmacológica do fármaco (NOVAK, SPORAR, *et al.*, 2012).

As formulações F6 e F10 se ajustaram melhor ao modelo de Weibull. Os valores de  $\beta$  calculados (tabela 9) descrevem o formato da

curva, no caso de F6 e F10  $\beta > 1$ , que classifica as curvas no Caso 2, observando a curvatura sigmoide (formato de S) dos perfis de dissolução. O modelo de Weibull não possui nenhum parâmetro capaz de descrever a cinética de liberação do fármaco (SIEPMANN e PEPPAS, 2001). A formulação F9 se adequa melhor ao modelo de Korsmeyer-Peppas, sendo a difusão o principal mecanismo de liberação do fármaco. Os perfis, com exceção de F6, tiveram maior correlação com o modelo Korsmeyer-Peppas em comparação com Higuchi, o que indica que a liberação do fármaco não é dependente apenas do mecanismo de difusão. Os valores de  $n$  fornecidos por este modelo, permitiram a avaliação dos mecanismos de liberação de BNZ.

Os critérios incluem as formulações F3 e F4 no caso-2 relaxação (erosão da cadeia polimérica) ou caso-2 transporte. O polímero EPO está presente em ambas formulações e sua alta solubilidade em meio ácido pode ter contribuído com a menor resistência dos comprimidos a erosão causada pela ação do fluido gástrico. Os demais perfis de dissolução podem ser descritos por difusão anômala ou não fickiana (difusão+erosão) (SIEPMANN,2001).

Tabela 9- Parâmetros dos modelos matemáticos e regressão estatísticas descritivas para os dados de dissolução dos comprimidos contendo BNZ.

Modelo	Estatística	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Ordem-zero	k0	0,1024	0,1002	0,0782	0,1404	0,1362	0,2556	0,2068	0,1738	0,2820	0,2747
	Tlag	-12,4825	-5,1117	27,5211	7,8916	-20,2010	-123,9192	-27,8807	-33,2183	-24,5997	-60,3560
	R <sup>2</sup>	0,9969	0,9989	0,9807	0,9969	0,9967	0,7039	0,9980	0,9939	0,9727	0,8605
	AIC	18,4670	7,7477	31,5869	24,8247	24,7375	85,9241	28,4590	35,8778	60,8219	77,8315
1º ordem	k1	0,0013	0,0012	0,0008	0,0017	0,0019	0,0262	0,0034	0,0029	0,0043	0,0077
	R <sup>2</sup>	0,9877	0,9962	0,9388	0,9677	0,9829	0,6366	0,9710	0,9795	0,8764	0,9531
	AIC	30,3374	18,2606	41,1549	46,2916	39,3568	85,9710	52,9521	46,0455	73,9172	64,9230
Hixson-Crowell	KHC	0,0004	0,0004	0,0003	0,0006	0,0006	0,0054	0,0011	0,0008	0,0020	0,0021
	Tlag	-3,0398	2,3113	30,7501	17,3135	-5,2196	23,8171	0,9355	-9,9192	18,0964	-5,3779
	R <sup>2</sup>	0,9914	0,9984	0,9730	0,9874	0,9890	0,6872	0,9836	0,9892	0,9766	0,9659
AIC	28,7045	11,7755	34,9604	38,8791	36,9035	86,4724	49,2502	41,6914	59,2919	63,7392	
Weibull	$\alpha$	235,8203	366,5455	1950,6611	575,2998	157,3618	186,4850	84,3917	75,0563	199,3524	167,1929
	$\beta$	0,7991	0,8401	1,0886	1,0161	0,7984	1,2804	0,7680	0,7022	1,0575	1,0893
	Ti	6,9792	6,0000	6,9792	6,8750	6,9792	9,0000	9,0000	6,0000	9,0000	9,0000
	R <sup>2</sup>	0,9519	0,9692	0,9629	0,9675	0,9451	0,9631	0,9317	0,9275	0,9706	0,9778
AIC	47,9702	43,0598	40,1399	50,3605	54,9971	67,0963	65,5307	62,6906	63,5617	61,4500	
Korsmeyer-Peppas	kKP	0,5490	0,3190	0,0639	0,2653	0,8831	3,9411	1,8537	1,8428	1,3756	1,8462
	n	0,6941	0,7859	0,9835	0,8993	0,6679	0,5987	0,6117	0,5845	0,7300	0,7085
	Tlag	6,0000	6,0000	6,0000	7,2813	6,0000	6,0000	6,0000	6,0000	6,0000	6,0000
	R <sup>2</sup>	0,9476	0,9752	0,9007	0,9712	0,9559	0,7773	0,9461	0,9385	0,9810	0,9043
AIC	48,8308	40,8855	49,9857	49,1687	52,8119	85,0737	63,1683	61,0410	59,2007	76,0590	
Baker-Lonsdale	KBL	8,318E-05	7,310E-05	3,776E-05	1,500E-04	1,661E-04	3,215E-03	4,897E-04	3,138E-04	1,190E-03	1,298E-03
	Tlag	5,145E+01	5,029E+01	9,428E+01	8,636E+01	5,040E+01	4,466E+01	5,051E+01	4,592E+01	5,011E+01	4,322E+01
	R <sup>2</sup>	0,8859	0,9311	0,9231	0,9237	0,8727	-44,3209	0,8577	0,8497	0,9025	0,9498
AIC	54,6093	49,1091	45,4361	56,8938	61,4139	136,2325	70,8711	67,9861	73,5434	67,5984	
Higuchi	kH	1,6098	1,5221	0,9864	1,9889	2,2226	6,2933	3,4989	3,0121	4,7237	5,3899
	Rsq	0,8423	0,8358	0,6982	0,7870	0,8644	0,8308	0,8858	0,8938	0,8860	0,8961
AIC	55,8457	55,7976	57,1034	65,1654	60,0412	78,3256	66,6706	62,5131	73,1157	72,8857	

A relevância das diferenças dos perfis de dissolução foi avaliada utilizando os fatores de diferença ( $f1$ ) e de similaridade ( $f2$ ). Os valores entre 50-100 relativos a  $f2$  observados na tabela 10, indicam as formulações F1, F2 e F3 são semelhantes entre si, assim como F2 se assemelha a F3, F4 e F5; F4 e também com F1. F5 é semelhante a F8, e por fim F7 se assemelha somente com F8. O fator  $f1$ , por sua vez, indicou similaridade apenas entre F1-F2 e F7-F8.



Tabela 10- Fatores de similaridade ( $f_2$ ) x de diferença ( $f_1$ ) para os dados de dissolução dos comprimidos contendo BNZ.

	fator de similaridade ( $f_2$ )										fator de diferença ( $f_1$ )									
	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10		
F1	88	56	63	56	12	32	38	21	17	7	43	23	40	327	122	92	197	250		
F2		59	60	53	11	31	37	20	16		39	28	50	358	138	106	218	276		
F3			45	41	9	26	31	17	13			110	146	652	290	238	422	516		
F4				73	13	37	45	24	19				17	258	86	61	149	194		
F5					14	40	51	26	20					206	59	38	113	151		
F6						21	18	29	42						48	55	31	18		
F7							60	40	30							13	34	58		
F8								33	26								54	82		
F9									45									18		

#### 4 CONCLUSÃO

A necessidade de desenvolvimento de formulações que melhorem as características biofarmacêuticas e de toxicidade do BNZ é notória, sendo que os sistemas de liberação prolongados vêm como alternativa para diminuição da sua toxicidade, ligada aos picos plasmáticos comuns às formulações disponíveis atualmente no mercado. Outro fator importante a ser destacado é a grande estabilidade do fármaco em meio ácido observado por meio de estudos em nosso grupo, o que o torna adequado para aplicação em sistemas gastrorretentivos. A análise dos perfis de dissolução dos comprimidos produzidos permitiu observar que, com exceção de F6 e F10, as formulações possuem características de liberação prolongada, o que garante a manutenção dos níveis de fármaco constantes. Os módulos (macho e fêmea) obtidos se ajustaram perfeitamente, configurando um espaço vazio central nos comprimidos, o que promoveu a flutuação esperada para o sistema Dome Matrix<sup>®</sup> no meio de dissolução. As formulações com maior percentual de HPMC K15M (30%) possuem a liberação mais lenta do fármaco, e a presença do Manitol e do EPO não demonstrou grande impacto nesta característica. Maiores quantidades do polímero HPMC L3LV influenciaram positivamente na velocidade de dissolução de BNZ. Entretanto, quantidades superiores a 20% deste polímero promoveram a rápida desintegração dos comprimidos. Em avaliação aos resultados pode-se concluir que, o estudo de formulação no que compete a composição polimérica, é de suma importância para garantia de qualidade e obtenção

de formulações com melhor desempenho possível. Os estudos comparativos das formulações demonstraram que F7 e F9 são as mais promissoras por apresentarem uma maior porcentagem de liberação do fármaco no mesmo período de tempo. Ao mesmo tempo, por se tratar de um fármaco de baixa solubilidade aquosa, com absorção irregular, as formulações devem ser aprimoradas com cautela para garantir as doses mínimas terapêuticas.

## CAPÍTULO III- ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS POLÍMEROS NA DISSOLUÇÃO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL EM MISTURAS SÓLIDAS COMOÍDAS

### 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 50% das novas moléculas desenvolvidas apresentam problemas de solubilidade aquosa (MARSAC, LI e TAYLOR, 2009). A taxa de absorção e a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água são frequentemente controladas pela sua dissolução no trato gastrointestinal. Dessa forma, o desenvolvimento de novas técnicas para aumento da solubilidade dos fármacos é fundamental para o desenvolvimento de formas farmacêuticas orais (LIMA, SANTOS, *et al.*, 2011). Devido à característica não ionizável de fármacos neutros, como o BNZ, a dissolução deverá ser a mesma em todos os níveis de pH do trato gastrointestinal. Existem várias estratégias que podem melhorar as características de solubilidade em água dos fármacos como a formação de complexos, seleção dos sais, redução do tamanho de partícula do fármaco, dispersão sólida, obtenção de formulações lipídicas, geração de formas polimórficas e seleção de excipientes (ANSEL, 2011).

As dispersões sólidas (DS) têm sido amplamente utilizadas para o incremento da biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em meio aquoso. A contribuição destes sistemas pode estar relacionada a redução do tamanho de partícula do fármaco, melhora da sua molhabilidade, redução da formação de aglomerados e a geração de supersaturação no meio. Algumas vantagens das DS como facilidade de manipulação de material e produção, podem ser destacadas. Assim como as desvantagens de baixa estabilidade das formulações nas quais o fármaco se encontra amorfo como, a sensibilidade a umidade e temperatura, que podem promover a recristalização do fármaco e dificuldade de transposição de escala (STORPIRTIS, GONÇALVES, *et al.*, 2009). Sistemas binários comoídeos, são DS produzidas pela moagem simultânea do princípio ativo e um carreador hidrofílico, onde o fármaco não se encontra completamente amorfo. Estas formulações apresentam menores dificuldades no processo de obtenção e transposição de escala (BROUWERS, BREWSTER e AUGUSTIJNS, 2009). O presente capítulo traz o estudo da influência dos polímeros hidrofílicos na dissolução do fármaco BNZ, e a avaliação do comportamento físico-químico e de dissolução dos sistemas binários comoídeos obtidos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 MATERIAIS

O BNZ foi doado pela empresa NORTEC Química, Rio de Janeiro, Brasil. O polímero PVP/VA S-630<sup>®</sup> foi adquirido da Isp do Brasil (Cachoeirinha, Brasil, lote 111). Os polímeros Eudragit EPO<sup>®</sup> (EPO) e o Eudragit L100<sup>®</sup> (EL100) foram gentilmente fornecidos pela empresa Colorcon do Brasil Ltda. (Cotia, Brasil), sob números de lote G060331051 e TD 100112N11, respectivamente.

### 2.2 IMPACTO DE POLÍMEROS HIDROFÍLICOS NA SOLUBILIDADE AQUOSA DO BNZ

Os polímeros hidrofílicos EL100 (aniônico), EPO (catiônico) e PVPVA (não-iônico) foram selecionados de acordo com as suas diferentes propriedades iônicas. A avaliação quantitativa da solubilidade aquosa de BNZ foi efetuada com adição de um excesso de amostra em água, em triplicata como segue. Foram pesados 10 mg de BNZ e de polímero, individualmente. Fármaco e polímero foram misturados manualmente, na proporção 1:1, com auxílio de espátula e na sequência foram adicionados 10 mL de água destilada em um béquer (50 mL). O béquer foi vedado com filme plástico. As soluções supersaturadas foram submetidas a agitação em *shake-flask*, 150 rpm pelo período de 48h, a temperatura de  $37 \pm 5$  °C. Aliquotas das soluções foram retiradas nos tempos zero, 24 e 48h e filtradas em filtro de papel quantitativo (Quanty). As amostras foram avaliadas quanto ao teor de princípio ativo por espectrofotometria na região do UV. Foram realizados os testes estatísticos de comparação múltipla ANOVA e Tukey e de comparação de pares, t-student ( $p \leq 0,05$ ), com auxílio do programa Prism Graphpad 5<sup>®</sup>.

## 2.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS CO-MOÍDOS

Duas metodologias diferentes foram utilizadas para obtenção das formulações: moagem assistida por líquido (LAG) e moagem em moinho planetário de bolas (MB). Na LAG, 1g de polímero e 1g de BNZ foram cuidadosamente pesados e transferidos para um gral de porcelana e misturados com auxílio de espátula. À mistura BNZ:polímero, proporção 1:1(p/p), foram adicionados 500  $\mu$ L de Acetona. O pó foi macerado com auxílio do pistilo por 15 min obtendo-se três formulações nomeadas: L100/Ac-M; PVPVA/Ac-M e EPO/Ac-M. Os polímeros que obtiveram melhor desempenho no ensaio de dissolução em pH ácido de BNZ foram selecionados.

Novas formulações foram obtidas em MB variando-se as proporções fármaco: polímero, tempo de moagem e velocidade de rotação conforme descrito no item 2.4. Para avaliação do impacto destes parâmetros no produto final, foi construído um “design” experimental, conforme descrito no item 2.4. A técnica de MB foi desenvolvida no moinho Retsch GmbH PM200, 230 V, 60 Hz, com 2 estações de moagem equipadas com jarros de aço 125 mL, (Haan, Alemanha), relação bola ( $\varnothing=20$  mm) /amostra (g) 1:1.

## 2.4 DESIGN EXPERIMENTAL (DOE)

Os polímeros PVPVA e EPO foram selecionados levando em consideração o aumento da velocidade de dissolução de BNZ, observado nos estudos preliminares. Foram construídos os domínios experimentais para cada um dos polímeros, com o intuito de detectar e estimar as interações entre os fatores: (A) proporção fármaco: polímero  $m/m$ ; (B) tempo-min e (C) velocidade rotação-rpm. Um delineamento fatorial completo ( $2^4$ ) foi empregado resultando em 8 experimentos e 5 réplicas. Os três fatores foram analisados como variáveis independentes, considerando-se dois níveis: mínimo (-1) e máximo (+ 1), dispostos na Tabela 11. A relação entre os fatores e as respostas foi avaliada a partir do modelo de regressão múltipla (equação 12).

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{123}ABC$$

Onde,  $Y$  é a variável resposta,  $\beta_0$  o intercepto,  $\beta_i$  a estimativa do efeito principal e  $\beta_{ij}$  estimativa do efeito de interação entre fatores  $i$  e  $j$ . A área sob a curva (AUC), eficiência de dissolução (DE), tempo de dissolução média (MDT) dos sistemas binários comoídeos obtidos em moinho de bolas (SBMB) foram consideradas como variáveis resposta,  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_3$ , respectivamente. Todo o planejamento apresentado nesta seção foi analisado com auxílio do programa Design-Expert® 8.0.7.1 (Stat-Ease Inc., EUA). O método de Lenth foi utilizado para estimar a importância de cada fator sobre a resposta dos experimentos, assumindo que há a mesma variância para todos os parâmetros (equação 13):

$$\pi^2 = 4 \sigma^2 / N \quad (13)$$

Onde,  $\sigma^2$  é a variância do erro. A estimativa envolve a obtenção de  $s_0 = 1,5 \cdot \text{média} \{|c_j|\}$  e depois do pseudo erro-padrão, equação 14.

$$\text{PSE} = 1,5 \cdot \text{média} \{|c_j| : |c_j| \leq 2,5s_0\} \quad j = 1, \dots, m, \quad (14)$$

onde  $c$  são os contrastes e  $m$  o contraste independente. Uma vez obtido o PSE, a margem de erro (ME) para os contrastes foi calculada, equação 15.

$$\text{ME} = t_{\{1 - \alpha/2; d\}} \times \text{PSE} \quad (15)$$

onde  $t_{\{1 - \alpha/2; d\}}$  é o quantil,  $d=m/3$  e  $\alpha = 0,05$ . Sendo assim, para evitar uma falsa conclusão foi calculada uma margem de erro simultânea (SME),

$$\text{SME} = t_{\gamma; d} \times \text{PSE}, \quad \gamma = (1 + 0,951 + m)/2 \quad (16)$$

Tabela 11: Planejamento fatorial 2<sup>3</sup>

Ordem	Fatores			Níveis		
	A m/m	B min	C rpm			
1*	1,0	30	150	1	1	-1
2	0,5	30	300	-1	1	1
3	0,5	15	150	-1	-1	-1
4	1,0	15	300	1	-1	1
5	0,5	30	150	-1	1	-1
6	1,0	15	150	1	-1	-1
7	1,0	30	300	1	1	1
8	0,5	15	300	-1	-1	1
9	1,0	30	150	1	1	-1
10*	1,0	15	150	1	-1	-1
11*	0,5	30	300	-1	1	1
12*	1,0	15	150	1	-1	-1
13*	0,5	30	300	-1	1	1

\*Réplica

## 2.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Os perfis de dissolução das formulações (50 mg) obtidas foram avaliados pelo método 2 (pás), utilizando dissolutor VK 7000 (Varian) na temperatura  $37 \pm 0,5$  °C em HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL (BRASIL, 2010). Alíquotas de 5 mL de meio de dissolução foram coletadas em seringa nos tempos de 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min e filtradas em papel quantitativo. As amostras foram avaliadas quanto ao teor de princípio ativo por espectrofotometria na região do UV. Os perfis de dissolução foram avaliados quanto a sua DE (equação 17), MDT (equação 18) e AUC (equação 19), dados obtidos com auxílio do programa DD Solver 1.0, KinetDS 3 e Prism Graphpad 5<sup>®</sup>.

$$D.E. = \frac{\int_0^t y \times dt}{y_{100} \times t} \times 100\%$$

(17)

$$MDT = \frac{\sum_{j=1}^n \hat{t}_j \Delta M_j}{\sum_{j=1}^n \Delta M_j} \quad (18)$$

$$AUC = \frac{1}{n_p} \sum_{j=1}^{n_p} f_j \quad (19)$$

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES OBTIDAS

### 2.6.1 Espectroscopias vibracionais na região do infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos em equipamento Perkin Elmer (FTIR Frontier), em uma faixa espectral de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com 4 acumulações. Os pós foram acondicionados diretamente no porta amostras, em quantidade suficiente para preenchimento total do leitor.

### 2.6.2 Determinação da cristalinidade

A avaliação de cristalinidade do fármaco, antes e depois do processo de obtenção das formulações, foi realizada através da técnica de difração de raios-X de pó (DRXP). Foi utilizado o difratômetro de raios-X q-q (Phaser D2, Bruker), operando com radiação de cobre Ka ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), à tensão de 10 mA e voltagem 30 kV. Com detecção realizada por meio de um contador de cintilação unidimensional detector LYNXEYE, à temperatura ambiente, digitalização 2 $\theta$  de 5 ° a 30°, tamanho de passo de 0.091. O difratograma BNZ calculado (BNZCALC) foi simulado com auxílio do programa Mercury 3.1 a partir dos dados do



monocristal de BNZ, depositado sob a sigla de LIVWET (SOARES-SOBRINHO, CUNHA-FILHO, *et al.*, 2008).

### 2.6.3 Morfologia das partículas

As fotomicrografias do fármaco e das DS foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), JSM-6390LV (JEOL, EUA). As amostras foram posicionadas em *stubs* de alumínio e revestidas com ouro em um sistema de pulverização catódica Penning em câmara de vácuo câmara alta (Leica EMSCD500, EUA). As análises foram realizadas em campo de emissão sob pressão variável, probe 4.0 nm, à voltagem de aceleração de 15 kV e detecção por elétrons secundários.

### 2.6.4 Avaliação do comportamento termoanalítico

Os estudos do comportamento termoanalítico do fármaco, excipientes e formulações foram realizados, assim como as misturas físicas dos mesmos (1:1 p/p), de acordo com as técnicas a seguir:

A técnica de termogravimetria foi realizada utilizando uma termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu em cadinho de platina, aberto, na faixa de temperatura de 30 a 500 °C, em fluxo de N<sub>2</sub> (50 mL/min). A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada em célula DSC-60 da Shimadzu, utilizando cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas, com razão de aquecimento de 10 °C /min, na faixa de temperatura de 30 a 250°C, em fluxo de N<sub>2</sub> (50 mL/min).

### 2.6.5 Molhabilidade

A caracterização da molhabilidade do BNZMP e das formulações obtidas por MB foi realizada pelo método da gota, por ângulo de contato estático, com auxílio de um medidor de ângulo de contato OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha). As imagens de alta resolução foram obtidas pelo sistema de processamento DataPhysics Instruments. Uma gota de água deionizada (5 µL, 25°C) foi adicionada por uma seringa acionada por um motor. O valor médio dos ângulos de ambos os lados de cada gota foi

contado como uma medida. As medidas foram feitas em triplicata e os dados apresentados correspondem ao valor médio final.

## 2.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS SBMB

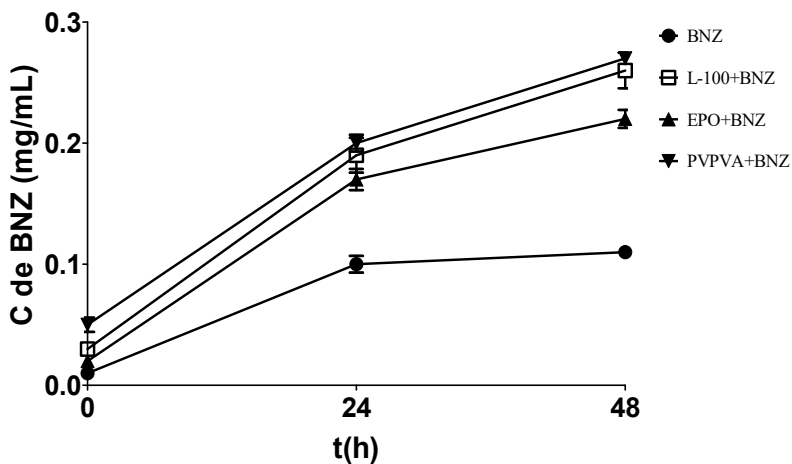
As SBMB foram submetidas a condições de armazenamento de estresse, a  $40 \pm 2$  °C e  $75 \pm 5\%$  UR, pelo período de 90 dias, em câmara climática (MMM Climacell 111 Comfort, Munique, Alemanha). Após o período de 90 dias a estabilidade das formulações foi avaliada por IV conforme descrito no item 2.6.1. As amostras com o melhor desempenho no teste de dissolução foram reavaliadas também por DRXP e DSC (itens 2.6.2 e 2.6.4).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 IMPACTO DOS POLÍMEROS HIDROFÍLICOS NA SOLUBILIDADE AQUOSA E DISSOLUÇÃO DE BNZ EM MEIO ÁCIDO

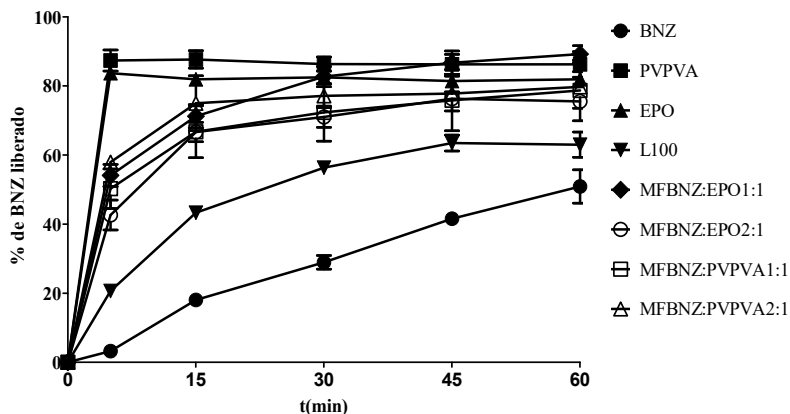
A influência dos polímeros na solubilidade aquosa de BNZ foi avaliada por meio do ensaio de solubilidade em equilíbrio de BNZ. Para tal, foram avaliadas as misturas físicas (MF) fármaco: polímero na proporção 1:1(m/m). Foi possível observar a presença de pó sobrenadante durante todo o experimento. As médias das quantidades de fármaco dissolvidas no período de 48h foram aumentadas com a presença dos polímeros, em 2,2 vezes para L100, 1,9 para EPO e 2,4 para PVPVA conforme demonstrado na figura 1. O teste de ANOVA indicou que houveram diferenças significativas entre os perfis de solubilidade de BNZ na presença dos polímeros estudados,  $p < 0,05$  (figura 17).

Figura 17- Solubilidade aquosa de BNZ, das misturas físicas fármaco: polímero 1:1(m/m), método *shake-flask*, 150 rpm,  $37 \pm 5$  °C, pelo período de 48h.



Na sequência, foram produzidas 3 diferentes formulações contendo BNZ e os polímeros já citados por LAG na proporção 1:1, com adição de acetona. A performance das formulações foi avaliada quanto à velocidade de dissolução em meio ácido (figura 18).

Figura 18: Perfis de dissolução das formulações obtidas por LAG,  $T=37 \pm 0,5$  °C, HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL.



As formulações contendo os polímeros EPO e PVPVA apresentaram uma rápida dissolução atingindo quantidades superiores a 80% de liberação do fármaco em apenas 5 min. Entretanto, a formulação contendo L100 não ultrapassou os 65% da liberação de BNZ em uma hora, superando somente em 10% a liberação do fármaco isolado. Quando comparadas em pares as curvas de BNZ e L100: BNZ, PVPVA: BNZ e EPO: BNZ não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Contudo as curvas PVPVA: BNZ e EPO: BNZ apresentaram diferenças significativas quando comparadas com a curva BNZ ( $p < 0,05$ ), pelo teste de ANOVA.

A influência do tipo de polímero na dissolução do fármaco BNZ pode ser avaliada em comparação aos perfis de dissolução obtidos. A solubilidade dos carreadores no meio é fundamental para a melhoria da dissolução do fármaco, demonstrando que este fato não está somente correlacionado a processos mecânicos como redução de partícula e, conseqüente, aumento da área superficial do fármaco. Essa característica ficou clara em observação ao fraco desempenho da formulação contendo o polímero L100, que possui baixa solubilidade em meio com pH inferior a 6,0. O polímero EPO é solúvel em fluido gástrico em  $pH < 5,0$  (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

O impacto do Eudragit® na dissolução do fármaco pode estar relacionado a cosolvência, uma vez que a solubilidade do polímero foi

fundamental para o resultado. O polímero PVPVA possui características tensoativas e pode ter aumentado a velocidade de dissolução de BNZ por melhorar a molhabilidade do sistema (ASHLAND, 2013). Estas modificações na estrutura dos polímeros aceleram a velocidade de dissolução de maneira geral. Entretanto, deve-se também levar em consideração que o intumescimento intra e inter-cristalino pode ser responsável pela quebra das ligações de hidrogênio e aumento da acessibilidade às moléculas do fármaco (ELIDRISSI, EL BARKANY, *et al.*, 2012).

### 3.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS OBTIDOS EM MOINHO DE BOLAS (SBMB).

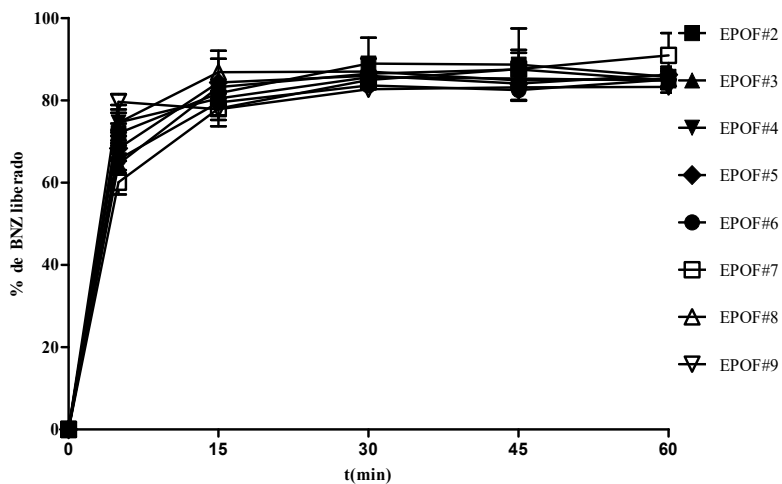
A velocidade de dissolução *in vitro* foi selecionada para avaliação do método de obtenção das SBMB, por se tratar de um fator limitante na biodisponibilidade fármacos pouco solúveis em meio aquoso (BROUWERS, BREWSTER e AUGUSTIJNS, 2009). A descrição dos perfis de dissolução das SBMB foi feita com o auxílio dos modelos matemáticos independentes, AUC e MDT, e pelo parâmetro de caracterização DE, os perfis foram estatisticamente comparados por esses modelos (COSTA e LOBO, 2001). Além dos testes de comparação de ANOVA e Tukey (NILUFER, KANIK e BAYKARA, 2000). As SBMB contendo o polímero EPO não apresentaram diferenças significativas entre as médias de dissolução das formulações pelos testes de ( $p > 0,05$ ). Os valores médios de AUC e DE calculados não apresentaram variações importantes entre os perfis de dissolução, o que pode ser notado pela sobreposição dos mesmos na figura 19 (tabela 12). Os valores que apresentaram maior variação são atribuídos ao parâmetro MDT, o que pode ser explicado pelas diferentes porcentagens de BNZ liberado para cada SBMB, no  $t=5\text{min}$ .

Tabela 12 - Valores médios dos parâmetros cinéticos (desvios-padrão derivados dos perfis de dissolução dos SBMBEPO).

<b>Ordem</b>	<b>AUC</b>	<b>DE (%)</b>	<b>MDT</b>
1*	4718	88,69	4,57.10 <sup>14</sup>
2	4688	91,16	3,26 .10 <sup>14</sup>
3	4609	90,52	4,03.10 <sup>14</sup>
4	4578	89,99	3,94.10 <sup>14</sup>
5	4593	88,79	4,71.10 <sup>14</sup>
6	4451	87,22	5,76.10 <sup>14</sup>
7	4545	83,32	8,32.10 <sup>14</sup>
8	4675	91,38	2,74.10 <sup>14</sup>
9	4483	89,72	3,52.10 <sup>14</sup>
10*	4454	88,71	4,73.10 <sup>14</sup>
11*	4500	89,56	4,19.10 <sup>14</sup>
12*	4526	90,96	3,22.10 <sup>14</sup>
13*	4594	90,37	3,72.10 <sup>14</sup>

\*Réplica

Figura 19: Perfis de dissolução das SBMB contendo EPO,  $T=37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL.



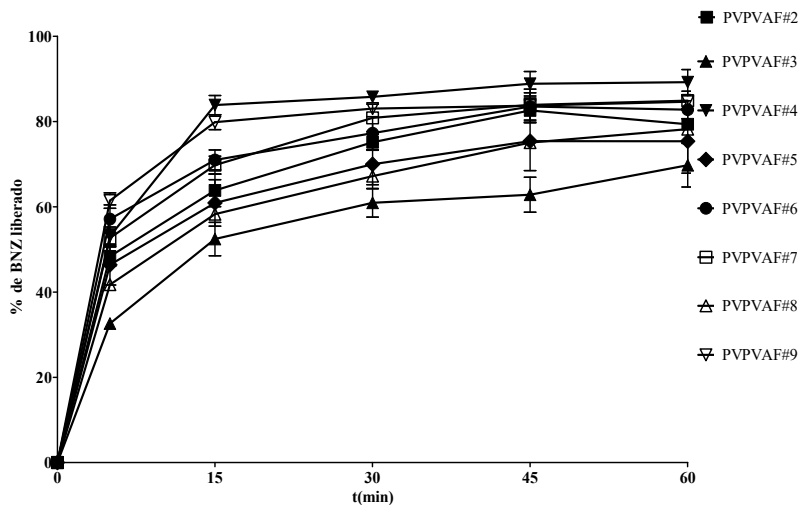
Os perfis de dissolução das SBMBPVPVA (figura 20) foram discriminativos, apresentando diferenças significativas nos meios de AUC, DE e MDT calculados ( $p < 0,05$ ), por ANOVA (tabela 13).

Tabela 13 - Valores médios dos parâmetros cinéticos (desvios-padrão derivados dos perfis de dissolução dos SBMPVPVA.

Ordem	AUC	DE	MDT
1*	4571	86,21	6,41E+14
2	4002	84,03	7,82E+14
3	3199	76,41	1,31E+15
4	4604	85,97	6,74E+14
5	3740	82,69	8,73E+14
6	4207	84,70	7,56E+14
7	4244	83,30	8,41E+14
8	3658	77,92	2,74E+14
9	4443	87,47	5,88E+14
10*	4054	83,45	8,30E+14
11*	4359	86,28	6,22E+14
12*	4106	82,87	8,79E+14
13*	3846	82,27	9,12E+14

\*Réplica

Figura 20: Perfil de dissolução das SBMB contendo PVPVA, T=37°C ±0,5°C, HCL 0,1M, pH 1,2 no volume de 900 mL.





### 3.3 DESIGN EXPERIMENTAL (DOE)

O Design Experimental (DoE) foi uma importante ferramenta para avaliação do impacto dos processos de obtenção das SBMB e da sua composição. O impacto dos fatores sobre as respostas individuais foi analisado por ANOVA, e cada resposta foi transformada em raiz quadrada (Sqrt), para análise dos dados e geração de modelos para a predição. Foram realizados o modelo sequencial de soma quadrática, falta de ajuste, erro puro, interação dos fatores principais e modelos cúbicos. Os modelos foram selecionados com base em um valor de  $p$  significativo ( $p < 0,05$ ), advindos do modelo sequencial de análise. Os efeitos e interações dos fatores investigados em relação às repostas dissolução, foram calculados e serão discutidos a seguir. Ambos os modelos, para PVPVA e EPO, apresentaram 4 graus de liberdade para falta de ajuste e 5 para o erro puro, o que indica que o número de réplicas está adequado para verificar o ajuste do modelo.

No caso das SBMB contendo polímero EPO, não foi possível inferir a influência dos fatores selecionados do DoE para as respostas selecionadas. O modelo não foi significativo em relação ao ruído, com valores de  $p > 0,05$ . A similaridade entre as curvas BNZ: EPO, discutidas no item 3.2, demonstra que os fatores avaliados não impactam na velocidade de dissolução do fármaco.

O modelo para PVPVA não foi significativo para avaliação da resposta MDT  $p > 0,05$ . Foram avaliadas então as respostas AUC e DE cujos valores de  $p < 0,05$  indicam que o ajuste do modelo foi adequado. Para ambas as respostas se observou que os fatores que mais impactaram o processo de obtenção das SBMBPVPVA, foram a proporção fármaco: polímero e o tempo de moagem ( $p < 0,05$ ), Tabelas 14 e 15.

Tabela 14- Análise de variância do modelo PVPVA (resposta AUC). Soma parcial de quadrados - Tipo III

	SQ	df	Média Q	Valor F	Valor de <i>p</i> Prob>F
<b>Modelo</b>	82,29	3	27,43	6,38	0,0131
<b>A</b>	74,51	1	74,51	17,34	0,0024
<b>B</b>	21,94	1	21,94	5,11	0,0502
<b>C</b>	3,01	1	3,01	0,70	0,4245
<b>Resíduo</b>	38,68	9	4,30		
<b>Falta de ajuste</b>	20,18	4	5,05	1,36	0,3644
<b>Erro puro</b>	18,5	5	3,70		
<b>Cor total</b>	120	12			

Tabela 15- Análise de variância do modelo PVPVA (resposta DE). Soma parcial de quadrados - Tipo III

	SQ	df	Média Q	Valor F	Valor de <i>p</i> Prob>F
<b>Modelo</b>	0,25	3	0,082	5,77	0,0175
<b>A</b>	0,19	1	0,19	13,33	0,0053
<b>B</b>	0,093	1	0,093	6,57	0,0305
<b>C</b>	4,420.10 <sup>-4</sup>	1	4,420.10 <sup>-4</sup>	0,031	0,8638
<b>Resíduo</b>	0,13	9	0,014		
<b>Falta de ajuste</b>	0,100	4	0,025	4,41	0,0677
<b>Erro puro</b>	0,028	5	5,648.10 <sup>-3</sup>		
		1			
<b>Cor total</b>	0,37	2			

Os dados demonstrados na tabela 16 permitem estimar o impacto dos fatores nas respostas AUC e DE, DoE-DSMBPVPVA. Valores dos efeitos padronizados maiores que ME foram considerados importantes para o experimento, uma vez que nenhum valor superou SME.

Observou-se que apenas o fator A (proporção fármaco: polímero) influencia na velocidade de dissolução de BNZ, e quantidade de fármaco dissolvida nos SBMBPVPVA, tendo impactado tanto para AUC quanto para DE. O gráfico *half-normal* (figura 21) exhibe os valores absolutos dos efeitos, comparando as suas magnitudes relativas. Portanto, quanto mais

à direita da origem se dispõe o efeito, e/ou suas interações, mais relevante ele é para o modelo. O fator A tem maior influência seguido de B e AC para resposta AUC, e para a resposta DE apresentam efeitos positivos A e B (BARROS-NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010). As equações finais para Y1(AUC) e Y2(DE), equações 20 e 21 estão descritas em termos de fatores codificados. Onde pode-se verificar a relação entre os fatores e as respostas, pelo modelo de regressão múltipla. Salientando-se que a quantidade de polímero é o fator que mais influencia a AUC e DE, sendo assim a otimização do processo pode ser pensada levando em consideração principalmente a proporção fármaco: polímero.

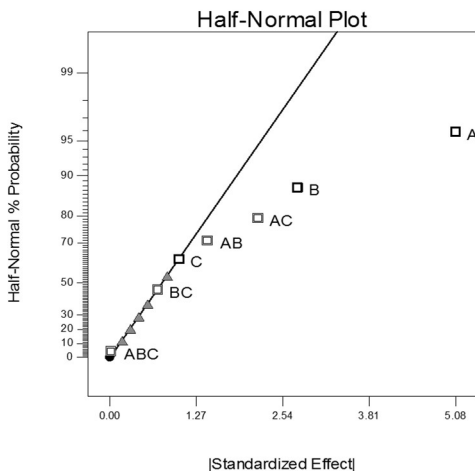
Tabela 16- Lista dos efeitos padronizados e porcentagem de contribuição Margem de erro (ME) e margem de erro simultânea (SME) no DoE SBMBPVPVA.

	Efeitos padronizados		% de contribuição	
	AUC	DE	AUC	DE
<b>A</b>	5,08	0,26	53,94	46,07
<b>B</b>	2,76	0,18	15,88	22,72
<b>C</b>	1,02	-0,012	2,18	0,11
<b>AB</b>	-1,43	-0,15	4,53	17,09
<b>AC</b>	-2,18	-0,096	9,02	5,67
<b>BC</b>	-0,70	-0,039	1,16	1,25
<b>ABC</b>	-0,017	-0,018	6,402. 10 <sup>4</sup>	0,22
<b>Erro puro</b>			13,39	6,88
<b>Lenth's ME</b>	3,51	0,21		
<b>Lenth's SME</b>	5,01	0,32		

Figura 21: Gráficos % probabilidade *Half-Normal* em função do efeito padronizado-DoE DSMBPVPVA

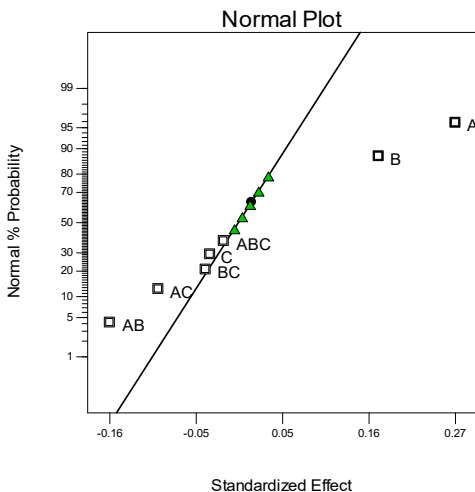
Design-Expert® Software  
Sqrt(AUC)

- ▲ Error from replicates
- A: Polymer
- B: Rotation
- C: Time
- Positive Effects
- Negative Effects



Design-Expert® Software  
Sqrt(DE)

- ▲ Error from replicates
- A: Polymer
- B: Rotation
- C: Time
- Positive Effects
- Negative Effects



$$Y1(AUC) = 63,06 + 2,59A + 1,21B + 0,49C - 0,73AB - 1,17AC - 0,36BC \quad (20)$$

$$Y2(DE) = 9,08 + 0,13A + 0,09B - 0,028C - 0,08AB - 0,05AC - 0,02BC - 9,06.10E - 3ABC \quad (21)$$

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES OBTIDAS

#### 3.4.1 Determinação da cristalinidade

A comparação dos difratogramas (figura 23) da matéria-prima de BNZ (BNZMP) e o BNZCALC, demonstrou que se trata da mesma estrutura cristalina. O discreto deslocamento a esquerda das reflexões observado no difratograma de BNZMP, pode ser atribuído a diferença de temperatura na qual os experimentos foram executados, uma vez que BNZMP foi obtido à temperatura ambiente e BNZCALC a  $-173,15^{\circ}\text{C}$ . Baixas temperaturas provocam a contração da cristalita, deslocando os ângulos  $2\Theta$  para direita, e a diminuição da distância interplanar ( $d$ ) (CULLITY, 1978). A comparação dos difratogramas de BNZMP e BNZCALC permitiu observar também orientação preferencial dos cristais da matéria-prima. Este efeito que pode ser notado nas reflexões em  $20,57$  e  $23,76$  que tem a intensidade diminuída. No caso de cristais em forma colunar, como os de BNZ, pode ocorrer o empilhamento de maneira não randômica dos cristais, onde apenas um plano cristalográfico é detectado pelo difratômetro, fornecendo um difratograma com algumas reflexões mais intensas em relação às demais (BYRN e STOWELL, 1999). A comparação das posições das reflexões nos difratogramas de BNZMP e as formulações obtidas por LAG (Figura 22) e MB (Figuras 23 e 24), demonstrou que não houveram modificações observáveis na estrutura cristalina de BNZ durante a manufatura. A intensificação das reflexões em  $20,57$  e  $23,76$  pode ser o indicativo de que não há mais orientação preferencial dos cristais de fármaco nas formulações, uma vez que as mesmas adquiriram intensidades proporcionais as demais reflexões. Nas SBMB também é possível observar um halo amorfo, definido pelo deslocamento do difratograma da base e a redução geral nas intensidades das reflexões. Estes efeitos podem ser atribuídos a diminuição de cristalita e parcial amorfização do fármaco, assim como a dispersão do mesmo no polímero, sendo mais pronunciados nas formulações que contém maiores quantidades de carreador.

Figura 22: Padrões de DRXP de BNZ matéria-prima (BNZMP) e simulado a partir do DRX do monocrystal (BNZCALC); formulações obtidas por LAG contendo os polímeros L100, EPO e PVPVA.

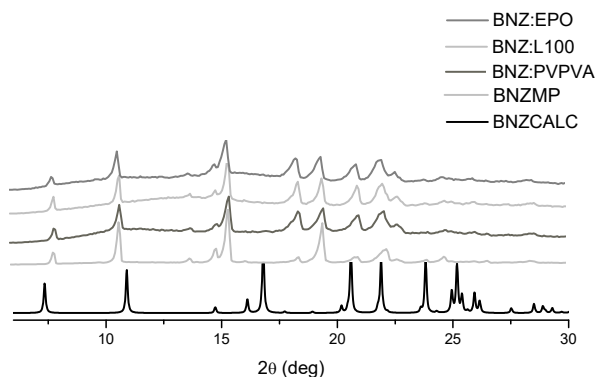


Figura 23: Padrões de DRXP de BNZ matéria-prima (BNZMP) e os SBMB contendo o polímero EPO.

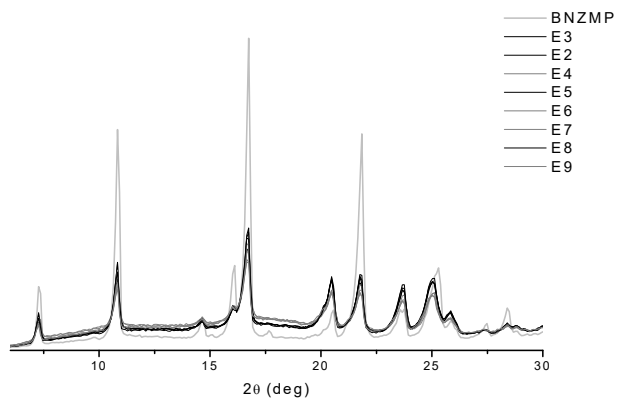
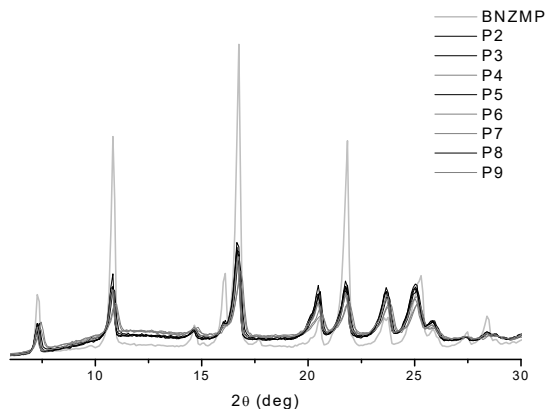


Figura 24: Padrões de DRXP de BNZ matéria-prima (BNZMP) e os SBMB contendo o polímero PVPVA.



### 3.4.2 Morfologia das partículas

As fotomicrografias de MEV da BNZMP permitiram observar a forma colunar dos cristais, com partículas de formato irregular e formação de agregados, conforme as descrições usuais disponíveis na (USP, 2011). Nos cristais poliagregados, as propriedades mecânicas, elétricas e químicas estão relacionadas ao monocristal e a forma que estes se aglomeram para formar a massa. Essas características podem estar diretamente ligadas às propriedades de baixo fluxo de BNZ e orientação preferencial dos cristais do fármaco. A avaliação das fotomicrografias de BNZ e das formulações (Figura 26) permitiu observar a redução do tamanho de cristalita do fármaco e a sua dispersão nos polímeros carreadores. Uma solução intersticial sólida de BNZ nos polímeros é esperada uma vez que BNZ é muito menor e pode entrar nos espaços vazios dos polímeros sem causar distorções.

O tamanho do grão tem influência direta sobre as propriedades físico-químicas do fármaco. A redução do tamanho de partícula aumenta a área de superfície total exposta ao solvente, permitindo que um maior número de partículas se dissolvam mais rapidamente (BRITAIN, 1995). Diferenças na área superficial podem ter sido produzidas pela moagem, alterando a molhabilidade da amostra (VIPPAGUNTA, BRITAIN e GRANT, 2001). Estas características podem estar relacionadas ao aumento da velocidade de dissolução do fármaco em meio aquoso.

As formulações obtidas por LAG contendo EPO se apresentaram na forma de grandes agregados rugosos, o que pode ser atribuído a pressão e energia mecânica exercida pelo processo (Figura 25). As formulações contendo o polímero L-100 apresentaram sistemas heterogêneos compostos por algumas partículas de tamanho variável. As formulações contendo PVPVA apresentaram a forma de grandes blocos agregados. Pode-se afirmar que a dissolução do fármaco não foi influenciada por a sua amorfização, mais sim pela redução do tamanho de cristalita, uma vez que ainda podem ser observadas algumas estruturas cristalinas nas imagens, como foi indicado nos DRXP discutidos anteriormente (item 3.4.1). As formulações obtidas por MB (Figuras 26 e 27) possuem partículas menores em comparação com as obtidas por LAG, o que é esperado uma vez que o moinho de bolas submete o sistema a uma maior energia, quebrando os grãos em partículas menores (PRAKASH, RO, *et al.*, 2014).



Figura 25: Fotomicrografias obtidas por MEV referentes as amostras: BNZMP, EPO, PVPVA, LAGL100, LAGEPO e LAGPVPVA. Aumento 500X

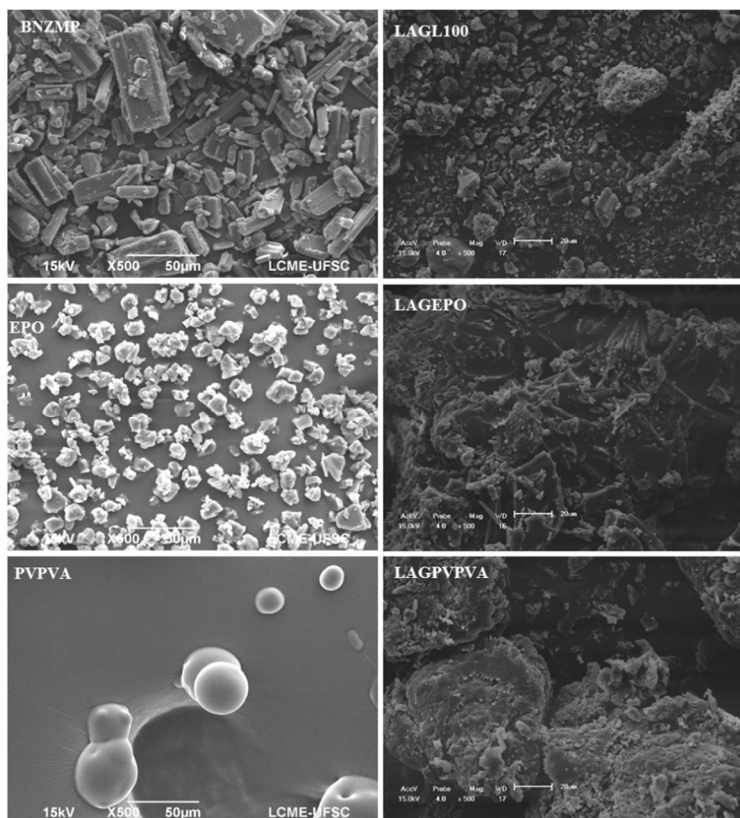


Figura 26: Fotomicrografias obtidas por MEV referentes as amostras SBMB – EPO F2-F9. Formulações 2, 3, 5 e 8, proporção fármaco: polímero 1:1 (m/m) e 4, 6, 7 e 9 - 2:1 (m/m).

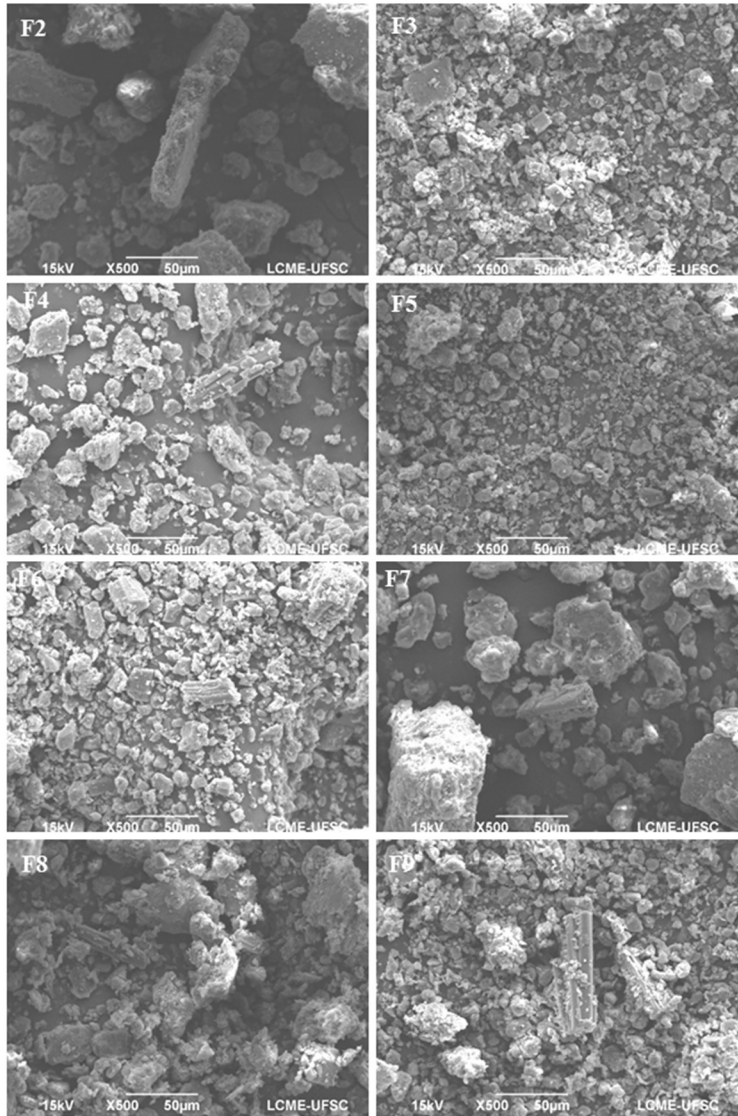
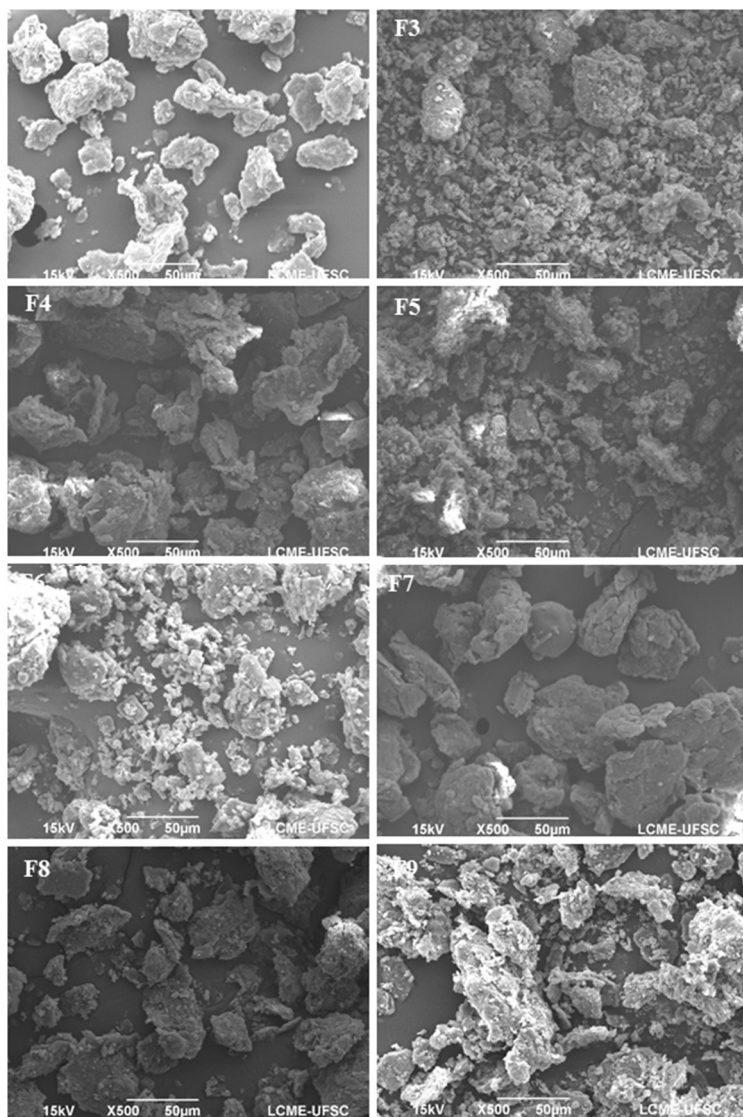


Figura 27: Fotomicrografias obtidas por MEV referentes as amostras SBMB - PVPVA F2-F9. Formulações 2, 3, 5 e 8, proporção fármaco: polímero 1:1 (m/m) e 4, 6, 7 e 9 - 2:1 (m/m).



### 3.4.3 Avaliação do comportamento termoanalítico

As curvas de DSC (Figura 28) da mistura física (MF) fármaco e o polímero EPO (1:1, m/m) e das respectivas SBMB não apresentaram desvios relevantes nas endotermas de fusão em relação à de BNZMP (RSD= 0,58%). A variação de entalpia ( $\Delta H$ ) observadas na análise correlaciona diretamente com a proporção fármaco e polímero nas amostras. As curvas DSC das MF de BNZ: PVPVA (1:1, m/m) e suas SBMB (1:1, m/m), não apresentaram endotermas que permitissem avaliá-las no que diz respeito à temperatura de fusão e variação de entalpia ( $\Delta H$ ). Entretanto, nas curvas das SBMB- BNZ: PVPVA: (2:1, m/m), foi possível observar discretas endotermas ( $\Delta H \leq -1,5 \text{ mW}$ ) que podem ser atribuídas a fusão do fármaco, com um deslocamento em torno de  $4^\circ\text{C}$ , para temperaturas mais baixas.

A possibilidade de amorfização do sistema durante o processo de obtenção das SBMB pode ser descartada, uma vez que, os difratogramas das amostras indicam a manutenção das características de cristalinidade do fármaco. A solubilização de BNZ pode ter ocorrido após a transição vítrea do PVPVA, promovida pelo aquecimento do sistema. A maior quantidade de fármaco nas SBMB 2:1, pode ser o motivo da manutenção de uma pequena endoterma de fusão nos termogramas de DSC. A miscibilidade do sistema pode ser indicada pela presença de uma única temperatura de transição vítrea, mas não é um indicativo infalível (MARSAC, LI e TAYLOR, 2009). Alterações como redução significativa ou desaparecimento dos picos na curva DSC podem caracterizar alguma interação física, interações confirmadas pela avaliação dos espectros IV, item 3.4.4 (STORPIRTIS, GONÇALVES, *et al.*, 2009). As curvas TG das MF de BNZ: EPO e BNZ: PVPVA mantiveram os eventos de perda de massa de BNZ inalterados, 70% em  $292,94^\circ\text{C}$  (Figura 29).

Figura 28: Curvas de DSC relativas a BNZ, MF polímeros e suas respectivas SBMB: EPO; PVPVA. MF e formulações 2, 3, 5 e 8, proporção fármaco: polímero 1:1 (m/m) e 4, 6, 7 e 9 - 2:1 (m/m).

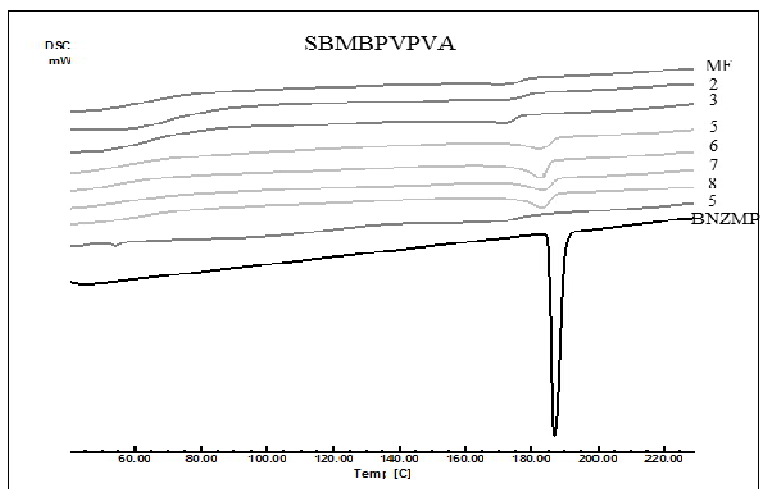
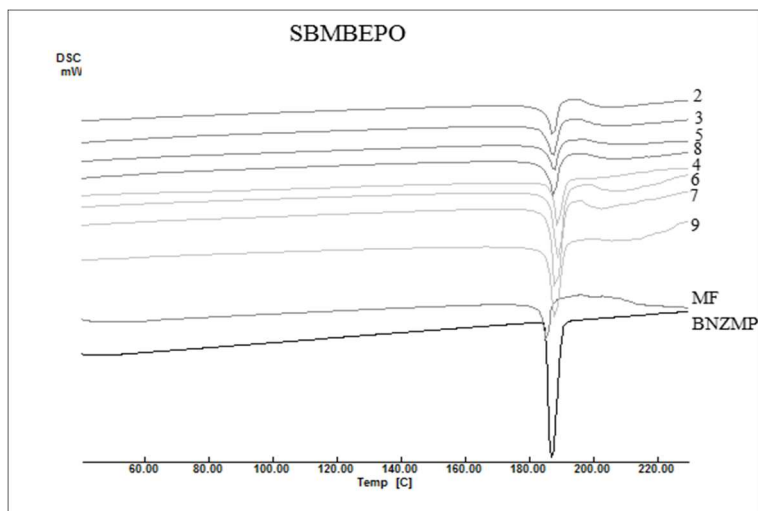
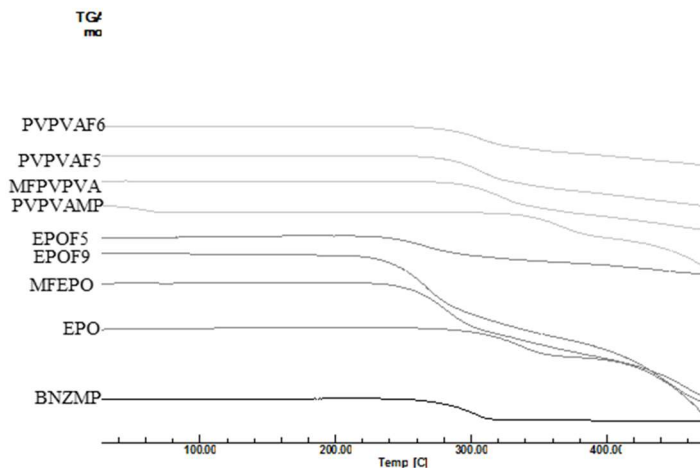


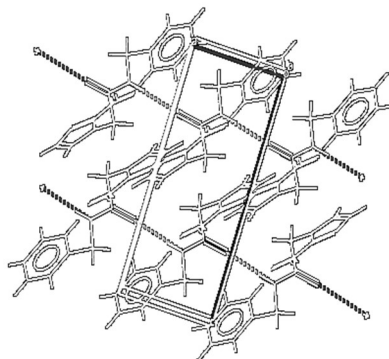
Figura 29: Curvas de TG relativas a BNZ, MF polímeros e suas respectivas SBMB: EPO; PVPVA e curvas de. MF e formulações: F5 proporção fármaco: polímero 1:1 (m/m) e F6 e F9 - 2:1 (m/m).



### 3.4.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

As interações entre o fármaco e os polímeros nas SBMB foram verificadas por meio da comparação dos espectros de IV dos materiais de partida e das formulações. A análise dos espectros de infravermelho das SBMB permitiu observar a diminuição das bandas e da resolução espectral dos mesmos. Essas características podem ser atribuídas à redução do tamanho de partícula do fármaco e a grande uniformidade da mistura fármaco: polímero. A Figura 30 traz a representação da célula unitária do monocrystal de BNZ, assim como as suas ligações de hidrogênio intermoleculares, que podem ser responsáveis pela formação dos agregados cristalinos presentes na matéria-prima do fármaco (SWARBRICK, 2006).

Figura 30: Representação da célula unitária do monocristal de BNZ e suas respectivas ligações de H intermoleculares, linhas tracejadas.



Por meio de comparação entre os espectros de IV de BNZMP, EPOMP e as suas respectivas SBMB (Figuras 31 e 32), foi possível observar deslocamento de algumas bandas, conforme atribuído na tabela 17. Foi observado, de um modo geral, o aumento das frequências das bandas IV, efeito é conhecido como hipsocrômico ou *blue-shift*. As interações deste tipo são mais brandas, e não há uma grande perturbação na integridade estrutural, por fraca interação intermolecular (OLIVEIRA e ARAÚJO , 2012).

Os deslocamentos mais expressivos são observados nos grupos benzil e nitro, os quais podem ser responsáveis pelas principais interações entre o fármaco e polímero. O primeiro, atribuído à interação de van der Waals e o segundo, por ligação de hidrogênio, de acordo com a Figura 31. A variação em apenas uma das bandas do grupo nitro pode ser atribuída à conformação espacial das moléculas de BNZ, que torna mais acessível para interação de hidrogênio apenas um dos oxigênios. Deslocamentos importantes também podem ser observados nas bandas da carbonila de PVPVA, sendo indícios do ponto de interação entre o fármaco e polímero. No caso de PVPVA, o anel pirrolidona pode atuar como grupo aceptor de elétrons, atribuindo características tensoativas ao polímero. E, o polímero EPO pode funcionar como aceptor de prótons por conter um grupo amino terciário, em adição a um grupo carbonila na estrutura (KOJIMA, HIGASHI, *et al.*, 2012). Por essa razão, o EPO pode formar interações

com BNZ como doador de prótons. As SBMB se mostraram estáveis após submissão às condições de estabilidade acelerada, uma vez que não apresentaram variações nos espectros de IV, o que é um indicativo da manutenção das interações fármaco polímero.

Figura 31: Espectros de IV de BNZMP, EPO, MF e sua respectiva SBMB

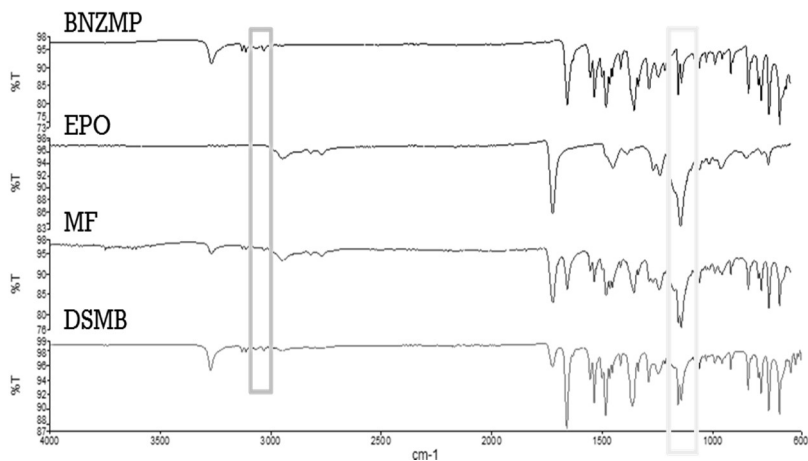


Figura 32- Espectros de IV de BNZMP, PVPVA, MF e sua respectiva SBMB.

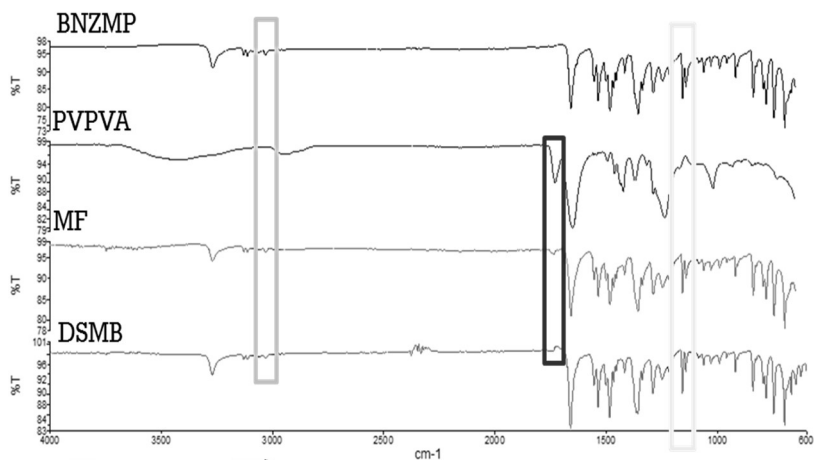




Tabela 17- Atribuição das bandas de absorção IV de BNZ, polímeros e SBMB

Composto	Absorção IV (cm <sup>-1</sup> )				
	N-H (amida 1°)	C-H (benzil)	C=O (carbonila)		N=O (grupo nitro)
<b>BNZ</b>	3269	3029	1659		1554 1356
<b>EPO</b>				1724	
<b>PVPVA</b>				1731	
<b>SBMBEPO</b>	3273	3034	1661	1726	1555 1364
<b>SBMBPVPVA</b>	3272	3034	1558	1739	1555 1363

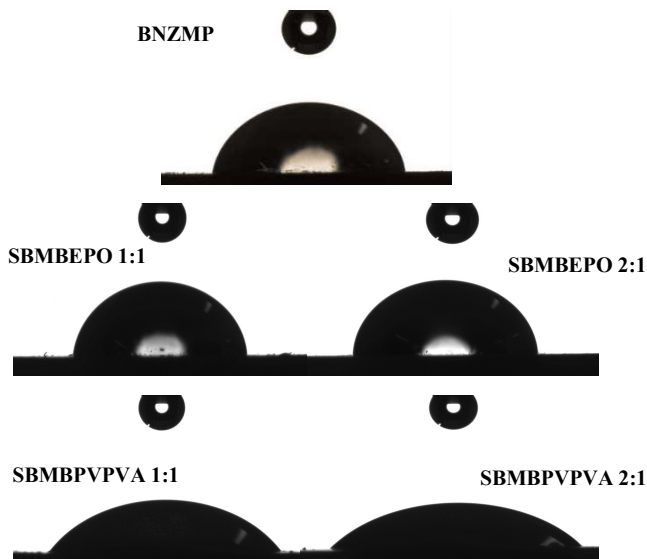
### 3.4.5 Molhabilidade

O aumento da molhabilidade é considerado uma vantagem para a melhoria da velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis, uma vez que garante um maior acesso do solvente as moléculas do fármaco (PRAKASH, RO, *et al.*, 2014). O ângulo de contato indica o grau de interação entre líquido e sólido, ângulos de contato pequenos ( $\ll 90^\circ$ ) demonstram a maior interação entre o solvente e as moléculas do material (KWOK e NEUMANN, 1999). A comparação entre os ângulos (Figura 33) de contato dos comprimidos de BNZMP e das SBMB contendo EPO e PVPVA permitiu avaliar se a composição das formulações teria influência na molhabilidade das amostras. Os comprimidos se mostraram adequados para avaliação do ângulo de contato, por apresentarem uma superfície lisa, homogênea e livre de fraturas, fatores primordiais para interpretação dos dados através da equação de Young (YUAN e LEE, 2013).

Todas as amostras apresentaram ângulos de contato inferiores a  $90^\circ$ , o que pode estar relacionado com a sua interação com a água. As médias de ângulos de contato para os comprimidos de BNZMP  $81,26^\circ$  (RSD=1,16%) e SBMBEPO 1:1,  $81,57^\circ$  (RSD=0,89%) e 2:1,  $81,53^\circ$  (RSD=0,45%). Estes dados permitiram observar que o polímero EPO não teve influência na molhabilidade das amostras, independente da sua proporção. O aumento da velocidade de dissolução de BNZ neste caso pode ser atribuído ao fenômeno de cosolvência. Já o polímero PVPVA apresentou uma diminuição significativa nos ângulos de contato, SBMBPVPVA 1:1,  $54,44^\circ$  (RSD=2,00%), 2:1,  $42,37^\circ$  (RSD=0,42%), o que pode ser atribuído as características tensoativas do polímero, que

reduziu a tensão superficial da gota de água. Este resultado corrobora para explicação do aumento do perfil de dissolução de BNZ em meio aquoso.

Figura 33: Comparação dos ângulos de contato formados por gotas de água (destilada) em comprimidos de: BNZMP, SBMBEPO e SBMBPVPVA



Os mecanismos envolvidos na dissolução das SBMB em meios aquosos, podem ser descritos pelo conceito de *spring* e *parachute*. Onde, uma solução supersaturada é formada pela rápida dissolução do fármaco (*spring*) e depois essa condição de supersaturação é mantida por tempo suficiente para absorção do princípio ativo (*parachute*). Mesmo que não seja bem esclarecida a forma como os polímeros prolongam a supersaturação das soluções, acredita-se que haja uma inibição do crescimento/precipitação dos cristais do fármaco. Desta forma, as misturas comoídas podem formar nanocristais de fármaco, aumentando a sua superfície de contato com o meio líquido, promovendo uma rápida solubilização (BROUWERS, BREWSTER e AUGUSTIJNS, 2009). Além disso, o processo também parece promover a dispersão homogênea

do princípio ativo no polímero, favorecendo as interações entre os mesmos, por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Essas interações parecem estar diretamente relacionadas a manutenção de soluções altamente concentradas por um período de maior tempo, favorecendo a absorção do fármaco.

A avaliação dos SBMB permitiu observar uma rápida dissolução de BNZ e do polímero EPO (cosolvência), em menos de 5 min do ensaio o meio estava aparentemente límpido e livre de partículas. As misturas físicas BNZ: EPO apresentaram maiores velocidades de dissolução quando comparadas a BNZ isoladamente (40% em 60 min), e demonstraram que maiores quantidades de EPO podem contribuir positivamente na dissolução do fármaco, com 40% de dissolução de BNZ em 5 min para BNZ: EPO 2:1 (m/m) e 50% para proporção 1:1. Entretanto, estes resultados não superaram os observados para as SBMBEPO, uma vez que foram atingidas quantidades superiores a 80% de BNZ em solução no mesmo tempo. Os resultados indicam que a cosolubilização e interação fármaco polímero em meio aquoso são importantes no aumento da dissolução de BNZ, assim como a moagem.

No caso dos sistemas formados com PVPVA, observou-se que as características tensoativas do polímero têm influência direta na dissolução/precipitação do fármaco, este fenômeno está relacionado a solubilização micelar e estabilização/minimização do crescimento dos cristais de BNZ (ALHALAWEH, ALI e VELAGA, 2014). A comparação das MF BNZ: PVPVA permitiu observar que as MF que continham menores quantidades de polímeros tiveram melhores resultados no ensaio de dissolução. O mecanismo pelo qual tensoativos atuam em solução é limitado por suas porções hidrofóbicas, sendo que grandes quantidades de polímero começam a produzir efeitos negativos na formação de soluções supersaturadas (HUANG e DAI, 2014). Os resultados de molhabilidade corroboram com essa observação, sendo que os efeitos tensoativos foram maiores para DS que continham menor quantidade de polímero. Entretanto os resultados de dissolução das MF fármaco: polímero 2:1 figuram entre esses resultados das SBMBPVPVA 1:1, o que pode indicar a interação BNZ-PVPVA propiciada pela moagem, foi mais efetiva em sistemas que continham massas iguais dos componentes. Essa interação, juntamente com a redução do tamanho de grão de BNZ são importantes na melhoria da dissolução do fármaco. A obtenção dos SBMB também permite um melhor controle de dose de princípio ativo, por formar sistemas homogeneamente dispersos.

## 4 CONCLUSÃO

Formular dispersões sólidas com propriedades físicas e químicas desejadas requer um entendimento de como combinar o apropriadamente fármaco, carreador e método de preparação e métodos de avaliação. As formulações obtidas por LAG contendo os polímeros PVPVA, EPO foram as que obtiveram melhor desempenho frente ao perfil de dissolução do fármaco puro. O aumento da velocidade de dissolução de BNZ pode ser atribuído ao somatório da redução do tamanho de partícula e ao efeito carreador dos polímeros selecionados, uma vez que as formulações contendo L100 não obtiveram melhora significativa na solubilidade de BNZ, mesmo com a redução de partícula. O design experimental (DoE) permitiu avaliar o impacto das variáveis relacionadas ao processo de moagem e composição na obtenção apenas para SBMBPVPVA, constatou-se que a quantidade de polímero é diretamente proporcional a velocidade de dissolução de BNZ. As análises de DRXP, DSC, MEV e IV permitiram avaliar que houveram importantes interações entre o fármaco e os carreadores, a redução de tamanho de cristalita de BNZ e a formação de uma mistura homogênea entre os componentes. A avaliação da molhabilidade demonstra o efeito tensoativo de PVPVA, influenciando o aumento da velocidade de dissolução do fármaco. Entretanto o efeito de cosolvência pode ser atribuído as formulações contendo EPO. A aplicação da técnica de comoagem com polímeros hidrofílicos foi efetiva para o aumento da velocidade de dissolução e a manutenção da supersaturação do fármaco por um longo período de tempo, fator que pode contribuir para a melhoria das características farmacocinéticas de BNZ.

## **CAPÍTULO IV- COCRISTAIS: UMA ALTERNATIVA PARA MELHORIA DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FÁRMACO BENZNIDAZOL**

### **1 INTRODUÇÃO**

A biodisponibilidade de princípios ativos administrados oralmente está diretamente relacionada as suas características de solubilidade e permeação (AMIDON, LENNERNÄS, *et al.*, 1995). Para fármacos pouco solúveis em meio aquoso como no caso do benznidazol (BNZ), a velocidade de dissolução é um fator limitante para sua viabilidade como produto farmacêutico (SOARES-SOBRINHO, MEDEIROS, *et al.*, 2007) (PANAKANTI e NARANG, 2012). Neste sentido, técnicas de síntese no estado sólido podem aprimorar a dissolução/solubilidade de fármacos e, conseqüentemente, demonstram-se relevantes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas orais.

A obtenção de sais e de fármacos amorfos são alternativas para melhoria da solubilidade aparente de princípios ativos, entretanto ambas as técnicas possuem limitações (ALHALAWEH, ALI e VELAGA, 2014). Por exemplo, a produção de sais requer que a substância ativa seja ionizável, o que exclui sua aplicação em fármacos neutros como BNZ (MAXIMIANO, COSTA, *et al.*, 2010). Já no que se refere às formas amorfas, estas geralmente possuem baixa estabilidade física e dificuldade de obtenção em escala industrial (BAGHEL, CATHCART e O'REILLY, 2016). Como alternativa, os cocristsais farmacêuticos estão emergindo como uma nova classe de insumos farmacêuticos sólidos. Cocrystal pode ser definido como um material cristalino homogêneo formado por múltiplos componentes, os quais são sólidos a temperatura ambiente. Estes componentes coexistem em proporções estequiométricas e são estabilizados por ligações de hidrogênio entre as moléculas envolvidas (RODRÍGUEZ-HORNEDO, NEHMA e JAYASANKAR, 2013).

Quando ocorre a cocrystalização, a nova forma sólida possui o potencial de melhora das características dos ingredientes envolvidos, sem modificação de ligações covalentes (ÉVORA, CASTRO e SILVA, 2014). Cocristsais com a mesma substância ativa podem ter propriedades físico-químicas diferentes como ponto de fusão, solubilidade, dissolução, biodisponibilidade, higroscopicidade e estabilidade química (TRASK, MOTHERWELL e JONES, 2005). Este capítulo visa demonstrar a

síntese, caracterização estrutural e propriedades físico-químicas de cocristais de BNZ.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 MATERIAIS

O BNZ foi doado pela empresa NORTEC Química, Rio de Janeiro, Brasil. Os *Coformers* foram adquiridos de diferentes fornecedores como: ácido oxálico trihidratado, Vetec - Duque de Caxias, Brasil; ácido glutárico e ácido maleico Merck - Darmstadt, Alemanha; ácido succínico e ácido fumárico Synth - Diadema, Brasil. Ácido propiônico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malônico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido adípico, ácido aspártico, ácido glutâmico, ácido cítrico, asparagina, glutamina, ureia, cisteína, lisina, sacarina, cafeína, nicotinamida e fenazina utilizados nos experimentos de moagem foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Chemie, Alemanha. Os demais reagentes foram adquiridos com a pureza química necessária.

### 2.2 AVALIAÇÃO DA TENDÊNCIA DE COCRISTALIZAÇÃO DO FÁRMACO BNZ

A triagem dos cocristais de BNZ foi realizado por moagem a seco e moagem assistida por solvente (LAG) em moinho RETCH<sup>®</sup> MM20 em parceria com o grupo de Química de Materiais (Gabriela Schneider Rauber, Departamento de Química, Universidade de Cambridge, UK). As baterias de moagem foram padronizadas conforme estudos prévios: 30 min, 30 Hz de frequência, jarros de aço, 2 bolas de aço por jarro (7 mm de diâmetro cada). Inicialmente, a proporção molar fármaco:*coformer* compreendeu 1:1 (n:n, massa total de 200 mg), entretanto diferentes estequiometrias foram testadas tendo em vista os resultados de caracterização dos materiais e objetivando definir a proporção mais exata e a obtenção de amostras puras. Da mesma forma, a moagem LAG foi normalmente conduzida em 50 µL de metanol, mas diferentes solventes também foram testados em amostras que apresentavam traços de materiais de partida (nitrometano, DMSO, hexano, isobutanol e

diclorometano). Também foram realizados ensaios de moagem em gral visando à reprodução interlaboratorial das reações.

O método de cocristalização por reação (RODRIGUEZ-HORNEDO, NEHRU, *et al.*, 2006) também foi utilizado a fim de obter grandes quantidades de amostra para posteriores ensaios de performance. O procedimento consistiu na adição de excesso de BNZ a uma solução de metanol (10 mL) saturada pelo respectivo *coformer*. As soluções saturadas de *coformer* foram preparadas em agitador Dist DI 01/06P com o auxílio de barra magnética a 150 rpm, conforme Tabela 18. Após a adição de fármaco em excesso, houve um tempo de espera variável 1 min a 24h, o líquido foi removido por filtração a vácuo em papel filtro qualitativo.

Tabela 18- Componentes da síntese de cocristais pelo método de reação

<i>Coformer</i>	Massa (g)	mmol	BNZ (g)	mmol
Ácido succínico	0,543	$4,6 \times 10^{-3}$	0,531	$2,0 \times 10^{-3}$
Ácido fumárico	0,580	$5,0 \times 10^{-3}$	0,502	$1,9 \times 10^{-3}$
Ácido maleico	3,030	$2,6 \times 10^{-2}$	0,500	$1,9 \times 10^{-3}$
Ácido oxálico. 2H <sub>2</sub> O	4,005	$3,2 \times 10^{-2}$	0,500	$1,9 \times 10^{-3}$
Ácido glutárico	0,255	$1,9 \times 10^{-3}$	0,500	$1,9 \times 10^{-3}$

### 2.3 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

Os espectros de IV foram obtidos em equipamento Perkin Elmer (FTIR Frontier), em uma faixa espectral de 4.000 a 600 cm<sup>-1</sup>, com 4 acumulações. Os materiais sólidos foram acondicionados diretamente no porta amostras em quantidade suficiente para preenchimento total do leitor.

### 2.4 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X DE PÓ (DRXP)

Os difratogramas foram obtidos em difratômetro de raios X q-q (Phaser D2, Bruker), operando com radiação de cobre e sem monocromador ( $K_{\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$ ), à tensão de 10 mA e voltagem 30 kV. A detecção foi realizada por meio de um contador de cintilação unidimensional detector LYNXEYE, com medidas realizadas à

temperatura ambiente, digitalização  $2\theta$  de 5 a  $35^\circ$ , com tamanho de passo de  $0.091^\circ/\text{segundo}$ . O difratograma BNZ teórico (BNZCALC) foi calculado com auxílio do programa Mercury 3.1 a partir dos dados do monocristal de BNZ, depositados no *CSD – Cambridge Structural Database* sob a sigla de LIVWET (SOARES-SOBRINHO, CUNHA-FILHO, *et al.*, 2008).

Os padrões de difração de pó utilizados para determinação de estrutura cristalina foram coletados em capilar (0,5 mm) com difratômetro Stoe StadiP, geometria de transmissão, radiação  $\text{CuK}\alpha 1$  monocromática gerada por 40 kV e 30 mA. Os dados foram coletados de  $2-60^\circ 2\theta$  ( $0.015^\circ/\text{s}$ ). A resolução da estrutura e o refinamento Rietveld do cocrystal contendo BNZ e ácido succínico foram realizados com o programa TOPAS Academic V5 (Bruker AXS, 2011). Orientação preferencial não foi incluída nos cálculos. As estruturas refinadas foram otimizadas via cálculos DFT em parceria com o grupo de Química de Materiais (Dr. Mihails Arhangel'skis, Departamento de Química, Universidade de Cambridge, UK). Os cálculos para resolução de estrutura dos outros cocrystal obtidos estão em andamento.

## 2.5 MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS

As fotomicrografias dos insumos e cocrystal foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), JSM-6390LV (JEOL, EUA). As amostras foram posicionadas em porta-amostras (*stubs*) de alumínio e revestidas com ouro em um sistema de pulverização catódica Penning em câmara de alto vácuo (Leica EMSCD500, EUA). As análises foram realizadas em campo de emissão sob pressão variável, probe 4.0 nm, à voltagem de aceleração de 10 kV, e detecção por elétrons secundários.

## 2.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TERMOANALÍTICO

O comportamento termoanalítico foi avaliado por calorimetria exploratória diferencial (DSC), em célula DSC-60 da Shimadzu, utilizando cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas, com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , na faixa de temperatura de 30 a  $250^\circ\text{C}$ , em atmosfera de  $\text{N}_2$ .



## 2.7 DOSEAMENTO DO CONTEÚDO DE BNZ NOS COCRISTAIS

Para o doseamento do teor do fármaco, a fim de aferir a proporção fármaco: *coformer*, foi utilizada a técnica de espectrofotometria na região do UV/Vis,  $\lambda = 324$  nm (espectrofotômetro Cary 50 Bio). Para o preparo de amostra, 5 mg do analito foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico (25 mL). As soluções foram preparadas em HCl 0,1 M empregando-se sonicação (5 minutos) e filtração em papel filtro Millipore® 0,45  $\mu$ m). Quando necessário, as soluções foram diluídas. As análises foram feitas em triplicata.

## 2.8 SOLUBILIDADE DOS COCRISTAIS DE BNZ

A avaliação quantitativa da solubilidade pH dependente dos cocristais de BNZ foi efetuada conforme método padronizado no laboratório. O volume de 10 mL de meio (solução HCl 0,1 M, pH 1,2 ou tampão acetato de amônio, pH 7,5) foi transferido para frasco de vidro (100 mL) apropriadamente tampado. O líquido foi submetido à agitação (150 rpm) com auxílio de barra magnética, em agitador Dist DI 01/06P. Um excesso de amostra (50 mg) foi precisamente pesado e transferido para o frasco sob agitação constante. Os experimentos foram realizados em triplicata a temperatura ambiente. Alíquotas (0,5 mL) foram retiradas nos tempos zero e no intervalo de 1 min até 10 minutos, e depois nos tempos 15, 30, 45, 60, 120 min e 24h. As amostras foram filtradas em filtro Millipore® 0,45 $\mu$ m e avaliadas quanto ao teor de substância ativa por espectrofotometria na região do UV, em espectrofotômetro- Cary 50 Bio® (Perkin Elmer).

## 2.9 FOTODEGRADAÇÃO

O fármaco matéria-prima e os cocristais obtidos foram expostos à radiação UV (lâmpada Philips® UVC, 30 W, 254 nm) em instalação revestida internamente com superfície espelhada. Foram pesados 50 mg de amostra e dispostos homogeneamente em vidro de relógio. As amostras foram posicionadas a uma distância de 10 cm da lâmpada UVC, cuja intensidade foi testada com auxílio de luxímetro calibrado (modelo

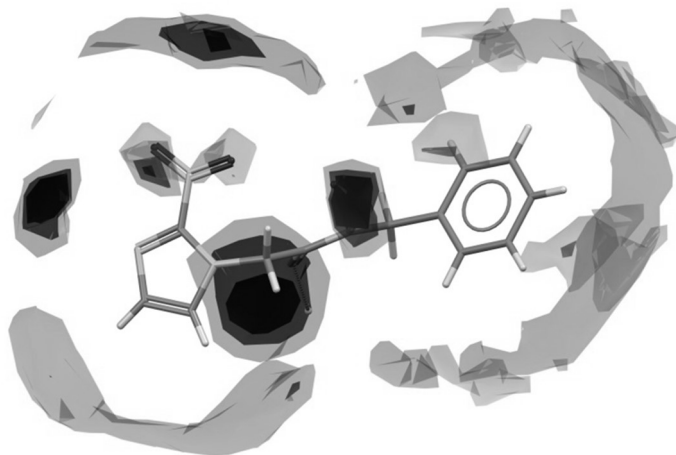
Mimipa® MLM 1011, São Paulo, Brasil). O material foi analisado no intervalo de 24 e 48 h, com experimentos realizados em triplicata. O procedimento de fotodegradação está de acordo com o guia ICH Q1B (ICH, 1996). As amostras foram avaliadas por CLAE, coluna C-18 (Luna-250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel ACN:Acetato de Amônio pH = 6,5 (65:35, v:v), fluxo 0,5 ml.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 220 nm, volume de injeção de 20  $\mu\text{l}$  e temperatura de coluna de 25 °C. Técnica previamente validada conforme descrito no capítulo I.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ESTUDOS PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DAS POTENCIAIS INTERAÇÕES SUPRAMOLECULARES DE BNZ E SELEÇÃO DOS *COFORMERS* PARA *SCREENING*

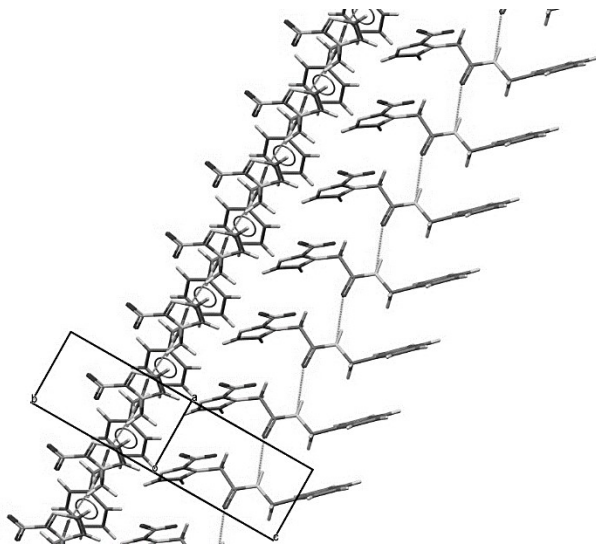
Utilizando-se a estrutura de BNZ reportada, foi construído o mapa de interação global da molécula (Mercury, CSD) (Figura 1). A avaliação do mapa demonstrou que os grupos de BNZ mais favoráveis à interação são: o grupo amida, com a amina secundária (doadora de ligação-H) e a carbonila (acceptora de ligação-H); a amina terciária do anel imidazol, e o grupo nitro, ambos aceptores de ligação-H (Figura 34).

Figura 34: Mapa das interações mais favoráveis de BNZ (regiões mais escuras da Figura), gerado pelo programa Mercury 3.5 (plataforma CSD).



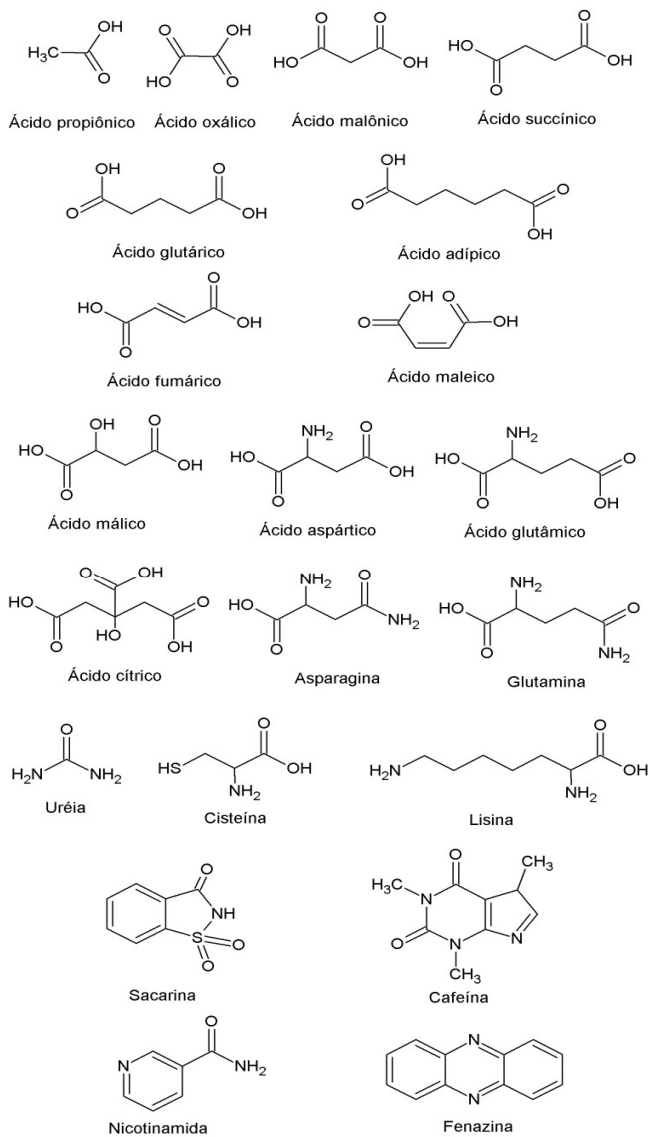
Entretanto, embora os grupos amina e nitro-substituído do anel imidazol supracitado demonstrem alta probabilidade de interação no mapa, a estrutura reportada para o cristal de BNZ (SOARES-SOBRINHO, CUNHA-FILHO, *et al.*, 2008) apresenta apenas ligações de hidrogênio entre os grupamentos amida das moléculas do fármaco. Nestas ligações de hidrogênio, a amina secundária e a carbonila da amida adquirem a configuração *trans*, formando cadeias infinitas ao longo de um dos eixos da estrutura, como pode ser observado na Figura 35.

Figura 35: Cadeias de BNZ formadas pelas interações amida intermoleculares, gerado pelo programa Mercury 3.5 (plataforma CSD).



No caso da estrutura reportada de BNZ, além das ligações de hidrogênio entre os grupamentos amida, a estabilidade do empacotamento das moléculas na rede cristalina pode ser atribuída ao efeito *stacking* originado do empilhamento de grupos imidazol e de anéis aromáticos de moléculas paralelas não centralizadas. Ambos grupos imidazol e anel aromático apresentam alta densidade eletrônica e promovem atrações eletrostáticas entre as moléculas organizadas ao longo do eixo de ligações de hidrogênio da amida. O efeito *stacking* pode conferir uma barreira energética para tentativas de desestruturação das cadeias formadas pela interação entre as amidas das moléculas de BNZ.

Dessa forma, a seleção dos *coformers* (Figura 36) foi baseada na presença de grupos em sua estrutura capazes de interagir com BNZ, porém levando-se em consideração os pontos destacados nos parágrafos anteriores. Optou-se por trabalhar principalmente com ácidos dicarboxílicos planares variando-se o tamanho da cadeia carbônica, insaturações/conformações e grupos substituídos (amina, álcool/ácido carboxílico, sulfeto). Também foram selecionados *coformers* contendo grupos amida e *coformers* cíclicos.

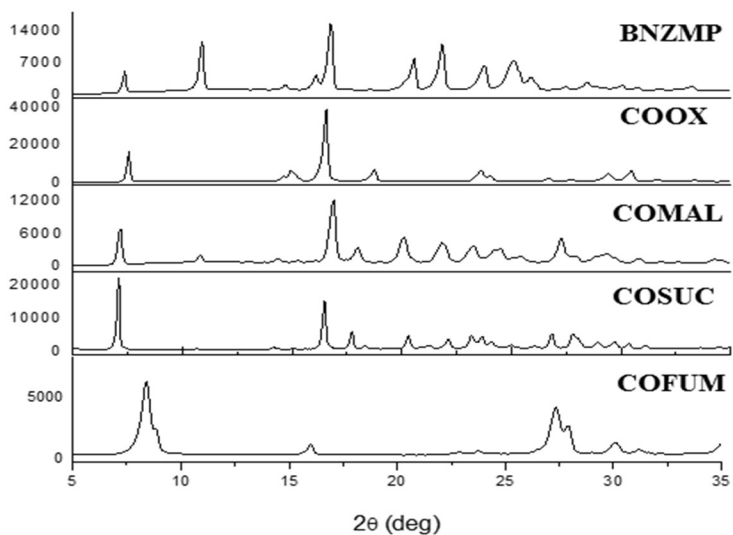
Figura 36: Estrutura molecular dos *coformers* utilizados na triagem

## 3.2 TRIAGEM E CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

### 3.2.1 Caracterização dos materiais obtidos

A formação de novas estruturas cristalinas após o *screening* de BNZ com os ácidos dicarboxílicos oxálico, succínico, fumárico e maleico, pode ser observada pela comparação dos difratogramas dos novos materiais com o BNZ puro (Figura 37). Verifica-se o surgimento de novas reflexões e a ausência de picos de difração relativos aos materiais de partida, exceto para a amostra obtida com ácido fumárico. Neste caso, as amostras COFUM aparentam ser misturas de BNZ, *coformer* e nova fase cristalina. Além disso, em algumas amostras, dependendo do processo de obtenção e especialmente para as reflexões em baixo ângulo, observou-se a ocorrência de orientação preferencial (condizente com os resultados obtidos nas fotomicrografias). Comparação detalhada dos difratogramas para cada sistema estudado está disponível no APÊNDICE B, Figura 1.

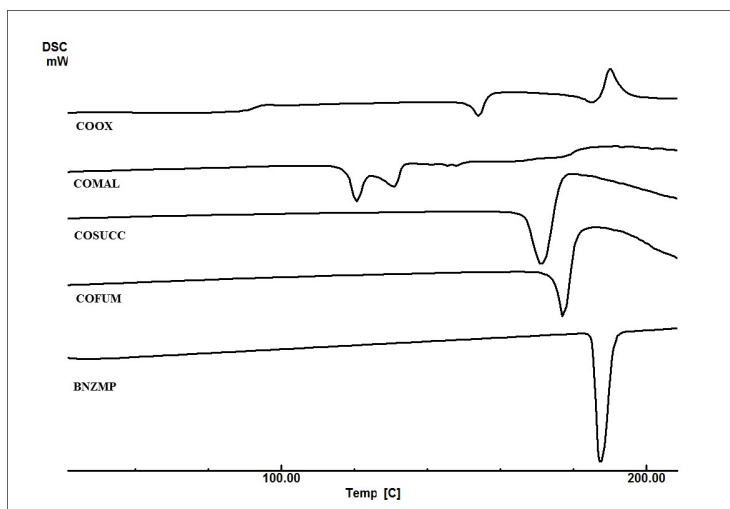
Figura 37: Comparação-resumo dos difratogramas dos co cristais contendo BNZ obtidos durante a triagem.



A Figura 38 traz as curvas DSC representativas do comportamento termoanalítico dos novos materiais cristalinos obtidos em

comparação com o BNZ (comparação detalhada para cada sistema estudado está disponível no APÊNDICE B, figura 3). A análise desses resultados em conjunto com DRXP, permite classificar as amostras obtidas em três grupos: misturas físicas (nas quais nenhuma modificação em DRXP e DSC é observada), misturas eutéticas (nas quais o evento de fusão é reduzido, embora DRXP não se modifique) e novas fases cristalinas (nas quais DRXP e DSC apresentam diferenças em relação aos materiais de partida). Misturas físicas foram obtidas no caso da triagem: ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina, ureia, cisteína, lisina, propiônico, ureia, ácido malônico, fenazina. No caso das amostras BNZ:ácido adípico, BNZ:caféina, BNZ:sacarina, BNZ:nicotinamida, BNZ:ácido cítrico, BNZ:ácido glutárico não ocorreu a formação de um novo cristal, porém houve um nível de interação que podemos classificar como mistura eutética. Uma vez que, misturas eutéticas podem ser definidas como mistura de dois ou mais compostos que são normalmente sólidos à temperatura ambiente, mas, quando combinados formam ligações não-covalentes a uma razão molar específica, apresenta uma significativa redução no ponto de fusão (CHERUKUVADA e ROW, 2014). No caso de COMAL, COSUC, COFUM e COOX, novos sistemas cristalinos foram formados.

Figura 38: Comparação-resumo das curvas DSC dos novos materiais cristalinos contendo BNZ obtidos durante a triagem.



Os materiais apresentando diferença por DRXP e DSC foram submetidos à análise no IV, a qual permitiu observar diferenças significativas entre os materiais de partidas e produtos, conforme resumido na Tabela 19. A banda relativa ao N-H da amida primária sofreu um grande deslocamento, em torno de  $30\text{ cm}^{-1}$  para COOX e COSUC, e em torno de  $40\text{ cm}^{-1}$  para COMAL. As frequências de absorção no IV para COFUM não são representativas do comportamento do cocrystal, visto que a amostra apresentava impurezas e as bandas de absorção dos materiais de partida se sobrepuseram às da nova fase.

Tabela 19- Resumo das bandas de absorção IV dos produtos de cocrystalização de BNZ.

Composto	Absorção IV ( $\text{cm}^{-1}$ )			
	N-H (amida 1°)	C-H (imidazol)		C=O (amida 1°)
<b>BNZMP</b>	3269	3130	3113	1658
<b>COMAL</b>	3308	3136	3121	1668
<b>COOX</b>	3299	3173	3130	1669
<b>COSUC</b>	3299	3132	3111	1671
<b>COFUM</b>	3273	3130	3113	1661
<b>Ác glutárico:BNZ</b>	3273	3130	3113	1660
<b>Cafeína:BNZ</b>	3271	3131	3114	1657
<b>Nicotinamida:BNZ</b>	3270	3131	3114	1659
<b>Sacarina:BNZ</b>	3271	3130	3113	1659
<b>Ác.cítrico:BNZ</b>	3270	3130	3113	1659

O aumento nas frequências das bandas, denominado efeito hipsocrômico ou *blue-shift*, é um indicativo de que interações intermoleculares brandas foram formadas ou modificações muito sutis foram estabelecidas nestes grupos. Deslocamentos hipsocrômicos no IV são característicos de interações via ligação de hidrogênio, enquanto que a formação de ligação iônica apresenta deslocamento batocrômico (*red-shift*) na frequência IV. Como em nenhum dos novos materiais cristalinos obtidos não houve efeito batocrômico, pode-se caracterizar estes materiais como cocrystalos (OLIVEIRA e ARAÚJO, 2012).

O mesmo efeito hipsocrômico pode ser observado para as bandas relativas às carbonilas da amida primária de BNZ, que aumentaram de frequência em torno de  $10\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que as interações



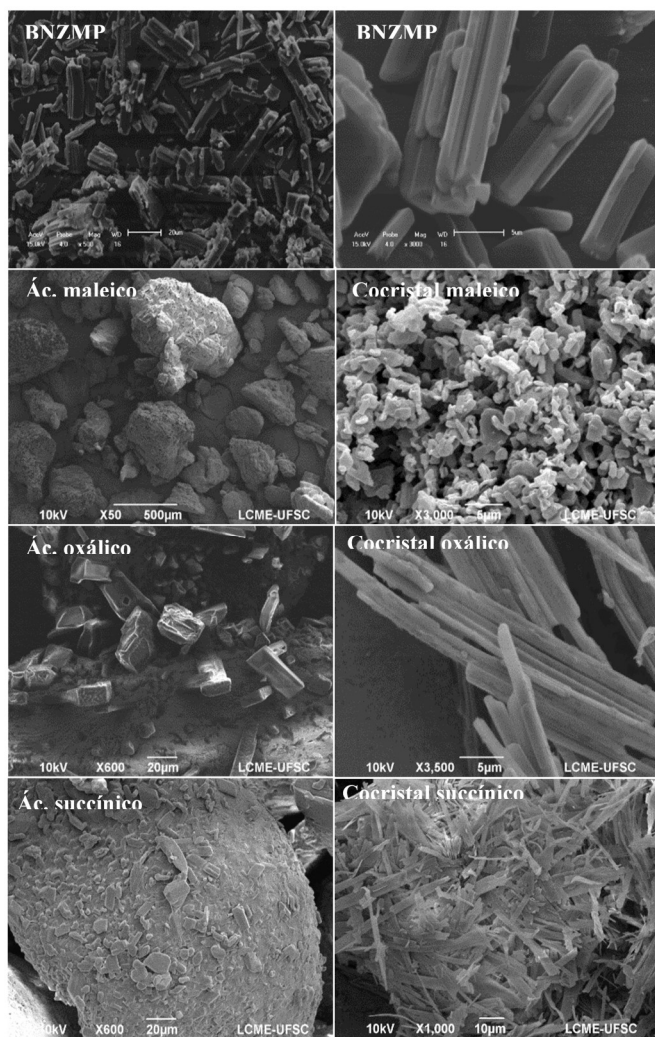
intermoleculares nos cocristais formados pode ser semelhante ao BNZ. As variações nas bandas C-H do grupo imidazol de BNZ, indicam que este pode ser o ponto de interação entre o *coformer* e a molécula do fármaco. A intensidade destas variações pode estar ligada à estrutura e geometria das moléculas do *coformer* e à magnitude das modificações nas novas estruturas formadas.

As bandas relativas aos produtos com ácido glutárico, ácido cítrico, cafeína, nicotinamida e sacarina não variaram além de  $4\text{ cm}^{-1}$ , o que pode indicar que houveram interações não-covalentes fracas, o que pode ser sugestivo da formação de misturas eutéticas (tabela 19). Os espectros dos produtos de reação com os *coformers* não listados na tabela, não apresentaram nenhuma alteração quando comparados aos espectros dos materiais de partida. Comparação detalhada dos espectros para cada sistema estudado estão disponíveis no APÊNDICE B, Figura 2.

Com relação ao aspecto dos novos materiais cristalinos de BNZ, as amostras obtidas com ácido maleico se apresentam como um pó fino, enquanto que as amostras com ácido oxálico e o cocrystal com ácido succínico apresentam-se com grânulos volumosos. Em específico, o cocrystal de ácido succínico assemelha-se a lã de vidro.

As fotomicrografias eletrônicas de BNZMP, dos *coformers* e de seus respectivos cocristais, demonstram as diferenças de morfologia dos materiais (Figura 39). Em sua maioria, os cocristais contendo BNZ apresentaram hábito cristalino variável entre acicular e laminar, entretanto o aspecto das partículas apresentou modificações de acordo com o método de síntese. O material BNZ: ácido maleico sintetizado por LAG possui partículas menores em relação aos demais materiais devido ao efeito da moagem. As demais amostras sintetizadas pelo método de reação formaram partículas maiores. Neste caso, os materiais obtidos com ácido oxálico têm o formato de agulha e se empilham facilmente. No cocrystal de ácido succínico, observam-se partículas laminares e aglomeração na amostra, mesmo após a tamisação em peneira granulométrica (16 mesh). Esta característica geral das partículas pode contribuir para a orientação preferencial observada nas análises de difração.

Figura 39: Fotomicrografias dos novos materiais cristalinos obtidos e dos materiais de partida.



### 3.2.2 Análise da estrutura do cocrystal com ácido succínico (COSUC)

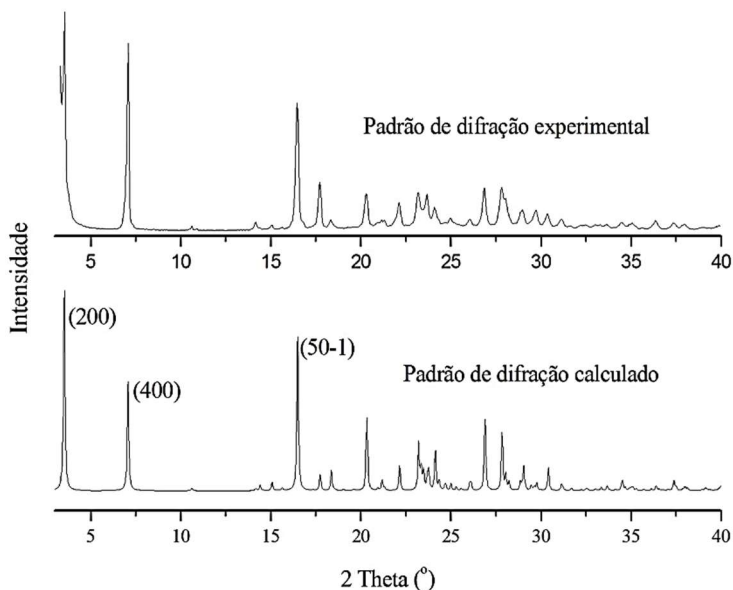
A estrutura do cocrystal de BNZ com ácido succínico foi resolvida através de dados de difração de raios-X de material policristalino utilizando ferramentas computacionais específicas (“*Simulated-Annealing*” e refinamento Rietveld). Os parâmetros de cela da estrutura resolvida encontram-se descritos na Tabela 20. A referida estrutura corresponde ao primeiro cocrystal de BNZ reportado na literatura.

Tabela 20- Parâmetros de cela e informações cristalográficas da estrutura do cocrystal de BNZ com ácido succínico (COSUC) resolvida.

Dados cristalográficos	Cocrystal COSUC
Fórmula molecular	$C_{12}H_{12}N_4O_3 \cdot 0,5 C_4H_6O_4$
Massa molar (g.mol <sup>-1</sup> )	319,29
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> /n (Monoclínico)
a (Å)	50,059
b (Å)	4,855
c (Å)	6,161
β (°)	92,198
V (Å <sup>3</sup> )	1494,84

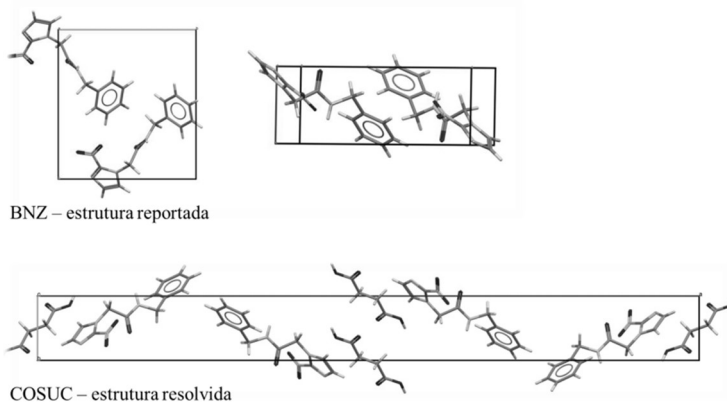
A comparação do padrão de difração calculado após a resolução e padrão de difração obtido experimentalmente pode ser verificada na Figura 40. Observa-se que a posição dos picos foi coincidente em ambos os difratogramas e não se constatou nenhum pico adicional na amostra, apenas orientação preferencial. Destaca-se na respectiva Figura os planos referentes às três reflexões mais intensas do padrão de difração calculado.

Figura 40: Comparação dos padrões de difração calculado e experimental do cocristal de BNZ com ácido succínico (COSUC).



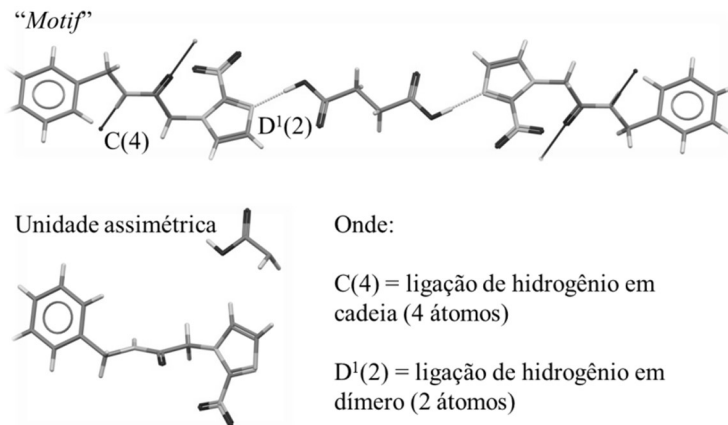
A Figura 41 representa uma comparação esquemática das células unitárias de fármaco e do cocristal. Embora se perceba que suas dimensões variam consideravelmente, o modo como as cadeias de BNZ se organizam na rede cristalina do cocristal é essencialmente o mesmo. O tamanho das ligações de hidrogênio  $N-H \cdots O=C$  não apresenta modificação significativa no cocristal (diferença de  $0,05 \text{ \AA}$ ). A geometria destas ligações e também a coplanaridade do anel aromático e o grupo imidazol via *stacking* é muito semelhante, o que corrobora com os resultados de caracterização no estado sólido.

Figura 41: Comparação das células unitárias de BNZ e COSUC.



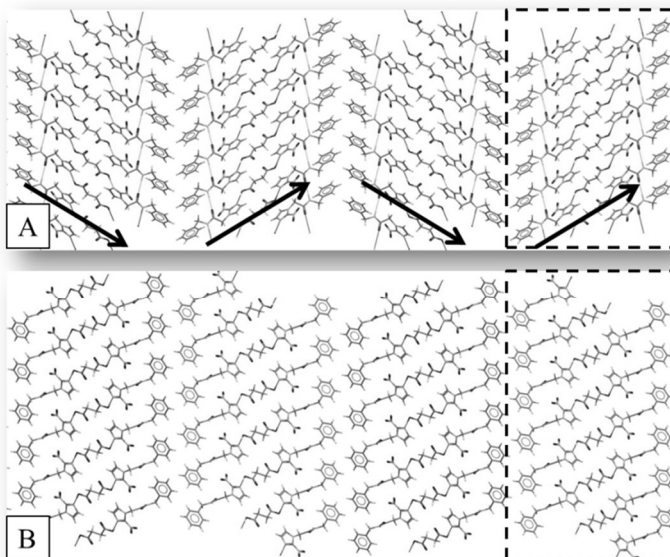
No cocrystal, as moléculas de BNZ demonstraram estar organizadas em cadeia via interações de hidrogênio amida-amida do tipo C(4), conforme se verifica na estrutura do fármaco puro. Entretanto, no cocrystal, as moléculas do *coformer* se intercalam perpendicularmente com cadeias de moléculas do fármaco via ligação de hidrogênio D(2) entre os grupos carboxílicos do *coformer* e a amina do grupo imidazol de BNZ. Já no caso das moléculas de ácido succínico, não foram observadas interações entre as mesmas. Este conjunto formado por BNZ-*coformer*-BNZ compreende o *motif* da estrutura, ou seja, compreende as estruturas supramoleculares que se repetem tridimensionalmente e, via operações de simetria, são capazes de formar a rede cristalina do COSUC (Figura 42).

Figura 42: Interações supramoleculares observadas em COSUC, destacando-se sua unidade assimétrica.



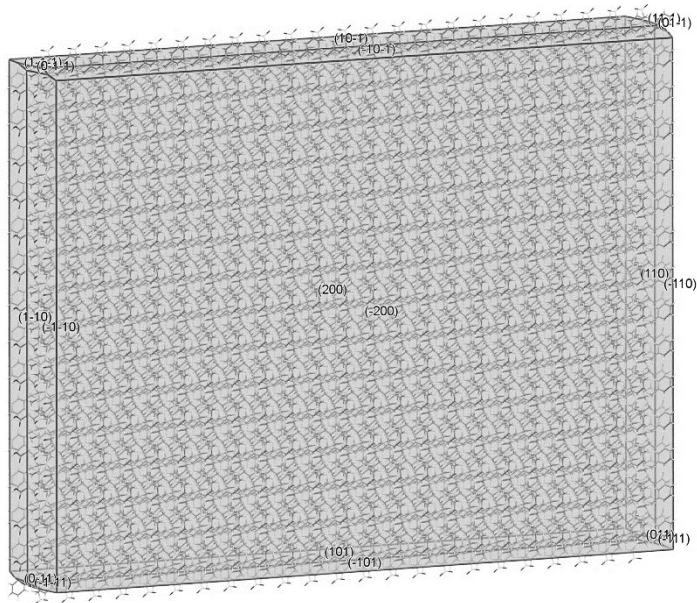
A estrutura resolvida e refinada demonstrou um eixo medindo aproximadamente 50 Å, fato que não é muito comumente visualizado nestes tipos de materiais. Esta super-cela é justificada pela organização linear BNZ-*coformer*-BNZ e pela simetria da estrutura. Conforme se verifica na Figura 10, os “motifs” BNZ-*coformer*-BNZ se agrupam e formam domínios ao longo das ligações de hidrogênio C(4). Esses domínios são subsequentemente relacionados com outros domínios via planos de espelhamento, em outras palavras, domínios vizinhos são relacionados via *twining*. Este fenômeno de geminação é intrínseco à estrutura resolvida e confere o aspecto de zig-zag observado na organização das moléculas ao longo do eixo principal da cela (super-eixo). Perpendicular a este eixo e separando estes domínios, observam-se planos de deslizamento contendo a porção aromática das moléculas de BNZ (Figura 43).

Figura 43: Empacotamento das moléculas observado em COSUC, destacando-se os domínios BNZ-*coformer*-BNZ e a orientação dos “*motifs*” em zig-zag. “A” representa o plano ao longo das ligações de hidrogênio amida-amida; “B” representa o plano perpendicular às ligações de hidrogênio amida-amida.



Estes planos de deslizamento (400) são paralelos aos planos contendo a parte central das moléculas de *coformer* (200). Tendo em vista o tamanho do eixo *a* de COSUC, as reflexões relativas a estes planos estão localizadas em baixo ângulo (Figura 44). Pela observação de orientação preferencial nestes picos, a morfologia das partículas por microscopia e o cálculo do hábito cristalino teórico para COSUC, acredita-se que estes planos compreendam as faces predominantes nos cristais deste material.

Figura 44: Morfologia calculada para COSUC, gerado pelo programa Mercury 3.5 (plataforma CSD), método *Bravais-Friedel-Donnay-Harker*.

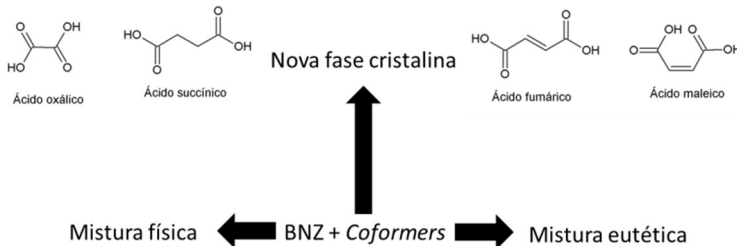


### 3.2.3 Tendência de cocristalização de BNZ

Em geral, a tendência de cocristalização de BNZ no screening conduzido, demonstrou-se positiva para coformers menores e contendo grupamentos dicarboxílicos, em especial ácidos lineares não substituídos (Figura 45). Embora ainda seja necessário isolar o cocristal formado com ácido fumárico e resolver a estrutura dos cocristais com ácidos oxálico, fumárico e maleico, algum esclarecimento a respeito desta tendência de cocristalização pode ser obtido a partir da análise de COSUC. A estrutura resolvida do cocristal de BNZ com ácido succínico permite inferir que coformers com substituintes não teriam espaço para se acomodar no látice de um cocristal estruturalmente semelhante. Além deste efeito estérico, coformers menores são também mais favoráveis à cocristalização por permitirem a formação de estruturas mais densas e mais estáveis.



Figura 45: Esquema-resumo dos resultados obtidos durante *screening* de cocristais contendo BNZ.



A série de coformers formada pelos ácidos propiônico, oxálico, malônico, succínico, glutárico e adípico demonstra que o tamanho da cadeia carbônica do *coformer* influencia na cocristalização. Observou-se no caso de BNZ que ácidos de cadeias alifáticas pares (ácido oxálico, ácido succínico, fumárico e maleico) são favoráveis à cocristalizar. Este fenômeno é chamado de “Efeito par-ímpar” e está relacionado com a conformação das moléculas de ácidos dicarboxílicos (ângulo de torção intramolecular  $O = C \cdots C = O$ ) (DUTKIEWICZ, DUTKIEWICZ e KUBICKI, 2015). Em compostos alifáticos pares, este ângulo está próximo de  $180^\circ$  (o que pode ser observado na estrutura resolvida de COSUC), enquanto que para compostos alifáticos ímpares varia entre  $8^\circ$  e  $88^\circ$ . Desta forma, os grupos COOH terminais estão planares e mais estáveis nos diácidos de cadeia alifática par, o que pode ter contribuído para sua interação com BNZ (EDWARDS, JONES e MOTHERWELL, 2002).

É importante destacar também o caso do ácido fumárico, que independentemente de possuir um número par de  $CH_2$ , não reagiu completamente com BNZ. Da mesma maneira, sugere-se que a conformação da molécula tenha impactado neste comportamento, visto a presença da dupla ligação no ácido fumárico (configuração *trans*). Já as moléculas de ácido maleico também apresentam o mesmo número par de átomos de carbono e uma dupla ligação na cadeia alifática, entretanto possuem a configuração *cis*. É necessário obter as estruturas destes novos materiais para entender e comparar a organização supramolecular na rede cristalina dos cocristais. Porém, pode-se inferir com as presentes análises que o posicionamento dos grupos COOH no mesmo plano, parece ter

facilitado a cocristalização com o fármaco (SCOTT, HACHIKEN e TANAKA, 2008).

A série de coformers formada por ácido málico, ácido aspártico, ácido glutâmico e ácido cítrico demonstram que substituições nas cadeias dos ácidos dicarboxílicos contribuem negativamente para a cocristalização com BNZ. Da mesma forma, o resultado da triagem com moléculas contendo heterosynthons e substituintes na cadeia alifática (asparagina, cisteína, lisina, glutamina e uréia), o que reforça que ácidos dicarboxílicos lineares e não substituídos são mais favoráveis à interação fármaco: *coformer*.

Como foi sugerido anteriormente, propõe-se que a interação BNZ: BNZ via ligações de hidrogênio entre os grupamentos amida associada ao *stacking* de moléculas paralelas não centralizadas, seja muito estável no fármaco puro. Assim, os *coformers* cíclicos volumosos de cafeína, nicotinamida, sacarina e fenazina, não foram capazes de estabelecer interações de van der Waals mais favoráveis que as observadas no fármaco (BHATTACHARYA, SARASWATULA e SAHA, 2013).

O método de síntese utilizado também pode ter influenciado nos resultados da cocristalização. Os cocristais COSUC e COOX se formam tanto por LAG quanto pelo método de reação, enquanto que COMAL e COFUM somente foram obtidos por LAG. Os dois métodos diferem entre si principalmente no tipo de energia aplicada no sistema. Os efeitos cinéticos que podem estar associados na mecanoquímica (LAG) incluem a difusão das moléculas pela fase de vapor, a formação de fase eutética líquida e a passagem por uma fase amorfa intermediária. O processo de moagem fornece energia que promove desordem na rede cristalina com quebra de interações supramoleculares, e a posterior formação de novos materiais. No método de reação, a cocristalização está diretamente relacionada à solubilidade dos componentes. A partir de uma solução saturada de *coformer*, a adição de fármaco promove um deslocamento do equilíbrio da reação para a formação de produtos, ou seja, de cocristais. Esse efeito é visualizado claramente pela formação de precipitado decorrente da diminuição da solubilidade do cocristal com incremento da concentração de fármaco em solução (RODRIGUEZ-HORNEDO, NEHRU, *et al.*, 2006). Os processos de cocristalização estão relacionados à mobilidade molecular e complementaridade dos componentes da reação. Desta forma, cada método de síntese fornece diferentes ambientes de reação e conseqüentemente diferentes produtos (JAYASANKAR, SOMWANGTHANAROJ, *et al.*, 2006).

Além dos cocristais, também foram obtidas misturas eutéticas contendo BNZ com ácido glutárico, ácido cítrico, sacarina, cafeína e nicotinamida. Misturas eutéticas podem ser definidas como mistura de dois ou mais compostos que são normalmente sólidos à temperatura ambiente, e, quando combinados, formam ligações não-covalentes a uma razão molar específica e apresentam uma significativa redução no ponto de fusão. Alguns trabalhos na literatura sugerem que a força termodinâmica predominante das interações supramoleculares define se será formado um cocrystal ou uma mistura eutética (CHERUKUVADA e ROW, 2014).

As tendências de formação de cocristais ou misturas eutéticas seria governada pela topografia das moléculas dos reagentes. No caso dos cocristais, as moléculas devem possuir grupos funcionais capazes de formar ligações não covalentes eficazes, e o seu tamanho e forma devem ser compatíveis ao empacotamento cristalino. Para misturas eutéticas, este empacotamento encontra-se desfavorável (STOLER e WARNER, 2015).

### 3.3 DOSEAMENTO DO CONTEÚDO DE BNZ NOS MATERIAIS CRISTALINOS

O doseamento dos materiais permitiu avaliar a quantidade de fármaco em relação ao *coformer*. Para o correto estabelecimento das proporções dos componentes, foram utilizados cálculos estequiométricos feitos a partir da massa de BNZ A quantificada. As massas de fármaco observadas foram de: 3,38 (DPR = 1,82%) para coox, 3,44 (DPR = 1,32%) para cosuc e de 4,09 (DPR = 0,41%) para comal. Os cálculos resultaram na proporção BNZ: *coformer* 2:1 (n:n) para os cocristais de ácido maleico, enquanto os produtos obtidos a partir do método da reação tinham 1:1 (n:n) para ácido oxálico e succínico.

### 3.4 SOLUBILIDADE DOS COCRISTAIS DE BNZ

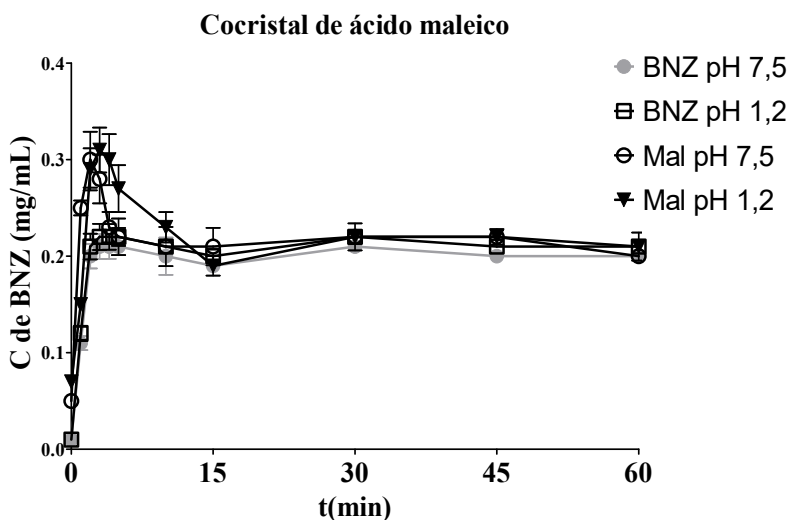
A solubilidade em meio ácido e básico foi avaliada pelo ensaio de solubilidade de equilíbrio (Figura 46). Apenas as amostras consideradas puras foram avaliadas neste ensaio (COMAL, COSUCC e COOX). Foi possível observar a presença de pó sobrenadante durante todo o ensaio, indicando que a condição de supersaturação e o equilíbrio entre a fase sólida e líquida foi mantida. O pó sobrenadante foi avaliado ao fim do experimento por IV, tendo sido observada a total conversão do material a fármaco. O teste estatístico de ANOVA demonstrou que as médias das curvas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). O teste de multicomparação MANOVA permitiu verificar que um platô foi atingido pelas curvas em 45 minutos e que as concentrações de fármaco quantificado não variaram significativamente ( $p > 0,05$ ) a partir de então. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) só foram observadas nos primeiros minutos de análise, onde se nota uma rápida solubilização do fármaco, e em seguida concentrações menores constantes. Este fenômeno é denominado *spring* e é um comportamento característico de curvas de solubilidade de formas sólidas mais energéticas, como por exemplo, os cocristais. No presente estudo, a cocrystalização forneceu a força motriz para solubilizar BNZ numa concentração superior à sua solubilidade em equilíbrio (GUZMAN, TAWA, *et al.*, 2007).

A avaliação individual das curvas demonstra que a solubilidade de BNZ independe do pH, por se tratar de um fármaco neutro (MAXIMIANO, COSTA, *et al.*, 2010), o mesmo atinge o equilíbrio nos primeiros minutos do experimento. Entretanto, comportamentos diversos puderam ser observados com relação ao efeito *spring* discutido anteriormente. Nos diferentes cocristais, o ápice do efeito *spring* ocorre em momentos diversos para os diferentes pH. Como se tratam de *coformers* com características ácidas, observa-se que as curvas atingem concentrações máximas menores e retornam ao equilíbrio mais rapidamente em meio básico. Este fato pode ser explicado pela rápida dissociação e ionização destes cocristais no meio. A solubilidade dos cocristais pH-dependente está diretamente relacionada com a sua variedade estequiométrica e propriedades de ionização (BETHUNE, HUANG, *et al.*, 2009).

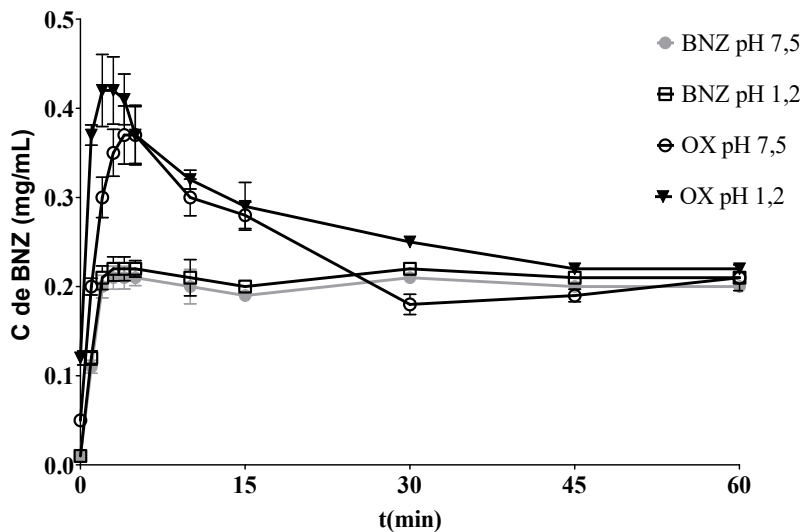
Em meio ácido, verifica-se uma maior estabilidade dos cocristais, que atingem concentrações maiores e demoram mais tempo para retornar ao equilíbrio. A estabilidade dos cocristais, em presença de solvente, pode ser demonstrada pelo tempo que a sobresaturação da solução foi mantida.

Estes valores indicam que se trata de conversão de uma forma metaestável altamente solúvel para outra forma mais estável menos solúvel (ROY, LIPERT e RODRIGUEZ-HORNEDO, 2011). Com relação aos valores das medidas, o cocrystal COMAL se demonstrou menos estável em relação aos demais visto que a conversão total levou 15 min, enquanto que para COSUCC e COOX levou 60 e 45 min, respectivamente.

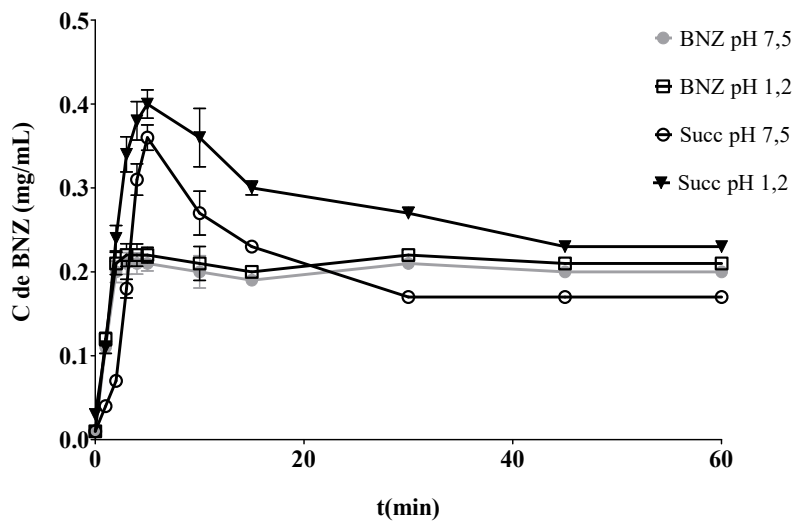
Figura 46: Curvas de solubilidade dos cocrítals de BNZ, solução HCl 0,1 M, pH 1,2 e tampão acetato de amônio, pH 7,5, 150 rpm.



## Cocrystal de ácido oxálico



## Cocrystal de ácido succínico



### 3.5 FOTODEGRADAÇÃO DOS COCRISTAIS DE BNZ

O impacto da cocrystalização na fotodegradação do fármaco foi avaliado. O método de doseamento demonstrou ser específico para quantificação do fármaco na presença dos *coformers*. Os cromatogramas não apresentaram picos adicionais de degradação, embora fosse observada a redução da quantidade de BNZ ao longo do tempo de exposição a luz UV. A recuperação de BNZ após o período de 24 h e 48 h está relatada na Tabela 21. Pode-se observar que BNZMP sofre uma redução em torno de 5% em 24 h e aproximadamente 15% após 48 h de ensaio de fotodegradação. Os cocristais de ácido succínico e maleico conferiram proteção à degradação química do fármaco. Com relação ao cocristal com ácido succínico, após 24 h de ensaio conseguiu-se recuperar em torno de 100% de BNZ enquanto que após período de 48h observou-se degradação de apenas 5,24% do fármaco, frente aos 15,71% de BNZMP. Já o cocristal contendo ácido maleico apresentou níveis de degradação semelhantes aos observados para o fármaco. O cocristal de ácido oxálico pode ter tornado o material mais sensível à fotodegradação, apresentando recuperação de BNZ em torno de 5% menor em comparação a de BNZMP, para ambos os tempos analisados.

Tabela 21- Resultados relativos a % de recuperação de BNZ pós experimentos de fotodegradação.

t(h)	BNZMP <sup>a</sup>	% recuperada de BNZ		
		Cocristal oxálico <sup>a</sup>	Cocristal succínico <sup>a</sup>	Cocristal maleico <sup>a</sup>
24	94,32(±1,80)	90,79(±1,71)	100,09(±1,26)	99,52(±1,41)
48	84,29(±1,96)	79,01(±1,47)	94,75(±1,37)	84,69(±1,65)

<sup>a</sup> Desvio padrão relativo

## 4 CONCLUSÃO

A habilidade de modificar as propriedades físicas de princípios ativos com a formação de novos sólidos cristalinos é uma útil ferramenta para melhoria da biodisponibilidade de alguns fármacos. Os resultados do estudo demonstram que a tendência de cocristalização de BNZ está intimamente ligada a estrutura do *coformer*. Foi desenvolvido uma triagem sistemático para obtenção de novos materiais cristalinos baseados na propensão de interação de BNZ. A formação de novos sólidos cristalinos foi observada com os ácidos dicarboxílicos, planares de cadeia par: fumárico, succínico, maleico e oxálico.2H<sub>2</sub>O. Cocritais de BNZ ainda não foram relatados na literatura, sendo considerada uma importante contribuição a descrição da estrutura cristalina de COSUCC. A resolução das demais estruturas está em andamento, mas estima-se que segue a mesma tendência de COSUCC, 2:1, *mmol: mmol*, fármaco:*coformer*. Os cocritais de BNZ exibiram mudanças positivas nas propriedades físico-químicas do fármaco, como maior estabilidade de luz no caso de COMAL e COSUCC. A avaliação da solubilidade em equilíbrio de COOX, COMAL e COSUCC, permitiu observar que os novos materiais cristalinos formados também aumentaram a concentração de saturação do fármaco. Entretanto, por se tratarem de cocritais metaestáveis, o uso de excipientes pode ser necessário para equilibrar o sistema. Estes estudos serão submetidos a futuras contribuições.



## CAPÍTULO V: POTENCIALIDADE TERAPÊUTICA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE BENZNIDAZOL DESENVOLVIDOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: AVALIAÇÃO *IN VITRO*.

### 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina e, atualmente, é considerada uma doença global em função da migração da populacional (ALVAR, VELEZ, *et al.*, 2012 ) (WHO, 2015). Infecções agudas são geralmente assintomáticas, mas as infecções crônicas por *T. cruzi* têm sido associados com altas taxas de morbidade e mortalidade. Recentemente, a doença de Chagas também tem sido reconhecida como uma doença oportunista em indivíduos infectados pelo HIV (FERREIRA, SALOMÃO, *et al.*, 2011).

A quimioterapia disponível para o tratamento da doença de Chagas inclui o agente nitro heterocíclico, benznidazol (BNZ), que é eficaz no tratamento da infecção aguda, mas mostra fraca atividade na fase crônica, com efeitos colaterais graves e eficácia limitada. Como também observado em outras doenças negligenciadas, fármacos para a doença de Chagas não são de interesse para as indústrias farmacêuticas. Estas desvantagens justificam a necessidade urgente de desenvolvimento de medicamentos que reúnam características como eficácia nas fases aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*, baixa toxicidade e menor custo de produção (CARDOSO, SALOMÃO, *et al.*, 2015).

O desenvolvimento racional de medicamentos depende da identificação de diferenças no metabolismo humano e do parasito (DOCAMPO, 2001). O planejamento de novos tratamentos deve ser feito com ênfase no mecanismo de ação, atingindo alvos específicos e essenciais dos parasitos por meio do conhecimento bioquímico, molecular, fisiológico e o entendimento do ciclo de vida dos parasitos no homem (SOEIRO, DANTAS, *et al.*, 2009). O presente capítulo apresenta o estudo *in vitro* dos sistemas de liberação de Benznidazol obtidos frente ao protozoário *T. cruzi*.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 PREPARO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE BNZ

Foram testados os sistemas binários comoídeos contendo fármaco: polímero (EPO ou PVPVA) produzidos conforme descrito no capítulo III e também os cocristais contendo ácido maleico, fumárico e succínico produzidos de acordo com o capítulo IV.

### 2.2 TRIAGEM DOS COMPOSTOS FRENTE A FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *T. CRUZI* EXPRESSANDO BETA-GALACTOSIDASE NA LINHAGEM CELULAR THP-1.

#### 2.2.1 Cultivo de células e indução da diferenciação de células THP-1

As células THP-1, linhagem de leucemia monocítica humana aguda (TSUCHIYA, YAMABE, *et al.*, 1980) foram obtidas no criobanco do Laboratório de Protozoologia da UFSC. O cultivo das células foi feito em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup>, contendo 12 ml de RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis), sem vermelho de fenol, pH 7,4, suplementado com 10% (v/v) de SBF, 12,5 mM de tampão HEPES (GIBCO, BRL), 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina (GIBCO, BRL), 2 mM de Glutamax<sup>®</sup> (GIBCO, BRL) 1mM de Piruvato de Sódio (GIBCO, BRL) em incubadora a 37°C e atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>.

Foram feitos repiques no 3º ou 4º dia de crescimento das células e estas foram reinoculadas a uma densidade de 3x10<sup>5</sup>/ml, para manutenção da linhagem. O número de células viáveis foi determinado pelo teste de exclusão do azul de trypan (0,02%), após lavagem em PBS e quantificado em Câmara de Neubauer. A concentração de células foi ajustada pela adição de meio RPMI suplementado, conforme descrito anteriormente. Foram utilizadas células com no máximo 15 passagens para realização dos experimentos. As linhagens celulares murinas semelhantes a macrófagos (RAW 264.7 e J774.G8) foram submetidas ao mesmo tratamento da linhagem THP-1 e, por ser aderente, o tapete celular foi raspado com auxílio de um *cell scraper* duas vezes por semana para o repique. As células THP-1 coletadas no 3º ou 4º dia de crescimento foram

induzidas à diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos (SCHWENDE, FITZKE, *et al.*, 1996). Para tanto, as células foram cultivadas em microplacas de 96 poços,  $3 \times 10^4$  células/poço em 200  $\mu$ l de meio RPMI suplementado, acrescido de 100  $\mu$ g/ml de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 72 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As mesmas condições foram utilizadas para diferenciação, em garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> ( $6 \times 10^6$  células/garrafa), volume de 12 ml ou em *Chamber Slides* ( $10^5$ /poço em 300 $\mu$ L).

### 2.2.2 Infecção das células THP-1 com *T. cruzi*

A cepa Tulahuén de *T. cruzi* expressando  $\beta$ -galactosidase, (BUCKNER, VERLINDE, *et al.*, 1996) foi fornecida pelo Laboratório de Parasitologia Molecular e Celular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte. Formas tripomastigotas do parasito foram obtidas a partir de células L929 infectadas e utilizadas para infecção das células THP-1 diferenciadas ( $4.0 \times 10^4$  células/poço), em microplacas de 96 poços, numa proporção de parasita/célula de 3:1. As microplacas foram incubadas por 12 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio contendo parasitas não internalizados foi removido e substituído com 180  $\mu$ l de meio fresco. Após 24 horas, as monocamadas de células infectadas foram tratadas com 20  $\mu$ l de cada amostra em diferentes diluições (50 a 3,12  $\mu$ M), em triplicata, seguida de incubação por 72 horas à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tratamento, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas durante 16 h a 37 °C com 250  $\mu$ l de clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosideo-CPRG (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), em 100 $\mu$ M de Nonidet P-40 (Amresco Inc, Solon, Ohio, EUA) (NP-40) 0,1%. A seguir, a densidade óptica (D.O.) foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas TECAN<sup>®</sup>, Modelo Infinite M2000. Os valores de CI<sub>50</sub> de cada amostra foram estimados a partir dos valores médios obtidos de três réplicas, por interpolação gráfica utilizando o programa GraphPad Prism 5.03<sup>®</sup> (San Diego, USA). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

A concentração de cada amostra que reduziu a viabilidade do parasita em 50% quando comparado com controle não tratado (CI<sub>50</sub>) foi calculada por regressão não-linear de concentração resposta curvas.

Como controles positivo e negativo foram utilizados BNZ (Padrão) nas concentrações, 50, 20, 5 e 1  $\mu\text{M}$  e DMSO (1%), respectivamente.

### 2.2.3 Ensaio de citotoxicidade

A viabilidade celular foi determinada através da técnica do MTT (SIEUWERTS, KLIJN, *et al.*, 1985). A técnica consiste na incorporação da substância hidrossolúvel brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) por células viáveis, que através da ação de desidrogenases mitocondriais reduzem o composto, formando o sal de formazan insolúvel, que se deposita no citoplasma com coloração roxa (VAN DE LOOSDRECHT, NENNIE, *et al.*, 1991). A quantidade do sal é diretamente proporcional ao número de células viáveis. As células foram coletadas e quantificadas conforme o item 2.2.1. As células foram semeadas em placas de 96 poços ( $4 \times 10^4$  células/poço) em 180  $\mu\text{L}$  de RPMI suplementado. As amostras dos sistemas de liberação de BNZ e excipientes foram solubilizadas em DMSO e diluídas em série (500 a 15,6  $\mu\text{M}$ ).

Como controles positivo e negativo foram utilizados BNZ nas concentrações, 500, 20, 5 e 1  $\mu\text{M}$  e DMSO (1%), respectivamente. Em seguida, 20  $\mu\text{l}$  das amostras, nas concentrações supracitadas, foram adicionadas a cultura celular e cultivadas por 72 horas a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . As microplacas foram centrifugadas (2.700xg/10 minutos) e o sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspendido em 50  $\mu\text{l}$  de uma solução de MTT-3 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis). Na sequência, as microplacas foram incubadas a 37°C, no escuro por 4 horas e centrifugadas (2.700xg/10 minutos). O sobrenadante foi retirado e o sedimento (sal de formazan) solubilizado em DMSO. A  $\text{CC}_{50}$  das amostras foi calculada pelo modelo de regressão não linear das curvas concentração-resposta com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.03® (San Diego, USA). O percentual de inibição (P.I.) foi determinado conforme para concentração 500  $\mu\text{M}$  (Equação 22). A densidade óptica foi determinada a 540 nm em equipamento Tecan® modelo Infinite M200.

$$PI = \left( 1 - \frac{D.O_{\text{composto}} - D.O_{\text{branco -composto}}}{D.O_{\text{controle negativo}} - D.O_{\text{branco -contr ole negativo}}} \right) \times 100$$

(22)

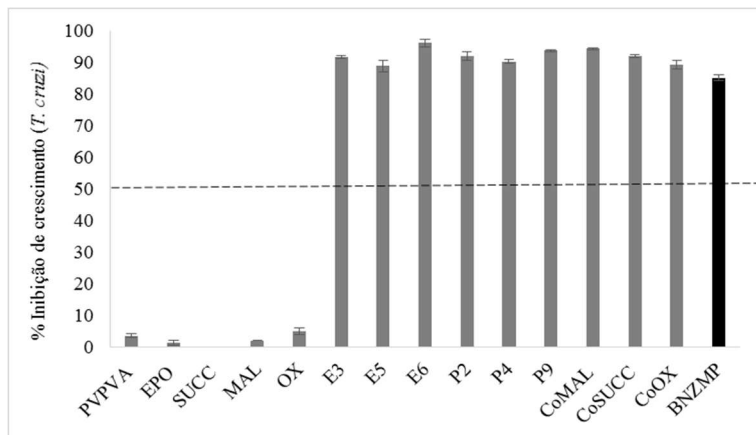
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 APLICAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE BNZ E EXCIPIENTES.

As amostras foram preparadas para uma avaliação inicial quanto a sua atividade tripanocida, de forma a garantir a concentração de 50  $\mu\text{M}$  de BNZ. Para tal, os sistemas de liberação de BNZ foram pesados cuidadosamente para que mantivessem proporção fármaco: excipiente contidas nos produtos. Os excipientes também foram pesados individualmente com massa proporcional, para observar o seu impacto isolado na resposta. O gráfico (Figura 47) mostra a percentagem de inibição de crescimento de *T. cruzi* frente as diferentes formulações do BNZ.

Os excipientes apresentaram inibição do crescimento do parasito inferior a 5%, e os produtos analisados apresentaram taxas de inibição entre 88 e 96%, semelhante ao padrão do fármaco (BNZMP) em torno de 85%. Todos os produtos apresentaram a atividade tripanocida superior à de BNZ, em maior ou menor grau. Destacam-se E6 e COMAL, com resultados aprimorados em torno de 10%. A quantidade de polímero pareceu influenciar nas formulações contendo EPO, uma vez que E6 foi mais efetivo e possui uma maior quantidade de polímero em relação a E3 e E5, que apresentam quantidades iguais. A mesma correlação não pode ser observada para as formulações contendo PVPVA, uma vez que está apresentou resultados muito próximos entre 90 e 93%, independente das proporções fármaco: polímero. Entre os cocristais COMAL foi o que obteve melhor desempenho (94%), mas vale ressaltar que a atividade de COSUCC e COOX superou a atividade do fármaco em torno de 5%.

Figura 47: Atividade tripanocida dos sistemas de liberação de BNZ (50  $\mu\text{M}$ ) e de seus excipientes sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi* pelo método colorimétrico



Ainda não foram descritos cocristais com atividade contra doenças parasitárias. Embora não tenham sido realizados estudos para verificar o mecanismo de ação dos produtos testados, é possível supor que as diferenças de captação e/ou metabolização das membranas celulares do parasito e da célula hospedeira, podem estar envolvidos na biodisponibilidade destes produtos nos modelos *in vitro* e, conseqüentemente, interferindo de forma sinérgica na melhoria da atividade biológica do fármaco. O efeito sinérgico pode melhorar eficiência do tratamento da doença de Chagas, promovendo a redução de dose, de duração de tratamento, de efeitos colaterais e de resistência do parasito ao fármaco. Os produtos podem ter contribuído para melhoria do acesso do fármaco no citoplasma, onde o parasita geralmente reside, burlando o arsenal bioquímico e molecular do parasito (EDWARDS e KRISHNA, 2004). A morte parasitária pode também ter sido mediada pela desestabilização da sua membrana plasmática comprometendo maquinaria do parasito (DATE, JOSHI e PATRAVALE, 2007). Esta desestabilização pode ser relacionada à característica tensoativa do polímero PVPVA, por exemplo, que altera a fluidez da membrana e promove a perda de conteúdo vital para o parasito. Os testes *in vivo* que estão em andamento serão fundamentais para o esclarecimento da farmacocinética e mecanismo de ação destes produtos.

Para detecção de um possível efeito tóxico inespecífico, que afetasse tanto os parasitos e as células, foram calculados a  $CI_{50}$  contra *T. cruzi* e a atividade citotóxica sobre células THP-1 não infectadas ( $CC_{50}$ ). Conforme demonstrado na tabela 22, todos os produtos testados foram ativos, com  $CI_{50}$  variando entre 2,02 e 2,65  $\mu\text{M}$ , foram cerca de 5 vezes menores do que o fármaco referência BNZMP ( $CI_{50} = 10,18 \mu\text{M}$ ). Os resultados relativos à  $CI_{50}$  dos produtos, indicam que os excipientes contribuem positivamente para a atividade tripanocida do fármaco. Como critérios de avaliação da atividade tripanocida foram utilizados como valores mínimos:  $IC_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$  e índices de seletividade (IS)  $> 50$  (NWAKA e HUDSON, 2006) e (ROMANHA, CASTRO, *et al.*, 2010).

Com exceção das formulações contendo EPO, todos os resultados de  $CC_{50}$  foram superiores a 500  $\mu\text{M}$ , o que pode ser relacionado à baixa citotoxicidade destas amostras (tabela 22 e 23). As formulações contendo EPO apresentaram resultados entre 215,40 e 308,60  $\mu\text{M}$ , podendo indicar a contribuição deste excipiente para citotoxicidade da formulação. Apesar das formulações contendo EPO apresentarem uma maior citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) e, que o excipiente isolado em torno de inibiu em torno de 44,17 % o crescimento das células TPH-1, estas formulações apresentaram IS entre 106,63 e 152,56, que são no mínimo o dobro observado para o fármaco referência. A contribuição atividade tripanocida de EPO pode estar relacionada às características catiônicas do polímero que promoveria a sua ligação a membrana plasmática do *T. cruzi*, que possui carga negativa, gerada pela exposição de grupos sulfato, carboxil (ácido siálico) e fosfato, expostos na superfície celular. As formulações contendo PVPVA apresentaram IS entre 217,39 e 238,10 superando em mais de 4 vezes os resultados de BNZMP. Os cocristais também apresentaram excelentes IS de 202,43 para CoMal, 232,51 para CoOX e 191,57 para CoSucc, resultados que podem indicar uma grande seletividade destes produtos. Os resultados foram considerados significantes quando analisados por ANOVA e pelo teste de Tukey com valores de  $p < 0,05$ .

Ainda não foram descritos cocristais para tratamento de doenças parasitárias, os mecanismos pelos quais estes sistemas promovem o aumento da seletividade pode estar ligado como aumento da entrada de BNZ no meio intracelular facilitando a sua ação sobre o parasito. Altos IS são indicativos da maior especificidade das formulações contra o parasito, sendo o aumento da seletividade é um dos maiores objetivos para tratamentos tóxicos. A natureza de disseminação da doença de Chagas no, com a presença de parasitos nas membranas das mucosas, músculo cardíaco, esquelético e liso, e células da glia, requer fármacos com

elevado volume de distribuição (Vd), um longo tempo de meia-vida e alta seletividade pelo parasito. BNZ apresenta um alto Vd, mas o seu acesso prejudicado aos alvos intracelulares resulta em altas concentrações plasmáticas (ROMERO e MORILLA, 2010).

O direcionamento dos sistemas de administração de fármacos, no caso de doenças causadas por parasitos intracelulares obrigatórios, aumenta a atividade e diminui a toxicidade do tratamento, pois podem incrementar a biodisponibilidade destes no meio intracelular e particularmente no vacúolo parasitóforo (BASU e LALA, 2009).

Tabela 22 - Atividade dos sistemas de liberação de BNZ sobre amastigotas de *T. cruzi* expressando  $\beta$ -gal (método colorimétrico) e citotoxicidade para células THP-1.

<b>Amostra[50<math>\mu</math>M]</b>	<b>CC<sub>50</sub> [<math>\mu</math>M]<sup>a</sup></b>	<b>CI<sub>50</sub> [<math>\mu</math>M]<sup>a</sup></b>	<b>IS<sup>b</sup></b>
<b>E3</b>	215,4 $\pm$ 11,1	2,02 $\pm$ 0,08	106,63
<b>E5</b>	321,9 $\pm$ 18,8	2,11 $\pm$ 0,05	152,56
<b>E6</b>	308,6 $\pm$ 37,9	2,23 $\pm$ 0,09	138,39
<b>P2</b>	>500	2,10 $\pm$ 0,04	238,10
<b>P4</b>	>500	2,19 $\pm$ 0,1	228,31
<b>P9</b>	>500	2,30 $\pm$ 0,22	217,39
<b>CoMAL</b>	>500	2,47 $\pm$ 0,35	202,43
<b>CoSUCC</b>	>500	2,61 $\pm$ 0,16	191,57
<b>CoOX</b>	>500	2,15 $\pm$ 0,1	232,56
<b>BNZMP</b>	>500	10,18 $\pm$ 0,3	49,12

<sup>a</sup>Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

<sup>b</sup>Índice de Seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>)

Tabela 23- Citotoxicidade dos excipientes sobre células THP-1.

<b>Amostra<sup>a</sup></b>	<b>% Inibição de crescimento das células THP-1<sup>b</sup></b>
PVPVA (13 mg)	17,39 $\pm$ 1,85
EPO (13 mg)	44,17 $\pm$ 1,14
SUCC (3,1 mg)	Sem atividade
MAL (2,8 mg)	17,89 $\pm$ 0,84
OX (2,8 mg)	9,47 $\pm$ 4,80

<sup>a</sup>Massa pesada dos excipientes de acordo com a proporção nos sistemas de liberação de BNZ (500  $\mu$ M).

<sup>b</sup>Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos realizados em triplicata.



## 4 CONCLUSÃO

Consideráveis avanços foram feitos no entendimento da biologia do *T. cruzi* nas últimas décadas, mas a doença de Chagas ainda está longe de ser completamente erradicada. Os principais obstáculos a serem transpostos estão relacionados à grande capacidade do *T. cruzi* na invasão e manipulação do sistema de defesa humano. Portanto, grandes desafios em relação à produção de vacinas efetivas e desenvolvimento de quimioterapias que perfaçam a resistência do parasito, são enfrentados. Os produtos obtidos neste trabalho se demonstraram promissores para o tratamento da doença de Chagas experimental. A redução da concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) e aumento do índice de seletividade (IS), aliados a baixa toxicidade celular, trazem boas perspectivas para a melhoria da efetividade de BNZ. O panorama positivo estimulou o investimento em testes *in vivo*, que estão sendo realizados no laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou- Fiocruz em Belo Horizonte para avaliar o impacto destes produtos na atividade tripanocida do fármaco no modelo murino.



## DISCUSSÃO GERAL

O fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas é o BNZ, apesar da sua toxicidade (RASSI-JR e MARIN-NETO, 2000). O fármaco pertence ao grupo nitroimidazol e é totalmente absorvido por via digestiva, as concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 2 a 4 horas, o tempo de meia-vida de eliminação plasmática é de 12 horas e seus metabólitos são eliminados rapidamente pela urina e pelas fezes (BRASIL, 2010). Este fármaco é classificado no grupo II do SCB, possui propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, como baixa solubilidade aquosa e nos fluidos aquosos, com absorção limitada por sua velocidade de dissolução. Novos métodos de administração de BNZ já foram testados, mas sem comprovação da real melhoria da sua terapêutica (MAXIMIANO, 2011).

O conhecimento da estabilidade dos princípios ativos é fundamental para o desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes. Para a avaliação da estabilidade de BNZ foi desenvolvido um método indicativo de estabilidade CLAE-UV/Vis, sendo validado com êxito para quantificação do fármaco em meio aos seus produtos de degradação química e física. O método indicativo de estabilidade exibiu excelente precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, de acordo com diretrizes (ICH, 2005). Foi possível estimar o fármaco em sistemas binários, consistindo de BNZ:Ac-Di-Sol<sup>®</sup> comoídos. No caso de BNZ, a moagem de alta energia acarretou na mudança de cor e na perda de massa por possíveis processos de degradação, o que torna importante o controle dos processos de obtenção das formulações contendo o fármaco. Além pode-se detectar alguns processos de degradação do fármaco, como oxidação e hidrólise básica, sendo possível detectar a sua alta estabilidade em meio ácido. O desenvolvimento do método demonstrou-se relevante para a análise de rotina de BNZ, matéria-prima e suas formulações, podendo ser realizada sem qualquer interferência de produtos de degradação e componentes da formulação.

Comprimidos de liberação prolongada gastroretentivos do tipo Dome Matrix<sup>®</sup> foram desenvolvidos atendo-se a baixa solubilidade aquosa de BNZ, alta estabilidade em meio ácido e as suas propriedades de fluxo e de compressibilidade deficientes (MAXIMIANO, COSTA, *et al.*, 2010). A análise dos perfis de dissolução com o auxílio dos modelos matemáticos permitiu observar que as formulações possuem

características de liberação prolongada, dependente da sua composição polimérica. As formulações com maior percentual de HPMC K15M (30%) apresentam uma liberação mais lenta do fármaco, sendo que o acréscimo do polímero HPMC L3LV influenciou positivamente na velocidade de dissolução de BNZ. Entretanto, quantidades superiores a 20% deste polímero promoveram a rápida desintegração dos comprimidos. A perfeita flutuação no meio de dissolução dos comprimidos também foi observada como esperado para o sistema Dome Matrix®. Os estudos comparativos das formulações demonstraram que F7 e F9, contendo de 10-20% de HPMC L3LV e 10-15% de HPMC K15M, são as mais promissoras por apresentarem uma maior porcentagem de liberação do fármaco, em quantidades constantes no mesmo período de tempo.

Com o intuito de aprimorar a velocidade de dissolução de BNZ em meio aquoso foram desenvolvidas formulações contendo polímeros hidrofílicos e produção de cocristais de BNZ. Para triagem dos polímeros mais adequados para obtenção de dispersões sólidas, foi utilizado primeiramente o método de LAG foi utilizado para obtenção dos sistemas com os polímeros PVPVA, EPO e L100. Foi observado o aumento significativo da velocidade de dissolução de BNZ, apenas para as formulações BNZ: PVPVA e BNZ: EPO. Este efeito pode ser atribuído ao somatório da redução do tamanho de partículas e ao efeito carreador dos polímeros selecionados, uma vez que as formulações contendo L100 não obtiveram igual desempenho, mesmo com a redução de partícula. A técnica de comoagem em moinho de bolas com polímeros hidrofílicos foi efetiva para obtenção dos sistemas binários comoídos, e possui a vantagem de fácil transposição de escala em comparação ao LAG. O impacto das variáveis relacionadas ao processo de moagem e composição das formulações foi avaliado por design experimental (DoE) - 2<sup>3</sup>, efeito avaliado apenas nos sistemas SBMBPVPVA. Constatou-se que a quantidade de polímero é diretamente proporcional a velocidade de dissolução de BNZ. As demais variáveis, tempo de moagem e velocidade de rotação, não demonstraram influência nas respostas avaliadas. Houveram importantes interações entre o fármaco e os carreadores, uma redução de tamanho de cristalita de BNZ e a formação de uma mistura homogênea entre os componentes. O aumento da velocidade de dissolução do fármaco nos SBMB pode ser atribuído a maior molhabilidade dos sistemas contendo PVPVA a cosolvência para as formulações contendo EPO (BROUWERS, BREWSTER e AUGUSTIJNS, 2009).

Uma triagem sistemática foi executada para obtenção de novos materiais cristalinos baseados na propensão de interação de BNZ, onde se observou que a cocristalização do fármaco está intimamente ligada a estrutura do *coformer*. A formação de novos sólidos cristalinos foi observada com os ácidos dicarboxílicos, planares de cadeia ímpar: fumárico, succínico, maleico e oxálico.2H<sub>2</sub>O. A estrutura COSUCC foi descrita e apresenta-se na 2:1 *mmol: mmol*, fármaco: *coformer* e estima-se que os demais materiais cristalinos sigam a mesma tendência de cocristalização. A resolução das demais estruturas está em andamento, ainda não se encontram descritos cocristais de BNZ na literatura. Os cocristais de BNZ exibiram mudanças positivas nas propriedades físico-químicas do fármaco, como maior estabilidade de luz no caso de COMAL e COSUCC. A avaliação da solubilidade em equilíbrio de COOX, COMAL e COSUCC, permitiu observar que os novos materiais cristalinos formados também aumentaram a concentração de saturação do fármaco (RODRÍGUEZ-HORNEDO, NEHMA e JAYASANKAR, 2013). Ambas as técnicas obtenção de dispersões sólidas e de cocristais tiveram um impacto positivo no aumento da velocidade dissolução de BNZ em meios aquosos, o que pode contribuir para a melhoria das características farmacocinéticas de BNZ. Sendo estes resultados promissores para redução da dose de fármaco necessária para sua absorção e chegada aos sítios de ação.

Com a finalidade de avaliar o impacto dos sistemas obtidos no tratamento da doença de Chagas, SBMBPVPVA e SBMBEPO, e os materiais cristalinos COOX, COMAL e COSUCC foram testados quanto a sua atividade tripanocida pelo teste colorimétrico e demonstraram resultados promissores para o tratamento da doença de Chagas. Os produtos analisados apresentaram taxas de inibição entre 88 e 96%, semelhante ao padrão do fármaco (BNZMP) em torno de 85%. A redução da CI<sub>50</sub> e aumento do IS, aliados a baixa toxicidade celular, trazem boas perspectivas para a melhoria da efetividade de BNZ. Os resultados observados de CI<sub>50</sub> variam entre 2,02 e 2,65 µM, superando em torno de 5 vezes o fármaco de referência BNZMP (CI<sub>50</sub> = 10,18 µM). O IS calculados para SBMBEPO variam entre 106,63 e 152,56, e as SBMBPVPVA apresentaram IS entre 217,39 e 238,10. Os cocristais apresentaram IS de 202,43 para COMAl, 232,51 para COOX e 191,57 para COSUCC. A grande seletividade destes produtos pelo parasito pode aumentar a atividade do fármaco e diminuir a toxicidade do tratamento, pois podem incrementar a biodisponibilidade destes, no meio intracelular (BASU e LALA, 2009). O panorama positivo estimulou o investimento em testes *in vivo*, que estão sendo realizados no laboratório de

Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz em Belo Horizonte para avaliar o impacto destes produtos na atividade tripanocida do fármaco no modelo murino. Além disso pretende-se investir na inserção destes sistemas nas formas farmacêuticas gastroretentivas de liberação prolongada do tipo Dome Matrix<sup>®</sup>, afim de aliar os resultados positivos das técnicas para melhoria da segurança e eficácia do tratamento, com a redução de efeitos colaterais e melhor adesão dos pacientes.

## SÍNTESE DOS RESULTADOS

- ✓ Um método indicativo por CLAE/UV foi desenvolvido e validado, mostrando-se capaz de quantificar o fármaco BNZ em meio aos seus produtos de degradação e na presença de excipientes nas formulações.
- ✓ Comprimidos flutuantes de liberação prolongada do tipo Dome Matrix® foram desenvolvidos e a influência da composição polimérica na liberação do fármaco foi avaliada
- ✓ Sistemas binários comoídos foram obtidos promovendo o aumento da velocidade de dissolução de BNZ. O impacto do processo de moagem em moinho de bolas e as propriedades físico-químicas das formulações foram avaliados.
- ✓ Materiais cristalinos de BNZ foram obtidos por meio de um *screening* sistemático da tendência de cocrystalização do fármaco. Os produtos formados foram descritos quanto às suas propriedades físico-químicas e interações *coformer*: fármaco.
- ✓ A atividade tripanocida *in vitro* dos produtos obtidos foi avaliada com resultados considerados promissores. O material foi encaminhado para estudos complementares *in vivo* no laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou- Fiocruz em Belo Horizonte. Busca-se avaliar o impacto destes produtos na atividade tripanocida do fármaco no modelo murino.





## REFERÊNCIAS

- AHER, S. et al. Ultrasound assisted cocrystallization from solution (USSC) containing a non-congruently soluble cocrystal component pair: Caffeine/maleic acid. **Eur. J Pharm. Sci.**, v. 41, p. 597-602, 2010.
- ALHALAWEH, A.; ALI, H. R. H.; VELAGA, S. P. Effects of Polymer and Surfactant on the Dissolution and Transformation Profiles of Cocrystals in Aqueous Media. **Cryst. Growth Des.**, v. 14, p. 643–648, 2014.
- ALHALAWEH, A.; ALI, H. R. H.; VELAGA, S. P. Effects of Polymer and Surfactant on the Dissolution and Transformation Profiles of Cocrystals in Aqueous Media. **Cryst. Growth Des.**, v. 14, p. 643–648, 2014.
- ALLEN, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. **Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.**, v. 58, 2002.
- ALLEN, F. H. et al. First Neutron Diffraction Analysis of an O-H... $\pi$  Hydrogen Bond: 2-Ethynyladamantan-2-ol. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, p. 4081-4084, 1996.
- ALMARSSON, Ö.; ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? **Chem. Commun.**, p. 1889-1896, 2004.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm.Res.**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.
- ANSEL, H. C. **Farmacotécnica. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Premier, 2011.
- ANSEL, H. C.; ALLEN, L.; POPOVICH, N. G. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ARAYA, H.; TOMITA, M.; HAYASHI, M. The novel formulation design of O/W microemulsion for improving the gastrointestinal absorption of poorly water soluble compounds. **Int. J. Pharm.**, v. 305, p. 61–74, 2005.

ASHLAND. Plasdonetm S-630. Product Overview. **Ashland**, 2013. Disponível em: <[http://www.ashland.com/Ashland/Static/Documents/ASI/PC\\_11737\\_PI\\_asdone\\_S-630\\_Copovidone.pdf](http://www.ashland.com/Ashland/Static/Documents/ASI/PC_11737_PI_asdone_S-630_Copovidone.pdf)>. Acesso em: 30 jan. 2016.

AULTON, M. E. **Delineamentos de formas farmacêuticas**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. **J Pharm. Sci.**, v. article in press, p. 1-18, 2016.

BARBEIRA, P. J. S. et al. Polarographic determination of benznidazole in DMSO. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 20, n. 4, p. 723–726, Aug 1999.

BARROCAS, P. M. C. et al. Sistemas farmacêuticos gastrorretentivos flutuantes. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, v. 43, n. 3, 2007.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BASU, M. K.; LALA, S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. **Cur. Mol. Med.**, v. 4, n. 6, p. 681-689, 2009.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **N. Engl. J Med.**, v. 364, p. 2527–2534, 2011.

BETHUNE, S. J. et al. Understanding and Predicting the Effect of Cocrystal Components and pH on Cocrystal Solubility. **Cryst. Growth Des.**, v. 9, n. 9, p. 3976-3988, 2009.

BHATT, P. M. et al. Cocrystals of the Anti-HIV Drugs Lamivudine and Zidovudine. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 2, p. 951–957, 2009.

- BHATTACHARYA, S.; SARASWATULA, V. G.; SAHA, K. B. Thermal Expansion in Alkane Diacids□Another Property Showing. **Cryst. Growth Des.**, v. 13, p. 3651–3656, 2013.
- BOLDYREV, V. V. Mechanochemical modification and synthesis of drugs.. **J Mater Sci**, v. 39, p. 5117-5120, 2004.
- BOLDYREV, V. V. Mechanochemistry and mechanical alloying. **J. Mat. Sci.**, v. 39, p. 5117 – 5120, 2004.
- BORST, I.; UGWU, S.; BECKETT, A. H. New and Extended Applications for USP Drug Release Apparatus 3. **Diss. Tech.**, v. 4, p. 11-15, 1997.
- BRASIL. **Resolução No. 899, Maio 29. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. 2003.
- BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso.** Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, p. 448. 2010.
- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira.** 5. ed. Brasília: Anvisa, v. I, 2010.
- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira.** 5. ed. Brasília: Anvisa, v. I, 2010.
- BRASIL. **Resolução-RDC N°. 31. Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo.** ANVISA-- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. 2010.
- BREITENBACH, J. Melt extrusion: from process to drug delivery technology. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 54, n. 2, p. 107-17, 2002.
- BRENER, Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas.. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 379-388.
- BRITAIN, H. G. **Physical Characterization of Pharmaceutical Solids.** New York: Marcel Dekker, Inc. , 1995.
- BROUWERS, J.; BREWSTER, M. E.; AUGUSTIJNS, P. Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability? **J Pharm. Sci.**, v. 98, n. 8, p. 2549-2572, 2009.

BUCKLEY, S. T. et al. Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to “enabling formulations”. **Eur. J Pharm. Sci.**, v. 50, p. 8–16, 2013.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing  $\beta$ -galactosidase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Curr. Opin. Infect Dis.**, v. 23, p. 609-616, 2010.

BYRN, S. R.; PFEIFFER, R. R.; STOWELL, J. G. **Solid-state chemistry of drugs**. 2. ed. West Lafayette: [s.n.], 1999.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 44, p. 29-37, 2002.

CARDOSO, M. F. C. et al. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of new 3-phenylthio-nor-b-lapachone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 23, p. 4763–4768, 2015.

CARREÑO, N. L. V. et al. Nanocompósitos cerâmicos a partir do processo de moagem mecânica de alta energia. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, 2008.

CARSTENSEN, T.; RHODES, C. T. **Drug stability: principles and practices**. New York: Marcel Dekker, 2000.

CARVALHO, T. U.; SOUTO-PADRON, T.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: surface charge and freeze-fracture of amastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 59, p. 12–23, 1985.

CASAS, M. et al. Tapioca starch graft copolymers and Dome Matrix® modules II. Effect of modules assemblage on Riboflavin release kinetics.. **Euro. J. Pharm. Biopharm.**, v. 77, p. 111–115, 2011.

CASTRO, G. M. B. **Estudo de Propriedades Estruturais, Magnéticas e Magnetorresistivas em multicamadas magnéticas de Co/Pt acopladas a IrMn**. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Instituto de Física. UFRGS, 2010.

- CHADHA, R. et al. Cocrystals of efavirenz with selected cofomers: preparation and characterization. **Pharm Pharma Sci**, v. 4, n. 2, p. 244-250, 2012.
- CHAUHAN, H.; HUI-GU, C.; ATEF, E. You have full text access to this contentCorrelating the behavior of polymers in solution as precipitation inhibitor to its amorphous stabilization ability in solid dispersions. **J Pharm. Sci.**, v. 102, n. 6, p. 1924–1935, 2013.
- CHERUKUVADA, S.; ROW, T. N. G. Comprehending the Formation of Eutectics and Cocrystals in Terms of Design and Their Structural Interrelationships. **Cryst. Growth Des.**, v. 14, p. 4187–4198, 2014.
- CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S12–S15, 2010.
- COHEN, J.; DIBNER, M. S.; PRADO, A. P. Development of and access to products for neglected diseases.. **PLoS One**, v. 12, p. e10610, 2010.
- COLOMBO, I.; GRASSI, G.; GRASSI, M. Drug mechanochemical activation. **J Pharm Sci**, v. 98, p. 3961-3986, 2009.
- COLOMBO, P. et al. **New modules, new assemblage kits and new assemblies for the controlled release of substances.** WO 2008067829 A1, 12 jun. 2008.
- COSTA, ; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J Pharm. Sci.**, v. 13, p. 123–133, 2001.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Port. Farm.**, v. 49, n. 4, p. 181-190, 1999.
- COURA, J.; VIÑAS, P. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 24, n. 465, p. S6-7, 2010.
- CULLITY, B. D. **Elements of X-Ray diffraction**. 2. ed. Philippines: Addison-Wesley Publishing Company Inc, 1978.
- DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 59, p. 505–521, 2007.
- DAVANÇO, M. et al. Benznidazole extended-release tablets for improved treatment of Chagas. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 4, p. 2492-2498, 2016.

DIAS, J. C. . Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop.**, v. 44, p. 68–72, 2011.

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Design**, v. 12, p. 1157-1164, 2001.

DRESSMAN, L. C. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 50, p. 47-60, 2000.

DUGGIRALA, N. K. et al. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. **Chem. Commun**, v. 52, p. 640--655, 2016.

DUTKIEWICZ, G.; DUTKIEWICZ, E.; KUBICKI, M. Even–odd effect in the co-crystals of pyrazine and dicarboxylic acids. **Struct Chem** , v. 26, p. 247–259, 2015.

EBERLE, V. A. et al. Floating gastroretentive drug delivery systems: Comparison of experimental and simulated dissolution profiles and floatation behavior. **Euro. J. Pharm. Sci.** , v. 58 , p. 34–43, 2014.

EDWARDS, G.; KRISHNA, S. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Parasitic Infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, p. 233–242, 2004.

EDWARDS, M. R.; JONES, W.; MOTHERWELL, W. D. S. Influence of dicarboxylic acid structure on tape networks in co-crystals of 2-pyridone. **Crystal Eng.** , v. 2, p. 25–36, 2002.

EISAI AND DNDI. **Eisai and DNDi Enter into a Collaboration and License Agreement To Develop a New Drug for Chagas Disease.** <http://www.dndi.org/2009/media-centre/press-releases/eisai-and-dndi-enter-into-a-collaboration><http://www.dndi.org/2009/media-centre/press-releases>. Eisai and DNDI. Geneva. 2009.

ELIDRISSI, A. et al. New approach to predict the solubility of polymers Application: Cellulose Acetate at various DS, prepared from Alfa "Stipa -tenassicima" of Eastern Morocco. **J. Mater. Environ. Sci**, v. 3, n. 2, p. 270-285, 2012.

ESTANI, S. S. et al. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease.. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59 , n. 4, p. 526–529, 1998.

ETTER, M.; REUTZEL, S. Hydrogen-bond directed cocrystallization and molecular recognition properties of acyclic imides. **J Am Chem Soc**, v. 113, p. 2586–2598, 1991.

ÉVORA, A. O. L.; CASTRO, R. A. E. M. T. M. R.; SILVA, M. R. A thermodynamic based approach on the investigation of a diflunisal pharmaceutical co-crystal with improved intrinsic dissolution rate. **Int J Pharm**, v. 466, p. 68–75, 2014.

FDA. **FDA Guidance for industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms.** Food and Drug Administration. Rockville, p. 1-11. 1997.

FDA. **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry.** Food and Drug Administration. Silver Spring:US. 2015.

FERREIRA, S. B. et al. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of  $\beta$ -lapachone analogues. **Euro J Med Chem**, v. 46, n. 7, p. 3071–3077, 2011.

FRIŠCIC, T.; JONES, W. Benefits of cocrystallisation in pharmaceutical materials science: an update. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, p. 1547–1559, 2010.

GIL, E. **Controle físico-químico de qualidade.** 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

GOOD, D. J.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N. C. Eutectic Constants and Prediction of Solubility Behavior. **Cryst. Growth Des.**, v. 10, n. 3, p. 1028-1032, 2010.

GUERRERO, L. et al. A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. **Clin Chem Lab Med**, v. 49, n. 1, p. 77–82, 2011.

GUZMAN, H. R. et al. Combined Use of Crystalline Salt Forms and Precipitation Inhibitors to Improve Oral Absorption of Celecoxib from Solid Oral Formulations. **J Pharm Sci**, v. 96, n. 10, 2007.

HIDE, G. et al. (Eds.). **Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control.** Wallingford: CAB Internacional, 1997.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. **AAPS J**, v. 18, n. 1, p. 251-260, 2016.

HOTEZ, P. et al. Control of neglected tropical diseases.. **New Eng J Med**, v. 357, p. 1018–1027, 2007.

HOTEZ, P. J. et al. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and The Neglected Tropical Diseases of Latin America and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.

HUANG, Y.; DAI, W. G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharm Sin B**, v. 4, n. 1, p. 18-25, 2014.

**ICH. Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. Harmonised Tripartite Guideline.** International Conference on Harmonisation. Geneva. 1996.

**ICH. Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology.Harmonised Tripartite Guideline.** International Conference on Harmonisation. Geneva. 2005.

ISSA, M. G.; FERRAZ, H. G. Intrinsic Dissolution as a Tool for Evaluating Drug Solubility in Accordance with the Biopharmaceutics Classification System. **Diss.Tech.**, v. 18, n. 2, p. 6-11, 2011.

JANSSENS, S.; VAN DEN MOOTER, G. Physical chemistry of solid dispersions. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 61, p. 1571–1586, 2009.

JAYASANKAR, A. et al. Cocrystal Formation during Cogrounding and Storage is Mediated by Amorphous Phase. **Pharm Res**, v. 23, p. 2381-2392, 2006.

JONES, W.; MOTHERWELL, W. D. S.; TRASK, A. V. Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement. **MRS Bull.**, v. 31, p. 875-879, 2006.

JORGENSEN, E. D.; BHAGWAT, D. Development of dissolution tests for oral extended-release products. **PSTT**, v. 1, n. 3, p. 128-135, 1998.



- KALLIOPI, A.; HATZIAVRAMIDIS, C.; HATZIAVRAMIDIS, D. T. Dissolution Efficiency and Design Space for an Oral Pharmaceutical. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 54, p. 6305–6310, 2015.
- KASIM, N. A. . et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Mol. Pharm.**, v. 1, p. 85–96, 2004.
- KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **Int. J. Pharm.**, v. 420, p. 1– 10, 2011.
- KITAGAWA, S.; KITAURA, R.; NORO, S. I. Functional Porous Coordination Polymers. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 43, p. 2334 –2375, 2004.
- KOJIMA, T. et al. Stabilization of a Supersaturated Solution of Mefenamic Acid from a Solid Dispersion with EUDRAGIT®EPO. **Pharm. Res.**, v. 29, p. 2777–2791, 2012.
- KUMINEK, G. et al. Development and validation of a rapid and simple stability-indicating LC method for nifedipine. **J. Liq. Chromatogr. Related Technol.**, v. 33, n. 17, p. 1601–1611., NOV 2010.
- KWOK, D. Y.; NEUMANN, W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. **Adv. Coll. Interf. Sci.**, v. 81, p. 167-249, 1999.
- LAFEPE. **Guia de Compras do LAFEPE BNZ (100mg e 12,5mg)**. LAFEPE. Rio de Janeiro. 2012.
- LAMAS, M. C. . V. L. . N. I. . B. G. . L. D. . P. F. B. S. E. . S. C. J. Development of parenteral formulations and evaluations of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **Int. J. Pharm.**, v. 307, p. 239–243, 2006.
- LEONARDI, D. . S. C. J. . L. M. C. . O. A. C. Unexpected performance of physical mixtures over solid dispersions on the dissolution behavior of benznidazole from tablets. **J. Pharm. Sci.**, v. 102, n. 3, p. 1016–1023, 2013.
- LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **Euro J Pharm Biopharm.**, v. 50, p. 47–60, 2000.

LIMA, Á. A. N. et al. Solid dispersion systems for increase solubility: cases with hydrophilic polymers in poorly water soluble drugs. **Rev. Bras. Farm.**, v. 92, n. 4, p. 269-278, 2011.

LIMA, A. A. N. et al. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benznidazole solubility. **J Pharm. Sci.**, v. 100, n. 6, p. 2443–2451, 2011.

LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil.. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

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

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v. 41, n. 2, p. 455-470, 2005.

LOSI, E. et al. Assemblage of novel release modules for the development of adaptable drug delivery systems.. **J Control Rel**, v. 111, 2006.

MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA O, J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. **J. Control. Release**, v. 154, p. 2–19, 2011.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 38, n. 2, p. 375-400, 2002.

MANIRUZZAMAN, M. et al. Drug-polymer intermolecular interactions in hot-melt extruded solid dispersions. **Int J Pharm.**, v. 25, n. 443, p. 199-208., 2013.

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

MARSÓN, M. E. et al. A Simple and Efficient HPLC Method for Benznidazole Dosage in Human Breast Milk. **Ther Drug Monit**, v. 35, n. 4, 2013.

MARSÓN, M. E. et al. Development of UV/HPLC Methods for Quantitative Analysis of Benznidazole in Human Plasma and Urine for Application in Pediatric Clinical Studies. **J Clin Lab Anal**, v. 27, p. 384–390, 2013.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167–174, 2014.

MASON, L. M. et al. The influence of polymer content on early gel-layer formation in HPMC matrices: The use of CLSM visualisation to identify the percolation threshold. **Eu. J.Pharm. Biopharm.**, v. 94, p. 485–492, 2015.

MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY. Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 374, n. 2, p. 188-190, 2016.

MAXIMIANO, F. P. et al. Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 78, p. 377–384, 2011.

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

MCNAMARA, D. P. et al. Use of a Glutaric Acid Cocrystal to Improve Oral Bioavailability of a Low Solubility API. **Pharmaceut Res**, v. 23, p. 1888-1897, 2006.

MOLINA, I. et al. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, 2015.

MORILLA, M. et al. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. **Int J Pharm**, v. 278, p. 311-318, 2004.

MORILLA, M. J. et al. Liposomal Benznidazole: A High-Performance Liquid Chromatographic Determination for Biodistribution Studies. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 41, n. 8, p. 405-409, sep 2003.

MOUSTAFINE, R. I. et al. Eudragit E PO as a Complementary Material for Designing Oral Drug Delivery Systems with Controlled Release Properties: Comparative Evaluation of New Interpolyelectrolyte

Complexes with Countercharged Eudragit L100 Copolymers. **Mol. Pharm.**, v. 10, p. 2630-2641, 2013.

NEHM, S. J.; RODRIGUEZ-SPONG, B.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N. Phase Solubility Diagrams of Cocrystals Are Explained by Solubility Product and Solution Complexation. **Cryst. Growth Des.**, v. 6, p. 592-600, 2006.

NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M. H. **Applied Linear Statistical Models**. 4. ed. Irwin: McGraw-Hill, 1996.

NILUFER, Y.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *International Journal of Pharmaceutics*. **I J Pharm.**, v. 209, p. 57-67, 2000.

NOVAK, S. D. et al. Characterization of physicochemical properties of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) type 2208 and their influence on prolonged drug release from matrix tablets. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 66, p. 136-143, 2012.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, p. 941-955, 2006.

OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, R. C. M. U. SAPT: LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO OU INTERAÇÃO DE van der WAALS? **Quim. Nova**, v. 35, n. 10, p. 2002-2012, 2012.

OLIVEIRA, M. A. et al. Degradation kinetics of atorvastatin under stress conditions and chemical analysis by HPLC. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1447-1456, Jan 2013.

OLIVEIRA, P. R. et al. Assembled modules technology for site specific prolonged delivery of norfloxacin. **Int. J. of Pharm.**, v. 405, p. 90-96, 2011.

PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro. 2009.

PANAKANTI, R.; NARANG, A. S. Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. **Pharm. Res.**, v. 29, p. 2639-2659, 2012.

- PANDIT, N. K. **Introdução as Ciências Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- PATEL, R. B.; NAREGALKAR, N. S.; PATEL, M. R. Stability-Indicating HPTLC Method for Quantitative Estimation of Asenapine Maleate in Pharmaceutical Formulations, Equilibrium Solubility and Ex Vivo Diffusion Studies. **J. Liq. Chromatogr. Related Technol.**, v. 38, n. 19, p. 1731-1739, Sep 2015.
- PATTERSON, J. S.; GUHL, F. Distribution of Chagas disease. In: TELLERIA, J. . M. **American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research**. London: Elsevier, 2010. Cap. 5.
- PEREZ, C. J.; LYMBERG, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? **Trends Parasitol.**, v. 30, n. 4, p. 176-182, 2014.
- PEREZ, C. J.; LYMBERG, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. **Trends Parasitol.** , v. 31, n. 11, p. 595-603, 2015.
- PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev. Bras. Ciên.**, v. 43, n. 4, 2007.
- PINAZO, M.-J. et al. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease.. **Antimicrob. Ag. Chemother.** , v. 57 , n. 1 , p. 390–395, 2013.
- POKHARKAR, V. B.; MANDPE, L. P.; PADAMWAR, M. N. Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low T-g drug. **Powder Technol.**, v. 167 , p. 20–25, 2006.
- PRAKASH, K. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian J Pharm. Sci.**, v. 9, p. 304-316, 2014.
- RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery.. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, p. 785-796, 2004.
- RAILLARD, S. P. et al. Prediction of Drug Degradation Pathways leading to Structural Alerts for Potential Genotoxic Impurities. **Org. Process Res. Dev.**, v. 14, n. 4, p. 1015–1020, April 2010.

RASSI-JR, A.; MARIN-NETO, J. A. Cardiopatia chagásica crônica. **Rev Soc Cardiol.**, v. 10, p. VI-XXXII, 2000.

REDDY, L. S. et al. Cocrystals and Salts of Gabapentin: pH Dependent Cocrystal Stability and Solubility. **Cryst. Growth Des.**, v. 9, p. 378–385, 2009.

RODRIGUEZ-HORNEDO, N. et al. Reaction Crystallization of Pharmaceutical Molecular. **Mol. Pharm.**, v. 3, n. 3, p. 362-367, 2006.

RODRIGUEZ-HORNEDO, N. et al. Reaction crystallization of pharmaceutical molecular complexes. **Mol. Pharm.**, v. 3, n. 3, p. 362-367, 2006.

RODRÍGUEZ-HORNEDO, N.; NEHMA, S. J.; JAYASANKAR, A. Cocrystals: Design, Properties and Formation Mechanisms. In: \_\_\_\_\_ **Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology**. 4. ed. Michigan: Taylor & Francis, v. 6, 2013.

RODRIGUEZ-SPONG, B. et al. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 56, p. 241–274, 2004.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem I Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 33-238, 2010.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 62, p. 576-588, 2010.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. (Eds.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5. ed. Washington; Pharmaceutical Press, 2006.

ROY, L.; LIPERT, M. P.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N. Co-crystal Solubility and Thermodynamic Stability. In: WOUTERS, J.; QUERE, L. **Pharmaceutical Salts and Co-Crystals**. BRUSSELS: RSC PUBLISHING, 2011. p. 247-279.

SAFFARI, M.; EBRAHIMI, A.; LANGRISH, T. A novel formulation for solubility and content uniformity enhancement of poorly water-soluble drugs using highly-porous mannitol. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 83, p. 52–61, 2016.

SANTOS, F. L. A. et al. A study of photostability and compatibility of the anti-chagas drug Benznidazole with pharmaceutical excipients. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 41, n. 1, p. 63-69, jan 2015.

SARODE, A. L. et al. Hot melt extrusion (HME) for amorphous solid dispersions: predictive tools for processing and impact of drug-polymer interactions on supersaturation. **Eur J Pharm Sci.**, v. 14, n. 3, p. 371-84, 2013.

SCHWENDE, H. et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, n. 4, p. 555-561, 1996.

SCOTT, J. L.; HACHIKEN, S.; TANAKA, K. Efficient Isomeric Enrichment in Cocrystals of Cyclohexanediamines and Low Molecular Weight Diols. **Cryst Growth Des.**, v. 8, n. 7, p. 2447-2452, 2008.

SEEBER, F.; BOOTHROYD, J. C. Escherichia coli  $\beta$ -galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite Toxoplasma gondii. **Gene**, v. 169, p. 9-45, 1996.

SEKHON, B. S. Pharmaceutical Cocrystals - An Update. **Int Bull Drug Res**, v. 1, n. 2, p. 24-39., 2013.

SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 59, p. 603-616, 2007.

SERRA, C. H. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, p. 79-88, 2007.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug dissolution. **I J Pharm.**, v. 453, p. 12-24, 2013.

SIEUWERTS, A. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50 - values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 33, n. 11, p. 813-823., 1985.

SILVA, A. L. M. et al. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163-1166, Sep-oct 2007.

SILVA, E. O. R. et al. Programa de controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo, Brasil: o controle e a vigilância da transmissão vetorial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 74-84, 2011.

SILVA, R. M. L. et al. Preclinical Monitoring of Drug Association in Experimental Chemotherapy of Chagas' Disease by a New HPLC-UV Method. **Antimicro Agents Ch**, v. 56, n. 6, p. 3344-3348, 2012.

SILVERSTEIN, R. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6. ed. London: John Wiley & Sons, 2005.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Stress test to determine inherent stability of drugs. **Pharm. Technol.**, n. 4, p. 4-14, April 2000.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Development and in vitro evaluation of tablets based on the antichagasic benznidazole. **Rev. Bras. Farm.**, v. 44, n. 3, p. 78-80, July-sep 2006.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Rev. Patol. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benznidazole. **Acta Cryst.**, v. E64, p. 634, 2008.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benznidazole. **Acta Crystallographica**, p. 634, 2008.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benznidazole. **Acta Cryst.**, v. E64, p. 634, 2008.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **J. Carb. Pol.**, v. 89, n. 2, p. 323-330, 2012.

SOEIRO, M. N. C. et al. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 301-310, 2009.



SOY, D. et al. Population Pharmacokinetics of Benznidazole in Adult Patients with Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 6, 2015.

STOLER, E.; WARNER, J. C. Non-Covalent Derivatives: Cocrystals and Eutectics. **Molecules**, v. 20, p. 14833-14848, 2015.

STORPIRTIS, S. et al. **Ciências Farmacêuticas. Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

STRECK, L. et al. Validação de método analítico por espectrofotometria UV para sistema emulsionado lipídico contendo benznidazol. **Quim. Nova**, v. 34, n. 8, p. 1459-1463, 2011.

STRUSI, O. L. et al. Module assemblage technology for floating systems: In vitro flotation and in vivo gastro-retention. **J. Cont. Rel.**, v. 14, n. 129, p. 88-92, 2008.

STRUSI, O. L. et al. Artesunate-clindamycin multi-kinetics and site-specific oral delivery system for antimalaric combination products. **J. Cont. Rel.**, v. 146, p. 54–60, 2010.

SWARBRICK, J. **Spectroscopy of Pharmaceutical Solids**. Pinehurst: Taylor & Francis Group, 2006.

TOMICH, C. S. C. et al. Use of lacZ expression to monitor transcription.. **Plasmid**, v. 20, p. 167–170, 1988.

TRASK, A. V.; MOTHERWELL, W. D. S.; JONES, W. Pharmaceutical cocrystallization: engineering a remedy for caffeine hydration. **Cryst. Growth Des.**, v. 5, p. 1013-1021, 2005.

TSUCHIYA, S. et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **Int. J. Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-176, 1980.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011.

VAN DE LOOSDRECHT, A. et al. Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **J. Immunol. Methods**, v. 141, p. 15-22, 1991.

VANDROOGE, D. J. et al. Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques. **Int J Pharm.**, v. 9, n. 310, p. 220-9, 2006.

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

VELASCO, M. V. et al. Influence of drug: hydroxypropylmethylcellulose ratio, drug and polymer particle size and compression force on the release of diclofenac sodium from HPMC tablets. **J. Control. Release**, v. 57, p. 75–85, 1999.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Adv. Drug Del.**, v. 48, n. 1, p. 3–26, MAY 2001.

VIRIDÉN, A.; LARSSON, A. W. The effect of substitution pattern of HPMC on polymer release from matrix tablets. **Int. J. Pharm.**, v. 389, p. 147–156, 2010.

WANG, Y. et al. Statistical comparison of dissolution profiles. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, n. ONLINE, p. 1-12, 2015.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical.** UK: Chemists Elsevier Health Sciences, 2012.

WELLS, J. I.; RUBINSTEIN, M. H. (Eds.). **Pharmaceutical Technology: Tableting Technology.** Chichester: CRC Press, v. 2, 1993.

WHO. **Control of Chagas Disease: Second Report of the WHO Expert Committee.** World Health Organization. [S.l.], p. 905. 2002.

WHO. **Neglected tropical disease, hidden successes emerging opportunities.** WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geneva, p. 41. 2006.

WHO. **Leishmaniasis: cutaneous, mucocutaneous, visceral.** World Health Organization. Geneva. 2015.

WHO A. **Technical Report Series.** World Health Organization. [S.l.], p. Annex No. 937. 2006.

WILLIAMS-BLANGERO, S. . C. C. D. et al. Host genetics and population structure effects on parasitic disease.. **Philos. Trans. R. Soc. B**, v. 367, n. 1590, p. 887–894, 2012.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 48, n. 1, p. 27-42, 2001.

YUAN, Y.; LEE, T.. Contact Angle and Wetting Properties. In: BRACCO, G.; ; HOLST, B. **Surface Science Techniques**. [S.l.]: Springer, v. 51, 2013. Cap. 1, p. 3-34.

ZAKERI-MILANIA, P. et al. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 73, n. 1, p. 102–106, 2009.

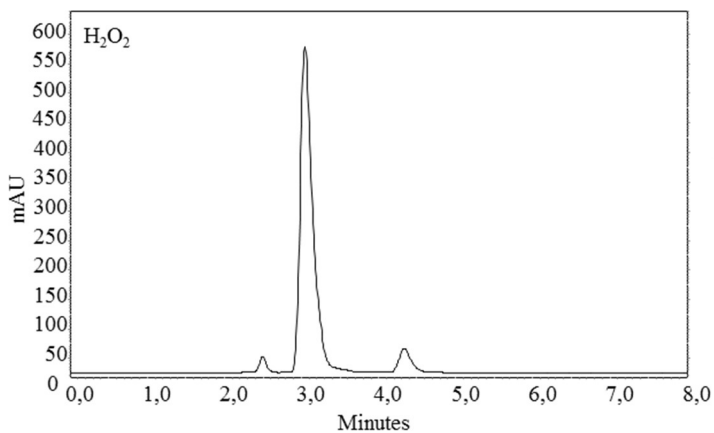
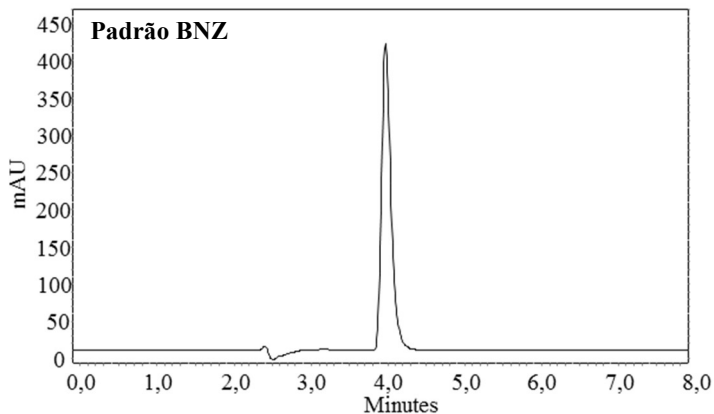
ZHANG, Y. et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **AAPS J**, p. 263-271, 2010.

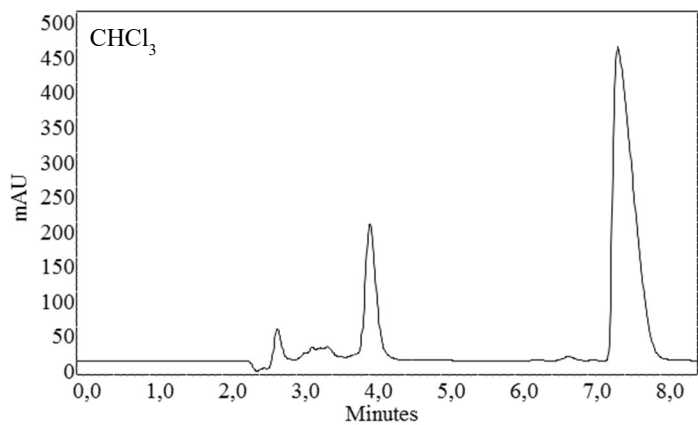
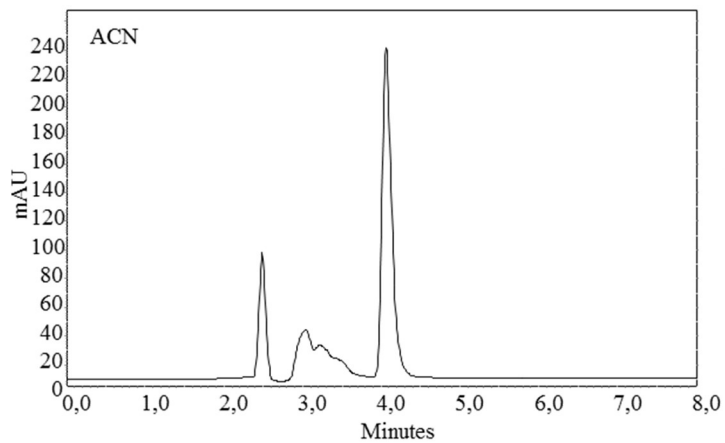
ZHOU, D. et al. Understanding and Managing the Impact of HPMC Variability on Drug Release from Controlled Release Formulations. **J. PHARM. SCI.**, v. 103, p. 1664–1672, 2014.

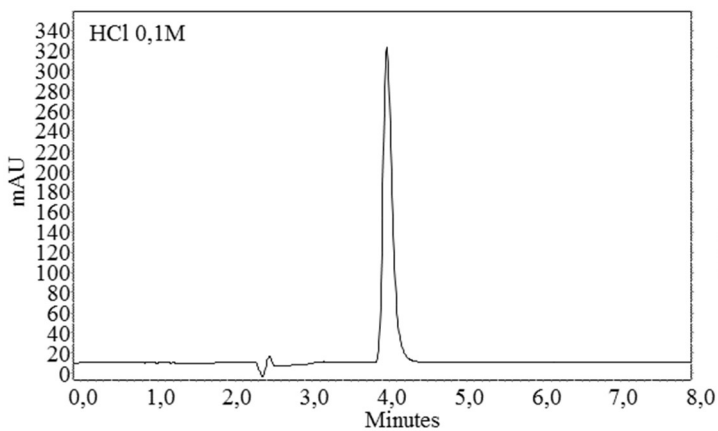
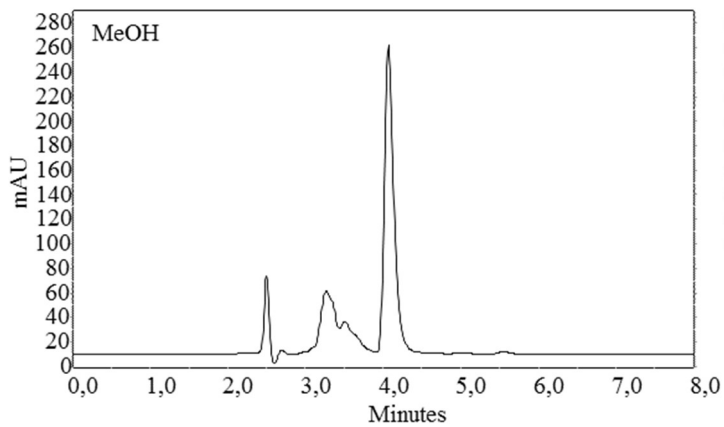


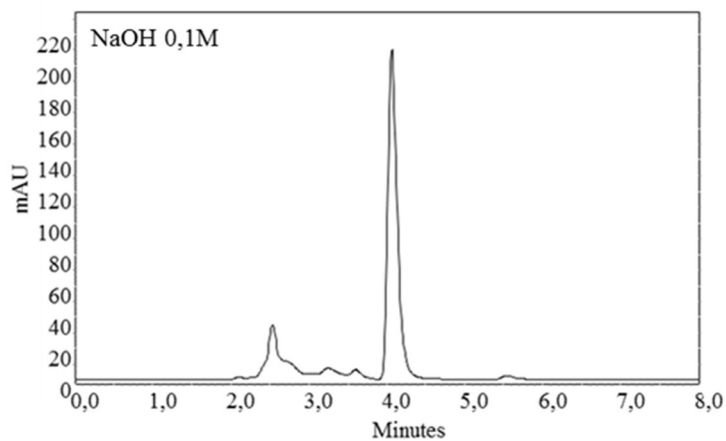
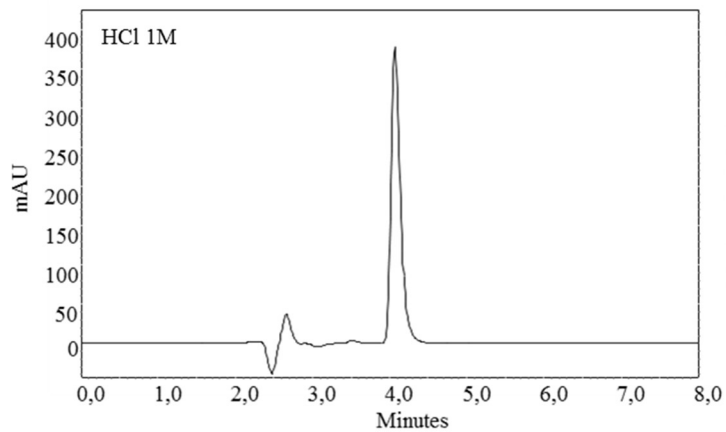
**APÊNDICE A**

Figura 1- Cromatogramas relativos aos resultados dos estudos de degradação forçada. Coluna C-18, ACN-solução acetato de amônio- (pH 6,5, 26mM) (65:35 v/v), fluxo de 0,5 mL/min,  $\lambda = 220$  nm.

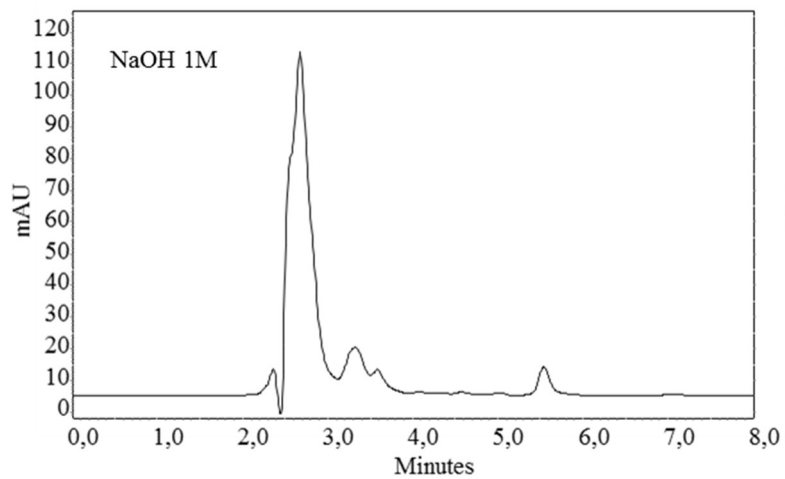








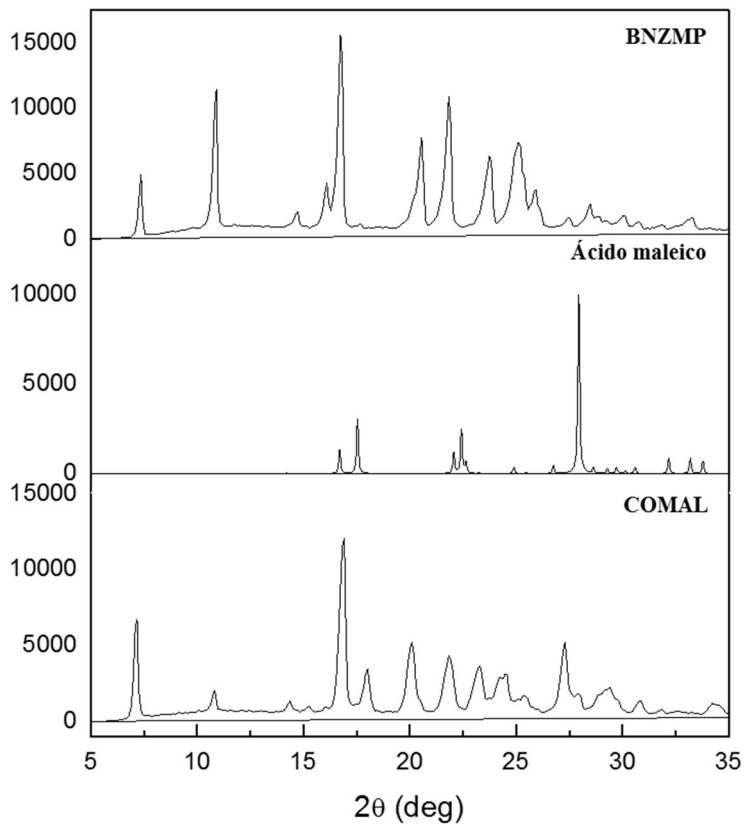


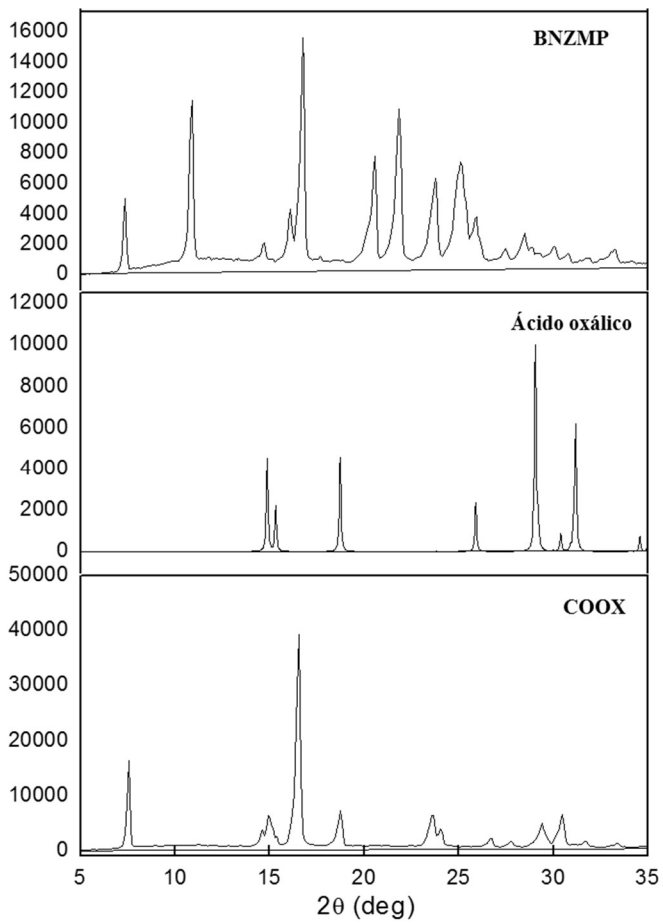


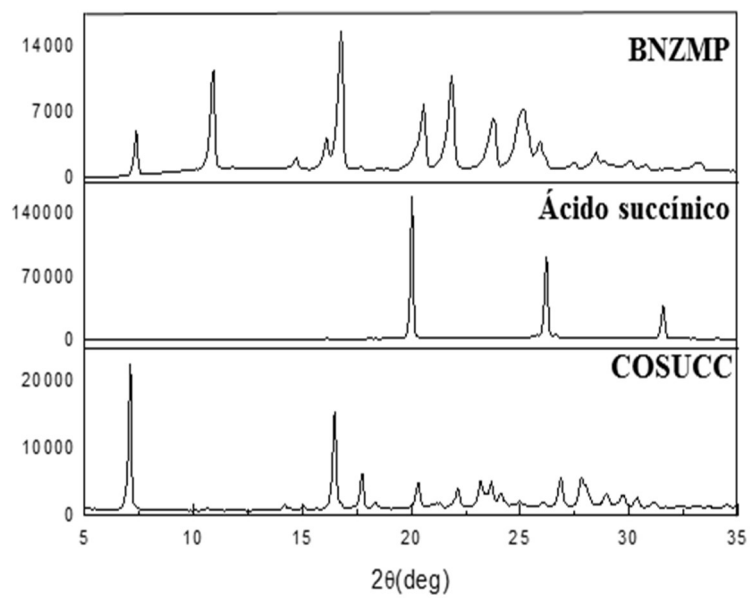


**APÊNDICE B**

Figura 1- Comparação dos difratogramas dos cocristais, BNZMP e *coformers* contendo BNZ obtidos durante a triagem.







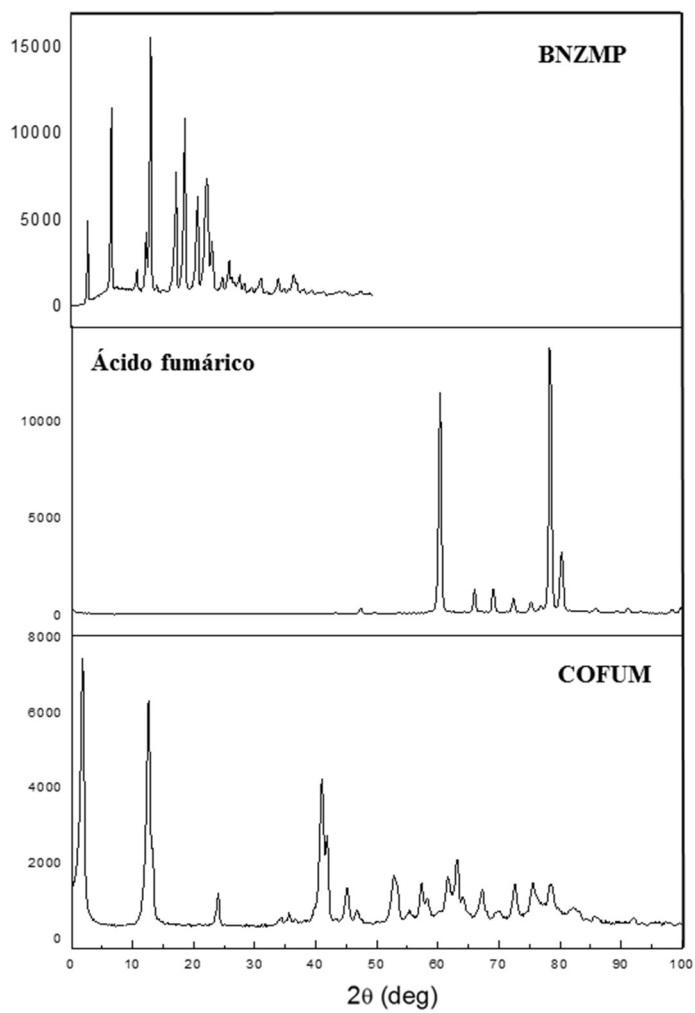
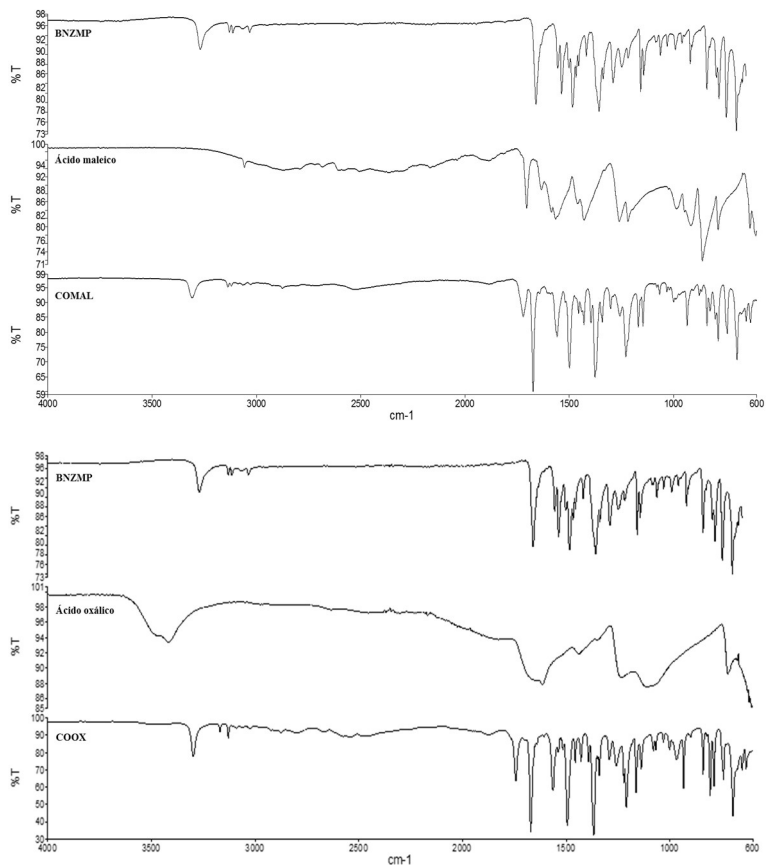


Figura 2- Espectro de IV de BNZMP, *coformer* e seus respectivos cocrystalis

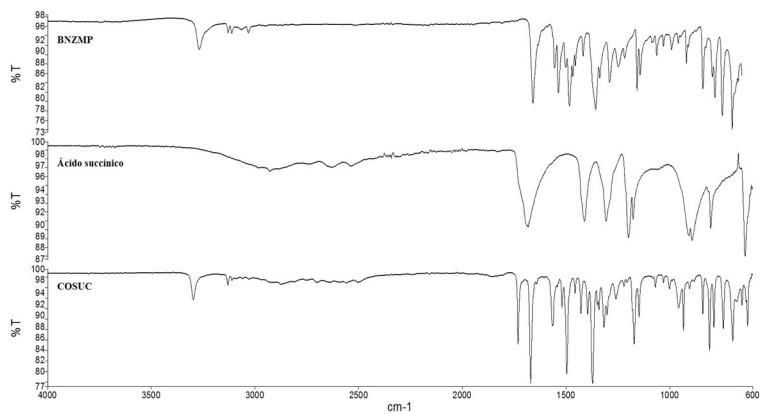


Figura 3- Termogramas de DSC comparativos dos cocristais, BNZMP e *coformers* contendo BNZ obtidos durante a triagem.

