

**Juliana Rosa**

**MODULAÇÃO DA SOLUBILIDADE E PERMEAÇÃO  
CUTÂNEA DA ISONIAZIDA ATRAVÉS DA  
COCRISTALIZAÇÃO COM COFORMADORES  
“INTELIGENTES”**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Simone Gonçalves Cardoso.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Caon.

Florianópolis  
2018

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

Rosa, Juliana

Modulação da solubilidade e permeação cutânea da isoniazida através da cocrystalização com coformadores "inteligentes" / Juliana Rosa ; orientadora, Simone Gonçalves Cardoso, coorientador, Thiago Caon, 2018.

144 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Cocrystalais. 3. Isoniazida. 4. Solubilidade. 5. Permeação cutânea. I. Cardoso, Simone Gonçalves. II. Caon, Thiago. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

**“Modulação da solubilidade e permeação cutânea da  
isoniazida através da cocristalização com coformadores  
"inteligentes"”**

**POR**

**Juliana Rosa**

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

**Banca Examinadora:**



---

**Prof(a). Dr(a). Angela Machado de Campos (UFSC – Membro  
Titular)**

---

**Prof(a). Dr(a). Nair Rodriguez-Hornedo (University of Michigan  
(videoconferência) – Membro Titular)**



---

**Prof(a). Dr(a). Simone Gonçalves Cardoso (UFSC – Orientador(a))**

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

**Florianópolis, 08 de março de 2018.**



## AGRADECIMENTOS

À minha família. Meu pai Daltro, que partiu do plano físico mas nos carregou de amor para uma vida inteira. Teus valores, teu abraço, teu sorriso viverão sempre em nossos corações. Minha mãe Haidi, doce guerreira, obrigada por sempre acreditar em mim. Teu colo será sempre o lugar mais reconfortante do mundo! À minha irmã Débora e meu cunhado Diego, que sempre torceram pelo meu sucesso e minha felicidade. Ao meu companheiro Guilherme, por me apoiar nesta caminhada com compreensão, carinho e alegria.

À minha orientadora, Simone Cardoso, profissional exemplar com um lado humano incrível! Obrigada por tornar possível meu crescimento desde os primeiros passos na iniciação científica. Tua energia positiva e tua luz nos fazem acreditar que tudo vai dar certo.

Ao Thiago Caon, meu coorientador, que com muita coragem, criatividade e parceria embarcou comigo neste desafiador casamento entre cocristais e permeação cutânea. Sou muito grata por fazer parte da carreira brilhante que estás construindo!

À Tati, que pessoa especial! Te agradeço por toda a força que sempre me deu e por dividir (e assim somar) o conhecimento, possibilitando minha evolução como profissional e ser humano.

À Gis, que além de amiga nos deu todo o suporte possível e nos transmitiu os conhecimentos do grupo da professora Naír Rodríguez.

Ao professor Marcos Segatto e à professora Hellen Stulzer pelos anos de convívio, amizade e pelo espírito de equipe. Ao professor Adailton Bortoluzzi pelos ensinamentos e colaboração neste projeto.

Aos amigos Aline, Eliéser, Thaís, Marjorie, Manu, Maya, e às Papigirls, que com um simples riso, um brinde, um abraço tornam tudo mais leve.

À Gabi Rauber, minha primeira e tão importante mentora na iniciação científica e quem nos apresentou aos cocristais! À minha aluna de iniciação científica Ana Karolina, pessoa doce e dedicada que cativou a todos nós e foi essencial para a realização deste projeto.

Aos colegas-amigos de laboratório: André, Brenda, Cassi, Fabi, Ju, Maria, Maristela, Paola, Rafael e Roberta pelas boas conversas, risadas, cafés e troca de conhecimentos.

À UFSC, ao PGFAR e à FAPESC, por possibilitarem a realização deste trabalho, através do apoio financeiro e/ou infraestrutura.



acima de tudo ame  
como se fosse a única coisa que você sabe fazer  
no fim do dia isso tudo  
não significa nada  
esta página onde você está  
seu diploma  
seu emprego  
o dinheiro  
nada importa  
exceto o amor e a conexão entre as pessoas  
quem você amou  
e com que profundidade você amou  
como você tocou as pessoas à sua volta  
e quanto você se doou a elas.

(Rupi Kaur)



## RESUMO

Cocristais farmacêuticos tem como principal benefício a modulação da solubilidade de fármacos. Conhecer a solubilidade e estabilidade termodinâmica dos cocristais é essencial para desenvolver formas farmacêuticas estáveis, independente da via de administração. Ainda que poucos estudos tenham aplicado a cocristalização para modular a permeação cutânea de fármacos, os resultados tem sido promissores. Nesta dissertação, avaliou-se a solubilidade e estabilidade termodinâmica de cocristais de isoniazida, seguidos de estudos de permeação cutânea. Selecionaram-se coformadores com relatos de modulação da permeação cutânea ou sinergismo de ação com a isoniazida. Meios aquosos com pH entre 1,2 e 7,4 foram considerados nos estudos de solubilidade termodinâmica no ponto eutético. Fármaco e coformadores foram quantificados por CLAE e a fase sólida foi caracterizada por técnicas espectroscópicas e cristalográficas ao final do experimento, de modo a avaliar transições de fase. Modelos matemáticos foram aplicados para prever a solubilidade dos cocristais e da isoniazida, demonstrando alto poder preditivo. Os diagramas de fases gerados indicaram que cada cocristal possui um perfil de solubilidade vs. pH característico, resultante da ionização do fármaco e coformador. A isoniazida exibiu um aumento exponencial da solubilidade em  $\text{pH} < 4$ , enquanto que para os cocristais com coformadores ácidos observou-se um perfil em “U”. Os cocristais exibiram um ponto de transição ( $\text{pH}_{\text{max}}$ ), com exceção do cocristal com resveratrol. A cocristalização foi eficaz na modulação da permeação cutânea da isoniazida. A redução da absorção do fármaco através da pele promovida pelos cocristais foi associada à sua menor solubilidade em relação ao fármaco puro. A análise da fase sólida e o cálculo da vantagem de solubilidade (SA) dos cocristais na câmara doadora confirmaram que os cocristais foram estáveis ao longo do experimento de permeação. Coformadores com maiores valores de log P reduziram a permeação da isoniazida. Dentre os sistemas testados, o cocristal composto por resveratrol foi considerado o mais promissor para ser incluído em uma formulação tópica devido a menor absorção através da pele.

**Palavras-chave:** Cocristais. Isoniazida. Solubilidade. Estabilidade. pH. Permeação cutânea. Tuberculose.



# MODULATING THE SOLUBILITY AND SKIN PERMEATION OF ISONIAZID THROUGH COCRYSTALLIZATION WITH "INTELLIGENT" COFORMERS

## ABSTRACT

The main benefit of pharmaceutical cocrystals is the ability to modulate drug solubility. Knowing cocrystal solubility and thermodynamic stability is essential to develop stable pharmaceutical formulations, regardless of the route of administration. Although few studies have considered the cocrystallization to modulate skin permeation of drugs, the results are promising. This dissertation demonstrates studies of solubility and thermodynamic stability of isoniazid cocrystals, followed by skin permeation experiments. Coformers were selected due to reports of modulating skin permeation of drugs or synergistic activity with isoniazid. Aqueous media with pH between 1.2 and 7.4 were considered for thermodynamic solubility studies at the eutectic point. Drug and coformer were quantified by HPLC, and the solid phases were analyzed by spectroscopic and crystallographic techniques at the end of the experiments, in order to evaluate phase transitions. Mathematical models were applied to predict drug and cocrystal solubility, and exhibited high predictive power. Diagrams demonstrated that each cocrystal exhibits a unique solubility vs. pH profile, as a result of its components ionization. An exponential raise in isoniazid solubility was observed at  $\text{pH} < 4$ , while the cocrystals with acidic cofromers presented a "U" shaped solubility. Four cocrystals exhibited a transition point ( $\text{pH}_{\text{max}}$ ). Cocrystallization effectively modulated isoniazid permeation. The reduction in drug absorption through the skin promoted by the cocrystals was attributed to the lower cocrystal solubility in comparison to the pure drug. Solid phase analysis, associated with the solubility advantage (SA) at the donor compartment confirmed that the cocrystals remained stable during the permeation experiment. The association with cofromers with higher log P decreased isoniazid permeation. The cocrystal with resveratrol was considered the most promising to be included in a topic formulation due to its lower absorption through the skin.

**Keywords:** Cocrystals. Isoniazid. Solubility. Stability. pH. Skin permeation. Tuberculosis.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático dos arranjos moleculares no estado sólido.....	30
Figura 2 – Principais <i>synthons</i> supramoleculares formados por ácidos carboxílicos, amidas e piridina.....	31
Figura 3 - Diagrama de solubilidade de fases de um cocristal AB e do fármaco A.....	33
Figura 4 - Diferentes perfis de solubilidade em função do pH. ....	35
Figura 5 – Representação da dissociação do cocristal sólido em seus componentes em solução, descrita pelo $K_{sp}$ . ....	39
Figura 6 – Reações de equilíbrio de um cocristal de fármaco básico (B) e coformador ácido (HA). ....	39
Figura 7 - Influência do pH na solubilidade e estabilidade termodinâmica do cocristal. ....	41
Figura 8 – Representação esquemática das camadas da pele e seus apêndices. ....	43
Figura 9 - Rotas de penetração de moléculas através do estrato córneo. ....	46
Figura 10 - Esquema ilustrativo da câmara de difusão de Franz. ....	48
Figura 11 - Estrutura química da INH.....	51
Figura 12 - Desenho esquemático do preparo dos cocristais de INH pelo método de cristalização por reação (MCR). ....	58

Figura 13 - Difratogramas referentes à matéria-prima e ao padrão de difração calculado de INH.....	64
Figura 14 - Padrões de difração de INH-PAS calculado (*) e obtidos por MCR em diferentes volumes de metanol.....	66
Figura 15 - Espectros FT-IR da INH e dos materiais cocrystalizados.....	68
Figura 16 - Resultado das análises por DSC da INH e das amostras cocrystalizadas.....	69
Figura 17 - Difratogramas comparando as amostra obtidas por MCR com os padrões calculados (*)......	70
Figura 18 - Identificação por DRXP da fase sólida presente no experimento de solubilidade do cocrystal INH-RES no $P_{eu}$ em diferentes soluções aquosas.....	84
Figura 19 - Diagrama de solubilidade de fases da INH e dos cocrystalais INH-FUM, INH-NIC-FUM, INH-PAS, INH-CIN e INH-RES.....	87
Figura 20 - Diagrama de solubilidade de fases para os cocrystalais INH-FUM, INH-NIC-FUM e seus componentes.....	89
Figura 21 - Espectros FT-IR da mistura física de INH e RES antes (A) e após 6 h em tampão PBS pH 7,4 (B), demonstrando a conversão ao cocrystal INH-RES (C). Mistura física entre INH e PAS (D) antes e após 6 h em tampão PBS (E) indica a conversão ao cocrystal INH-PAS (F)..	101
Figura 22 - Perfis de permeação da INH e dos cocrystalais através da pele de orelha de porco.....	103
Figura 23 - Porcentagem de INH acumulada na câmara receptora após 6 h de experimentos de permeação com tratamento com INH e cocrystalais.....	106

Figura 24 - SA ( $S_{\text{cocrystal}}/S_{\text{fármaco}}$ ) no pH das câmaras doadoras ao final dos experimentos de permeação.....	109
Figura 25 - Padrões de difração do coformador RES, do cocrystal INH-RES, e da fase sólida de INH-RES presente no compartimento doador ao fim dos experimentos de permeação cutânea.....	110
Figura 26 - Padrões de difração do coformador PAS, do cocrystal INH-PAS, e da fase sólida de INH-PAS presente no compartimento doador ao fim dos experimentos de permeação cutânea.....	111
Figura 27 - Padrões de difração do coformador CIN, do cocrystal INH-CIN, e da fase sólida de INH-CIN presente no compartimento doador ao fim dos experimentos de permeação cutânea.....	111
Figura 28 - Solubilidade calculada da INH e cocristais no pH final da câmara doadora, concentração de INH na câmara doadora ao final do experimento e concentração de INH permeada por área de pele ao final das 6 h de permeação.....	113
Figura 29 - Retenção cutânea de INH nas camadas da derme e epiderme a partir da aplicação de fármaco puro e dos cocristais.....	114



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Coformadores utilizados, com respectivos lotes e fabricantes. ....	56
Quadro 2 - Cocristais de INH descritos na literatura. ....	60
Quadro 3 - Cocristais de INH selecionados, respectivos coformadores e resumo das propriedades de interesse. ....	62
Quadro 4 - Estrutura química, $pK_a$ e temperatura de fusão da isoniazida e coformadores utilizados. ....	63
Quadro 5- Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da INH e coformadores. ....	78
Quadro 6 - Quantidade (mmol) de cocrystal e coformador utilizados nos experimentos de solubilidade no $P_{eu}$ . ....	79
Quadro 7 - Equações preditivas da solubilidade dos cocristais de INH com coformadores ácidos e básicos em função do pH. ....	86
Quadro 8 – Valores de $pH_{max}$ entre os cocristais e a INH. ....	88
Quadro 9 - log P da INH e coformadores selecionados. ....	112



## LISTA DE ABREVIATURAS, TERMOS E UNIDADES

[coformador] <sub>eu</sub>	Concentração de coformador no ponto eutético
[fármaco] <sub>eu</sub>	Concentração de fármaco no ponto eutético
ANOVA	Análise de variância
C <sub>eu</sub>	Concentrações eutéticas
CIN	Ácido cinâmico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>
DRXP	Difração de raios X de pó
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> ou calorimetria exploratória diferencial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	Espetroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
FUM	Ácido fumárico
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
INH	Isoniazida
INH-CIN	Cocristal de isoniazida e ácido cinâmico
INH-FUM	Cocristal de isoniazida e ácido fumárico
INH-NIC-FUM	Cocristal de isoniazida, nicotinamida e ácido fumárico
INH-PAS	Cocristal de isoniazida e ácido p-aminosalicílico
INH-RES	Cocristal de isoniazida e resveratrol
J <sub>s</sub>	Estado de fluxo constante
K <sub>a</sub>	Constante de ionização ácida
K <sub>sp</sub>	Produto da solubilidade
LD	Limite de detecção
Log P	Coefficiente de partição
LQ	Limite de quantificação
MCR	Método cristalização por reação
NIC	Nicotinamida
P	Coefficiente de permeabilidade
P <sub>eu</sub>	Ponto eutético
PAS	Ácido p-aminosalicílico
PBS	Tampão fosfato salino ( <i>phosphate buffered saline</i> )
pH <sub>max</sub>	Ponto de transição onde a solubilidade do fármaco é igual do cocristal
R	Coefficiente de correlação linear

RES	Resveratrol
S	Solubilidade
S*	Ponto de transição onde a solubilidade do fármaco é igual a do cocristal
S <sub>0</sub>	Solubilidade intrínseca
SA	Vantagem de solubilidade do cocristal em relação ao fármaco, $SA \equiv S_{\text{cocristal}}/S_{\text{fármaco}}$
S <sub>cocristal</sub>	Solubilidade do cocristal determinada no ponto eutético
S <sub>coformer</sub>	Solubilidade do coformador
SDDS	<i>Supersaturating Drug Delivery Systems</i>
S <sub>fármaco</sub>	Solubilidade do fármaco
S <sub>INH</sub>	Solubilidade da INH
TEER	Resistência elétrica transepitelial
T <sub>L</sub>	Tempo de latência
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 OBJETIVOS .....	25
1.1.1 Objetivo Geral .....	25
1.1.2 Objetivos Específicos .....	25
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>29</b>
2.1 COCRISTAIS: DEFINIÇÃO E ASPECTOS GERAIS .....	29
2.2 DESENHO E OBTENÇÃO DOS COCRISTAIS .....	31
2.3 SOLUBILIDADE E ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DOS COCRISTAIS .....	34
2.3.1 Ponto eutético .....	37
2.3.2 Produto de solubilidade ( $K_{sp}$ ) dos cocristais .....	38
2.3.3 Pontos de transição .....	39
2.3.3.1 $pH_{max}$ .....	40
2.4 APLICAÇÕES DOS COCRISTAIS .....	41
2.5 PELE .....	42
2.5.1 Aspectos anatômicos, histológicos e fisiológicos .....	42
2.5.2 Administração de fármacos através da pele .....	44
2.5.3 Vias de absorção de fármacos através da pele .....	45
2.5.4 Modelos para avaliação da permeação cutânea de fármacos .....	47
2.6 ISONIAZIDA .....	48
2.6.1 Indicações clínicas .....	48
2.6.2 Mecanismo de ação .....	49
2.6.3 Farmacocinética .....	49
2.6.4 Efeitos adversos .....	50
2.6.5 Aspectos físico-químicos .....	50
<b>3 SELEÇÃO, OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE ISONIAZIDA</b> .....	<b>55</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	55
3.2 METODOLOGIA .....	56
3.2.1 Materiais .....	56
3.2.2 Métodos .....	57
3.2.2.1 Seleção dos cocristais .....	57
3.2.2.2 Método de cocristalização .....	57
3.2.2.3 Técnicas de caracterização .....	58
3.2.2.3.1 Difração de raios x de pó (DRXP) .....	58
3.2.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	58

3.2.2.3.3 <i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR)</i> .....	59
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.4 CONCLUSÕES.....	71
<b>4 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE COCRISTAIS BINÁRIOS E TERNÁRIO DE ISONIAZIDA</b> .....	<b>75</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	75
4.2 METODOLOGIA.....	77
4.2.1 Materiais.....	77
4.2.2 Métodos.....	77
4.2.2.1 <i>Instrumentação e condições cromatográficas</i> .....	77
4.2.2.2 <i>Solubilidade da INH e coformadores</i> .....	78
4.2.2.3 <i>Solubilidade dos cocristais e determinação do <math>K_{sp}</math></i> .....	79
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.3.1 <b>Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de INH e coformadores</b> .....	<b>80</b>
4.3.2 <b>Solubilidade dos cocristais de INH e seus componentes</b> .....	<b>81</b>
4.3.2.1 <i>Solubilidade dos cocristais e <math>K_{sp}</math></i> .....	82
4.4 CONCLUSÕES.....	90
<b>5 ENSAIOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE ISONIAZIDA E COCRISTAIS EM CÂMARA DE DIFUSÃO DE FRANZ</b> .....	<b>95</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	95
5.2 METODOLOGIA.....	96
5.2.1 Materiais.....	96
5.2.2 Métodos.....	96
5.2.2.1 <i>Avaliação da estabilidade das misturas físicas em PBS</i> .....	96
5.2.2.2 <i>Ensaio de permeação cutânea ex vivo</i> .....	96
5.2.2.3 <i>Estudo da retenção cutânea ex vivo da INH</i> .....	98
5.2.2.4 <i>Análise Estatística</i> .....	98
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
5.4 CONCLUSÃO.....	115
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>117</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>119</b>
<b>APÊNDICE 1 - EQUAÇÕES DE PREDIÇÃO E DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE COCRISTAIS DE ISONIAZIDA E SEUS COMPONENTES</b> .....	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos medicamentos ainda permanece como um processo longo, custoso e complexo. Estima-se que cerca de 40% dos candidatos a fármacos não cheguem à etapa de comercialização devido a limitações relacionadas à farmacocinética, dentre as quais destaca-se a baixa solubilidade (GANESAN; BARAKAT, 2017). Visando aumentar a taxa de sucesso de novos produtos no mercado, modificações estruturais capazes de modular propriedades físico-químicas de fármacos têm sido realizadas pela indústria farmacêutica (KALE; ZODE; BANSAL, 2016). Dentre as estratégias de inovações incrementais, a cocristalização despertou crescente interesse das indústrias e da comunidade científica nas últimas duas décadas em função da possibilidade de otimizar as características biofarmacêuticas de um produto sem modificar sua estrutura molecular e/ou interação farmacológica (DUGGIRALA et al., 2016; ROCHA et al., 2016).

Cocristais farmacêuticos são compostos por um ingrediente farmacêutico ativo (IFA) e uma molécula formadora do cocristal, denominada coformador, cujo uso deve ser seguro em relação à toxicidade (ANVISA, 2017). Inúmeros trabalhos recentes utilizaram a cocristalização para a melhoria de diversas características de insumos farmacêuticos ativos (IFAs), tais como higroscopicidade, estabilidade e, em sua grande maioria, solubilidade (AITIPAMULA et al., 2012; GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO 2009; ZHOU et al., 2016). O impacto da cocristalização e a avaliação da influência dos coformadores na permeabilidade de fármacos foi, no entanto, avaliado em um limitado número de estudos (BANIK et al., 2016; DAI et al., 2016; DESIRAJU, 2017; FERRETTI et al., 2015; GOPI; BANIK; SAIKIA et al., 2015; SANPHUI et al., 2015). Em menor frequência ainda, explorou-se a cocristalização como estratégia para a modulação da permeação cutânea de fármacos. Apenas dois relatos foram encontrados até o momento (DAI et al., 2016; YAN; CHEN; LU, 2013).

De forma geral, a seleção de coformadores ocorre com foco nos grupamentos moleculares capazes de interagir com o fármaco via ligações de hidrogênio, considerando o coformador como molécula neutra e sem ação complementar à do fármaco (ROCHA et al., 2016).

Porém, a ampla variedade de coformadores utilizados na cocristalização pode permitir que se faça a seleção de moléculas com características físico-químicas bastante distintas, como promotores e retardadores de permeação. Desta forma, existe a oportunidade de explorar a cocristalização como ferramenta para modular a permeação cutânea de fármacos, com posterior direcionamento para uma ação tópica ou sistêmica.

Adequada a este propósito, a isoniazida (INH) representa um fármaco modelo interessante tendo em vista sua estrutura química que permite a formação de uma ampla variedade de ligações de hidrogênio (SARCEVICA et al., 2013). Além disto, a aplicação cutânea surge como alternativa promissora em relação à via oral por possibilitar a redução da hepatotoxicidade, efeito adverso associado à baixa adesão ao tratamento com INH pelos pacientes portadores de tuberculose (CAI et al., 2012; CAON et al., 2015; GÜLBAY et al., 2006).

Neste contexto, esta dissertação se propôs a avaliar o impacto da cocristalização na solubilidade termodinâmica e permeação cutânea de fármacos utilizando coformadores “inteligentes”, os quais podem ser capazes de exercer uma ação sinérgica ou antagônica àquela do IFA no que se refere à absorção através da pele. Esta dissertação foi organizada em quatro capítulos, a considerar: Capítulo I – revisão da literatura; Capítulo II – seleção, obtenção e caracterização de cocristais de isoniazida; Capítulo III – predição e determinação da solubilidade aquosa de cocristais binários e ternário de isoniazida; Capítulo IV – ensaios de permeação cutânea *ex vivo* de isoniazida e cocristais em câmara de difusão de Franz.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da cocristalização utilizando coformadores “inteligentes” na solubilidade termodinâmica e permeação cutânea da isoniazida.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar levantamento de todos os cocristais de isoniazida já relatados;
- Selecionar cocristais de isoniazida com potencial para uma aplicação tópica, considerando coformadores que já apresentem uma ação promotora ou retardadora reconhecida;
- Padronizar um método para o preparo dos cocristais farmacêuticos;
- Caracterizar os cocristais obtidos, fármaco e coformadores por técnicas térmicas, cristalográfica e espectroscópica;
- Desenvolver e validar métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de fármaco e coformadores;
- Determinar a solubilidade e estabilidade termodinâmica dos cocristais através de métodos de equilíbrio;
- Propor modelos matemáticos para predição da solubilidade dos cocristais em meio aquoso considerando diferentes valores de pH;
- Avaliar o poder preditivo dos modelos matemáticos através da comparação dos valores calculados com os resultados experimentais;
- Avaliar a permeação cutânea do fármaco puro e dos cocristais utilizando câmaras de Franz e pele de orelha de porco;

- Correlacionar os resultados encontrados nos experimentos de solubilidade e de permeação;
- Direcionar os cocristais avaliados para utilização em formulações tópicas ou sistêmicas com base nos resultados obtidos.

**CAPÍTULO I**  
**REVISÃO DA LITERATURA**

---



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

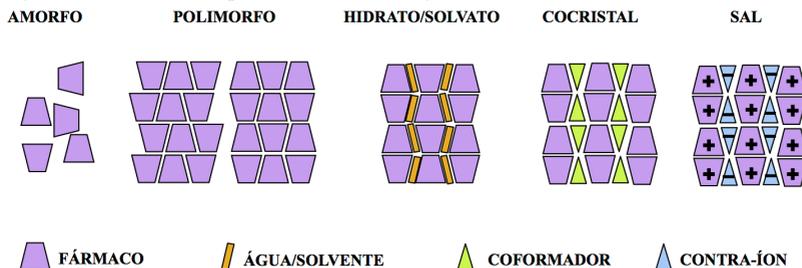
### 2.1 COCRISTAIS: DEFINIÇÃO E ASPECTOS GERAIS

Em 1844, Wöhler sintetizou a quinidrona, complexo molecular formado por quinona e hidroquinona e que, mais tarde, seria o primeiro cocristal depositado no banco de dados de estruturas cristalinas da Cambridge (CSD) (NANGIA, 2010). Embora tenham sido relatados há muito tempo na literatura, os cocristais tornaram-se populares a partir de 1990, quando Margaret C. Etter estudou extensivamente o papel das interações de hidrogênio na obtenção de cristais multicomponentes (ETTER, 1991; ETTER; FRANKENBACH, 1989).

Desde então, a definição de cocristal tem sido intensamente discutida pela comunidade científica. No guia publicado recentemente, o FDA define cocristais como materiais cristalinos compostos por duas ou mais moléculas diferentes na mesma estrutura cristalina e que estão associadas por ligações não iônicas e não covalentes (FDA, 2016). Segundo Aitipamula et al. (2012), cocristais consistem em materiais cristalinos homogêneos, formados por dois ou mais compostos em proporção estequiométrica definida e que são sólidos em condições ambientes (25 °C/1 atm), conceito este considerado menos simplista e mais adequado (AITIPAMULA et al., 2012). No caso dos cocristais farmacêuticos, o componente alvo é um ingrediente farmacêutico ativo (IFA) e a molécula formadora do cocristal (coformador) deve ser farmacêuticamente aceitável em relação à toxicidade (BRASIL, 2017; FDA, 2016).

Além dos cocristais, diversos arranjos das moléculas no estado sólido são conhecidos (Figura 1) e utilizados pela indústria farmacêutica por apresentarem diferentes propriedades físico-químicas (DATTA; GRANT, 2004).

Figura 1 - Desenho esquemático dos arranjos moleculares no estado sólido.



Adaptado de: Willians et al. (2013).

Cocrystalis, ao contrário de sais, possibilitam a obtenção de novas espécies cristalinas com fármacos neutros e não somente com moléculas ionizáveis (BLAGDEN; COLES; BERRY, 2014). Além disso, os cocrystalis podem apresentar grande estabilidade termodinâmica no estado sólido, diferente dos sólidos amorfos, e aumentam a solubilidade em uma proporção muito maior quando comparados com os polimorfos (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009). Do ponto de vista regulatório, um cocrystalis farmacêutico é classificado de forma semelhante a um polimorfo do IFA, não sendo considerado como um novo IFA. No caso de cocrystalis compostos por dois ou mais IFAs, classificam-se como um produto de dose fixa combinada (BRASIL, 2017; FDA, 2016).

Outro aspecto importante para a indústria farmacêutica é que os cocrystalis satisfazem os três critérios necessários para a obtenção de patentes, pois são inovadores (nova forma cristalina), não-óbvios (exibem distintas propriedades físico-químicas) e possuem aplicabilidade (atividade farmacológica e/ou performance aprimoradas em relação ao fármaco puro) (DUGGIRALA et al., 2016). O crescente número de patentes (>1650 até abril de 2016) e publicações (>2000 até abril de 2016) neste tema salienta a atenção dada aos cocrystalis tanto pela indústria farmacêutica quanto pelo meio acadêmico (KALE; ZODE; BANSAL, 2016).

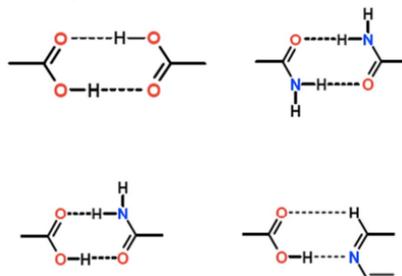
Estima-se que, devido à regulamentação e avanços recentes no âmbito dos cocrystalis farmacêuticos, diversos produtos registrados como sais possam ser, de fato, cocrystalis. Já existem produtos registrados como cocrystalis, como por exemplo o Entresto<sup>®</sup>, o qual é composto de sacubitril monossódico, valsartana dissódica e água. Este

medicamento foi aprovado em 2015 pelo FDA para o tratamento da insuficiência cardíaca. Outros exemplos de produtos formados por dois componentes cocristalizados são o medicamento Depakote<sup>®</sup>, destinado ao tratamento de episódios de mania associados ao transtorno afetivo bipolar, o anti-diabético ertuglifozin, atualmente em testes clínicos de fase III, e o Nootroo<sup>®</sup> Pure Energy, comercializado como cocristal de cafeína e pterostilbeno e utilizado para melhorar a memória e a cognição em pessoas com declínio cognitivo (BLAGDEN; COLES; BERRY, 2014; BOWLES et al., 2014; DUGGIRALA et al., 2016; EMA, 2015; NANGIA; BOLLA, 2016; NOOTROO, 2017).

## 2.2 DESENHO E OBTENÇÃO DOS COCRISTAIS

A primeira etapa para a obtenção de um cocristal farmacêutico consiste na identificação de coformadores que apresentem grupamentos complementares capazes de formar ligações de hidrogênio com o fármaco, principal modo de interação intermolecular observada nestes sólidos. Existem padrões de interações não covalentes entre grupos funcionais, chamados de *synthons* supramoleculares, os quais contribuem para a formação do cocristal. *Synthons* compostos por dois grupos funcionais iguais são definidos como *homosynthons*, enquanto que *heterosynthons* são formados entre dois grupos funcionais diferentes (DESIRAJU, 1995, 1997). Os principais *synthons* observados em cocristais farmacêuticos são ácido-amida, ácido-ácido, amida-amida, e ácido-piridina (Figura 2) (ALMARSSON; ZAWOROTKO, 2004).

Figura 2 – Principais *synthons* supramoleculares formados por ácidos carboxílicos, amidas e piridina.

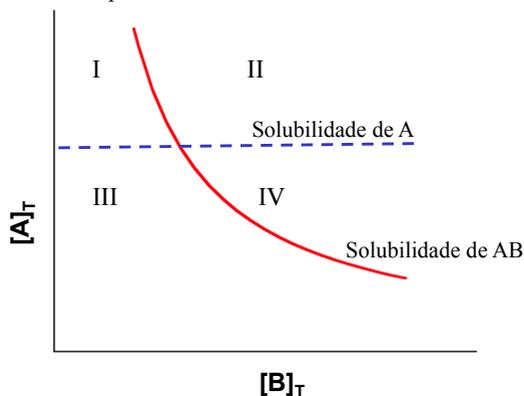


Fonte: Kuminek et al. (2015).

Outro parâmetro comumente utilizado para guiar o desenho do cocristal é o  $\Delta pK_a$  ( $pK_{a,base} - pK_{a,\acute{a}cido}$ ) entre fármaco e coformador.  $\Delta pK_a < 0$  aponta para a formação de um cocristal visto que a transferência de prótons é substancialmente reduzida, enquanto  $\Delta pK_a > 3$  tende a resultar em um sal. Na região de  $\Delta pK_a$  entre 0 e 3, a capacidade de prever o material resultante é limitada (CRUZ-CABEZA, 2012).

Após a seleção de fármaco e coformador, a obtenção do cocristal pode ser realizada por diversos métodos, tais como reações de cristalização em solução, moagem, exposição à umidade, fluido supercrítico, fusão, micro-ondas e ultrassom (CHILDS; MOUGIN; STAHLY, 2005; GOOD; MIRANDA; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2011; ISSA, 2012; JAYSANKAR; GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2007; LU; RODRÍGUEZ-HORNEDO; SURYANARAYANAN, 2008; PADRELA et al., 2009; PAGIRE et al., 2013). O presente trabalho aborda principalmente o método de cristalização em solução denominado método de cristalização por reação (MCR) (RODRÍGUEZ-HORNEDO et al., 2006). A principal vantagem do MCR frente aos outros métodos é a formação de cocristais sem que ocorra a cristalização dos componentes isolados. Além disso, o MCR apresenta ótimo rendimento e é passível de escalonamento (CHILDS; HARDCASTLE, 2007; CHILDS et al., 2008). Este método fundamenta-se na geração de supersaturação da solução em relação ao cocristal a ser formado, enquanto a solução encontra-se apenas saturada ou insaturada em relação aos componentes do cocristal. O diagrama de solubilidade de fases do cocristal (Figura 3) no qual este método é baseado, demonstra as condições de insaturação, saturação e supersaturação com relação ao cocristal e/ou às fases cristalinas individuais.

Figura 3 - Diagrama de solubilidade de fases de um cocristal AB e do fármaco A. Assume-se que a solubilidade do fármaco A ( $[A]_T$ ) é independente da concentração de coformador  $[B]_T$  em um determinado solvente. Regiões: I - solução supersaturada em relação ao fármaco, o cocristal pode converter em fármaco; II: solução supersaturada em relação ao fármaco e cocristal; III - solução abaixo da saturação; IV- solução supersaturada em relação ao cocristal, o fármaco pode transformar-se em cocristal.



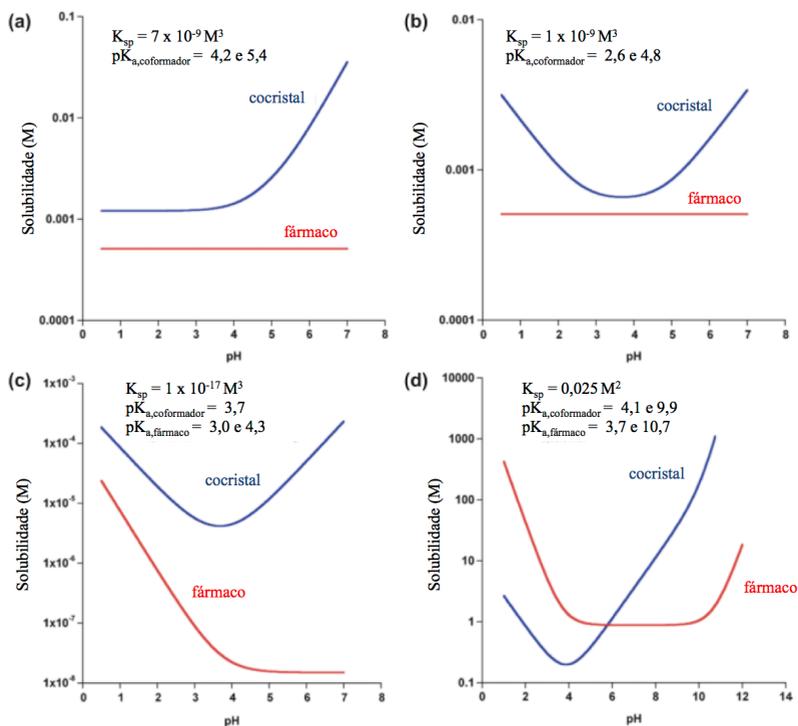
Fonte: Adaptado de Nehm; Rodríguez-Spong e Rodríguez-Hornedo (2006).

A cristalização ocorre em condições supersaturadas, ao passo que a dissolução acontece em condições de insaturação. Pela análise da Figura 3, é possível observar que o domínio I é supersaturado em relação ao componente A (fármaco) e insaturado para o cocristal (AB). Ambos, A e AB, estão supersaturados no domínio II, mas insaturados no domínio III. Por fim, o domínio IV é supersaturado com relação à AB, mas insaturado com relação a A. Desta forma, pode-se preparar soluções de reagentes A e B de modo que as concentrações se encontrem na região IV e ocorra a supersaturação unicamente relacionada ao cocristal. Nesta condição, as fases sólidas A e B podem transformar-se em cocristal (AB) através de reação mediada em solução. Enquanto o cocristal AB é formado, A e B em solução são consumidos e mais reagentes dissolvem-se até que o processo alcance o estado de equilíbrio determinado pela curva de solubilidade do cocristal (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2009; ROCHA et al., 2016; RODRÍGUEZ-HORNEDO et al., 2006).

### 2.3 SOLUBILIDADE E ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DOS COCRISTAIS

Cocristais são sólidos versáteis, capazes de modular a solubilidade do fármaco de acordo com o coformador utilizado e do comportamento de ambos os componentes em solução como: dissociação, complexação, ionização e solubilização micelar (ROY; LIPERT; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2012). A vantagem em ter a concentração de fármaco aumentada ou reduzida em determinada solução depende de fatores como a via de administração do medicamento e do perfil de liberação desejado. Por exemplo, é desejável uma alta solubilidade do cocrystal para um perfil de liberação imediata, ao passo que um cocrystal com solubilidade reduzida pode ser aplicável à liberação lenta e/ou sustentada (SUN, 2012). Cocristais podem exibir um perfil de solubilidade pH-dependente completamente diferente do fármaco puro quando o coformador é ionizável (Figura 4). No caso de cocrystalização de um fármaco neutro com coformador ácido (Figura 4 a), a solubilidade do cocrystal aumentará com o aumento do pH. Para coformadores anfotéricos, no entanto, a curva de solubilidade exibirá um perfil em U (Figura 4 b). Quando o fármaco apresenta grupamentos ionizáveis, tais mudanças também ocorrem, resultando em um perfil em U. Isto acontece para casos de fármaco básico e coformador ácido (Figura 4 c) e fármaco zwitteriônico e coformador ácido (Figura 4 d), por exemplo (BETHUNE et al., 2009).

Figura 4 - Diferentes perfis de solubilidade em função do pH para: a) cocristal de fármaco neutro com coformador ácido diprótico; b) cocristal de fármaco neutro com coformador zwitteriônico; c) cocristal de fármaco básico com coformador ácido diprótico; d) cocristal de fármaco zwitteriônico com coformador ácido diprótico.



Fonte: Adaptado de Bethune et al. (2009).

Após a obtenção de um cocristal que apresente a solubilidade desejada, deve-se tomar cuidado em relação à instabilidade termodinâmica em solução, a qual é caracterizada pela conversão aos componentes individuais do cocristal (BHARDWAJ; LIPERT; BAK, 2017). Cocristais altamente solúveis sofrem rápida conversão para a forma menos solúvel do fármaco quando expostos à solução, representando a principal barreira no desenvolvimento destes sistemas (HUANG; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010; WILLIAMS et al., 2013). Estes cocristais são considerados formas metaestáveis, e

pertencem ao grupo de sistemas que promovem supersaturação, do inglês "*Supersaturating Drug Delivery Systems*" (SDDS), caracterizados pela baixa estabilidade termodinâmica em solução (ROY; LIPERT; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2012).

Por essa razão, cocristais altamente solúveis nem sempre são a melhor opção para o desenvolvimento de uma nova formulação, uma vez que a elevada solubilidade pode estar associada a riscos desnecessários de instabilidade. A vantagem de solubilidade do cocristal em relação ao fármaco, do inglês "*solubility advantage*" (SA), é um indicativo do potencial dos cocristais sofrerem conversão ao componente mais estável quando em contato com solução. Uma série de estratégias, como a utilização de agentes solubilizantes (surfactantes, polímeros, lipídios, etc.), podem ser exploradas para evitar ou minimizar tais problemas de conversão de fase sólida através da modificação da SA para valores menores mantendo o cocristal mais solúvel que o fármaco. Em outras palavras, o ideal é que se alcance um equilíbrio entre os parâmetros de solubilidade e estabilidade termodinâmica (KUMINEK et al., 2015).

Diante disso, deve-se ter cuidado ao utilizar experimentos cinéticos para avaliar a solubilidade de cocristais. Apesar de amplamente utilizado (CHENEY et al., 2010; MARTIN et al., 2013; WEYNA et al., 2012), o método cinético pode subestimar a solubilidade de cocristais altamente solúveis. À medida que o cocristal se dissocia em solução, gera-se uma supersaturação em relação ao fármaco (a concentração de fármaco proveniente do cocristal excede a solubilidade do fármaco), que pode precipitar imediatamente. Dessa forma, a concentração em solução se aproxima à solubilidade do fármaco e não reflete a solubilidade do cocristal. Nesse contexto, estudos demonstram que o método termodinâmico, o qual utiliza concentrações eutéticas<sup>1</sup> para a determinação da solubilidade dos cocristais metaestáveis são mais confiáveis (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010; HUANG; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010).

A partir dos experimentos termodinâmicos em condições de equilíbrio, é possível obter informações a respeito do comportamento e estabilidade dos cocristais em solução, as quais são fundamentais

---

<sup>1</sup> Concentrações eutéticas referem-se às concentrações dos componentes do cocristal ( $[\text{fármaco}]_{\text{eu}}$  e  $[\text{coformador}]_{\text{eu}}$ ) quantificadas sob condições de equilíbrio em um ponto denominado ponto eutético, que será discutido no próximo tópico deste capítulo (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2009).

para delinear estudos cinéticos com segurança, sem que transições de fase influenciem os resultados da solubilidade destes sistemas (ROY; LIPERT; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2012).

### 2.3.1 Ponto eutético

O ponto eutético ( $P_{eu}$ ) é um sistema em que duas fases sólidas coexistem em equilíbrio com uma solução, a partir do qual a solubilidade do cocrystal pode ser acessada (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010). O cocrystal pode apresentar dois ou mais pontos eutéticos (dependendo da quantidade de componentes do cocrystal), os quais podem ser acessados por coformador + cocrystal ou fármaco + cocrystal sólidos em equilíbrio com a solução. Na maioria dos casos, utiliza-se o  $P_{eu}$  que envolve o equilíbrio entre fármaco e cocrystal, pois o fármaco é geralmente o componente com menor solubilidade aquosa. O  $P_{eu}$  representa o ponto de intersecção das curvas de solubilidade do fármaco e do cocrystal ( $S_{cocrystal} = S_{fármaco}$ ) ou do coformador e do cocrystal ( $S_{cocrystal} = S_{coformador}$ ) (KUMINEK et al., 2015). Este ponto pode ser acessado através da medida da concentração de cada componente do cocrystal ( $[fármaco]_{eu}$  e  $[coformador]_{eu}$ ) quando o sistema encontra-se em equilíbrio (NEHM; RODRÍGUEZ-SPONG; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2006).

Além de ser uma abordagem segura, a determinação da solubilidade no  $P_{eu}$  pode ser executada com pequenas quantidades de fármaco/coformador e cocrystal e em pequenos volumes de solução. Vale ressaltar que a determinação do pH, da temperatura e a análise das fases sólidas presentes em equilíbrio são imprescindíveis. Por meio de difração de raios X de pó (DRXP), calorimetria exploratória diferencial (DSC) ou espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é possível verificar se a fase sólida permanece composta por fármaco + cocrystal ou coformador + cocrystal, garantindo assim que o sistema está em equilíbrio e encontra-se no  $P_{eu}$  (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010).

A partir das concentrações eutéticas de fármaco e coformador, obtém-se o produto de solubilidade do cocrystal ( $K_{sp}$ ). Para cocrystal menos solúveis que o fármaco, o mesmo  $K_{sp}$  pode ser obtido pela abordagem convencional de medida de solubilidade, com a simples suspensão de cocrystal até que o sistema alcance o equilíbrio. Esta estratégia mais simples torna-se possível pois, neste caso, após a

dissolução dos componentes do cocristal, a concentração de fármaco na solução permanece abaixo da sua solubilidade intrínseca. Na ausência de supersaturação, não há cristalização dos componentes isolados, e pode-se mensurar a solubilidade do cocristal a partir da dissolução do mesmo.

Uma vez obtido o  $K_{sp}$ , este valor pode ser aplicado a modelos matemáticos de predição da solubilidade de cocristais em qualquer valor de pH, os quais encontram-se bem descritos na literatura (BETHUNE et al., 2009; GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2009; 2010).

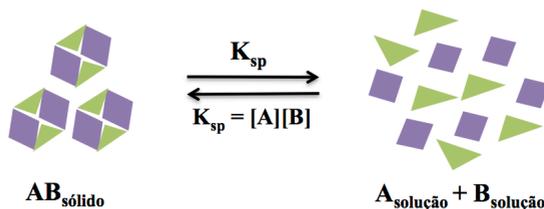
### **2.3.2 Produto de solubilidade ( $K_{sp}$ ) dos cocristais**

O equilíbrio químico de um cocristal em solução é descrito pelo produto de solubilidade ( $K_{sp}$ ), associado ao equilíbrio ácido ou base para os cocristais cujos componentes são ionizáveis (NEHM; RODRÍGUEZ-SPONG; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2006). O  $K_{sp}$  consiste no produto da concentração molar dos componentes do cocristal e pode ser calculado utilizando as concentrações de fármaco e coformadores (frações não ionizadas) obtidas nos experimentos de solubilidade.

A etapa inicial para desenvolver equações capazes de prever a solubilidade dos cocristais é conhecer o processo de dissociação e ionização dos componentes do cocristal e descrever as reações de equilíbrio químico envolvidas no sistema em estudo. Conceitos das reações de equilíbrio químico em solução descrito por Henderson-Hasselbach são utilizados para este propósito (BUTLER, 1964).

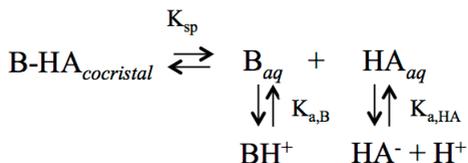
Durante a dissolução, os cocristais dissociam-se em fármaco e coformador, e o equilíbrio entre cocristal sólido e seus componentes em solução é descrito pela constante  $K_{sp}$  (Figura 5).

Figura 5 – Representação da dissociação do cocristal sólido em seus componentes em solução, descrita pelo  $K_{sp}$ .



Desse modo, o equilíbrio para um cocristal de fármaco básico (B) e coformador ácido monoprotóico (HA) envolve as etapas de dissociação do complexo BHA, regida pelo  $K_{sp}$ , seguida pela ionização dos seus componentes em solução de acordo com a constante de ionização ( $K_a$ ) dos mesmos e o pH da solução (Figura 6).

Figura 6 – Reações de equilíbrio de um cocristal de fármaco básico (B) e coformador ácido (HA). Primeiramente o cocristal dissocia-se em seus componentes em solução, seguido da ionização dos mesmos.



Assim, obtém-se o  $K_{sp}$  a partir da multiplicação das espécies não ionizadas de fármaco e coformador medidas no experimento de solubilidade no  $P_{eu}$ . Juntamente com o  $K_{sp}$ , as constantes de ionização dos componentes do cocristal e o pH da solução determinam a solubilidade do cocristal.

### 2.3.3 Pontos de transição

A solubilidade de um cocristal pode ser menor, igual ou maior que o fármaco que o compõe dependendo das condições da solução. Concentração de coformador, pH e presença de agentes solubilizantes são fatores capazes de induzir os chamados pontos de transição dos

cocristais. Nos pontos de transição, as solubilidades do fármaco e cocrystal são iguais e, acima ou abaixo dos mesmos, a relação de solubilidade se inverte e a fase até então mais estável passa a ser a mais solúvel (BETHUNE et al., 2009; ROY; LIPERT; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2012).

O conhecimento dos pontos de transição fornece importantes dados a respeito da estabilidade dos cocristais em solução e como modulá-la. Esses pontos são conhecidos como indicadores de estabilidade de formas sólidas, assim como a temperatura de transição vítrea está para amorfos, por exemplo. Estes pontos de transição podem ser (KUMINEK et al., 2015):

- (1)  $pH_{max}$ : gerado pela ionização dos componentes do cocrystal;
- (2)  $S^*$  e CEC: criados pela adição de agentes solubilizantes que promovem a solubilização preferencial do fármaco em relação ao coformador.

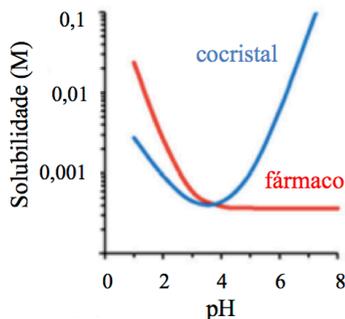
No presente trabalho, explorou-se apenas o  $pH_{max}$  já que o uso de agentes solubilizantes foi dispensado.

### 2.3.3.1 $pH_{max}$

O  $pH_{max}$  representa o valor de pH onde a solubilidade do fármaco ou coformador se iguala à solubilidade do cocrystal. O  $pH_{max}$  é dependente do  $K_{sp}$ , da solubilidade aquosa do fármaco/coformador e dos valores de  $pK_a$  dos componentes do cocrystal.

Um dado cocrystal pode apresentar mais de um valor de  $pH_{max}$ , por exemplo, um ponto de transição entre cocrystal e fármaco e outro entre cocrystal e coformador. A Figura 7 demonstra um exemplo de cocrystal composto por fármaco básico e coformador ácido. O  $pH_{max}$  encontra-se no ponto de intersecção entre as duas curvas de solubilidade. Em  $pH < pH_{max}$  o cocrystal é a fase mais estável e menos solúvel que o fármaco, enquanto em  $pH > pH_{max}$  esta relação se inverte.

Figura 7 - Influência do pH na solubilidade e estabilidade termodinâmica do cocrystal. O cocrystal é termodinamicamente estável quando  $S_{\text{cocrystal}} \leq S_{\text{fármaco}}$ . O  $\text{pH}_{\text{max}}$  é a interseção entre as curvas de solubilidade abaixo representadas.



Fonte: adaptado de Kuminek et al. (2016).

Vale ressaltar que o  $\text{pH}_{\text{max}}$  não é uma propriedade físico-química exclusiva dos cocrystalis, mas também um parâmetro bem descrito na literatura que identifica regiões de estabilidade de sais farmacêuticos.

## 2.4 APLICAÇÕES DOS COCRISTAIS

Melhorias na taxa de dissolução, higroscopicidade, compressibilidade, estabilidade química, biodisponibilidade e solubilidade têm sido relatadas com o uso da cocrystalização, sendo esta última a mais explorada pela área farmacêutica (CHOW et al., 2012; GAO; ZU; ZHANG, 2011; GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO 2009; HICKEY et al., 2007; KARKI et al., 2009). Sabe-se que a solubilidade influencia diretamente a eficácia terapêutica do fármaco. Porém, a absorção do IFA, seja por membrana gastrointestinal ou através da pele, depende também de outra propriedade cuja avaliação é igualmente importante: a permeabilidade/permeação. O estudo do impacto da cocrystalização e dos coformadores na permeabilidade de fármacos ainda é incipiente (BOLLA; NANGIA, 2016).

Com relação à avaliação da permeabilidade, o emprego dos cocrystalis farmacêuticos administrados pela via percutânea é ainda mais escasso. Até o momento, há relatos de apenas dois trabalhos com este enfoque, ambos com objetivo de favorecer a absorção transdérmica dos fármacos. Em estudo realizado por Yan e

colaboradores (2013), cocristais de aciclovir apresentaram maiores taxa de dissolução e permeabilidade através da pele de ratos em comparação ao fármaco puro. Dai et al (2016) utilizaram membranas de silicone para mimetizar a pele e verificaram que cocristais de 5-fluorouracil com coformadores lipofílicos melhoraram efetivamente a permeação do fármaco. Sistemas cocristalinos visando ação tópica ainda não foram relatados.

Apesar de promissora, mais estudos são necessários para consolidar a aplicação da cocristalização como estratégia para modular a permeação cutânea de fármacos. Nesse contexto, fármacos que possam ser aplicados na pele, visando ação tópica ou transdérmica são ótimos candidatos.

## 2.5 PELE

A pele consiste na mais ampla interface entre o organismo e o ambiente externo. Além de ser o maior órgão do corpo humano em extensão e em peso, a pele é uma barreira protetora contra perda de água e ataques físicos, químicos, microbiológicos e de raios ultravioletas, bem como está envolvida na termorregulação corporal e em funções sensoriais (tato, calor, frio, dor). Sua composição e espessura são variáveis de acordo com a região do corpo (HADGRAFT; LANE, 2005).

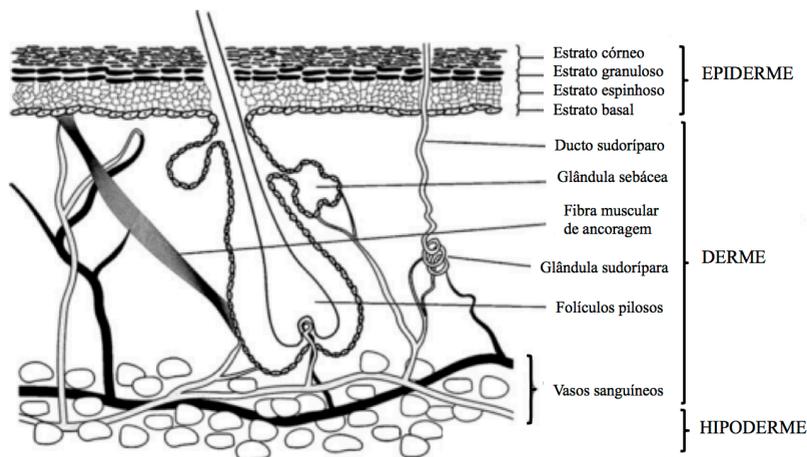
Compreender os processos de absorção cutânea é imprescindível para explorar a administração de fármacos através da pele visando ação local ou efeito sistêmico. Na área das ciências farmacêuticas, sistemas tópicos e transdérmicos têm recebido crescente destaque devido à alta aceitação pelos pacientes (SCHAEFER et al., 2008).

### 2.5.1 Aspectos anatômicos, histológicos e fisiológicos

A pele é composta por duas principais camadas, a epiderme (mais externamente) e a derme, camada mais profunda (Figura 8). A epiderme é formada por várias camadas de células, incluindo o estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso (camada espinhosa), estrato granuloso (camada granular) e estrato córneo. A derme é composta por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel

interfibrilar formada por glicosaminoglicanas, sais e água (HADGRAFT; LANE, 2005). Além disto, a derme é intensamente vascularizada e contém terminações nervosas, glândulas sudoríparas e sebáceas, bem como folículos capilares (MOSER et al., 2001).

Figura 8 – Representação esquemática das camadas da pele e seus apêndices.



Adaptado de: EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS (2008)

O estrato córneo é constituído por queratinócitos ou corneócitos, embebidos em uma matriz lipídica intercelular composta por ácidos graxos, colesterol, triglicérides e ceramidas. Esta camada possui espessura média de 10-25  $\mu\text{m}$ , e representa a principal barreira física frente à entrada de substâncias através da pele e à perda de água (BERGH et al., 1997; SCHAEFER et al., 2008).

Abaixo do estrato córneo há o que se chama de epiderme viável. Durante um período de 28 dias, as células originárias do estrato germinativo migram em direção à superfície da pele, sofrendo um processo de corneificação e/ou queratinização. Ao longo deste processo, as células perdem seu núcleo, tornam-se achatadas, liberam lipídeos para o espaço intercelular (estrato granuloso) e por fim, tornam-se cornificadas formando o estrato córneo. Além disso, na epiderme viável encontram-se os melanócitos, produtores de melanina, e as células de Langerhans, responsáveis pela resposta imune da pele (SCHAEFER et al., 2008). Visto que a epiderme é avascular, sua

viabilidade é assegurada pela difusão de nutrientes a partir da derme (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

A derme é constituída por uma matriz de tecido conectivo (fibras elásticas, colágenas, reticulares, pré-elásticas e de ancoragem), vasos sanguíneos e linfáticos, e nervos (MONTEIRO-RIVIERE, 2006). Dependendo do local do corpo, a espessura da derme pode variar de 3 a 5 mm (SCHAEFER et al., 2008).

Predominantemente adiposa, a hipoderme funciona como reserva energética e atua na proteção contra traumas físicos (MONTEIRO- RIVIERE, 2006).

Os folículos pilosos e ductos sudoríparos estendem-se por todas as camadas da pele e comunicam-se com o exterior pela superfície cutânea, constituindo assim uma rota de absorção de substâncias (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

### **2.5.2 Administração de fármacos através da pele**

Embora a aplicação de substâncias na pele ocorra desde a antiguidade, tornou-se mais popular somente a partir do século 20 com o advento dos adesivos transdérmicos. Atualmente, aproximadamente 20 fármacos já foram incorporados com êxito em sistemas transdérmicos e são absorvidos pela pele para o tratamento de uma série de enfermidades (PATORE; ROBERTS, 2017).

A utilização da pele como via de administração de fármacos é atrativa não somente para patologias locais (administração tópica), mas também para quando se deseja um efeito sistêmico (administração transdérmica) (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). Formulações dermatológicas ou produtos tópicos atuam nas distintas camadas da pele e/ou nos apêndices cutâneos, ao passo que, os produtos transdérmicos necessitam da absorção percutânea do fármaco em concentrações suficientes para se obter um efeito terapêutico (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; BABY et al., 2008; PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1994).

Em comparação com outras vias de administração de fármacos, a aplicação transdérmica apresenta uma série de vantagens, pois é um sistema não-invasivo, pode ser auto-administrado, evita o metabolismo hepático de primeira passagem, pode proporcionar a liberação de fármacos por longos períodos de tempo (até uma semana), e contribui

para uma maior adesão dos pacientes ao tratamento (PRAUSNITZ; LANGER, 2009).

O processo de absorção percutânea envolve as etapas de liberação do fármaco do veículo, seguida da penetração através das barreiras da pele e, por fim, a ação farmacológica. Para que todas as etapas possam garantir a eficácia terapêutica do fármaco, deve-se considerar aspectos referentes à natureza físico-química do IFA, ao veículo utilizado, às condições da pele, às interações pele/fármaco e pele/veículo (AULTON, 2005).

Quando se trata de fármacos ionizáveis, a permeação cutânea também é determinada pelo pH da formulação. Isto ocorre pois o pH influencia na ionização e conseqüentemente, na solubilidade e quantidade de fármaco disponível para ser absorvida através da pele. De maneira geral, quanto maior a fração ionizada de uma substância, maior será a solubilidade da mesma. Por outro lado, substâncias não ionizadas normalmente possuem maior capacidade de penetração pelas membranas biológicas. Para a via tópica, apesar do grande número de formulações disponíveis comercialmente, esta relação entre pH, solubilidade e permeabilidade é pouco documentada (CORNELIO; MAYORGA, 2007; HADGRAFT; VALENTA, 2000).

### **2.5.3 Vias de absorção de fármacos através da pele**

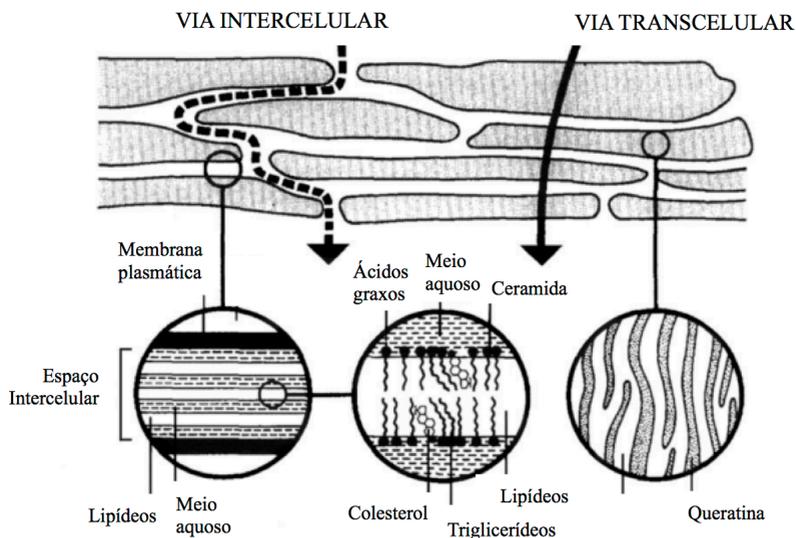
A eficácia de um medicamento tópico ou transdérmico depende da disponibilidade do fármaco no local de ação. Em outras palavras, é necessário que a substância ativa seja liberada na pele em condições adequadas para exercer o efeito farmacológico desejado (ALBERTI et al., 2001). Para que isto ocorra, deve ocorrer a liberação ou cedência do fármaco a partir da formulação, o que por sua vez depende do veículo utilizado e do modo de preparo da mesma. Após a liberação, a disponibilidade local do fármaco será determinada pela sua capacidade de penetração através das camadas da pele (BEMVINDO, 2006).

A etapa inicial da permeação de fármacos através da pele ocorre no estrato córneo, a partir do qual a substância pode difundir para as camadas profundas da epiderme até atingir a derme. Nos casos em que o fármaco alcança a camada vascularizada da derme, o mesmo pode tornar-se disponível na circulação para exercer efeito sistêmico (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

O transporte de moléculas através da pele pode ocorrer por três rotas principais: via transcelular (difusão através das células), intercelular (difusão entre as células) e transanexial (difusão através dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, e anexos pilosebáceos) (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007). Pela via transcelular, as moléculas atravessam as membranas das células, cujo interior é hidrofílico enquanto que, na rota intercelular, as moléculas interagem com a matriz intercelular lipídica (BARRY, 2002).

Devido à grande área superficial, as vias transcelular e intercelular (Figura 9) são responsáveis pela maior parte da permeação de moléculas. A via intercelular é predominantemente utilizada por apresentar regiões hidrofílicas e lipofílicas na estrutura da bicamada, o que possibilita a permeação de substâncias com distintos valores de coeficiente de partição ( $\log P$ ) (SCHAEFER et al., 2008).

Figura 9 - Rotas de penetração de moléculas através do estrato córneo.



Adaptado de: EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS (2008).

Sob condições normais, a permeação através dos anexos não é muito significativa devido à reduzida predominância dos mesmos na

pele (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008). No entanto, moléculas muito grandes e partículas de dimensões coloidais podem ter a rota folicular como alvo. Otberg et al. (2004) mostraram que o número de folículos, o diâmetro de abertura e o volume folicular são fatores que interferem na liberação de fármacos nestes apêndices.

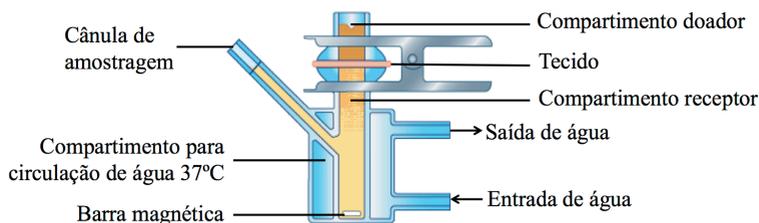
Muito embora alguns autores sugiram que, devido à constituição predominantemente lipídica das membranas, as moléculas hidrofóbicas atravessariam a pele com maior velocidade que as hidrofílicas, é necessário avaliar com cautela a influência das características de cada fármaco na taxa de penetração, incluindo o coeficiente de partição e tamanho das moléculas (WELLING, 1997; BARRY, 2002). Nos últimos anos, avanços importantes foram alcançados no sentido de compreender a permeação transdérmica de solutos hidrofílicos. Entretanto, a administração transdérmica de fármacos de caráter hidrofílico permanece um desafio em comparação às moléculas hidrofóbicas (CHEN; HAN; LIAN, 2013; PRAUSNITZ; LANGER, 2009).

#### **2.5.4 Modelos para avaliação da permeação cutânea de fármacos**

A fim de desenvolver produtos de aplicação tópica e transdérmica, faz-se necessário uma avaliação prévia do comportamento biofarmacêutico de uma formulação no que diz respeito à permeação do fármaco e adjuvantes (STORPIRTIS ET AL., 2009). O modelo vertical de câmaras de difusão proposto por Franz em 1975 ainda é um dos sistemas mais utilizados para estudos de permeabilidade e permeação *ex vivo* (FRANZ, 1975).

O modelo de câmaras de difusão de Franz (Figura 10) compreende dois compartimentos, doador e receptor, entre os quais a porção de interesse do tecido (membrana sintética ou pele humana ou animal) é colocada com o estrato córneo voltado para o compartimento doador. No compartimento doador é depositado o fármaco ou outro material-teste solúvel ou suspenso em um veículo, e o compartimento receptor é preenchido com uma solução geralmente tamponante.

Figura 10 - Esquema ilustrativo da câmara de difusão de Franz.



De forma geral, os experimentos são realizados à 37°C (temperatura corporal), sob agitação constante e controlada. Em intervalos de tempo pré-determinados, coleta-se alíquotas da solução receptora e efetua-se a quantificação da substância testada por técnicas compatíveis com a taxa de absorção da molécula. Métodos espectrofotométricos e cromatográficos são os mais utilizados. Após a quantificação, pode-se calcular os valores de fluxos e os coeficientes de partição e de difusão do material avaliado (CAON, 2009; MASHRU et al., 2005; MOHAMMADI-SAMANI et al., 2014; SHOJAEI; BERNER; XIAOLING, 1998).

Sempre que possível, a pele humana deve ser utilizada para melhor mimetizar as condições encontradas *in vivo* (HENNING; SCHAEFER; NEUMANN, 2009). No entanto, devido a aspectos éticos, a pele humana é comumente substituída por tecidos animais, como pele suína, bovina ou, alternativamente, pele de rato. Dentre os modelos animais utilizados para este fim, destaca-se a pele de porco devido à fácil obtenção em abatedouros, bem como semelhança com a pele humana em relação à distribuição dos pelos, pigmentação, vascularização, composição lipídica e propriedades biofísicas do estrato córneo (MUHAMMAD; RIVIERE, 2006; CAPT et al., 2007; JUNG; MAIBACH, 2015).

## 2.6 ISONIAZIDA

### 2.6.1 Indicações clínicas

A INH tem sido utilizada para o tratamento da tuberculose desde 1952 e permanece até os dias atuais como a base do tratamento antituberculínico (WHO, 2016). Estima-se que mais de um terço da população mundial esteja infectado pelo bacilo causador da tuberculose (GÜLBAY et al., 2006).

O tratamento padrão para novos pacientes portadores de tuberculose consiste em INH (5 mg/kg/dia, até 300 mg) associada à rifampicina, pirazinamida e etambutol nos dois primeiros meses, seguidos de INH e rifampicina nos 4 meses seguintes (WHO, 2010). Nos casos de tuberculose latente, recomenda-se INH na forma de monoterapia, com eficácia superior a 90% (BOELSTERLI; LEE, 2014). Além disso, este fármaco também é indicado para a profilaxia da doença, principalmente para idosos e outros grupos de risco (STEAD et al., 1987).

### **2.6.2 Mecanismo de ação**

A INH é um pró-fármaco que, quando ativado pela enzima catalase-peroxidase (KatG) do *Mycobacterium tuberculosis*, produz espécies reativas de oxigênio e radicais orgânicos capazes de bloquear a produção de ácido micólico, provocando danos ao DNA com consequente morte do bacilo (ARBEX et al., 2010; CADE et al., 2010; METCALFE et al., 2008; ZHANG, 2005).

### **2.6.3 Farmacocinética**

A INH é rapidamente absorvida após administração oral, com pico plasmático depois de 1 a 2 h. O fármaco distribui-se por todos os tecidos e órgãos e pode ser recuperado a partir do líquido ascítico, pleural e cefalorraquidiano. A INH atravessa livremente a barreira placentária (alcançando o líquido amniótico e o feto), e é excretada no leite materno. A concentração no sistema nervoso e no líquido cefalorraquidiano varia de 20 a 100% em relação à do plasma (JAYARAM et al., 2004).

A INH é metabolizada no fígado sob um processo de acetilação controlado por fatores genéticos. 50% dos indivíduos negros e brancos apresentam acetilação lenta, que reflete em maiores níveis plasmáticos do fármaco livre (não acetilado), com meia-vida de 45 a 110 minutos. Para os acetiladores rápidos, o tempo de meia vida aumenta para 2 a 4,5 horas e a concentração de INH livre na corrente sanguínea é reduzida (GOLDMAN; BRAMAN, 1972). O fármaco é excretado primariamente na urina, nas formas inalterada ou como derivado acetil (JAYARAM et al., 2004).

### 2.6.4 Efeitos adversos

Apesar da alta taxa de sucesso no tratamento da tuberculose, sabe-se que a administração de INH por via oral resulta com frequência em efeitos indesejáveis que comprometem a adesão dos pacientes e a conclusão do tratamento (GÜLBAY et al., 2006). Estes efeitos podem ser classificados como:

1. Tóxicos: neuropatia periférica, hepatotoxicidade, convulsões (overdose), encefalopatia, psicose, atrofia óptica.
2. Idiossincráticos: lúpus eritematoso, síndromes reumáticas, desordens hematológicas.
3. Reações de hipersensibilidade: dermatite, febre, anemia hemolítica (GIRLING, 1982).

O efeito adverso mais comum decorrente do tratamento com INH é a neurite periférica, geralmente precedida de parestesia dos pés e das mãos. Observa-se com maior frequência em pacientes malnutridos e predispostos a neurites, como alcoólatras ou diabéticos (GOLDMAN; BRAMAN, 1972). Os efeitos neurotóxicos podem ser reduzidos ou evitados com administração simultânea de piridoxina (10 a 50 mg/dia) (GIRLING, 1982).

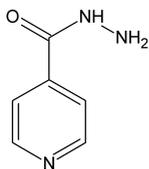
A metabolização hepática da INH pode provocar danos hepáticos leves a severos (1-2% dos pacientes), e está associada à elevação das enzimas hepáticas em 20% dos pacientes (CAI et al., 2012). Além de comprometer a adesão ao tratamento, a hepatotoxicidade também limita a utilização concomitante da INH com outros fármacos igualmente metabolizados no fígado, tais como os antirretrovirais (CAON et al., 2015).

### 2.6.5 Aspectos físico-químicos

A isoniazida (hidrazida do ácido isonicotínico, INH), de forma molecular  $C_6H_7N_3O$  e massa molar de 137,14 g/mol, possui estrutura simples (Figura 11) constituída por um anel piridina e um grupamento hidrazida (USP, 2011). Ainda não existem relatos da identificação de polimorfos ou hidratos da INH (BECKER et al., 2007). A molécula apresenta dois valores de  $pK_a$ : 3,53 ( $pK_{a1}$ ) e 11,41 ( $pK_{a2}$ ). O  $pK_{a1}$  é básico e refere-se à protonação do nitrogênio do anel piridina. O  $pK_{a2}$ , por sua vez, é ácido e associado à desprotonação do nitrogênio do grupamento hidrazida (BLOKHINA et al., 2015; RÀFOLS et al.,

2012). A INH apresenta caráter hidrofílico, com log P de -0,70. (HANSCH et al., 1995).

Figura 11 - Estrutura química da INH



A classificação da INH de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), o qual foi proposto por Amidon em 1995, tem sido alvo de debates. O fármaco apresenta solubilidade de 141 mg/mL em água a 37°C, de forma que indiscutivelmente classifica-se como altamente solúvel (AITIPAMULA et al., 2013). No entanto, os dados de absorção e permeabilidade da INH são inconclusivos.

Dados da literatura que referem a INH como altamente permeável, e BCS classe I, não são completamente confiáveis por utilizarem metodologias consideradas menos seguras, como excreção urinária e métodos colorimétricos (ELMENDORF; CAWTHON; MUSCHENHEIM, 1952; KLEBER, 1979; BECKER, et al., 2007). Por outro lado, Kasim et al. (2004) baseou-se na correlação entre o coeficiente de partição e a permeabilidade para classificar a INH como BCS classe III, e sabe-se que este tipo de correlação tem capacidade preditiva limitada. Neste contexto, em guia publicado pela organização mundial da saúde, a INH foi classificada como *borderline* III/I (WHO, 2006).

Os grupamentos piridina e hidrazida na estrutura química da INH são promissores para a formação de ligações de hidrogênio com grupamentos complementares, razão pela qual esta molécula tem sido alvo de diversos estudos na área da engenharia de cristais (SARCEVICA et al., 2013).

Tendo em vista a diversidade de cocrystalis com INH, associada à possibilidade da aplicação cutânea do fármaco como alternativa para evitar a hepatotoxicidade, a INH apresenta-se adequada aos propósitos desta dissertação.



**CAPÍTULO II**

**SELEÇÃO, OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
COCRISTAIS DE ISONIAZIDA**

---



### **3 SELEÇÃO, OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COCRISTAIS DE ISONIAZIDA**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Embora medicamentos potencialmente eficazes para o tratamento da tuberculose já estejam disponíveis há mais de 50 anos, a administração oral frequente e de longa duração de comprimidos contendo estes fármacos resulta, em muitos casos, no surgimento de efeitos adversos e baixa adesão ao tratamento. Como consequência, há o aparecimento de bactérias multirresistentes. Visando otimizar o tempo de tratamento e desacelerar o surgimento da resistência bacteriana, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose tem sido alvo de crescente interesse (HARI et al., 2010; ZUMLA et al., 2015).

Em contraste à urgente necessidade dos pacientes por novas opções de tratamento, estão os longos e custosos processos que envolvem desde a descoberta de um fármaco até seu lançamento no mercado. Nos Estados Unidos, estima-se um prazo de 12 anos para a aprovação de um novo medicamento, com custos que podem superar 1 bilhão de dólares (NORMAN, 2016). Neste contexto, modificações estruturais de fármacos já existentes surgem como uma alternativa. Dentre estas inovações incrementais, destaca-se a obtenção de cocristais farmacêuticos, capazes de impactar profundamente as propriedades físico-químicas de fármacos, como já mencionado anteriormente (GAO; ZU; ZHANG, 2011; GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2009; SHAN; ZAWOROTKO, 2008).

A isoniazida (INH), fármaco extensamente utilizado no tratamento da tuberculose, consiste em um candidato em potencial para a obtenção de cocristais por conter grupamentos funcionais capazes de formar uma ampla variedade de ligações de hidrogênio (SARCEVICA et al., 2013). Tal versatilidade foi determinante para o surgimento de diversas publicações de cocristais de INH com diversos coformadores (AITIPAMULA et al., 2013; DINIZ et al., 2018; MASHHADI et al., 2016; ORUGANTI et al., 2016; SARCEVICA et al., 2013; SARCEVIČA et al., 2015).

Dentre as várias técnicas que podem ser utilizadas para a cristalização na área farmacêutica, optou-se por padronizar o método de cristalização por reação (MCR) no presente trabalho. A sólida

fundamentação teórica do MCR sugere a possibilidade de se obterem cocristais sem que ocorra a cristalização dos componentes individuais, além de ser uma estratégia simples e passível de escalonamento (RODRÍGUEZ-HORNEDO et al., 2006).

Tão importante quanto a obtenção dos cocristais, é a etapa de caracterização desses sólidos, que tem como propósito a confirmação da identidade e pureza do novo material cristalino. A formação de um cocristal pode ser verificada a partir da combinação de técnicas termoanalíticas, espectroscópicas, e pela difração de raios X de pó (DRXP), considerada atualmente como o “padrão ouro” para esse fim (REUTZEL-EDENS, 2012). A grande maioria das formas cristalinas que tiveram suas estruturas já elucidadas possuem um padrão de difração depositado no banco de dados estruturais de Cambridge (CSD - *Cambridge Structural Database*). A comparação dos padrões de difração de raios X experimentais e disponíveis neste banco é de grande utilidade para a caracterização dos cocristais (QIAO et al., 2011).

Neste âmbito, o presente capítulo apresenta a metodologia utilizada e os resultados encontrados na seleção, obtenção e caracterização dos cocristais de INH.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Materiais

A INH foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), lote MKBV9475V. Os coformadores utilizados e seus respectivos lotes e fabricantes estão representados no Quadro 1. Metanol grau P.A foi obtido da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). Todos os demais materiais utilizados foram de grau analítico.

Quadro 1 - Coformadores utilizados, com respectivos lotes e fabricantes.

<b>Coformador</b>	<b>Lote</b>	<b>Fabricante</b>
Ácido 4-aminosalicílico	BCBJ0827V	Sigma-Aldrich
Ácido cinâmico	DCBD3502V	Vetec
Ácido fumárico	134245	Synth
Ácido succínico	142469	Synth
Nicotinamida	DCBD4307V	Vetec
Resveratrol	20161213	Pharma Nostra

### 3.2.2 Métodos

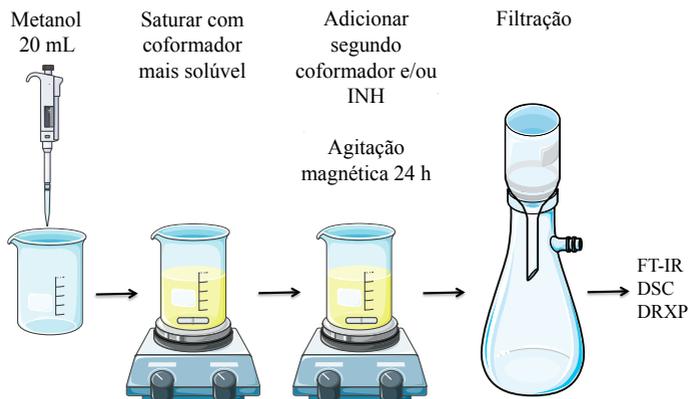
#### 3.2.2.1 Seleção dos cocristais

A primeira etapa deste projeto consistiu no levantamento dos cocristais de INH relatados na literatura até o mês de julho de 2016. Utilizou-se a base de dados *Scopus* com busca por *isoniazid cocrystal*, considerando as revistas farmacêuticas, químicas, e das engenharias de materiais e química. Na sequência, foram selecionados os cocristais alvos de estudo no presente trabalho considerando três critérios: 1. Ausência de toxicidade do coformador frente à aplicação na pele; 2. Coformadores que exerçam uma ação promotora ou retardadora de penetração já conhecida; 3. Coformadores com ação farmacológica sinérgica à do fármaco para o tratamento da tuberculose.

#### 3.2.2.2 Método de cocristalização

Para a obtenção de cocristais de INH, optou-se por padronizar o método de cristalização por reação (MCR) (RODRÍGUEZ-HORNEDO et al., 2006). O processo de cocristalização foi desenvolvido inicialmente em 2 mL de metanol, com posterior transposição para 20 mL. Primeiramente, o solvente foi saturado com o coformador mais solúvel, seguido da adição do segundo coformador e/ou fármaco em quantidades molares de acordo a proporção estequiométrica do cocristal. A mistura foi mantida sob agitação magnética a 900 rpm por 24 h em temperatura ambiente (Figura 12). Em seguida, as suspensões foram submetidas a uma filtração à vacuo em filtro de papel quantitativo. A identidade das amostras foi confirmada por FT-IR, DSC e DRXP.

Figura 12 - Desenho esquemático do preparo dos cocrystal de INH pelo método de cristalização por reação (MCR).



### 3.2.2.3 Técnicas de caracterização

#### 3.2.2.3.1 Difração de raios x de pó (DRXP)

Os difratogramas foram obtidos em equipamento  $\theta$ - $\theta$  D2 Phaser (Bruker), com radiação de cobre  $K\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), operando em corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV, equipado com detector de cintilação unidimensional LINXEYE. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em porta amostra com cavidade, através de varredura angular a  $2\theta$  na faixa de 5 a  $40^\circ$  e com *step* angular de  $0,091^\circ/s$ .

#### 3.2.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas utilizando-se célula Shimadzu DSC-60. As amostras foram pesadas (1,5 mg) e depositadas em cacinhos de alumínio (modelo 201-52943) hermeticamente fechados. A faixa de temperatura analisada foi de 25 a  $300^\circ\text{C}$  para o ácido fumárico, resveratrol e cocrystal com estes coformadores, e de 25 a  $200^\circ\text{C}$  para os demais sólidos. As análises foram realizadas a uma razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  e sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  de  $100 \text{ mL}/\text{min}$ . Os dados obtidos foram processados em software TA-

60. O equipamento foi previamente calibrado com índio (ponto de fusão: 156,6 °C, entalpia de fusão = 28,54 J/g) e zinco (ponto de fusão 419,6 °C).

### ***3.2.2.3.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR)***

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em equipamento PerkinElmer FT-IR (Frontier Spectrometer), em uma faixa espectral de 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma média de 10 varreduras em resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

## **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O levantamento dos cocristais de INH relatados na literatura (Quadro 2) revelou um crescente número de publicações envolvendo a síntese e a caracterização destes sólidos.

Quadro 2 - Cocristais de INH descritos na literatura.

<b>Cocrystal</b>	<b>Referência</b>
Isoniazida: Resveratrol	(ZHOU et al., 2016)
Isoniazida:Ácido vanílico Isoniazida:Ácido ferúlico Isoniazida:Ácido cafeico Isoniazida:Resorcinol	(SWAPNA; MADDILETI; NANGIA, 2014)
Isoniazida:Ácido gálico Isoniazida:Ácido 2,3 dihidrobenzóico Isoniazida:Ácido 3,5 dihidrobenzóico	(MASHHADI et al., 2014)
Isoniazida:Ácido fumárico Isoniazida:Nicotinamida:Ácido fumárico Isoniazida:Ácido 4-aminobenzóico Isoniazida:Nicotinamida:Ácido salicílico	(AITIPAMULA et al., 2013)
Isoniazida:Ácido benzóico Isoniazida:Ácido subérico Isoniazida:Ácido sebácico Isoniazida:Ácido cinâmico	(SARCEVICA et al., 2013)
Isoniazida: Ácido L (+) tartárico	(SEVUKARAJAN et al., 2011)
Isoniazida: Ácido 4-amino-salicílico	(GROBELNY; MUKHERJEE; DESIRAJU, 2011)
Isoniazida:Ácido malônico Isoniazida:Ácido adípico Isoniazida:Ácido succínico Isoniazida:Ácido glutárico Isoniazida:Ácido pimélico Isoniazida:Ácido tereftálico Isoniazida:Ácido 2,4 dihidrobenzóico Isoniazida:Ácido 3 hidroxibenzóico	(LEMMERER; BERNSTEIN; KAHLENBERG, 2010)

Dentre os cocristais apresentados no Quadro 2, cinco foram selecionados para a realização deste projeto. As justificativas que motivaram esta escolha são apresentadas na sequência e no Quadro 3.

#### **Isoniazida:Nicotinamida:Ácido fumárico (INH-NIC-FUM)**

A nicotinamida é uma das formas da vitamina B3, e pode exercer uma série de ações benéficas à pele, razão pela qual tem sido alvo de crescente interesse para aplicação em produtos cosméticos (LEVIN; DEL ROSSO; MOMIN, 2010). A capacidade de aumentar a função de barreira da pele, atuando como retardador de permeação foi a principal razão que levou à seleção deste cocristal (MOHAMMED et al., 2013). Além disso, a avaliação de propriedades biofarmacêuticas de cocristais ternários, cuja cela unitária é composta por três moléculas diferentes, até o momento, ainda não foi explorada.

#### **Isoniazida:Ácido fumárico (INH-FUM)**

Em estudo realizado por Ren e colaboradores (2008), dentre oito ácidos orgânicos avaliados, o ácido fumárico se destacou por aumentar significativamente a permeação da indapamida, um fármaco diurético tiazídico, através da pele abdominal de ratos (REN et al., 2008). Neste trabalho, selecionou-se o cocristal contendo este coformador devido a seu efeito como promotor de permeação. Sua *performance* foi comparada a do cocristal INH:NIC:FUM, uma vez que a nicotinamida tem um efeito retardador de permeação.

#### **Isoniazida:Ácido cinâmico (INH-CIN)**

A escolha do cocristal INH:CIN resultou da união de duas propriedades do coformador que tornam este sólido extremamente interessante: o fato de ser um composto com atividade sobre o bacilo causador da tuberculose e por apresentar ação como promotor de permeação (CHEN et al., 2014, 2011; RASTOGI et al., 1998).

#### **Isoniazida:Ácido 4-amino-salicílico (INH-PAS)**

Assim como o cocristal com ácido cinâmico, o INH:PAS pertence ao limitado grupo de cocristais cuja composição envolve dois

fármacos (GROBELNY; MUKHERJEE; DESIRAJU, 2011). Além disso, o PAS é um dos únicos fármacos ainda capazes de tratar casos de tuberculose extensivamente resistente a drogas. Quando em associação, demonstrou-se que o PAS inibiu a inativação da INH por acetilação, resultando em aumento da concentração plasmática do fármaco (DONALD; DIACON, 2015; LAUENER; FAVEZ, 1958).

### **Isoniazida:Resveratrol (INH-RES)**

Resveratrol, o polifenol encontrado principalmente na casca da uva vermelha ou roxa, tem demonstrado-se promissor em diversas enfermidades, incluindo doenças e desordens na pele, tais como o envelhecimento e câncer de pele (BAUR; SINCLAIR, 2006; NDIAYE et al., 2011). Além da ausência de toxicidade frente à aplicação tópica e do potencial antioxidante deste coformador, a administração oral de RES anterior à INH preveniu completamente os danos hepáticos causados pela terapia combinada de isoniazida-rifampicina através de um mecanismo que envolve a modulação da migração de neutrófilos para o fígado (NICOLETTI et al., 2014).

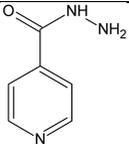
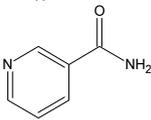
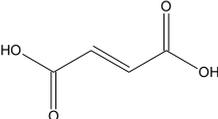
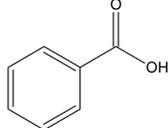
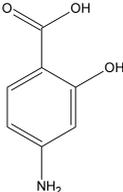
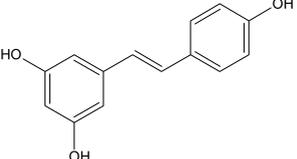
Quadro 3 - Cocristais de INH selecionados, respectivos coformadores e resumo das propriedades de interesse.

<b>Cocristal (Razão estequiométrica fármaco:coformador)</b>	<b>Propriedade de interesse do coformador</b>
INH-NIC-FUM (1:1:1)	Ação da nicotinamida como retardador de permeação <sup>1</sup> ; escassez de estudos explorando propriedades biofarmacêuticas de cocristais ternários
INH-FUM (2:1)	Ação do FUM como promotor de permeação <sup>2</sup> ; comparação com INH:NIC:FUM
INZ-PAS (1:1)	Utilizado no tratamento de tuberculose multirresistente <sup>3</sup> ; reduz inativação da INH <sup>4</sup>
INZ-CIN (1:1)	Promotor de permeação; atividade comprovada contra o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <sup>5,6,7</sup>
INH-RES (1:1)	Efeito antioxidante, protege contra a hepatotoxicidade causada por INH <sup>8</sup>

Fonte: MOHAMMED et al., 2013<sup>1</sup>; REN et al., 2008<sup>2</sup>; DONALD; DIACON, 2015<sup>3</sup>; LAUENER, FAVEZ, 1958<sup>4</sup>; CHEN et al., 2014<sup>5</sup>; CHEN et al., 2011<sup>6</sup>; RASTOGI et al., 1998<sup>7</sup>; NICOLETTI et al., 2014<sup>8</sup>.

As estruturas químicas, valores de  $pK_a$ , e pontos de fusão do fármaco e dos coformadores utilizados estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Estrutura química,  $pK_a$  e temperatura de fusão da isoniazida e coformadores utilizados.

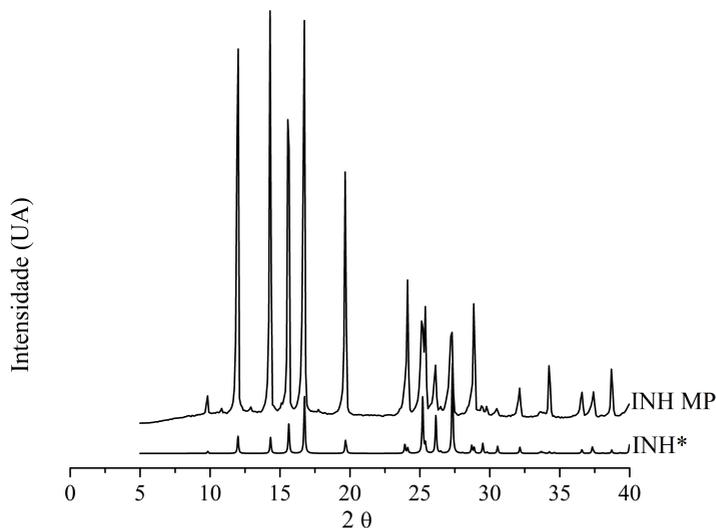
Substância	Estrutura química	$pK_a$	Ponto de fusão
INH		$pK_{a1}$ : 3,53 <sup>1</sup> $pK_{a2}$ : 11,14 <sup>1</sup>	170°C - 173°C <sup>2</sup>
NIC		3,30 <sup>3</sup>	128°C - 131°C <sup>3</sup>
FUM		$pK_{a1}$ : 2,74 <sup>4</sup> $pK_{a2}$ : 4,17 <sup>4</sup>	287°C <sup>3</sup>
CIN		4,44 <sup>5</sup>	133°C - 135°C <sup>3</sup>
PAS		3,61 <sup>4</sup>	150°C - 151°C <sup>3</sup>
RES		$pK_{a1}$ : 8,0 <sup>6</sup> $pK_{a2}$ : 9,9 <sup>6</sup> $pK_{a3}$ : 10,5 <sup>6</sup>	253°C - 255°C <sup>3</sup>

Fonte: RÁFOLS et al., 2012<sup>1</sup>; USP, 2011<sup>2</sup>; O'NEIL, 2006<sup>3</sup>; AVDEEF, 2012<sup>4</sup>; TRUONG, 2007 (thesis)<sup>5</sup>; TAKAGAI et al., 2005<sup>6</sup>.

A estreita correlação entre os efeitos biofarmacêuticos e as propriedades físico-químicas dos fármacos justifica a importância da

correta caracterização de matérias-primas visando à produção de medicamentos de qualidade (CARSTENSEN, 2001; HUANG; TONG, 2004). No presente trabalho, a ausência de polimorfismo da INH facilitou a caracterização da matéria-prima, que apresentou picos de difração bem definidos na análise realizada por DRXP, condizentes com o padrão de INH (Figura 13) (JENSEN, 1954). A variação das intensidades relativas entre a amostra e o padrão indica notável orientação preferencial, a qual não interfere nesta comparação visto que os ângulos de espalhamento das reflexões mais intensas do material de referência variam em  $\pm 10^\circ$ , conforme estabelecido pela Farmacopeia Americana (USP, 2011). O efeito de orientação preferencial normalmente é observado para sólidos cujo hábito cristalino é altamente assimétrico, como acontece com as agulhas de INH. Quando processado ou comprimido, este sólido tende a assumir uma mesma orientação.

Figura 13 - Difratogramas referentes à matéria-prima e ao padrão de difração calculado de INH.



\*Padrão de difração calculado para INH relatado por Jensen, 1954.

Os resultados das análises de DSC e FT-IR da INH, juntamente com a caracterização dos cocristais, são apresentados nas Figuras 15 e 16.

A análise espectroscópica por FT-IR da matéria-prima revelou a presença das bandas atribuídas às vibrações de estiramento do grupo hidrazida em 3302 e 3172  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento NH da amina primária), assim como em 3103  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento NH da amina secundária). Verificaram-se estiramentos em 1662  $\text{cm}^{-1}$  referente à carboxila (C=O) da amida; e em 1330  $\text{cm}^{-1}$  relacionado à vibração de estiramento C-N do anel piridina (DINIZ et al., 2018; TIBOLA, 2009; ZHOU et al., 2016). Tais frequências de estiramento são características da estrutura molecular da INH e favoráveis à identificação de interações supramoleculares no sólido.

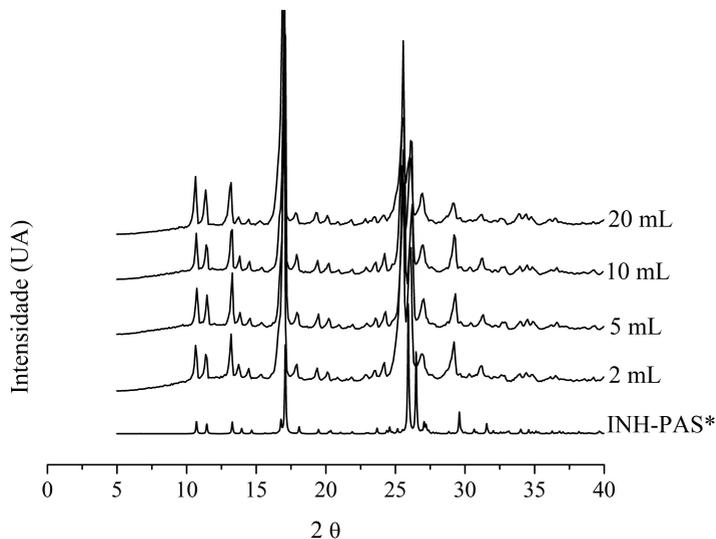
Com relação ao comportamento termoanalítico, a amostra de INH matéria-prima apresentou um único evento endotérmico, com ponto de fusão em 169,7 °C ( $\Delta H=266,86$  J/g). Os resultados observados vão de encontro ao intervalo de fusão descrito na literatura para este fármaco (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2013; USP, 2011).

Os artigos nos quais os cocristais selecionados foram descritos envolvem técnicas de evaporação lenta de solvente, moagem à seco e moagem assistida por solvente. No entanto, neste trabalho priorizou-se o método de cristalização por reação (MCR). A escolha foi devido às diversas vantagens que este método oferece, tal como a possibilidade de obter cocristais sem que ocorra a cristalização dos componentes individuais. Além disto, é um método simples, passível de escalonamento e proporciona alto rendimento e pureza dos sólidos obtidos. Trata-se de uma abordagem eficaz na triagem e obtenção dos cocristais (ROCHA et al., 2016; RODRÍGUEZ-HORNEDO et al., 2006). Utilizando as quantidades de reagentes e solventes definidas, foi possível acessar a região IV do diagrama de solubilidade de fases que descreve o MCR (Figura 3, capítulo I). Durante o experimento, a solução encontrava-se supersaturada em relação ao cocristal, caracterizando a região IV do diagrama. Nessas condições, a solubilidade do cocristal é inferior à do fármaco puro, possibilitando que o cocristal precipite e permaneça estável. Assim, ocorreu a precipitação/cristalização dos cocristais de INH, que foram posteriormente filtrados e caracterizados pelos métodos anteriormente citados.

De maneira condizente com a fundamentação teórica do MCR, esta metodologia demonstrou-se eficaz e com possibilidade de produção em maiores escalas. O volume inicial de 2 mL pôde ser expandido gradativamente até 20 mL, conforme observado pela

comparação dos padrões de difração referentes à cristalização em diferentes volumes de solvente, tomando como exemplo o cocrystal INH-PAS (Figura 14). No que se refere ao rendimento, os resultados em 20 mL demonstraram-se superiores aos obtidos em volumes menores, com resultados de 71,52 (INH-RES), 73,91 (INH-PAS), 80,3 (INH-CIN), 87,48 (INH-NIC-FUM) e 91,48 % (INH-FUM). O rendimento foi determinado pela diferença entre a massa de sólido obtido ao final da reação e a massa total de fármaco e coformador(es) inicialmente adicionado(s). Baseando-se no fato de que os cocristsais INH-FUM e INH-NIC-FUM são menos solúveis em metanol comparativamente aos demais, em um primeiro momento sugeriu-se que o rendimento do MCR era inversamente proporcional à solubilidade do cocrystal. Neste contexto, para cocristsais menos solúveis, a perda na etapa de filtração seria menor, favorecendo o rendimento. Por outro lado, a mesma relação não foi encontrada para os outros três cocristsais.

Figura 14 - Padrões de difração de INH-PAS calculado (\*) e obtidos por MCR em diferentes volumes de metanol.

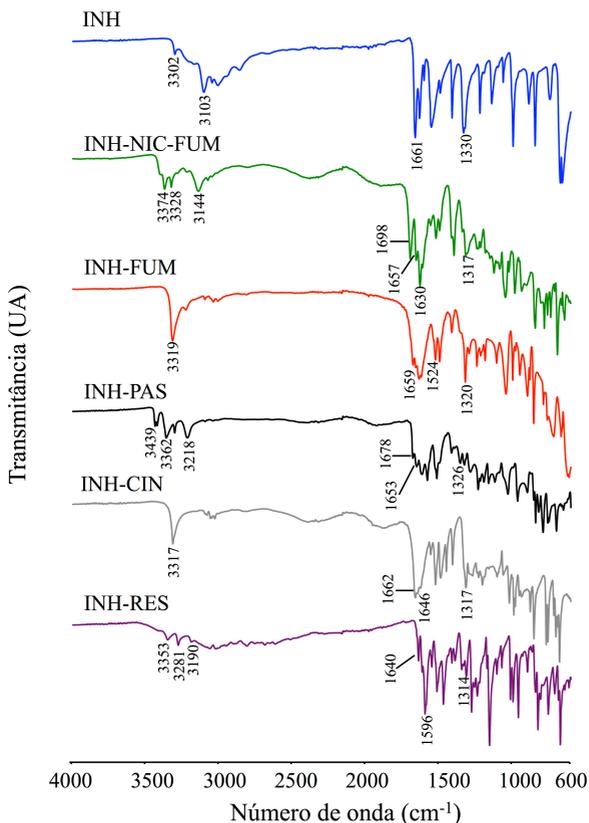


\*Padrão de difração calculado para o cocrystal INH-PAS relatado por Grobelny, Mukherjee e Desiraju (2011).

Todos os materiais cocristalizados foram caracterizados por FT-IR, DSC e DRXP, comparando-se o produto final da reação de cocristalização com os materiais de partida. É importante ressaltar que a efetiva cocristalização resulta em um novo sólido cristalino, que difere da simples sobreposição dos resultados do fármaco e do coformador devido às interações supramoleculares entre os componentes.

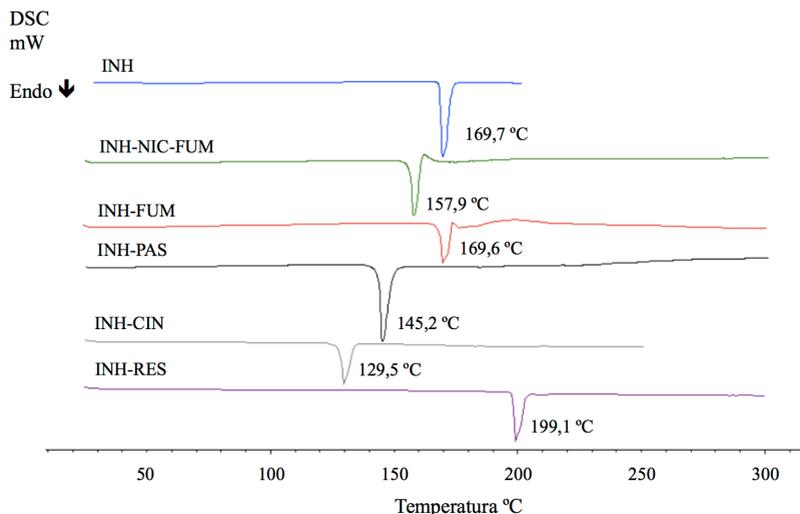
Alterações nas frequências vibracionais decorrentes da formação de um cocristal podem ser facilmente observadas por FT-IR, uma vez que a técnica é capaz de detectar a formação de ligações de hidrogênio. De forma geral, alterações nos modos vibracionais de grupamentos específicos do fármaco e dos coformadores, especialmente ácidos carboxílicos, indicam a formação do cocristal (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009). A atribuição das bandas dos espectros FT-IR da INH e dos cocristais baseou-se nos dados espectroscópicos descritos nos artigos que originalmente relataram tais cocristais. Conforme demonstrado nos espectros (Figura 15), foi possível observar um deslocamento das bandas referentes aos estiramentos NH do grupamento hidrazida ( $3302$  e  $3103\text{ cm}^{-1}$ ) devido à formação de *synthons* intermoleculares envolvendo esta região do fármaco. No que se refere ao anel piridina, a banda de alta intensidade em  $1330\text{ cm}^{-1}$  visualizada no espectro da INH foi deslocada ( $4 - 16\text{ cm}^{-1}$ ) nos espectros dos cocristais devido à formação de ligações de hidrogênio ácido-piridina (DINIZ et al., 2018). Bandas características entre  $3300-3500\text{ cm}^{-1}$  relativas ao grupamento hidroxila e  $1750-1660\text{ cm}^{-1}$  à carboxila (ausente no RES) dos coformadores também foram encontradas nos espectros dos cocristais.

Figura 15 - Espectros FT-IR da INH e dos materiais cocristalizados: INH-NIC-FUM, INH-FUM, INH-PAS, INH-CIN e INH-RES.



Em relação às curvas DSC, observou-se um único evento endotérmico para cada sólido obtido, distinto dos eventos de fusão do coformador e do fármaco (Figura 16). Nesta etapa, a análise do comportamento térmico das amostras possibilitou a discriminação preliminar do polimorfo de INH-FUM sintetizado como sendo a forma I (ponto de fusão 169,6 °C), visto que a forma II possui temperatura de fusão em 173,1°C (AITIPAMULA et al., 2013). A curva DSC encontrada para cada cocristal obtido por MCR, foi consistente com os dados da literatura, confirmando a identidade dos materiais (AITIPAMULA et al., 2013; GROBELNY; MUKHERJEE; DESIRAJU, 2011; SARCEVICA et al., 2013; ZHOU et al., 2016)

Figura 16 - Resultado das análises por DSC da INH e das amostras cocristalizadas: INH-NIC-FUM, INH-FUM, INH-PAS, INH-CIN E INH-RES.

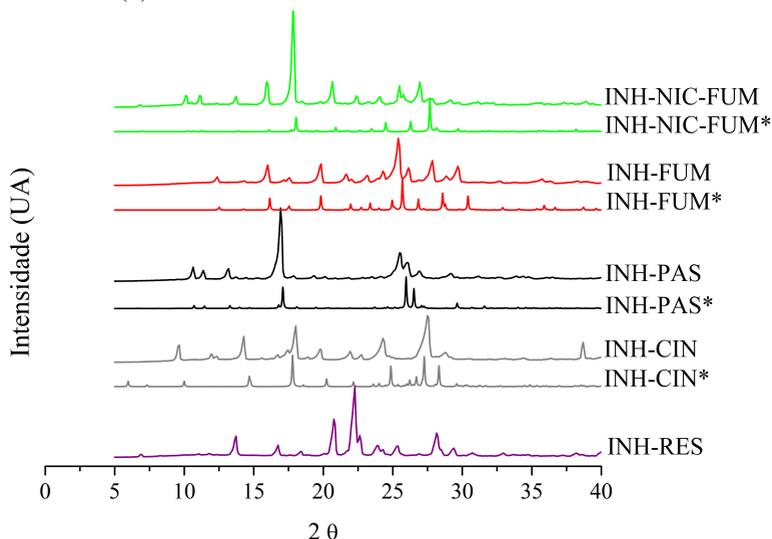


Considerada como a principal técnica para a análise de materiais sólidos cristalinos, a DRXP permite a caracterização das amostras de acordo com seus padrões de difração (BRITAIN, 2009). Por meio da análise dos difratogramas das amostras cocristalizadas, foi possível observar reflexões bem definidas e equivalentes àquelas encontradas nos padrões de difração calculados desses cocristais (Figura 17). O pequeno deslocamento das reflexões entre as amostras e os padrões calculados deve-se à realização das análises em diferentes temperaturas. Enquanto que as análises de DRXP foram realizadas a temperatura ambiente, as estruturas cristalinas foram resolvidas por monocristal sob temperaturas negativas.

Em estudo realizado por Aitipamula e colaboradores (2013), foram descritos dois polimorfos do cocristal INH-FUM, forma I e forma II. Observou-se que a forma I é o polimorfo mais estável e que a forma II sofreu conversão completa à forma I após o preparo do cocristal pelo método de *slurry* (AITIPAMULA et al., 2013). O difratograma da amostra de INH-FUM permitiu a identificação das principais reflexões descritas para a forma I deste sólido (AITIPAMULA et al., 2013). A avaliação por DRXP do cocristal

INH-RES diferiu do procedimento realizado para os demais, pois até o momento não há estrutura cristalina resolvida para este cocrystal e um padrão calculado depositado no CSD. Assim, o difratograma do cocrystal foi comparado com aquele do fármaco e coformador, e as principais reflexões foram também comparadas com aquelas obtidas por Zhou e colaboradores (2016). As principais reflexões do sólido foram 7,0; 13,9; 21,0 e 22,8°, coincidentes ao relatado na literatura e diferentes dos perfis de difração dos materiais de partida INH e RES.

Figura 17 - Difratogramas comparando as amostras obtidas por MCR com os padrões calculados (\*).



\*Padrões de difração calculados para as amostras pelas fontes: AITIPAMULA et al., 2013; GROBELNY; MUKHERJEE; DESIRAJU, 2011; SARCEVICA et al., 2013; ZHOU et al., 2016.

Dessa maneira, associada aos resultados obtidos por FT-IR e DSC, a análise dos difratogramas confirmou a identidade das amostras.

### 3.4 CONCLUSÕES

A obtenção dos cocristais de INH pelo MCR apresentou alto rendimento e reprodutibilidade em maior escala. A caracterização no estado sólido confirmou a identidade da matéria-prima de INH. No que se refere aos sólidos cocristalizados, a análise por FT-IR apresentou as bandas características para os cocristais relatados, e os deslocamentos observados em regiões de grupamentos específicos evidenciaram as interações que ocorrem entre fármaco e coformador(es). Na análise por DSC, os eventos de fusão observados para esses materiais estão em concordância com o relatado para os cocristais. As análises de DRXP apresentaram picos de difração bem definidos, diferentes dos insumos de partida e de acordo com padrões de referência. O conjunto das análises espectroscópicas, termoanalíticas e cristalográficas permitiu a identificação dos cocristais selecionados bem como possibilitou a diferenciação de INH-FUM como a forma I do cocristal.



### **CAPÍTULO III**

## **AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE COCRISTAIS BINÁRIOS E TERNÁRIO DE ISONIAZIDA**

---



## **4 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE COCRISTAIS BINÁRIOS E TERNÁRIO DE ISONIAZIDA**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

A obtenção de formas cristalinas que apresentem uma vantagem de solubilidade em relação ao fármaco puro consiste na principal aplicação da estratégia da cocristalização (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO 2009).

Os cocristais farmacêuticos são sólidos versáteis capazes de modular a solubilidade de acordo com as características do coformador selecionado e fenômenos como dissociação, complexação, ionização e solubilização do fármaco e coformador em solução (HUANG; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010; LIPERT; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2015). Em função disto, a diferença de solubilidade do cocristal em relação ao fármaco não pode ser considerada um valor constante, podendo ser modulada, por exemplo, por meio de pequenas alterações no pH da solução.

Vale ressaltar que o comportamento distinto de ionização e solubilização dos cocristais em relação aos seus componentes isolados pode acarretar na existência de um  $pH_{max}$ , ponto de transição a partir do qual a solubilidade do cocristal e um de seus componentes se invertem, de modo que a fase antes mais estável passa a ser a mais solúvel. Em função do mecanismo complexo de solubilização dos cocristais, a sua solubilidade pode ser maior, menor ou semelhante à do fármaco que os compõe (BETHUNE et al., 2009; LIPERT; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2015).

Em contraste ao grande número de publicações com foco na obtenção, caracterização e resolução de estruturas dos cocristais, são escassos os estudos que associam o pH à avaliação da dissolução e solubilidade desses materiais (KUMINEK et al., 2016). Entender as interações dos cocristais em solução bem como os mecanismos envolvidos na determinação da sua solubilidade e estabilidade termodinâmica em solução, é de extrema importância nos estudos de pré-formulação, pois minimiza os riscos do aparecimento de uma falha inesperada em estágios mais avançados de desenvolvimento (KALE; ZODE; BANSAL, 2016; ROY; LIPERT; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2012).

Para cocristais altamente solúveis em relação ao fármaco que os compõe, a determinação da solubilidade pode ser um desafio devido à tendência do complexo em converter à forma mais estável do fármaco, levando a resultados não fidedignos. Para evitar tal equívoco, aplica-se o método termodinâmico, o qual utiliza concentrações eutéicas para a determinação da solubilidade dos cocristais metaestáveis (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010; HUANG; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010). O método termodinâmico, aplicado no presente trabalho, baseia-se na determinação da solubilidade no ponto eutéico ( $P_{eu}$ ). Neste ponto, duas fases sólidas coexistem em equilíbrio com uma solução e, a partir das concentrações de fármaco e coformador no  $P_{eu}$ , a solubilidade do cocristal pode ser acessada de forma mais apropriada e segura (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010).

Ao realizar ensaios de solubilidade termodinâmica, é de extrema importância caracterizar a fase sólida para assegurar que o sistema encontra-se no  $P_{eu}$ , verificado pela presença das duas fases adicionadas inicialmente (cocristal + fármaco ou cocristal + coformador) (KUMINEK et al., 2015). Nos casos em que o cocristal apresenta-se menos solúvel que o fármaco constituinte, torna-se possível a avaliação da sua solubilidade pela simples adição de excesso de cocristal em solução, sem o risco do complexo sofrer conversão para fármaco (ROCHA et al., 2016). Para ambas as metodologias podem ser associados modelos matemáticos de predição da solubilidade de cocristais, os quais encontram-se bem descritos na literatura (BETHUNE et al., 2009; GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2009, 2010).

Variações de pH não decorrem apenas de aspectos fisiológicos, mas também de fatores de formulação, como a inclusão de componentes com grupamentos ácido ou básico. Assim, independente da via proposta para a administração dos cocristais, a avaliação da solubilidade e estabilidade dos mesmos em diferentes valores de pH é essencial para o desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis.

O presente capítulo foca na influência do pH sobre a solubilidade e estabilidade termodinâmica em solução dos cinco cocristais de INH. Nesta seção, são apresentados (1) o desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de fármaco e coformadores, (2) os resultados da determinação da solubilidade experimental dos cocristais e da INH, (3) equações de

predição da solubilidade dos cocristais em função do pH, e, por fim, (4) a comparação entre o perfil de solubilidade em função do pH dos cocristais e da INH, associada à comparação dos resultados experimentais e calculados a fim de avaliar o poder preditivo dos modelos matemáticos.

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Materiais

Foram utilizados reagentes (ácidos, bases, solventes e sais) de grau analítico e grau cromatográfico. A água ultrapura foi obtida a partir de sistema de filtração Milli-Q (Millipore, Bedford, Estados Unidos).

### 4.2.2 Métodos

#### 4.2.2.1 Instrumentação e condições cromatográficas

A quantificação de fármaco e coformadores foi realizada por CLAE utilizando metodologia desenvolvida com base em métodos descritos na literatura (AWAD et al., 2014; BANDA et al., 2016; CAON et al., 2015; DING; YANG, 2011). INH, NIC e FUM puderam ser quantificados simultaneamente utilizando método com gradiente de comprimento de onda, enquanto os demais coformadores foram analisados separadamente por métodos específicos. As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10A, degaseificador DGU-14A, detector de luz UV SPD-10A e auto injetor SCL-10A. A separação do analito de interesse foi realizada em coluna de fase reversa Phenomenex Luna<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm; 5µm), fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL. Com exceção do método desenvolvido para o CIN, cuja temperatura do forno foi definida em 40°C, os demais métodos foram realizados com o forno à 25°C. A fase móvel utilizada para a quantificação do fármaco e de cada coformador, bem como o comprimento de onda de detecção, o tempo de retenção, a faixa de linearidade e os limites de detecção e quantificação estão descritos no Quadro 5. Os dados obtidos foram avaliados através do software CLASS-VP.

Quadro 5- Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da INH e coformadores.

	<b>Fase móvel</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>INH</b>	Metanol : tampão acetato de amônio 25 mM pH 2,5 (10:90 V/V)	260	3,2
<b>NIC</b>	Metanol : tampão acetato de amônio 25 mM pH 2,5 (10:90 V/V)	260	4,1
<b>FUM</b>	Metanol : tampão acetato de amônio 25 mM pH 2,5 (10:90 V/V)	220	6,1
<b>RES</b>	Acetonitrila : água (50:50 V/V)	306	3,6
<b>CIN</b>	Ácido fosfórico 40 mM pH 3,0 : acetonitrila (92:8 V/V 0-3 min; 50:50 V/V 3-4 min; 30:70 V/V 4-11 min; 92:8 V/V 11-16 min)	260 (0-6 min) 272 (6-16 min)	9,9
<b>PAS</b>	Ácido fórmico 3% (V/V) : acetonitrila (70:30 V/V)	300	5,1

#### 4.2.2.2 Solubilidade da INH e coformadores

A solubilidade da INH ( $S_{INH}$ ) e dos coformadores foi determinada experimentalmente a partir da adição de excesso de cada material em 5 mL de soluções aquosas com valores iniciais de pH 1,2 (HCl 0,08 M), 6,3 (água) e 7,4 (solução tampão PBS e solução tampão acetato de amônio a 25 mM). Para a INH e RES, considerou-se também a avaliação de solubilidade em pH 3,0 (0,0003 M HCl) de modo que os resultados pudessem ser comparados com a literatura. As suspensões foram mantidas sob agitação ( $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ , 240 rpm) em incubadora do tipo *shaker* (NT 715, Novatecnica, Piracicaba, Brasil).

Alíquotas de 1 mL foram coletadas e filtradas em membrana de poliamida 0,45  $\mu\text{m}$  após 6, 24 e 48 h do início do ensaio. Verificou-se o pH das amostras e, após diluição adequada em fase móvel, as concentrações de INH e coformadores foram determinadas por CLAE (seção 4.2.2.1). Além disso, a cada coleta analisou-se a fase sólida por DRXP para assegurar que não houve transições de fase durante o experimento. O ensaio era finalizado quando o sistema alcançava o equilíbrio, com variação de concentração molar inferior a 5% entre as duas últimas coletas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.2.2.3 Solubilidade dos cocristais e determinação do $K_{sp}$

Para a avaliação da solubilidade dos cocristais de INH, aplicou-se os mesmos parâmetros descritos na seção 4.2.2.2. Diante do conhecimentos que os cocristais podem apresentar transições de fase/conversão à fármaco ou coformadores sólidos, foram realizados experimentos no ponto eutético ( $P_{eu}$ ). Nesta condição, cocristal e coformador (ou fármaco) estão presentes na fase sólida em equilíbrio com a solução. As quantidades de cocristal e coformadores utilizados para cada cocristal estão descritas no Quadro 6

Quadro 6 - Quantidade (mmol) de cocristal e coformador utilizados nos experimentos de solubilidade no  $P_{eu}$ .

	<b>Cocristal (mmol)</b>	<b>Coformador (mmol)</b>
<b>INH-FUM</b>	4,35	8,6
<b>INH-NIC-FUM</b>	2,26	8,6 (FUM)*
<b>INH-CIN</b>	0,88	1,35
<b>INH-PAS</b>	0,67	6,53
<b>INH-RES</b>	0,68	0,44

\*Optou-se por utilizar excesso de FUM por ser o coformador menos solúvel.

Após cada coleta, monitorou-se o pH das amostras filtradas e as concentrações de fármaco e coformador(es) em solução foram quantificadas por CLAE após diluição apropriada em fase móvel. Neste caso, a análise da fase sólida por DRXP e FT-IR visou assegurar que o sistema encontrava-se no  $P_{eu}$  (cocristal + coformador). Os experimentos foram realizados em triplicata.

As equações apresentadas a seguir foram utilizadas para a obtenção dos valores de solubilidade (Tabela 2) e  $K_{sp}$  dos cocristais

(Tabela 3). A completa derivação das equações encontra-se no Apêndice I.

Para cocristais de estequiometria 1:1, como INH-PAS, INH-CIN e INH-RES:

$$S_{CC,T}^{1:1} = \sqrt[2]{[INH]_T [CF]_T} \quad (1)$$

$$K_{sp} = [INH]_0 [CF]_0 \quad (2)$$

Onde  $[INH]_T$  e  $[CF]_T$  representam, respectivamente, as concentrações totais de fármaco e coformador em solução, enquanto  $[INH]_0$  e  $[CF]_0$  referem-se às concentrações das espécies não ionizadas dos componentes do cocristal.

No caso de cocristais de estequiometria 2:1 (fármaco:coformador), como INH-FUM, aplicou-se as equações:

$$S_{CC,T}^{2:1} = 2 \sqrt[3]{\frac{[INH]_T^2 [CF]_T}{4}} \quad (3)$$

$$K_{sp} = [INH]_0^2 [CF]_0 \quad (4)$$

Já para cocristais de estequiometria 1:1:1, como INH-NIC-FUM, foram utilizadas as equações a seguir:

$$S_{CC,T}^{1:1:1} = \sqrt[3]{[INH]_T [CF_1]_T [CF_2]_T} \quad (5)$$

$$K_{sp} = [INH]_0 [CF_1]_0 [CF_2]_0 \quad (6)$$

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de INH e coformadores

Inicialmente, objetivou-se o desenvolvimento de métodos capazes de quantificar fármaco e coformador(es) na mesma análise. Entretanto, como alguns coformadores apresentavam uma polaridade

muito diferente do fármaco, a análise de INH e coformadores utilizando o mesmo método só foi possível para os cocristais INH-FUM e INH-NIC-FUM. Nestes dois casos, alternou-se o comprimento de onda considerando-se o máximo de absorção dos analitos. Para quantificar simultaneamente CIN e INH, desenvolveu-se um método com gradiente de fase móvel, porém, no momento da validação do método, o fármaco eluiu próximo do volume morto. Assim, manteve-se o método gradiente já validado para o CIN e quantificou-se o fármaco separadamente. No total, incluindo as metodologias para quantificação de RES e PAS, quatro métodos foram adaptados e validados.

Os métodos desenvolvidos demonstraram-se lineares, sensíveis, seletivos, precisos, exatos e robustos, conforme exigido pelos órgãos regulatórios (BRASIL, 2017 ICH, 2005). Valores de precisão intradia e interdia (n = 6 para cada analito) demonstraram variabilidade aceitável com desvio padrão relativo inferior a 5% para a quantificação do fármaco e coformadores. Em termos de exatidão, os valores obtidos variaram entre 99,6 e 101,3%. Os resultados das curvas de calibração de cada método, bem como os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados das curvas analíticas aplicadas para a quantificação de INH e coformadores por CLAE.

<b>Parâmetro</b>	<b>INH</b>	<b>NIC</b>	<b>FUM</b>	<b>CIN</b>	<b>PAS</b>	<b>RES</b>
Faixa (µg/mL)*	5-100	5-100	5-100	5-50	5-100	5-100
LD (µg/mL)	0,5832	0,1267	0,8232	0,7653	0,2084	0,4262
LQ (µg/mL)	1,9434	0,4231	2,7440	2,5510	0,6947	1,4206
Coefficiente de correlação	0,9999	0,9998	0,9996	0,9993	0,9999	0,9991

\*Foram consideradas 11 concentrações para o preparo das curvas analíticas na faixa de 5-100 µg/mL e 6 concentrações para a faixa de 5-50 µg/mL.

### 4.3.2 Solubilidade dos cocristais de INH e seus componentes

A avaliação da solubilidade de sistemas cocrystalinos em função do pH é um processo que envolve três etapas. Primeiramente, quantifica-se as concentrações de fármaco e coformador em equilíbrio com o cocrystal em soluções com diferentes valores de pH. Na

seqüência, determina-se a solubilidade do cocristal e o produto de solubilidade ( $K_{sp}$ ) a partir destas concentrações medidas em equilíbrio. Por fim, analisa-se a influência do pH sobre a solubilidade do cocristal, calculada com base no  $K_{sp}$  e nos valores de  $pK_a$  de fármaco e coformador, aplicando-se equações específicas de solubilidade.

Nesta seção, equações que descrevem a relação de solubilidade *versus* pH de cocristais compostos por INH e coformadores ácidos e básico com distintas estequiometrias são apresentadas e aplicadas a fim de compreender e predizer os efeitos do pH na solubilidade destes materiais.

#### 4.3.2.1 Solubilidade dos cocristais e $K_{sp}$

A maioria dos estudos com cocristais farmacêuticos encontrados na literatura são constituídos de fármaco hidrofóbico e coformadores hidrofílicos. Dessa maneira, é esperado que o cocristal seja mais solúvel que o fármaco e que transições de fase de cocristal à fármaco sejam observadas. Contrapondo esses estudos, os cocristais deste trabalho são constituídos de fármaco hidrofílico. Na avaliação da solubilidade aquosa da INH e dos coformadores, foi possível observar que a INH é mais solúvel que os coformadores utilizados em quase todos os valores de pH testados. Sendo assim, os cocristais são mais propensos à conversão ao coformador menos solúvel do que a fármaco. Por este motivo, considerou-se neste projeto o ponto eutético entre cocristal e coformador. Para o cocristal ternário (INH-NIC-FUM), optou-se por realizar os experimentos no  $P_{eu}$  com excesso de cocristal e de FUM por ser o coformador menos solúvel, e portanto menor quantidade de material foi necessária para saturar o meio.

Uma vez que tanto a INH como os coformadores são ionizáveis, a solubilidade dos sistemas avaliados é dependente do pH, razão pela qual este parâmetro foi monitorado no início do experimento e ao atingir o equilíbrio (pH final).

Por meio da determinação da solubilidade no  $P_{eu}$  foi possível quantificar a concentração total de fármaco e coformador(es) no momento em que a solução encontrava-se em equilíbrio com a fase sólida (cocristal + coformador). As concentrações de fármaco e coformador quantificadas por CLAE, juntamente com as fases sólidas em equilíbrio, os valores de pH inicial e final e a solubilidade dos cocristais e da INH em cada pH estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações eutéticas totais de fármaco (INH) e coformador (CF) e solubilidade experimental dos cocrystalos ( $S_{cc,T}$ ) e da INH. O pH inicial e final da solução está descrito, bem como as fases sólidas finais identificadas por DRXP e FT-IR.

Sistema	pH inicial - final	Fases sólidas no equilíbrio	$[INH]_{eu}$ (mM) $\pm DP^a$	$[CF]_{eu}^b$ (mM) $\pm DP^a$	$S_{cc,T}^c$ (mM) $\pm DP^a$
INH	3,00 - 3,06	INH	5.794,24 $\pm$ 55,13	-	-
	1,20 - 4,52	INH	1.276,23 $\pm$ 32,44	-	-
	6,58 - 6,94	INH	1.292,17 $\pm$ 14,66	-	-
	7,40 - 7,36	INH	1.298,22 $\pm$ 67,84	-	-
INH-NIC-FUM	1,20 - 3,03	INH-NIC-FUM + FUM	121,41 $\pm$ 7,32	NIC: 134,91 $\pm$ 1,23 FUM: 168,09 $\pm$ 1,42	140,16 $\pm$ 7,62
	6,70 - 3,17	INH-NIC-FUM + FUM	115,17 $\pm$ 9,11	NIC: 136,73 $\pm$ 2,07 FUM: 153,65 $\pm$ 7,44	134,25 $\pm$ 3,59
	7,40 - 3,21	INH-NIC-FUM + FUM	116,75 $\pm$ 3,82	NIC: 144,55 $\pm$ 1,72 FUM: 168,10 $\pm$ 2,51	141,56 $\pm$ 5,31
INH-FUM	1,20 - 3,26	INH-FUM + FUM	351,12 $\pm$ 8,43	503,63 $\pm$ 5,32	498,90 $\pm$ 10,60
	6,70 - 3,34	INH-FUM + FUM	306,22 $\pm$ 10,98	549,84 $\pm$ 12,82	468,93 $\pm$ 37,84
	7,40 - 3,36	INH-FUM + FUM	307,25 $\pm$ 7,55	571,43 $\pm$ 9,37	476,36 $\pm$ 12,48
INH-PAS	1,20 - 4,11	INH-PAS + PAS	100,59 $\pm$ 0,71	58,33 $\pm$ 0,57	76,60 $\pm$ 3,63
	6,24 - 4,48	INH-PAS + PAS	97,58 $\pm$ 2,14	83,45 $\pm$ 0,90	90,24 $\pm$ 7,15
	7,40 - 4,67	INH-PAS + PAS	138,92 $\pm$ 1,26	140,55 $\pm$ 1,28	139,73 $\pm$ 0,37
INH-CIN	1,20 - 4,14	INH-CIN + CIN	194,88 $\pm$ 2,11	8,01 $\pm$ 0,11	39,52 $\pm$ 1,34
	6,32 - 4,83	INH-CIN + CIN	166,58 $\pm$ 2,53	15,05 $\pm$ 0,07	50,07 $\pm$ 3,35
	7,40 - 5,00	INH-CIN + CIN	169,46 $\pm$ 3,56	21,95 $\pm$ 0,09	60,99 $\pm$ 5,02
INH-RES	1,20 - 3,80	INH-RES + RES	100,97 $\pm$ 5,56	0,32 $\pm$ 0,01	5,73 $\pm$ 3,63
	3,50 - 4,33	INH-RES + RES	83,39 $\pm$ 1,80	0,21 $\pm$ 0,01	4,14 $\pm$ 0,84
	6,32 - 4,99	INH-RES + RES	75,99 $\pm$ 3,02	0,22 $\pm$ 0,01	4,07 $\pm$ 0,47
	7,40 - 6,02	INH-RES + RES	73,56 $\pm$ 5,87	0,22 $\pm$ 0,01	4,00 $\pm$ 0,46

<sup>a</sup> DP = Desvio Padrão

<sup>b</sup> A concentração do coformador adicionado em excesso no  $P_{eu}$  corresponde à sua solubilidade.

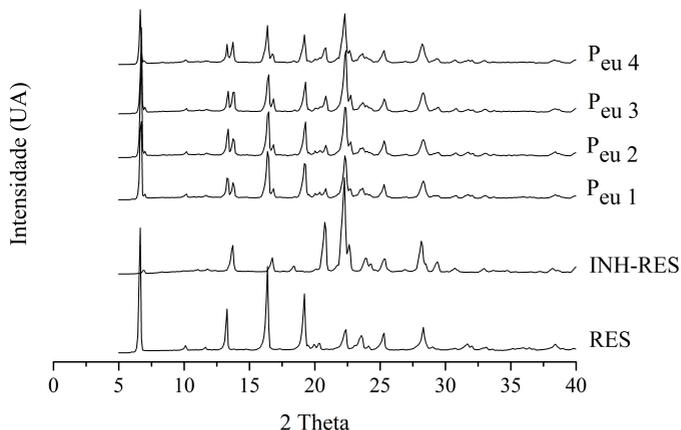
<sup>c</sup> Obtido através das equações 1, 3 e 5.

As alterações entre o pH inicial e final, observadas até mesmo para a solução tampão pH 7,40 devem-se às concentrações e à ionização do fármaco básico e dos coformadores ácidos (exceto NIC) em equilíbrio. Destaca-se a estreita faixa de pH final (3,03 – 3,36)

obtida nos experimentos com os cocristais INH-FUM e INH-NIC-FUM. Dentre os coformadores utilizados, o FUM é o ácido mais forte, o que explica a redução do pH da solução para valores próximos aos valores de  $pK_a$  do coformador. Por esta razão, não foi possível a realização dos experimentos em valores de pH mais elevados. Vale também ressaltar que, para a avaliação da solubilidade, deve-se considerar o pH no equilíbrio (pH final).

Ao final dos experimentos de solubilidade dos cocristais, a fase sólida constituiu-se de uma mistura de cocrystal e coformador, comprovando assim que as suspensões estavam no  $P_{eu}$  em todos os sistemas avaliados. A Figura 18 demonstra como foi realizada a caracterização por DRXP. Nessa análise foi possível verificar que as amostras presentes no  $P_{eu}$  para o cocrystal INH-RES apresentaram difrações características do coformador RES (6,6°, 16,4° e 19,2°) e de INH-RES (6,9°, 13,7°, 20,8° e 22,7°) (Figura 18). Como esperado, este resultado também indica a ausência de conversão à fármaco mediada pela solução.

Figura 18 – Identificação por DRXP da fase sólida presente no experimento de solubilidade do cocrystal INH-RES no  $P_{eu}$  em diferentes soluções aquosas. Valores de pH final:  $P_{eu 1} = 3,8$ ;  $P_{eu 2} = 4,33$ ;  $P_{eu 3} = 4,33$ ;  $P_{eu 4} = 6,02$ .



Após a obtenção das concentrações eutéticas de fármaco e coformadores demonstradas na Tabela 2, partiu-se para a segunda etapa, que foi a determinação da solubilidade e do  $K_{sp}$  dos cocristais à 37°C (Tabela 3).

Equações que relacionam as concentrações dos componentes do cocristal com sua solubilidade e  $K_{sp}$  dependem da estequiometria de cada sistema, e, com exceção do cocristal ternário, são conhecidas (ALHALAWEH et al., 2012; GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2009; KUMINEK et al., 2015, 2016).

O  $K_{sp}$  consiste no produto da concentração molar dos componentes do cocristal na forma não ionizada, calculadas a partir dos conceitos das reações de equilíbrio químico em solução descritos por Henderson-Hasselbach (BUTLER, 1964).

Uma vez que os valores de  $K_{sp}$  costumam ser pequenos, este parâmetro é comumente expresso em escala logarítmica ( $pK_{sp} = -\log K_{sp}$ ). Logo, quanto maior é o valor de  $K_{sp}$ , menor o  $pK_{sp}$ . Valores menores de  $pK_{sp}$  estão associados aos cocristais mais solúveis.

Tabela 3 -  $K_{sp}$  dos cocristais de INH.

Cocristal	$K_{sp}$	$pK_{sp}$
INH-FUM	$1,65 (\pm 0,10) \times 10^{-3} M^2$	2,78
INH-NIC-FUM	$8,16 (\pm 1,11) \times 10^{-3} M^2$	4,09
INH-PAS	$1,33 (\pm 0,35) \times 10^{-3} M^2$	2,88
INH-CIN	$7,73 (\pm 0,77) \times 10^{-4} M^2$	3,11
INH-RES	$1,70 (\pm 0,29) \times 10^{-5} M^2$	4,77

A obtenção do valor de  $K_{sp}$  de um dado cocristal é de extrema importância, pois a partir desta constante, é possível aplicar modelos matemáticos para obter as curvas de solubilidade dos cocristais em uma ampla faixa de pH e compará-las com a curva da solubilidade do fármaco e coformadores. Desse modo, pode-se antecipar o comportamento de solubilidade do cocristal sem a necessidade de realizar experimentos em cada valor de pH.

A solubilidade do fármaco varia com o pH de acordo com a equação conhecida:

$$S_{INH,T} = S_{INH,0}(1 + 10^{pK_{a,INH}-pH}) \quad (6)$$

onde  $S_{INH,T}$  representa a solubilidade total da INH, o subscrito 0 refere-se à solubilidade intrínseca da INH (solubilidade do fármaco não ionizado) e  $pK_{a,INH}$  retrata a constante de ionização do fármaco. A solubilidade da INH foi avaliada experimentalmente em quatro valores

de pH (Tabela 2) e a solubilidade intrínseca foi calculada a partir da equação 7, com o resultado de 1,298 ( $\pm 0,002$ ) M.

As equações que descrevem a solubilidade dos cocristais em função do pH (Quadro 7) foram derivadas com base nas constantes de equilíbrio envolvidas na dissociação dos cocristais ( $K_{sp}$ ), constantes de ionização ( $K_a$ ) dos seus componentes e estequiometria do cocristal. Foram considerados apenas os valores de  $pK_a$  (Quadro 4, capítulo II) com relevância para a faixa de pH avaliada neste projeto (1-8). A completa derivação das equações encontra-se no Apêndice I. Ressalta-se que efeitos de complexação e interações iônicas não foram considerados neste trabalho.

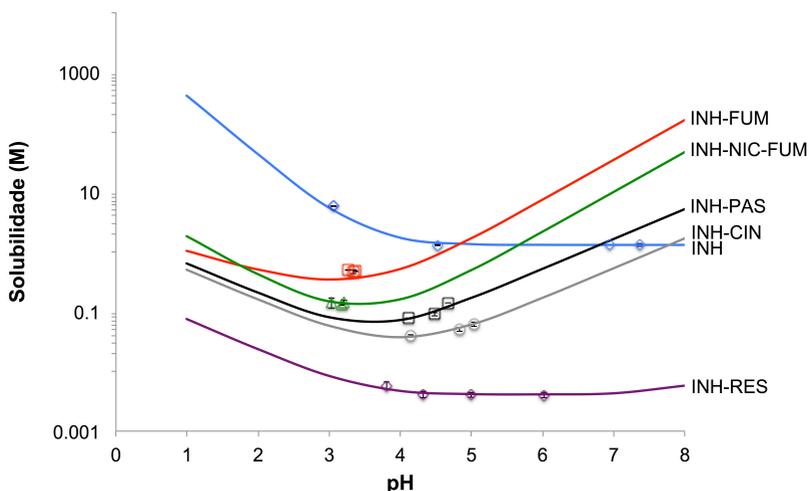
Quadro 7 - Equações preditivas da solubilidade dos cocristais de INH com coformadores ácidos e básico em função do pH a partir dos parâmetros  $K_{sp}$ , pH e  $pK_a$ . A derivação completa das equações encontra-se no Apêndice I.

Cocristal	Equação preditiva da solubilidade
<b>INH-FUM (2:1)</b>  (base/ácido diprótico)	$S_{CC}^{2:1} = 2 \sqrt{K_{sp}/4 (1 + 10^{pK_{a,INH}-pH})}$  $\times \sqrt{(1 + 10^{pH-pK_{a1,H_2A}} + 10^{2pH-pK_{a1,H_2A}-pK_{a2,H_2A}})}$
<b>INH-NIC-FUM (1:1:1)</b>  (base/base/ácido diprótico)	$S_{CC}^{1:1:1} = \sqrt[3]{K_{sp}(1 + 10^{pK_{a,INH}-pH})(1 + 10^{pK_{a,B}-pH})}$  $\times \sqrt[3]{(1 + 10^{pH-pK_{a1,H_2A}} + 10^{2pH-pK_{a1,H_2A}-pK_{a2,H_2A}})}$
<b>INH-RES (1:1)</b> <b>INH-CIN (1:1)</b> <b>INH-PAS (1:1)</b>  (base/ácido monoprótico)	$S_{CC}^{1:1} = \sqrt{K_{sp}(1 + 10^{pK_{a,INH}-pH})(1 + 10^{pH-pK_{a,HA}})}$

Sabe-se que cocristais farmacêuticos podem exibir um perfil de solubilidade pH-dependente completamente diferente do fármaco puro, resultante das propriedades de ionização do coformador (KUMINEK et al., 2015; ROCHA et al., 2016). As curvas de solubilidade *versus* pH preditas e os pontos experimentais para INH e cocristais (Figura 19) demonstram que os cocristais apresentam curva

de solubilidade em U, diferente do fármaco que apresenta curva descendente.

Figura 19 - Diagrama de solubilidade de fases da INH e dos cocristais INH-FUM, INH-NIC-FUM, INH-PAS, INH-CIN e INH-RES. Os símbolos representam as solubilidades obtidas pelas concentrações de fármaco e coformador no  $P_{eu}$  aplicadas às equações 1, 3 e 5. As curvas preditivas foram geradas a partir das equações apresentadas no Quadro 7.



Com os resultados obtidos, pode-se observar que a INH comporta-se como uma base. Conforme o pH diminui ( $\text{pH} < 4$ ), as frações ionizadas do fármaco aumentam, resultando em maior solubilidade. Alta concentração de ácido clorídrico foi necessária para obter um ponto experimental em pH inferior a 4 a fim de confirmar o comportamento básico do fármaco. A ação tamponante da INH tende a aumentar o pH da solução ácida provocando diferença significativa entre o pH inicial e o pH final. Estes resultados são divergentes em relação ao encontrado por Blokhina et al (2015), onde variações de pH praticamente não afetaram a solubilidade da INH. Isto poderia ser explicado por diferenças metodológicas, já que o estudo da literatura não monitorou o pH final das soluções e provavelmente não foi possível atingir experimentalmente a região de pH abaixo de 4.

O perfil em U exibido pelos cocristais deve-se à ionização dos coformadores ácidos em valores de pH elevados, resultando em

aumento da solubilidade do novo complexo molecular. Em relação ao cocristal INH-RES, verificou-se uma região de *plateau* na solubilidade entre pH 4,5 e 7 decorrente das hidroxilas ácidas fracas do coformador, que resultam em leve aumento da solubilidade apenas em valores de pH superiores a 7.

Todos os cocristais exibem solubilidade reduzida em comparação ao fármaco em valores de pH entre 1 e 5, aproximadamente. É importante destacar, entretanto, que esta relação de solubilidade é invertida a partir de determinado pH (Quadro 8) e os cocristais (exceto INH-RES) passam a apresentar-se mais solúveis que o fármaco puro. Este valor é um ponto de transição denominado  $pH_{max}$ , que permite conhecer as regiões de estabilidade do cocristal. Cocristais são menos solúveis que o fármaco em  $pH < pH_{max}$ , igualmente solúveis ao fármaco em  $pH = pH_{max}$  e mais solúveis que o fármaco quando  $pH > pH_{max}$  (CHEN; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2015).

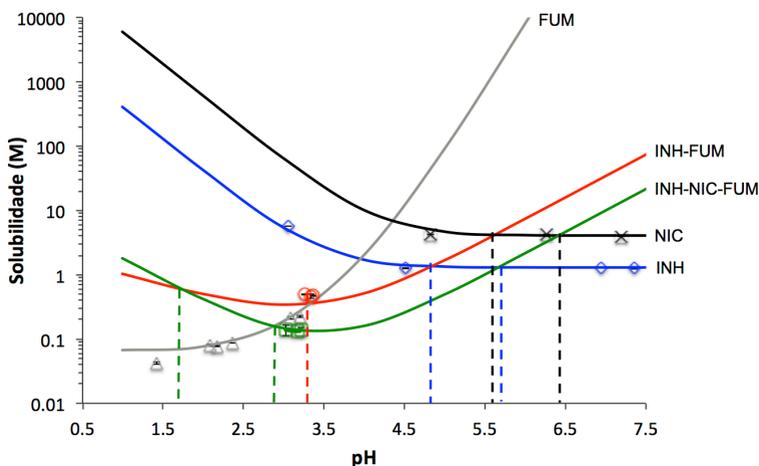
Quadro 8 – Valores de  $pH_{max}$  entre os cocristais e a INH.

Cocristal	$pH_{max}$
INH-FUM	4,8
INH-NIC-FUM	5,7
INH-CIN	7,7
INH-PAS	6,8

No que se refere à avaliação da solubilidade dos cocristais de INH, quando o pH da solução é  $< pH_{max}$ , a solubilidade do cocristal pode ser mensurada a partir da dissolução do cocristal em equilíbrio com a solução pela simples suspensão do mesmo, uma vez que o cocristal é a forma estável e não tende a converter aos seus componentes. Por outro lado, se o pH da solução é  $> pH_{max}$ , podem ocorrer transições de fase em solução. Neste caso, só é possível acessar a solubilidade estequiométrica do cocristal de maneira segura partir das concentrações eutéticas de fármaco e coformador(es) (GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO 2009). Os maiores valores de  $pH_{max}$ , encontrados para INH-CIN e INH-PAS indicam que estes cocristais são menos solúveis e mais estáveis que o fármaco em praticamente toda a faixa de pH avaliada.

Vale ressaltar que também é possível a existência de pontos de transição entre os cocrystal e/ou entre o cocrystal e coformador, como verificado para os cocrystal INH-FUM e INH-NIC-FUM. No gráfico de solubilidade destes cocrystal e seus componentes em função do pH (Figura 20) verificam-se múltiplos  $pH_{max}$  (cocrystal-cocrystal, cocrystal-fármaco, cocrystal-coformador), o que resulta em uma estreita região de estabilidade dos cocrystal (pH 3 a 5).

Figura 20 - Diagrama de solubilidade de fases para os cocrystal INH-FUM, INH-NIC-FUM e seus componentes INH, FUM e NIC. As linhas pontilhadas destacam os valores de  $pH_{max}$ .



De acordo com as curvas de predição é possível observar que a presença de NIC proporciona um aumento da solubilidade do cocrystal ternário (INH-NIC-FUM) em relação ao binário (INH-FUM) em pH inferior a 1,7. Este resultado pode ser explicado pela maior solubilidade da NIC em comparação ao FUM (cerca de 17.000 vezes mais solúvel em pH 1,7). Em pH 1,7, existe um ponto de transição ( $pH_{max}$ ) entre os dois cocrystal, e a partir deste pH a solubilidade do cocrystal ternário torna-se menor que a do cocrystal binário. Esta inversão é atribuída ao drástico aumento de solubilidade do FUM em maiores valores de pH, e à redução da solubilidade da NIC (até atingir o *plateau* em pH 5). A ionização do FUM é responsável pelo aumento da solubilidade dos dois cocrystal em pH superior a 3,5. Acredita-se que a semelhança observada entre as curvas dos cocrystal INH-NIC-

FUM (1:1:1) e INH-FUM (2:1) na região de pH entre 3,5 e 7,5 esteja relacionada à estequiometria dos sólidos, que resulta em uma proporção equivalente de FUM na composição dos mesmos.

Aitipamula et al. (2013) realizou experimento de solubilidade com INH-FUM e INH-NIC-FUM em pH inicial de 7,5 e constatou que os dois cocristais foram menos solúveis que o fármaco. No entanto, conforme observado na Figura 19, tal afirmação não reflete toda a faixa de pH, pois quando os componentes do cocristal são ionizáveis, a solubilidade não se trata de um parâmetro fixo, mas dependente do pH da solução. Além disso, os autores atribuem um valor de  $C_{\max}$  (concentração máxima de fármaco) como  $S_{cc}$ . De forma semelhante, Sarcevic e colaboradores (2013) descreveram que o cocristal INH-CIN é menos solúvel que a INH a partir de experimento de suspensão do cocristal em água. Zhou e colaboradores (2016) avaliaram o cocristal INH-RES em diferentes valores de pH, porém, não houve comparação entre a solubilidade do cocristal e da INH pois neste trabalho priorizou-se o aprimoramento das propriedades físico-químicas do RES (ZHOU et al., 2016).

Em contraste à maioria dos trabalhos encontrados na literatura, em que a solubilidade dos cocristais é relatada como um valor fixo, os resultados deste capítulo comprovam que o pH é um fator crucial que exerce significativa influência na solubilidade de cocristais compostos por fármaco e coformador ionizáveis.

Conhecer o comportamento de solubilidade e estabilidade dos cocristais de INH em uma ampla faixa de pH, foi essencial para planejar com segurança os experimentos de permeação cutânea apresentados no capítulo a seguir.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Os métodos analíticos de CLAE desenvolvidos e validados mostraram-se adequados para a quantificação de INH e coformadores. O método termodinâmico no  $P_{eu}$  foi eficiente para o cálculo da solubilidade e do  $K_{sp}$  dos cocristais sem a necessidade de grandes volumes de amostra e de solução. A INH comporta-se como um fármaco básico uma vez que se observou um aumento da solubilidade com a redução do pH. A cocristalização da INH com coformadores ácido e básico resultou em perfis de solubilidade vs. pH característicos, decorrentes do comportamento de ionização do

fármaco e do respectivo coformador. Quatro dos cinco cocristais apresentaram um ponto de transição ( $\text{pH}_{\text{max}}$ ) a partir do qual passaram a ser mais solúveis e menos estáveis que o fármaco. A comparação entre os valores calculados e experimentais confirmou que os modelos aqui apresentados possuem alto poder preditivo e permitem estimar a solubilidade e as regiões de estabilidade dos cocristais em uma ampla faixa de pH sem determinar experimentalmente todo o diagrama de fase. Além de anteciparem o comportamento destes sistemas em meio aquoso, os modelos matemáticos ainda comprovam que a consideração do pH é imprescindível para acessar com segurança valores de solubilidade destes cocristais.



#### **CAPÍTULO IV**

### **ENSAIOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE ISONIAZIDA E COCRISTAIS EM CÂMARA DE DIFUSÃO DE FRANZ**

---



## 5 ENSAIOS DE PERMEACÃO CUTÂNEA DE ISONIAZIDA E COCRISTAIS EM CÂMARA DE DIFUSÃO DE FRANZ

### 5.1 INTRODUÇÃO

A tuberculose cutânea representa cerca de 1-2% dos casos de tuberculose extrapulmonar e o tratamento inclui o mesmo esquema terapêutico da tuberculose pulmonar (isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida) (BRAVO; GOTUZZO, 2007; LAICHEONG et al., 2007; VAN ZYL; DU PLESSIS; VILJOEN, 2015). Ainda que altamente eficaz, a administração destes antitubercúlicos por via oral tem sido associada a graves efeitos adversos, principalmente hepatotoxicidade, que ameaçam a adesão dos pacientes e a conclusão do tratamento, além de favorecer o desenvolvimento de cepas multirresistentes (GÜLBAY et al., 2006; TOSTMANN et al., 2008).

Como alternativa para evitar tais problemas, a administração local de INH poderia ser explorada, já que nenhuma formulação tópica encontra-se disponível comercialmente até o momento (VAN ZYL; DU PLESSIS; VILJOEN, 2015). Em estudo recente, experimentos de permeação cutânea de INH *ex vivo* resultaram em altas concentrações sistêmicas do fármaco, o que seria favorável à utilização desta via para o tratamento da tuberculose pulmonar (CAON et al., 2015). Para o tratamento da tuberculose cutânea, no entanto, são desejáveis formulações que promovam uma ação farmacológica local.

Apesar de amplamente utilizada para o aprimoramento de diversas propriedades físico-químicas de fármacos, poucos estudos exploraram a estratégia da cocristalização para otimizar a permeabilidade dos mesmos. Em menor frequência ainda, encontram-se relatos de aplicação da cocristalização farmacêutica para a modulação da permeação cutânea de fármacos e, até o momento, não foi relatado o uso da cocristalização visando uma aplicação tópica.

Diante disso, a proposta deste capítulo foi avaliar o impacto da cocristalização na permeação cutânea da INH utilizando coformadores “inteligentes”, os quais possuem ação conhecida como promotores ou retardadores de permeação, ou ainda que exerçam ação farmacológica sinérgica à INH.

## 5.2 METODOLOGIA

### 5.2.1 Materiais

Foram utilizados INH e os cocristais previamente obtidos e caracterizados conforme descrito no Capítulo II. Solução tampão PBS foi preparada de acordo com protocolos padronizados (COLD SPRING HARB PROTOC; 2012). Utilizou-se acetonitrila grau HPLC e outros reagentes (ácidos, bases, solventes, sais) de pureza analítica. A água ultrapura foi obtida a partir de sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, USA).

### 5.2.2 Métodos

#### 5.2.2.1 Avaliação da estabilidade das misturas físicas em PBS

A análise comparativa entre a permeação cutânea dos cocristais e suas respectivas misturas físicas tinha sido inicialmente prevista no escopo deste estudo. Anteriormente aos estudos de permeação, foi realizado um teste preliminar para avaliar a estabilidade das misturas físicas de fármaco e coformadores em tampão PBS. Quantidades de fármaco e coformadores equivalentes às utilizadas nos experimentos de permeação com os cocristais foram adicionadas a 2 mL (volume da câmara doadora) de tampão PBS pH 7,4 e mantidos à 37°C, sem agitação, durante 6h. Ao final do experimento, filtrou-se a fase sólida, que foi posteriormente analisada por FT-IR a fim de verificar se houve conversão de fases ou se a mistura física manteve-se estável.

#### 5.2.2.2 Ensaios de permeação cutânea *ex vivo*

A permeação da INH e dos cinco cocristais foi avaliada conforme método descrito por Caon e colaboradores (2015). A pele de orelha de porco foi selecionada como modelo de membrana tendo em vista a sua semelhança com a pele humana em termos de pigmentação, vascularização, composição lipídica e distribuição folicular (especialmente importante para moléculas polares como a INH) (CAON et al., 2015; JUNG; MAIBACH, 2015; MUHAMMAD; RIVIERE, 2006).

As orelhas suínas foram obtidas em um matadouro local, situado na cidade de Antônio Carlos (SC), e armazenadas em tampão Krebs à 4°C até o processamento. As camadas mais externas, ou seja, derme e epiderme ( $1,00 \pm 0,005$  mm) foram manualmente separadas da hipoderme com auxílio de bisturi. As amostras foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a -20°C até o momento da utilização. O descongelamento foi realizado à temperatura ambiente (25°C), com adição da solução tampão PBS refrigerada (4°C).

As câmaras de Franz foram alocadas no banho termostatzado (37°C) com agitação magnética multiponto (Dist<sup>®</sup>) a 800 rpm. O compartimento receptor foi preenchido com tampão PBS (10 mL). O tecido foi disposto na interface dos compartimentos da câmara de Franz, com a epiderme voltada para o compartimento doador e a derme para o compartimento receptor. Considerou-se uma área de difusão de  $1,77$  cm<sup>2</sup>.

Antes de iniciar os ensaios de permeação propriamente ditos, ambos os compartimentos foram preenchidos com tampão PBS de modo a manter uma hidratação mais uniforme dos tecidos. Estipulou-se um período de equilíbrio de 30 min. Os cocristais (INH-FUM, INH-NIC-FUM, INH-CIN, INH-PAS, INH-RES) em quantidades equivalentes a 75 mg de INH foram suspensos em 2 mL de PBS e depositados sobre a superfície da epiderme. Utilizou-se esta quantidade de INH para garantir que, ao final dos experimentos com os cocristais, pudesse ser coletada fase sólida da câmara doadora. Como controle, avaliou-se a permeação do fármaco puro (75 mg de INH em 2 mL de PBS). Em intervalos pré-determinados (a cada 1 h, durante 6 h), alíquotas de 400 µL da solução receptora foram retiradas pela cânula de amostragem (com reposição da solução) e quantificadas por CLAE utilizando o método previamente descrito (item 4.2.2.1). No final do experimento de permeação *ex vivo*, coletou-se a fase sólida presente na câmara doadora a fim de avaliar se os cocristais permaneceram estáveis ao longo de todo o período do experimento. A caracterização da fase sólida foi realizada por DXRP.

A análise final da permeação da INH sozinha e da INH proveniente dos cocristais através da pele incluiu o cálculo dos coeficientes de permeabilidade, dos fluxos constantes e dos tempos de latência, bem como a plotagem das quantidades permeadas do fármaco ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em função do tempo (h). Os valores de coeficiente de

permeabilidade ( $P$ ) foram obtidos a partir da seguinte equação (CHEN; HUI-NAN; XIAO-LING, 2002):

$$P = \frac{dQ/dt}{A \times Cd} \quad (8)$$

Onde:  $A$  = superfície da área de difusão,  $dQ/dt$  = quantidade de fármaco que permeou por unidade de tempo, e  $Cd$  = concentração do fármaco no compartimento doador.

O estado de fluxo constante ( $J_s$ ) foi calculado pelo coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade de INH permeada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em função do tempo (h) (MASHRU et al., 2005). O tempo de latência ( $T_L$ ), definido como o tempo necessário para que o transporte de uma substância através de uma membrana atinja o equilíbrio, foi obtido a partir da extrapolação da porção linear da reta até a interceptação no eixo das abscissas (tempo) (BARRY, 2002).

A cinética de permeação foi determinada utilizando o DD-Solver, um programa *Add-In* para Microsoft Excel. Foram aplicados os modelos de ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas, e Higuchi. Escolheu-se como modelo que melhor correspondeu à cinética de permeação aquele que apresentou o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) mais próximo a 1.

#### 5.2.2.3 *Estudo da retenção cutânea ex vivo da INH*

Ao final do experimento, as amostras de pele expostas aos tratamentos foram lavadas com PBS para remover o excesso de sólido nas camadas superficiais e a epiderme foi separada da derme com o auxílio de bisturi. Com auxílio de tesoura, fragmentos ainda menores foram gerados de modo a aumentar a eficiência de extração do fármaco a partir dos tecidos. A extração da INH dos fragmentos da pele foi realizada com 3 mL de acetonitrila, que, após 24 h de armazenamento em geladeira (4°C), incluiu uma etapa de sonicação (15 min) e centrifugação (5 min). As amostras foram diluídas e analisadas por CLAE.

#### 5.2.2.4 *Análise Estatística*

Todos os experimentos de permeação foram realizados em sextuplicata. A comparação entre os parâmetros de fluxo, tempo de

latência e coeficientes de permeabilidade obtidos para a INH e para os cocristais foi realizada por análise de variância (ANOVA) com pós teste de Tukey utilizando o software GraphPad InStat. Os valores de quantidade de INH permeada após 6 h foram analisados pelo teste t-Student entre cada cocristal e o fármaco puro. Aplicou-se intervalo de confiança de 95%. Diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

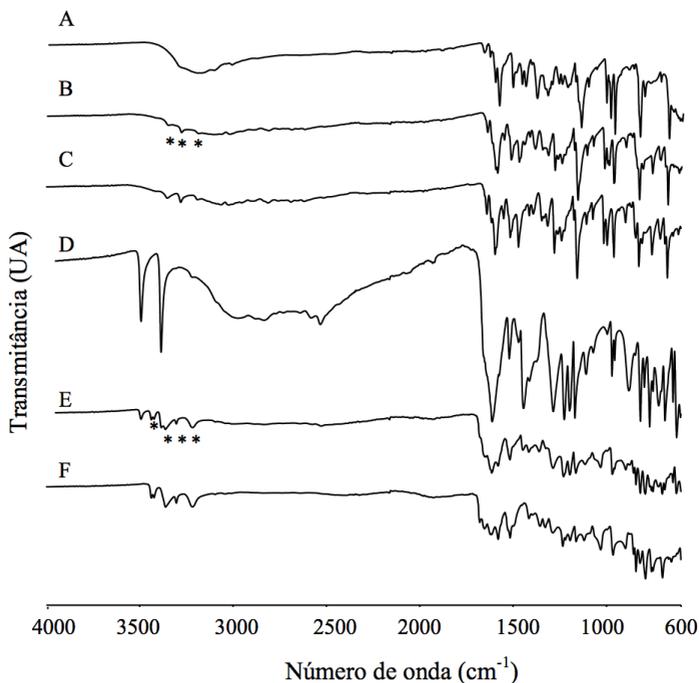
Tendo em vista as limitações relativas à hepatotoxicidade da terapia anti-tuberculínica e a ausência de um tratamento local para a tuberculose cutânea, justifica-se a pesquisa por rotas alternativas para a administração da INH, dentre as quais destaca-se a via cutânea. Para o desenvolvimento de uma formulação tópica, se faz necessária uma avaliação da capacidade de permeação cutânea do fármaco e excipientes, a qual pode ser realizada utilizando modelos *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Neste estudo, experimentos de permeação cutânea *ex vivo* foram considerados.

Devido à formação de ligações de hidrogênio entre fármaco e coformador, o cocristal apresenta propriedades físico-químicas de um novo sólido cristalino, as quais diferem do fármaco puro e de uma simples mistura física entre os seus componentes. De acordo com Dai e colaboradores (2016), o aprimoramento da permeabilidade do fármaco 5-fluorouracil foi atribuído à cocristalização com ácidos carboxílicos, já que a mistura física não resultou em nenhuma melhora deste parâmetro. A ausência de interações intermoleculares na mistura física explicaria estas diferenças. O tipo de interação dos cocristais com as barreiras biológicas ainda não é claro. Ferretti e colaboradores (2015), por exemplo, investigaram o impacto que três cocristais apresentavam sobre a resistência elétrica transepitelial (TEER) de membranas biológicas. Os autores concluíram que não há uma regra capaz de prever a ação do cocristal e da mistura física de seus componentes sobre as membranas biológicas.

Muito embora a análise comparativa entre cada cocristal e a respectiva mistura física de fármaco e coformador estivesse inclusa no planejamento inicial deste trabalho, observou-se a cocristalização espontânea entre INH e PAS e INH e RES em solução, o que tornou a comparação inviável. A conversão da mistura física de fármaco e

coformador para INH-PAS e INH-RES foi evidenciada pelo surgimento de bandas de FT-IR características dos cocristais após 6h em contato com o tampão PBS (Figura 21). A cocrystalização espontânea destes dois sistemas foi favorecida pela menor solubilidade e maior estabilidade dos cocristais INH-RES e INH-PAS em comparação aos demais, conforme observado no diagrama de solubilidade dos cocristais (Figura 19, capítulo III). Como exceção, a mistura física de INH e CIN manteve-se estável apesar da baixa solubilidade do cocrystal INH-CIN, provavelmente devido à reduzida molhabilidade do coformador, o que dificultou a interação com o fármaco e impossibilitou a transição de fase mediada por solução. No que se refere aos sistemas INH-NIC-FUM e INH-FUM, as misturas físicas apresentaram conversão parcial aos respectivos cocristais, associados à FUM sólido.

Figura 21 - Espectros FT-IR da mistura física de INH e RES antes (A) e após 6 h em tampão PBS pH 7,4 (B), demonstrando a conversão ao cocrystal INH-RES (C). De maneira semelhante, a mistura física entre INH e PAS (D) antes e após 6 h em tampão PBS (E) indica a conversão ao cocrystal INH-PAS (F). \* Aponta as principais bandas características dos cocristais identificadas nos espectros B e E.



Para sistemas como INH-RES e INH-PAS, perfis de permeação semelhantes seriam obtidos para os cocristais e as respectivas misturas físicas, de forma que não seria possível atribuir vantagens ou desvantagens à cocrystalização. Por esta razão, as misturas físicas não foram consideradas nos ensaios de permeação. Este achado destaca a importância da caracterização no estado sólido durante os experimentos envolvendo sólidos multicomponentes. Além disso, deve-se ter cuidado com a possibilidade de cocrystalização espontânea *in vivo* quando da administração concomitante de fármacos e excipientes que podem atuar como coformadores. Um exemplo deste cenário ocorreu durante a administração combinada de melamina e

ácido cianúrico, ambos presentes em produtos para alimentação de animais de estimação. Após a formação de cocrystalis *in vivo*, esta associação causou falência renal aguda em cães e gatos (DOBSON et al., 2008).

Não há formulações que associem INH e RES disponíveis comercialmente. Entretanto, a administração simultânea destas substâncias poderia culminar na formação do cocrystal INH-RES *in situ*. A combinação entre INH e PAS, por sua vez, é comumente indicada para o tratamento de pacientes portadores de tuberculose extensivamente resistente ou que não responderam ao tratamento de tuberculose multirresistente (DONALD; DIACON, 2015).

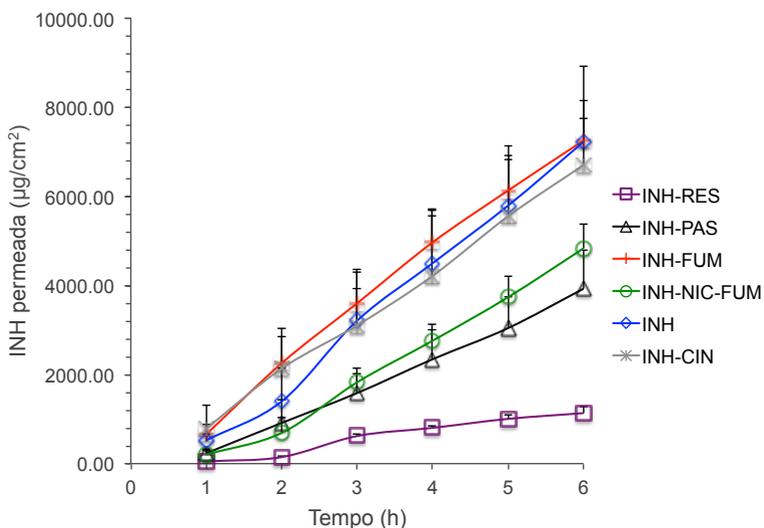
O conselho médico britânico desenvolveu uma série de testes randomizados e controlados para avaliar a eficácia da administração de PAS e INH isolados e em associação, utilizando diferentes dosagens de PAS. Os resultados indicaram que após três meses de tratamento com 200 mg de INH, em duas doses diárias de 100 mg, associados à 10 g de PAS, distribuídos em 2 dosagens de 5 g diariamente, 75 % dos pacientes apresentaram bacteriologia negativa em ambas microscopia e cultura de escarro. Tal achado incentivou a utilização combinada destes fármacos, uma vez que apenas 23 % dos pacientes apresentaram bacteriologia negativa dois meses após a administração de INH isolada. Ao final do terceiro mês de tratamento apenas com INH, 71 % das culturas também mostraram resistência a este fármaco (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1950; MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1952; MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1953; MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1955).

Não há relatos de redução da eficácia da INH devido à coadministração com PAS, o que possivelmente descarta o fenômeno de cocrystalização *in situ*, pois o mesmo resultaria em redução da solubilidade do complexo com consequente impacto na biodisponibilidade da INH. No entanto, vale ressaltar que, nos estudos do conselho médico britânico, o PAS foi utilizado na forma de grânulos gastrorresistentes, desenvolvidos em 1994 pela Jacobus Pharmaceutical Company (Princeton, NJ, USA) e utilizados até hoje nos Estados Unidos, Europa e diversos países. Esta formulação resulta na liberação lenta do PAS, promovendo um longo período de ação bacteriostática em que a concentração do fármaco fica acima da concentração inibitória mínima (2 µg/mL). Além disso, evita-se a produção do metabólito tóxico meta-aminofenol, subproduto originado

a partir da metabolização do PAS após liberação no estômago (DONALD; DIACON, 2015; SCHAAF et al., 2014). Uma vez que a INH apresenta-se mais solúvel em valores de pH ácido e seria prontamente liberada no estômago, é possível que a formulação de PAS gastrorresistente também inviabilize a formação de cocristais *in situ* após administração concomitante dos dois fármacos.

Neste contexto, o efeito da cocristalização sobre a permeação cutânea foi avaliado por comparação entre os resultados obtidos para INH e cada cocristal. Após ajustes de diluição, a quantificação da INH por CLAE permitiu a obtenção dos gráficos de perfil cinético de difusão (Figura 22), a partir dos quais foram calculados os parâmetros de permeabilidade.

Figura 22 - Perfis de permeação da INH e dos cocristais através da pele de orelha de porco. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ).



Os perfis cinéticos da INH e dos cocristais, exceto INH-RES, demonstraram comportamento linear mediante cálculo dos coeficientes de correlação ( $R^2 > 0,99$ ), classificando-os como sendo de ordem zero e indicando que o  $J_s$  independe da concentração do fármaco. Para o cocristal INH-RES, no entanto, obteve-se coeficiente

de correlação de 0,96. Desta forma, procedeu-se a análise dos dados utilizando o software *Add-In* DD-Solver, o qual sugeriu que a cinética de ordem zero também é o modelo mais adequado para este sistema por demonstrar o valor de  $R^2$  mais próximo a 1 ( $R^2 = 0,922$ ). Este comportamento é geralmente encontrado em casos em que excesso de fármaco é aplicado sobre a pele (dose infinita). Muito observada em adesivos transdérmicos, a cinética de ordem zero resulta em menor flutuação na concentração de fármaco absorvida (FLYNN, 1989; PASTORE et al., 2015).

A quantidade de INH permeada através da pele por unidade de área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) aumentou linearmente em função do tempo (h) para todos os sistemas, de modo que o parâmetro de fluxo pôde ser determinado a partir da porção linear do gráfico, enquanto a interseção com o eixo das abscissas permitiu a obtenção do valor do tempo de latência (Tabela 4).

Observou-se que o tempo de latência, o qual representa o tempo necessário para que os sistemas alcancem o estado estacionário de difusão, foi relativamente baixo (inferior a 1,02 h), para todos os sistemas avaliados. Os dados encontrados são coerentes com estudo prévio que avaliou a permeação cutânea da INH, demonstrando a rápida difusão do fármaco através da pele (possivelmente pela via folicular) (CAON et al., 2015). Diferenças significativas em relação ao fármaco puro foram observadas apenas para o cocrystal ternário (INH-NIC-FUM), que exibiu um aumento no valor do tempo de latência. Sugere-se assim, que a nicotinamida poderia atuar retardando o início da difusão da INH.

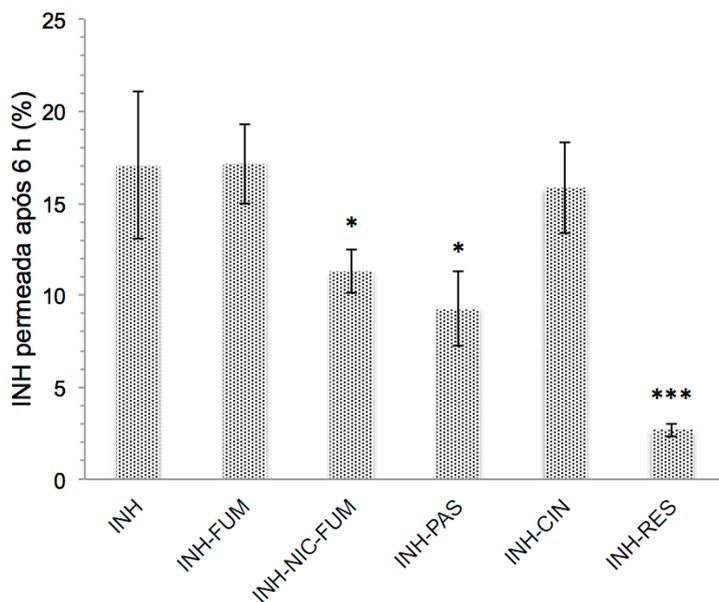
Tabela 4 - Parâmetros de permeação (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos para a INH e cocristais através da pele de orelha de porco. Utilizou-se o teste ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ( $n=6$ ). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significativas entre as médias. Cada parâmetro de permeabilidade foi analisado separadamente.  $J_s$  = fluxo;  $T_L$  = tempo de latência;  $P$  = coeficiente de permeabilidade.

	$J_s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$ )	$T_L$ (h)	$P$ ( $\text{cm}/\text{h} \times 10^{-2}$ )
INH	1726,13 $\pm$ 168,69 <sup>(a)</sup>	0,56 $\pm$ 0,33 <sup>(a,c)</sup>	3,63 $\pm$ 0,88 <sup>(a)</sup>
INH-NIC-FUM	942,12 $\pm$ 101,09 <sup>(b)</sup>	1,02 $\pm$ 0,14 <sup>(b)</sup>	2,51 $\pm$ 0,27 <sup>(b)</sup>
INH-FUM	1308,50 $\pm$ 116,15 <sup>(b,d)</sup>	0,30 $\pm$ 0,27 <sup>(c)</sup>	3,49 $\pm$ 0,31 <sup>(b,d)</sup>
INH-PAS	732,22 $\pm$ 136,77 <sup>(c)</sup>	0,76 $\pm$ 0,23 <sup>(a,b)</sup>	1,95 $\pm$ 0,36 <sup>(c)</sup>
INH-CIN	1162,50 $\pm$ 106,86 <sup>(d)</sup>	0,37 $\pm$ 0,10 <sup>(d,c)</sup>	3,10 $\pm$ 0,28 <sup>(d)</sup>
INH-RES	213,22 $\pm$ 46,04 <sup>(e)</sup>	0,74 $\pm$ 0,16 <sup>(a,b,d)</sup>	0,57 $\pm$ 0,14 <sup>(e)</sup>

Embora alguns sistemas não possam ser considerados diferentes entre si, a ordem decrescente para ambos os parâmetros  $J_s$  e  $P$  é: INH>INH-FUM>INH-CIN>INH-NIC-FUM>INH-PAS>INH-RES. A cocristalização com RES, PAS e NIC-FUM resultou em redução significativa do fluxo ( $J_s$ ) de fármaco através da pele em comparação à INH isolada (aproximadamente 6, 2 e 1,5 vezes, respectivamente). Valores de coeficiente de permeabilidade ( $P$ ) significativamente inferiores também foram observados para os cocristais INH-RES e INH-PAS, e para INH-NIC-FUM obteve-se  $p=0,0500078$ . O valor de  $P$  obtido para INH vai de encontro ao relatado em estudo prévio de Caon et al. (2015), que foi de  $3,26 \pm 0,64 \times 10^{-2} \text{cm}/\text{h}$  ( $p > 0,05$ ).

Ao final dos experimentos, 17,06  $\pm$  3,99 % de fármaco permeou através da pele a partir da INH isolada. Com exceção de INH-FUM, todos os demais cocristais promoveram redução significativa do percentual de INH permeado (Figura 23). Esta diferença obtida por meio da cocristalização pode estar associada à menor quantidade de fármaco solúvel na câmara doadora e livre para ser absorvido.

Figura 23 - Porcentagem de INH acumulada na câmara receptora após 6 h de experimentos de permeação com tratamento com INH e cocristais. A porcentagem refere-se ao total de 75 mg de INH. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). \* indica diferença estatística significativa,  $p < 0,05$  (teste t-Student) e \*\*\* corresponde a  $p < 0,001$ .



Dentre os cocristais avaliados, o maior impacto na permeação da INH foi obtido com o cocristal INH-RES, o qual resultou em uma diminuição da quantidade de fármaco permeada em 84,3 % comparativamente ao fármaco puro. A partir deste dado, dentre os cocristais testados, o cocristal de INH-RES passa a ser uma opção promissora no que se refere à ação local, ideal para o tratamento da tuberculose cutânea. Além disso, diversos benefícios são atribuídos ao RES, tais como efeito de proteção contra o estresse oxidativo provocado pela radiação ultravioleta, redução de edema, inflamação, geração de peróxidos de hidrogênio, entre outras ações que contribuem para evitar danos à pele, incluindo o envelhecimento cutâneo e o câncer de pele (NDIAYE et al., 2011). A associação de INH com RES também é favorável para a patogênese e tratamento da tuberculose. Após a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, as

células fagocíticas do hospedeiro produzem espécies reativas de oxigênio como mecanismo de defesa. O excesso destas espécies reativas afeta as lesões granulomatosas, contribuindo para a propagação dos bacilos (VERMA; JINDAL; GANGULY, 2014). O RES possui potente atividade antioxidante do tipo *scavenger*, capaz de transformar os radicais livres em espécies menos reativas, o que pode reduzir o estresse oxidativo gerado pela infecção da tuberculose (NICOLETTI et al., 2014).

A influência do pH na permeabilidade cutânea de fármacos é, com frequência, desconsiderada em experimentos que visam o desenvolvimento de formulações dermatológicas. Distintos valores de pH cutâneo podem ser encontrados na literatura, todos em uma faixa que varia de 4 a 7. Em estudo clínico multicêntrico envolvendo 330 participantes, foi demonstrado que a pele com pH abaixo de 5,0 apresenta-se mais saudável em termos de função de barreira da pele, flora bacteriana, hidratação, dentre outras propriedades biofísicas, em comparação a valores de pH mais alcalinos (LAMBERS et al., 2006). Neste contexto, formulações tópicas ou transdérmicas que mantenham o pH natural da pele são preferíveis. Vale ressaltar, no entanto, que o pH final do produto influenciará na solubilidade de ativos e excipientes ionizáveis da formulação e, consequentemente, na quantidade de fármaco disponível para ser absorvida.

De maneira geral, quanto maior a fração ionizada de uma substância, maior será a solubilidade da mesma. Porém, no que se refere à permeabilidade, o aumento da solubilidade aquosa nem sempre é favorável, uma vez que resulta na diminuição do coeficiente de partição, importante parâmetro para a penetração do fármaco através das membranas biológicas. Esta interação entre pH, solubilidade e permeabilidade encontra-se bem estabelecida para medicamentos administrados por via oral, de modo que fármacos não ionizados geralmente possuem maior capacidade de penetração. Para a via tópica/transdérmica, apesar do grande número de formulações disponíveis comercialmente, esta relação é pouco documentada (CORNELIO; MAYORGA, 2007; HADGRAFT; VALENTA, 2000).

No presente projeto, como os cocristais são compostos por fármaco e coformadores ionizáveis, o pH é considerado um fator crucial, pois determina a solubilidade dos sistemas (soma das espécies ionizadas e não ionizadas de fármaco e coformador em solução). Por

essa razão, ao final dos experimentos de permeação, verificou-se o pH das câmaras doadoras e receptoras (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de pH das câmaras doadoras e receptoras ao final do experimento de permeação cutânea com INH e cocristais. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). pH inicial= 7,4.

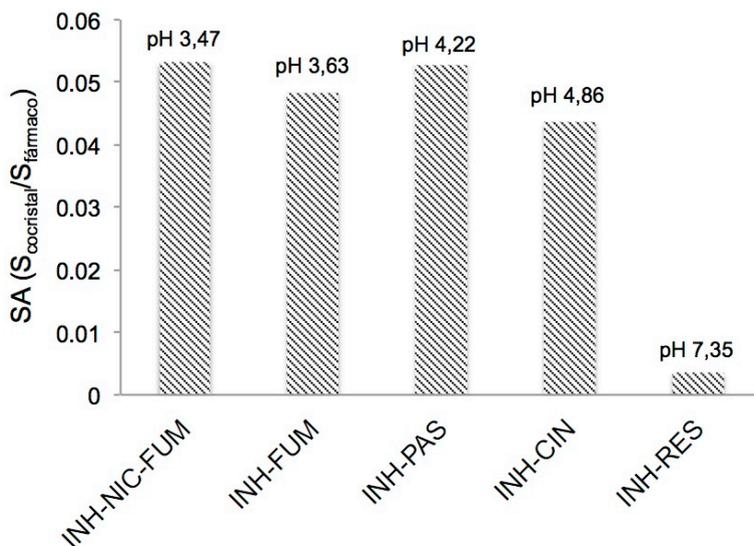
	<b>pH doadora</b>	<b>pH receptora</b>
INH	7,38 $\pm$ 0,16	7,22 $\pm$ 0,18
INH-NIC-FUM	3,47 $\pm$ 0,02	4,95 $\pm$ 0,99
INH-FUM	3,63 $\pm$ 0,02	6,41 $\pm$ 0,32
INH-PAS	4,22 $\pm$ 0,13	6,99 $\pm$ 0,17
INH-CIN	4,86 $\pm$ 0,12	7,10 $\pm$ 0,14
INH-RES	7,35 $\pm$ 0,19	7,27 $\pm$ 0,20

Mudanças significativas no pH da câmara receptora ocorreram somente com os cocristais contendo FUM em sua composição, possivelmente devido ao menor  $pK_a$  deste coformador ( $pK_{a1} = 2,47$ ). INH-FUM e INH-NIC-FUM também resultaram no menor pH da suspensão aplicada sobre a pele e, juntamente com INH-PAS e INH-CIN, enquadram-se na faixa de pH desejada para manter as propriedades do manto ácido do estrato córneo (LAMBERS et al., 2006). Alterações insignificantes foram verificadas para INH-RES em ambos os compartimentos doador e receptor devido à natureza de ácido fraco do coformador.

Ao final dos ensaios de permeação, observou-se que o tratamento apenas com INH resultou em uma solubilização completa da fase sólida, diferente dos cocristais menos solúveis (INH-RES, INH-PAS) e com limitada molhabilidade (INH-CIN). Como INH-NIC-FUM e INH-FUM apresentam maior solubilidade dentre os 5 cocristais testados, reduzida quantidade de fase sólida foi observada, o que impossibilitou a caracterização destes sistemas. Considerando-se o valor do pH final das câmaras doadoras e o diagrama de solubilidade dos cocristais e do fármaco apresentado no capítulo III (Figura 19), é possível constatar que todos os cocristais ficaram na região de pH em que a solubilidade é menor que o fármaco (abaixo do  $pH_{max}$ ). A mesma conclusão pode ser obtida a partir do cálculo da vantagem de solubilidade (SA) dos cocristais em relação ao fármaco nos valores finais de pH das câmaras doadoras (Figura 24). Todos os cocristais apresentaram  $SA < 1$  e, desta forma, são considerados menos solúveis

que a INH nas condições avaliadas. A ausência de supersaturação reduz a tendência de precipitação do fármaco puro quando os cocristais estão em contato com a solução. Desta forma, assume-se que, assim como os demais cocristais, INH-FUM e INH-NIC-FUM permaneceram estáveis ao longo dos experimentos.

Figura 24 - SA ( $S_{\text{cocrystal}}/S_{\text{fármaco}}$ ) no pH das câmaras doadoras ao final dos experimentos de permeação.  $S_{\text{cocrystal}}$  foi calculado através das equações 1, 3 e 5 e  $S_{\text{fármaco}}$  fármaco utilizando a equação 7.



Para INH-RES, INH-CIN e INH-PAS, a fase sólida restante no compartimento doador foi analisada por DRXP. Em relação a INH-RES, detectou-se uma mistura entre cocrystal e RES, evidenciado pela presença de picos de difração característicos do coformador ( $16,4^\circ$ ,  $19,2^\circ$ , e  $31,7^\circ$ ) (Figura 25). O mesmo ocorreu para INH-PAS e INH-CIN cuja presença dos coformadores foi evidenciada pelos picos de difração em  $18,61^\circ$ ,  $22,9^\circ$ ,  $25,45^\circ$  e  $29,58^\circ$  (Figura 26), e  $7,29^\circ$  e  $14,69^\circ$  (Figura 27), respectivamente. No que se refere a cocristais menos solúveis que o fármaco, problemas de conversão de fases tendem a resultar na cristalização do coformador menos solúvel, e não ao fármaco, como ocorre com a maioria dos cocristais encontrados na literatura. À medida que o cocrystal dissolve em solução, seus

componentes se dissociam, gerando supersaturação em relação à forma menos solúvel (neste caso o coformador), o qual precipita. Por essa razão, RES, CIN e PAS foram identificados na fase sólida removida das câmaras doadoras aonde somente cocristais haviam sido adicionados. Contudo, após 6h de experimentos ainda foi possível detectar os cocristais, indicando que a cinética de conversão a coformador é lenta.

Figura 25 - Padrões de difração do coformador RES, do cocristal INH-RES, e da fase sólida de INH-RES presente no compartimento doador ao fim dos experimentos de permeação cutânea. O asterisco (\*) indica os picos de difração atribuídos ao RES.

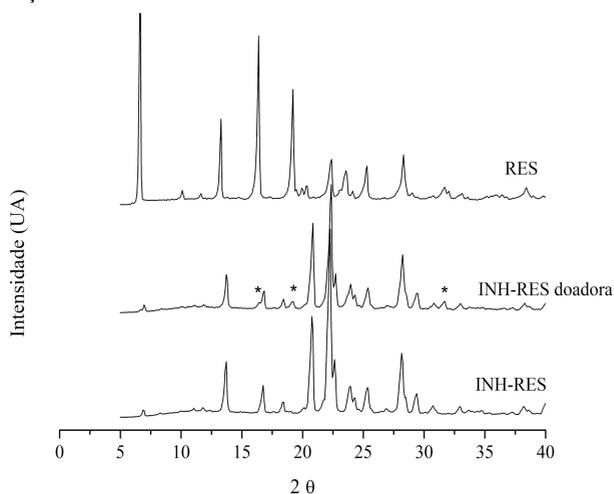


Figura 26 - Padrões de difração do coformador PAS, do cocrystal INH-PAS, e da fase sólida de INH-PAS presente no compartimento doador ao fim dos experimentos de permeação cutânea. O asterisco (\*) indica os picos de difração atribuídos ao PAS.

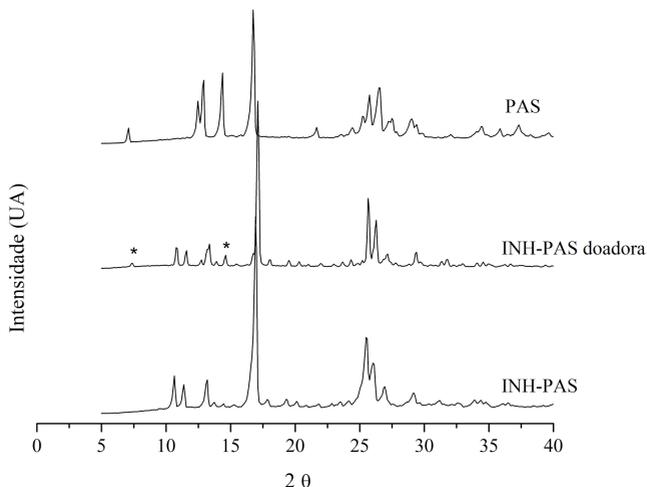
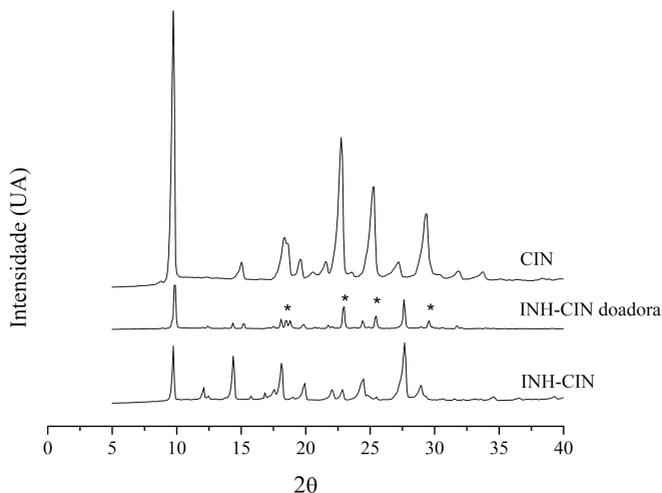


Figura 27 - Padrões de difração do coformador CIN, do cocrystal INH-CIN, e da fase sólida de INH-CIN presente no compartimento doador ao fim dos experimentos de permeação cutânea. O asterisco (\*) indica os picos de difração atribuídos ao CIN.



Outro parâmetro importante no que diz respeito à permeação de um fármaco através de membranas biológicas é o coeficiente de partição (log P), que expressa a lipofilicidade relativa das substâncias (fração não ionizada). Quanto maior é o valor de log P, maior é a lipofilicidade da molécula (BARTZATT et al., 2014). Neste projeto, todos os coformadores selecionados apresentam maior log P em comparação à INH (Quadro 9).

Quadro 9 - log P da INH e coformadores selecionados.

Substância	INH	NIC	FUM	PAS	CIN	RES
Log P	-0,70	-0,37	-0,46	1,32	2,13	3,00

Fonte: PubChem.

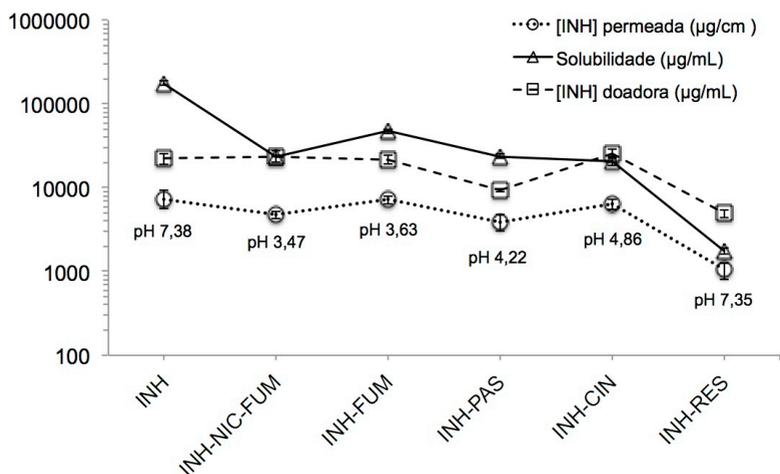
Em estudo realizado com três cocristais do fármaco 5-fluorouracil, a seleção de coformadores lipofílicos foi associada ao aumento do coeficiente de partição (log P) dos cocristais e, conseqüentemente, à maior permeação através das membranas (DAI et al., 2016). De forma análoga, era esperado que os cocristais selecionados no presente projeto exibissem um potencial elevado de penetração cutânea. No entanto, observou-se o oposto, uma vez que os complexos provocaram redução na quantidade de INH permeada. Resultados semelhantes foram observados por Yan e colaboradores (2013) para cocristais de aciclovir, os quais apresentaram aumento em ambas solubilidade e permeabilidade em relação ao fármaco puro.

Considerando que a maioria dos fármacos administrados na pele são lipofílicos e, desta forma, absorvidos através da via intracelular, a associação com substâncias mais lipofílicas tende a aumentar a permeação já que as membranas biológicas apresentam natureza lipídica. Por outro lado, a INH é um fármaco hidrofílico cuja permeação ocorre possivelmente pela via folicular, fato que pode estar relacionado ao efeito contrário observado neste estudo.

Além disso, a permanência de fase sólida dos cocristais nas câmaras doadoras ao final dos experimentos indica uma menor quantidade de fármaco livre em solução, o que justifica a redução da INH permeada em comparação ao fármaco puro que estava completamente solubilizado. Esta relação diretamente proporcional entre solubilidade, concentração de fármaco na câmara doadora e

permeação cutânea dos sistemas avaliados pode ser visualizada na Figura 28.

Figura 28 - Solubilidade calculada da INH e cocristais no pH final da câmara doadora a partir das equações descritas no capítulo II, concentração de INH na câmara doadora ao final do experimento (quantificada por CLAE) e concentração de INH permeada por área de pele ao final das 6 h de permeação. O gráfico está disposto em escala logarítmica. Valores de pH representam o pH final da câmara doadora.

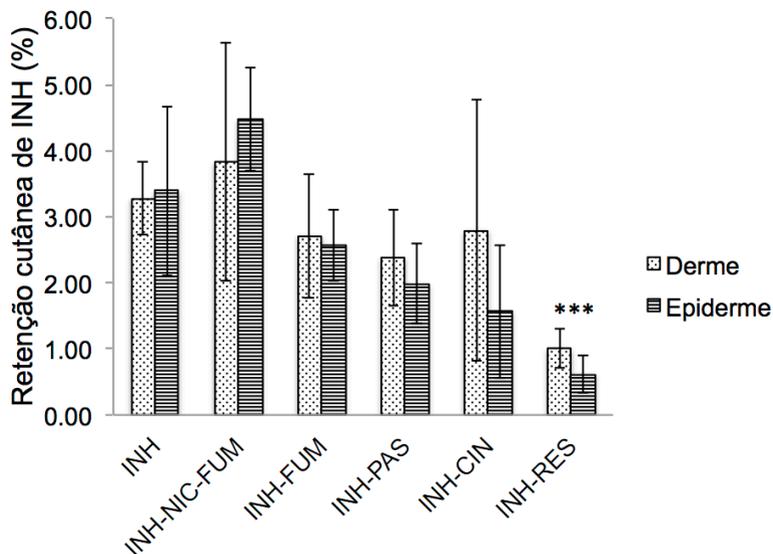


De forma geral, uma tendência de redução da permeação com a diminuição da solubilidade aquosa dos cocristais pode ser observada. A partir destes resultados, fica evidente que a solubilidade aquosa do fármaco e dos cocristais possui papel importante na taxa de permeação cutânea da INH por aumentar a quantidade de fármaco livre.

À medida que os cocristais são solubilizados, ocorre a dissociação entre fármaco e coformador(es) e, a partir deste momento, o fármaco pode então ser absorvido através das membranas biológicas. Cocristais com coformadores lipofílicos são menos solúveis em meio aquoso e, portanto, este processo de dissociação entre seus componentes ocorre em menor grau do que cocristais altamente solúveis. Além de uma redução na quantidade de INH permeada, os cocristais com coformadores mais lipofílicos também resultaram em

menor quantidade de INH extraída da pele ao final do experimento (Figura 29).

Figura 29 - Retenção cutânea de INH nas camadas da derme e epiderme a partir da aplicação de fármaco puro e dos cocristais. \*\*\* indica  $p < 0,0001$  entre o cocristal e a INH para ambas as camadas da pele.



Apesar dos desvios elevados, observou-se uma tendência inversamente proporcional entre log P do coformador (INH < FUM < NIC < PAS < CIN < RES) e retenção cutânea de fármaco (INH-NIC-FUM > INH > INH-FUM > INH-PAS > INH-CIN > INH-RES). Tal relação deve-se ao fato de que há menos fármaco disponível em solução para interagir com as camadas da pele quando se consideram cocristais menos solúveis. Não foram verificadas diferenças significativas na distribuição da INH entre derme e epiderme.

Coformadores capazes de reduzir ambas solubilidade e permeação podem ser selecionados para aplicar a estratégia da cocristalização em situações em que se deseja um efeito local ou uma liberação controlada do fármaco. Vale destacar a importância de se levar em consideração a via de transporte do fármaco através das

membranas biológicas a fim de desenvolver formulações dermatológicas eficazes.

Uma vez que os cocristais consistem em formas farmacêuticas intermediárias, assim como nano e micropartículas, a incorporação destes sistemas em preparações semissólidas ou em adesivos pode contribuir ainda mais para o retardo da permeação cutânea e a obtenção de uma ação farmacológica local.

#### 5.4 CONCLUSÃO

A cocrystalização foi eficaz na modulação da permeação cutânea da INH. Com exceção de INH-FUM e INH-CIN, todos os demais cocristais reduziram significativamente a permeação do fármaco por apresentarem menor solubilidade que a INH pura e, conseqüente, menor concentração de INH disponível para ser absorvida através da pele. A seleção de coformadores lipofílicos é uma estratégia promissora quando se deseja otimizar a ação tópica de fármacos hidrofílicos absorvidos através da via folicular. Estudos adicionais para a incorporação destes sistemas cocrystalinos em formulações devem ser realizados a fim de confirmar os benefícios sugeridos.

O fato de que coformadores com maiores valores de log P resultaram em redução significativa da permeação da INH destaca a importância de se considerar a via de permeação e as características físico-químicas do fármaco ao selecionar coformadores para modular a permeação cutânea aplicando a cocrystalização.

Dentre os cocristais testados, o cocrystal composto por resveratrol é o mais promissor para ser incluído em uma formulação tópica devido a menor absorção através da pele.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta de novas moléculas ativas e sua inserção no mercado são grandes desafios para a indústria farmacêutica. Neste contexto, inovações incrementais em fármacos, como a manipulação dos sólidos cristalinos pela formação de cocristais tem sido alvo de grande destaque. Inúmeros trabalhos têm demonstrado que a formação de cocristais farmacêuticos consiste em uma estratégia eficaz para o aprimoramento de propriedades físico-químicas dos insumos farmacêuticos ativos, tais como ponto de fusão, higroscopicidade, estabilidade e, em sua grande maioria, solubilidade. Entretanto, o impacto da cocristalização e a avaliação da influência dos coformadores na capacidade de um fármaco em penetrar na pele permanecem pouco explorados até o momento. Além disso, a maioria dos trabalhos publicados até o momento realizaram a seleção de coformadores com foco exclusivo na engenharia de cristais e nos agrupamentos moleculares capazes de interagir através de ligações de hidrogênio, considerando o coformador como molécula neutra e sem ação complementar à do fármaco.

Desta forma, existe a oportunidade de empregar a cocristalização como ferramenta para modular a permeação cutânea de fármacos. A ampla variedade de coformadores disponíveis permite a seleção de moléculas com características físico-químicas bastante distintas, como promotores e retardadores de permeação (possibilitando o direcionamento do cocristal para ação tópica ou sistêmica), e substâncias com ação farmacológica complementar ao fármaco alvo.

Sabe-se que os cocristais podem sofrer conversão em uma forma menos solúvel do fármaco ou coformador quando expostos à solução, prejudicando sua *performance*. Por isso, independente da via proposta para a administração dos cocristais, a avaliação da solubilidade e estabilidade dos mesmos é essencial para o delineamento seguro de experimentos e para o desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis. Assim, nesta dissertação aplicou-se o método termodinâmico para avaliação da solubilidade e estabilidade de cocristais, propondo modelos matemáticos capazes de prever a solubilidade destes complexos em qualquer valor de pH. No Brasil, esta abordagem é exclusiva do nosso grupo de pesquisa, e foi aplicada

em associação à permeação cutânea de forma inédita no presente trabalho.

O fármaco utilizado neste projeto foi a isoniazida, por participar da composição de uma ampla variedade de cocristais, além de ser um bom candidato para a administração cutânea por possibilitar a redução da hepatotoxicidade decorrente da via oral e como alternativa inovadora para o tratamento da tuberculose cutânea.

Os resultados obtidos evidenciaram que o pH exerce intensa influência sobre a solubilidade dos cocristais de INH com os coformadores selecionados. Cada cocristal apresentou um perfil único de solubilidade, decorrente do comportamento de ionização dos seus componentes. Também foi possível identificar que a mudança de pH resulta em pontos de transição entre cocristal e fármaco, cocristal e coformador e entre os cocristais. Dessa forma, foram identificadas regiões de pH nas quais pode-se esperar que os cocristais permaneçam estáveis em solução.

Após a avaliação da solubilidade, experimentos de permeação cutânea demonstraram que a cocristalização foi eficaz para modular a permeação da INH. A redução significativa da absorção do fármaco através da pele promovida pelos cocristais (exceto INH-FUM) foi associada à menor solubilidade dos complexos em relação à INH pura e, por consequência, menor concentração de INH disponível em solução para permear. A partir destes resultados, fica evidente que a solubilidade aquosa do fármaco e dos cocristais possui papel importante na taxa de permeação cutânea da INH.

Em suma, acredita-se que os resultados obtidos nesta dissertação representam avanços à pesquisa farmacêutica no país e servirão para consolidar novas aplicações da cocristalização, permitindo o desenvolvimento de formulações seguras e inovadoras que impactem positivamente na adesão dos pacientes ao tratamento.

## 7. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Nota Técnica 02/2017**. Registro de medicamentos novos, genéricos e similares contendo solvatos e cocristais como insumo farmacêutico ativo. 2017

AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name? **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, 2012.

AITIPAMULA, S. et al. Novel solid forms of the anti-tuberculosis drug, Isoniazid: ternary and polymorphic cocrystals. **CrystEngComm**, v. 15, n. 29, p. 5877–5887, 2013.

ALBERTI, I.; KALIA, Y. N.; NAIK, A.; GUY, R. H. Assessment and prediction of the cutaneous bioavailability of topical terbinafine, in vivo, in Man. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n.10, p.1472- 1475, 2001.

ALHALAWEH, A. et al. PH-dependent solubility of indomethacin-saccharin and carbamazepine- saccharin cocrystals in aqueous media. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 9, p. 2605–2612, 2012.

ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8a. Edição. Porto Alegre: Artmed, 2007, cap. 10, p. 301-313.

ALMARSSON, Ö.; ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? **Chemical communications**, v.7, n.17, p. 1889–1896, 2004.

ARBEX, M. A. et al. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 2: fármacos de segunda linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 641–656, 2010.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2º ed., Porto Alegre: Artemed, 677p, 2005.

AVDEEF, Alex. PKa determination. In: AVDEEF, Alex. **Absorption and drug development: dolubility, permeability, and charge state**. 2. ed. Wiley, 2012. Cap. 3, p. 115.

AWAD, R. et al. Quality control of cinnamic acid in traditional medicinal plants in Jordan using high performance liquid chromatography. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 411–418, 2014.

BABY, A. R. et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.

BANDA, J. et al. Determination of mesalazine, a low bioavailability olsalazine metabolite in human plasma by UHPLC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1008, p. 1–10, 2016.

BANIK, M. et al. Cocrystal and salt forms of furosemide: solubility and diffusion variations. **Crystal Growth & Design**, v. 16, p. 5418–5428, 2016.

BARTZATT, R. et al. Novel tuberculostatic agents suitable for treatment of mycobacterium tuberculosis infections of the central nervous system. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n.12, p. 1535–1551, 2014.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493–506, 2006.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. Em: AULTON, M.E. (ed.) **Pharmaceutics: The science of dosage form design**. 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 2002, p. 499-533.

BECKER, C. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 3,

p.522-531, 2007.

BEMVINDO, C. S. **Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia, UFRJ; 2006.

BERGH, B. A. I. V. et al. Development of an optimal protocol for ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. **Journal of Microscopy**, v.187, p.125-133, 1997.

BETHUNE, S. J. et al. Understanding and predicting the effect of cocrystal components and pH on cocrystal solubility. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 9, p. 3976–3988, 2009.

BHARDWAJ, S.; LIPERT, M.; BAK, A. Mitigating Cocrystal Physical Stability Liabilities in Preclinical Formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 1, p. 31–38, 2017.

BLAGDEN, N.; COLES, S. J.; BERRY, D. J. Pharmaceutical cocrystals – are we there yet? **CrystEngComm**, v. 16, n. 26, p. 5753, 2014.

BLOKHINA, S. V. et al. Solution thermodynamics of pyrazinamide, isoniazid, and p-aminobenzoic acid in buffers and octanol. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 91, n. December 2015, p. 396–403, 2015.

BOELSTERLI, Urs; LEE, Kang Kwang. Mechanisms of isoniazid-induced idiosyncratic liver injury: Emerging role of mitochondrial stress. **Journal Of Gastroenterology And Hepatology**, v. 29, n. 4, p.678-687, 2014.

BOLLA, G.; NANGIA, A. Pharmaceutical cocrystals: walking the talk. **Chemical Communications**, v. 52, n. 54, p. 8342–8360, 2016.

BOWLES, P. et al. Commercial route research and development for SGLT2 inhibitor candidate ertugliflozin. **Organic Process Research and Development**, v. 18, n. 1, p. 66–81, 2014.

BRASIL. **RDC No 166**, de 24 de julho de 2017. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 dez. 2017.

BRAVO, F. G.; GOTUZZO, E. Cutaneous tuberculosis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 173– 180, 2007.

BRITISH PHARMACOPOEIA, Medicines & Healthcare products Regulatory Agency. v.5, 2013.

BRITAIN, H. G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. New York: Informa Healthcare, v.192, 2009, 640 p.

BUTLER, J. N. **Ionic equilibrium: a mathematical approach**. 1 ed. Massachusetts: Addison-Wesley, 1964, 547 p

CADE, C. E. et al. Isoniazid-resistance conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis KatG: Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. **Protein Science**, v. 19, n. 3, p. 458– 474, 2010.

CAI, Y. et al. Pharmacogenetic study of drug-metabolising enzyme polymorphisms on the risk of anti- tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.

CAON, Thiago. **Padronização do modelo de difusão ex vivo da câmara de Franz para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e adjuvantes farmacêuticos, através das mucosas bucal e esofágica e da pele de suínos**.2009. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CAON, T. et al. Novel perspectives in the tuberculosis treatment: Administration of isoniazid through the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 463–470, 2015.

CAPT, A.; LUZY, A.P.; ESDAILE, D.; BLANCK, O. Comparison of the human skin grafted onto nude mouse model with in vivo and in vitro models in the prediction of percutaneous penetration of three lipophilic pesticides. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v.

47, p. 274–287, 2007.

CARSTENSEN, J. T. **Advanced Pharmaceutical Solids**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. 518 p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences) O'Neil MJ (Ed). The Merck Index. 14th ed. Whitehouse Station(NJ): Merck & Co., Inc, 2006.

CHEN, L.; HAN, L.; LIAN, G. Recent advances in predicting skin permeability of hydrophilic solutes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 295–305, 2013.

CHEN, L.; HUI-NAN, X.; XIAO-LING, L. In vitro permeation of tetramethylpyrazine across porcine buccal mucosa. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.23, p.792-796, 2002.

CHEN, Y. et al. Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 51–64, 2014.

CHEN, Y. L. et al. Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 188–194, 2011.

CHENEY, M.L. et al. Effects of crystal form on solubility and pharmacokinetics: a crystal engineering case study of lamotrigine, **Crystal Growth & Design**, v. 10, p. 394-405, 2010.

CHILDS, S. L.; HARDCASTLE, K. I. Cocrystals of piroxicam with carboxylic acids. **Crystal Growth & Design**, v.7, p. 1291-1304, 2007.

CHILDS, S.L., MOUGIN, P., STAHLY, B. **Screening for solid forms by ultrasound crystallization and cocrystallization using ultrasound**. United States Patent, 2005. WO/2005/089375.

CHILDS, S. et al. Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine. **Crystal Engineering Communications**, v.10, n.7, p.

856-864, 2008.

CHOW, S. F. et al. Simultaneously improving the mechanical properties, dissolution performance, and hygroscopicity of ibuprofen and flurbiprofen by cocrystallization with nicotinamide.

**Pharmaceutical research**, v. 29, n. 7, p. 1854–1865, 2012.

COLD SPRING HARB PROTOCOL. **Phosphate-buffered saline (PBS)**. 2006. Disponível em:

<<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247>>. Acesso em : 09 nov. 2016.

CORNELIO, R.; MAYORGA, P. Estudo da penetração cutânea do flurbiprofeno. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 883–888, 2007.

CRUZ-CABEZA, A. J. Acid–base crystalline complexes and the pKa rule. **CrystEngComm**, v. 14, n. 20, p. 6362, 2012.

DAI, X. L. et al. Improving the membrane permeability of 5-fluorouracil via cocrystallization. **Crystal Growth and Design**, v. 16, n. 8, p. 4430–4438, 2016.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 42–57, 2004.

DESIRAJU, G. R. Supramolecular synthons in crystal engineering—a new organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 34, n. 21, p. 2311–2327, 1995.

DESIRAJU, G. R. Designer crystals: intermolecular interactions, network structures and supramolecular synthons. **Chemical Communications**, n. 16, p. 1475–1482, 1997.

DING, Y.; YANG, H. HPLC determination of resveratrol and piceid from circassian fruit wine. **ICAE 2011 Proceedings: 2011 International Conference on New Technology of Agricultural Engineering**, p. 998–1001, 2011.

DINIZ, L. F. et al. Novel isoniazid cocrystals with aromatic carboxylic acids: crystal engineering, spectroscopy and thermochemical investigations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1153, p. 58–68, 2018.

DOBSON, R. L. M. et al. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. **Toxicological Sciences**. v. 106, n. 1, p. 251–262, 2008.

DONALD, P. R.; DIACON, A. H. Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1091–1099, 2015.

DUGGIRALA, N. K. et al. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. **Chemical Communications**, v. 52, p. 640–655, 2016.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.34, p.203-222, 2008.

ELMENDORF, D. F. JR.; CAWTHON, W. U.; MUSCHENHEIM, C. MC. D. W. The absorption, distribution, excretion, and short-term toxicity of isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) in man. **American Review of Tuberculosis**, v.65, p. 429 – 442, 1952.

ETTER, M. C. Hydrogen bonds as design elements in organic chemistry. **The Journal of Physical Chemistry**, n. 8, p. 4601–4610, 1991.

ETTER, M. C.; FRANKENBACH, G. M. Hydrogen-bond directed cocrystallization as a tool for designing acentric organic solids. **Chemistry of Materials**, n. 5, p. 10–12, 1989.

FERRETTI, V. et al. Indomethacin co-crystals and their parent mixtures: Does the intestinal barrier recognize them differently? **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 1501–1511, 2015.

Food and Drug Administration – FDA. **Guidance for Industry (Draft Guidance): Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals**. 2016.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance in vitro data. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p.190-195, 1975.

GANESAN, A.; BARAKAT, K. Solubility : a speed-breaker on the drug discovery highway. **MOJ Bioequivalence & Bioavailability**, v. 3, n. 3, 2017.

GAO, Y.; ZU, H.; ZHANG, J. Enhanced dissolution and stability of adefovir dipivoxil by cocrystal formation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 483–490, 2011.

GIRLING, D. Adverse effects of antituberculosis drugs. **Drugs**, v. 23, n. 1–2, p. 56–74, 1982.

GOLDMAN, A. L.; BRAMAN, S. S. Isoniazid: a review with emphasis on adverse effects. **Chest**, v. 62, n. 1, p. 71–77, 1972.

GOOD, D.; MIRANDA, C.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Dependence of cocrystal formation and thermodynamic stability on moisture sorption by amorphous polymer. **Crystal Engineering Communications**, v.13, p.1181-1189, 2011.

GOOD, D. J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 10, p. 2252-2264, 2009.

GOOD, D. J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Cocrystal eutectic constants and prediction of solubility behavior. **Crystal Growth and Design**, v. 10, n. 3, p. 1028–1032, 2010.

GOPI, S. P.; BANIK, M.; DESIRAJU, G. R. New cocrystals of hydrochlorothiazide: optimizing solubility and membrane diffusivity. **Crystal Growth & Design**, v. 17, n. 1, p. 308–316, 2017.

GROBELNY, P.; MUKHERJEE, A.; DESIRAJU, G. R. Drug-drug co-crystals: temperature-dependent proton mobility in the molecular complex of isoniazid with 4-aminosalicylic acid. **Crystengcomm**, v. 13, n. 13, p. 4358–4364, 2011.

GÜLBAY, B. E. et al. Side effects due to primary antituberculosis drugs during the initial phase of therapy in 1149 hospitalized patients for tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 10, p. 1834–1842, 2006.

HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Skin permeation: the years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 305, n. 1–2, p. 2–12, 2005.

HADGRAFT, J.; VALENTA, C. pH, pKa and dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, n.2, p. 243–247, 2000.

HARI, B. N. V. et al. Novel technologies: A weapon against tuberculosis. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 338–344, 2010.

HENNING, A.; SCHAEFER, U. F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 324–331, 2009

HICKEY, M. B. et al. Performance comparison of a co-crystal of carbamazepine with marketed product. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 112–119, 2007.

HUANG, N.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Effect of micellar solubilization on cocrystal solubility and stability. **Crystal Growth & Design**, v.10, p. 2050-2053, 2010.

HUANG, L.-F.; TONG, W.-Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 321–334, 2004.

ICH. Q2 (R1). **Validation of analytical procedures: text and methodology**. Harmonised tripartite guideline. International Conference on Harmonisation. Geneva. 2005.

ISSA, N. et al. Screening for cocrystals of succinic acid and 4-aminobenzoic acid. **Crystal Engineering Communications**, v. 14, p. 2454–2464, 2012.

JAYARAM, R. et al. Isoniazid pharmacokinetics-pharmacodynamics in an aerosol infection model of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2951–2957, 2004.

JENSEN, L. H. The crystal structure of isonicotinic acid hydrazide 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 18, p. 4663–4667, 1954.

JUNG, E. C.; MAIBACH, H. I. Animal models for percutaneous absorption. **Journal of Applied Toxicology**. v.35, p. 1–10, 2015.

KALE, D. P.; ZODE, S. S.; BANSAL, A. K. Challenges in translational development of pharmaceutical cocrystals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1–14, 2016.

KARKI, S. et al. Improving mechanical properties of crystalline solids by cocrystal formation: new compressible forms of paracetamol. **Advanced Materials**, v. 21, n. 38–39, p. 3905–3909, 2009.

KASIM, N. A et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85–96, 2004.

KLEBER, F. X. Absorption of anti-tuberculous drugs after gastric surgery. **Prax Klin Pneumol**, v. 33, p. 38 – 44, 1979.

KUMINEK, G. et al. Cocrystals to facilitate delivery of poorly soluble compounds beyond-rule-of-5. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2015.

KUMINEK, G. et al. How cocrystals of weakly basic drugs and acidic

coformers might modulate solubility and stability. **Chemical Communications**, v. 52, n. 34, p. 5832–5835, 2016.

LAI-CHEONG, J. E. et al. Cutaneous manifestations of tuberculosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 32, n. 4, p. 461–466, 2007.

LAMBERS, H. et al. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 5, p. 359–370, 2006.

LAUENER, H.; FAVEZ, G. The inhibition of isoniazid inactivation by means of pas and benzoyl-pas in man. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 80, p. 26–37, 1958.

LEMMERER, A.; BERNSTEIN, J.; KAHLENBERG, V. One-pot covalent and supramolecular synthesis of pharmaceutical co-crystals using the API isoniazid: a potential supramolecular reagent. **CrystEngComm**, v. 12, n. 10, p. 2856, 2010.

LEVIN, J.; DEL ROSSO, J.; MOMIN, S. How much do we really know about our favorite cosmeceutical ingredients? **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 3, n. 2, p. 22–41, 2010.

LIPERT, M. P.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Cocrystal transition points: Role of cocrystal solubility, drug solubility, and solubilizing agents. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 10, p. 3535–3546, 2015.

LU, E.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N.; SURYANARAYANAN, R. A rapid thermal method for cocrystal screening. **Crystal Engineering Communications**, v. 10, p. 665–668, 2008.

MARTIN, F. A. et al. Ketoconazole salt and co-crystals with enhanced aqueous solubility. **Crystal Growth and Design**, v. 13, n. 10, p. 1–26, 2013.

MASHHADI, S. M. A. et al. Isoniazid cocrystals with anti-oxidant hydroxy benzoic acids. **Journal of Molecular Structure**, v. 1076, p. 446–452, 2014.

MASHHADI, S. M. A. et al. Synthesis, characterization, solubility and stability studies of hydrate cocrystal of antitubercular Isoniazid with antioxidant and anti-bacterial Protocatechuic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 1117, p. 17–21, 2016.

MASHRU, R. et al. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.8, p.54-62, 2005.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Treatment of pulmonary tuberculosis with streptomycin and para-aminosalicylic acid: a Medical Research Council investigation. **British Medical Journal**, Londres, p.1073-1085, 1950.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Treatment of pulmonary tuberculosis with isoniazid: an interim report to the Medical Research Council by their tuberculosis Chemotherapy Trials Committee. **British Medical Journal**, Londres, p.735-746, 1952.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Isoniazid in combination with streptomycin or with P.A.S. in the treatment of pulmonary tuberculosis: fifth report to the Medical Research Council by their tuberculosis Chemotherapy Trials Committee. **British Medical Journal**, Londres, p.1005-1014, 1953.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Various combinations of isoniazid with streptomycin or with P.A.S. in the treatment of pulmonary tuberculosis: seventh report to the Medical Research Council by their tuberculosis Chemotherapy Trials Committee. **British Medical Journal**, Londres, p.435-444, 1955.

METCALFE, C. et al. The tuberculosis prodrug isoniazid bound to activating peroxidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 10, p. 6193–6200, 2008.

MOHAMMADI-SAMANI, S. et al. Meloxicam transdermal delivery: Effect of eutectic point on the rate and extent of skin permeation. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 2, p. 112– 118,

2014.

MOHAMMED, D. et al. Influence of niacinamide containing formulations on the molecular and biophysical properties of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 192–201, 2013.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A. Structure and function of skin. In: RIVIERI, J.E. (ed.) **Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology**. New York: CRC, 2006, p.1-19.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MUHAMMAD, F.; RIVIERE, J.E. In vivo models. In: RIVIERE, J.E. (ed.). **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York: CRC, 2006, p. 49-60.

NANGIA, A. Supramolecular chemistry and crystal engineering. **The Journal of Chemical Sciences**. v. 122, n. 3, p. 295–310, 2010.

NEHM, S. J.; RODRÍGUEZ-SPONG, B.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Phase solubility diagrams of cocrystals are explained by solubility product and solution complexation. **Crystal Growth & Design**, v. 6, n. 2, p. 592-600, 2006.

NDIAYE, M. et al. NIH Public Access. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 2, p. 164–170, 2011.

NICOLETTI, N. F. et al. Protective effects of resveratrol on hepatotoxicity induced by isoniazid and rifampicin via SIRT1 modulation. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 10, p. 2190–2195, 2014.

NORMAN, G. A. VAN. Drugs, Devices, and the FDA: Part 1: An Overview of Approval Processes for Drugs. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 1, n. 3, p. 170–179, 2016.

O'NEIL, M.J., ed. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, 14th ed. New Jersey: Merck, 2006.

OECD. Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method. In: OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**:Section 1 Physical-Chemical properties. Paris: Oecd Publishing, 2004. p. 1-11.

ORUGANTI, M. et al. The hierarchies of hydrogen bonds in salts/cocrystals of isoniazid and its Schiff base – a case study. **RSC Advances**, v. 6, n. 19, p. 15868–15876, 2016.

OTBERG, N.; RICHTER, H.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 122, p. 14-19, 2004.

PADRELA, L.; RODRIGUES, M.A.; VELAGA, S.P.; MATOS, H.A.; AZEVEDO, E.G. Formation of indomethacin–saccharin cocrystals using supercritical fluid technology. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 9–17, 2009.

PAGIRE, S., et al. Microwave assisted synthesis of caffeine/maleic acid cocrystals: the role of the dielectric and physicochemical properties of the solvent. **Crystal Engineering Communications**, v.15, p. 3705–3710, 2013.

PASTORE, M. N.; ROBERTS, M. S. Selection of topically applied chemical candidates: transdermal drug delivery systems. In: SUGIBAYASHI, Kenji. **Skin permeation and disposition of therapeutic and cosmeceutical compounds**. New York: Springer, 2017. Cap. 21. p. 251-262.

PERSHING, L. K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p. 90-95, 1994.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261–1268, 2009.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 2, p. 115–124, 2004.

QIAO, N. et al. Pharmaceutical cocrystals: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1–2, p. 1–11, 2011.

RÀFOLS, C. et al. Acidity and hydrophobicity of several new potential antitubercular drugs: isoniazid and benzimidazole derivatives. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 57, n. 2, p. 330–338, 2012.

RASTOGI, N. et al. Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 149–157, 1998.

REN, C. et al. Effect of permeation enhancers and organic acids on the skin permeation of indapamide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, n. 1–2, p. 43–47, 2008.

REUTZEL-EDENS, S. M. Analytical techniques and strategies for salt/co-crystal characterization. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, 390 p.

ROCHA, A. B. et al. Cocrystal: uma estratégia promissora na área farmacêutica, **Química Nova**, v.39, n.9, p.1112-1125, 2016.

RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. et al. Reaction crystallization of pharmaceutical molecular complexes. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 3, p. 362–367, 2006.

ROY, L.; LIPERT, M. P.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Co-crystal solubility and thermodynamic stability. **Pharmaceutical salts and co-**

**crystals**, p. 247–279, 2012.

SAIKIA, B. et al. Hydrogen bond synthons in the interplay of solubility and membrane permeability/diffusion in variable stoichiometry drug cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v. 15, n. 11, p. 5593–5603, 2015.

SANPHUI, P. et al. Cocrystals of hydrochlorothiazide: Solubility and diffusion/permeability enhancements through drug-coformer interactions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 1615–1622, 2015.

SARCEVICA, I. et al. Crystal and molecular structure and stability of isoniazid cocrystals with selected carboxylic acids. **Crystal Growth and Design**, v. 13, n. 3, p. 1082–1090, 2013.

SARCEVIČA, I. et al. Mechanistic and kinetic insight into spontaneous cocrystallization of isoniazid and benzoic acid. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 2981–2992, 2015.

SCHAAF, B. H. S. et al. Dose regimen of para-aminosalicylic acid gastro-resistant formulation (PAS- GR) in multidrug-resistant tuberculosis. **Clinical Drug Investigation**. 2014.

SCHAEFER, Ulrich F. et al. Models for skin absorption and skin toxicity testing. In: EHRHARDT, Carsten; KIM, Kwang-jin. **Drug absorption studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models**. New York: Springer, 2008. p. 3-7.

SCHULTHEISS, N.; NEWMAN, A. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 6, p. 2950–2967, 2009.

SEVUKARAJAN, M. et al. Preparation and pharmaceutical characterization of supra molecular complex of isoniazid with L (+) tartaric acid. **Journal of Biomedical Science**, v. 3, n. 2, p. 397–402, 2011.

SHAN, N.; ZAWOROTKO, M. J. The role of cocrystals in

pharmaceutical science. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9–10, p. 440–446, 2008.

STEAD, W. W. et al. Benefit-risk considerations in preventive treatment for tuberculosis in elderly persons. **Annals of Internal Medicine**, v. 107, n. 6, p. 843–845, 1987.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, cap. 20, p. 212- 219.

SUN, C. C. Cocrystallization for successful drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2012.

SWAPNA, B.; MADDILETI, D.; NANGIA, A. Cocrystals of the tuberculosis drug isoniazid: Polymorphism, isostructurality, and stability. **Crystal Growth and Design**, v. 14, n. 11, p. 5991–6005, 2014.

TAKAGAI, Y. et al. Adsorption and desorption properties of trans-resveratrol on cellulose cotton. **Analytical sciences**, v. 21, n. 2, p. 183–6, 2005.

TIBOLA, A. P. **Estudo de compatibilidade entre a isoniazida e excipientes farmacêuticos**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Curso de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

TOSTMANN, A. et al. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 23, n. 2, p. 192–202, 2008.

USP. **THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA**. 32 ed. United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, p. 71-3, 2008.

VAN ZYL, L.; DU PLESSIS, J.; VILJOEN, J. Cutaneous tuberculosis overview and current treatment regimens. **Tuberculosis**, v. 95, n. 6, p. 629–638, 2015.

VERMA, I. et al. **Studies on Respiratory Disorders**. New York: Humana Press, p. 101-114, 2014.

WELLING, P.G. **Pharmacokinetics: process, mathematics, and applications**. 2. ed. Washington: American Chemical Society, 1997.

WOLF, WEYNA, D. R. et al. Improving solubility and pharmacokinetics of meloxicam via multiple- component crystal formation. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 7, p. 2094–2102, 2012.

WHO. 2006. **Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO model list of essential medicines immediate-release, solid oral dosage forms**. Technical Report Series, No 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert committee on specifications for pharmaceutical preparations.

WHO; THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Treatment of tuberculosis: guidelines**. 4Th Edition, p. 160, 2010.

WHO; THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2016**, p. 201, 2016.

YAN, Y.; CHEN, J.-M.; LU, T.-B. Simultaneously enhancing the solubility and permeability of acyclovir by crystal engineering approach. **CrystEngComm**, v. 15, n. 33, p. 6457–6460, 2013.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 529–564, 2005.

ZHOU, Z. et al. Resveratrol cocrystals with enhanced solubility and tableability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 509, n. 1–2, p. 391–399, 2016.

ZUMLA, A. et al. Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 3, p. 220–234, 2015.

## APÉNDICE I

---



## APÊNDICE I - EQUAÇÕES DE PREDIÇÃO E DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE COCRISTAIS DE ISONIAZIDA E SEUS COMPONENTES

### 1.1 Solubilidade da INH

A INH é um fármaco cuja solubilidade pode ser descrita pelo equilíbrio de INH sólida com a solução conforme a seguinte reação de equilíbrio, onde o fármaco dissolvido é expresso como  $\text{INH}_{\text{aq}}$ :



De acordo a literatura, a INH apresenta dois valores de  $\text{pK}_a$  ( $\text{pK}_{a1} = 3,53$  e  $\text{pK}_{a2} = 11,14$ ) (RÀFOLS et al., 2012). O primeiro é básico e está relacionado à protonação do nitrogênio do anel heterocíclico, enquanto que o  $\text{pK}_{a2}$  é ácido e corresponde à perda de próton pelo nitrogênio do grupamento amida. Tendo em vista a faixa de pH avaliada no presente projeto (pH 1-8), considerou-se apenas o  $\text{pK}_{a1}$ , de forma que a INH foi classificada como um fármaco básico. Em função disto, variações no pH da solução podem levar à ionização deste fármaco. Logo, a concentração total de INH em uma solução aquosa ( $\text{INH}_T$ ) consiste na soma de todas as espécies, ionizadas e não ionizadas em solução:



Onde  $\text{B}_{\text{aq}}$  está relacionado à forma não ionizada e  $\text{BH}^+_{\text{aq}}$  ao estado protonado da INH.  $\text{B}_{\text{aq}}$  também refere-se à solubilidade intrínseca da INH, a qual será expressa em equações a seguir como  $S_{\text{INH},0}$ .

A forma protonada da INH se dissocia em solução de acordo com a constante de ionização correspondente ( $K_{a,\text{INH}}$ ):



$$K_{a,\text{INH}} = \frac{[\text{H}^+]_{\text{aq}}[\text{B}]_{\text{aq}}}{[\text{BH}^+]_{\text{aq}}} \quad (12)$$

Conhecendo as reações de equilíbrio, pode-se aplicar a equação do balanço de massas e descrever a solubilidade da INH pela equação:

$$S_{\text{INH},T} = [\text{INH}]_T = S_{\text{INH},0} \left( 1 + \frac{[\text{H}^+]_{\text{aq}}}{K_{a,\text{INH}}} \right) \quad (13)$$

A mesma equação pode ser expressa em termos de pH e pKa:

$$S_{\text{INH},T} = S_{\text{INH},0} (1 + 10^{\text{p}K_{a,\text{INH}} - \text{pH}}) \quad (14)$$

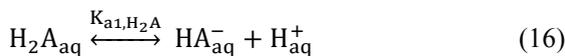
### 1.2 Solubilidade dos coformadores

O ácido fumárico é um ácido diprótico, cuja concentração total em solução aquosa ( $\text{CF}_T$ ) é representada pela soma das espécies ionizadas e não ionizadas em solução (balanço de massas):

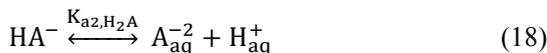
$$\text{CF}_T = \text{H}_2\text{A}_{\text{aq}} + \text{HA}^-_{\text{aq}} + \text{A}^{-2}_{\text{aq}} \quad (15)$$

Onde  $\text{H}_2\text{A}$  refere-se à forma não ionizada, enquanto  $\text{HA}^-$  e  $\text{A}^{-2}$  às espécies ionizadas do coformador.

Em solução, o ácido dicarboxílico se dissocia de acordo com suas constantes de ionização:



$$K_{a1,\text{H}_2\text{A}} = \frac{[\text{HA}^-]_{\text{aq}}[\text{H}^+]_{\text{aq}}}{[\text{H}_2\text{A}]_{\text{aq}}} \quad (17)$$



$$K_{a2,\text{H}_2\text{A}} = \frac{[\text{A}^{-2}]_{\text{aq}}[\text{H}^+]_{\text{aq}}}{[\text{HA}^-]_{\text{aq}}} \quad (19)$$

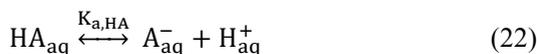
Aplicando o balanço de massas para este coformador, tem-se:

$$[\text{CF}]_T = [\text{H}_2\text{A}]_{\text{aq}} \left( 1 + \frac{K_{a1,\text{H}_2\text{A}}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{a1,\text{H}_2\text{A}} K_{a2,\text{H}_2\text{A}}}{[\text{H}^+]^2} \right) \quad (20)$$

Em termos de pH e  $pK_a$ :

$$[CF]_T = [H_2A]_{aq} \left( 1 + 10^{pH - pK_{a1, H_2A}} + 10^{2pH - pK_{a1, H_2A} - pK_{a2, H_2A}} \right) \quad (21)$$

O processo de ionização apresenta-se de forma semelhante para os ácidos cinâmico e 4-aminosalicílico, classificados como ácidos monopróticos. Assim, a solubilidade destes dois coformadores é representada pelas seguintes reações e equações:



$$K_{a,HA} = \frac{[HA^-]_{aq}[H^+]_{aq}}{[HA]_{aq}} \quad (23)$$

$$[CF]_T = [HA]_{aq} \left( 1 + \frac{K_{a,HA}}{[H^+]} \right) \quad (24)$$

Ou, em termos de pH e  $pK_a$ :

$$[CF]_T = [HA]_{aq} \left( 1 + 10^{pH - pK_{a,HA}} \right) \quad (25)$$

Diferente da maioria dos coformadores, os quais normalmente são ácidos carboxílicos, a NIC apresenta caráter básico e sua solubilidade é descrita pelas mesmas equações utilizadas para a INH (equações 10 a 14).

#### 4.3.2.2 Solubilidade dos cocrystalis de INH em função do pH, $pK_a$ e $K_{sp}$

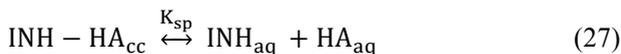
Para os cocrystalis de fármaco básico e coformador ácido diprótico ou monoprótico, equações de predição da solubilidade já estão bem descritas na literatura (BETHUNE et al., 2009; KUMINEK et al., 2016). Em relação ao cocrystal ternário, foram derivadas equações inéditas que descrevem a solubilidade do cocrystal INH-NIC-FUM (1:1:1).

##### 4.3.2.2.1 INH-PAS, INH-CIN e INH-RES

A solubilidade estequiométrica do cocristal 1:1 ( $S_{cc}$ ) de INH e ácido carboxílico monoprótico (HA), como INH-PAS, INH-CIN e INH-RES, pode ser descrita como:

$$S_{cc} = \text{INH}_T = \text{HA}_T \quad (26)$$

De acordo com o produto de solubilidade,  $K_{sp}$ , o cocristal se dissocia em solução:



$$K_{sp} = [\text{INH}]_{aq}[\text{HA}]_{aq} \quad (28)$$

onde  $[\text{INH}]_{aq}$  e  $[\text{HA}]_{aq}$  referem-se às espécies não ionizadas de fármaco e coformador.

Considerando o balanço de massas aplicado aos componentes deste tipo de cocristal (Equações 10 e 24), sua solubilidade pode ser calculada por meio da seguinte equação:

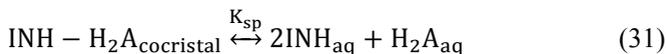
$$S_{CC}^{1:1} = \sqrt[2]{K_{sp} \left(1 + \frac{[\text{H}^+]_{aq}}{K_{a,INH}}\right) \left(1 + \frac{K_{a,HA}}{[\text{H}^+]_{aq}}\right)} \quad (29)$$

a qual também pode ser expressa em termos de pH e  $pK_a$ :

$$S_{CC}^{1:1} = \sqrt[2]{K_{sp}(1 + 10^{pK_{a,INH}-pH})(1 + 10^{pH-pK_{a,HA}})} \quad (30)$$

#### 4.3.2.2.1 INH-FUM

Considerando-se um cocristal INH- $\text{H}_2\text{A}$  na estequiometria 2:1 onde  $\text{H}_2\text{A}$  representa um coformador ácido diprótico (como o ácido fumárico), as seguintes reações de equilíbrio descrevem a dissociação/dissolução do cocristal (esquerda para direita) e a precipitação (direita para a esquerda), caracterizadas pelo produto de solubilidade ( $K_{sp}$ ):



$$K_{sp} = [\text{INH}]_{\text{aq}}^2 [\text{H}_2\text{A}]_{\text{aq}} \quad (32)$$

A solubilidade de um cocristal 2:1 é:

$$S_{cc} = [\text{A}]_{\text{T}} = 1/2 [\text{INH}]_{\text{T}} \quad (33)$$

e, portanto:

$$S_{cc}^{2:1} = \sqrt[3]{\frac{K_{sp}}{4} \left(1 + \frac{[\text{H}^+]_{\text{aq}}}{K_{a,\text{INH}}}\right) \left(1 + \frac{K_{a1,\text{H}_2\text{A}}}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}} + \frac{K_{a1,\text{H}_2\text{A}} K_{a2,\text{H}_2\text{A}}}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}^2}\right)} \quad (34)$$

A equação acima pode ser expressa em termos de moles de fármaco como:

$$S_{cc}^{2:1} = 2 \sqrt[3]{\frac{K_{sp}}{4} \left(1 + \frac{[\text{H}^+]_{\text{aq}}}{K_{a,\text{INH}}}\right) \left(1 + \frac{K_{a1,\text{H}_2\text{A}}}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}} + \frac{K_{a1,\text{H}_2\text{A}} K_{a2,\text{H}_2\text{A}}}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}^2}\right)} \quad (35)$$

a qual pode ser reescrita em termos de pH e pK<sub>a</sub>:

$$S_{cc}^{2:1} = 2 \sqrt[3]{K_{sp}/4 (1 + 10^{\text{p}K_{a,\text{INH}} - \text{pH}}) (1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1,\text{H}_2\text{A}}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1,\text{H}_2\text{A}} - \text{p}K_{a2,\text{H}_2\text{A}}})} \quad (36)$$

#### 4.3.2.2.1 INH-NIC-FUM

A solubilidade do cocristal INH-NIC-FUM (1:1:1), composto por fármaco básico (INH), coformador 1 básico (NIC) e coformador 2 ácido diprótico (FUM), sob condições estequiométricas, pode ser descrita como:

$$S_{cc} = [\text{INH}]_{\text{T}} = [\text{NIC}]_{\text{T}} = [\text{FUM}]_{\text{T}} \quad (37)$$

Quando em solução, este tipo de cocristal dissocia-se de acordo com o K<sub>sp</sub>:



$$K_{\text{sp}} = [\text{INH}]_{\text{aq}}[\text{B}]_{\text{aq}}[\text{H}_2\text{A}]_{\text{aq}} \quad (39)$$

em que  $[\text{INH}]_{\text{aq}}$ ,  $[\text{B}]_{\text{aq}}$  e  $[\text{H}_2\text{A}]_{\text{aq}}$  representam as formas não ionizada de INH, NIC e FUM, respectivamente.

Conhecendo as equações de balanço de massas do fármaco (10) e dos coformadores (15 e 24), a solubilidade deste cocristal pode ser calculada pela seguinte equação:

$$S_{\text{CC}}^{1:1:1} = \sqrt[3]{[\text{INH}]_{\text{T}} [\text{NIC}]_{\text{T}} [\text{A}]_{\text{T}}} \quad (40)$$

e, portanto:

$$S_{\text{CC}}^{1:1:1} = \sqrt[3]{K_{\text{sp}} \left(1 + \frac{[\text{H}^+]_{\text{aq}}}{K_{\text{a,INH}}}\right) \left(1 + \frac{[\text{H}^+]_{\text{aq}}}{K_{\text{a,B}}}\right) \left(1 + \frac{K_{\text{a1,H}_2\text{A}}}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}} + \frac{K_{\text{a1,H}_2\text{A}} K_{\text{a2,H}_2\text{A}}}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}^2}\right)} \quad (41)$$

ou expressa em termos de pH e  $\text{pK}_{\text{a}}$ :

$$S_{\text{CC}}^{1:1:1} = \sqrt[3]{K_{\text{sp}} (1 + 10^{\text{pK}_{\text{a,INH}} - \text{pH}}) (1 + 10^{\text{pK}_{\text{a,B}} - \text{pH}}) (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{\text{a1,H}_2\text{A}}} + 10^{2\text{pH} - \text{pK}_{\text{a1,H}_2\text{A}} - \text{pK}_{\text{a2,H}_2\text{A}}})} \quad (42)$$