

Juliana Munari Oliveira Pinto

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS SUPERSATURADOS DE  
LIBERAÇÃO DE CANDESARTANA CILEXETILA E  
HIDROCLOROTIAZIDA NA FORMA DE DISPERSÕES  
SÓLIDAS AMORFAS**

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> Hellen Karine  
Stulzer

Florianópolis  
2018

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

Pinto, Juliana Munari Oliveira

Desenvolvimento de sistemas supersaturados de liberação de candesartana cilexetila e hidroclorotiazida na forma de dispersões sólidas amorfas / Juliana Munari Oliveira Pinto ; orientadora, Hellen Karine Stulzer, 2018.

176 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. Sistemas supersaturados de liberação de fármacos. 3. Dispersões sólidas amorfas. 4. Candesartana cilexetila. 5. Hidroclorotiazida. I. Stulzer, Hellen Karine. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Juliana Munari Oliveira Pinto

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS SUPERSATURADOS DE  
LIBERAÇÃO DE CANDESARTANA CILEXETILA E  
HIDROCLOROTIAZIDA NA FORMA DE DISPERSÕES  
SÓLIDAS AMORFAS**

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

Florianópolis, 29 de março de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Crezinski Pasa

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hellen Karine Stulzer

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Thiago Caon

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lucila e Antônio, meus irmãos Ricardo e Marcelo, e ao meu noivo Yuri, pelo carinho, parceria, por confiarem em mim, me apoiarem e darem suporte em todos os momentos desta e de muitas outras caminhadas;

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup> Hellen Karine Stulzer, pela grande chance que me concedeu de fazer parte do seu time, pela parceria, confiança no meu trabalho e por me proporcionar crescimento profissional e pessoal ímpar;

À minha aluna de iniciação científica e “filha”, Aline F. Leão, por toda a colaboração, parceria e bom humor, e por todos os finais de semana de experimentos no Laboratório;

Aos professores do Laboratório de Controle de Qualidade, Marcos Antônio Segatto Silva e Simone Gonçalves Cardoso, e ao professor do Laboratório de Farmacotécnica, Thiago Caon, pela presença constante, contribuição e carinho em todos os momentos;

Aos meus companheiros e amigos de laboratório Aline B., Aline F., Amarilis, Ana Karolina, Cinira, Daiane, Fabiana, Giulio, Juliana, Maristela, Paola, Rafael, Roberta, Tatiane e Yasmin pelos bons momentos vividos, pelos muitos cafés e conversas na copa, e por todos os debates e troca de conhecimentos;

À Brenda, pela amizade e por me acolher desde o primeiro instante que pisei na UFSC, literalmente;

À Manoela, por trazer luz, positividade e perspectivas aos momentos mais críticos do meu trabalho, e pela disponibilidade em sempre me ajudar no que fosse preciso;

À Maria, pela parceria e pelas risadas, por pegar firme comigo sempre que necessário e por ser minha consultora particular de assuntos de dissertação;

À Cassiana, minha amiga e “dinda”, pela presença, parceria, conselhos, dicas, apoio, enfim... por ser este grande presente que a UFSC me deu para a vida;

À Franciele, pela amizade de todas as horas e por me ensinar o significado das palavras garra e resiliência;

À Ariana, por me mostrar que mesmo quando a gente acha que a hora já passou, nunca é tarde para realizar um sonho, só basta decidir e correr atrás;

Ao professor Adailton Bortoluzzi, do Departamento de Química desta Universidade, por proporcionar a utilização do difratômetro de raios X de pó;

Aos professores Marcos José Machado e Dirleise Colle, do Departamento de Análises Clínicas desta Universidade, pela confiança e por possibilitar a realização das análises de Microscopia de Luz Polarizada;

Ao professor Daniel Fernandes e ao seu aluno Gustavo Ferreira Alves, do Departamento de Farmacologia desta Universidade, por confiarem no projeto e possibilitarem a realização dos estudos farmacodinâmicos *in vivo*;

À professora Bianca Pezzini, do Departamento de Ciências Farmacêuticas desta Universidade, e à Univille, pelo apoio e por proporcionar a utilização do moinho de esferas;

À Leila Giarola, da Ashland, pelo apoio técnico-científico e pela doação de materiais para a condução do trabalho;

Ao Laboratório Farmacêutico Elofar, especialmente à Carolina Scheidt, Cintia Camera e Alberto de Souza Vieira, pela parceria, doação de materiais necessários ao trabalho e por possibilitarem o uso das câmaras climáticas;

Ao Andrés F. Chamorro, do Departamento de Química desta Universidade, pela paciência, parceria e auxílio na realização das análises de Espalhamento dinâmico de luz;

A todos os professores, servidores e colegas de outros laboratórios do Departamento de Ciências Farmacêuticas, que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR) desta universidade, por possibilitarem a realização deste trabalho, através do suporte financeiro e/ou infraestrutura.

“O correr da vida embrulha tudo.  
A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e  
daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem. ”

(Guimarães Rosa)





## RESUMO

A baixa solubilidade de fármacos é um dos aspectos mais desafiadores no desenvolvimento de novas formulações. Os fármacos candesartana cilexetila (CC) e hidroclorotiazida (HCTZ) são amplamente utilizados para o tratamento da hipertensão arterial, sendo encontrados no mercado na forma de comprimidos, de maneira individual e em dose fixa combinada. Devido às suas características físico-químicas e propriedades biofarmacêuticas, são classificados como pertencentes às classes II e IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS, do inglês *Biopharmaceutic Classification System*), respectivamente, que compreendem os fármacos de baixa solubilidade aquosa. Dentre as estratégias tecnológicas para melhoria das propriedades biofarmacêuticas de fármacos pouco solúveis, os Sistemas Supersaturados de Liberação de Fármacos (SDDS, do inglês *Supersaturating Drug Delivery Systems*) tem destaque. Estes sistemas são capazes de promover o aumento da biodisponibilidade destes fármacos pela manutenção de um estado de supersaturação transitório no trato gastrointestinal. Os SDDS englobam várias abordagens tecnológicas, onde as dispersões sólidas (DS) são relatadas como uma das mais bem sucedidas técnicas. Neste trabalho, foram desenvolvidas DS de CC e HCTZ pela técnica de moagem mecânica. Estas formulações apresentaram resultados promissores e inéditos relacionados ao aprimoramento das propriedades biofarmacêuticas destes fármacos. Considerando os resultados obtidos com as DS desenvolvidas para os fármacos de forma individual, DS ternárias contendo os dois fármacos em dose fixa combinada foram desenvolvidas. Previamente ao desenvolvimento e obtenção das DS, um *screening* de potenciais inibidores poliméricos de precipitação foi realizado por meio de estudos de supersaturação *in vitro* conduzidos em meios compatíveis com os fluidos intestinais, incluindo meios biorrelevantes. Os polímeros hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), hidroxipropilmetilcelulose acetato succinato (HPMCAS) tipos L, M e H e polivinil caprolactama-polivinil acetato-polietilenoglicol, comercialmente chamado de Soluplus® (SOL) foram avaliados quanto ao potencial de inibição de precipitação de CC e HCTZ. Dentre estes, o polímero HPMCAS tipo M obteve a melhor performance para ambos os fármacos, e foi selecionado para compor as DS dos mesmos. Onze formulações foram desenvolvidas, caracterizadas em estado sólido e avaliadas quanto ao seu perfil de supersaturação *in vitro*. As formulações apresentaram amorfização adequada e geração de supersaturação em comparação aos fármacos cristalinos. As DS CC30, HZ70, CH50 e CH70

se destacaram por promover extensão e manutenção de supersaturação dos fármacos superiores às demais formulações desenvolvidas. Estudos de estabilidade foram conduzidos para estas formulações, que demonstraram boa estabilidade física e manutenção das propriedades promotoras de supersaturação após 90 dias, sobretudo quando protegidas da umidade. Adicionalmente, a formulação CC30 foi selecionada para a condução de estudos farmacodinâmicos *in vivo*, no qual o aumento da absorção da CC a partir da DS desenvolvida foi comprovado pelo aumento da resposta farmacológica *in vivo* e tempo reduzido de início de ação do fármaco. Os resultados descritos neste trabalho demonstram o potencial dos SDDS na forma de DS de contornar problemas de baixa solubilidade e melhorar as propriedades biofarmacêuticas de fármacos pouco solúveis.

**Palavras-chave:** Dispersões sólidas. Supersaturação. Solubilidade. Inibidores poliméricos de precipitação. Candesartana cilexetila. Hidroclorotiazida.

## ABSTRACT

The low solubility is currently one of the most challenging aspects in pharmaceutical formulation development. Candesartan cilexetil (CC) and hydrochlorothiazide (HCTZ) are poorly soluble drugs widely used for the treatment of arterial hypertension, individually or in fixed dose combination. These drugs are classified as II and IV classes of the Biopharmaceutic Classification System (BCS), respectively, due to their physicochemical characteristics and biopharmaceutical properties. Among the strategies to improve the biopharmaceutical properties of poorly soluble drugs, the Supersaturating Drug Delivery Systems (SDDS) are highlighted. These systems are capable of improving bioavailability by achieving temporary supersaturation in the gastrointestinal tract. The SDDS comprehend several technological approaches, where the amorphous solid dispersions (DS) are described as one of the most successful. In this study, DS of CC and HCTZ were developed by mechanical milling technique. The formulations demonstrated new and promising results related to the improvement of biopharmaceutical properties of the drugs tested. Considering the results obtained to the DS developed with the drugs individually, ternary DS containing the drugs in fixed dose combination were developed. Previously, a screening of potential polymeric precipitation inhibitors was performed by *in vitro* supersaturation studies conducted in media compatible with the intestinal fluids, including biorelevant conditions. The polymers hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMCAS) types L, M and H and polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer (SOL) were evaluated regarding their CC and HCTZ precipitation inhibition ability. HPMCAS type M demonstrated the best results for both drugs and was selected to compose the DS. Eleven formulations containing the drugs individually or associated were developed, characterized by solid-state techniques and evaluated by *in vitro* supersaturation studies. All formulations presented proper amorphization and supersaturation generation when compared to the crystalline drugs. DS CC30, HZ70, CH50 and CH70 were highlighted by promoting greater supersaturation extension and maintenance when compared to the other formulations developed. These formulations were selected for stability studies, and demonstrated good physical stability and maintenance of supersaturation generation after 90 days when stored protected from humidity. In addition, DS CC30 was selected for *in vivo* pharmacodynamics studies. It was demonstrated that DS CC30 enhanced

drug absorption, as well as the time required to the start of the pharmacological effect of the drug was reduced. These results demonstrate the potential of the SDDS, as amorphous DS, to overcome the poor solubility issues and improve the biopharmaceutical properties of poorly soluble drugs.

**Keywords:** Solid dispersions. Supersaturation. Solubility. Polymeric precipitation inhibitors. Candesartan cilexetil. Hydrochlorothiazide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do processo de solubilização de um fármaco .....	34
Figura 2 - Exemplos de estratégias aplicadas à modulação de solubilidade de fármacos .....	38
Figura 3 - Entalpia e volume dos diferentes estados do fármaco em função da temperatura .....	40
Figura 4 - O conceito <i>Spring and Parachute</i> .....	42
Figura 5 - Estruturas químicas dos fármacos CC e HCTZ e unidades monoméricas dos polímeros HPMCAS, SOL e HPMC .....	49
Figura 6 - Precipitação do fármaco CC nos diferentes meios e IS .....	67
Figura 7 - Difractogramas relativos à HCTZ cristalina e moída .....	69
Figura 8 - Perfis de supersaturação de CC e suas respectivas AUC em tampão fosfato pH 6,8 com diferentes polímeros .....	70
Figura 9 - Imagens de MLP (aumento de 200x) do tampão fosfato pH 6,8 contendo os diferentes polímeros a 0,10% após 120 min de estudo de supersaturação <i>in vitro</i> para o fármaco CC .....	72
Figura 10 - Perfis de supersaturação de HCTZ e suas respectivas AUC em tampão fosfato pH 6,8 com diferentes polímeros .....	73
Figura 11 - Imagens de MLP (aumento de 200x) do tampão fosfato pH 6,8 contendo os diferentes polímeros a 0,50% após 120 min de estudo de supersaturação <i>in vitro</i> para o fármaco HCTZ .....	75
Figura 12 - Perfis de supersaturação de CC e suas respectivas AUC em FaSSIF com diferentes polímeros. A) 0,10%; B) 0,25% e C) 0,50% .....	76
Figura 13 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) do meio FaSSIF sem e com a adição de SOL, aos 120 min de teste .....	78
Figura 14 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) de FaSSIF sem e com a adição de polímeros a 0,50% (m/v), aos 120 min de teste dos estudos de supersaturação do fármaco CC .....	79
Figura 15 - Perfis de supersaturação de HCTZ e suas respectivas AUC em FaSSIF com diferentes polímeros .....	80
Figura 16 - Difractogramas referentes aos fármacos cristalinos e polímero HPMCAS M. ....	101
Figura 17 - Difractogramas relativos às DS de CC e HCTZ .....	102
Figura 18 - Curvas DSC referentes à CC cristalina, moída, polímero HPMCAS M e DS desenvolvidas .....	103
Figura 19 - Curvas DSC referentes à HCTZ cristalina, moída e dispersões sólidas desenvolvidas .....	104
Figura 20 - Espectros FTIR dos fármacos cristalinos, amorfos e polímero HPMCAS M .....	106
Figura 21 - Espectros FTIR das DS e MF de CC .....	107
Figura 22 - Espectros FTIR das DS e MF de HCTZ .....	108
Figura 23 - Imagens de MLP (aumento de 40x) dos fármacos cristalinos e moídos .....	109
Figura 24 - Imagem de MLP do polímero HPMCAS M (aumento de 40x) .....	109

Figura 25 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) das DS de CC.....	110
Figura 26 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) das DS de HCTZ.....	111
Figura 27 - Fotomicrografias dos fármacos cristalinos e moídos .....	112
Figura 28 - Fotomicrografia do polímero HPMCAS M .....	112
Figura 29 - Fotomicrografias das DS de CC.....	113
Figura 30 - Fotomicrografias das DS de HCTZ.....	114
Figura 31 - Perfis de supersaturação <i>in vitro</i> em meio FaSSiF das DS de CC e HCTZ desenvolvidas .....	115
Figura 32 - Variação da pressão arterial média frente a administração da angiotensina II avaliada em diferentes tempos .....	117
Figura 33 - Variação do fluxo sanguíneo renal frente a administração de angiotensina II avaliada em diferentes tempos .....	118
Figura 34 - Difratoogramas obtidos para a CC amorfa e DS CC30 armazenada a 4 °C/0% UR.....	120
Figura 35 - Difratoogramas obtidos para a CC amorfa e DS CC30 armazenada a 30 °C/0% UR.....	120
Figura 36 - Difratoogramas obtidos para a CC amorfa e DS CC30 armazenada a 30 °C/75% UR.....	121
Figura 37 - Difratoogramas obtidos para a CC amorfa e DS CC30 armazenada a 40 °C/75% UR.....	121
Figura 38 - Difratoogramas obtidos para a HCTZ amorfa e DS HZ70 armazenada a 4 °C/0% UR .....	122
Figura 39 - Difratoogramas obtidos para a HCTZ amorfa e DS HZ70 armazenada a 30 °C/0% UR .....	122
Figura 40 - Difratoogramas obtidos para a HCTZ amorfa e DS HZ70 armazenada a 30 °C/75% UR .....	123
Figura 41 - Difratoogramas obtidos para a HCTZ amorfa e DS HZ70 armazenada a 40 °C/75% UR .....	123
Figura 42 - Curvas DSC obtidas para a CC amorfa e dispersão sólida CC30 armazenada a 4 °C/0% UR .....	125
Figura 43 - Curvas DSC obtidas para a CC amorfa e dispersão sólida CC30 armazenada a 30 °C/0% UR .....	125
Figura 44 - Curvas DSC obtidas para a CC amorfa e dispersão sólida CC30 armazenada a 30 °C/75% UR .....	126
Figura 45 - Curvas DSC obtidas para a CC amorfa e dispersão sólida CC30 armazenada a 40 °C/75% UR .....	126
Figura 46 - Perfis de supersaturação <i>in vitro</i> obtidos para o fármaco CC amorfo (A) e DS CC30 (B) em meio FaSSiF após 90 dias de estudo de estabilidade sob as diferentes condições de armazenamento avaliadas.....	128
Figura 47 - Perfis de supersaturação <i>in vitro</i> obtidos para o fármaco HCTZ amorfo (A) e DS HZ70 (B) em meio FaSSiF após 90 dias de estudo de estabilidade sob as diferentes condições de armazenamento avaliadas.....	129
Figura 48 - Difratoogramas relativos aos fármacos associados moídos e as DS ternárias desenvolvidas .....	142

Figura 49 - Curvas DSC referentes à aos fármacos associados moídos e dipensões sólidas ternárias desenvolvidas .....	142
Figura 50 - Espectros FTIR dos fármacos associados, DS ternárias e MF produzidas.....	144
Figura 51 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) dos fármacos associados moídos e DS ternárias.....	145
Figura 52 - Fotomicrografias dos fármacos associados moídos e DS ternárias .....	146
Figura 53 - Perfis de supersaturação <i>in vitro</i> em meio FaSSIF das DS ternárias desenvolvidas.....	147
Figura 54 - Difratomogramas obtidos para os fármacos associados moídos e DS ternárias armazenadas a 4 °C/0% UR .....	150
Figura 55 - Difratomogramas obtidos para os fármacos associados moídos e DS ternárias armazenadas a 30 °C/0% UR .....	150
Figura 56 - Difratomogramas obtidos para os fármacos associados moídos e DS ternárias armazenadas a 30 °C/75% UR .....	151
Figura 57 - Difratomogramas obtidos para os fármacos associados moídos e DS ternárias armazenadas a 40 °C/75% UR .....	151
Figura 58 - Perfis de supersaturação <i>in vitro</i> obtidos para o fármaco CC nas amostras de CC + HCTZ moídas (A), DS CH70 (B) e DS CH50 (C) em meio FaSSIF após 90 dias de estudo de estabilidade sob as diferentes condições de armazenamento avaliadas .....	155
Figura 59 - Perfis de supersaturação <i>in vitro</i> obtidos para o fármaco HCTZ nas amostras de CC + HCTZ moídas (A), DS CH70 (B) e DS CH50 (C) em meio FaSSIF após 90 dias de estudo de estabilidade sob as diferentes condições de armazenamento avaliadas .....	156





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes existentes no Sistema de Classificação Biofarmacêutica .....	36
Tabela 2 - Solubilidade em equilíbrio dos fármacos CC e HCTZ na presença e ausências dos polímeros em diferentes concentrações nos meios de estudo.....	64
Tabela 3 - Resultados de solubilidade em equilíbrio de CC em diferentes meios com e sem a adição de solvente orgânico .....	66
Tabela 4 - Dados de $IS_{120min}$ obtidos para o fármaco CC nos diferentes polímeros e concentrações testadas em meio tampão fosfato pH 6,8 .....	71
Tabela 5 - Dados de $IS_{120min}$ obtidos para o fármaco HCTZ nos diferentes polímeros e concentrações testadas em meio tampão fosfato pH 6,8 .....	74
Tabela 6 - Dados de $IS_{120min}$ obtidos para o fármaco CC nos diferentes polímeros e concentrações testadas em meio FaSSIF.....	76
Tabela 7 - Diâmetro médio das micelas em solução determinadas por DLS .....	78
Tabela 8 - Dados de $IS_{120min}$ obtidos para o fármaco HCTZ nos diferentes polímeros e concentrações testadas em meio FaSSIF.....	81
Tabela 9 - <i>Ranking</i> do potencial de inibição de precipitação dos polímeros sobre o fármaco CC em diferentes meios .....	82
Tabela 10 - <i>Ranking</i> do potencial de inibição de precipitação dos polímeros sobre o fármaco HCTZ em diferentes meios .....	82
Tabela 11 - Composição das DS e misturas físicas.....	91
Tabela 12 - Rendimentos das DS obtidas .....	100
Tabela 13 - Teores obtidos para as DS produzidas .....	101
Tabela 14 - Teor de CC e HCTZ nas amostras de estabilidade nos tempos zero e 90 dias de armazenamento .....	127
Tabela 15 - Composição das DS ternárias e misturas físicas .....	134
Tabela 16 - Composição do gradiente de eluição cromatográfica .....	136
Tabela 17 - Rendimento das DS obtidas.....	140
Tabela 18 - Teores obtidos para as DS ternárias produzidas .....	141
Tabela 19 - Teor de CC nas amostras de estabilidade de CC + HCTZ, DS CH50 e DS CH70 nos tempos zero e 90 dias de armazenamento .....	153
Tabela 20 - Teor de HCTZ nas amostras de estabilidade de CC + HCTZ, DS CH50 e DS CH70 nos tempos zero e 90 dias de armazenamento .....	154



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Grupos substituintes e solubilidade dos diferentes tipos de HPMCAS .....	53
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AUC	Área sobre a curva
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
CC	Candesartana cilexetila
C	Concentração
° C	Celsius
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetros
CMC	Concentração micelar crítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raios-X de pó
DS	Dispersões sólidas
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FaSSIF	Fluido intestinal simulado em condições de jejum
FTIR	Espectroscopia infravermelho com Transformada de Fourier
g	Grama
G	Energia livre de Gibbs
h	Hora
H	Entalpia
HCTZ	Hidroclorotiazida
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HPMCAS	Hidróxipropilmetilcelulose acetato succinato
IS	Índice de supersaturação
IS <sub>120min</sub>	Índice de supersaturação aos 120 minutos de teste
J	Fluxo
m	Massa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
mPa	Milipascal
MPL	Microscopia de luz polarizada
pH	Potencial hidrogeniônico
P	Permeabilidade
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPA	Polivinilpirrolidona-co-vinil acetato

rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
S	Entropia
SDDS	Sistemas supersaturados de liberação de fármacos
SOL	Soluplus®
T	Temperatura
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
v	Volume
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
ΔG <sub>s</sub>	Variação da energia de Gibbs

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>27</b>
1.1	OBJETIVOS .....	29
1.1.1	Objetivo Geral .....	29
1.1.2	Objetivos Específicos.....	29
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>33</b>
2.1	SOLUBILIDADE DE FÁRMACOS E O SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA .....	33
2.3	SISTEMAS SUPERSATURADOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	36
2.4	O ESTADO AMORFO E SUA UTILIZAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE.....	39
2.4	DISPERSÕES SÓLIDAS .....	42
2.4.1	Aplicação dos polímeros em dispersões sólidas .....	43
2.4.2	Estudos de supersaturação <i>in vitro</i> para seleção de polímeros e avaliação de dispersões sólidas.....	44
2.4.2.1	Solubilização em co-solvente .....	45
2.4.2.2	Dissolução do fármaco amorfo.....	46
2.4.2.3	Mudanças de pH.....	47
2.4.3	Técnicas de obtenção comumente aplicadas a dispersões sólidas.....	47
2.5	FÁRMACOS MODELO E POLÍMEROS SELECIONADOS .....	49
2.5.1	Candesartana cilexetila .....	50
2.5.2	Hidroclorotiazida .....	51
2.5.3	Hidroxipropilmetilcelulose .....	52
2.5.4	Hidroxipropilmetilcelulose acetato succinato .....	52
2.5.5	Polivinil caprolactama-polivinil acetato-poli(etilenoglicol).....	54
<b>3</b>	<b>ESTUDOS DE SUPERSATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> PARA SELEÇÃO DE INIBIDORES POLIMÉRICOS DE PRECIPITAÇÃO</b> .....	<b>57</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	57
3.2	METODOLOGIA .....	58
3.2.1	Materiais .....	58
3.2.2	Métodos .....	58
3.2.2.1	Preparo dos meios .....	58
3.2.2.2	Estudos de solubilidade em equilíbrio.....	59
3.2.2.3	Obtenção e caracterização da hidroclorotiazida amorfa.....	59

3.2.2.4 Estudos de supersaturação <i>in vitro</i> .....	60
3.2.2.4 Microscopia de Luz Polarizada.....	61
3.2.2.4 Quantificação dos fármacos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	61
3.2.2.5 Análise estatística.....	62
3.2.2.6 Espalhamento Dinâmico de Luz .....	62
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
<b>3.3.1 Solubilidade em equilíbrio de candesartana cilexetila e hidroclorotiazida.....</b>	<b>63</b>
<b>3.3.2 Definição do índice de supersaturação para o fármaco candesartana cilexetila.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.3 Caracterização da hidroclorotiazida amorfa.....</b>	<b>68</b>
<b>3.3.4 Influência dos polímeros na supersaturação dos fármacos em tampão fosfato pH 6,8.....</b>	<b>70</b>
<b>3.3.5 Influência dos polímeros na supersaturação dos fármacos em FaSSiF.....</b>	<b>75</b>
<b>3.3.6 A escolha do correador polimérico e considerações acerca da seleção dos meios para estudos de supersaturação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>82</b>
3.4 CONCLUSÃO .....	84

#### **4 DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS DE CANDESARTANA CILEXETILA E HIDROCLOROTIAZIDA..... 89**

4.1 INTRODUÇÃO .....	89
4.2 METODOLOGIA .....	90
<b>4.2.1 Materiais.....</b>	<b>90</b>
<b>4.2.2 Métodos.....</b>	<b>90</b>
4.2.2.1 Preparo das dispersões sólidas e misturas físicas.....	90
4.2.2.2 Determinação do rendimento das dispersões sólidas .....	92
4.2.2.3 Determinação do teor dos fármacos nas dispersões sólidas .....	92
4.2.2.4 Caracterização em estado sólido .....	93
4.2.2.4.1 Difração de raios X de pó.....	93
4.2.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	93
4.2.2.4.3 Microscopia de Luz Polarizada.....	94
4.2.2.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier.....	94
4.2.2.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	94
4.2.2.5 Estudos de supersaturação <i>in vitro</i> .....	94
4.2.2.6 Avaliação <i>in vivo</i> do antagonismo de receptores de Angiotensina II.....	95
4.2.2.6.1 Preparo das amostras .....	96



4.2.2.6.2 Animais .....	96
4.2.2.6.3 Protocolo experimental para avaliação da variação de pressão arterial e fluxo sanguíneo renal.....	96
4.2.2.6.4 Análise estatística.....	98
4.2.2.7 Estudos de estabilidade .....	98
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	99
<b>4.3.1 Seleção da técnica de obtenção das dispersões sólidas .....</b>	<b>99</b>
<b>4.3.2 Rendimentos do processo e teor dos fármacos.....</b>	<b>100</b>
<b>4.3.3 Caracterização no estado sólido.....</b>	<b>101</b>
4.3.3.1 Difração de raio X de pó .....	101
4.3.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	103
4.3.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier.....	105
4.3.3.4 Microscopia de Luz Polarizada .....	108
4.3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	111
<b>4.3.4 Estudos de supersaturação <i>in vitro</i> .....</b>	<b>114</b>
<b>4.3.5 Avaliação <i>in vivo</i> do antagonismo dos receptores de Angiotensina II .....</b>	<b>116</b>
<b>4.3.5 Estudos de estabilidade.....</b>	<b>119</b>
4.3.5.1 Difração de raios X de pó.....	119
4.3.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	124
4.3.5.3 Teor e perfil de supersaturação <i>in vitro</i> .....	127
4.4 CONCLUSÃO.....	129
<b>5 DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS TERNÁRIAS CONTENDO OS FÁRMACOS EM ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA.....</b>	<b>133</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	133
5.2 METODOLOGIA .....	134
<b>5.2.1 Materiais .....</b>	<b>134</b>
<b>5.2.2 Métodos .....</b>	<b>134</b>
5.2.2.1 Preparo das dispersões sólidas e misturas físicas .....	134
5.2.2.2 Determinação do rendimento das dispersões sólidas .....	135
5.2.2.3 Determinação do teor dos fármacos nas dispersões sólidas ....	136
5.2.2.4 Caracterização no estado sólido .....	137
5.2.2.4.1 Difração de raios X de pó .....	137
5.2.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial .....	137
5.2.2.4.3 Microscopia de Luz Polarizada .....	138
5.2.2.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier.....	138
5.2.2.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	138

5.2.2.5 Estudos de supersaturação <i>in vitro</i> .....	138
5.2.2.6 Estudos de estabilidade .....	139
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	140
<b>5.3.1 Seleção da técnica de obtenção, rendimento e teor dos fármacos nas dispersões sólidas.....</b>	<b>140</b>
<b>5.3.2 Caracterização em estado sólido.....</b>	<b>141</b>
5.3.2.1 Difração de raio X de pó .....	141
5.3.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	142
5.3.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier.....	143
5.3.2.4 Microscopia de Luz Polarizada .....	145
5.3.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	146
<b>5.3.3 Estudos de supersaturação <i>in vitro</i> .....</b>	<b>147</b>
<b>5.3.4 Estudos de estabilidade.....</b>	<b>149</b>
5.3.4.1 Difração de raios X de pó .....	149
5.3.4.2 Teor e perfil de supersaturação <i>in vitro</i> .....	153
5.4 CONCLUSÃO .....	156
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>159</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>163</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A hipertensão arterial é considerada a mais comum condição cardiovascular crônica. Esta doença aumenta o risco de acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca, sendo que o controle efetivo da pressão arterial é capaz de reduzir a ocorrência destas complicações. No entanto, a maioria dos pacientes exigirá mais de um medicamento para obter o controle adequado da pressão arterial (CDER/FDA, 2018). Neste sentido, o desenvolvimento de medicamentos em doses fixas combinadas, que contém mais de um fármaco em dose fixa na mesma unidade farmacotécnica, está se tornando cada vez mais importante de um ponto de vista de saúde pública (EMA, 2017; GAUTAM; SAHA, 2008; WHO, 2005).

Os fármacos CC e HCTZ são amplamente utilizados para o tratamento da hipertensão arterial. A CC é um pró-fármaco antihipertensivo esterificado, contendo como metabólito ativo a candesartana, um derivado tetrazólico que atua como antagonista altamente seletivo dos receptores de angiotensina tipo I. A HCTZ é um potente diurético tiazídico, que atua inibindo a retenção de água pelos rins por meio da inibição do transporte de  $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$  no túbulo coletor distal (ARUMUGAM *et al.*, 2016; HEMMELGARN *et al.*, 2008; HUSAIN *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2016). Estes fármacos são encontrados no mercado na forma de comprimidos simples, sendo também comercialmente disponíveis como comprimidos em dose fixa combinada.

Devido às suas características físico-químicas e propriedades biofarmacêuticas, a CC e HCTZ são classificadas como pertencentes às classes II e IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS, do inglês *Biopharmaceutic Classification System*), que compreendem os fármacos de baixa solubilidade aquosa (DARWHEKAR; JAIN; CHOUHAN, 2012; MENDES *et al.*, 2016).

É fato que, para que um fármaco seja absorvido por via oral, este deve estar solubilizado, de modo a propiciar sua absorção através do sistema gastrointestinal (AMIDON *et al.*, 1995; JANSSENS; MOOTER, 2009). Fármacos de baixa solubilidade aquosa possuem potencialmente baixa dissolução em fluidos biológicos, absorção sistêmica insuficiente ou inconsistente, e conseqüentemente eficácia diminuída em pacientes, particularmente quando administrados por via oral (BLAGDEN *et al.*, 2007). A baixa solubilidade de fármacos é, portanto, um dos aspectos mais desafiadores no desenvolvimento de novas formulações, e diversas

estratégias vem sendo descritas para aumentar a biodisponibilidade oral por meio do incremento de sua solubilidade (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; MILLER *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2013).

Os SDDS são uma destas estratégias, compreendendo sistemas capazes de gerar concentrações intraluminais de fármacos acima da sua solubilidade de saturação, promovendo supersaturação temporária, que é capaz de aumentar sua absorção fisiológica (AUGUSTIJNS; BREWSTER, 2012; BEVERNAGE *et al.*, 2013; MILLER *et al.*, 2012).

Os SDDS incluem diferentes abordagens, onde as DS amorfas constituem uma das mais bem sucedidas estratégias tecnológicas para o incremento das propriedades biofarmacêuticas de fármacos pouco solúveis (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016b; VASCONCELOS *et al.*, 2016). Estas formulações são capazes de promover o aumento da biodisponibilidade de fármacos pela manutenção de um estado de supersaturação no trato gastrointestinal (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

A primeira aplicação das DS visando o aumento de biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis foi reportada há mais de 50 anos e, na atualidade, o número de formulações baseadas em DS em estágio final de desenvolvimento ou em forma de produtos comercializados vem crescendo, em virtude de sua cinética de dissolução melhorada, baixa toxicidade, flexibilidade de dosagem e adequabilidade para administração por meio das formas farmacêuticas orais convencionais, como comprimidos e cápsulas (HE; HO, 2015).

Desta forma, DS contendo os fármacos CC e HCTZ isolados e na forma de associação em dose fixa foram desenvolvidas visando a melhoria da solubilidade aquosa destes fármacos e potencial aumento da absorção dos mesmos a partir do trato gastrointestinal.

O presente trabalho encontra-se dividido em forma de capítulos, com o objetivo de facilitar a leitura, compreensão e a interpretação dos dados. O Capítulo I aborda uma revisão da literatura para contextualizar o trabalho realizado. O Capítulo II aborda os estudos de supersaturação *in vitro* conduzidos para a seleção de inibidores poliméricos de precipitação para os fármacos estudados. Os Capítulos III e IV, por sua vez, abordam o desenvolvimento, caracterização e avaliação das dispersões sólidas de CC e HCTZ de forma individual e em associação em dose fixa, respectivamente.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Obter sistemas supersaturados de liberação de CC e HCTZ na forma de DS amorfas, visando o aumento da solubilidade aparente e manutenção do estado de supersaturação em meio aquoso.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar experimentalmente a solubilidade dos fármacos CC e HCTZ em diferentes meios, incluindo meios biorrelevantes;
- Selecionar carreadores poliméricos para as DS através de seu potencial de manutenção do estado de supersaturação *in vitro* dos fármacos em estudo;
- Obter as DS dos fármacos isolados e associados através da técnica de moagem mecânica;
- Caracterizar os fármacos e as DS desenvolvidas por diferentes técnicas de estado sólido: difração de raios X de pó (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), microscopia de luz polarizada (MLP) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar as DS desenvolvidas quanto ao rendimento, teor e perfil de supersaturação *in vitro*;
- Avaliar a estabilidade das DS em diferentes condições de armazenamento através das técnicas de estado sólido mencionadas acima, teor e perfil de supersaturação *in vitro*.
- Realizar estudos farmacodinâmicos *in vivo* para a DS que apresentar o melhor resultado *in vitro*.



**Capítulo I**

**REVISÃO DA LITERATURA**

---





## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 SOLUBILIDADE DE FÁRMACOS E O SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

A via oral continua sendo a mais comumente utilizada para administração de fármacos devido a sua conveniência, facilidade de administração e boa relação custo/benefício (WEBSTER; JACKSON; BELL, 2017).

Porém, para que um fármaco seja absorvido pelo organismo humano, por meio de seu transporte através das membranas biológicas, é necessário que este seja dissolvido nos fluidos gastrointestinais. Assim, a solubilidade de fármacos é uma das mais importantes de suas características físico-químicas (AMIDON *et al.*, 1995; JANSSENS; MOOTER, 2009; QIU *et al.*, 2017).

Os fármacos que possuem baixa solubilidade em fluidos biológicos apresentam absorção sistêmica insuficiente ou inconsistente e consequentemente eficácia diminuída em pacientes, representando desafios no âmbito do desenvolvimento e tecnologia farmacêutica (BLAGDEN *et al.*, 2007).

A solubilidade é um parâmetro termodinâmico que representa a máxima quantidade de uma substância sólida que pode ser dissolvida em certa quantidade de solvente à temperatura e pressão constantes (QIU *et al.*, 2017). A solubilização de fármacos envolve basicamente a remoção das moléculas do sólido não dissolvido por meio da quebra das ligações soluto-soluto e a posterior acomodação destas moléculas dentro do sistema solvente, de modo que as moléculas do fármaco se encontrem uniformemente distribuídas neste sistema, conforme ilustra a Figura 1. Deste modo, o estado solúvel significa que o fármaco encontra-se molecularmente disperso no solvente (SHAH *et al.*, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2013).

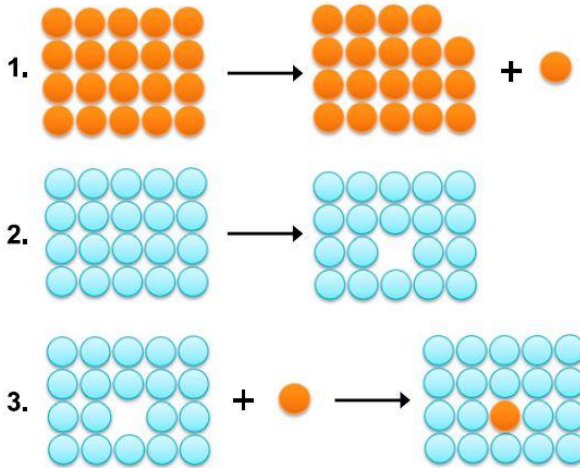
O processo de solubilização requer fornecimento de energia para que as ligações intermoleculares do sólido sejam rompidas e o mesmo possa passar para um estado solúvel, bem como a geração de energia em virtude das interações fármaco-solvente formadas (solvatação) (SHAH *et al.*, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2013).

A energia livre de Gibbs (G) é uma função do estado termodinâmico e, em um processo de solubilização, a variação da energia de Gibbs ( $\Delta G_s$ ) pode ser definida como a diferença dos valores de G

inicial e final do processo, conforme demonstra a equação (1) (SHAH *et al.*, 2014).

$$\Delta G_S = G_{solução} - G_{componentes\ isolados} \quad (1)$$

Figura 1 - Representação do processo de solubilização de um fármaco. 1) remoção da molécula do sólido não dissolvido, 2) reorganização do sistema solvente; 3) acomodação da molécula do soluto no sistema solvente.



Fonte: Adaptado de WILLIANS *et al.*, 2013

A  $\Delta G_S$  combina matematicamente os efeitos termodinâmicos de entalpia e entropia, e determina a possibilidade e extensão de dois compostos se misturarem para formar uma solução, sendo que esta mistura irá ocorrer sempre que a  $\Delta G_S$  for negativa (QIU *et al.*, 2017). Assim, quanto maior o estado energético do material de partida (fármaco em estado sólido), menor a energia de ativação requerida para a solubilização do mesmo, o que torna o processo termodinamicamente favorável.

Alguns fatores relativos ao soluto são determinantes no processo de solubilização de fármacos. Primeiramente, a força das interações soluto-soluto, que varia significativamente entre os diferentes sólidos e depende das características físicas e químicas dos mesmos. Em seguida, a afinidade das moléculas por solventes polares como a água, onde quanto maior esta afinidade, mais favorável o processo de solubilização. Portanto, de um modo geral, a solubilidade aquosa tende a ser baixa para

fármacos que possuem grandes forças atrativas entre suas moléculas (tipicamente representadas por sólidos com alto ponto de fusão) e baixa afinidade pela água (WILLIAMS *et al.*, 2013). Dessa forma, o valor de  $\Delta G_S$  é altamente dependente das características e do estado sólido inicial do fármaco (SHAH *et al.*, 2014).

A solubilidade, por ser uma propriedade físico-química, é também influenciada por fatores como temperatura, pressão, pureza dos materiais, composição e pH do solvente (por exemplo, soluções tampão), além das propriedades do fármaco já citadas e outras, como pKa, lipofilicidade, polimorfismo, agregação e formação de soluções supersaturadas (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2008).

Fármacos com limitada solubilidade aquosa estão se tornando crescentemente prevalentes nos portfólios de pesquisa e desenvolvimento de indústrias farmacêuticas focadas no desenvolvimento de novas moléculas, assim como fármacos já existentes com importantes alvos terapêuticos possuem baixa solubilidade aquosa. Estima-se que 60 a 70% das moléculas em desenvolvimento são pouco solúveis, sendo que esta porcentagem pode ser ainda mais alta para certas categorias de fármacos, chegando até mesmo a 90% (JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018; SHAH *et al.*, 2014). Alternativas tecnológicas poderiam superar esta limitação, e fazer destes candidatos mais atraentes para a terapêutica. No entanto, o desenvolvimento de formulações efetivas no incremento da absorção oral de fármacos de baixa solubilidade constitui um desafio considerável (ALONZO *et al.*, 2010; WARREN *et al.*, 2010).

A biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral depende fundamentalmente de sua solubilidade no trato gastrointestinal e em sua permeabilidade através das membranas celulares. Baseado no reconhecimento de que estes são os parâmetros fundamentais para controlar taxa e a extensão de absorção dos mesmos, um sistema de classificação biofarmacêutica (BCS, do inglês *Biopharmaceutic Classification System*) de fármacos foi proposto em 1995 por Amidon e colaboradores, visando correlacionar a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de fármacos. Este sistema distingue os fármacos em 4 classes, demonstradas na Tabela 1 (AMIDON *et al.*, 1995; QIU *et al.*, 2017).

Por abordar os dois fatores que influenciam de forma mais significativa na absorção oral de fármacos, este sistema tem provado ser um ponto de partida muito útil e amplamente aceito para o desenvolvimento de produtos e regulação farmacêutica, e constitui uma

ferramenta importante para auxiliar na predição do comportamento *in vivo* de um medicamento.

Tabela 1 - Classes existentes no Sistema de Classificação Biofarmacêutica

<b>Classe</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>Permeabilidade</b>
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

Os fármacos BCS classe 2 são considerados de absorção fisiológica limitada por sua solubilidade e taxa de dissolução, uma vez que estes são altamente permeáveis. Já os fármacos BCS classe IV são limitados não somente por sua baixa solubilidade, mas também por sua baixa permeabilidade, ou seja, esta classe é limitada por ambas as propriedades biofarmacêuticas (AMIDON *et al.*, 1995; TSUME *et al.*, 2014; WEBSTER; JACKSON; BELL, 2017).

A grande maioria das moléculas desenvolvidas pela indústria farmacêutica durante as últimas décadas do século XX foram classificadas como moléculas de classe BCS I, apresentando alta permeabilidade e alta solubilidade. Se uma molécula falhasse em cumprir este critério, ela seria provavelmente descartada em função das preocupações com a baixa biodisponibilidade e/ou problemas com o processo de formulação do medicamento. Nos anos 1990, com o advento das Ciências da Computação e sua aplicação no campo farmacêutico, surgiu um novo paradigma, com a seleção de candidatos a novos fármacos por meio de modulação de alvos terapêuticos. Esta nova ferramenta trouxe para a indústria farmacêutica a habilidade de produzir fármacos mais potentes, específicos, porém geralmente pouco solúveis, classificados como classes BCS II ou IV. Estes desafios impulsionaram a busca por alternativas para contornar a baixa solubilidade de fármacos, explorando abordagens químicas, físicas ou de formulação (ALONZO *et al.*, 2010; BUCKLEY *et al.*, 2013; JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018; QIU *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2016; WARREN *et al.*, 2010).

### 2.3 SISTEMAS SUPERSATURADOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

No passado, as abordagens para incremento da absorção de fármacos pouco solúveis focavam no aumento de sua solubilidade em

equilíbrio aparente no trato gastrointestinal ou no aumento da taxa de dissolução dos mesmos. Nas últimas décadas, a percepção de que a manutenção de um estado de supersaturação temporária nos fluidos gastrointestinais pode ser suficiente para promover uma melhor absorção vem direcionando as pesquisas sobre alternativas tecnológicas para melhoria de suas propriedades biofarmacêuticas (WARREN *et al.*, 2010).

Os SDDS compreendem formulações capazes de gerar concentrações intraluminais de fármacos acima de sua solubilidade de saturação. Estas formulações contêm o fármaco em um estado de dissolução rápida, promovendo supersaturação temporária que é capaz de melhorar a absorção do mesmo e aumentar a habilidade de prover respostas clinicamente reprodutíveis, seguras e eficazes após sua administração oral (AUGUSTIJNS; BREWSTER, 2012; BEVERNAGE *et al.*, 2013; BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; GAO; SHI, 2012; MILLER *et al.*, 2012; WARREN *et al.*, 2010).

A primeira Lei de Fick (Equação 2) governa a difusão passiva de fármacos, onde a direção da transferência de massa das moléculas depende de seu gradiente de concentração nos dois lados das membranas gastrointestinais (CAO; YU; SUN, 2008). Esta lei demonstra que o fluxo ( $J$ ) de um fármaco através da parede gastrointestinal é dependente do coeficiente de permeabilidade ( $P$ ) da barreira gastrointestinal para o fármaco e da concentração ( $C$ ) do mesmo no ambiente gastrointestinal (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

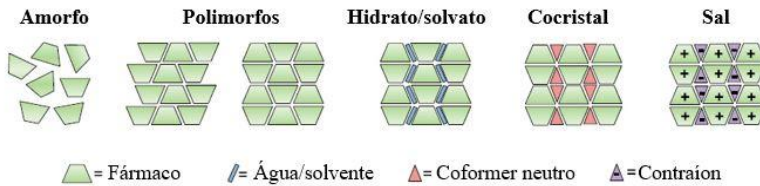
$$J = P \times C \quad (2)$$

Portanto, para fármacos de baixa solubilidade, especialmente os pertencentes à classe II do BCS, a concentração intraluminal máxima é ditada por sua solubilidade de saturação, e pode limitar sua absorção. No entanto, se uma solução supersaturada do fármaco existir no ambiente gastrointestinal por período suficiente para ocorrência da absorção, o aumento da concentração intraluminal irá proporcionar o aumento do fluxo do fármaco através da parede intestinal, uma vez que estes dois fatores são diretamente proporcionais (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

A extensão ou grau de supersaturação alcançado por estes sistemas pode ser expresso como um índice de supersaturação (IS), que é calculado dividindo a concentração do fármaco em um determinado tempo pela sua solubilidade em equilíbrio. Valores de IS superiores a 1 indicam um estado de supersaturação (BEVERNAGE *et al.*, 2013; BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

A condição de rápida dissolução dos fármacos pode ser alcançada por estratégias de modulação de solubilidade, como a modificação química dos mesmos por meio da formação de sais, solvatos, cocristais ou pró-fármacos, e também de mudanças em seu estado físico, como a obtenção de formas amorfas e polimorfos metaestáveis. A Figura 2 ilustra algumas destas estratégias de modulação de solubilidade.

Figura 2 - Exemplos de estratégias aplicadas à modulação de solubilidade de fármacos



Fonte: Adaptado de WILLIAMS *et al.*, 2013

Através da redução do tamanho de partícula também é possível aumentar a área superficial do sólido, proporcionando melhoria de sua molhabilidade. Estas estratégias propiciam a obtenção de fármacos com maior solubilidade aparente, que podem ser utilizados em formulações farmacêuticas (JANSSENS; MOOTER, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2013).

Porém, as soluções supersaturadas de fármacos pouco solúveis são termodinamicamente instáveis quando comparadas à condição de equilíbrio, em virtude do seu maior potencial químico, possuindo a tendência de retornar ao seu estado de menor potencial químico através da precipitação do fármaco, o que muitas vezes requer o uso de aditivos para minimizar este comportamento. Nesse sentido, a performance de um SDDS é dependente de vários fatores, incluindo a técnica de processamento utilizada, as propriedades físico-químicas do fármaco, e a tendência a formar e manter uma solução supersaturada (AUGUSTIJNS; BREWSTER, 2012; BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

Várias alternativas tecnológicas têm sido investigadas e utilizadas para melhoria das propriedades biofarmacêuticas de fármacos pouco solúveis, sobretudo os fármacos da classe BCS II, como a redução do tamanho de partícula, nanocristalização, formação de sais, micro/nano emulsões, solubilização com surfactantes, complexação, formulações lipídicas e DS amorfas (JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018; KANAUIA *et al.*, 2015), sendo que dentre as estratégias citadas, os sistemas amorfos têm destaque.

## 2.4 O ESTADO AMORFO E SUA UTILIZAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE

No âmbito dos SDDS, os materiais amorfos são atrativos, pois são capazes de gerar soluções de concentração muitas vezes maior que seus homólogos cristalinos (ALONZO *et al.*, 2010; GROHGANZ *et al.*, 2013; KANAUIA *et al.*, 2015). O estado amorfo é a forma de maior energia de um material sólido, não contendo um ordenamento molecular de longo alcance. A ausência de ordenamento molecular de longo alcance é definida como uma distribuição aleatória das unidades moleculares, que são individualmente orientadas umas às outras e existem em uma variedade de estados conformacionais (SHAH *et al.*, 2014).

A energia livre de um sólido é expressa conforme a equação (3), onde  $G$  é a energia livre de Gibbs,  $H$  é a entalpia,  $T$  é a temperatura e  $S$  é a entropia.

$$G = H - TS \quad (3)$$

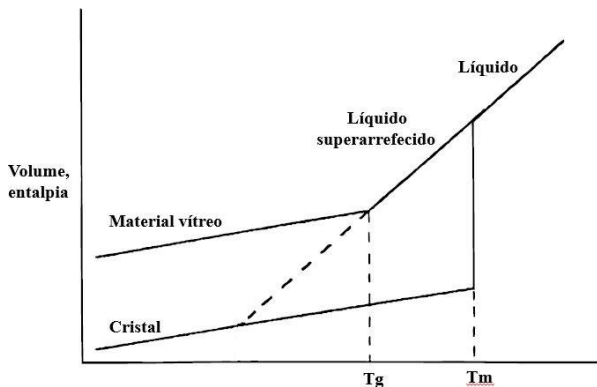
Nos sólidos amorfos, modos adicionais de mobilidade molecular estão presentes, coletivamente chamados de configurações, incluindo rotação e translação. A maior entalpia, entropia e energia livre dos sólidos amorfos estão ligadas à presença destas configurações adicionais que promovem maior mobilidade às moléculas. Como resultado desta alta energia interna, maior mobilidade molecular e propriedades termodinâmicas melhoradas quando comparadas ao estado cristalino, os materiais amorfos geralmente apresentam maior solubilidade aparente e maior taxa de dissolução em meios aquosos (KANAUIA *et al.*, 2015; LAITINEN *et al.*, 2013; QIU *et al.*, 2017).

Neste sentido, a entropia configuracional, em conjunto com a mobilidade molecular, desempenham um importante papel tanto no incremento da solubilidade aparente quanto na estabilidade física dos materiais amorfos. Compostos que são flexíveis e podem existir em um número considerável de conformações moleculares tendem a exibir maiores valores de entropia configuracional, sendo este parâmetro inversamente relacionado à probabilidade das moléculas possuírem a orientação e conformação adequada para a ocorrência de cristalização. Ainda, estudos demonstram que sólidos amorfos com maior barreira entrópica e menor mobilidade molecular são menos propensos a cristalização, e conseqüentemente capazes de manter suas propriedades termodinâmicas melhoradas ao longo do tempo, em comparação aos materiais cristalinos (ZHOU *et al.*, 2002).

Um sólido amorfo é considerado um material vítreo, que possui propriedades similares às dos líquidos em nível molecular, porém possui propriedades dos sólidos a nível macroscópico. Deste modo, os sólidos amorfos são caracterizados pela ausência de ponto de fusão e birrefringência, assim como pela ausência de reflexões e exibição de halo amorfo característico em difratogramas obtidos pela técnica de DRX (SHAH *et al.*, 2014).

Outra característica dos sólidos amorfos é a ocorrência de transição vítrea. A Figura 3 ilustra a variação da entalpia e volume dos diferentes estados do fármaco em função da temperatura.

Figura 3 - Entalpia e volume dos diferentes estados do fármaco em função da temperatura



Fonte: Adaptado de HANCOCK; ZOGRAFI, 1997

Quando um sólido cristalino é aquecido, a baixas temperaturas há um pequeno aumento em sua entalpia e volume. A transição do sólido cristalino para o estado líquido acontece quando a temperatura de fusão do mesmo é alcançada ( $T_m$ ), resultando em uma descontinuidade tanto na entalpia quanto no volume. Sob rápido resfriamento do material fundido, os valores de entalpia e volume podem seguir a linha de equilíbrio além da temperatura de fusão, em uma região chamada de região do líquido superarrefecido. Em resfriamento adicional, uma mudança no ângulo é visualizada a uma determinada temperatura, sendo esta conhecida como temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Abaixo desta temperatura, um material vítreo é obtido, que possui menor entalpia e volume que o líquido superarrefecido, assim como mobilidade molecular



reduzida quando comparado ao mesmo material em temperaturas acima da T<sub>g</sub> (HANCOCK; ZOGRAFI, 1997).

Entretanto, os benefícios associados aos sólidos amorfos podem ser perdidos facilmente, uma vez que sua alta energia interna e mobilidade molecular são também responsáveis pela maior reatividade química e pela sua tendência à recristalização, que pode ocorrer durante a sua manufatura, armazenamento ou dissolução após administração (KANAUJIA *et al.*, 2015; LAITINEN *et al.*, 2013; QIU *et al.*, 2017).

Quando introduzidos em meio aquoso, os fármacos amorfos possuem a tendência de cristalizar via transição sólido-sólido. A cristalização e precipitação de fármacos a partir de uma solução supersaturada ocorre essencialmente em dois processos, a nucleação e o crescimento de cristal, que ocorrem simultaneamente. A nucleação consiste na formação inicial de pequenos agregados, enquanto o crescimento de cristal consiste na difusão das moléculas da solução supersaturada para a interface do cristal e incorporação de novas moléculas aos pequenos agregados, acompanhada do fenômeno de desolvatação, até a formação de cristais macroscópicos. Assim, se a taxa de cristalização do material amorfo em contato com o meio de dissolução for suficientemente rápida, não será possível gerar soluções com concentrações maiores que aquelas produzidas com o material cristalino (ALONZO *et al.*, 2010; BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; WARREN *et al.*, 2010).

Portanto, para a estratégia ser adequada, a solução supersaturada formada deve ser estabilizada, para permitir absorção significativa e biodisponibilidade suficiente. A estabilização de uma solução supersaturada pode ser realizada pela adição de inibidores de precipitação, que podem atuar por uma variedade de mecanismos (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

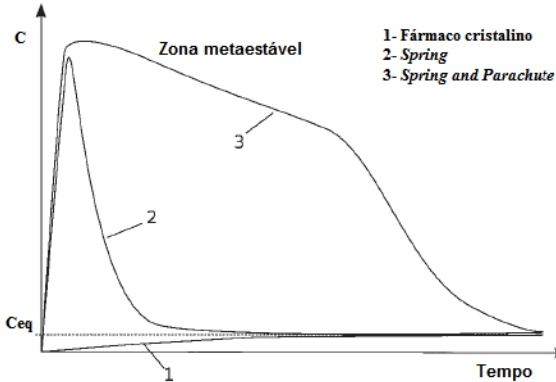
O conceito *Spring and Parachute* demonstra a influência dos inibidores de precipitação no estado de supersaturação de fármacos pouco solúveis (Figura 4) (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; KANAUJIA *et al.*, 2015).

O perfil 1 ilustrado na Figura 4 representa a dissolução de um fármaco em sua forma cristalina, enquanto que o perfil 2 representa a dissolução de forma de dissolução rápida sem a presença dos inibidores de precipitação.

Comparando os perfis 1 e 2, é possível perceber que a forma de dissolução rápida é capaz de gerar o estado de supersaturação (*Spring*), atingindo concentração de fármaco solúvel superior a solubilidade em equilíbrio do mesmo. No entanto, ao passar do tempo ocorre a

recristalização e precipitação, com conseqüente redução da supersaturação do fármaco, até o retorno a sua condição de solubilidade em equilíbrio.

Figura 4 - O conceito *Spring and Parachute*



FONTE: Adaptado de BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009

Sabe-se que o potencial químico de uma solução supersaturada é superior àquele apresentado na condição de equilíbrio, tornando assim esta solução termodinamicamente instável, com a tendência a retornar ao estado de potencial químico mais baixo por meio da precipitação do fármaco (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009).

O perfil 3, por sua vez, demonstra o comportamento do fármaco na forma de dissolução rápida com a presença dos inibidores de precipitação. Neste, há a formação de zona metaestável, que proporciona a manutenção do estado de supersaturação ao longo do tempo (*Spring and Parachute*). A zona metaestável é aquela em que o fármaco se encontra em um sistema diferente do seu estado de equilíbrio mais estável, devido à presença dos inibidores de precipitação, que impedem a sua transição imediata para a forma cristalina estável.

## 2.4 DISPERSÕES SÓLIDAS

Os SDDS incluem muitas abordagens para contornar a baixa solubilidade aquosa de fármacos, dentre as quais as DS são consideradas uma das mais recentes, mais pesquisadas e mais bem sucedidas estratégias (AUGUSTIJNS; BREWSTER, 2012; KANAUIA *et al.*, 2015; MILLER *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2013).

O termo DS foi inicialmente definido como uma dispersão de fármaco em uma matriz sólida, onde a matriz é uma pequena molécula ou um polímero. No entanto, o estado disperso inclui várias formas, como misturas eutéticas, soluções vítreas/cristalinas, e suspensões amorfas/cristalinas. Levando em consideração a forma mais utilizada atualmente, uma dispersão sólida é mais precisamente definida como uma dispersão do fármaco em uma matriz de polímero amorfo, onde o fármaco se encontra preferencialmente no estado molecularmente disperso (HUANG; DAI, 2014; NEWMAN, 2015; SHAH *et al.*, 2014; WEBSTER; JACKSON; BELL, 2017).

Uma dispersão molecular de um fármaco pouco solúvel em um carreador polimérico hidrofílico é capaz de aumentar a dissolução e supersaturação do fármaco quando este sistema é exposto à água, devido a fatores como aumento da molhabilidade do sistema, redução do tamanho de partícula, separação das partículas individuais do fármaco pelas partículas do polímero e prevenção da precipitação do fármaco em meio aquoso. Ainda, os polímeros também são utilizados para estabilizar formas de alta energia em estado sólido (SHAH *et al.*, 2014; WARREN *et al.*, 2010).

#### **2.4.1 Aplicação dos polímeros em dispersões sólidas**

Uma variedade de polímeros tem sido estudada quanto a sua habilidade de prolongar a supersaturação e inibir a precipitação de fármacos pouco solúveis, especialmente alguns tipos de derivados de celulose como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), hidroxipropilmetilcelulose acetato succinato (HPMCAS) e polímeros vinílicos, como a polivinilpirrolidona (PVP) e polivinilpirrolidona-co-vinil acetato (PVPA). Estes polímeros são capazes de manter supersaturação do fármaco *in vivo* por um período estendido de tempo visando proporcionar absorção ótima do mesmo (HUANG; DAI, 2014).

Apesar de existir pesquisa considerável, os mecanismos de como os polímeros prolongam a supersaturação do fármaco ainda não são totalmente compreendidos, mas em geral são atribuídos ao resultado da interação fármaco-polímero, como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Devido à sua complexa estrutura tridimensional, com numerosas ligações cruzadas intercadeia ou intracadeia, a incorporação de fármacos amorfos nestes ligações cruzadas dificultam e reduzem a sua mobilidade molecular. Isto diminui o potencial químico do fármaco amorfo e o traz para próximo daquele da forma cristalina (AUGUSTIJNS;

BREWSTER, 2012; BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016b; HUANG; DAI, 2014; JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018).

Ainda, os polímeros em DS podem interferir nas propriedades de nucleação e crescimento de cristal, por meio de sua interação com o fármaco ou pela alteração das propriedades do meio, evitando ou retardando o fenômeno de precipitação. Alguns polímeros são conhecidos por suprimir o processo de nucleação, enquanto outros se adsorvem na superfície dos cristais para bloquear o acesso das moléculas de soluto, prevenindo ou retardando seu crescimento. Assim, a inclusão de certos polímeros em DS pode manter a supersaturação após dispersão, levando a melhorias na biodisponibilidade (HUANG; DAI, 2014; WARREN *et al.*, 2010).

#### **2.4.2 Estudos de supersaturação *in vitro* para seleção de polímeros e avaliação de dispersões sólidas**

A seleção de carreadores poliméricos para compor DS de fármacos pouco solúveis é uma etapa fundamental para o seu desenvolvimento. Esta seleção deve considerar aspectos como a miscibilidade do fármaco e do polímero, o potencial de formação de DS amorfas, a estabilidade física das formulações obtidas e a habilidade de geração e manutenção de supersaturação em fluidos gastrointestinais (GAO; SHI, 2012; PINTO *et al.*, 2018).

Estudos de supersaturação *in vitro* podem ser utilizados para esta seleção, sendo estes compostos basicamente por duas etapas: a geração da supersaturação inicial do fármaco e a quantificação da sua solubilidade aparente/precipitação ao longo do tempo, de modo a gerar perfis cinéticos de solubilidade concentração  $\times$  tempo, também chamados de perfis de supersaturação. A geração da supersaturação é comumente propiciada por técnicas de solubilização em co-solvente (*solvent shift*), dissolução do fármaco amorfo e mudanças de pH (*pH shift*) (BEVERNAGE *et al.*, 2013; GAO; SHI, 2012; PINTO *et al.*, 2018), sendo estas técnicas melhor detalhadas nos tópicos a seguir. Já a quantificação da supersaturação pode ser realizada por meio da quantificação da concentração de fármaco dissolvido no meio aquoso, por técnicas como espectrofotometria ultravioleta e CLAE, ou pela massa de fármaco precipitada durante o experimento, por meio de medições turbidimétricas *in situ* (WARREN *et al.*, 2010).

Ressalta-se ainda que os estudos de supersaturação *in vitro* não são importantes apenas para a seleção de inibidores poliméricos de

precipitação para o desenvolvimento de DS, mas também para a avaliação das formulações desenvolvidas, num contexto de controle de qualidade.

Estudos recentes indicam que os métodos tradicionais de dissolução utilizando aparatos como pás e cestas (USP, 2016), tipicamente utilizados para controle de qualidade de formulações sólidas, não são adequados para avaliação de SDDS, pela baixa capacidade de prever a performance *in vivo* destas formulações. Deste modo, testes devem ser executados em condições mais aproximadas às condições fisiológicas, considerando a composição, pH e volume de meios de dissolução. Estudos em condições não-*sink* (condição de supersaturação) são mais apropriados para a avaliação de SDDS, sobretudo com a utilização de meios biorrelevantes. De fato, a aplicação de condições não-*sink* nos ensaios de dissolução de SDDS é a maior diferença quando comparados aos métodos convencionais de dissolução, que são conduzidos em condições *sink*, sendo a condição *sink* definida como um volume de meio no mínimo três vezes superior ao volume requerido para formar uma solução saturada do fármaco (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; LU; LI; WANG, 2017; USP, 2016).

#### 2.4.2.1 Solubilização em co-solvente

A solubilização em co-solvente (*solvent shift*) é uma das técnicas mais utilizadas para a geração da supersaturação inicial nos estudos de supersaturação *in vitro* para *screening* de inibidores poliméricos de precipitação de fármacos pouco solúveis (SUN *et al.*, 2016; YAMASHITA; OZAKI; KUSHIDA, 2011).

Este método consiste na solubilização inicial do fármaco em um solvente orgânico miscível em água, como por exemplo etanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido e propilenoglicol. Pequenas alíquotas desta solução são então adicionadas no meio aquoso de estudo, no qual o fármaco é tipicamente menos solúvel, o que gera a supersaturação no sistema. O volume das alíquotas da solução do fármaco em solvente orgânico deve ser definido com base na solubilidade em equilíbrio do mesmo, de modo a atingir um IS previamente definido. Para a avaliação da inibição de precipitação mediada por polímeros, estes são previamente dissolvidos no meio aquoso, nas concentrações de interesse do estudo (BEVERNAGE *et al.*, 2013; WARREN *et al.*, 2010).

O método de solubilização em co-solvente é considerado uma técnica simples, prática e rápida. Por favorecer a ocorrência das interações fármaco-polímero em meio líquido, é um método útil para rastrear polímeros capazes de inibir a cristalização de fármacos a partir de

soluções supersaturadas (PINTO *et al.*, 2018; VANDECRUYS *et al.*, 2007).

Exemplos de trabalhos utilizando o método de solubilização em co-solvente são vastos na literatura científica. Sun e colaboradores utilizaram este método para avaliar o potencial de inibição de precipitação de 78 diferentes polímeros frente a diferentes fármacos modelo, utilizando como co-solvente o propilenoglicol e como meio aquoso tampão fosfato pH 6,5 (SUN *et al.*, 2016). Bevernage e colaboradores realizaram trabalhos utilizando como meios fluidos intestinais simulados e fluidos intestinais humanos. Estes estudos englobaram a avaliação do perfil de supersaturação de diversos fármacos, que foram solubilizados no solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) (BEVERNAGE *et al.*, 2011, 2012). Yamashita e colaboradores também avaliaram o perfil de supersaturação do fármaco Itraconazol pelo método *solvent shift*, utilizando o DMSO como solvente orgânico e como meio aquoso o fluido intestinal simulado em condições de jejum (FaSSIF, do inglês *Fasted State Simulated Intestinal Fluid*) (YAMASHITA; OZAKI; KUSHIDA, 2011).

#### 2.4.2.2 Dissolução do fármaco amorfo

A utilização de formas amorfas se baseia no princípio de que os materiais amorfos dissolvem mais rapidamente que suas formas cristalinas. Como abordado anteriormente, a entalpia, entropia e energia livre dos sólidos amorfos são maiores quando comparadas aos sólidos cristalinos, e esta maior energia livre resulta em aumento da solubilidade e das taxas de dissolução dos mesmos. Deste modo, os sólidos amorfos são capazes de induzir a supersaturação inicial necessária para condução dos estudos de supersaturação *in vitro* (BEVERNAGE *et al.*, 2013; WARREN *et al.*, 2010).

Para isso, é necessário que a forma amorfa dos fármacos possa ser obtida, sem ocasionar degradação química dos mesmos e preferencialmente de maneira prática, o que consiste em uma limitação desta técnica. Também é importante ressaltar que os sólidos amorfos são instáveis e tendem a retornar ao seu estado cristalino mais estável, o que requer o uso de técnicas de estado sólido para confirmar a natureza amorfa dos materiais antes da condução dos estudos de supersaturação pelo método de dissolução do fármaco amorfo.

Apesar de mais escassos, a literatura relata alguns estudos conduzidos por este método. Como exemplo, Murdande e colaboradores avaliaram o incremento de solubilidade associados à amorfização de

diferentes fármacos por meio de estudos de supersaturação utilizando os materiais amorfos como forma de geração da supersaturação (BOGNER *et al.*, 2010).

#### 2.4.2.3 Mudanças de pH

A técnica de mudança de pH (*pH shift*) se baseia no mesmo princípio de alteração drástica de solubilidade do fármaco que o método de solubilização em co-solvente, porém é aplicada para fármacos ionizáveis.

Neste, o fármaco é primeiramente solubilizado em um meio capaz de promover sua ionização e conseqüente solubilização. Em seguida, alíquotas desta solução são adicionadas ao meio aquoso de interesse, onde o fármaco é tipicamente menos solúvel, sendo esta adição feita preferencialmente em modo contínuo (BEVERNAGE *et al.*, 2013; WARREN *et al.*, 2010).

Este método se baseia no fato de que fármacos básicos podem gerar supersaturação quando presentes no intestino delgado. No estômago, que possui pH ácido, estes fármacos se encontrariam na sua forma ionizada mais solúvel, que tipicamente excede a sua solubilidade em meios intestinais, onde este fármaco se encontraria na forma não ionizada. Um exemplo de utilização do método *pH-shift* é o estudo conduzido por Matteuci e colaboradores, que avaliou a supersaturação ocasionada pela dissolução de micropartículas de Itraconazol. O estudo foi iniciado em pH 1,2 e então o pH foi alterado para 6,8, simulando a transição do estômago para o intestino e ocasionando a supersaturação do fármaco (LU; LI; WANG, 2017; MATTEUCCI *et al.*, 2009).

#### 2.4.3 Técnicas de obtenção comumente aplicadas a dispersões sólidas

Uma variedade de métodos pode ser utilizada para produzir DS, sendo mais comumente aplicados os métodos de fusão, como *quench cooling* e extrusão (*hot melt extrusion*), o método de *spray drying* e as técnicas de moagem mecânica. A seleção da técnica mais adequada a ser aplicada deve considerar as características físico-químicas dos fármacos e dos polímeros, como ponto de fusão, temperatura de decomposição, T<sub>g</sub>, solubilidade e tamanho de partícula, dentre outros aspectos relevantes.

O método de fusão, como o próprio nome diz, utiliza temperatura para ocasionar a amorfização do fármaco. Neste método, uma mistura física do fármaco e do polímero é aquecida até a sua fusão e formação de uma mistura fundida, que é então resfriada e solidificada. O sólido

resultante deste processo é pulverizado, para a obtenção de material sólido com o tamanho de partícula requerido. A técnica de *Hot Melt Extrusion* é uma versão moderna do método de fusão, que oferece a vantagem de ser capaz de moldar a mistura fundida em diferentes formas, como implantes e *pellets*, por meio de um extrusor. No entanto, como requer a utilização de temperatura, uma premissa para a utilização deste método é que o fármaco e o polímero sejam termicamente estáveis (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016b; JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018).

A técnica de *spray drying* é baseada na evaporação de solvente, sendo composta por algumas etapas. A primeira delas é a solubilização do fármaco e do polímero em um solvente em que os mesmos sejam solúveis. A segunda etapa consiste na atomização desta solução em uma câmara de secagem de equipamento específico para esta aplicação. Durante esta etapa, a solução é bombeada para a câmara de secagem para a atomização do líquido, que transforma a solução em pequenas gotículas por meio da aplicação de força. As gotículas atomizadas entram em contato com o fluido secante, como por exemplo ar aquecido, sendo que a grande superfície de contato destas gotículas favorece a secagem rápida e eficiente das mesmas. Por fim, o sólido seco é separado do fluido secante e coletado através de um dispositivo coletor (PAUDEL *et al.*, 2013; SINGH; VAN DEN MOOTER, 2016). Dependendo na natureza química do fármaco, a partir da técnica de *spray drying*, é possível a geração de produtos finais amorfos, parcialmente cristalinos ou cristais metaestáveis (PAUDEL *et al.*, 2013).

A moagem mecânica é uma técnica comumente utilizada na indústria farmacêutica com o objetivo de redução de tamanho de partícula de matérias-primas variadas. A moagem é uma operação unitária onde uma energia mecânica é aplicada para quebrar fisicamente as partículas cristalinas, reduzindo o tamanho destas partículas e ocasionando transição de fases cristalinas ou amorfização do material sólido. Quando um fármaco sólido é submetido a um processo de moagem de alta energia, suas características estruturais, microestruturais e mobilidade molecular são consideravelmente alteradas. Durante a operação de moagem, a redução do tamanho de partícula cessa quando esta atinge um limite prático. Quando este limite é atingido, a transferência continuada de energia mecânica do moinho para o fármaco leva a um acúmulo de defeitos nos cristais do sólido e a conseqüente desordem da estrutura cristalina até a ausência de um ordenamento molecular no mesmo. Estas desordens podem ter um impacto nas propriedades biofarmacêuticas de fármacos, sobretudo se as condições operacionais do processo aplicado

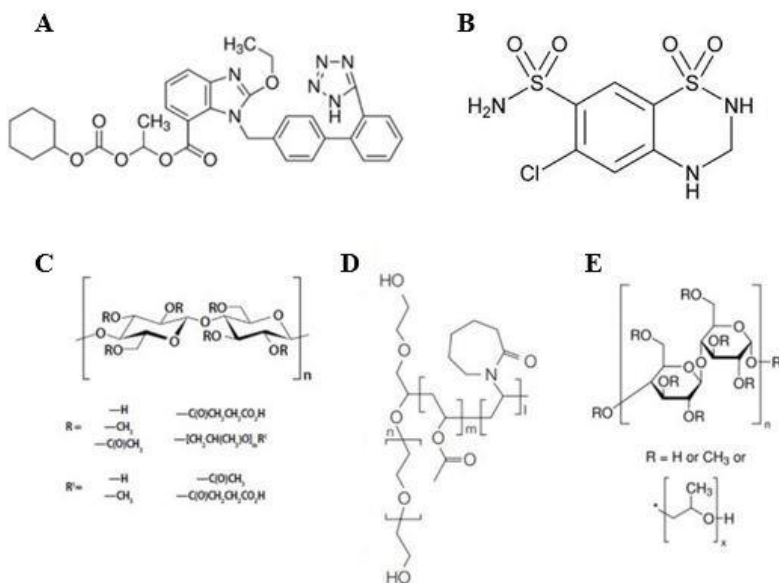


forem capazes de ocasionar a amorfização completa dos mesmos. Assim, a amorfização por ativação mecânica é de grande interesse para fármacos pouco solúveis em seu estado cristalino (DESCAMPS; WILLART, 2016; LOH; SAMANTA; SIA HENG, 2014; NART *et al.*, 2015).

## 2.5 FÁRMACOS MODELO E POLÍMEROS SELECIONADOS

O presente trabalho foi conduzido com os fármacos CC e HCTZ e os polímeros HPMC, HPMCAS e SOL (Figura 5). A CC e HCTZ são dois fármacos anti-hipertensivos, selecionados com base nas suas características físico-químicas, classe BCS, e devido ao fato de existirem no mercado comprimidos contendo ambos os fármacos em associação em dose fixa, o que possibilitou o trabalho com os fármacos individualmente e associados. Os polímeros HPMC, HPMCAS e SOL foram escolhidos por apresentarem características físico-químicas distintas, diferentes mecanismos de inibição de precipitação ou aumento de solubilidade aparente de fármacos pouco solúveis, e por serem comumente utilizados para compor DS amorfas.

Figura 5 - Estruturas químicas dos fármacos CC e HCTZ e unidades monoméricas dos polímeros HPMCAS, SOL e HPMC



Fonte: Adaptado de PINTO *et al.*, 2018; USP, 2016.

### 2.5.1 Candesartana cilexetila

A CC é um novo e potente pró-fármaco antihipertensivo esterificado, contendo como metabólito ativo a candesartana, um derivado tetrazólico que atua como antagonista altamente seletivo dos receptores de angiotensina tipo I.

Este fármaco é amplamente utilizado para o controle da hipertensão arterial e, juntamente com os demais antagonistas de receptores de angiotensina, teve um aumento de 4.054% nas prescrições médicas entre os anos de 1996 e 2006. As doses comercialmente disponíveis deste fármaco são de 8, 16 e 32 mg, na forma de comprimidos simples (ARUMUGAM *et al.*, 2016; HEMMELGARN *et al.*, 2008; HUSAIN *et al.*, 2011).

A CC é praticamente insolúvel em água, sendo sua solubilidade aquosa menor que  $8 \times 10^{-8}$  M ou 0,05 µg/mL. CC possui coeficiente de partição octanol/água maior que 1000 em pH 1,1; 6,9 e 8,9, indicando alta hidrofobicidade. Este fármaco possui massa molar de 610,66 g/mol, um pKa de 6,0 e ponto de fusão entre 157 e 160 °C (HUSAIN *et al.*, 2011).

Após administração oral, a CC é rápida e completamente hidrolisada e absorvida ao longo do trato gastrointestinal, sendo seu comportamento de absorção predominante a difusão passiva (ZHOU *et al.*, 2009). Sua biodisponibilidade oral é de 15%, com ligação às proteínas plasmáticas maior que 99% e tempo de meia vida de 1,5 a 2 h (ARUMUGAM *et al.*, 2016; HUSAIN *et al.*, 2011; LAINSCAK; VITALE; SEFEROVIC, 2016).

Devido às suas características físico-químicas e propriedades biofarmacêuticas, o fármaco CC é classificado como BCS classe II, possuindo baixa solubilidade e alta permeabilidade. Dessa maneira, alternativas tecnológicas visando a melhoria de sua solubilidade aquosa podem ser vantajosas para o aumento de sua absorção e biodisponibilidade oral.

Ademais, poucos estudos foram encontrados reportando estratégias para incremento de sua solubilidade ou propriedades biofarmacêuticas na forma de DS. Gurunath e colaboradores desenvolveram dispersões sólidas de CC com o carreador polimérico PVP K30 por três técnicas diferentes e avaliaram a permeabilidade intestinal de CC a partir destas formulações, obtendo resultados promissores (GURUNATH; NANJWADE; PATILA, 2014). Surampalli e colaboradores, por sua vez, desenvolveram comprimidos contendo DS de CC e PVP K30 desenvolvida por Gurunath e colaboradores (SURAMPALLI *et al.*, 2014). Yuce e colaboradores, por sua vez

desenvolveram DS de CC com o carreador polietilenoglicol 4000 para compor comprimidos de liberação imediata deste fármaco (YUCE *et al.*, 2016). Estudos englobando técnicas diversas para melhoria da solubilidade aparente do fármaco CC também foram encontrados na literatura científica, sendo elas nanosuspensões, nanopartículas, formulações sólidas automicroemulsionantes, complexos de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrinas e micelas poliméricas (AL OMARI *et al.*, 2011; DETROJA, 2011; GEÇER *et al.*, 2010; MAHESH *et al.*, 2015; NEKKANTI *et al.*, 2009, 2010; SATTURWAR *et al.*, 2007).

### 2.5.2 Hidroclorotiazida

A HCTZ é um potente diurético tiazídico, que atua inibindo a retenção de água pelos rins por meio da inibição do transporte de  $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$  no túbulo coletor distal. Esta foi descoberta no ano de 1958, e foi o primeiro fármaco utilizado efetivamente para o controle da hipertensão arterial. Hoje, é amplamente utilizado para esta finalidade, sobretudo em combinação com outros fármacos cardiovasculares, sendo que as prescrições deste fármaco, juntamente com os demais fármacos diuréticos, aumentaram 128% no período entre 1996 e 2006 (GANESAN *et al.*, 2015; HEMMELGARN *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2016).

Sua massa molar é de 297,74 g/mol, possuindo um valor de  $\log P$  de -0,07 e valores de  $pK_a$  de 8,7 e 10,4. A HCTZ possui faixa de fusão entre 266 e 270 °C e solubilidade aquosa de cerca de 500 a 700  $\mu\text{g/mL}$ . Encontra-se disponível no Brasil na forma de comprimidos simples, nas dosagens de 25 e 50 mg/comprimido (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2008; BOGNER *et al.*, 2010; USP, 2016).

Este fármaco é classificado como classe BCS IV, possuindo biodisponibilidade baixa e variável, que é atribuída a sua baixa solubilidade e baixa permeabilidade através das membranas celulares.

A HCTZ é absorvida a partir do trato gastrointestinal, e sua absorção é dose-dependente, sendo sugerida a difusão passiva como mecanismo predominante de absorção (PATEL *et al.*, 1984). Este fármaco é aparentemente não metabolizado, sendo excretado de forma inalterada pela urina. Sua biodisponibilidade oral é de cerca de 60 a 80% (GANESAN *et al.*, 2015; MENDES *et al.*, 2016).

Neste sentido, melhorias em sua solubilidade aquosa por meio de abordagens tecnológicas são interessantes para minimizar variações e aumentar sua absorção a partir do trato gastrointestinal.

### 2.5.3 Hidroxipropilmetilcelulose

A HPMC é um polímero celulósico hidrossolúvel amplamente utilizado como inibidor de precipitação em DS. Este polímero também é utilizado como aglutinante, material de revestimento e matriz de liberação modificada em formas farmacêuticas sólidas (ALONZO *et al.*, 2011; DUKECK; SIEGER; KARMWAR, 2013; GANESAN *et al.*, 2015; KONNO *et al.*, 2008; QIU *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2014; VO; PARK; LEE, 2013; XU; DAI, 2013).

O material de base da HPMC é a celulose, um polímero natural abundante em plantas. A celulose é um polissacarídeo de cadeia longa, e a HPMC é sintetizada a partir da reação da celulose com cloreto de metileno, óxido de propileno e soda cáustica. Neste processo, os três grupamentos OH presentes na celulose são substituídos por grupamentos metoxila e hidroxipropila, sendo os tipos de HPMC classificados conforme seu conteúdo destes grupamentos. Este polímero é disponível comercialmente em uma ampla faixa de viscosidade e seu efeito inibitório de precipitação de fármacos é dependente do tipo de HPMC utilizado, onde os tipos de baixa viscosidade (3 a 15 mPas) são tipicamente utilizados para compor DS. A Tg da HPMC varia entre 155 a 180 °C (NEWMAN, 2015; QIU *et al.*, 2017; XU; DAI, 2013).

Existem alguns produtos comerciais no mercado na forma de DS que utilizam a HPMC como carreador polimérico. Exemplos destes são os produtos Certican<sup>®</sup> (everolimo), Nivadil<sup>®</sup> (nilvadipina), Crestor<sup>®</sup> (rosuvastatina), Prograf<sup>®</sup> (tacrolimo) e Sporanox<sup>®</sup> (Itraconazol) (SHAH *et al.*, 2014). No presente trabalho, o polímero HPMC com 28 a 30% de grupos metoxila e 7 a 12% de grupos hidroxipropila, com viscosidade de 4,8 a 7,2 mPas (solução aquosa a 2%), comercialmente disponível como Methocel 6 Premium LV (DOW, 2013), foi avaliado como potencial carreador polimérico para compor DS dos fármacos CC e HCTZ.

### 2.5.4 Hidroxipropilmetilcelulose acetato succinato

O HPMCAS é um polímero entérico derivado do HPMC, que tem sido aplicado com sucesso como carreador polimérico em DS com relação à sua boa performance anti-precipitante para fármacos com diferentes características físico-químicas (CURATOLO; NIGHTINGALE; HERBIG, 2009; GHOSH *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013; MITRA *et al.*, 2016; SOTTHIVIRAT *et al.*, 2013; XU; DAI, 2013).

HPMCAS possui boa estabilidade térmica, baixa higroscopicidade e alta Tg (aproximadamente 120 °C), e por estes motivos é comumente

utilizado como excipiente para DS. Este polímero existe em alguns tipos, variando entre eles a razão molecular dos substituintes acetil e succinoil, o que o proporciona diferentes características físico-químicas (ASHLAND INC., 2016; UEDA *et al.*, 2014b).

Por ser um polímero entérico, o HPMCAS é insolúvel nos fluidos gástricos, porém começa a entumescer e se dissolver em valores de pH acima de 5, dependendo do seu tipo, sendo que o pH de dissolução e a hidrofobicidade deste polímero aumenta à medida que a razão dos substituintes acetil/succinoil aumenta (QIU *et al.*, 2017).

Existem três tipos comercialmente disponíveis: L, M e F. O Quadro 1 demonstra a proporção dos substituintes e o pH de solubilidade dos diferentes tipos de HPMCAS (ASHLAND INC., 2016; NEWMAN, 2015; PINTO *et al.*, 2018; SHAH *et al.*, 2014).

Quadro 1 – Grupos substituintes e solubilidade dos diferentes tipos de HPMCAS

<i>Tipo</i>	<i>Grupos substituintes</i>				<i>Solubilidade em pH</i>
	<i>Acetil</i>	<i>Succinoil</i>	<i>Metoxil</i>	<i>Hidroxiopropil</i>	
L	5 a 9	14 a 18	20 a 24	5 a 9	> 5,5
M	7 a 11	10 a 14	21 a 25	5 a 9	> 6,0
H	10 a 14	4 a 8	22 a 26	6 a 10	> 6,5

Fonte: Adaptado de ASHLAND INC., 2016.

O polímero HPMCAS é obtido a partir da esterificação do HPMC com anidrido acético e anidrido succínico em ácido acético, utilizando um catalisador básico, como o acetato de sódio. O produto obtido é precipitado pela adição de água e purificado por lavagens adicionais com água. A massa molar deste polímero varia entre 55.000 e 93.000 Da (NEWMAN, 2015; QIU *et al.*, 2017).

O HPMCAS foi primeiramente introduzido no mercado como um polímero de revestimento entérico para comprimidos e sistemas multiparticulados. Entretanto, este é atualmente um dos polímeros mais utilizados para solubilização de fármacos pela estratégia tecnológica de DS. Devido à diferença de hidrofobicidade entre seus diferentes tipos, a performance do HPMCAS pode ser otimizada pelo ajuste dos níveis de substituição dos grupos acetato e succinato para atingir a dissolução e manutenção da supersaturação desejada para o fármaco em estudo, dependendo das características físico-químicas deste, o que confere versatilidade ao uso deste polímero como carreador em DS (NEWMAN, 2015; QIU *et al.*, 2017).

Exemplos de produtos na forma de DS utilizando o HPMCAS como carreador polimérico disponíveis no mercado são o Zelboraf<sup>®</sup> (verbufenib) e o Incivek<sup>®</sup> (telapravir) (WILLIAMS *et al.*, 2013).

### 2.5.5 Polivinil caprolactama-polivinil acetato-polietilenoglicol

Recentemente, vários estudos reportaram o uso do copolímero solubilizante SOL em DS (LINN *et al.*, 2012; LUST *et al.*, 2015; SHAMMA; BASHA, 2013). Este polímero foi desenvolvido especialmente para processos de extrusão a calor pela empresa BASF, em 2009. SOL foi desenhado para ser anfifílico por natureza e solúvel em solventes orgânicos. Este polímero possui alta massa molar, Tg baixa (em torno de 70 °C) e alta temperatura de decomposição, o que o torna excelente candidato para o desenvolvimento de DS por técnicas de *Hot Melt Extrusion* e *Spray-drying*. Ainda, devido à suas propriedades anfifílicas, SOL possui uma alta capacidade de solubilização e formação de soluções sólidas de fármacos pouco solúveis (BASF PHARMA INGREDIENTS & SERVICES, 2010; NEWMAN, 2015; QIU *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2014).

SOL é um copolímero hidrofílico não iônico, e sua solubilidade não muda ao longo do trato gastrointestinal. Possui massa molar entre 90.000 a 140.000 g/mol e concentração micelar crítica de 7,6 mg/L ou 7,6 ppm. SOL é solúvel em água, sendo que altas concentrações deste polímero podem formar soluções aquosas turvas, devido à formação de micelas coloidais. Este efeito é mais pronunciado a temperaturas mais elevadas, de aproximadamente 40 °C. A literatura ainda relata que é possível que este copolímero forme micelas mistas com os componentes dos fluidos gastrointestinais, como os sais biliares e fosfolipídeos (BASF PHARMA INGREDIENTS & SERVICES, 2010; NEWMAN, 2015; SHAMMA; BASHA, 2013).

Ao contrário de outros solubilizantes clássicos, como o Cremophor<sup>®</sup> e Solutol<sup>®</sup>, SOL possui característica bifuncional de polímero formador de matriz para DS e solubilizante ativo através de formação de micelas em água. Este polímero apresenta excelentes propriedades de solubilização de fármacos BCS classe II e oferece a possibilidade de produzir DS de uma variedade de fármacos pouco solúveis, sobretudo por meio de técnicas de extrusão a calor (SHAMMA; BASHA, 2013).

## Capítulo II

### **ESTUDOS DE SUPERSATURAÇÃO *IN VITRO* PARA SELEÇÃO DE INIBIDORES POLIMÉRICOS DE PRECIPITAÇÃO**

---





### 3 ESTUDOS DE SUPERSATURAÇÃO *IN VITRO* PARA SELEÇÃO DE INIBIDORES POLIMÉRICOS DE PRECIPITAÇÃO

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Os SDDS, especialmente as DS amorfas, constituem estratégias para melhoria das propriedades biofarmacêuticas de fármacos pouco solúveis, sendo capazes de gerar supersaturação temporária e promover maior absorção dos mesmos (AUGUSTIJNS; BREWSTER, 2012; BEVERNAGE *et al.*, 2013; LU; LI; WANG, 2017; MILLER *et al.*, 2012). Entretanto, como o estado supersaturado é metaestável, o fármaco tende a retornar à sua forma cristalina e precipitar em soluções aquosas. Para contornar este comportamento, o uso de inibidores de precipitação, como os polímeros, é requerido (ALTAMIMI; NEAU, 2017; BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016b; GAO; SHI, 2012; ILEVBARÉ *et al.*, 2012).

Para o desenvolvimento de formulações efetivas na forma de DS amorfas, a seleção do carreador polimérico é uma etapa muito importante. (GAO; SHI, 2012). Estudos de supersaturação *in vitro* vêm sendo aplicados como ferramenta para seleção destes carreadores para compor DS de fármacos pouco solúveis. Estes estudos envolvem a geração da supersaturação do fármaco em um meio selecionado e a quantificação desta supersaturação na presença e ausência dos inibidores poliméricos de precipitação (IPPs) (BEVERNAGE *et al.*, 2013).

Existem diferentes métodos para a condução dos estudos de supersaturação *in vitro*, que variam entre si a forma da geração da supersaturação inicial ou a forma de quantificação desta supersaturação/precipitação do fármaco em estudo. O método *solvent shift* consiste em adicionar o fármaco solubilizado em uma pequena quantidade de solvente orgânico miscível em água ao meio selecionado, de modo a alcançar um índice de supersaturação (IS) previamente determinado. Outro método utilizado para a geração da supersaturação é a adição do fármaco ao meio em uma forma de dissolução rápida, como a forma amorfa (BEVERNAGE *et al.*, 2013; BOGNER *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2016; WARREN *et al.*, 2010).

Independentemente de como a supersaturação inicial será gerada, o meio utilizado nos estudos de supersaturação *in vitro* deve reproduzir, ao máximo, as condições *in vivo*. Neste sentido, meios biorrelevantes têm sido crescentemente empregados e têm demonstrado uma boa estimativa das condições de dissolução *in vivo* (HENS *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2017).

Estudos de supersaturação *in vitro* também vêm sendo conduzidos utilizando fluidos gastrointestinais humanos como meio (HENS *et al.*, 2016; RUBBENS *et al.*, 2016). Porém, devido a disponibilidade destes meios ser consideravelmente restrita, seu uso apresenta limitações.

Um número considerável de estudos de supersaturação ainda vem sendo conduzido em meios não-biorrelevantes, como a água ou soluções tampão (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016c; RAINA *et al.*, 2015; UEDA *et al.*, 2015). Estes meios podem não prover informações consistentes sobre a capacidade dos carreadores poliméricos de atingir e manter a supersaturação de fármacos pouco solúveis, ou não predizer adequadamente seu comportamento *in vivo*.

Neste contexto, o presente capítulo aborda a aplicação de estudos de supersaturação *in vitro* para a seleção de potenciais carreadores poliméricos para compor DS de HCTZ e CC, por meio da avaliação da atividade anti-precipitante dos polímeros selecionados sobre estes fármacos. Os estudos serão conduzidos por meio do método *solvent shift* para o fármaco CC e pela adição do fármaco amorfo para a HCTZ, em dois meios distintos: tampão fosfato pH 6,8 e meio biorelevante FaSSIF.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Materiais

As matérias-primas CC (Xi'an Lyphar Biotech Co., Ltd) e HCTZ (Suzhou Ausun Chemical Co., Ltd) foram adquiridas do fornecedor Pharmanostra. O HPMC (Methocel<sup>®</sup> E6 Premium LV) foi doado pelo Laboratório Farmacêutico Elofar Ltda (Florianópolis, Brasil). Os polímeros HPMCAS tipos L, M e H (AquaSolve<sup>®</sup>, pó fino) foram doados pelo fabricante Ashland (São Paulo, Brasil). O SOL (Soluplus<sup>®</sup>) foi doado pelo fabricante BASF (São Paulo, Brasil). O meio biorrelevante FaSSIF foi adquirido do fabricante Biorelevant (Londres, Inglaterra). A água ultrapura foi obtida através de sistema Milli-Q<sup>®</sup>. Todos os demais reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e/ou de grau para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### 3.2.2 Métodos

#### 3.2.2.1 Preparo dos meios

O meio biorrelevante FaSSIF foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Após o preparo, este é composto por 3mM de

taurocolato de sódio, 0,75 mM de lecitina, 105,9 mM de cloreto de sódio, 28,4 mM de fosfato de sódio monobásico e 8,7 mM de hidróxido de sódio em água, com um pH de  $6,5 \pm 0,05$ . O tampão fosfato de potássio pH 6,8 foi preparado conforme instruções da *United States Pharmacopeia* 39 (USP, 2016).

### 3.2.2.2 Estudos de solubilidade em equilíbrio

Estudos de solubilidade em equilíbrio foram realizados para os fármacos cristalinos nos meios selecionados, com e sem a presença dos polímeros, pelo método *Shake flask*, utilizando uma Incubadora Shaker NT-715 (Nova Técnica, Brasil).

Excesso dos fármacos (5 mg de CC e 100 mg de HCTZ) foram adicionados individualmente a 10 mL de cada um dos meios contendo 0,0%, 0,10%, 0,25% e 0,50% (m/v) de SOL, HPMC, HPMCAS L, M ou H, e submetidos à agitação de 240 rotações por minuto (rpm) sob temperatura de  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Alíquotas de 1 mL de cada meio foram retiradas a cada 24 h, até o alcance do equilíbrio da concentração dos fármacos solúvel nos meios. Após a coleta, as alíquotas foram imediatamente filtradas por meio de filtro de seringa de poliamida com  $0,45\ \mu\text{m}$  de tamanho de poro (Chromaphil<sup>®</sup> Xtra), diluídas em acetonitrila e quantificadas por CLAE conforme os métodos desenvolvidos.

Ainda, para avaliar o impacto de pequenas quantidades do solvente orgânico na solubilidade em equilíbrio da CC, o estudo de solubilidade em equilíbrio para este fármaco também foi conduzido nos meios sem a adição de polímero, porém contendo 0,50% de DMSO.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.2.2.3 Obtenção e caracterização da hidroclorotiazida amorfa

Para a obtenção da HCTZ na forma amorfa, 2 g do fármaco cristalino foram pesados e transferidos para jarros de aço inox de capacidade de 125 mL de um moinho de esferas Retsch PM200 (Haan, Alemanha), contendo em seu interior três esferas de aço inoxidável de 10 mm de diâmetro, de modo que a razão esfera/pó se manteve em aproximadamente 50:1 (m/m).

O fármaco foi moído a 560 rpm por 2,5 h à temperatura ambiente, sendo as condições de moagem definidas por meio de testes experimentais prévios. Após sua obtenção, a amorfização do material foi confirmada por análises de DRX, onde os difratogramas do fármaco cristalino e moído foram obtidos utilizando equipamento  $\theta$ - $\theta$  D2 Phaser

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

O fármaco amorfo foi acondicionado em frasco ampola de vidro com tampa plástica, vedado com filme Parafilm<sup>®</sup>, identificado e armazenado em geladeira à temperatura de  $2,0$  a  $8,0^\circ\text{C}$  até sua utilização nos estudos de supersaturação *in vitro*, que foram executados no período de uma semana a partir da data da realização da moagem.

#### 3.2.2.4 Estudos de supersaturação *in vitro*

Os estudos de supersaturação *in vitro* foram conduzidos nos meios FaSSIF e tampão fosfato pH 6,8 contendo 0,0%, 0,10%, 0,25% e 0,50% (m/v) de SOL, HPMC, HPMCAS L, M ou H.

Frascos erlenmeyer de capacidade de 25 mL contendo 10 mL de FaSSIF ou 20 mL de tampão fosfato pH 6,8 (com a ausência e presença dos polímeros nas concentrações selecionadas) foram acomodados em incubadora Shaker Nova Técnica NT-715. A temperatura foi mantida a  $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  com agitação de 240 rpm durante todo o estudo.

Para a CC, soluções estoque do fármaco em DMSO nas concentrações de 5,52 mg/mL e 154,18 mg/mL foram preparadas, de modo a induzir um IS inicial de 20 para o meio tampão fosfato pH 6,8 e de 100 para o meio FaSSIF. Alíquotas destas soluções estoque correspondentes a 0,50% do volume dos meios (50  $\mu\text{L}$  para o meio FaSSIF e 100  $\mu\text{L}$  para o meio tampão fosfato pH 6,8) foram adicionadas a cada frasco contendo o meio pré-aquecido.

Para a HCTZ, massas de 100 mg (para o meio FaSSIF) e 200 mg (para o meio tampão fosfato pH 6,8) do fármaco amorfo foram pesadas individualmente e adicionadas a cada frasco erlenmeyer contendo os meios pré-aquecidos, com e sem a presença dos polímeros. Adicionalmente, o estudo foi conduzido com o fármaco cristalino apenas nos meios sem a adição de polímero, visando avaliar o incremento de solubilidade proporcionado pela amorfização do fármaco.

Nos intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90 e 120 min, alíquotas de 0,5 mL (para o meio FaSSIF) e 1,0 mL (para o meio tampão fosfato pH 6,8) foram retiradas e filtradas por filtros de seringa de poliamida com  $0,45 \mu\text{m}$  de tamanho de poro (Chromaphil<sup>®</sup> Xtra). As amostras filtradas foram imediatamente diluídas em acetonitrila, para prevenir qualquer cristalização adicional do fármaco, e injetadas em

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para análise da concentração dissolvida dos fármacos.

Todos os estudos de supersaturação *in vitro* foram realizados em triplicata.

#### 3.2.2.4 Microscopia de Luz Polarizada

A técnica de Microscopia de Luz Polarizada (MLP) foi utilizada para avaliar a tendência de cristalização das amostras durante os estudos de supersaturação *in vitro*. Nos intervalos de tempo de 5, 60 e 120 min, alíquotas de 300 µL foram retiradas de cada frasco erlenmeyer, transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas a 6.200 rpm por 5 min em microcentrífuga MiniStar (MiniStar, Bélgica). O sobrenadante foi cuidadosamente descartado até que restassem poucos microlitros no fundo do tubo. Alíquotas de 20 µL das suspensões remanescentes foram colocadas em lâminas de vidro, cobertas com lamínulas de vidro e analisadas por meio de Microscópio Olympus CX41RF equipado com analisador de luz transmitida (U-ANT) e polarizador de luz transmitida (U-POT) (Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

A avaliação da cristalinidade das amostras foi realizada, baseada na observação visual da birrefringência dos cristais (quando presentes), em comparação com as regiões amorfas não-birrefringentes.

#### 3.2.2.4 Quantificação dos fármacos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As soluções amostra foram quantificadas por CLAE, conforme métodos desenvolvidos e para esta finalidade, utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 (Shimadzu Corporation, Japão) equipado com detector ultravioleta.

Para ambos os fármacos, foi utilizada coluna analítica de fase reversa octadecilsilano (C18) Phenomenex Gemini 110 A, com dimensões de 250 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm, mantida a uma temperatura de 25°C.

Para quantificação da CC, a fase móvel foi utilizada em modo isocrático e composta por acetonitrila: tampão acetato de sódio 5mM pH 4,0 (75:25 v/v), a um fluxo de 1,5 mL/min. O comprimento de onda utilizado para a análise foi de 215 nm. Após filtração apropriada, 40 µL das amostras foram injetados no sistema de CLAE.

Para quantificação da HCTZ, a fase móvel foi composta de acetonitrila: tampão acetato de sódio 5mM pH 4,0 (25:75 v/v), a um fluxo de 1,5 mL/min. O comprimento de onda utilizado para a análise foi de 254 nm e, após filtração apropriada, 10 µL das amostras foram injetados no sistema de CLAE.

Curvas de calibração foram construídas em uma faixa linear de 0,2 a 100,0 µg/mL para a CC e de 5,0 a 200,0 µg/mL para a HCTZ. As amostras foram diluídas de modo a apresentarem respostas dentro do intervalo linear da curva de calibração, e quantificadas por meio das equações da reta obtidas.

### 3.2.2.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos e os cálculos de área sob a curva (AUC) foram realizados utilizando o software GraphPad Prism® 6 (San Diego, EUA).

O teste *t* de Student foi utilizado para determinar a influência do DMSO na solubilidade em equilíbrio de CC.

A análise de variâncias (ANOVA) fator único, seguida de teste de múltiplas comparações de Tukey foi empregada a fim de comparar e testar a significância estatística dos valores de solubilidade em equilíbrio dos meios com e sem polímeros e dos valores de área sob as curvas (AUC) obtidos nos experimentos de supersaturação *in vitro* para ambos os fármacos.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de probabilidade (p) foi inferior a 0,05, a um nível de confiança de 95%.

### 3.2.2.6 Espalhamento Dinâmico de Luz

Visando avaliar a ocorrência da potencial interação entre o polímero SOL e os sais biliares presentes em FaSSIF, o tamanho das partículas dispersas em solução foi medido pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), em equipamento ALV *laser goniometer* com laser de hélio-neon vermelho linearmente polarizado ( $\lambda = 632,8$  nm) e correlacionador digital de múltiplo tau LSE-5004.

Para o preparo das amostras, frascos erlenmeyer de 25 mL contendo 10 mL de FaSSIF, FaSSIF contendo 0,25% de SOL e tampão fosfato de sódio pH 6,5 contendo 0,25% de SOL foram acomodados em incubadora Shaker Nova Técnica NT-715. O tampão fosfato pH 6,5 é

utilizado para o preparo do meio biorrelevante FaSSIF, e foi preparado conforme as instruções do fabricante Biorelevant.

Os meios, preparados em duplicata, foram pré-aquecidos a  $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , e a um dos frascos alíquotas de  $50 \mu\text{L}$  de uma solução estoque do fármaco CC em DMSO a  $154,18 \text{ mg/mL}$  foram adicionadas. As amostras dos meios com e sem o fármaco CC foram agitadas por 120 min a 240 rpm e então filtradas por meio de filtro de seringa de poliamida com  $0,45 \mu\text{m}$  de tamanho de poro (Chromaphil® Xtra). Em seguida, foram introduzidas em células de vidro de 10 mm e analisadas em diversos ângulos de espalhamento no intervalo de  $30^\circ$  e  $145^\circ$ , a temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Os resultados foram analisados utilizando software ALV-correlator V.3.0.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Solubilidade em equilíbrio de candesartana cilexetila e hidrocolorotiazida

Os estudos de solubilidade em equilíbrio foram realizados para avaliar a influência dos polímeros na solubilidade dos fármacos. A seleção dos meios foi realizada considerando que a CC e HCTZ não possuem um local preferencial de absorção e a literatura relata que a absorção da HCTZ pode ser aumentada na presença de alimentos no trato gastrointestinal, enquanto a absorção da CC não é afetada por esse este fator (BARBHAIYA *et al.*, 1982; HUSAIN *et al.*, 2011).

Deste modo, meios compatíveis com a porção intestinal foram utilizados, uma vez que este é conhecidamente um local preferencial de absorção de fármacos (DUIZER *et al.*, 1997). A condição de jejum foi selecionada considerando que esta representaria o pior caso para a absorção do fármaco HCTZ.

Os resultados de solubilidade em equilíbrio obtidos para os fármacos HCTZ e CC encontram-se demonstrados na Tabela 2.

Para a CC, o equilíbrio foi alcançado após 72 h em tampão fosfato pH 6,8 e após 48 h em FaSSIF, resultando em uma concentração de fármaco solúvel de  $1,38 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$  e  $7,71 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$  para os meios citados, respectivamente.

Para a HCTZ, o equilíbrio foi atingido após 24h para ambos os meios, resultando em valores de solubilidade em equilíbrio de  $978,08 \pm 8,68 \mu\text{g/mL}$  para o tampão fosfato pH 6,8 e  $1.262,83 \pm 32,84 \mu\text{g/mL}$  para o FaSSIF.

Tabela 2 - Solubilidade em equilíbrio dos fármacos CC e HCTZ na presença e ausências dos polímeros em diferentes concentrações nos meios de estudo. \* representa resultados estatisticamente diferentes quando comparados aos respectivos meios sem a adição de polímeros ( $p < 0,05$ ).

Polímero adicionado	<i>Candesartana cilexetila</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )		<i>Hidroclorotiazida</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Tampão fosfato pH 6,8	FaSSIF	Tampão fosfato pH 6,8	FaSSIF
Sem polímero	1,38 $\pm$ 0,07	7,71 $\pm$ 0,12	978,08 $\pm$ 8,68	1262,83 $\pm$ 32,84
0,10% HPMC	1,17 $\pm$ 0,07	8,68 $\pm$ 0,92	927,77 $\pm$ 28,86	1214,68 $\pm$ 47,99
0,25% HPMC	1,25 $\pm$ 0,03	8,77 $\pm$ 0,67	931,16 $\pm$ 14,70	1270,10 $\pm$ 41,90
0,50% HPMC	1,29 $\pm$ 0,10	8,36 $\pm$ 0,25	942,27 $\pm$ 22,11	1290,85 $\pm$ 33,28
0,10% HPMCAS L	1,21 $\pm$ 0,04	7,23 $\pm$ 0,10	997,57 $\pm$ 10,64	1285,55 $\pm$ 14,12
0,25% HPMCAS L	1,21 $\pm$ 0,01	7,11 $\pm$ 0,14	952,39 $\pm$ 18,99	1259,35 $\pm$ 15,42
0,50% HPMCAS L	1,19 $\pm$ 0,10	7,09 $\pm$ 0,24	971,47 $\pm$ 6,12	1254,60 $\pm$ 32,57
0,10% HPMCAS M	1,43 $\pm$ 0,04	7,53 $\pm$ 0,63	971,29 $\pm$ 13,79	1216,42 $\pm$ 18,36
0,25% HPMCAS M	1,58 $\pm$ 0,08	8,17 $\pm$ 0,11	978,02 $\pm$ 10,82	1250,21 $\pm$ 66,67
0,50% HPMCAS M	2,02 $\pm$ 0,12	7,41 $\pm$ 0,24	997,77 $\pm$ 59,42	1268,46 $\pm$ 46,34
0,10% HPMCAS H	1,34 $\pm$ 0,03	8,34 $\pm$ 0,67	925,80 $\pm$ 21,52	1271,17 $\pm$ 49,18
0,25% HPMCAS H	1,77 $\pm$ 0,11	8,67 $\pm$ 0,17	971,95 $\pm$ 10,39	1295,74 $\pm$ 24,45
0,50% HPMCAS H	1,83 $\pm$ 0,13	8,76 $\pm$ 0,44	946,86 $\pm$ 25,02	1220,12 $\pm$ 29,31
0,10% SOL	4,75 $\pm$ 0,45*	8,57 $\pm$ 0,34	1146,86 $\pm$ 25,02*	1343,88 $\pm$ 27,54
0,25% SOL	11,93 $\pm$ 0,31*	12,22 $\pm$ 0,42*	1192,94 $\pm$ 26,59*	1386,88 $\pm$ 37,88*
0,50% SOL	13,11 $\pm$ 1,57*	18,64 $\pm$ 0,74*	1208,99 $\pm$ 11,65*	1400,52 $\pm$ 23,32*



Como esperado, o valor de solubilidade em equilíbrio obtido para os fármacos em meio FaSSIF sem a adição de polímeros foi superior àquela obtida para o tampão fosfato pH 6,8, devido ao mecanismo de solubilização micelar atribuído aos sais biliares presentes no meio biorrelevante (BUCKLEY *et al.*, 2013; HOLM; MÜLLERTZ; MU, 2013; RIETHORST *et al.*, 2016).

Para o fármaco CC, a solubilidade em equilíbrio em FaSSIF foi cerca de 5,5 vezes maior que em tampão fosfato pH 6,8, enquanto que para a HCTZ este aumento foi de cerca de 1,3 vezes. Esta diferença no incremento de solubilidade pode ser atribuída às diferentes características físico-químicas dos fármacos, onde a CC, sendo mais lipofílica, apresentou grande afinidade pelas micelas do meio biorrelevante, tendo um incremento de solubilidade mais significativo em meio FaSSIF.

Os estudos de solubilidade em equilíbrio também demonstraram que a presença dos polímeros HPMC e HPMCAS tipos L, M e H não influenciou na solubilidade em equilíbrio da CC e da HCTZ cristalinas em ambos os meios testados ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a solubilidade dos mesmos aumentou quando o polímero SOL foi adicionado ao meio tampão fosfato pH 6,8, em todas as concentrações testadas, e ao meio FaSSIF contendo SOL a 0,25% e 0,50%, apresentando resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao meio sem a adição de polímeros. Já para o meio FaSSIF contendo SOL a 0,10% resultados estatisticamente semelhantes foram obtidos ( $p > 0,05$ ).

Em geral, a solubilidade de ambos os fármacos aumentou com o aumento da concentração de SOL nos meios estudados. Como um solubilizante polimérico, o SOL é capaz de promover a solubilização micelar de fármacos pouco solúveis. A formação de micelas ocorre quando a concentração do surfactante se encontra acima de sua concentração micelar crítica (CMC) (SHAMMA; BASHA, 2013). Todas as concentrações testadas nos estudos realizados se encontraram acima da CMC do polímero SOL, que é de aproximadamente 0,0007% (REINTJES, 2011), sendo, portanto, o aumento de solubilidade dos fármacos atribuído à solubilização micelar proporcionada por este polímero.

A análise estatística dos dados demonstrou que a pequena quantidade de DMSO adicionada não interferiu significativamente na solubilidade em equilíbrio do fármaco CC em ambos os meios testados, uma vez que o valor de  $p$  foi superior a 0,05 no teste  $t$  realizado. Assim sendo, a solução estoque de CC em DMSO, quando adicionada na concentração de 0,5% do volume total dos meios, demonstrou ser

adequada utilização nos estudos de supersaturação *in vitro*. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de solubilidade em equilíbrio de CC em diferentes meios com e sem a adição de solvente orgânico

Meio	Concentração (µg/mL)	Concentração média ± desvio padrão (µg/mL)	p (teste t)
Tampão fosfato pH 6,8	1,46	1,38 ± 0,07	0,9652
	1,33		
	1,35		
Tampão fosfato pH 6,8 + 0,5% DMSO	1,39	1,38 ± 0,03	
	1,35		
	1,40		
FaSSIF	7,77	7,71 ± 0,11	0,7539
	7,78		
	7,58		
FaSSIF + 0,5% DMSO	7,68	7,68 ± 0,13	
	7,54		
	7,80		

### 3.3.2 Definição do índice de supersaturação para o fármaco candesartana cilexetila

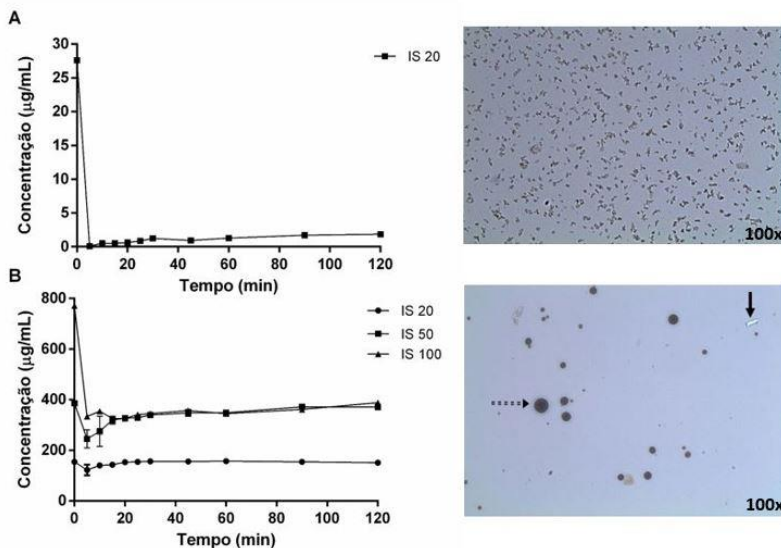
Os métodos para condução dos estudos de supersaturação *in vitro* foram selecionados com base nas características de solubilidade dos fármacos. Como o fármaco CC possui baixa solubilidade aquosa, a utilização do fármaco amorfo para geração da supersaturação requer a pesagem de massas muito pequenas do mesmo. Desta forma, optou-se pela utilização do método *solvent shift* para este fármaco, sendo que este método requer a definição de um IS para condução dos estudos.

Com base nos resultados de solubilidade em equilíbrio obtidos para a CC nos meios sem a adição de polímeros, e sabendo-se que a extensão da supersaturação pode interferir no efeito inibidor de precipitação dos polímeros (SUN; WEN; TAYLOR, 2016), um IS inicial de 20 foi selecionado para ambos os meios estudados. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Devido à baixa solubilidade da CC em tampão fosfato pH 6,8, o IS de 20 demonstrou ser adequado para este meio, uma vez que precipitação significativa do fármaco foi observada após apenas 5 min de teste (**Erro! onte de referência não encontrada. A**).

Por outro lado, comportamento diferente foi visualizado para o meio FaSSIF, onde com o IS de 20, praticamente todo o fármaco permaneceu solúvel até 120 min após a adição da solução estoque de CC neste meio (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** B). Este comportamento pode ser explicado pelo mecanismo de solubilização micelar atribuído aos sais biliares, que reduz a quantidade de fármaco livre em solução e aumenta a solubilidade aparente da CC.

Figura 6 - Precipitação do fármaco CC nos diferentes meios e IS: A) tampão fosfato pH 6,8 e B) FaSSIF. Imagens de MLP (aumento de 100x) dos precipitados em tampão fosfato pH 6,8 (IS 20) e FaSSIF (IS 100) após 120 min de teste. As setas indicam estruturas representativas: cristais (seta sólida) e aglomerados não birefringentes de tamanhos variáveis (seta tracejada).



Estudos prévios também demonstraram que os sais biliares podem agir como inibidores de precipitação, ainda que um estudo recente tenha reportado que a lecitina pode reduzir o efeito inibitório de cristalização dos sais biliares para o fármaco modelo telapravir (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; HOLM; MÜLLERTZ; MU, 2013; LU *et al.*, 2017).

Sabe-se que o potencial químico de um sistema supersaturado é aumentado quando comparado à condição de saturação (equilíbrio). Assim, uma solução supersaturada é termodinamicamente instável e

possui a tendência a retornar a seu estado de equilíbrio (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009). Por consequência, quanto maior o IS e o potencial químico do sistema supersaturado, maior a tendência de precipitação do fármaco. Deste modo, devido à ausência de precipitação significativa da CC em FaSSIF com a utilização do IS de 20, IS adicionais de 50 e 100 foram testados neste meio.

Para o IS de 50, alguma precipitação do fármaco foi observada, porém em pequena extensão, o que não possibilitaria a adequada visualização do efeito inibidor de precipitação dos polímeros testados. Já o IS de 100 demonstrou ser capaz de apresentar precipitação significativa da CC, sendo selecionado para a condução dos estudos de supersaturação *in vitro* no meio FaSSIF.

Adicionalmente, análises de MLP foram realizadas, e demonstraram que a CC possui um comportamento de precipitação diferente entre os dois meios testados.

A MLP é considerada técnica analítica de escolha para avaliação qualitativa da cristalinidade de amostras (GUO; SHALAEV; SMITH, 2013; THAKRAL *et al.*, 2016), sendo baseada na visualização da birrefringência das mesmas. A birrefringência é definida como a diferença numérica entre os índices de refrações principais máximos e mínimos onde, para amostras amorfas e cristais em sistemas cúbicos, a birrefringência é igual a zero, em virtude destes materiais apresentarem apenas um índice de refração. Visualmente, a birrefringência é detectada na forma de cristais coloridos, enquanto que amostras amorfas são visualizadas com a coloração preta sob luz polarizada (DELLY, 2008).

Nas análises realizadas, foi possível visualizar que em tampão fosfato pH 6,8, a CC precipita como aglomerados desorganizados abundantes e não-birrefringentes. Devido à presença dos surfactantes taurocolato de sódio e lecitina em FaSSIF, as ultraestruturas deste meio são caracterizadas pela presença de micelas simples de sais biliares/fosfolipídeos (RIETHORST *et al.*, 2016), onde estruturas arredondadas não-birrefringentes de tamanhos variáveis foram observadas, provavelmente originadas por aglomeração micelar. Cristais birrefringentes também puderam ser observados em FaSSIF (**Erro! Fonte e referência não encontrada.**).

### 3.3.3 Caracterização da hidroclorotiazida amorfa

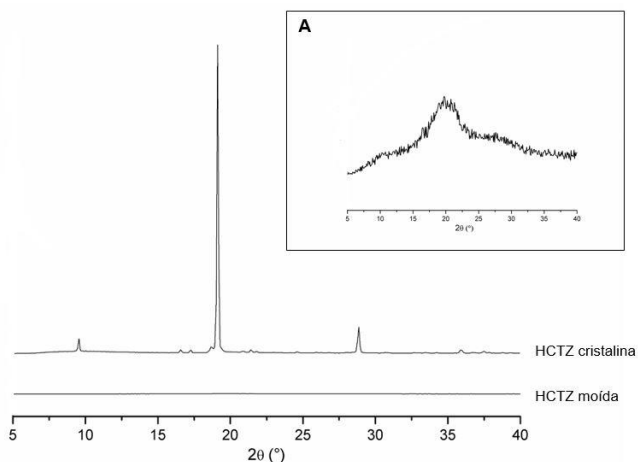
Para a condução dos estudos de supersaturação *in vitro* para o fármaco HCTZ, o método selecionado para a geração da supersaturação

foi a utilização da sua forma amorfa, por ser esta uma forma de alta energia e dissolução rápida.

Este método foi selecionado uma vez que a HCTZ apresenta uma solubilidade aquosa muitas vezes superior à da CC, o que inviabiliza a sua solubilização em uma pequena quantidade de solvente orgânico para condução do método *solvent shift*.

Desta forma, a obtenção prévia da forma amorfa do fármaco foi necessária para a condução dos estudos. Após o processo de moagem aplicado, a amorfização da HCTZ foi confirmada pela técnica de DRX. A Figura 7 ilustra os difratogramas obtidos para a HCTZ cristalina e moída.

Figura 7 - Difratogramas relativos à HCTZ cristalina e moída. A) Difratograma ampliado do fármaco moído.



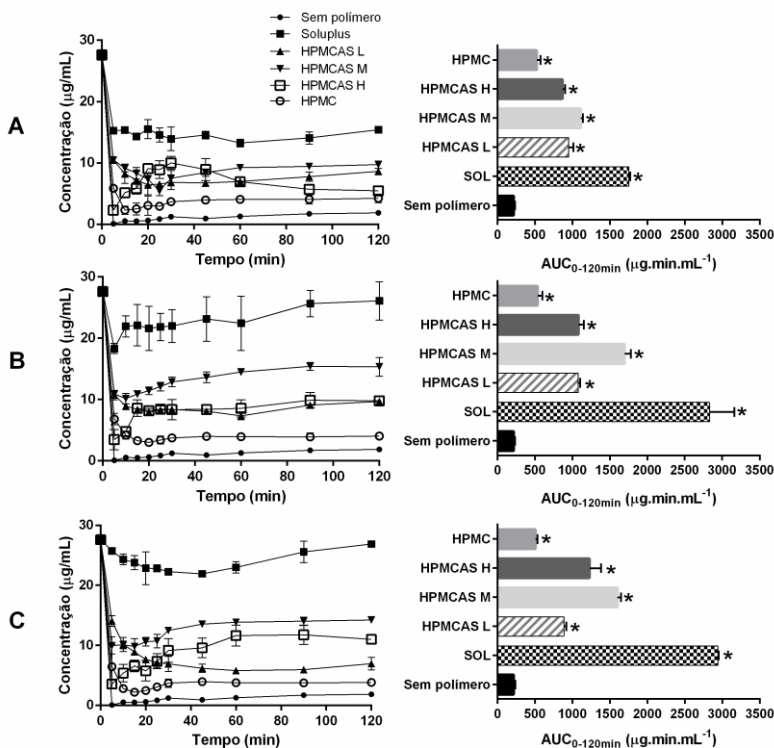
O fármaco HCTZ exibiu alto grau de cristalinidade antes do processo de moagem, com reflexões características em  $2\theta$  evidenciadas nas posições  $9,55^\circ$ ,  $19,11^\circ$  e  $28,85^\circ$ , compatível com difratogramas relatados em literatura científica para este fármaco (ACEVES-HERNÁNDEZ *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2017; PIRES; DOS SANTOS; SINISTERRA, 2011). Já o difratograma obtido para a HCTZ moída demonstrou ausência de reflexões agudas, e formação de halo característico de materiais amorfos, confirmando a amorfização da mesma proporcionada pelo processo de moagem aplicado.

Assim, a HCTZ moída foi utilizada para a condução dos estudos de supersaturação *in vitro* para seleção de potenciais carreadores poliméricos para compor as DS deste fármaco.

### 3.3.4 Influência dos polímeros na supersaturação dos fármacos em tampão fosfato pH 6,8

Os perfis de supersaturação e suas respectivas AUC obtidas para o fármaco CC em meio tampão fosfato pH 6,8 encontram-se demonstrados na Figura 8. A AUC foi avaliada como uma medida da extensão da supersaturação alcançada pelos fármacos nos respectivos meios e concentrações de polímeros testados.

Figura 8 - Perfis de supersaturação de CC e suas respectivas AUC em tampão fosfato pH 6,8 com diferentes polímeros. A) 0,10%; B) 0,25% e C) 0,50%. \* representa resultados estatisticamente diferentes quando comparados ao meio sem a adição de polímeros ( $p < 0,05$ ).



Adicionalmente, os resultados de IS aos 120 min ( $IS_{120min}$ ) de teste para cada polímero e concentrações testadas encontram-se demonstrados na Tabela 4. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Tabela 4 - Dados de  $IS_{120min}$  obtidos para o fármaco CC nos diferentes polímeros e concentrações testadas em meio tampão fosfato pH 6,8

Polímero	$IS_{120min}$		
	0,10%	0,25%	0,50%
HPMC	3,07 $\pm$ 0,51	2,93 $\pm$ 0,42	2,78 $\pm$ 0,41
HPMCAS L	6,26 $\pm$ 0,17	7,02 $\pm$ 0,38	5,05 $\pm$ 0,75
HPMCAS M	7,06 $\pm$ 0,43	11,11 $\pm$ 1,11	10,32 $\pm$ 0,14
HPMCAS H	3,96 $\pm$ 0,12	7,09 $\pm$ 0,34	7,98 $\pm$ 0,05
SOL	11,16 $\pm$ 0,01	18,90 $\pm$ 2,28	19,60 $\pm$ 0,12

Nos estudos realizados, foi possível observar que quando o polímero SOL foi adicionado ao tampão fosfato pH 6,8, altos valores de AUC e  $IS_{120min}$  foram obtidos quando comparados ao meio contendo os outros polímeros. Os valores de AUC se mostraram estatisticamente diferentes daquele obtido para o meio sem polímeros, em todas as concentrações de SOL testadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 8).

Ainda se observou que os valores de AUC aumentaram a medida que a concentração de SOL neste meio aumentou. A 0,25% e 0,50%, o polímero SOL foi capaz de manter uma concentração de aproximadamente 30  $\mu\text{g/mL}$  de CC solúvel no meio, ou seja, praticamente todo o fármaco adicionado permaneceu solúvel em tampão fosfato pH 6,8 pela influência do polímero adicionado ao meio, sendo que a AUC obtida para o tampão fosfato pH 6,8 contendo 0,50% de SOL foi cerca de 13 vezes maior que aquela obtida para o meio sem adição de polímeros.

Este mesmo comportamento foi observado nos estudos de solubilidade em equilíbrio realizados, demonstrando que a CC solubiliza nas micelas de SOL. Assim sendo, a melhor efetividade demonstrada para o SOL no meio tampão fosfato pH 6,8 pode ser atribuída ao fenômeno de solubilização micelar, ao invés de um efeito real de inibição de precipitação. Ressalta-se que a solubilização micelar reduz a quantidade de fármaco livre em solução, o que pode influenciar na absorção *in vivo* do mesmo (FRANÇA *et al.*, 2017).

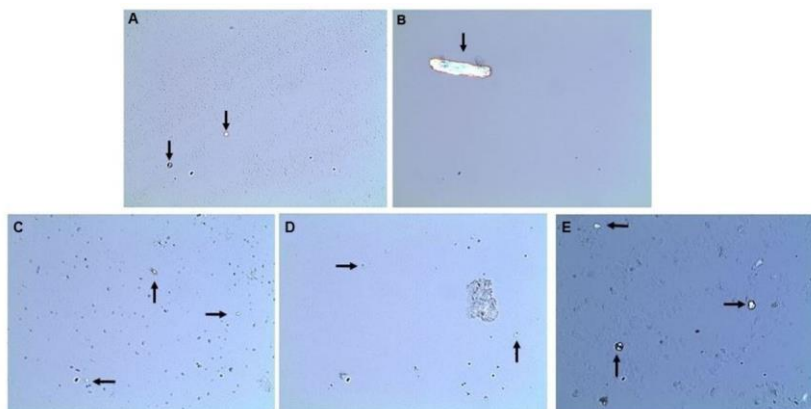
Por outro lado, o polímero HPMC demonstrou a pior capacidade de manutenção de supersaturação da CC em tampão fosfato pH 6,8 dentre os polímeros testados. Embora os resultados de AUC obtidos para o meio com a presença de HPMC tenham sido estatisticamente diferentes daqueles obtidos para o meio sem adição de polímeros ( $p < 0,05$ ), o  $IS_{120min}$

alcançado foi de apenas aproximadamente 3, demonstrando intensa precipitação do fármaco CC, sendo que os valores de  $IS_{120min}$  não se tornaram maiores com o aumento da concentração de HPMCAS no meio.

O polímero HPMCAS M demonstrou a melhor atividade antiprecipitante sobre a CC dentre os diferentes tipos de HPMCAS testados, atingindo maiores valores de AUC e  $IS_{120min}$ , conforme demonstrado na Figura 8 e Tabela 4. A menor quantidade de HPMCAS M presente no meio (0,10%) permitiu uma maior precipitação do fármaco, enquanto que nenhuma diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) foi obtida entre as concentrações de 0,25% e 0,50% deste polímero em tampão fosfato pH 6,8. Estes resultados sugerem efeito concentração-dependente do HPMCAS M sobre a precipitação da CC, o que requer testes experimentais para a determinação da razão fármaco/polímero apropriada para compor futuras DS de CC utilizando este carreador polimérico.

Nas análises de MLP realizadas, a presença de precipitados não-birrefringentes e cristais foi demonstrada para todos os polímeros e concentrações testadas em tampão fosfato pH 6,8, conforme demonstra a Figura 9. Os cristais visualizados apresentaram-se, em geral, pequenos e detectados em proporção muito menor que os precipitados não-birrefringentes.

Figura 9 - Imagens de MLP (aumento de 200x) do tampão fosfato pH 6,8 contendo os diferentes polímeros a 0,10% após 120 min de estudo de supersaturação *in vitro* para o fármaco CC. A) SOL; B) HPMC; C) HPMCAS L; D) HPMCAS M e E) HPMCAS H. As setas pretas indicam cristais birrefringentes.





Quando os polímeros SOL e HPMCAS M estavam presentes no meio, pouco material precipitado foi visualizado quando comparado ao meio sem a adição de polímeros, o que concorda com os resultados de supersaturação proporcionados por estes polímeros.

A Figura 10 demonstra os perfis de supersaturação e suas respectivas AUC, assim como a Tabela 5 sumariza os resultados de  $IS_{120min}$  obtidos para o fármaco HCTZ em meio tampão fosfato pH 6,8. Os valores de  $IS_{120min}$  foram calculados em relação à concentração dissolvida de HCTZ aos 120 min para o fármaco cristalino, e os dados encontram-se expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Figura 10 - Perfis de supersaturação de HCTZ e suas respectivas AUC em tampão fosfato pH 6,8 com diferentes polímeros. A) 0,10%; B) 0,25% e C) 0,50%. \* representa resultados estatisticamente diferentes quando comparados ao fármaco amorfo em meio sem a adição de polímeros ( $p < 0,05$ ).

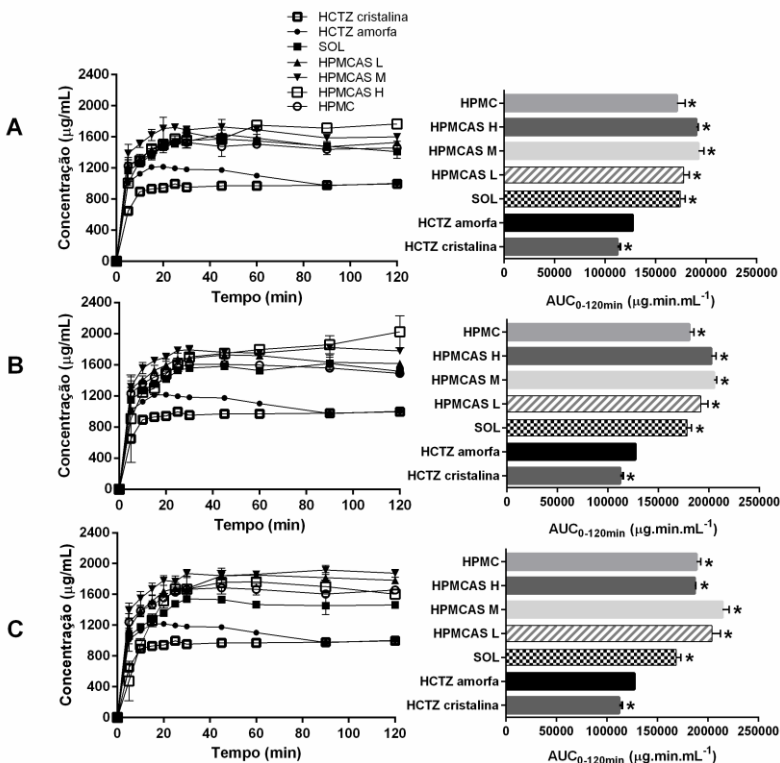


Tabela 5 - Dados de  $IS_{120min}$  obtidos para o fármaco HCTZ nos diferentes polímeros e concentrações testadas em meio tampão fosfato pH 6,8

Polímero	$IS_{120min}$		
	0,10%	0,25%	0,50%
Sem polímero (HCTZ amorfa)		1,01 ± 0,01	
HPMC	1,46 ± 0,09	1,49 ± 0,04	1,66 ± 0,03
HPMCAS L	1,53 ± 0,05	1,62 ± 0,02	1,79 ± 0,04
HPMCAS M	1,60 ± 0,03	1,78 ± 0,04	1,88 ± 0,05
HPMCAS H	1,77 ± 0,01	2,03 ± 0,21	1,61 ± 0,05
SOL	1,41 ± 0,09	1,52 ± 0,06	1,47 ± 0,04

Pode-se observar que, devido às características físico-químicas dos fármacos estudados, resultados diferentes daqueles obtidos para a CC foram obtidos para o fármaco HCTZ no meio tampão fosfato pH 6,8.

Inicialmente, foi possível observar que, como esperado, a amorfização promoveu o aumento da solubilidade do fármaco HCTZ em meio tampão fosfato pH 6,8, gerando supersaturação do mesmo, como pode ser visualizado pelo resultado de AUC estatisticamente diferente quando comparado ao fármaco cristalino no meio sem adição de polímeros ( $p < 0,05$ ). No entanto, a supersaturação obtida foi pequena, e houve precipitação do fármaco amorfo no meio, a partir dos 30 min de teste. Por este motivo, apesar dos valores de AUC se apresentarem estatisticamente diferentes entre o fármaco cristalino e amorfo, o  $IS_{120min}$  obtido para o fármaco amorfo foi de apenas 1,01, conforme demonstrado na Tabela 5. Este comportamento de reduzida extensão de supersaturação e precipitação em meio aquoso é condizente com estudos prévios realizados com a HCTZ.

Apesar dos perfis de supersaturação obtidos com os diferentes polímeros serem bastante semelhantes, como demonstra a Figura 10, o polímero HPMCAS tipo M foi o que alcançou os maiores valores de AUC nas três concentrações testadas dentre todos os polímeros estudados.

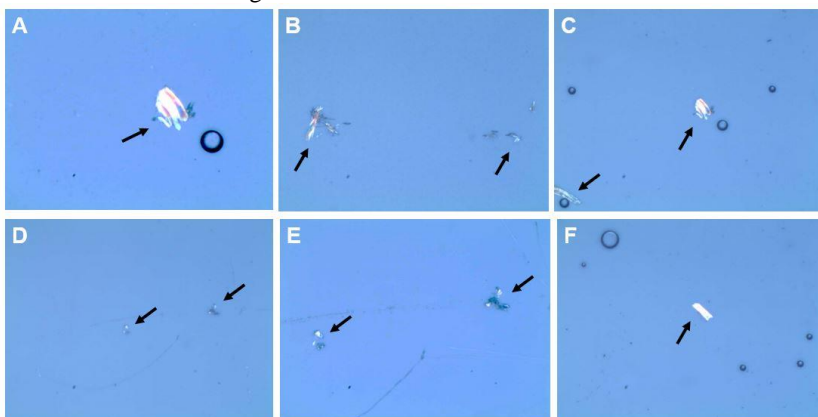
O polímero SOL, que apresentou grande aumento da solubilidade aparente da CC no meio tampão fosfato pH 6,8, não exerceu tanta influência sobre a solubilização da HCTZ amorfa neste meio. Estes resultados sugerem que a HCTZ pode ser menos sensível ao mecanismo de solubilização micelar que a CC, possivelmente em virtude de sua maior solubilidade aquosa e menor valor de logP. Assim, os polímeros inibidores de cristalização, como os polímeros derivados de celulose

(HPMC e HPMCAS), exerceram efeito mais significativo sobre a supersaturação da HCTZ, em comparação com o surfactante polimérico avaliado (SOL), como pode ser visualizado na Figura 10 e Tabela 5.

Assim como para o fármaco CC, todos os polímeros adicionados ao meio, nas diferentes concentrações testadas, promoveram supersaturação do fármaco em relação ao fármaco amorfo ( $p < 0,05$ ).

Ainda, as análises de MLP realizadas evidenciaram a presença de cristais birrefringentes no meio contendo todos os polímeros adicionados, assim como para o tampão fosfato pH 6,8 sem a adição de polímeros. As imagens de MLP obtidas para os estudos de supersaturação de HCTZ em tampão fosfato pH 6,8 encontram-se demonstradas na Figura 11.

Figura 11 - Imagens de MLP (aumento de 200x) do tampão fosfato pH 6,8 contendo os diferentes polímeros a 0,50% após 120 min de estudo de supersaturação *in vitro* para o fármaco HCTZ. A) fármaco amorfo; B) SOL; C) HPMCAS L; D) HPMCAS M; E) HPMCAS H e F) HPMC. As setas pretas indicam cristais birrefringentes.



### 3.3.5 Influência dos polímeros na supersaturação dos fármacos em FaSSIF

Os estudos de supersaturação *in vitro* dos fármacos em meio FaSSIF foram realizados com o objetivo de verificar o efeito antiprecipitante dos IPPs selecionados em meio biorrelevante.

A Figura 12 apresenta os perfis de supersaturação e resultados de AUC obtidos para o fármaco CC em meio FaSSIF e a Tabela 6 sumariza os resultados de  $IS_{120\text{min}}$ . Os dados da Tabela 6 estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Figura 12 - Perfis de supersaturação de CC e suas respectivas AUC em FaSSiF com diferentes polímeros. A) 0,10%; B) 0,25% e C) 0,50%. \* representa resultados estatisticamente diferentes quando comparados ao meio sem a adição de polímeros ( $p < 0,05$ ).

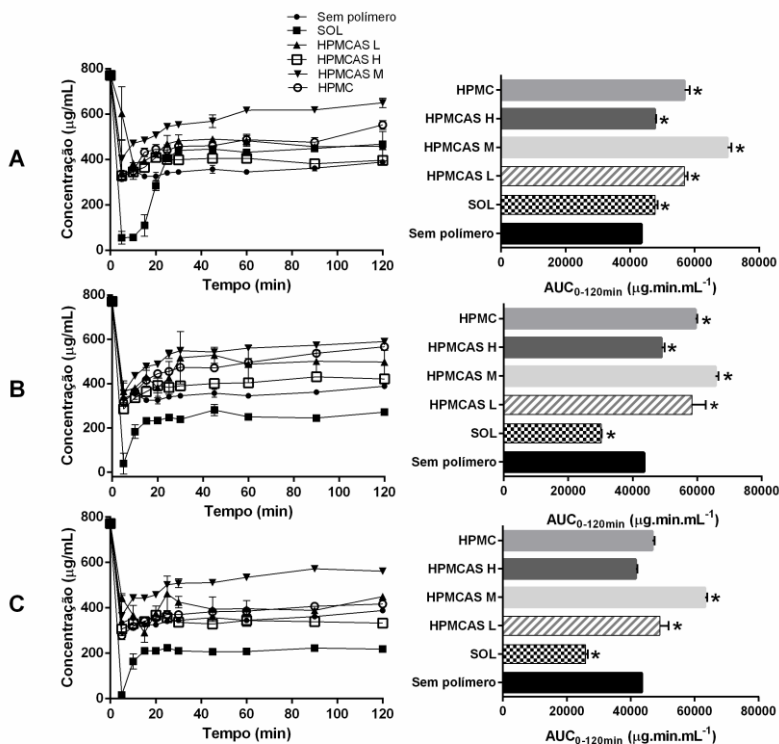


Tabela 6 - Dados de  $IS_{120min}$  obtidos para o fármaco CC nos diferentes polímeros e concentrações testadas em meio FaSSiF

Polímero	$IS_{120min}$		
	0,10%	0,25%	0,50%
HPMC	71,60 ± 2,52	73,52 ± 0,48	54,05 ± 0,42
HPMCAS L	59,46 ± 8,35	64,54 ± 6,86	58,30 ± 1,15
HPMCAS M	84,27 ± 2,65	76,47 ± 0,95	72,88 ± 0,76
HPMCAS H	51,41 ± 0,98	54,60 ± 1,58	43,16 ± 0,53
SOL	60,68 ± 2,00	35,24 ± 1,10	28,32 ± 0,48

De fato, os resultados obtidos no meio biorrelevante para o fármaco CC foram consideravelmente diferentes daqueles obtidos em meio tampão fosfato pH 6,8. Em meio FaSSIF, observou-se que o efeito solubilizante do polímero SOL sobre este fármaco foi drasticamente diminuído no meio biorrelevante, como demonstram os valores de AUC e IS120min na Figura 12 e Tabela 6, respectivamente.

Estudos recentes reportaram ocorrência de interação entre os prótons da unidade de repetição polietilenoglicol do polímero SOL e a carga negativa do surfactante laurilsulfato de sódio, formando um complexo que propiciou tanto o incremento (XIA *et al.*, 2016) quanto o decaimento (THIRY *et al.*, 2016) da dissolução de fármacos pouco solúveis. A lecitina e o taurocolato de sódio presentes em FaSSIF possuem estruturas anfífilas comparáveis à do laurilsulfato de sódio, que podem interagir com o SOL da mesma maneira, afetando sua performance (THIRY *et al.*, 2016).

Esta potencial interação pode ter sido responsável pelo decaimento da solubilização da CC em FaSSIF, o que resultou em valores de AUC menores do que aquele obtido para o meio sem a adição de polímeros quando SOL se encontrava presente neste meio a 0,25% e 0,50%.

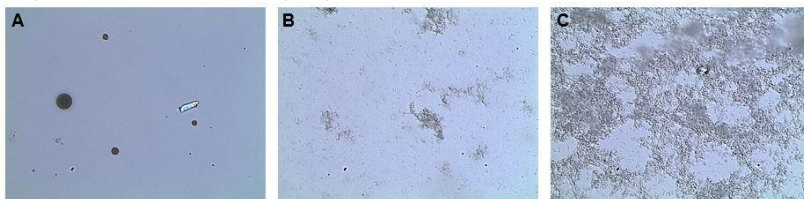
Ainda, um outro indicativo da ocorrência de tal interação são os resultados de solubilidade em equilíbrio obtidos para o fármaco. Enquanto a solubilidade da CC em FaSSIF contendo 0,10% de SOL não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao meio sem polímero, esta mesma concentração de SOL em tampão fosfato pH 6,8 demonstrou um incremento de cerca de 3,5 vezes na solubilidade em equilíbrio do fármaco. A 0,50%, SOL aumentou a solubilidade da CC em FaSSIF cerca de 2,4 vezes, enquanto em tampão fosfato pH 6,8 este aumento foi de aproximadamente 9,5 vezes. Estes resultados também indicam a possível interação entre o SOL e os sais biliares, que afeta a solubilização da CC.

A Figura 13 ilustra as imagens de MLP obtidas para o meio FaSSIF sem a adição de polímeros e com a adição de 0,10% e 0,50% (m/v) de SOL após 120 min de teste.

As análises de MLP demonstraram que as estruturas arredondadas não-birrefringentes observadas em FaSSIF sem adição de polímeros não estavam presentes quando SOL foi adicionado ao mesmo. Neste caso, o precipitado remanescente apresentou característica majoritária de aglomerados não-birrefringentes, relativamente semelhantes aos obtidos no meio tampão fosfato pH 6,8 sem adição de polímeros, porém mais abundantes. Também foi possível visualizar que a quantidade destes

precipitados aumentou a medida que a quantidade de SOL dissolvida no meio foi aumentada.

Figura 13 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) do meio FaSSIF sem e com a adição de SOL, aos 120 min de teste. A) FaSSIF, B) FaSSIF + 0,10% SOL (m/v), e C) FaSSIF + 0,50% SOL (m/v)



Ainda, análises de DLS demonstraram alteração no tamanho das micelas presentes em FaSSIF quando SOL foi adicionado a este meio, conforme ilustra a Tabela 7, o que representa mais um indício da ocorrência de interação entre o SOL e os componentes do meio biorelevante FaSSIF, afetando a solubilização do fármaco CC neste meio.

Tabela 7 - Diâmetro médio das micelas em solução determinadas por DLS

<i>Amostras</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>
FaSSIF	9,24
FaSSIF + CC	38,94
FaSSIF + 0,25% SOL	68,76
FaSSIF + 0,25% SOL + CC	169,76
Tampão fosfato de sódio pH 6,5 + 0,25% SOL	63,02
Tampão fosfato de sódio pH 6,5 + 0,25% SOL + CC	215,34

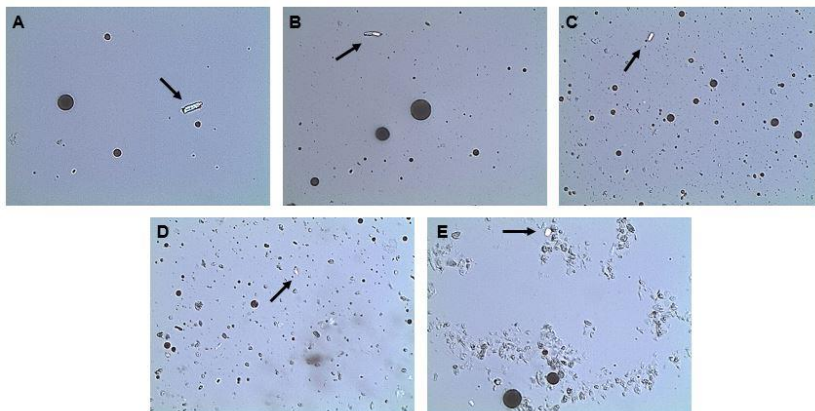
A performance antiprecipitante do polímero HPMC foi consideravelmente melhorada em FaSSIF, como pode ser observado pelos valores de AUC e os perfis de supersaturação obtidos. Aos 120 min de teste, a concentração de CC no meio biorrelevante contendo 0,10% e 0,25% de HPMC foi de aproximadamente 552 e 567  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, enquanto em FaSSIF contendo 0,50% esta concentração foi de 417  $\mu\text{g/mL}$ . Estes dados representam supersaturação considerável para as menores concentrações de HPMC, uma vez que a concentração do fármaco obtida em FaSSIF sem polímeros aos 120 min de teste foi de 388  $\mu\text{g/mL}$ .

O polímero HPMCAS M foi o que alcançou os maiores valores de AUC e  $IS_{120\text{min}}$  dentre os polímeros testados em FaSSIF, demonstrando boa performance anti-precipitante sobre a CC em ambos os meios testados. A menor concentração deste polímero atingiu o maior valor de AUC, assim como o maior  $IS_{120\text{min}}$ , conforme demonstrado na Figura 12 e Tabela 6, respectivamente. Também se observou que quanto menor a concentração de HPMCAS M em FaSSIF, maior o valor de AUC obtido.

Entretanto, os polímeros HPMCAS tipos L e H demonstraram pouca capacidade de inibição de precipitação da CC no meio biorrelevante, exibindo performance superior apenas ao polímero SOL.

As análises de MLP, ilustradas na Figura 14, demonstraram que as estruturas arredondadas visualizadas em FaSSIF sem a adição de polímeros permaneceram até 120 min de teste quando o polímero HPMCAS M foi adicionado a este meio em todas as concentrações testadas, o que possivelmente aumentou a solubilidade aparente da CC. Em todas as análises de MLP realizadas, cristais birrefringentes puderam ser detectados, assim como partículas não-birrefringentes.

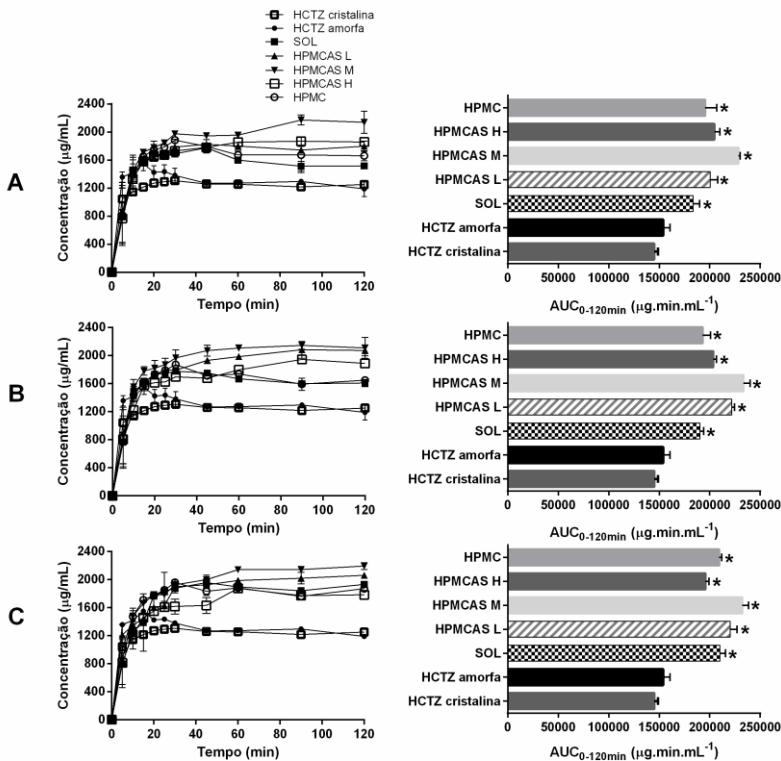
Figura 14 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) de FaSSIF sem e com a adição de polímeros a 0,50% (m/v), aos 120 min de teste dos estudos de supersaturação do fármaco CC. A) FaSSIF, B) FaSSIF + HPMC, C) FaSSIF + HPMCAS L, D) FaSSIF + HPMCAS M, e E) FaSSIF + HPMCAS H. As setas sólidas pretas indicam a presença de cristais birrefringentes.



Em contraste ao evidenciado para o fármaco CC, os estudos de supersaturação *in vitro* realizados para a HCTZ em meio FaSSIF não demonstraram diferenças tão significativas em relação ao meio tampão fosfato pH 6,8.

A Figura 15 apresenta os perfis de supersaturação e resultados de AUC obtidos para o fármaco HCTZ em meio FaSSIF.

Figura 15 - Perfis de supersaturação de HCTZ e suas respectivas AUC em FaSSIF com diferentes polímeros. A) 0,10%; B) 0,25% e C) 0,50%. \* representa resultados estatisticamente diferentes quando comparados ao fármaco amorfo em meio sem a adição de polímeros ( $p < 0,05$ ).



Os resultados de  $IS_{120min}$  obtidos para a HCTZ encontram-se demonstrados na Tabela 8. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Nos estudos realizados, observou-se diferença entre os resultados de AUC obtidos em meio tampão fosfato pH 6,8 e em meio FaSSIF para a HCTZ cristalina e amorfa. Enquanto em tampão estes valores foram estatisticamente diferentes, no meio FaSSIF, apesar do valor de AUC obtido para o fármaco amorfo ser superior ao obtido para o fármaco



cristalino, estes não demonstraram diferença estatística significativa. Este comportamento é explicado pelo maior valor de AUC obtido para o fármaco cristalino em comparação com o meio tampão pH 6,8, possivelmente em virtude da solubilização micelar do fármaco no meio biorrelevante. Ainda, em meio FaSSIF a HCTZ amorfa apresentou comportamento de precipitação ao longo do estudo de supersaturação, resultando em  $IS_{120min}$  inferior ao do próprio fármaco cristalino (Tabela 8), apesar de apresentar valor de AUC superior.

Tabela 8 - Dados de  $IS_{120min}$  obtidos para o fármaco HCTZ nos diferentes polímeros e concentrações testadas em meio FaSSIF

Polímero	$IS_{120min}$		
	0,10%	0,25%	0,50%
Sem polímero (HCTZ amorfa)	0,95 ± 0,09		
HPMC	1,33 ± 0,06	1,32 ± 0,04	1,50 ± 0,04
HPMCAS L	1,44 ± 0,06	1,66 ± 0,06	1,65 ± 0,02
HPMCAS M	1,71 ± 0,13	1,69 ± 0,12	1,75 ± 0,04
HPMCAS H	1,48 ± 0,05	1,51 ± 0,05	1,43 ± 0,02
SOL	1,21 ± 0,03	1,29 ± 0,04	1,54 ± 0,03

Como observado para o meio tampão fosfato pH 6,8, a adição dos polímeros nas diferentes concentrações testadas no meio biorrelevante promoveu aumento da AUC obtida em relação ao meio sem polímeros ( $p < 0,05$ ), bem como perfis de supersaturação consideravelmente semelhantes entre si foram obtidos com os diferentes polímeros, como demonstra a Figura 15.

O polímero HPMCAS tipo M também alcançou os maiores valores de AUC em meio biorrelevante dentre os polímeros estudados nas três concentrações testadas, enquanto que o polímero SOL obteve os menores valores de AUC, exceto para a concentração de 0,50%, o que demonstra certo efeito concentração dependente de SOL sobre a solubilidade da HCTZ, porém ainda enfatiza que os polímeros inibidores de cristalização são mais efetivos que os polímeros solubilizantes para manutenção da supersaturação deste fármaco, conforme observado para o meio tampão.

Cristais birrefringentes, assim como precipitados não birrefringentes foram observados nas análises de MLP para todos os estudos de supersaturação realizados no meio biorrelevante para a HCTZ, assim como para o estudo realizado com o fármaco amorfo no meio sem adição de polímeros.

### 3.3.6 A escolha do correador polimérico e considerações acerca da seleção dos meios para estudos de supersaturação *in vitro*

Com base nos dados de AUC obtidos nos estudos de supersaturação realizados, foi possível ordenar os polímeros testados por sua capacidade de inibição de precipitação dos fármacos modelo CC e HCTZ, conforme dados demonstrados nas Tabela 9 e Tabela 10 abaixo.

Tabela 9 - *Ranking* do potencial de inibição de precipitação dos polímeros sobre o fármaco CC em diferentes meios

Meio	% polímero	Potencial de inibição de precipitação
Tampão fosfato pH 6,8	0,10	HPMCAS M > HPMCAS H > HPMCAS L > HPMC
	0,25	HPMCAS M > HPMCAS H > HPMCAS L > HPMC
	0,50	HPMCAS M > HPMCAS H > HPMCAS L > HPMC
FaSSIF	0,10	HPMCAS M > HPMC > HPMCAS L > HPMCAS H
	0,25	HPMCAS M > HPMC > HPMCAS L > HPMCAS H
	0,50	HPMCAS M > HPMC > HPMCAS L > HPMCAS H

Tabela 10 - *Ranking* do potencial de inibição de precipitação dos polímeros sobre o fármaco HCTZ em diferentes meios

Meio	% polímero	Potencial de inibição de precipitação
Tampão fosfato pH 6,8	0,10	HPMCAS M > HPMCAS H > HPMCAS L > HPMC
	0,25	HPMCAS M > HPMCAS H > HPMCAS L > HPMC
	0,50	HPMCAS M > HPMCAS L > HPMCAS H > HPMC
FaSSIF	0,10	HPMCAS M > HPMCAS H > HPMCAS L > HPMC
	0,25	HPMCAS M > HPMCAS L > HPMCAS H > HPMC
	0,50	HPMCAS M > HPMCAS L > HPMC > HPMCAS H

Devido ao mecanismo de solubilização micelar promovido pelo polímero SOL, que possui uma concentração micelar crítica de 7,6 mg/L (BASF PHARMA INGREDIENTS & SERVICES, 2010), a concentração dos fármacos livres em solução foi reduzida, sobretudo para o fármaco CC, promovendo menor supersaturação dos mesmos, em virtude dos fármacos se encontrarem solubilizados em micelas. Desta forma, os dados de AUC obtidos nos estudos de supersaturação conduzidos nos meios contendo SOL não puderam ser comparados aos demais sistemas testados. Por esta razão, o polímero SOL não foi incluído na Tabela 9 e Tabela 10, assim como este não foi considerado um inibidor de precipitação promissor para os fármacos estudados.

O polímero HPMCAS tipo M apresentou boa atividade anti-precipitante para os fármacos HCTZ e CC em ambos os meios testados,

atingindo os maiores valores de AUC quando comparado aos demais polímeros, e foi capaz de manter a supersaturação pelos 120 min de teste. Assim sendo, este polímero foi considerado a melhor escolha de carreador polimérico para o desenvolvimento de DS dos fármacos CC e HCTZ.

O HPMCAS é considerado um polímero efetivo em iniciar e manter a supersaturação de vários fármacos com diferentes características físico-químicas (UEDA *et al.*, 2014b). Embora o mecanismo de estabilização polimérica das soluções supersaturadas não seja totalmente conhecido, a hidrofobicidade intermediária do HPMCAS e sua interação com os fármacos em estudo aparentam ser fatores chave para a sua performance como inibidor de precipitação da CC e HCTZ.

A literatura relata que polímeros muito hidrofílicos tendem a interagir com as moléculas do solvente, enquanto polímeros muito hidrofóbicos tendem a interagir preferencialmente com outras unidades monoméricas. Assim, polímeros com hidrofobicidade intermediária apresentam regiões hidrofóbicas capazes de interagir com os fármacos pouco solúveis, assim como possuem hidrofiliabilidade adequada para promover a solvatação em meio aquoso, sendo, portanto, mais efetivos como inibidores de precipitação (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016c; ILEVARE *et al.*, 2012; MOSQUERA-GIRALDO *et al.*, 2016; UEDA *et al.*, 2014a, 2014b).

O polímero HPMCAS tipo M é relatado como um polímero de média hidrofobicidade (ILEVBARE *et al.*, 2012; KLAR; URBANETZ, 2016) e, devido a esta característica, foi capaz de interagir favoravelmente com as moléculas dos fármacos HCTZ e CC, possivelmente adsorvendo na superfície dos cristais e prevenindo a incorporação de novas moléculas, atuando como um inibidor de crescimento de cristal (ILEVBARE *et al.*, 2012). A literatura também relata que este polímero é capaz de atuar como inibidor de cristalização mesmo em soluções micelares, como o meio FaSSIF (UEDA *et al.*, 2014b).

Nos experimentos realizados, também foi demonstrado que o meio utilizado nos estudos de supersaturação *in vitro* desempenha um importante papel nos resultados, assim como as características físico-químicas dos fármacos em estudo.

Os estudos conduzidos para a CC pelo método *solvent shift* demonstraram que o IS deve ser cuidadosamente selecionado, considerando a influência dos componentes particulares de cada meio e o seu potencial efeito na supersaturação dos fármacos. Nestes, foi claramente demonstrado que o IS selecionado para o meio tampão fosfato pH 6,8 não pode ser utilizado para o meio FaSSIF, sendo necessário um IS maior para o meio biorrelevante, de modo a se obter resultados

confiáveis a respeito da habilidade de inibição de precipitação dos polímeros testados. Assim, a utilização de um meio apropriado pode auxiliar na seleção de polímeros capazes de atingir e manter a supersaturação dos fármacos, assim como melhor predizer seu comportamento de supersaturação *in vivo*.

Para o fármaco HCTZ, não foram evidenciadas alterações significativas entre os dois meios estudados, possivelmente devido a maior solubilidade aquosa deste fármaco quando comparado à CC, assim como a sua maior tendência a recristalização em meio aquoso.

Ainda para a CC, todos os polímeros avaliados apresentaram performance anti-precipitante diminuída nas maiores concentrações testadas em meio FaSSIF. Este resultado sugere que a utilização de menores proporções de polímeros em DS deste fármaco pode ser capaz de atingir maior supersaturação e conseqüentemente favorecer a absorção fisiológica do fármaco. Já para o fármaco HCTZ, os resultados de AUC e IS120min obtidos para as diferentes concentrações testadas não se mostraram significativamente diferentes, apesar do *ranking* do potencial de inibição de precipitação dos polímeros em meio FaSSIF ter variado dentre as diferentes concentrações testadas.

Foi possível observar, sobretudo para a CC, que o aumento da AUC promovido pelos IPPs em meio FaSSIF foi menor que aquele visualizado em meio tampão fosfato pH 6,8, provavelmente devido ao efeito de solubilização micelar dos sais biliares. Assim, os altos valores de AUC alcançados em tampão fosfato pH 6,8 poderia superestimar a extensão do impacto dos polímeros na precipitação dos fármacos em estudo, fato que reforça a importância de se considerar a influência dos constituintes fisiológicos dos meios selecionados para condução dos estudos de supersaturação *in vitro*.

### 3.4 CONCLUSÃO

A seleção de potenciais carreadores poliméricos para obtenção de SDDS de fármacos pouco solúveis na forma de DS é um passo fundamental em seu desenvolvimento. Os polímeros podem agir como inibidores de precipitação e têm sido extensivamente aplicados para esta finalidade.

Diferentes polímeros foram testados com relação à sua capacidade de inibição de precipitação dos fármacos CC e HCTZ em dois diferentes meios, e o polímero HPMCAS tipo M foi selecionado como a melhor opção de carreador polimérico para compor DS destes fármacos, dentre os polímeros testados. Este é um polímero entérico derivado de celulose,

capaz de inibir a precipitação dos fármacos estudados, alcançando e mantendo seu estado de supersaturação em ambos os meios testados. Em contraste, o polímero SOL aparentemente formou complexos com os sais biliares presentes no meio biorrelevante FaSSIF, o que interferiu diretamente na solubilidade aparente do fármaco CC, enquanto que para o fármaco HCTZ a solubilidade aparente não foi consideravelmente afetada, apesar dos valores de AUC obtidos com o o polímero SOL se apresentarem, em geral, menor que as AUCs obtidas para os demais polímeros testados em meio biorrelevante.

O *ranking* dos polímeros conforme seu potencial de inibição de precipitação do fármaco CC foi completamente diferente entre os meios testados, sugerindo que o uso de meios não-biorrelevantes como o tampão fosfato pH 6,8 pode tanto superestimar ou reduzir a performance dos inibidores poliméricos de precipitação. Para este fármaco, o meio FaSSIF também demonstrou ser mais discriminativo para avaliar a habilidade de inibição de precipitação dos polímeros testados com relação à sua concentração adicionada aos meios.

Assim, o uso de meios biorrelevantes em estudos de supersaturação *in vitro* de fármacos pouco solúveis é recomendado, sobretudo para fármacos de alta lipofilicidade, de modo a guiar a seleção de carreadores poliméricos por prever as potenciais interações entre os IPPs e os componentes dos fluidos gastrointestinais. Como a disponibilidade dos fluidos gastrointestinais humanos é consideravelmente limitada, o uso de meios biorrelevantes comercialmente disponíveis é uma boa alternativa para condução dos estudos de supersaturação *in vitro*.



### Capítulo III

## **DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS DE CANDESARTANA CILEXETILA E HIDROCLOROTIAZIDA**

---





## 4 DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS DE CANDESARTANA CILEXETILA E HIDROCLOROTIAZIDA

### 4.1 INTRODUÇÃO

As DS constituem uma das mais bem sucedidas estratégias tecnológicas para o incremento das propriedades biofarmacêuticas de fármacos pouco solúveis (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016b).

A primeira aplicação destes sistemas visando o aumento da biodisponibilidade de fármacos foi reportada há mais de 50 anos e, na atualidade, o número de formulações baseadas em DS em estágio final de desenvolvimento ou em forma de produtos comercializados vem crescendo, em virtude de sua cinética de dissolução melhorada, baixa toxicidade, flexibilidade de dosagem e adequabilidade para administração por meio das formas farmacêuticas orais convencionais, como comprimidos e cápsulas (HE; HO, 2015).

As DS são capazes de promover o aumento da biodisponibilidade de fármacos pela manutenção de um estado de supersaturação no trato gastrointestinal (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009). Neste sentido, a seleção de carreadores poliméricos adequados exerce fundamental papel, visando a rápida dissolução e liberação do fármaco, a manutenção do estado supersaturado por tempo adequado para permitir sua absorção, bem como a manutenção do fármaco no estado amorfo durante seu armazenamento (HE; HO, 2015).

O carreador polimérico HPMCAS M foi selecionado com base em estudos de supersaturação *in vitro*, que demonstraram sua habilidade de geração e manutenção de supersaturação dos fármacos CC e HCTZ em meios compatíveis com os fluidos intestinais, dados já apresentados no capítulo anterior. No entanto, estes estudos por si só não são capazes de prover informações sobre a capacidade do polímero de formar DS com os fármacos em estudo, e qual a proporção fármaco/polímero ideal a ser aplicada.

Desta forma, o presente capítulo aborda o desenvolvimento de DS dos fármacos em estudo utilizando diferentes proporções de HPMCAS M, de modo a avaliar a efetividade da obtenção de DS amorfas, bem como determinar a proporção fármaco/polímero mais adequada para a geração e manutenção da supersaturação em meio aquoso da CC e HCTZ.

As DS desenvolvidas foram caracterizadas em estado sólido por técnicas diversas, assim como avaliadas em termos de rendimento, teor e capacidade de promoção e manutenção de supersaturação da CC sob condições não-*sink* em meio biorrelevante FaSSIF. Estudos de estabilidade físico-química das formulações mais promissoras selecionadas foram realizados com o objetivo de acompanhar a tendência de recristalização das DS desenvolvidas frente à diferentes condições de temperatura e umidade. Ainda, o efeito *in vivo* de bloqueio dos receptores de angiotensina II foi avaliado para a formulação mais promissora obtida para o fármaco CC. Esta formulação foi selecionada para condução de estudos farmacodinâmicos *in vivo* devido ao resultado expressivo de incremento de solubilidade e geração de supersaturação do fármaco verificados para a formulação selecionada.

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Materiais

As matérias-primas CC e HCTZ foram adquiridas do fornecedor Pharmanostra, provenientes dos fabricantes Xi'an Lyphar Biotech Co., Ltd/China e Suzhou Ausun Chemical Co., Ltd., respectivamente. O polímero HPMCAS M (AquaSolve<sup>®</sup>, pó fino) foi doado pelo fabricante Ashland. O meio biorrelevante FaSSIF foi adquirido do fabricante Biorelevant. A água ultrapura foi obtida através de sistema Milli-Q<sup>®</sup>. Todos os demais reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e/ou de grau CLAE.

### 4.2.2 Métodos

#### 4.2.2.1 Preparo das dispersões sólidas e misturas físicas

O preparo das DS de CC e HCTZ foi realizado pela técnica de moagem mecânica por moinho de esferas, e as composições das mesmas encontram-se descritas na Tabela 11. As misturas físicas (MF) foram preparadas respeitando a mesma composição das DS, e codificadas conforme Tabela 11.

Para a obtenção das DS de CC e HCTZ pela técnica selecionada, cada fármaco e o polímero HPMCAS M foram pesados nas proporções pré-definidas de modo a compor uma massa final de 4,0 g para o fármaco CC e 2,0 g para o fármaco HCTZ, e transferidos para jarros de aço inox

de capacidade de 125 mL de um moinho de esferas Retsch PM200 (Haan, Alemanha).

Tabela 11 - Composição das DS e misturas físicas

Formulação	Fármaco	Codificação	Proporção
			fármaco/HPMCAS M (% m/m)
DS	CC	CC10	10:90
		CC30	30:70
		CC50	50:50
		CC70	70:30
	HCTZ	HZ10	10:90
		HZ30	30:70
		HZ50	50:50
		HZ70	70:30
MF	CC	MFCC10	10:90
		MFCC30	30:70
		MFCC50	50:50
		MFCC70	70:30
	HCTZ	MFHZ10	10:90
		MFHZ30	30:70
		MFHZ50	50:50
		MFHZ70	70:30

Os materiais sólidos foram gentilmente misturados com auxílio de espátula por cerca de 1 minuto, e em seguida foram adicionadas três esferas de aço inoxidável de 10 mm de diâmetro a cada jarro, de modo que a razão esfera/pó se manteve em aproximadamente 25:1 (m/m) para as DS do fármaco CC e 50:1 (m/m) para o fármaco HCTZ.

O processo de moagem foi executado a 560 rpm por 2,5 h à temperatura ambiente, sendo estas condições definidas por meio de testes experimentais prévios de moagem realizadas com os fármacos cristalino.

Após sua obtenção, as DS foram acondicionadas em frascos ampola de vidro com tampa plástica, vedadas com filme Parafilm®, identificadas e armazenadas em geladeira à temperatura de 2,0 a 8,0°C, para posterior análise, que foi realizada em até uma semana após a produção das DS.

Amostras adicionais dos fármacos puros isolados foram obtidas sob as mesmas condições experimentais de moagem, sem a presença do polímero.

As proporções fármaco/polímero testadas foram sugeridas de modo contemplar amostras com alta e baixa concentração de polímero nas DS. Sabe-se que DS mais estáveis geralmente podem ser obtidas com maiores proporções de polímero em sua composição (GUO; SHALAEV; SMITH, 2013). Por este motivo, três formulações foram desenvolvidas com proporções de polímero de 50% (m/m) ou superiores. No entanto, visando avaliar formulações com maiores concentrações de fármaco, também foram propostas DS utilizando quantidade dos fármacos superior a 50% (m/m).

As misturas físicas (MF) foram preparadas por meio da pesagem dos fármacos e do polímero HPMCAS M nas proporções pré-definidas (quantidade final de 1,0g) seguida de simples mistura por espatulação por cerca de um minuto. As amostras obtidas foram acondicionadas em frascos ampola de vidro com tampa plástica, vedadas com filme Parafilm®, identificadas e armazenadas em geladeira à temperatura de 2,0 a 8,0°C, para posterior análise.

#### 4.2.2.2 Determinação do rendimento das dispersões sólidas

O rendimento final das DS foi calculado em porcentagem (m/m), por meio da realização da pesagem das DS obtidas e correlação com a massa inicial de 4,0 g para as DS de CC e de 2,0 g para as DS de HCTZ.

#### 4.2.2.3 Determinação do teor dos fármacos nas dispersões sólidas

O teor dos fármacos puros moídos e das DS obtidas foi determinado pelo método analítico por CLAE descrito no Capítulo 2, item 3.2.2.4.

Para tanto, as soluções amostra foram preparadas pesando individualmente, em balança microanalítica, massas dos fármacos puros moídos e DS equivalentes a cerca de 5,0 mg dos fármacos, e transferindo para balões volumétricos de 5 mL. Os materiais sólidos foram dissolvidos em aproximadamente 3,5 mL de acetonitrila, com auxílio de banho ultrassônico, e em seguida o volume foi completado com o mesmo solvente, de modo a obter soluções mãe das amostras com concentração de 1000 µg/mL.

Diluições adicionais foram realizadas de modo a obter soluções de concentração aproximada de 50 µg/mL para o fármaco CC e 100 µg/mL para o fármaco HCTZ.

Soluções padrão dos fármacos nas mesmas concentrações finais das soluções amostra foram preparadas com as matérias-primas cristalinas, conforme o procedimento descrito acima para as soluções amostra.

As soluções preparadas foram filtradas por filtros de seringa de poliamida com 0,45 µm de tamanho de poro (Chromaphil® Xtra), e injetadas em equipamento Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão). A solução padrão foi injetada em quintuplicata e sua área média foi considerada para a quantificação das soluções amostra. As soluções amostra foram injetadas em duplicata e suas áreas médias foram consideradas para os cálculos de teor.

O cálculo do teor das soluções amostra foi realizado utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ teor} = \frac{Aa \times Cp \times 100}{Ap \times Ca} \quad (4)$$

Onde Aa e Ap são as áreas médias obtidas para as soluções amostra e padrão, e Ca e Cp são as concentrações das soluções amostra e padrão, respectivamente.

#### 4.2.2.4 Caracterização em estado sólido

##### 4.2.2.4.1 Difração de raios X de pó

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

##### 4.2.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas DSC de aproximadamente 2,0 mg dos fármacos cristalinos, fármacos moídos e DS foram obtidas em célula Shimadzu DSC-60 utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados. A faixa de temperatura das análises foi de 30 a 200 °C para as amostras relativas ao fármaco CC e de 30 a 300 °C para as amostras relativas ao fármaco HCTZ, em uma única corrida, a uma razão de aquecimento de

10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> de 100 mL/min. O equipamento foi previamente calibrado com padrões de índio e zinco, e os dados obtidos foram processados em software TA-60.

#### 4.2.2.4.3 *Microscopia de Luz Polarizada*

As análises de MLP dos fármacos cristalinos, moídos, do polímero HPMCAS M e das DS produzidas foram realizadas utilizando Microscópio Olympus CX41RF equipado com analisador de luz transmitida (U-ANT) e polarizador de luz transmitida (U-POT) (Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

Para isso, pequena quantidade de pó foi transferida para lâminas de vidro, espalhadas e recobertas com auxílio de lamínula de vidro. As amostras foram avaliadas quanto à presença de cristais, por meio da observação visual da birrefringência dos cristais (quando presentes), em comparação com as regiões amorfas não-birrefringentes.

#### 4.2.2.4.4 *Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier*

Os espectros FTIR dos fármacos cristalinos, fármacos moídos, do polímero HPMCAS M, das MF e DS produzidas foram obtidos em equipamento PerkinElmer Frontier FT-IR, em uma faixa espectral de 600 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com uma média de 10 varreduras em resolução espectral de 4,0 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2.4.5 *Microscopia Eletrônica de Varredura*

A avaliação da morfologia das partículas dos fármacos cristalinos, fármacos moídos, do polímero HPMCAS M e das DS produzidas foram realizadas através da análise de fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura em microscópio Jeol modelo JSM6390LV, sob voltagem de aceleração de 10 kV, em diferentes aumentos. As amostras foram previamente preparadas pela fixação das mesmas em stubs de alumínio, por meio de fita adesiva dupla face de carbono, e recobrimento com ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD 500.

#### 4.2.2.5 Estudos de supersaturação *in vitro*

Os perfis de supersaturação *in vitro* dos fármacos moídos e das DS obtidas foram determinados em meio FaSSIF, uma vez que este se

mostrou mais apropriado para este tipo de avaliação, conforme descrito o Capítulo 2. Todos os estudos de supersaturação *in vitro* foram realizados em triplicata.

Para a condução dos estudos, frascos erlenmeyer de capacidade de 25 mL foram acomodados em incubadora Shaker Nova Técnica NT-715, e 10 mL de meio FaSSIF foram adicionados em cada frasco. A temperatura foi mantida a  $37,0 \pm 1,0$  °C, com agitação de 240 rpm, durante as 24 h de estudo.

Massas das DS equivalente a 7,71 mg de CC e a 100,0 mg de HCTZ foram individualmente pesadas e transferidas para os frascos erlenmeyer contendo o meio previamente aquecido. Estas massas foram definidas visando reproduzir as quantidades dos fármacos utilizadas para o meio FaSSIF nos estudos de supersaturação *in vitro* para seleção de polímeros (Capítulo 2). Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas e filtradas por filtros de seringa de poliamida com 0,45 µm de tamanho de poro (Chromaphil® Xtra) nos intervalos de tempo pré-determinados de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480 e 1440 min. As amostras foram imediatamente diluídas na proporção 1:10 (v/v) em acetonitrila, para prevenir qualquer cristalização adicional dos fármacos, e injetadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para análise da concentração de CC e HCTZ, conforme métodos descritos no Capítulo 2, item 3.2.2.4.

Os cálculos de AUC e as análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® 6. A análise de variâncias (ANOVA) fator único, seguida de teste de múltiplas comparações de Tukey foi empregada para comparar e testar a significância estatística dos valores de área sob as curvas (AUCs) obtidos nos experimentos de supersaturação *in vitro* para ambos os fármacos.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de probabilidade (p) foi inferior a 0,05 a um nível de confiança de 95%.

#### 4.2.2.6 Avaliação *in vivo* do antagonismo de receptores de Angiotensina II

O efeito antagonista dos receptores de angiotensina II promovido pela DS CC30 desenvolvida com o fármaco CC foi avaliado por meio de estudos farmacodinâmicos *in vivo* em comparação com o fármaco cristalino puro.

Dentre as DS desenvolvidas para ambos os fármacos avaliados neste trabalho, a DS CC30 foi selecionada em virtude do grande incremento de solubilidade proporcionado por esta formulação em

relação ao seu respectivo fármaco na sua forma cristalina, além da capacidade de manutenção deste estado de supersaturação por período prolongado promovido por esta formulação.

#### 4.2.2.6.1 *Preparo das amostras*

Para o preparo e administração das amostras, foi utilizado o kit Harvard Apparatus modelo PY2 72-4162 (Holliston, Massachusetts, Estados Unidos), composto por mini-cápsulas gelatinosas tamanho 9 (2,65 mm de diâmetro externo, 8,6 mm de largura e capacidade para 25 mg ou 25  $\mu$ L), seringa dosadora e funil para preenchimento das cápsulas.

Amostras de CC cristalina e DS CC30 foram acondicionadas nas mini-cápsulas por auxílio do funil de enchimento, de modo que cada cápsula contivesse dose do fármaco equivalente a 0,7 mg/Kg de peso dos animais.

Devido a baixa massa a ser pesada para o fármaco cristalino puro, o mesmo foi diluído em lactose monohidratada na proporção de 1:9 (p/p) por meio de simples mistura com auxílio de gral e pistilo de porcelana, enquanto a DS CC30 foi pesada e acondicionada diretamente nas cápsulas, sem diluição prévia.

Cápsulas contendo apenas o diluente lactose monohidratada, denominadas neste estudo como *controle*, também foram preparadas e administradas aos animais, a fim de avaliar a interferência deste nos resultados dos experimentos.

#### 4.2.2.6.2 *Animais*

Ratos da linhagem *Wistar* adultos, machos, de 3 meses de idade, pesando entre 200 a 300g, foram mantidos em ambiente com temperatura ( $21 \pm 2^\circ$  C) e ciclo de claro/escuro (12/12h) controlados automaticamente, com livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento.

Os animais foram ambientalizados no laboratório experimental por aproximadamente 1 hora antes dos procedimentos.

Todos os procedimentos encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA nº 1037091017).

#### 4.2.2.6.3 *Protocolo experimental para avaliação da variação de pressão arterial e fluxo sanguíneo renal*

Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos de 5 animais cada. O grupo 1 recebeu as mini-cápsulas contendo o fármaco CC



cristalino, o grupo 2 recebeu a formulação DS CC30 e o grupo 3 recebeu as mini-cápsulas contendo apenas o diluente (grupo controle).

Imediatamente após a administração das cápsulas, cada animal recebeu 200  $\mu$ L de água destilada e em seguida foram anestesiados com solução de quetamina (75 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), por via intramuscular.

Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35 e 36°C). Após a localização da veia jugular direita, a mesma foi isolada e feito a inserção de uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Este acesso venoso teve por objetivo a administração do agente vasoconstritor angiotensina II.

A artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. Em seguida, a artéria teve seu fluxo sanguíneo temporariamente suprimido por compressão de uma pinça curva, para promover a inserção de um cateter de polietileno (Angiocath<sup>®</sup> número 19), devidamente heparinizado, o qual foi amarrado na artéria e conectado a um transdutor de pressão acoplado ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia).

Na sequência, foi realizada a tricotomia do abdômen dos animais e a antisepsia do local com álcool 70%. Realizou-se uma incisão longitudinal no flanco esquerdo do abdômen dos animais e, com auxílio de duas pinças, o intestino foi gentilmente movido permitindo a localização do rim esquerdo. Um sensor modelo VP1 foi inserido sob a superfície renal, sendo este sensor conectado ao laser Doppler de monitoramento de fluxo sanguíneo (moorVMS-LDF2, Moor Instruments, Inglaterra) e acoplado ao sistema PowerLab<sup>®</sup>. O sensor foi mantido fixo para evitar variações bruscas nos valores do fluxo. A incisão cirúrgica foi coberta com uma gaze embebida de solução salina estéril e após aproximadamente 10 min de estabilização, pode-se obter os valores basais do fluxo sanguíneo renal.

O experimento foi conduzido por 4 h, sendo os valores de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca e fluxo sanguíneo renal (FSR) registrados em um computador por meio de software de integração (ChartPro7<sup>®</sup>).

Após a administração oral das diferentes amostras, a reatividade vascular para antiangiotensina II foi avaliada por meio da resposta de pressão arterial e fluxo sanguíneo renal após administração de doses repetidas de angiotensina II a 10 pmol/Kg nos tempos de 0,5, 1, 2, 3 e 4 h.

Durante a condução dos experimentos, foi realizado reforço anestésico a cada 45 min ou quando observadas alterações na frequência

cardíaca e/ou pressão arterial, as quais estavam sendo monitoradas, bem como qualquer reflexo apresentado pelo animal. Este reforço anestésico foi realizado pela administração de um terço da dose anestésica inicial, por via intramuscular.

Ao final do procedimento, os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica.

#### 4.2.2.6.4 *Análise estatística*

A significância estatística dos resultados de variação de pressão arterial média e variação do fluxo sanguíneo renal obtidos entre os grupos foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de teste de Newman-Keuls.

A normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foram verificadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de probabilidade (p) foi inferior a 0,05, a um nível de confiança de 95%.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism<sup>®</sup> 6 (San Diego, EUA).

#### 4.2.2.7 Estudos de estabilidade

A estabilidade físico-química dos fármacos amorfos puros e das DS selecionadas foi avaliada sob diferentes condições de temperatura e umidade. As DS que apresentaram a melhor performance de geração e manutenção de supersaturação de cada um dos fármacos nos estudos de supersaturação *in vitro* realizados foram armazenadas por um período de 90 dias sob as seguintes condições ambientais:

- 4 °C/0% umidade relativa (UR), em geladeira;
- 30 °C/0% UR, em estufa marca Nova Ética;
- 30 °C/75% UR, em câmara climática marca Climus;
- 40 °C/75% UR, em câmara climática marca Mecalor.

As amostras armazenadas em geladeira e em estufa foram acondicionadas em frasco ampola de vidro fechados com tampa plástica e seladas com lacre de alumínio, de modo evitar o contato do material com qualquer umidade residual.

As amostras expostas à 75% de umidade relativa nas câmaras climáticas foram acondicionadas em placas de petri de vidro recobertas com filme de PVC perfurado.

Imediatamente após a sua produção, e nos tempos 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento nas condições ambientais definidas, as amostras foram analisadas por técnica de DRX para a avaliação da tendência de recristalização dos fármacos, conforme o método citado no item 4.2.2.4.1. As amostras relativas ao fármaco CC também foram analisadas por DSC para esta finalidade, conforme método descrito no item 4.2.2.4.2 deste Capítulo.

Análises de teor e estudos de supersaturação *in vitro* também foram conduzidas para as amostras de ambos os fármacos, conforme os métodos citados nos itens 4.2.2.3 e 4.2.2.5, respectivamente, no tempo inicial e após 90 dias de estudos de estabilidade.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Seleção da técnica de obtenção das dispersões sólidas

A técnica selecionada para a produção das DS de CC e de HCTZ foi a moagem mecânica por meio de moinho de esferas, devido à sua ampla aplicação, uma vez que teoricamente todo fármaco no estado sólido pode ser submetido ao processo de moagem, devido a rapidez e facilidade de condução do processo de moagem, aos altos rendimentos associados ao mesmo e ainda devido a ausência da utilização de solventes orgânicos (LOH; SAMANTA; SIA HENG, 2014).

Ainda, as características físico-químicas dos fármacos em estudo inviabilizaram a obtenção das DS por outras técnicas comumente aplicadas para esta finalidade.

O fármaco CC apresenta instabilidade térmica, com o comportamento característico de degradação após fusão (MATSUNAGA *et al.*, 1999), o que impossibilitou o uso de técnicas por fusão como o *quench cooling* ou *hot melt extrusion*. Já o fármaco HCTZ apresenta um alto ponto de fusão, em cerca de 270 °C, e comportamento de degradação imediatamente após a sua fusão (AGEN, 1996). O alto ponto de fusão da HCTZ requer utilização de temperaturas acima da temperatura de degradação do polímero HPMCAS M (258 °C a 276 °C) (ASHLAND INC., 2016) para obtenção das DS por métodos de fusão, o que também inviabilizou a sua execução. Ainda, como a solubilidade aquosa os fármacos em estudo são baixas, este fato dificulta a utilização de técnicas

de solubilização em solventes polares, p.ex. *spray drying* sem *looping* inerte.

### 4.3.2 Rendimentos do processo e teor dos fármacos

Os resultados relativos ao rendimento das DS desenvolvidas encontram-se descritos na Tabela 12.

Após a sua produção, todas as DS se apresentaram como pós soltos e finos, de coloração branca a levemente amarelada. Os rendimentos obtidos foram considerados satisfatórios, uma vez que praticamente todas as DS apresentaram valor de rendimento superior a 84,0%. As DS de HCTZ, que possuíam menor massa inicial, assim como as DS que possuíam maior proporção de fármaco (CC70 e HZ70) apresentaram menor rendimento, devido a maior aderência do pó às esferas e aos jarros do moinho e conseqüente dificuldade de recuperação ao final do processo.

Tabela 12 - Rendimentos das DS obtidas

DS	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Rendimento (%)
CC10	4,00	3,63	90,0
CC30		3,70	92,5
CC50		3,62	90,0
CC70		3,51	87,8
HZ10	2,00	1,75	87,5
HZ30		1,74	87,1
HZ50		1,76	87,9
HZ70		1,69	84,5

Os resultados de teor (%) obtidos para os fármacos puros moídos e para as DS produzidas encontram-se descritos na Tabela 13. Nas análises de teor realizadas, o coeficiente de variação (CV%) obtido entre as replicatas de injeção da solução padrão foi considerado adequado, sendo este inferior a 2,0% (BRASIL, 2010).

Como pode ser observado nos dados apresentados, os teores obtidos para as DS desenvolvidas, assim como para os fármacos puros moídos, se mostraram satisfatórios, uma vez que todos se encontram acima de 90,0%.

As variações observadas nestes valores de teor podem ser atribuídas às pequenas variações de pesagem dos materiais, ou eventuais pequenas perdas nos processos de mistura prévia de fármaco e polímero e transferência de pós.

Tabela 13 - Teores obtidos para as DS produzidas

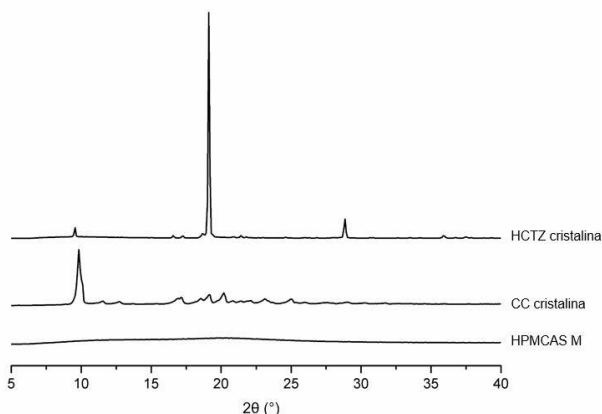
<b>Amostra</b>	<b>Teor de fármaco (%)</b>
CC moída	99,2
CC10	99,9
CC30	98,1
CC50	94,6
CC70	96,5
HCTZ moída	98,9
HZ10	94,4
HZ30	95,5
HZ50	94,7
HZ70	98,2

### 4.3.3 Caracterização no estado sólido

#### 4.3.3.1 Difração de raio X de pó

Os difratogramas referentes aos fármacos cristalinos e ao polímero HPMCAS M encontram-se ilustrados na Figura 16.

Figura 16 - Difratogramas referentes aos fármacos cristalinos e polímero HPMCAS M.



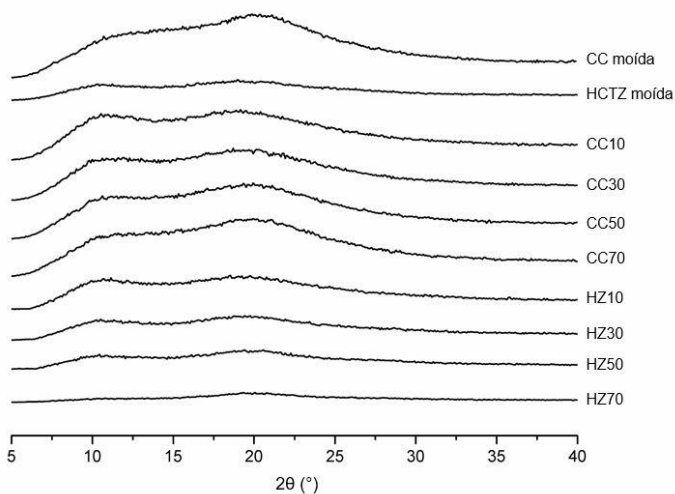
A análise de DRX da matéria-prima CC utilizada para o preparo das DS revela que esta exibe alto grau de cristalinidade. Suas reflexões em  $2\theta$  são evidenciadas nas posições  $9.82^\circ$ ,  $11.55^\circ$ ,  $12.74^\circ$ ,  $17.20^\circ$ ,  $18.57^\circ$ ,  $19.20^\circ$ ,  $20.20^\circ$ ,  $23.11^\circ$  e  $25.03^\circ$ , sendo a reflexão em  $9.82^\circ$  a mais intensa e característica, e a que possibilita a diferenciação das formas

polimórficas I e II deste fármaco. Esta reflexão confirma a natureza cristalina da matéria-prima utilizada neste estudo como sendo a forma polimórfica I, uma vez que na forma polimórfica II esta reflexão se apresentaria em cerca de  $7.28^\circ$ , conforme relatado da literatura (MATSUNAGA *et al.*, 1999).

A matéria-prima do fármaco HCTZ também exibiu alto grau de cristalinidade nas análises de DRX realizadas, com reflexões características em  $2\theta$  evidenciadas nas posições  $9.55^\circ$ ,  $19.11^\circ$  e  $28.85^\circ$ , em concordância com dados relatados em literatura científica para este fármaco (ACEVES-HERNÁNDEZ *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2017; PIRES; DOS SANTOS; SINISTERRA, 2011).

Os difratogramas relativos aos fármacos moídos e as DS obtidas para os fármacos CC e HCTZ encontram-se demonstrados na Figura 17.

Figura 17 - Difratogramas relativos às DS de CC e HCTZ



Os difratogramas obtidos para os fármacos CC e HCTZ moídos demonstraram que o processo de moagem resultou na obtenção de material amorfo para ambos. Esta amorfização é visualizada pela ausência de reflexões agudas e formação de halo característico de materiais amorfos nos difratogramas obtidos para os fármacos moídos.

A amorfização também foi observada para todas as DS desenvolvidas com o polímero HPMCAS M, tanto para o fármaco CC quanto para o fármaco HCTZ, em todas as proporções testadas. É importante enfatizar que, mesmo na menor proporção de polímero

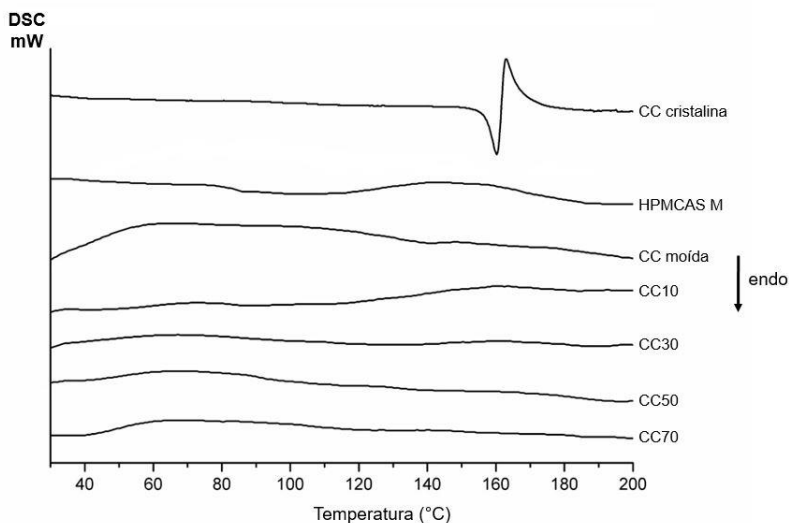
utilizada nas formulações, DS amorfas foram obtidas por meio do processo aplicado.

#### 4.3.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas DSC referentes à CC cristalina, CC moída, polímero HPMCAS M e DS de CC encontram-se demonstradas na Figura 18, enquanto as curvas DSC obtidas para a HCTZ cristalina, moída e para DS de HCTZ encontram-se ilustradas na Figura 19.

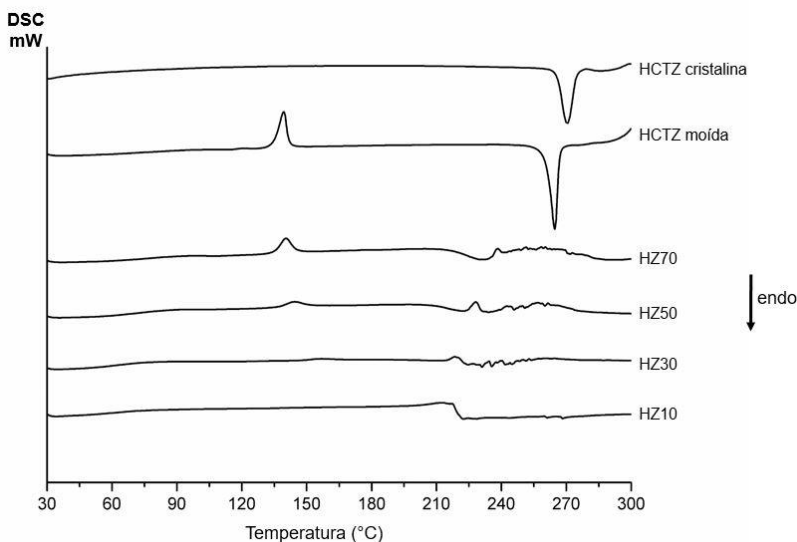
Como pode ser visualizado na Figura 18, a CC cristalina apresentou um único evento de fusão em 160,23 °C, seguido de evento exotérmico característico da decomposição do mesmo. Este perfil térmico caracteriza a matéria-prima como sendo composta pela forma polimórfica I (MATSUNAGA *et al.*, 1999).

Figura 18 - Curvas DSC referentes à CC cristalina, moída, polímero HPMCAS M e DS desenvolvidas.



O fármaco HCTZ cristalino (Figura 19), por sua vez, apresentou um evento endotérmico característico da fusão do fármaco em 269,76 °C, condizentes com as especificações e resultados relatados em literatura para este fármaco (BRASIL, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2016; USP, 2016).

Figura 19 - Curvas DSC referentes à HCTZ cristalina, moída e dispersões sólidas desenvolvidas.



O polímero HPMCAS tipo M é um polímero entérico de natureza amorfa, que possui uma temperatura de transição vítrea de aproximadamente 120 °C, e temperatura de decomposição de 267 °C (ASHLAND INC., 2016). A Figura 18 demonstra a curva DSC deste polímero, confirmando sua forma amorfa pela ausência de eventos de fusão.

Todas as DS de CC desenvolvidas demonstraram possuir natureza amorfa, confirmada pela ausência de qualquer evento de fusão nas curvas DSC obtidas, assim como a CC pura moída (Figura 18), ratificando os resultados das análises de DRX realizadas.

A curva DSC da HCTZ moída demonstrou um evento exotérmico abaixo da temperatura de decomposição do fármaco, em torno de 139 °C, seguido de evento endotérmico relativo à fusão do mesmo, em torno de 264 °C. O evento endotérmico visualizado é característico da recristalização do fármaco amorfo ocorrida mediante o aquecimento da amostra, o que explica a presença do evento de fusão do fármaco na curva DSC obtida (IONASHIRO, MASSAO; CAIRES, F. J.; GOMES, 2005).

Este perfil térmico com evento característico de recristalização também foi visualizado para as DS HZ70 e HZ50, que contem maior proporção do fármaco dentre as DS produzidas. Ainda, devido à temperatura de decomposição térmica do polímero HPMCAS M (267 °C)



ser muito próxima ao ponto de fusão do fármaco HCTZ, nas curvas DSC das DS deste fármaco, não foi possível verificar o evento de fusão decorrente da recristalização visualizada. Deste modo, a análise de DSC não foi considerada uma técnica conclusiva para avaliação da natureza do estado sólido das DS de HCTZ desenvolvidas. No entanto, como demonstrado nas análises de DRX realizadas, os difratogramas obtidos demonstram a característica amorfa destas amostras.

#### 4.3.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier

A técnica de FTIR é utilizada para detectar possíveis interações entre fármacos e polímeros, por meio de deslocamento, surgimento ou desaparecimento de bandas promovidos por estas interações (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016a).

Sabe-se que a miscibilidade do fármaco no sistema polimérico utilizado como carreador possui um efeito significativo tanto no incremento de solubilidade do fármaco quanto na formação de um sistema amorfo fisicamente estável. O termo miscibilidade aplicado a sistemas fármaco/polímero tem sido descrito como uma fase homogênea única na qual o fármaco e o polímero estão misturados a um nível molecular, e o sistema possui propriedades físicas diferentes daquelas dos componentes puros isolados (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016a; MENG; DAVE; CHAUHAN, 2015).

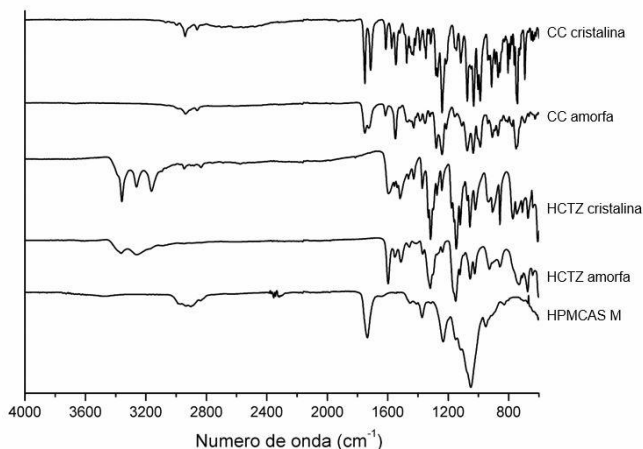
Ainda, combinações fármaco/polímero capazes de promover ligações de hidrogênio em solução são mais efetivas em prevenir a recristalização do fármaco, quando comparadas a sistemas sem estas interações, uma vez que a forte interação entre o fármaco e o polímero pode prevenir a associação das moléculas do fármaco, requerida para a formação de uma rede cristalina estável durante a cristalização do mesmo em meio aquoso (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016a).

Deste modo, análises de FTIR foram realizadas para os fármacos cristalinos e amorfos puros, o polímero HPMCAS M e para as DF e MF preparadas, com o objetivo de verificar a potencial interação dos fármacos em estudo com o polímero utilizado como carreador para as DS desenvolvidas. Na Figura 20 encontram-se ilustrados os espectros FTIR dos materiais de partida CC cristalina, HCTZ cristalina e HPMCAS M, assim como o espectro FTIR de ambos os fármacos moídos (amorfos).

O espectro FTIR obtido para a CC cristalina apresentou as bandas vibracionais características do fármaco em  $2940,90\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H aromático),  $2861,66\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H alifático),  $1751,23\text{ cm}^{-1}$  e

1718,21  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=O), 1612,66  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=N), 1546,25  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=C aromático) e 1281,49  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C-O de éster), confirmando a sua identidade, em conformidade com os relatos da literatura (BARBOSA, 2007; MATSUNAGA *et al.*, 1999; SURAMPALLI *et al.*, 2014; YUCE *et al.*, 2016).

Figura 20 - Espectros FTIR dos fármacos cristalinos, amorfos e polímero HPMCAS M



O espectro FTIR obtido para a HCTZ cristalina também demonstrou a presença das bandas características do fármaco em 3362, 3265 and 3169  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às ligações N-H das sulfonamidas primárias e secundárias. A banda na região de 1602  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída à sobreposição das bandas associadas a deformação das ligações C-C e C=C do anel aromático. As bandas localizadas em 1334, 1319 e 1165  $\text{cm}^{-1}$  foram associadas ao grupamento  $\text{SO}_2$  da sulfonamida e a banda localizada em 1123  $\text{cm}^{-1}$  foi relacionada ao anel heterocíclico  $\text{SO}_2$ , em conformidade com relatos da literatura para o fármaco (DE SOUZA *et al.*, 2017).

O espectro FTIR da CC amorfa demonstrou algumas modificações quando comparado ao espectro da CC cristalina, que compreenderam o alargamento e sobreposição de algumas bandas, como por exemplo as bandas características das carbonilas em 1751-1718  $\text{cm}^{-1}$ . No entanto, mudanças nas bandas referentes a esses grupamentos são esperadas, visto que a literatura relata que na CC amorfa, a banda vibração de estiramento de carbonila em 1718,21  $\text{cm}^{-1}$  é deslocada para uma posição média

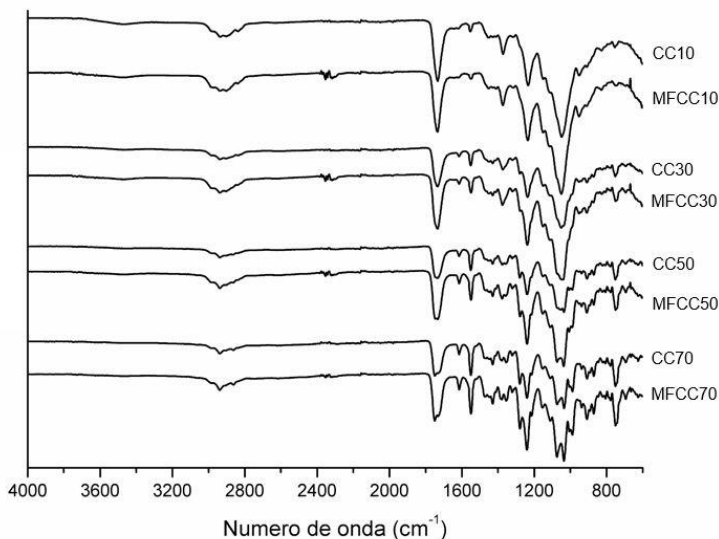
( $1723,06\text{ cm}^{-1}$ ) em relação às formas polimórficas I e II do fármaco, o que de fato ocorreu no espectro FTIR obtido (MATSUNAGA *et al.*, 1999).

Assim como para a CC, o espectro FTIR da HCTZ amorfa apresentou alterações em relação ao fármaco cristalino, com alargamento e sobreposição de bandas.

O espectro FTIR obtido para o polímero HPMCAS M se apresentou semelhante aos demonstrados em literatura, sendo a banda característica mais importante em  $1733,38\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração de estiramento de carbonila (AL-OBAIDI; BUCKTON, 2009; TANNO *et al.*, 2004).

A Figura 21 e Figura 22 exibem os espectros FTIR das misturas físicas e DS de CC e de HCTZ produzidas com o carreador polimérico HPMCAS M.

Figura 21 - Espectros FTIR das DS e MF de CC

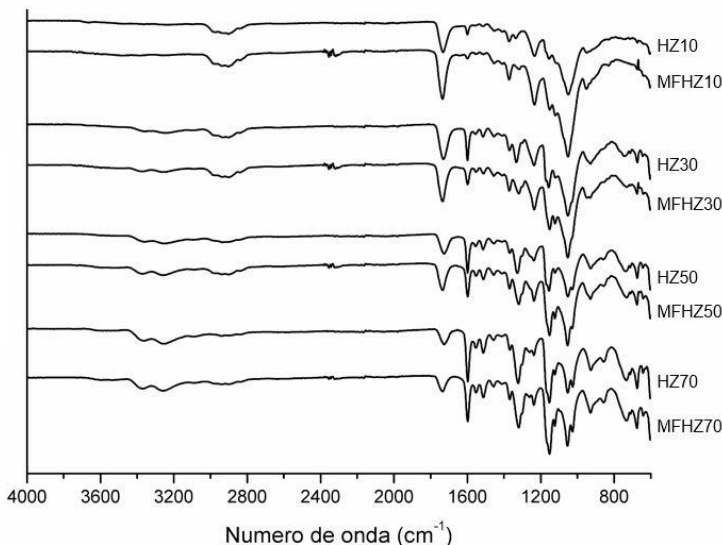


A interpretação dos espectros FTIR das formulações desenvolvidas foi realizada correlacionando os espectros das MF com os espectros das DS obtidas, de modo a verificar a ocorrência de interações químicas entre o fármaco e o carreador polimérico, por meio de deslocamento de bandas nos espectros das DS.

Nas análises realizadas, os espectros obtidos apresentaram apenas sobreposição das bandas referentes aos fármacos e ao polímero HPMCAS

M, sem deslocamentos significativos nas bandas de interesse, o que sugere a ausência de interações químicas entre as substâncias em estado sólido.

Figura 22 - Espectros FTIR das DS e MF de HCTZ



#### 4.3.3.4 Microscopia de Luz Polarizada

As figuras abaixo ilustram as imagens de MLP obtidas para as matérias-primas CC e HCTZ cristalinas e moídas (Figura 23), assim como para o polímero HPMCAS M (Figura 24).

As análises de MLP realizadas, técnica esta considerada de escolha para avaliação qualitativa da cristalinidade de amostras (GUO; SHALAEV; SMITH, 2013; THAKRAL *et al.*, 2016), comprovaram a natureza cristalina dos fármacos antes da moagem, bem como sua amorfização após este processo.

A presença de material cristalino é detectada pela birrefringência visualizada na Figura 23 A e C, resultando na visualização de cristais coloridos sob a luz polarizada. Já o material amorfo é caracterizado pela ausência de birrefringência, apresentando-se como pontos pretos sob a luz polarizada, como se apresentaram os fármacos após o processo de moagem (Figura 23 B e D). Esta análise também demonstrou a

característica amorfa do polímero HPMCAS M, carreador polimérico utilizado para compor as DS de CC e HCTZ (Figura 24).

Figura 23 - Imagens de MLP (aumento de 40x) dos fármacos cristalinos e moídos. A) CC cristalina, B) CC moída, C) HCTZ cristalina e D) HCTZ moída

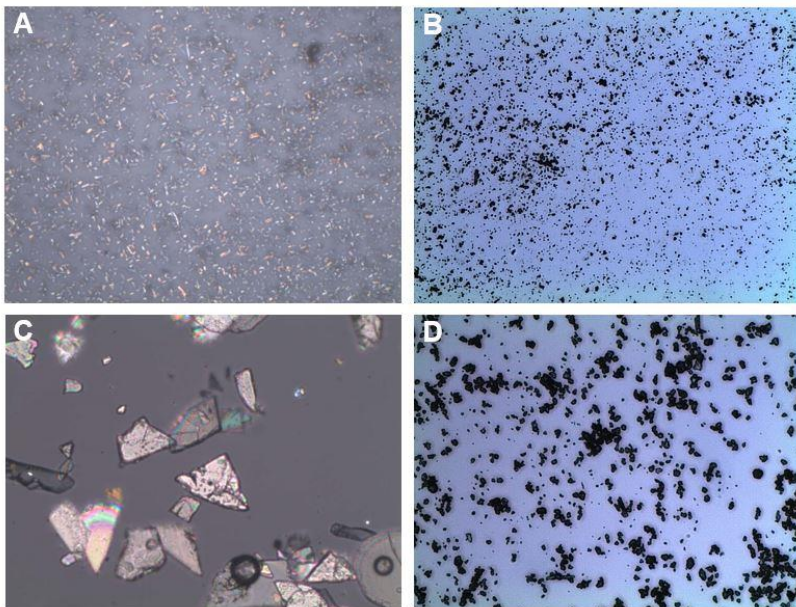
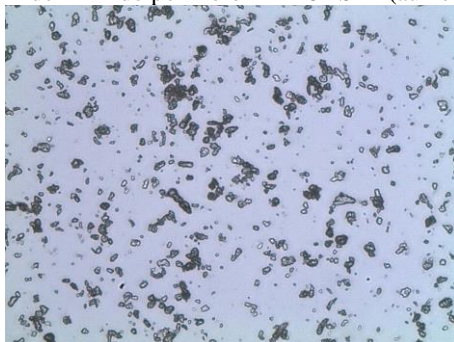


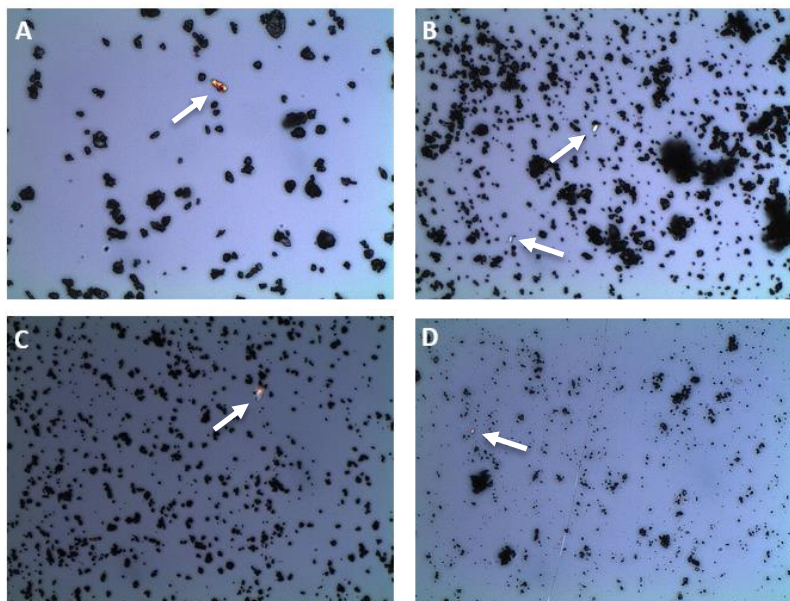
Figura 24 - Imagem de MLP do polímero HPMCAS M (aumento de 40x)



Nas imagens de MLP obtidas para as DS, pode-se observar que estas apresentaram característica predominantemente amorfa. No entanto, pequenos cristais birrefringentes puderam ser visualizados em todas as

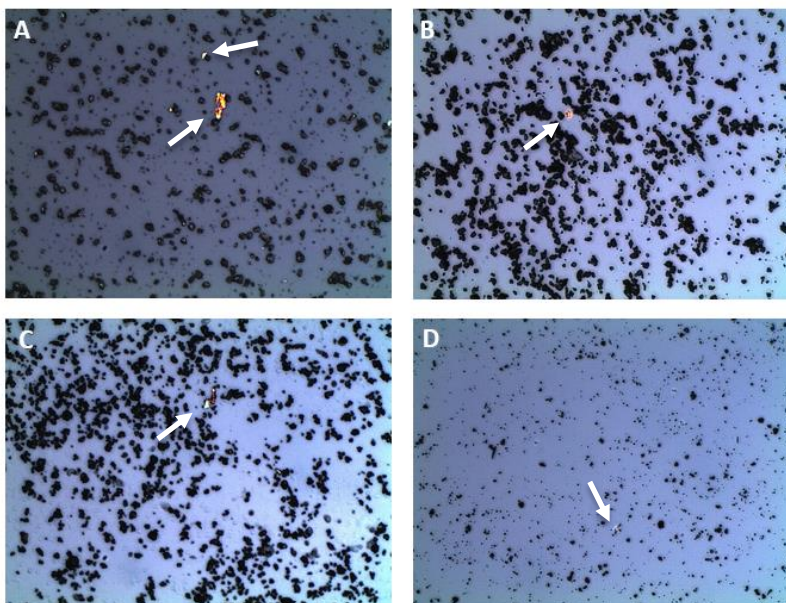
DS produzidas, tanto para o fármaco CC (Figura 25) quanto para o fármaco HCTZ (Figura 26), em quantidade ínfima quando comparada ao material amorfo, não sendo inclusive detectados pelas técnicas de DRX e DSC, e não influenciando significativamente na natureza amorfa das DS desenvolvidas.

Figura 25 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) das DS de CC. A) CC10, B) CC30, C) CC50, e D) CC70. As setas sólidas brancas indicam a presença de cristais birrefringentes.



Todavia, este é um resultado importante, uma vez que a presença de pequenos cristais no material amorfo pode atuar como “semente” e induzir e/ou acelerar o processo de recristalização do fármaco nas DS (VAN EERDENBRUGH; BAIRD; TAYLOR, 2010). Estudos de estabilidade física sob diferentes condições ambientais são utilizados como ferramenta para a avaliação desta potencial recristalização de DS amorfas.

Figura 26 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) das DS de HCTZ. A) HZ10, B) HZ30, C) HZ50 e D) HZ70. As setas sólidas brancas indicam a presença de cristais birrefringentes.



#### 4.3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias dos fármacos cristalinos e moídos encontram-se ilustradas na Figura 27, e a fotomicrografia do polímero HPMCAS M encontra-se demonstrada na Figura 28.

Conforme observado na Figura 27, as matérias-primas CC e HCTZ antes do processo de moagem possuem natureza claramente cristalina, como também evidenciado pelas análises de DRX, DSC e MLP. O fármaco CC se apresenta como pequenos cristais com aparência de escamas alongadas, enquanto a HCTZ se apresenta como cristais grandes e irregulares, com aparência de placas de superfície relativamente lisas. Fotomicrografias destes fármacos apresentando morfologias semelhantes às encontradas neste trabalho encontram-se relatadas na literatura (DE SOUZA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2012; NEKKANTI *et al.*, 2009, 2010; PIRES; DOS SANTOS; SINISTERRA, 2011; SAYYAD; TULSANKAR; KOLAP, 2013; VACULIKOVA *et al.*, 2016).

Ainda foi possível observar que o processo de moagem resultou na redução significativa do tamanho de partícula dos fármacos, quando

comparada ao fármaco cristalino, resultando em destruição de sua estrutura cristalina e consequente amorfização. Sob observação visual das fotomicrografias, é possível perceber que as partículas resultantes do processo realizado apresentaram tamanhos variáveis para ambos os fármacos. No entanto, não foi possível visualizar partículas com os formatos característicos dos cristais dos fármacos, mesmo nas partículas de maior tamanho.

Figura 27 - Fotomicrografias dos fármacos cristalinos e moídos. A) CC cristalina (1000x); B) CC moída (1000x); C) HCTZ cristalina (50x) e D) HCTZ moída (100x)

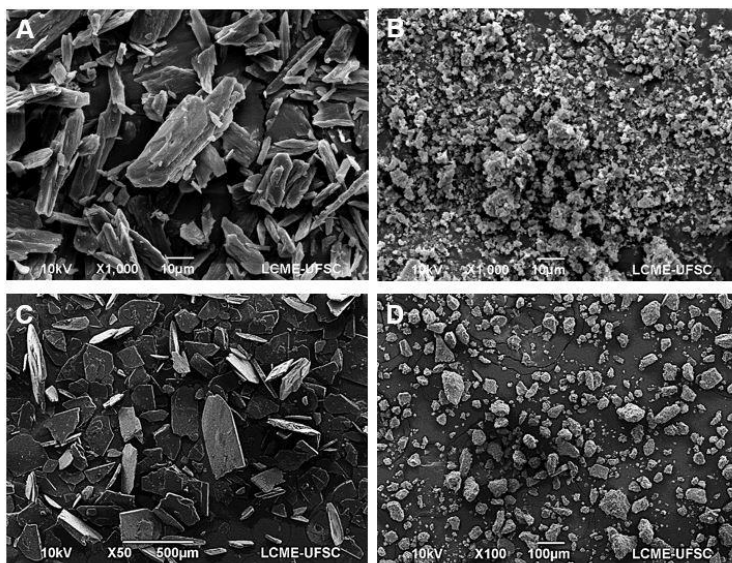
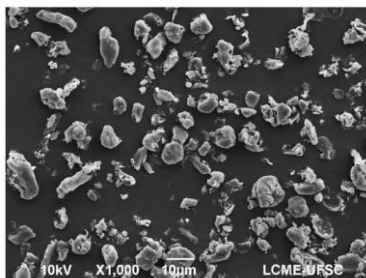


Figura 28 - Fotomicrografia do polímero HPMCAS M (1000x)





Segundo o fabricante Ashland, o polímero HPMCAS M apresenta-se como pequenas partículas arredondadas a alongadas, misturadas a aglomerados densos com diâmetro aproximado de 10  $\mu\text{m}$  (ASHLAND INC., 2016), morfologia que é consistente com os resultados deste trabalho, demonstrados na Figura 28.

A Figura 29 e Figura 30 ilustram as fotomicrografias das DS obtidas com fármacos CC e HCTZ com o carreador polimérico HPMCAS M. Como pode ser observado nestas figuras, todas as DS desenvolvidas apresentaram alterações morfológicas significativas em relação aos fármacos cristalinos, apresentando-se sob a forma de aglomerados de forma e superfície irregulares e tamanhos consideravelmente variáveis.

Nas análises realizadas, não foi visualizada claramente a presença de cristais característicos referentes aos fármacos nas amostras analisadas, indicando que os mesmos tiveram sua estrutura cristalina destruída durante o processo de moagem, bem como a proporção de fármaco/polímero (m/m) não pareceu influenciar na morfologia das DS obtidas, de modo que as formulações desenvolvidas para ambos os fármacos apresentaram aspecto semelhante.

Figura 29 - Fotomicrografias das DS de CC (1000x). A) CC10, B) CC30, C) CC50 e D) CC70.

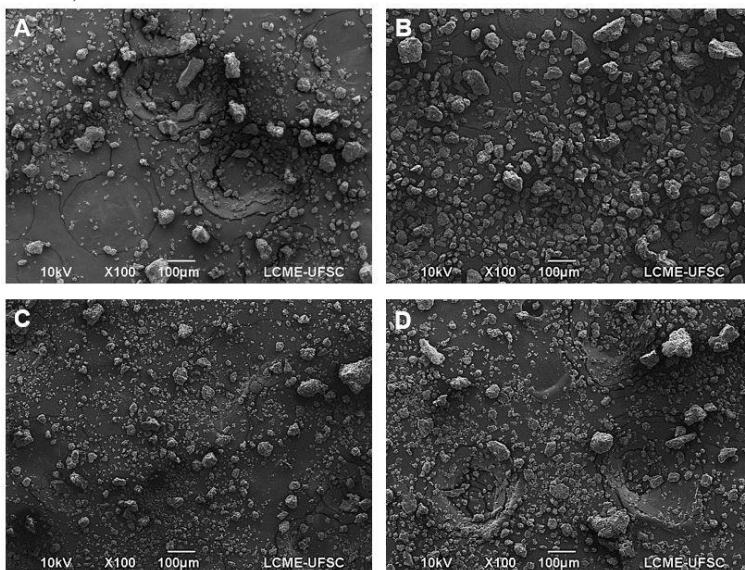
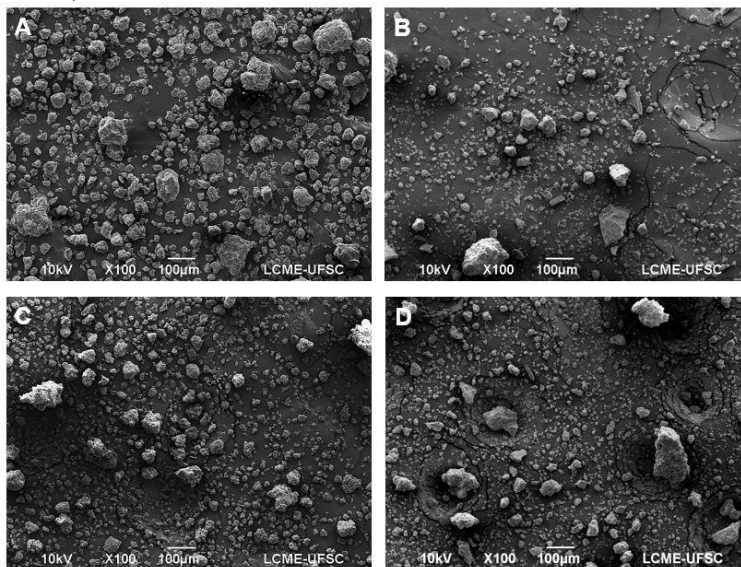


Figura 30 - Fotomicrografias das DS de HCTZ (100x). A) HZ10, B) HZ30, C) HZ50 e D) HZ70.



#### 4.3.4 Estudos de supersaturação *in vitro*

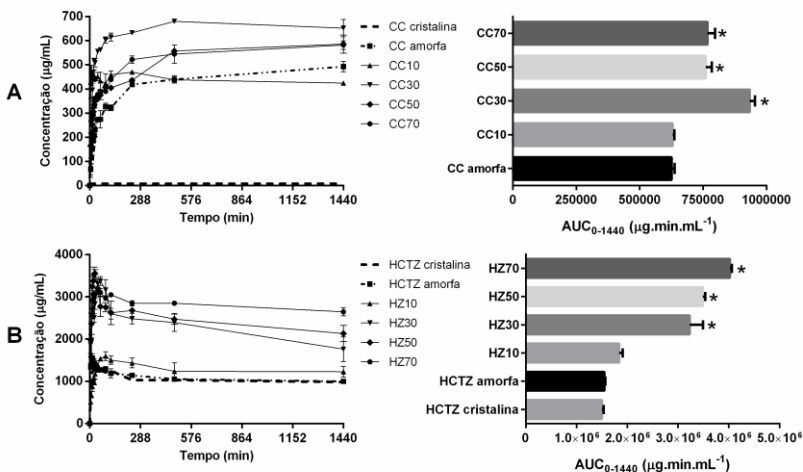
A Figura 31 demonstra os perfis de supersaturação *in vitro* obtidos em meio FaSSIF para os fármacos moídos (amorfos) e para as DS de CC e de HCTZ obtidas com o carreador polimérico HPMCAS M em diferentes proporções fármaco/polímero (m/m). A solubilidade em equilíbrio da CC cristalina, assim como o perfil de supersaturação da HCTZ cristalina neste meio também foram incluídas nos gráficos, para fins de comparação.

Inicialmente, é possível observar que a solubilidade aparente da CC amorfa é muitas vezes maior que a da CC cristalina. Enquanto este fármaco no estado cristalino possui uma solubilidade em equilíbrio de  $7,71 \pm 0,12$  ug/mL em FaSSIF, no tempo 24h do estudo de supersaturação utilizando a CC amorfa concentração obtida foi de  $492,63 \pm 21,71$  ug/mL, valor aproximadamente 64 vezes superior que sua solubilidade em equilíbrio.

Este resultado indica que a estratégia de amorfização da CC é extremamente útil para o incremento de sua solubilidade aparente em meio biorrelevante FaSSIF. De fato, sabe-se que materiais amorfos exibem maiores valores de solubilidade em relação aos seus homólogos

cristalinos, devido à sua alta mobilidade molecular e elevadas energias metaestáveis, o que justifica os resultados obtidos (TAYLOR; ZHANG, 2016)(HANCOCK; ZOGRAFI, 1997; KAWAKAMI, 2012).

Figura 31 - Perfis de supersaturação *in vitro* em meio FaSSIF das DS de CC e HCTZ desenvolvidas. \* representa resultados estatisticamente diferentes quando comparados aos respectivos fármacos amorfos ( $p < 0,05$ ).



No entanto, a estratégia de amorfização não se mostrou tão benéfica para o incremento de solubilidade do fármaco HCTZ. No estudo de supersaturação conduzido com a HCTZ cristalina em FaSSIF, a concentração máxima obtida foi de  $1,31 \pm 0,02$  mg/mL no tempo de 30 min. Para a HCTZ amorfa, a concentração máxima alcançada foi de apenas  $1,44 \pm 0,10$  mg/mL em 25 minutos do estudo de supersaturação *in vitro*. Adicionalmente, os valores de AUC obtidos para os perfis de supersaturação *in vitro* da HCTZ cristalina e HCTZ amorfa se mostraram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ).

Conforme demonstrado na Figura 31, é possível observar que praticamente todas as DS produzidas com o carreador polimérico HPMCAS M, para ambos os fármacos apresentaram supersaturação superior àquela promovida pelos fármacos amorfos, com exceção da DS HZ10, que apesar de apresentar valor de AUC superior ao obtido para a HCTZ amorfa, estes não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si ( $p > 0,05$ ).

Os valores de AUC obtidos para as formulações CC30, CC50, CC70, HZ30, HZ50 e HZ70 foram considerados significativamente superiores e estatisticamente diferentes daqueles apresentados pelos respectivos fármacos amorfos puros ( $p < 0,05$ ).

Sabe-se que a habilidade de gerar e manter supersaturação de misturas amorfas de fármaco e polímero é fortemente dependente tanto do tipo de polímero quanto da concentração do fármaco nas mesmas (SHAH *et al.*, 2014). Nos perfis de supersaturação obtidos para ambos os fármacos, destaca-se o fato de que as DS desenvolvidas com a maior proporção de polímero em relação ao fármaco (CC10 e HZ10) apresentaram os menores valores de AUC e conseqüentemente as menores extensões de supersaturação. De fato, os estudos de supersaturação conduzidos em meio FaSSIF para a seleção de carreadores poliméricos neste trabalho (Capítulo 2) evidenciaram que as maiores concentrações de polímero dissolvidos neste meio não proporcionaram a maior inibição de precipitação dos fármacos em questão, levando à conclusão de que o uso de altas concentrações deste polímero em DS dos mesmos poderia não ser tão benéfica com relação à extensão da supersaturação atingida.

Dentre as formulações testadas para cada fármaco, as DS CC30 e HZ70 promoveram as maiores extensões de supersaturação, evidenciadas pelos maiores valores de AUC apresentados. Adicionalmente, os perfis de supersaturação *in vitro* obtidos para estas formulações demonstram que a supersaturação da CC e da HCTZ foram mantidas por até 24 h em meio biorrelevante FaSSIF, o que é um dado significativo relevante, uma vez que formulações capazes de manter um estado de supersaturação de fármacos pouco solúveis por no mínimo 2 h são fisiologicamente relevantes, e representam formulações viáveis para serem investigadas *in vivo* (SHAH *et al.*, 2014).

#### **4.3.5 Avaliação *in vivo* do antagonismo dos receptores de Angiotensina II**

Os resultados obtidos para a variação da pressão arterial média e da variação do fluxo sanguíneo renal do fármaco CC cristalino e DS CC30 mediante a administração de angiotensina II são mostrados na Figura 32 e Figura 33, respectivamente.

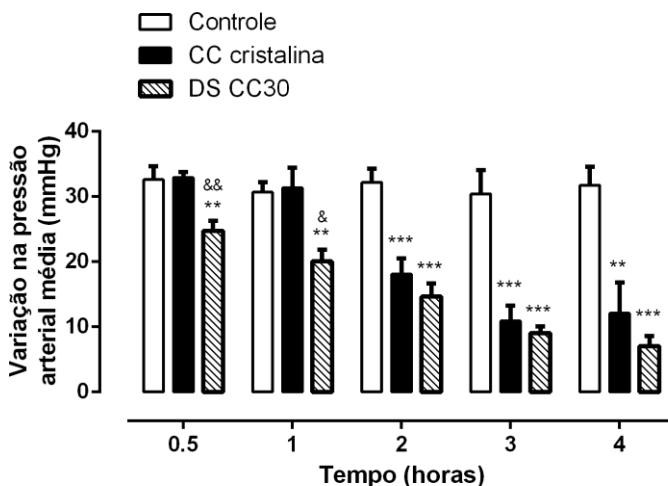
Os resultados obtidos nos experimentos realizados encontram-se apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, sendo estas condições

verificadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente.

O sistema renina-angiotensina, especialmente a angiotensina II, é envolvido na patogênese da hipertensão essencial e hipertensão renovascular. Na hipertensão essencial, a resistência vascular renal é rotineiramente aumentada e o fluxo sanguíneo renal, assim como a perfusão renal, é muitas vezes diminuído. Os antagonistas de receptor de angiotensina atuam interagindo seletivamente com receptores ATI, promovendo antagonismo competitivo e consequentemente reduzindo a vasoconstrição ocasionada pela angiotensina II, assim como aumentando a perfusão e taxa de filtração renal (BARRERAS; GURK-TURNER, 2003; SCHMIEDER, 2005).

Na Figura 32, é possível observar que a variação na pressão arterial média mediante a administração de angiotensina II nos diferentes tempos analisados para o grupo controle foi de cerca de 35 mmHg.

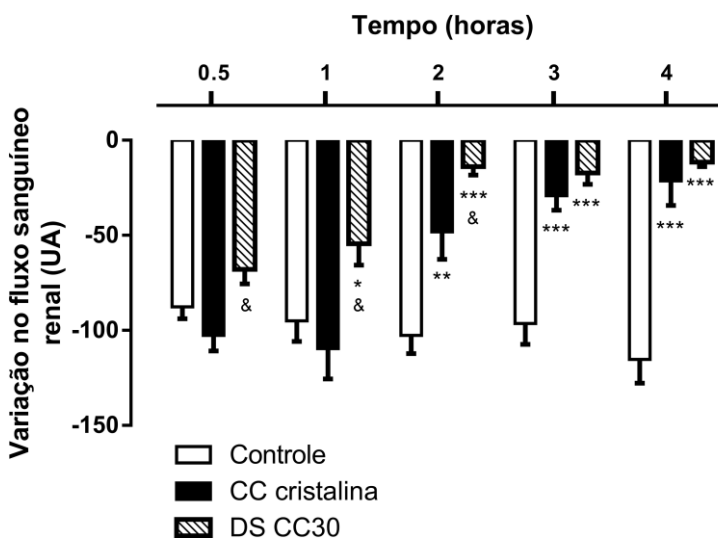
Figura 32 - Variação da pressão arterial média frente a administração da angiotensina II avaliada em diferentes tempos. Os símbolos \*\* e \*\*\* correspondem a  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, comparados ao grupo controle; & e && correspondem a  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, comparados ao grupo CC cristalina.



Para o grupo tratado com o fármaco CC cristalino, nos tempos de 0,5h e 1h, não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) na variação da pressão arterial média quando comparada ao grupo controle.

Porém, a partir de 2h de estudo, a variação deste parâmetro começou a ser diminuída, apresentando resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) daqueles obtidos com o grupo controle. No tempo de 4h, a variação da pressão arterial média diminuiu de cerca de 35 mmHg (grupo controle) para cerca de 15 mmHg para o grupo tratado com o fármaco CC cristalino.

Figura 33 - Variação do fluxo sanguíneo renal frente a administração de angiotensina II avaliada em diferentes tempos. Os símbolos \*, \*\* e \*\*\* correspondem a  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, comparados ao grupo controle; & corresponde a  $p < 0,05$  comparado ao grupo CC cristalina.



Para o grupo tratado com a DS CC30, logo nas primeiras administrações da solução de angiotensina II (0,5h e 1h), variação reduzida na pressão arterial média dos animais foi observada, demonstrando resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle e ao grupo tratado com a CC cristalina. Estes dados indicam um início de ação mais rápido atribuído à formulação DS30 quando comparada ao fármaco CC cristalino.

Ainda, ao longo de todo o experimento, a variação na pressão arterial média obtida para o grupo tratado com a DS desenvolvida foi menor que aquela obtida para o grupo tratado com a CC cristalina, indicando também um efeito aumentado da DS CC30 em relação ao fármaco cristalino.

Resultados semelhantes foram obtidos para a variação de fluxo sanguíneo renal (Figura 33), onde o grupo tratado com a formulação DS30 apresentou menor decaimento deste fluxo sanguíneo mediante a administração da solução de angiotensina II quando comparado com o grupo tratado com a CC cristalina pura, ao longo de todo o tempo do experimento.

Assim, verificou-se um potencial hipotensor aumentado da formulação CC30 desenvolvida em comparação com o fármaco CC cristalino puro, assim como início de ação mais rápido para esta formulação. Desta forma, foi possível observar que, como esperado, a geração e manutenção de supersaturação *in vitro* para o fármaco CC proporcionada pela formulação CC30 desenvolvida refletiu em efeito *in vivo* aumentado deste fármaco nos estudos farmacodinâmicos realizados.

#### 4.3.5 Estudos de estabilidade

Os sólidos amorfos são geralmente mais solúveis e se dissolvem mais rapidamente do que os seus homólogos cristalinos. No entanto, muitas vezes as DS demonstram baixa estabilidade química e física (KOU; ZHOU, 2014; WARREN *et al.*, 2010).

Neste sentido, estudos de estabilidade são importantes para determinar a influência dos fatores ambientais e condições de armazenamento, como temperatura e umidade, na tendência de recristalização e perfis de supersaturação *in vitro* destas formulações.

As DS CC30 e HZ70 foram as que obtiveram melhores resultados de geração e manutenção de supersaturação dos fármacos em estudo em meio FaSSIF, em comparação com as demais formulações desenvolvidas. Deste modo, estas foram selecionadas para a condução dos estudos de estabilidade, e os resultados obtidos encontram-se descritos nos itens abaixo. Estudos de estabilidade também foram conduzidos com os fármacos amorfos puros, para fins de comparação.

##### 4.3.5.1 Difração de raios X de pó

Os resultados obtidos para as análises de DRX realizadas sob as diferentes condições climáticas para o fármaco CC encontram-se demonstradas da Figura 34 a Figura 37. Os resultados obtidos de DRX para o fármaco HCTZ encontram-se demonstradas da Figura 38 a Figura 41.

Figura 34 - Difratoformas obtidos para a CC amorfa e DS CC30 armazenada a 4 °C/0% UR

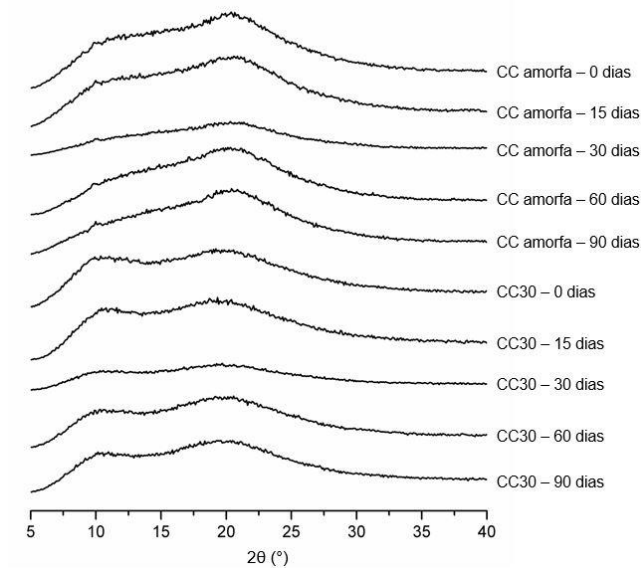


Figura 35 - Difratoformas obtidos para a CC amorfa e DS CC30 armazenada a 30 °C/0% UR

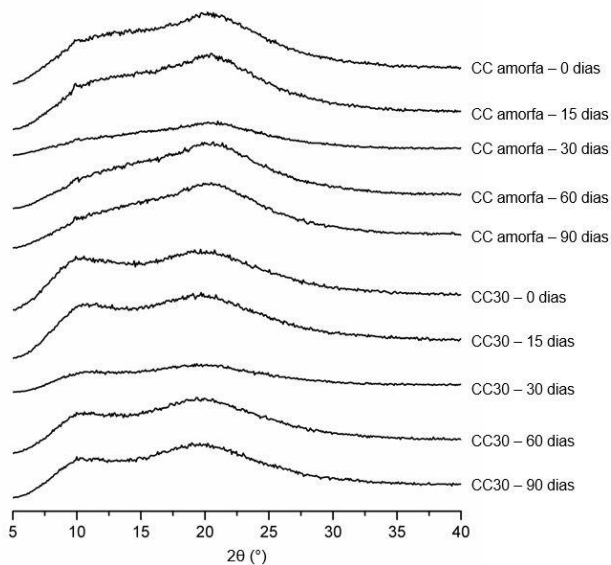




Figura 36 - Difratomogramas obtidos para a CC amorfa e DS CC30 armazenada a 30 °C/75% UR

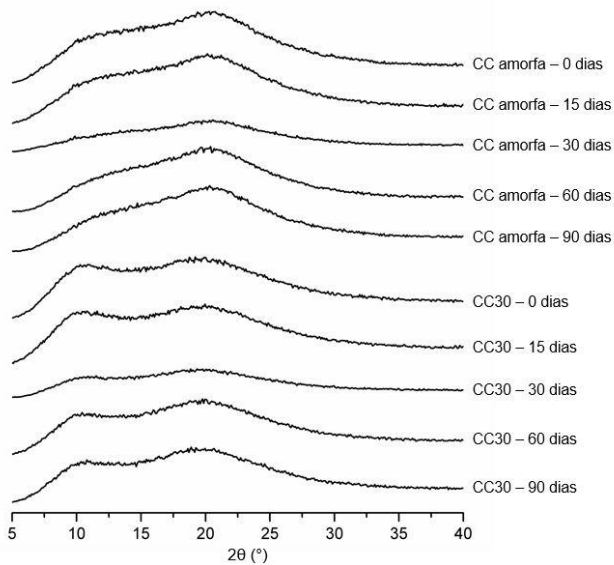


Figura 37 - Difratomogramas obtidos para a CC amorfa e DS CC30 armazenada a 40 °C/75% UR

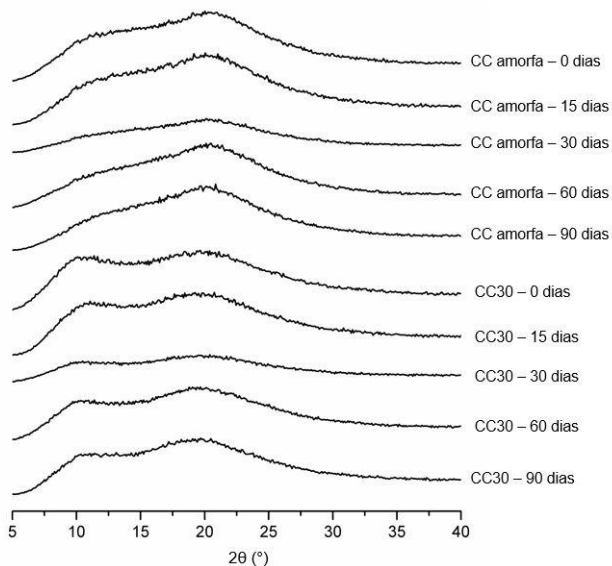


Figura 38 - Difratoogramas obtidos para a HCTZ amorfa e DS HZ70 armazenada a 4 °C/0% UR

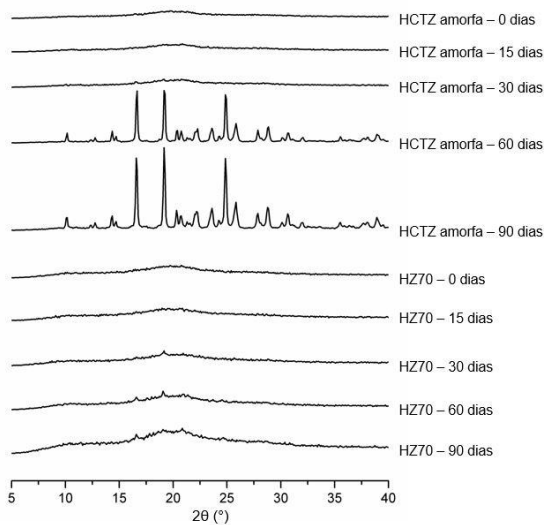


Figura 39 - Difratoogramas obtidos para a HCTZ amorfa e DS HZ70 armazenada a 30 °C/0% UR

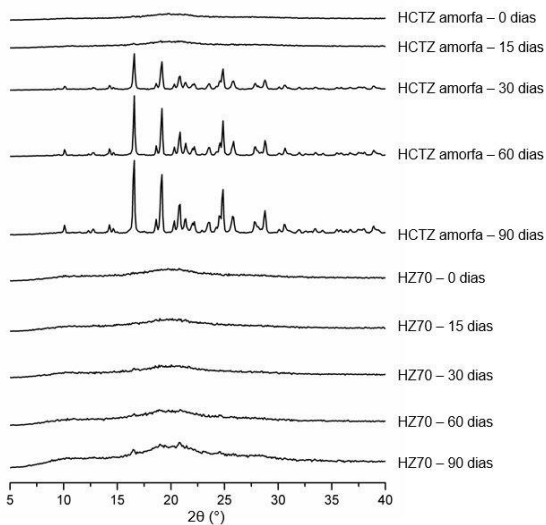


Figura 40 - Difratomogramas obtidos para a HCTZ amorfa e DS HZ70 armazenada a 30 °C/75% UR

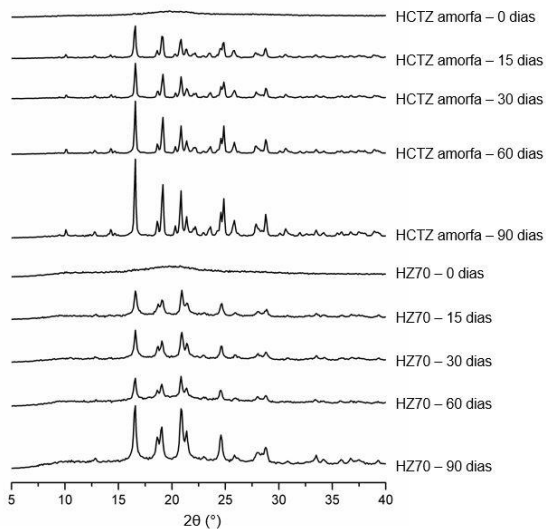
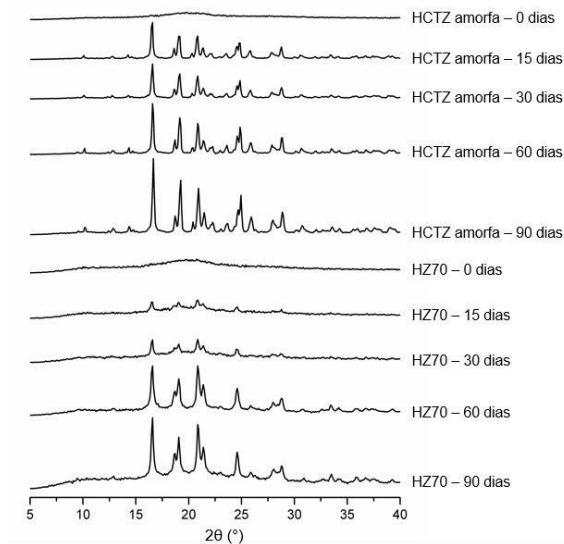


Figura 41 - Difratomogramas obtidos para a HCTZ amorfa e DS HZ70 armazenada a 40 °C/75% UR



De acordo com as análises de DRX realizadas, foi possível observar que o fármaco CC possui baixa tendência a recristalização, uma vez que o próprio fármaco amorfo puro, assim como a DS CC30, não apresentou reflexões características da recristalização do fármaco até 90 dias em todas as condições ambientais estudadas. A presença de halo amorfo característico em todos os difratogramas obtidos indica que as amostras de CC amorfa pura e da DS CC30 se mantiveram amorfas por 90 dias, mesmo na condição mais drástica testada (40 °C/75% UR), demonstrando a boa estabilidade física tanto do fármaco amorfo puro quanto da DS desenvolvida.

O fármaco HCTZ amorfo puro, por sua vez, apresentou maior tendência a recristalização em todas as condições de armazenamento testadas. Nas condições de 4 °C/0% UR e 30 °C/0% UR, reflexões características da recristalização do fármaco amorfo puderam ser observadas a partir de 60 e 30 dias, respectivamente, enquanto que nas condições de 30 °C/75% UR e 40 °C/75% estas reflexões puderam ser observadas já a partir de 15 dias de armazenamento das amostras.

No entanto, a incorporação do fármaco HCTZ na matriz polimérica de HPMCAS M na forma de DS amorfa demonstrou ser capaz de aumentar a estabilidade física da HCTZ frente à recristalização. Nas condições de 4 °C/0% UR e 30 °C/0% UR, a DS HZ70 se apresentou predominantemente amorfa por 90 dias de armazenamento, sendo apenas reflexões muito pequenas detectadas a partir dos 60 dias de armazenamento nestas condições. Com a presença de umidade, a recristalização do fármaco não pode ser evitada e, assim como para a HCTZ amorfa pura, a DS HZ70 apresentou reflexões características da recristalização do fármaco após 15 dias de armazenamento.

Estes resultados demonstram que a presença de umidade é capaz de acelerar o processo de recristalização em estado sólido tanto do fármaco HCTZ amorfo puro quanto da DS HZ70 desenvolvida.

#### 4.3.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

Análises de DSC foram realizadas para as amostras armazenadas sob as diferentes condições climáticas contendo CC, e seus resultados encontram-se demonstrados da Figura 42 a Figura 45.

Confirmando os resultados obtidos para as análises de DRX realizadas e a baixa tendência a recristalização em estado sólido do fármaco CC, as curvas DSC obtidas para o fármaco amorfo e para a DS CC30 apresentaram a ausência de evento característico da fusão do fármaco, em todos os tempos e condições de armazenamento testadas.

Figura 42 - Curvas DSC obtidas para a CC amorfa e dispersão sólida CC30 armazenada a 4 °C/0% UR

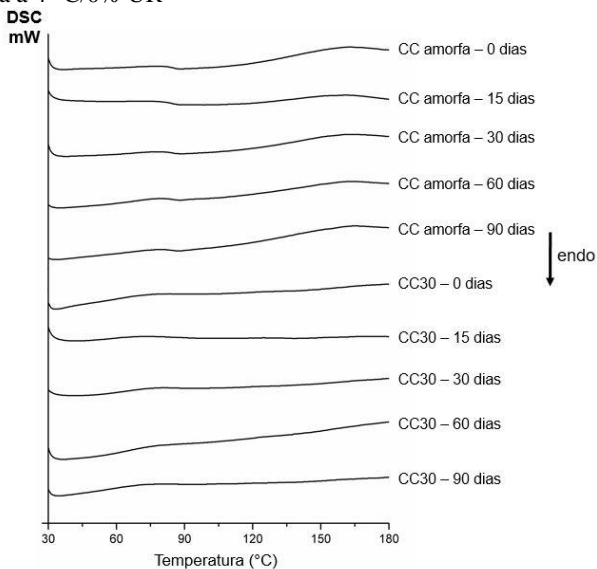


Figura 43 - Curvas DSC obtidas para a CC amorfa e dispersão sólida CC30 armazenada a 30 °C/0% UR

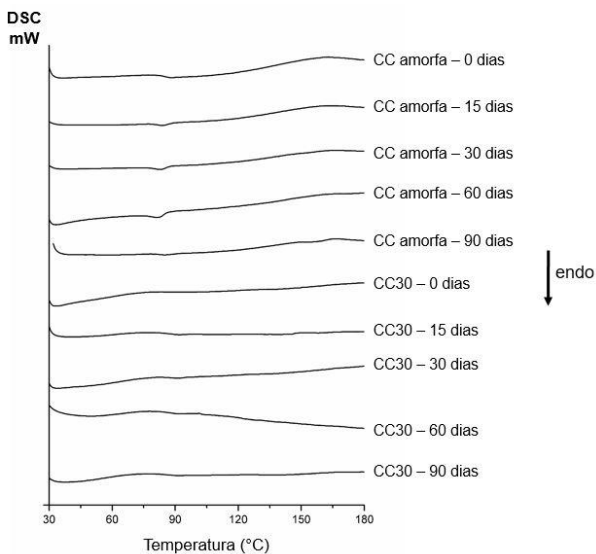


Figura 44 - Curvas DSC obtidas para a CC amorfa e dispersão sólida CC30 armazenada a 30 °C/75% UR

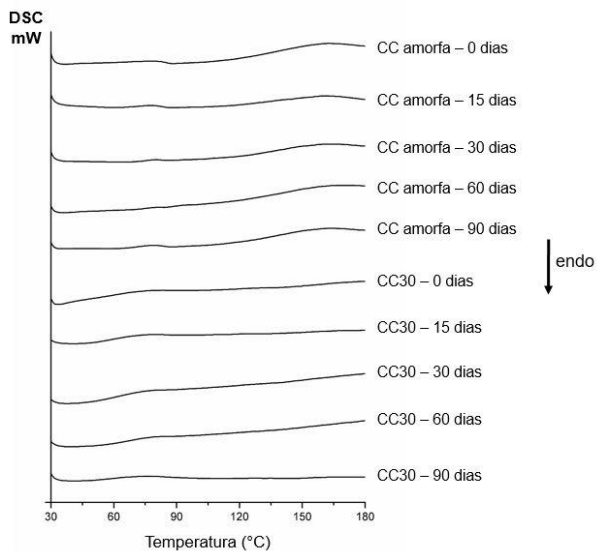
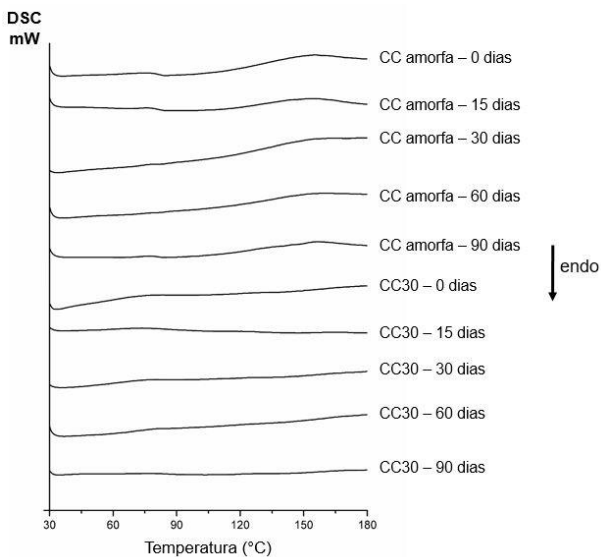


Figura 45 - Curvas DSC obtidas para a CC amorfa e dispersão sólida CC30 armazenada a 40 °C/75% UR



#### 4.3.5.3 Teor e perfil de supersaturação *in vitro*

Os resultados de teor, perfil de supersaturação *in vitro* e AUC obtidos para as amostras dos fármacos amorfos e DS CC30 e HZ70 recém produzidas (tempo zero) e após 90 dias armazenadas sob as diferentes condições estudadas encontram-se demonstrados na Tabela 14, Figura 46 e Figura 47.

Como pode ser observado nos resultados demonstrados na Tabela 14, o teor das amostras se manteve estável ao longo dos 90 dias do estudo de estabilidade. Pequenas variações nos valores de teor entre o tempo zero e o tempo 90 dias puderam ser observadas, porém todas inferiores a 2,0%, sendo estas atribuídas a pequenas variações analíticas entre as análises realizadas nos diferentes tempos de estudo.

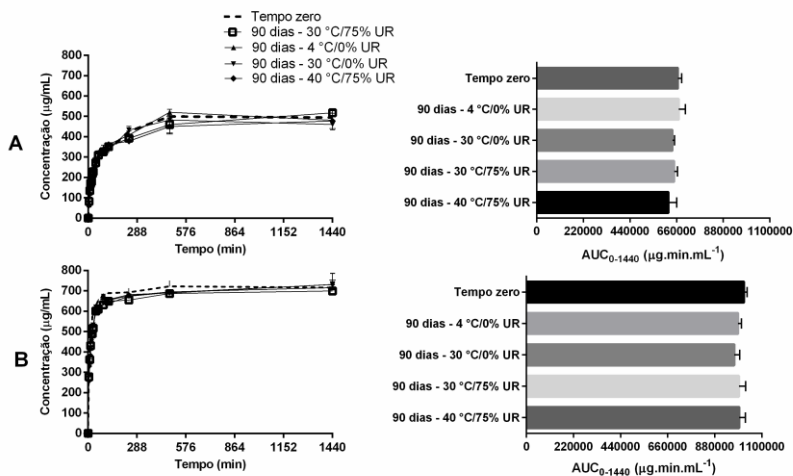
Tabela 14 - Teor de CC e HCTZ nas amostras de estabilidade nos tempos zero e 90 dias de armazenamento

<i>Amostra</i>	<i>Condição de armazenamento</i>	<i>Teor (%) - Tempo zero</i>	<i>Teor (%) - Tempo 90 dias</i>
CC amorfa	4 °C/0% UR	99,5	99,3
	30 °C/0% UR		100,4
	30 °C/75% UR		98,3
	40 °C/75% UR		98,5
DS CC30	4 °C/0% UR	96,9	96,0
	30 °C/0% UR		96,7
	30 °C/75% UR		95,9
	40 °C/75% UR		95,0
HCTZ amorfa	4 °C/0% UR	99,4	99,7
	30 °C/0% UR		98,5
	30 °C/75% UR		100,4
	40 °C/75% UR		99,0
DS HZ70	4 °C/0% UR	98,7	98,0
	30 °C/0% UR		99,3
	30 °C/75% UR		98,4
	40 °C/75% UR		97,8

Os perfis de supersaturação *in vitro* obtidos para o fármaco amorfo CC e DS CC30 no tempo zero e no tempo 90 dias sob as diferentes condições de estabilidade avaliadas demonstraram característica semelhante, assim como valores de AUC estatisticamente semelhantes, comprovando a estabilidade destas amostras e a manutenção da capacidade de manter um estado supersaturado deste fármaco em meio FaSSiF mesmo após o armazenamento sob condições elevadas de

temperatura e umidade. Estes resultados concordam com as análises de estado sólido realizadas e confirmam a estabilidade do fármaco amorfo e da DS de CC desenvolvida.

Figura 46 - Perfis de supersaturação *in vitro* obtidos para o fármaco CC amorfo (A) e DS CC30 (B) em meio FaSSIF após 90 dias de estudo de estabilidade sob as diferentes condições de armazenamento avaliadas

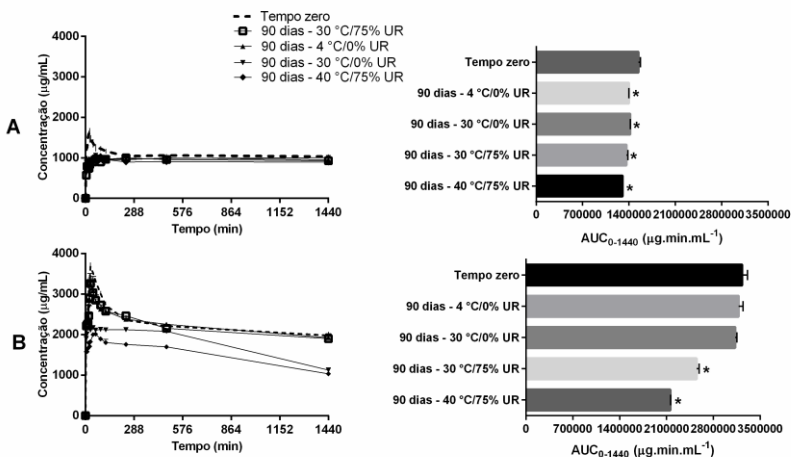


Para o fármaco HCTZ amorfo, diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos perfis de supersaturação *in vitro* e valores de AUC foi visualizada entre o tempo zero e o tempo 90 dias em todas as condições de armazenamento avaliadas. De fato, a análise de DRX demonstrou que a HCTZ amorfa pura apresentou recristalização durante o armazenamento, o que influenciou na extensão da supersaturação obtida para este fármaco.

Já a DS HZ70 armazenada sob as condições de 4 °C/0% UR e 30 °C/0% UR apresentaram resultados de AUC levemente inferiores, porém estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ) quando comparados ao tempo zero. Em contrapartida, sob as condições de armazenamento de 30 °C/75% UR e 40 °C/75% UR demonstraram resultados de AUC estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao valor obtido para a mesma formulação analisada imediatamente após a sua produção (tempo zero).



Figura 47 - Perfis de supersaturação *in vitro* obtidos para o fármaco HCTZ amorfo (A) e DS HZ70 (B) em meio FaSSIF após 90 dias de estudo de estabilidade sob as diferentes condições de armazenamento avaliadas



#### 4.4 CONCLUSÃO

Neste capítulo, DS de CC e HCTZ com o carreador polimérico HPMCAS M foram desenvolvidas com sucesso. A técnica de moagem mecânica por moinho de esferas se mostrou efetiva, proporcionando a adequada amorfização tanto dos fármacos puros quanto das DS desenvolvidas para ambos os fármacos, em todas as proporções fármaco/polímero (m/m) testadas. As formulações apresentaram bons rendimentos e valores satisfatórios de teor dos fármacos.

A amorfização das formulações desenvolvidas foi confirmada por técnicas de caracterização em estado sólido distintas. No entanto, a presença de pequenos cristais, em quantidade ínfima, foi detectada por meio de MLP em todas as DS obtidas para ambos os fármacos.

Os estudos de supersaturação *in vitro* em condições não-sink demonstraram que as DS desenvolvidas com o carreador polimérico HPMCAS M foram promissoras com relação à geração e manutenção de um estado de supersaturação dos fármacos modelo em meio biorelevante FaSSIF, sendo as formulações CC30 e HZ70 ao que promoveram maior extensão de supersaturação dos fármacos em estudo, que foi mantida por até 24 h. Esta supersaturação, ocasionada pela estratégia tecnológica aplicada, demonstrou resultados melhorados de redução de variação de pressão arterial e fluxo sanguíneo renal frente a administração de

angiotensina I para a DS CC30 em comparação ao fármaco CC cristalino nos estudos *in vivo* realizados, comprovando a capacidade dos sistemas geradores de supersaturação em promover a maior absorção e consequentemente maior efeito terapêutico para fármacos de baixa solubilidade aquosa.

Ainda, a estabilidade físico-química da formulação CC30, contendo o fármaco CC, foi confirmada por até 90 dias sob condições variadas de temperatura e umidade, enquanto que a formulação HZ70, que continha o fármaco HCTZ, se manteve estável por até 90 dias quando armazenada em condições protegidas do contato com a umidade. Os perfis de supersaturação *in vitro* obtidos para a DS CC30, armazenada sob todas as condições de estabilidade avaliadas, e pela DS HZ70 nas condições isentas de umidade (4 °C/75% e 30 °C/0% UR) demonstraram valores de AUC estatisticamente semelhantes às formulações recém produzidas e analisadas. Sob estas condições de armazenamento, a capacidade de geração e extensão de supersaturação dos fármacos em estudo proporcionadas por estas formulações foi mantida pelo período de 90 dias avaliado.

#### Capítulo IV

### **DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS TERNÁRIAS CONTENDO OS FÁRMACOS EM ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA**

---



## 5 DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS TERNÁRIAS CONTENDO OS FÁRMACOS EM ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA

### 5.1 INTRODUÇÃO

A hipertensão é a mais comum condição cardiovascular crônica diagnosticada por médicos de cuidados primários de saúde. Esta aumenta o risco de acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial e doenças vasculares. O controle efetivo da pressão arterial é capaz de reduzir a ocorrência destas complicações. No entanto, a maioria dos pacientes exigirá mais de um medicamento para obter o controle adequado da pressão arterial (CDER/FDA, 2018).

Medicamentos contendo fármacos em associação em dose fixa são combinações de um ou mais fármacos em uma única forma farmacêutica com razão de dosagens fixas entre os mesmos (EMA, 2017; GAUTAM; SAHA, 2008).

O desenvolvimento de medicamentos em doses fixas combinadas está se tornando cada vez mais importante de um ponto de vista de saúde pública, sendo suas vantagens, quando comparadas à monoterapia, são a possibilidade da associação prover resposta clínica e segurança melhoradas e, conseqüentemente, tratamento mais efetivo, assim como simplificar a administração dos fármacos quando presentes em um único medicamento (EMA, 2017; WHO, 2005).

Os fármacos CC e HCTZ compõem uma associação em dose fixa combinada na forma de comprimidos simples, em que o medicamento de referência no Brasil é o Atacand HCT<sup>®</sup>, do fabricante Astrazeneca. Este medicamento existe no país nas dosagens de 8 mg + 12,5 mg e 16 mg + 12,5 mg de CC e HCTZ, respectivamente. Dados da consultoria especializada na área farmacêutica IMS *Health* demonstram que, no Brasil, a dosagem de 16 mg + 12,5 mg é a mais vendida e, portanto, mais prescrita entre as duas dosagens do produto disponíveis.

As DS podem ser classificadas como binárias ou ternárias, com base no número de componentes presentes nestas, sendo que as DS ternárias compreendem formulações que contem três componentes. Assim sendo, este capítulo aborda o desenvolvimento de DS ternárias contendo o carreador polimérico HPMCAS M e os fármacos CC e HCTZ na forma de associação em dose fixa, respeitando a proporção entre os

fármaco de 56:44 (% m/m CC:HCTZ), proporção esta correspondente ao medicamento de dosagem 16 mg + 12,5 mg comercialmente disponível.

## 5.2 METODOLOGIA

### 5.2.1 Materiais

As matérias-primas CC e HCTZ foram adquiridas através do fornecedor Pharmanostra, provenientes dos fabricantes Xi'an Lyphar Biotech Co., Ltd/China e Suzhou Ausun Chemical Co., Ltd., respectivamente. O polímero HPMCAS M (AquaSolve<sup>®</sup>, pó fino) foi doado pelo fabricante Ashland. O meio biorrelevante FaSSIF foi adquirido do fabricante Biorelevant. A água ultrapura foi obtida através de sistema Milli-Q<sup>®</sup>. Todos os demais reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e/ou de grau CLAE.

### 5.2.2 Métodos

#### 5.2.2.1 Preparo das dispersões sólidas e misturas físicas

O preparo das DS contendo os fármacos CC e HCTZ em associação em dose fixa (DS ternárias) foi realizado pela técnica de moagem mecânica por moinho de esferas, e as composições das mesmas encontram-se descritas na Tabela 15.

Tabela 15 - Composição das DS ternárias e misturas físicas

Formulação	Codificação	Proporção
		CC/HCTZ/HPMCAS M (% m/m)
DS	CH30	17:13:70
	CH50	28:22:50
	CC70	39:31:30
MF	MFCH30	17:13:70
	MFCH50	28:22:50
	MFCH70	39:31:30

Para a obtenção das DS, os fármacos e o polímero HPMCAS M foram pesados nas proporções pré-definidas, de modo a compor uma massa final de 2,0 g, e transferidos para jarros de aço inox de capacidade de 125 mL de um moinho de esferas Retsch PM200 (Haan, Alemanha).

Os materiais sólidos foram gentilmente misturados com auxílio de espátula por cerca de 1 minuto e, em seguida, foram adicionadas três esferas de aço inoxidável de 10 mm de diâmetro a cada jarro, de modo que a razão esfera/pó se manteve em aproximadamente 50:1 (m/m).

O processo de moagem foi executado a 560 rpm por 2,5 h à temperatura ambiente, sendo estas condições definidas por meio de testes experimentais prévios de moagem realizadas com os fármacos cristalinos, bem como por meio dos resultados obtidos para as DS desenvolvidas para os fármacos isolados (Capítulo III). Após sua obtenção, as DS foram acondicionadas em frascos ampola de vidro com tampa plástica, vedadas com filme Parafilm<sup>®</sup>, identificadas e armazenadas em geladeira à temperatura de 2,0 a 8,0°C, para posterior análise, que foi realizada em até uma semana após a produção das DS.

Amostra adicional dos fármacos puros associados na proporção de 56:44 (% m/m CC:HCTZ) foi obtida sob as mesmas condições experimentais de moagem, sem a presença do polímero.

As proporções fármaco/polímero testadas foram embasadas nas proporções testadas para as DS dos fármacos isolados (Capítulo III). Nestes estudos, a DS com 90% de polímero não demonstrou resultados promissores com relação a extensão de supersaturação dos fármacos modelo. Por este motivo, esta formulação não foi testada para os fármacos em associação como DS ternárias. Deste modo, selecionou-se as proporções de 30%, 50% e 70% de polímero para o desenvolvimento das DS dos fármacos em associação em dose fixa.

As misturas físicas (MF) foram preparadas respeitando a mesma composição das DS, através da pesagem dos fármacos e do polímero HPMCAS M nas proporções pré-definidas (quantidade final de 1,0g), seguidas de simples mistura por espatulação por cerca de um minuto. A codificação das mesmas encontra-se descrita na Tabela 15. Uma MF contendo somente os fármacos na proporção 5,6:4,4 (CC:HCTZ) também foi preparada conforme as condições de preparo descritas para as MF, sendo esta nomeada como MFCH. As MF obtidas foram acondicionadas em frascos ampola de vidro com tampa plástica, vedadas com filme Parafilm<sup>®</sup>, identificadas e armazenadas em geladeira à temperatura de 2,0 a 8,0°C, para posterior análise.

#### 5.2.2.2 Determinação do rendimento das dispersões sólidas

O rendimento final das DS foi calculado em porcentagem (m/m), através da realização da pesagem das DS obtidas e correlação com a massa inicial de 2,0 g.

### 5.2.2.3 Determinação do teor dos fármacos nas dispersões sólidas

Os fármacos CC e HCTZ foram quantificados por CLAE, conforme método desenvolvido para esta finalidade, utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 (Shimadzu Corporation, Japão) equipado com detector ultravioleta.

Uma coluna analítica de fase reversa octadecilsilano (C18) Phenomenex Luna 100A com dimensões de 150 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm foi utilizada, e mantida a uma temperatura de 40°C. A fase móvel foi composta por acetonitrila e tampão acetato de sódio 5mM pH 4,0, em eluição gradiente a um fluxo de 2,0 mL/min, conforme a Tabela 16 abaixo.

Tabela 16 - Composição do gradiente de eluição cromatográfica

<i>Tempo (min)</i>	<i>Tampão acetato pH 4,0 (%)</i>	<i>Acetonitrila (%)</i>
0	80	20
7	30	70
10,5	30	70
11	80	20
14	80	20

O comprimento de onda utilizado para a análise foi de 254 nm e, após filtração apropriada, 10 µL das amostras foram injetados no sistema de CLAE.

Curvas de calibração foram construídas em uma faixa linear de 2,5 a 200,0 µg/mL para a CC e de 5,0 a 400,0 µg/mL para a HCTZ. As soluções amostra para determinação de teor foram preparadas pesando individualmente, em balança microanalítica, massas dos fármacos puros moídos e DS equivalentes a cerca de 10 mg dos fármacos associados, e transferindo para balões volumétricos de 10 mL. Os materiais sólidos foram dissolvidos em aproximadamente 7 mL de acetonitrila, com auxílio de banho ultrassônico, e em seguida o volume foi completado com o mesmo solvente, de modo a obter soluções mãe das amostras com concentração de 560 µg/mL de CC e 440 µg/mL de HCTZ. Diluições adicionais foram realizadas de modo a obter soluções de concentração aproximada de 56 µg/mL para o fármaco CC e 44 µg/mL para o fármaco HCTZ.

Soluções padrão dos fármacos nas mesmas concentrações finais das soluções amostra foram preparadas com as matérias-primas cristalinas, conforme o procedimento descrito acima para as soluções



amostra. Após seu preparo, as soluções padrão e amostra foram filtradas por filtros de seringa de poliamida com 0,45 µm de tamanho de poro (Chromaphil® Xtra), e injetadas em equipamento Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão). A solução padrão foi injetada em quintuplicata e as áreas médias dos analitos foi considerada para a quantificação das soluções amostra. As soluções amostra foram injetadas em duplicata e suas áreas médias foram consideradas para os cálculos de teor.

O cálculo do teor das soluções amostra foi realizado utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ teor} = \frac{Aa \times Cp \times 100}{Ap \times Ca} \quad (5)$$

Onde Aa e Ap são as áreas médias obtidas para as soluções amostra e padrão, e Ca e Cp são as concentrações das soluções amostra e padrão, respectivamente.

#### 5.2.2.4 Caracterização no estado sólido

##### 5.2.2.4.1 Difração de raios X de pó

Os difratogramas das DS ternárias desenvolvidas, dos fármacos cristalinos isolados e dos fármacos moídos associados foram obtidos utilizando-se equipamento  $\theta$ - $\theta$  D2 Phaser (Bruker), com radiação de cobre K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), operando em uma corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV, equipado com um detector de cintilação unidimensional LINXEYE. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em porta amostras com cavidade e varredura angular a  $2\theta$  na faixa de  $5^\circ$  a  $40^\circ$ , com step angular de  $0,091^\circ\text{s}^{-1}$ .

##### 5.2.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas DSC dos fármacos cristalinos isolados, fármacos moídos associados e DS ternárias desenvolvidas foram obtidas em célula Shimadzu DSC-60 utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados. Para tal, pesou-se aproximadamente 2,0 mg e a faixa de temperatura das análises foi de 30 a 300 °C, em uma única corrida, com razão de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> de 100 mL/min. O equipamento foi previamente calibrado com padrões de índio e zinco, e os dados obtidos foram processados em software TA-60.

#### 5.2.2.4.3 Microscopia de Luz Polarizada

As análises de MLP dos fármacos cristalinos isolados, fármacos moídos associados, do polímero HPMCAS M e das DS ternárias desenvolvidas foram realizadas utilizando Microscópio Olympus CX41RF equipado com analisador de luz transmitida (U-ANT) e polarizador de luz transmitida (U-POT) (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). Pequena quantidade das amostras sólidas foi transferida para lâminas de vidro, espalhadas e recobertas com auxílio de lamínula de vidro. As amostras foram avaliadas quanto à presença de cristais, por meio da observação visual da birrefringência dos cristais (quando presentes), em comparação com as regiões amorfas não-birrefringentes.

#### 5.2.2.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros FTIR dos fármacos cristalinos isolados, fármacos moídos associados, polímero HPMCAS M, das MF e DS ternárias desenvolvidas foram obtidos em equipamento PerkinElmer Frontier FT-IR, em uma faixa espectral de 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma média de 10 varreduras em resolução espectral de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 5.2.2.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A avaliação da morfologia das partículas dos fármacos cristalinos isolados, fármacos moídos associados, polímero HPMCAS M e das DS ternárias desenvolvidas foram realizadas através da análise de fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura em microscópio Jeol modelo JSM6390LV, sob voltagem de aceleração de 10 kV, em diferentes aumentos. As amostras foram previamente preparadas através da fixação das mesmas em stubs de alumínio, por meio de fita adesiva dupla face de carbono, e recobrimento com ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD 500.

#### 5.2.2.5 Estudos de supersaturação *in vitro*

Os perfis de supersaturação *in vitro* dos fármacos moídos associados e das DS ternárias desenvolvidas foram determinados em meio FaSSIF. Frascos erlenmeyer com capacidade de 25 mL foram acomodados em incubadora Shaker Nova Técnica NT-715, e 10 mL de meio FaSSIF foram adicionados em cada frasco. A temperatura foi

mantida a  $37,0 \pm 1,0$  °C, com agitação de 240 rpm, durante as 24 h de estudo.

Massas das DS ternárias equivalente a 100,0 mg de HCTZ e 127 mg de CC foram individualmente pesadas e transferidas para os frascos erlenmeyer contendo o meio previamente aquecido. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas e filtradas por filtros de seringa de poliamida com 0,45 µm de tamanho de poro (Chromaphil® Xtra) nos intervalos de tempo pré-determinados de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480 e 1440 min.

As amostras foram imediatamente diluídas na proporção 1:10 (v/v) em acetonitrila, para prevenir qualquer recristalização adicional dos fármacos, e injetadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para análise da concentração de CC e HCTZ, conforme o sistema cromatográfico e condições analíticas descritas no item 5.2.2.3.

Os cálculos de AUC e as análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® 6. A análise de variâncias (ANOVA) fator único, seguida de teste de múltiplas comparações de Tukey foi empregada para comparar e testar a significância estatística dos valores de área sob as curvas (AUCs) obtidos nos experimentos de supersaturação *in vitro* para ambos os fármacos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de probabilidade (p) foi inferior a 0,05 a um nível de confiança de 95%.

Os estudos de supersaturação *in vitro* foram realizados em triplicata.

#### 5.2.2.6 Estudos de estabilidade

A estabilidade físico-química dos fármacos amorfos associados e das DS ternárias selecionadas foi avaliada sob diferentes condições de temperatura e umidade.

As DS que apresentaram a melhor performance de geração e manutenção de supersaturação dos fármacos modelo nos estudos de supersaturação *in vitro* realizados foram armazenadas por um período de 90 dias sob as seguintes condições ambientais:

- 4 °C/0% umidade relativa (UR), em geladeira;
- 30 °C/0% UR, em estufa marca Nova Ética;
- 30 °C/75% UR, em câmara climática marca Climus;
- 40 °C/75% UR, em câmara climática marca Mecalor.

As amostras armazenadas em geladeira e em estufa foram acondicionadas em frasco ampola de vidro fechados com tampa plástica e seladas com lacre de alumínio, de modo evitar o contato do material com qualquer umidade residual.

As amostras expostas à 75% de umidade relativa nas câmaras climáticas foram acondicionadas em placas de petri de vidro recobertas com filme de PVC perfurado.

Imediatamente após a sua produção, e nos tempos 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento nas condições ambientais definidas, as amostras foram analisadas por técnica de DRX para a avaliação da tendência de recristalização dos fármacos, conforme o método citado no item 5.2.2.4.1. Análises de teor e estudos de supersaturação *in vitro* também foram conduzidas, conforme os métodos citados nos itens 5.2.2.3 e 5.2.2.5, respectivamente, no tempo inicial e após 90 dias de estudos de estabilidade.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1 Seleção da técnica de obtenção, rendimento e teor dos fármacos nas dispersões sólidas

A técnica selecionada para a produção das DS dos fármacos CC e HCTZ em associação em dose fixa foi a moagem mecânica por meio de moinho de esferas, devido às características dos fármacos. Ainda, os dados obtidos previamente para as DS desenvolvidas para os fármacos isolados por esta técnica foram levados em conta, conforme detalhado no Capítulo III deste trabalho.

Os resultados relativos ao rendimento das DS ternárias desenvolvidas encontram-se descritos na Tabela 17. Após a sua produção, todas as DS se apresentaram como pós soltos e finos, de coloração branca a levemente amarelada.

Tabela 17 - Rendimento das DS obtidas

DS	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Rendimento (%)
CH30		1,83	91,5
CH50	2,00	1,81	90,5
CH70		1,78	89,0

Os rendimentos obtidos foram considerados satisfatórios, uma vez que estes foram iguais ou superiores a 89,0%. Assim como observado no desenvolvimento das DS dos fármacos isolados (Capítulo III), a DS que

possuía maior proporção de fármaco (CH70) apresentou menor rendimento, devido a maior aderência do pó às esferas e aos jarros do moinho e consequente dificuldade de recuperação do material sólido ao final do processo.

Os resultados de teor obtidos para os fármacos puros moídos e para as DS desenvolvidas encontram-se descritos na Tabela 18. Nestas análises, o coeficiente de variação (CV%) obtido entre as replicatas de injeção da solução padrão foi considerado adequado, sendo este inferior a 2,0% (BRASIL, 2010).

Tabela 18 - Teores obtidos para as DS ternárias produzidas

<b>Amostra</b>	<b>Teor de CC (%)</b>	<b>Teor de HCTZ (%)</b>
CC+HCTZ	99,3	98,4
CH30	96,5	97,6
CH50	98,3	95,2
CH70	97,4	96,9

Os teores obtidos para as DS ternárias desenvolvidas, assim como para os fármacos moídos em associação se mostraram satisfatórios, uma vez que todos se encontram acima de 90,0%.

As variações observadas nestes valores de teor podem ser atribuídas às pequenas variações de pesagem dos materiais, ou eventuais pequenas perdas nos processos de mistura prévia de fármaco e polímero e transferência de pós.

### **5.3.2 Caracterização em estado sólido**

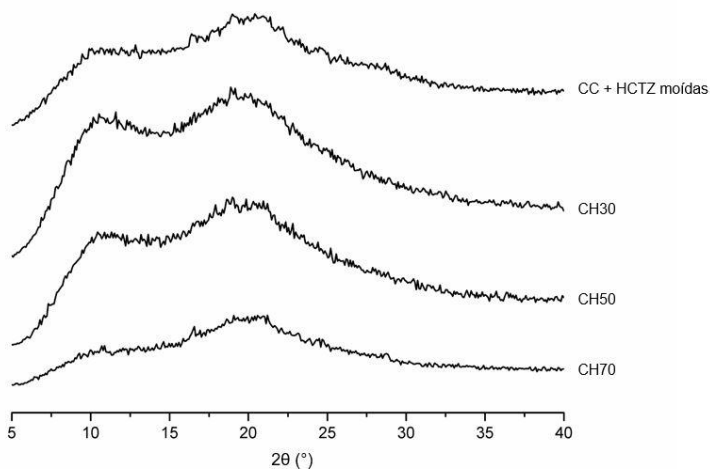
#### **5.3.2.1 Difração de raio X de pó**

Os difratogramas relativos aos fármacos associados moídos e as DS ternárias obtidas encontram-se demonstrados na Figura 48.

Os difratogramas obtidos para os fármacos CC e HCTZ moídos em associação demonstraram que o processo de moagem dos fármacos cristalinos resultou na obtenção de material amorfo, sendo esta amorfização visualizada pela ausência de reflexões nos difratogramas obtidos.

A amorfização também foi observada nas DS ternárias desenvolvidas com o carreador polimérico HPMCAS M, em todas as proporções testadas, visualizada pela ausência de reflexões e obtenção de halo amorfo característico nos difratogramas obtidos.

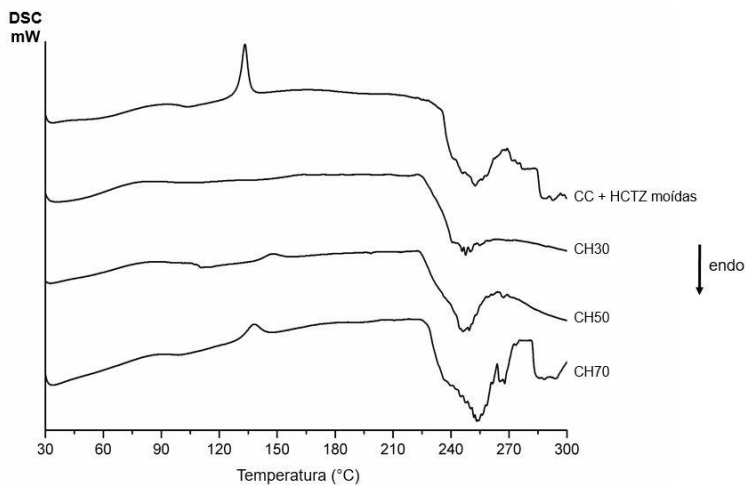
Figura 48 - Difratomogramas relativos aos fármacos associados moídos e as DS ternárias desenvolvidas



### 5.3.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas DSC referentes aos fármacos associados moídos e DS ternárias desenvolvidas encontram-se demonstradas na Figura 49.

Figura 49 - Curvas DSC referentes à aos fármacos associados moídos e dispersões sólidas ternárias desenvolvidas



A curva DSC obtida para os fármacos associados moídos demonstrou um evento exotérmico em cerca de 130 °C, assim como eventos endotérmicos pouco definidos a partir de 220 °C. O evento exotérmico foi associado à recristalização da HCTZ amorfa, conforme demonstrado no Capítulo 3, item 4.3.3.2. Já os eventos endotérmicos foram associados à degradação do fármaco CC, que ocorrem a partir de 160 °C. Eventos de degradação em curvas DSC são tipicamente exotérmicos, porém alguns fenômenos como vaporização e sublimação se apresentam como eventos endotérmicos, sendo provavelmente os ocorridos nas curvas DSC obtidas (IONASHIRO, MASSAO; CAIRES, F. J.; GOMES, 2005).

As DS ternárias desenvolvidas apresentaram o mesmo comportamento, porém o evento de recristalização visualizado em cerca de 130 °C diminuiu a medida que o fármaco HCTZ se apresentou mais diluído na formulação, ou seja, a medida que a proporção do polímero HPMCAS M foi aumentada. Os eventos de degradação se mostraram mais intensos nas DS desenvolvidas, em virtude da degradação do polímero, que ocorre a partir de 267 °C (ASHLAND INC., 2016).

Deste modo, a DSC não foi considerada uma técnica conclusiva para avaliação da natureza do estado sólido das DS ternárias desenvolvidas. No entanto, como visualizado nas análises de DRX realizadas, os difratogramas obtidos demonstram a característica amorfa destas amostras.

### 5.3.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier

A técnica de FTIR foi utilizada para detectar possíveis interações entre fármacos e polímeros. A interpretação dos espectros FTIR das DS ternárias desenvolvidas foi realizada correlacionando os espectros das MF com os espectros das DS, de modo a verificar a ocorrência de interações químicas entre os fármacos e o carreador polimérico, por meio de deslocamento de bandas nos espectros das DS.

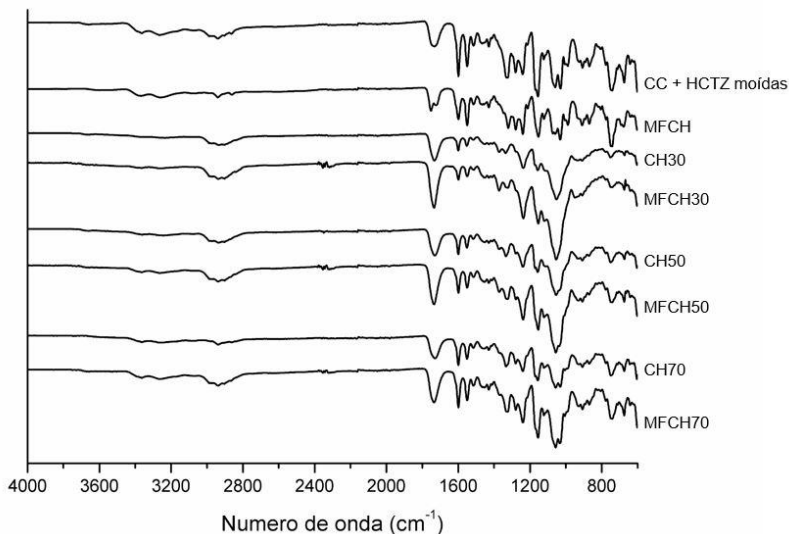
Os espectros FTIR relativos aos fármacos isolados cristalinos, amorfos e ao polímero HPMCAS M encontram-se ilustrados no Capítulo 3, item 4.3.3.3, enquanto os espectros FTIR relativos aos fármacos associados moídos, DS ternárias desenvolvidas e MF preparadas encontram-se ilustrados na Figura 50.

As bandas visualizadas em aproximadamente 1751  $\text{cm}^{-1}$  e 1718  $\text{cm}^{-1}$  presentes no espectro da MFCH referem-se às vibrações de

estiramento de carbonila e são relativas ao fármaco CC, conforme demonstrado na Figura 20 ilustrada no item 4.3.3.3 do Capítulo 2.

Ligações de hidrogênio podem ocorrer em qualquer sistema contendo um grupo doador de prótons (X-H) e um grupo aceptor de prótons, como a carbonila (C=O), sendo que ligações de hidrogênio intermoleculares envolvem a associação de duas ou mais moléculas do mesmo composto, ou de diferentes compostos. As ligações de hidrogênio alteram as constantes de força tanto dos grupos aceptores quanto doadores de elétrons, sendo as bandas relativas às vibrações de estiramento de carbonila comumente movidas para frequências mais baixas (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

Figura 50 - Espectros FTIR dos fármacos associados, DS ternárias e MF produzidas



Comparando-se os espectros obtidos para a MFCH e CC + HCTZ moídas (Figura 50), é possível perceber a supressão da banda visualizada em cerca de  $1718\text{ cm}^{-1}$  e o deslocamento da banda presente em cerca de  $1751\text{ cm}^{-1}$  na MFCH, sendo visualizada no espectro FTIR relativo à CC + HCTZ moídas uma única banda nesta região, em cerca de  $1732\text{ cm}^{-1}$ . Estes resultados sugerem a ocorrência de ligações de hidrogênio entre a função carbonila presente no fármaco CC e os grupos doadores de prótons presentes no fármaco HCTZ.

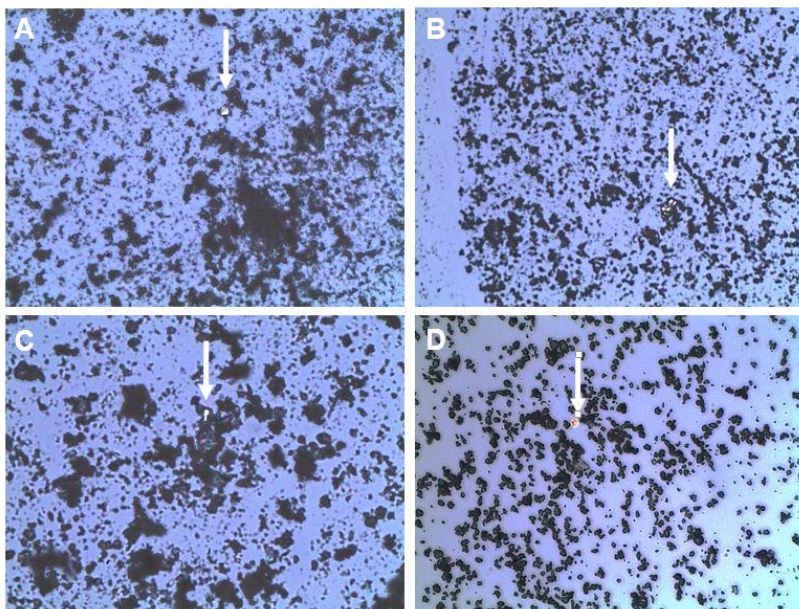


Nas análises realizadas para as DS desenvolvidas, os espectros FTIR obtidos apresentaram apenas sobreposições das bandas referentes aos fármacos e ao polímero HPMCAS M, sem deslocamentos significativos nas bandas de interesse quando se comparam os espectros das MF e DS. Isto sugere a ausência de interações químicas entre as substâncias em estado sólido. No entanto, como o polímero HPMCAS M também apresenta uma banda intensa em cerca de  $1730\text{ cm}^{-1}$ , a técnica de FTIR aplicada pode não ser capaz de identificar a ocorrência das ligações de hidrogênio entre os fármacos e o polímero, ou até mesmo entre os próprios fármacos.

#### 5.3.2.4 Microscopia de Luz Polarizada

As imagens de MLP obtidas para as matérias-primas CC e HCTZ cristalinas e polímero HPMCAS M encontram-se demonstradas no item 4.3.3.4 do Capítulo 3. As imagens relativas aos fármacos associados moídos e DS ternárias desenvolvidas encontram-se demonstradas na Figura 51.

Figura 51 - Imagens de MLP (aumento de 200 x) dos fármacos associados moídos e DS ternárias. A) CC + HCTZ moídas, B) CH30, C) CH50, e D) CH70. As setas sólidas brancas indicam a presença de cristais birrefringentes.



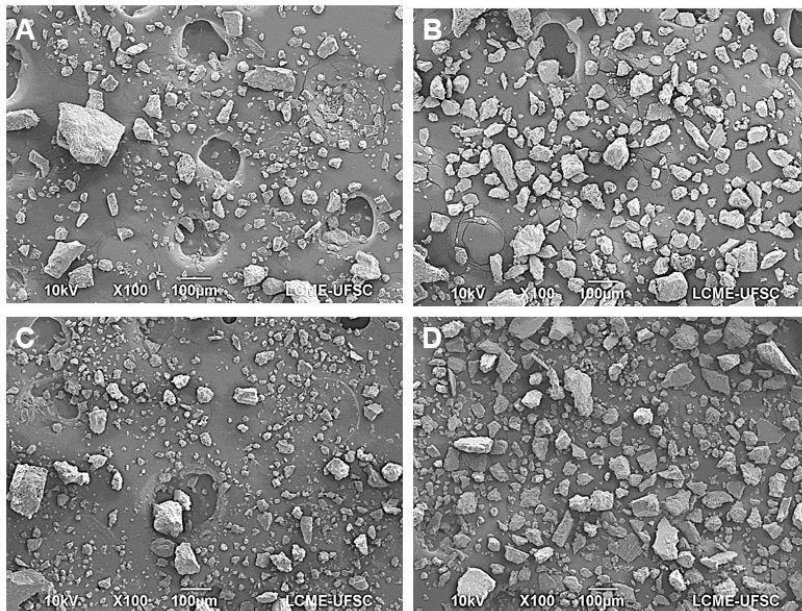
Assim como visualizado para as DS desenvolvidas para os fármacos isoladamente (Capítulo 3), nas análises de MLP realizadas para os fármacos associados moídos e para as DS ternárias, pode-se observar que estas apresentaram característica predominantemente amorfa.

A presença de pequenos cristais birrefringentes foi detectada, em quantidade ínfima quando comparada ao material amorfo, porém estes não foram detectados pela técnica de DRX e não influenciaram significativamente na natureza amorfa das DS desenvolvidas.

### 5.3.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias dos fármacos cristalinos e moídos encontram-se ilustradas no item 4.3.3.5 do Capítulo 3, e as fotomicrografias dos fármacos associados moídos e das DS ternárias desenvolvidas encontram-se demonstradas na Figura 52.

Figura 52 - Fotomicrografias dos fármacos associados moídos e DS ternárias (100x). A) CC + HCTZ moídas, B) CH30, C) CH50 e D) CH70



Como pode ser observado nestas figuras, todas as DS desenvolvidas apresentaram alterações morfológicas significativas em relação aos fármacos cristalinos, apresentando-se sob a forma de

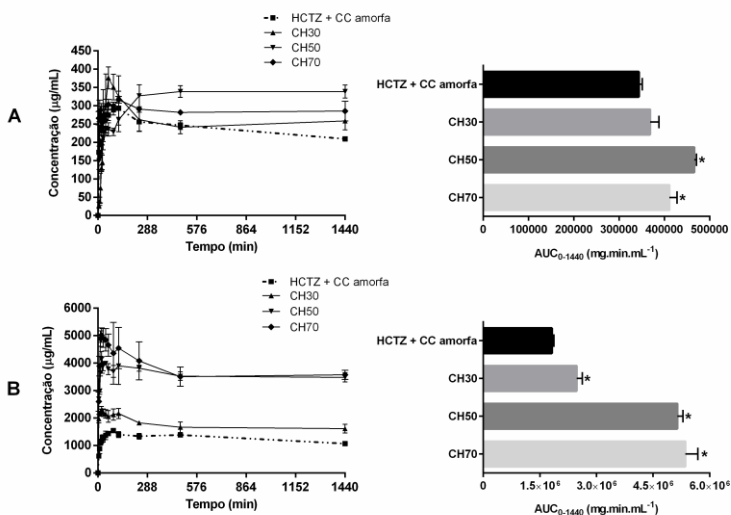
aglomerados de forma e superfície irregulares e tamanhos consideravelmente variáveis, de tamanho de partícula reduzido em comparação com os materiais cristalinos.

Não foi visualizada claramente a presença de cristais característicos referentes aos fármacos nas amostras analisadas, e todas as formulações desenvolvidas apresentaram aspecto semelhante.

### 5.3.3 Estudos de supersaturação *in vitro*

A Figura 53 demonstra os perfis de supersaturação *in vitro* em meio FaSSIF obtidos para os fármacos associados moídos e para as DS ternárias desenvolvidas.

Figura 53 - Perfis de supersaturação *in vitro* em meio FaSSIF das DS ternárias desenvolvidas. A) CC e B) HCTZ. \* representa resultados estatisticamente diferentes quando comparados aos respectivos fármacos amorfos ( $p < 0,05$ ).



Na Figura 53, é possível observar que praticamente todas as DS ternárias desenvolvidas com o carreador polimérico HPMCAS M promoveram extensão de supersaturação superior àquela dos fármacos associados moídos, com exceção da DS CH30 para o fármaco CC, que apresentou resultado de AUC superior, porém não estatisticamente diferente da AUC obtida para a amostra dos fármacos associados moídos ( $p > 0,05$ ). Os valores de AUC obtidos para o fármaco HCTZ para todas as

formulações desenvolvidas foram estatisticamente diferentes daquele obtido para os fármacos associados moídos ( $p < 0,05$ ).

Assim como para as DS desenvolvidas para os fármacos isolados (Capítulo 3), a DS CH30, produzida para os fármacos associados com a maior carga de polímero (m/m), apresentou os menores valores de AUC e menor extensões de supersaturação para ambos os fármacos, demonstrando que o uso de altas concentrações deste polímero não é benéfico com relação à extensão da supersaturação atingida.

Dentre as formulações testadas, as DS CH50 e CH70 promoveram as maiores extensões de supersaturação para ambos os fármacos, evidenciadas pelos maiores valores de AUC apresentados. A DS CH 50 obteve o maior valor de AUC dentre as formulações desenvolvidas, enquanto que para o fármaco HCTZ este maior valor foi alcançado pela DS CH70. No entanto, para o fármaco HCTZ, as formulações CH50 e CH70 não apresentaram valores de AUC estatisticamente diferentes quando comparadas entre si ( $p > 0,05$ ), sendo a performance de extensão e manutenção de supersaturação promovida por estas formulações para este fármaco considerada semelhante.

Apesar das DS ternárias apresentarem a capacidade de geração e manutenção de supersaturação *in vitro* dos fármacos HCTZ e CC em meio FaSSIF, é interessante observar que seu comportamento nos estudos de supersaturação *in vitro* foi diferente daquele apresentado pelas DS desenvolvidas com os fármacos isoladamente, resultados estes demonstrados no Capítulo 3.

Para o fármaco CC, a DS CC30, que apresentou melhor performance de supersaturação *in vitro*, alcançou a concentração máxima de CC solúvel em FaSSIF de aproximadamente 700  $\mu\text{g/mL}$ , e valor de AUC de aproximadamente 950000  $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Já a DS ternária CH50 foi capaz de promover a solubilização máxima de cerca de 400  $\mu\text{g/mL}$  deste fármaco, obtendo um valor aproximado de AUC de aproximadamente 450000  $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para o fármaco HCTZ, este comportamento foi inverso, onde a DS CH70 (DS ternária) e HZ70 (DS obtida apenas com o fármaco HCTZ) apresentaram valores de solubilidade máxima do fármaco em FaSSIF de aproximadamente 5.000  $\mu\text{g/mL}$  e 3.800  $\mu\text{g/mL}$ , e valores de AUC aproximados de  $5,25 \times 10^6$  e  $4,0 \times 10^6$   $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

Este comportamento diferente entre as formulações desenvolvidas pode ser explicado, em primeiro lugar, pelo aumento considerável da massa do fármaco CC adicionada ao meio nos estudos de supersaturação conduzidos com as DS ternárias.

Estes estudos foram planejados de modo a se adicionar ao meio FaSSIF massa das formulações de DS ternárias equivalentes a 100 mg de HCTZ, sendo esta a mesma massa aplicada para os estudos de supersaturação *in vitro* realizados para as DS contendo apenas a HCTZ.

Como nas DS ternárias desenvolvidas os fármacos CC e HCTZ se encontram associados na proporção de 56:44, respectivamente, a massa aproximada de CC adicionada ao meio FaSSIF foi de aproximadamente 127 mg, enquanto que nos estudos de supersaturação *in vitro* realizados para as DS desenvolvidas apenas com o fármaco CC (Capítulo 3), esta massa foi de aproximadamente 7,71 mg apenas.

Sabe-se que o potencial químico de um sistema supersaturado é aumentado quando comparado à condição de saturação. Por consequência, quanto maior o potencial químico do sistema supersaturado, maior a tendência de precipitação do fármaco. (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009). Assim, a maior quantidade do fármaco CC amorfo adicionado ao meio a partir das DS ternárias pode ter aumentado o potencial químico do sistema e induzido a maior precipitação deste fármaco no meio.

Por outro lado, observa-se que a presença do fármaco CC aparentemente proporcionou uma condição mais favorável para a solubilização do fármaco HCTZ no meio aquoso FaSSIF.

### **5.3.4 Estudos de estabilidade**

Estudos de estabilidade foram conduzidos para avaliar a influência dos fatores ambientais e condições de armazenamento na tendência de recristalização e perfis de supersaturação *in vitro* das DS ternárias selecionadas. Nos estudos de supersaturação *in vitro* realizados, a DS CH50 obteve resultados superiores de AUC para o fármaco CC, enquanto que as DS CH50 e CH70 obtiveram os maiores valores de AUC para o fármaco HCTZ. Deste modo, estas duas formulações foram selecionadas para a condução dos estudos de estabilidade físico-químicos. Estudos de estabilidade também foram conduzidos com os fármacos associados moídos, para fins de comparação.

#### **5.3.4.1 Difração de raios X de pó**

Os resultados obtidos para as análises de DRX realizadas encontram-se demonstradas da Figura 54 a Figura 57 abaixo.

Figura 54 - Difratoogramas obtidos para os fármacos associados moídos e DS ternárias armazenadas a 4 °C/0% UR

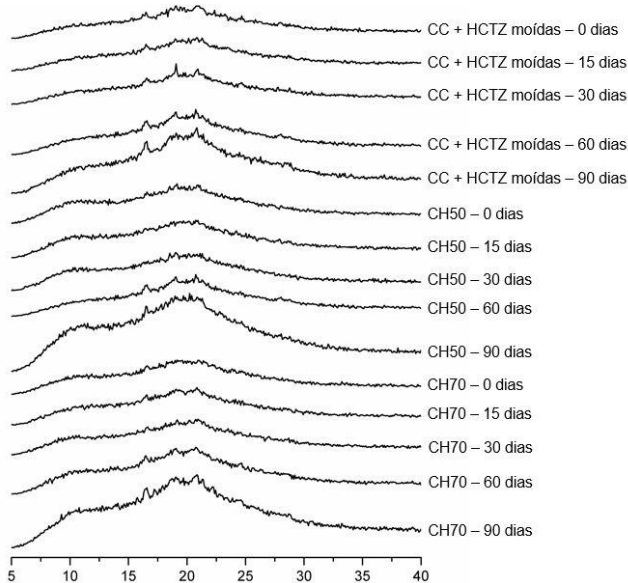


Figura 55 - Difratoogramas obtidos para os fármacos associados moídos e DS ternárias armazenadas a 30 °C/0% UR

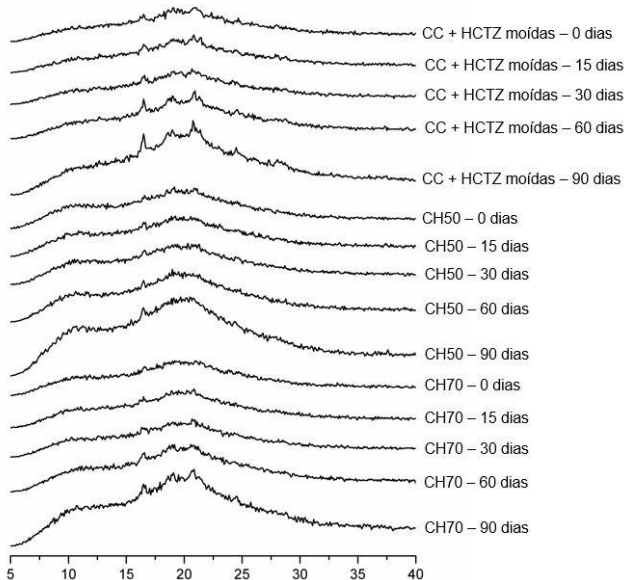


Figura 56 - Difratoogramas obtidos para os fármacos associados moídos e DS ternárias armazenadas a 30 °C/75% UR

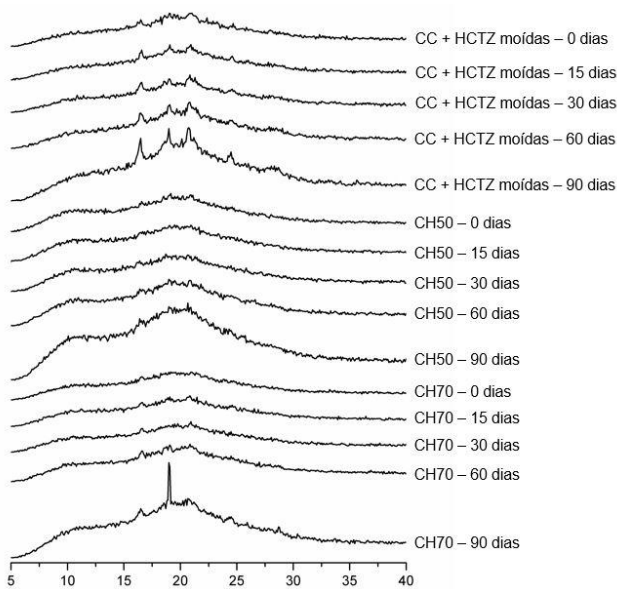
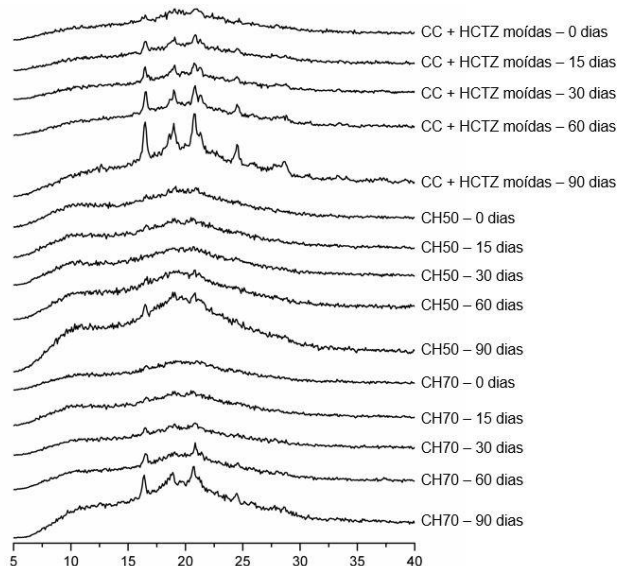


Figura 57 - Difratoogramas obtidos para os fármacos associados moídos e DS ternárias armazenadas a 40 °C/75% UR



Os difratogramas obtidos para as amostras em estabilidade demonstraram que tanto os fármacos associados moídos quanto as DS ternárias desenvolvidas possuem menor tendência à recristalização quando armazenados em baixa temperatura e protegidos da umidade, sendo a umidade a condição mais crítica quanto à indução da recristalização das formulações.

De fato, a literatura relata que a água absorvida pelas DS a partir do ambiente age como um agente plastificante, capaz de destruir as interações fármaco/polímero e aumentar significativamente a mobilidade molecular, levando à imiscibilidade do sistema e consequentemente acelerando a recristalização em estado sólido (CHEN *et al.*, 2018; FRANÇA *et al.*, 2017; LUST *et al.*, 2015). Ainda, é relatado que o armazenamento abaixo da Tg dos fármacos pode prevenir a cristalização e aumentar a estabilidade física dos fármacos amorfos (SCHAMMÉ *et al.*, 2015).

Nos difratogramas obtidos para as amostras armazenadas a 4 °C/0% UR (Figura 54), pequenas reflexões características da recristalização foram evidenciadas para os fármacos associados moídos a partir de 30 dias de armazenamento, e para as DS ternárias a partir de 60 dias de armazenamento.

Já as amostras armazenadas nas condições ambientais mais drásticas testadas, 40 °C/75% UR (Figura 57), demonstraram reflexões características de recristalização em estado sólido a partir de 15 dias para os fármacos associados moídos. Para as DS ternárias, é possível observar que a DS CH50 apresentou pequenas reflexões somente aos 90 dias de armazenamento, enquanto que a DS CH70 apresentou estas reflexões a partir dos 30 dias de armazenamento sob estas condições de temperatura e umidade.

Sabe-se que os polímeros atuam inibindo a recristalização de sólidos amorfos, e DS mais estáveis costumam ser obtidas com cargas de polímero mais elevadas (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016b; GUO; SHALAEV; SMITH, 2013). Os resultados obtidos nas análises de DRX realizadas para acompanhamento da estabilidade física das DS demonstraram que, de fato, a incorporação dos fármacos em uma matriz polimérica demonstrou aumentar a estabilidade física dos mesmos com relação à tendência de recristalização em estado sólido, assim como a DS CH50, que possui carga de 50% p/p de HPMCAS M, apresentou maior estabilidade frente à recristalização que a DS CH70, que possui carga polimérica de 30% p/p.

É interessante destacar que a possível interação entre os fármacos por meio de ligações de hidrogênio aumentou a estabilidade física dos



fármacos associados moídos e possivelmente das formulações ternárias desenvolvidas. Conforme demonstrado nos estudos de estabilidade conduzidos para as formulações obtidas com os fármacos isolados CC30 e HZ70 (Capítulo 3), o fármaco CC amorfo demonstrou estabilidade frente à recristalização, enquanto que o fármaco HCTZ amorfo apresentou alta tendência à recristalização em estado sólido. Quando os resultados de DRX obtidos no estudo de estabilidade dos fármacos associados moídos são comparados aos resultados obtidos para o fármaco HCTZ amorfo (Capítulo 3, item 4.3.5), fica evidente que a presença do fármaco CC retardou a cristalização da HCTZ em estado sólido, o que pode ser atribuído à miscibilidade e interação entre os mesmos.

### 5.3.2.2 Teor e perfil de supersaturação *in vitro*

Os resultados de teor obtidos para as amostras dos fármacos associados moídos e DS CH50 e CH70 recém produzidas (tempo zero) e após 90 dias armazenadas sob as diferentes condições estudadas encontram-se demonstrados na Tabela 19 e Tabela 20.

Tabela 19 - Teor de CC nas amostras de estabilidade de CC + HCTZ, DS CH50 e DS CH70 nos tempos zero e 90 dias de armazenamento

<i>Amostra</i>	<i>Condição de armazenamento</i>	<i>Teor (%) - Tempo zero</i>	<i>Teor (%) - Tempo 90 dias</i>
CC + HCTZ moídas	4 °C/0% UR	97,5	98,2
	30 °C/0% UR		99,0
	30 °C/75% UR		98,9
	40 °C/75% UR		97,8
DS CH50	4 °C/0% UR	96,8	97,1
	30 °C/0% UR		97,7
	30 °C/75% UR		98,6
	40 °C/75% UR		95,0
DS CH70	4 °C/0% UR	97,2	98,7
	30 °C/0% UR		96,7
	30 °C/75% UR		95,4
	40 °C/75% UR		95,5

Nestas tabelas, observa-se que o teor tanto do fármaco CC quanto do fármaco HCTZ se manteve estável nas amostras de estabilidade ao longo dos 90 dias do estudo. As variações nos valores de teor entre o tempo zero e o tempo 90 dias foram inferiores a 2,0%, sendo estas

atribuídas a variações inerentes à técnica de quantificação aplicada para análises realizadas nos diferentes tempos de estudo.

Tabela 20 - Teor de HCTZ nas amostras de estabilidade de CC + HCTZ, DS CH50 e DS CH70 nos tempos zero e 90 dias de armazenamento

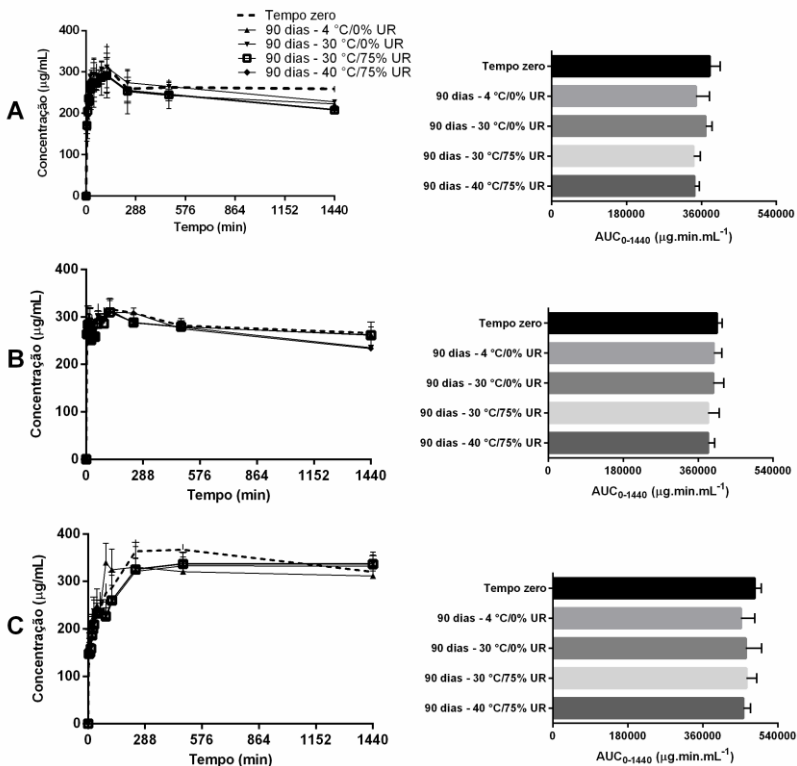
<i>Amostra</i>	<i>Condição de armazenamento</i>	<i>Teor (%) - Tempo zero</i>	<i>Teor (%) - Tempo 90 dias</i>
CC + HCTZ moídas	4 °C/0% UR	103,6	103,8
	30 °C/0% UR		104,8
	30 °C/75% UR		101,8
	40 °C/75% UR		103,1
DS CH50	4 °C/0% UR	100,3	98,9
	30 °C/0% UR		99,0
	30 °C/75% UR		98,7
	40 °C/75% UR		99,6
DS CH70	4 °C/0% UR	102,4	101,8
	30 °C/0% UR		101,2
	30 °C/75% UR		100,6
	40 °C/75% UR		103,5

Os resultados de perfil de supersaturação *in vitro* e AUC obtidos para as amostras dos fármacos associados moídos e DS CH50 e CH70 recém produzidas (tempo zero) e após 90 dias armazenadas sob as diferentes condições estudadas encontram-se demonstrados na Figura 58 e Figura 59.

Nos perfis de supersaturação *in vitro* obtidos para o fármaco CC, observou-se que não houve diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ) nos valores de AUC entre o tempo zero e o tempo 90 dias para todas as condições de armazenamento, e os perfis de supersaturação demonstraram características semelhantes entre si. Estes resultados comprovam a estabilidade das amostras frente às diferentes condições de armazenamento aplicadas, e a manutenção da capacidade de promoção de supersaturação do fármaco CC em meio FaSSiF destas formulações, mesmo após o armazenamento sob condições elevadas de temperatura e umidade.

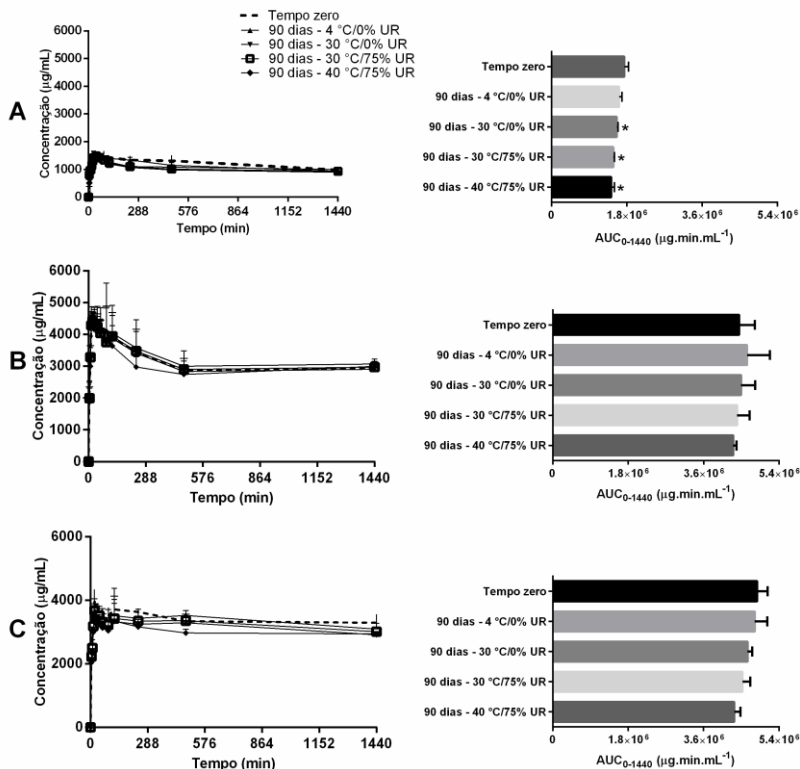
Para o fármaco HCTZ, é possível perceber que os valores de AUC apresentaram pequeno decaimento a medida que a temperatura e umidade foram aumentadas. No entanto, estes valores se apresentaram estatisticamente semelhantes ( $p>0,05$ ) entre si.

Figura 58 - Perfis de supersaturação *in vitro* obtidos para o fármaco CC nas amostras de CC + HCTZ moídas (A), DS CH70 (B) e DS CH50 (C) em meio FaSSiF após 90 dias de estudo de estabilidade sob as diferentes condições de armazenamento avaliadas



Apesar das análises de DRX realizadas detectarem pequenos eventos de recristalização dos fármacos aos 90 dias de armazenamento, sobretudo para as condições mais drásticas aplicadas, estas não influenciaram significativamente nos perfis de supersaturação obtidos, comprovando a capacidade destas formulações em gerar e manter a supersaturação do fármaco HCTZ frente às condições de armazenamento e tempo de exposição aplicadas.

Figura 59 - Perfis de supersaturação *in vitro* obtidos para o fármaco HCTZ nas amostras de CC + HCTZ moídas (A), DS CH70 (B) e DS CH50 (C) em meio FaSSIF após 90 dias de estudo de estabilidade sob as diferentes condições de armazenamento avaliadas



## 5.4 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de medicamentos na forma de associação em dose fixa é uma tendência e está se tornando cada vez mais importante de um ponto de vista de saúde pública.

Neste capítulo, DS ternárias contendo os fármacos CC e HCTZ em dose fixa combinada foram desenvolvidas com sucesso utilizando o carreador polimérico HPMCAS M. Assim como para as DS desenvolvidas para estes fármacos de forma isolada (Capítulo 3), a técnica de moagem por moinho de esferas se mostrou efetiva, proporcionando a amorfização dos fármacos e obtendo bons rendimentos de processo. A

natureza amorfa das formulações desenvolvidas foi confirmada por técnicas de caracterização em estado sólido distintas.

Os estudos de supersaturação *in vitro* em condições não-*sink* demonstraram que as DS foram promissoras com relação à geração e manutenção de um estado de supersaturação dos fármacos associados em meio biorelevante FaSSIF. Para o fármaco CC, a DS CH50 demonstrou maior extensão de supersaturação neste meio, enquanto que para o fármaco HCTZ, ambas as DS CH50 e CH70 promoveram supersaturação superior quanto comparada a DS CH30.

As DS CH50 e CH70 foram selecionadas para a condução dos estudos de estabilidade, que demonstrou o potencial dos fármacos associados e do polímero HPMCAS M em reduzir o potencial de recristalização em estado sólido das formulações desenvolvidas, que se mostraram estáveis por até 90 dias nas condições de armazenamento avaliadas.

Também foi possível verificar que as condições de armazenamento aplicadas não interferiram negativamente na geração e manutenção de supersaturação dos fármacos em meio FaSSIF, apesar das análises de DRX terem detectado a presença de pequenas reflexões características de recristalização dos fármacos, sobretudo nas condições mais drásticas de armazenamento aplicadas.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho abordou a obtenção de sistemas supersaturados de liberação de CC e HCTZ na forma de DS amorfas dos fármacos isolados e associados, visando o aumento de sua solubilidade aparente e manutenção do estado de supersaturação em meio aquoso.

Inicialmente, a solubilidade em equilíbrio dos fármacos foi determinada em meio tampão fosfato pH 6,8 e meio biorelevante FaSSIF, com e sem a presença dos polímeros HPMC, HPMCAS L, M ou H e SOL, nas concentrações de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Estes estudos permitiram a comprovação da baixa solubilidade dos fármacos em estudo, sobretudo do fármaco CC, e demonstraram que os polímeros não interferiram na solubilidade em equilíbrio dos mesmos nestes meios.

Estudos de supersaturação *in vitro* foram conduzidos para avaliar o potencial de inibição de precipitação dos polímeros selecionados sobre os fármacos em estudo, e assim permitir a seleção dos carreadores poliméricos mais adequados para compor as DS. Estes estudos foram realizados por diferentes métodos, de acordo com as particularidades dos dois diferentes fármacos estudados, e se mostraram fundamentais para a seleção racional de polímeros para atuar como inibidores de precipitação em DS. A capacidade do polímero HPMCAS tipo M em promover a supersaturação e inibir a precipitação de ambos os fármacos nos dois meios testados foi demonstrada, sendo este um resultado de fundamental importância para possibilitar o desenvolvimento de dispersões sólidas ternárias, que contem ambos os fármacos e um único polímero.

Após a seleção do carreador mais adequado dentre os polímeros avaliados, as DS foram obtidas para os fármacos individualmente, pela técnica de moagem mecânica. A amorfização foi confirmada para todas as formulações obtidas, assim como o teor dos fármacos nas mesmas foi adequado e o rendimento dos processos considerados satisfatórios.

Os estudos de supersaturação *in vitro* das formulações desenvolvidas confirmaram que a estratégia de amorfização e incorporação dos fármacos CC e HCTZ em matrizes de polímero hidrofílico resultou em aumento da solubilidade aparente destes, com geração e manutenção de supersaturação em meio biorelevante FaSSIF. Nestes estudos, as DS de CC se destacaram pelo grande aumento da solubilidade aparente quando comparado com o fármaco cristalino, sobretudo a DS CC30, que atingiu concentrações de aproximadamente 100 vezes o valor de solubilidade em equilíbrio deste fármaco em meio FaSSIF. Para o fármaco HCTZ, apesar do incremento de solubilidade não

ser tão extenso quanto o demonstrado para o fármaco CC, os estudos realizados demonstraram a capacidade de geração e manutenção de supersaturação deste fármaco pelas DS desenvolvidas. Neste contexto, a DS HZ70 teve destaque com relação à extensão da supersaturação gerada em comparação com as demais DS desenvolvidas.

Considerando os resultados obtidos para as DS obtidas com os fármacos individualmente, DS ternárias contendo ambos os fármacos em dose fixa combinada e o polímero HPMCAS tipo M foram desenvolvidas, onde diferentes proporções de polímero foram avaliadas. Assim, como as DS dos fármacos isolados, as DS contendo os fármacos associados demonstraram amorfização adequada e geração de supersaturação dos fármacos em meio aquoso.

Para a caracterização de todas as DS obtidas, dos fármacos cristalinos e dos fármacos amorfos, técnicas de estado sólido foram utilizadas, e se mostraram de fundamental importância para a avaliação destes sistemas. Neste ponto, destaca-se o uso e o potencial da MLP, que foi capaz de detectar pequenos cristais nas amostras, enquanto que as técnicas de DRX e DSC não demonstraram claramente esta presença.

Visando verificar a estabilidade das DS, as mesmas foram armazenadas em diferentes condições ambientais controladas por 90 dias, e acompanhadas durante este período por doseamento por CLAE, técnicas de caracterização em estado sólido e estudos de supersaturação *in vitro*.

Para as DS contendo apenas o fármaco CC, não foi verificada redução significativa de teor do mesmo, bem como quaisquer alterações significativas de sua natureza amorfa durante o período de estudo, confirmando a baixa tendência à recristalização deste fármaco. Os estudos de supersaturação *in vitro* realizados aos 90 dias de estudo igualmente não demonstraram alterações significativas em relação às análises iniciais realizadas. Já para o fármaco HCTZ, foi observada a maior tendência a recristalização deste, sobretudo em presença de umidade, que impactaram diretamente nos estudos de supersaturação realizados. No entanto, quando a HCTZ se encontrava associada ao fármaco CC e ao polímero HPMCAS tipo M na forma de DS ternária, esta tendência à recristalização foi consideravelmente diminuída, assim como não houve prejuízo à geração e manutenção de supersaturação dos fármacos aos 90 dias de estudo, quando comparados aos perfis de supersaturação obtidos no tempo inicial de estudo.

Como complemento importante dos estudos *in vitro* realizados, a DS CC30, que foi considerada a formulação mais promissora desenvolvida com relação à extensão de supersaturação, foi testada em modelo farmacodinâmico *in vivo* quanto à sua capacidade de antagonismo



dos receptores de angiotensina, em comparação ao fármaco CC cristalino. Estes estudos demonstraram que a geração da supersaturação promovida por esta formulação foi capaz de prover resposta aumentada *in vivo*, assim como início de ação mais rápido, comprovando que os SDDS são capazes de melhorar as propriedades biofarmacêuticas de fármacos pouco solúveis como a CC, e conseqüentemente favorecer a sua resposta biológica.

Como perspectivas futuras deste trabalho, citam-se a possibilidade de realização de estudos farmacodinâmicos *in vivo* com as DS HZ70 e HC50, para verificação do seu potencial de aumento da resposta biológica *in vivo*. Com base nestes estudos, formas farmacêuticas sólidas das DS CC30, HZ70 e CH50 poderiam ser desenvolvidas, assim como sua comparação *in vitro* e *in vivo* com os medicamentos de referência disponíveis no mercado. Exemplos destas formas farmacêuticas seriam cápsulas, comprimidos ou ainda sistemas multiparticulados (como *pellets* ou minicomprimidos), que são vantajosos para aumento de perfil de dissolução de fármacos pouco solúveis.



## REFERÊNCIAS

- ACEVES-HERNÁNDEZ, J. M. et al. Experimental and theoretical study of the conformational analysis of hydrochlorothiazide. **Journal of Molecular Structure**, v. 786, n. 1, p. 1–8, 2006.
- AGEN, S. Thermal decomposition of some diuretic agents. **Journal of Thermal Analysis**, v. 46, p. 1291–1299, 1996.
- AL OMARI, A. A. et al. Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of candesartan cilexetil in solution and solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 3, p. 503–509, fev. 2011.
- AL-OBAIDI, H.; BUCKTON, G. Evaluation of griseofulvin binary and ternary solid dispersions with HPMCAS. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1172–1177, 20 dez. 2009.
- ALONZO, D. E. et al. Understanding the behavior of amorphous pharmaceutical systems during dissolution. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p. 608–618, 2010.
- ALONZO, D. E. et al. Dissolution and precipitation behavior of amorphous solid dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 8, p. 3316–3331, ago. 2011.
- ALTAMIMI, M. A.; NEAU, S. H. Investigation of the *in vitro* performance difference of drug-Soluplus and drug-PEG 6000 dispersions when prepared using spray drying or lyophilization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 3, p. 419–439, 2017.
- AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.
- ARUMUGAM, S. et al. Angiotensin receptor blockers : focus on cardiac and renal injury. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 26, n. 3, p. 221–228, 2016.
- ASHLAND INC. **AquaSolve - physical and chemical properties**

**handbook.** Covington: Ashland, 2016.

AUGUSTIJNS, P.; BREWSTER, M. E. Supersaturating drug delivery systems: fast is not necessarily good enough. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 1, p. 7–9, jan. 2012.

BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Theoretical and experimental investigation of drug-polymer interaction and miscibility and its impact on drug supersaturation in aqueous medium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 16–31, 2016a.

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

BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Theoretical and experimental investigation of drug-polymer interaction and miscibility and its impact on drug supersaturation in aqueous medium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 16–31, out. 2016c.

BAKA, E.; COMER, J. E. A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 335–341, 2008.

BARBHAIYA, R. H. et al. Pharmacokinetics of hydrochlorothiazide in fasted and nonfasted subjects: a comparison of plasma level and urinary excretion methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 2, p. 245–248, 1982.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** Viçosa: UFV, 2007.

BARRERAS, A.; GURK-TURNER, C. Angiotensin II receptor blockers. **Bumc Proceedings**, v. 16, p. 123–126, 2003.

BASF PHARMA INGREDIENTS & SERVICES. Soluplus technical information. n. July, p. 1–8, 2010.

- BEVERNAGE, J. et al. Excipient-Mediated Supersaturation Stabilization in Human Intestinal Fluids. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 564–570, 4 abr. 2011.
- BEVERNAGE, J. et al. Supersaturation in human gastric fluids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 184–189, 2012.
- BEVERNAGE, J. et al. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 25–35, ago. 2013.
- BLAGDEN, N. et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 617–630, jul. 2007.
- BOGNER, R. H. et al. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: II. application of quantitative thermodynamic relationships for prediction of solubility enhancement in structurally diverse insoluble pharmaceuticals. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 12, p. 2704–2714, 2010.
- BRASIL. **FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 5ª edição ed. ANVISA, 2010.
- BROUWERS, J.; BREWSTER, M. E.; AUGUSTIJNS, P. Supersaturating drug delivery systems: the answer to solubility-limited oral bioavailability? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 8, p. 2549–2572, ago. 2009.
- BUCKLEY, S. T. et al. Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to “enabling formulations”. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 8–16, set. 2013.
- CAO, X.; YU, L.; SUN, D. Drug Absorption Principles. In: **Biopharmaceutics Applications in Drug Development**. Boston, MA: Springer US, 2008. p. 75–100.
- CDER/FDA. **Hypertension : Developing Fixed- Dose Combination Drugs for Treatment Guidance for Industry Hypertension : Developing Fixed-Dose Combination Drugs for Treatment - Guidance for Industry**. [s.l: s.n.].
- CHEN, H. et al. Moisture-Induced Amorphous Phase Separation of

Amorphous Solid Dispersions: Molecular Mechanism, Microstructure, and Its Impact on Dissolution Performance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 1, p. 317–326, 2018.

CURATOLO, W.; NIGHTINGALE, J. A.; HERBIG, S. M. Utility of hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMCAS) for initiation and maintenance of drug supersaturation in the GI milieu. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 6, p. 1419–1431, 10 jun. 2009.

DARWHEKAR, G. N.; JAIN, D. K.; CHOUHAN, J. Biopharmaceutical classification of candesartan and candesartan cilexetil. **Asian Journal of Pharmacy and Life Science**, v. 2, n. 2, p. 295–302, 2012.

DE SOUZA, C. M. P. et al. Thermal analysis study of solid dispersions hydrochlorothiazide. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1–9, 2017.

DELLY, J. G. Selected topics from essentials of polarized light microscopy. **Microscopy**, 2008.

DESCAMPS, M.; WILLART, J. F. Perspectives on the amorphisation/milling relationship in pharmaceutical materials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 51–66, 2016.

DETROJA, C. Enhanced antihypertensive activity of candesartan cilexetil nanosuspension: formulation, characterization and pharmacodynamic study. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n. 3, p. 635–651, 2011.

DOW. Chemistry of METHOCEL™ cellulose ethers - A technical review chemistry of METHOCEL™ cellulose ethers. p. 16, 2013.

DUIZER, E. et al. Comparison of permeability characteristics of the human colonic Caco-2 and rat small intestinal IEC-18 cell lines. **Journal of Controlled Release**, v. 49, n. 1, p. 39–49, nov. 1997.

DUKECK, R.; SIEGER, P.; KARMWAR, P. Investigation and correlation of physical stability, dissolution behaviour and interaction parameter of amorphous solid dispersions of telmisartan: A drug development perspective. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 723–731, jul. 2013.

EMA. **Guideline on Clinical Development of Fixed Combination Medicinal Products**, 2017.

FRANÇA, M. T. et al. Investigation of novel supersaturating drug delivery systems of chlorthalidone: The use of polymer-surfactant complex as an effective carrier in solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, n. June 2017, p. 142–152, 2017.

GANESAN, P. et al. Development, characterization and solubility enhancement of comparative dissolution study of second generation of solid dispersions and microspheres for poorly water soluble drug. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 5, p. 433–441, out. 2015.

GAO, P.; SHI, Y. Characterization of supersaturatable formulations for improved absorption of poorly soluble drugs. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 4, p. 703–713, 14 dez. 2012.

GAUTAM, C. S.; SAHA, L. Fixed dose drug combinations (FDCs): Rational or irrational: A view point. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 795–796, 2008.

GEÇER, A. et al. Trimethyl chitosan nanoparticles enhances dissolution of the poorly water soluble drug candesartan cilexetil. **Macromolecular Research**, v. 18, n. 10, p. 986–991, 23 out. 2010.

GHOSH, I. et al. Comparison of HPMC based polymers performance as carriers for manufacture of solid dispersions using the melt extruder. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1-2, p. 12–19, out. 2011.

GROHGANZ, H. et al. Amorphous drugs and dosage forms. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 403–408, 2013.

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

GURUNATH, S.; NANJWADE, B. K.; PATILA, P. A. Enhanced solubility and intestinal absorption of candesartan cilexetil solid dispersions using everted rat intestinal sacs. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 3, p. 246–257, jul. 2014.

HANCOCK, B. C.; ZOGRAFI, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 1, p. 1–12, jan. 1997.

HE, Y.; HO, C. Amorphous solid dispersions: utilization and challenges in drug discovery and development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 10, p. 3237–3258, 2015.

HEMMELGARN, B. R. et al. Trends in antihypertensive drug prescriptions and physician visits in Canada between 1996 and 2006. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 24, n. 6, p. 507–512, 2008.

HENS, B. et al. Supersaturation and precipitation of posaconazole upon entry in the upper small intestine in humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2677–2684, set. 2016.

HENS, B. et al. Exploring gastrointestinal variables affecting drug and formulation behavior: methodologies, challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1-2, p. 79–97, mar. 2017.

HOLM, R.; MÜLLERTZ, A.; MU, H. Bile salts and their importance for drug absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 44–55, ago. 2013.

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

HUSAIN, A. et al. A Review on candesartan: pharmacological and pharmaceutical profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 01, n. 10, p. 12–17, 2011.

ILEVBARE, G. A. et al. Understanding polymer properties important for crystal growth inhibition—impact of chemically diverse polymers on solution crystal growth of ritonavir. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 6, p. 3133–3143, 6 jun. 2012.

IONASHIRO, MASSAO; CAIRES, F. J.; GOMES, D. J. C. **Giolito: fundamentos da termogravimetria e análise térmica**



**diferencial/calorimetria exploratória diferencial. Title.** 2ª edição ed. São Paulo: GIZ, 2005.

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

JERMAIN, S. V.; BROUGH, C.; WILLIAMS, R. O. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery – An update. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1-2, p. 379–392, 2018.

KANAUIA, P. et al. Amorphous formulations for dissolution and bioavailability enhancement of poorly soluble APIs. **Powder Technology**, v. 285, p. 2–15, 2015.

KAWAKAMI, K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 480–495, maio 2012.

KLAR, F.; URBANETZ, N. A. Solubility parameters of hypromellose acetate succinate and plasticization in dry coating procedures. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 10, p. 1621–1635, 2016.

KONNO, H. et al. Effect of polymer type on the dissolution profile of amorphous solid dispersions containing felodipine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 493–499, out. 2008.

LAINCAK, M.; VITALE, C.; SEFEROVIC, P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cardiovascular drugs in chronic heart failure. **International Journal of Cardiology**, v. 224, p. 191–198, 2016.

LAITINEN, R. et al. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 65–79, 30 ago. 2013.

LI, B. et al. Stability and solubility enhancement of ellagic acid in cellulose ester solid dispersions. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1443–1450, fev. 2013.

LINN, M. et al. Soluplus as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 336–343, fev. 2012.

LOH, Z. H.; SAMANTA, A. K.; SIA HENG, P. W. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 255–274, 2014.

LU, E.; LI, S.; WANG, Z. Biorelevant test for supersaturable formulation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 9–20, jan. 2017.

LU, J. et al. Compositional effect of complex biorelevant media on the crystallization kinetics of an active pharmaceutical ingredient. **CrystEngComm**, v. 19, n. 32, p. 4797–4806, 2017.

LUST, A. et al. Amorphous solid dispersions of piroxicam and Soluplus: qualitative and quantitative analysis of piroxicam recrystallization during storage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 1-2, p. 306–314, maio 2015.

MAHESH, R. D. et al. Formulation, optimization and characterization of candesartan cilexetil nanosuspension for *in vitro* dissolution enhancement. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 5, p. 102–113, 8 fev. 2015.

MARTINS, R. M. et al. Microparticulated hydrochlorothiazide solid dispersion: enhancing dissolution properties via spray drying. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 959–967, 2012.

MATSUNAGA, H. et al. Solid-state characterization of candesartan cilexetil (TCV-116): crystal structure and molecular mobility. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 182–186, 1999.

MATTEUCCI, M. E. et al. Highly supersaturated solutions from dissolution of amorphous Itraconazole microparticles at pH 6.8. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 2, p. 375–385, 2009.

MENDES, C. et al. Inclusion complexes of hydrochlorothiazide and cyclodextrin: physicochemical characteristics, *in vitro* and *in vivo* studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 71–78, 2016.

MENG, F.; DAVE, V.; CHAUHAN, H. Qualitative and quantitative methods to determine miscibility in amorphous drug-polymer systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 106–111, 2015.

MILLER, J. M. et al. A win-win solution in oral delivery of lipophilic drugs: supersaturation via amorphous solid dispersions increases apparent solubility without sacrifice of intestinal membrane permeability. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 7, p. 2009–2016, 2012.

MITRA, A. et al. Impact of polymer type on bioperformance and physical stability of hot melt extruded formulations of a poorly water soluble drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, n. 1-2, p. 107–114, maio 2016.

MOSQUERA-GIRALDO, L. I. et al. Mechanistic design of chemically diverse polymers with applications in oral drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 11, p. 3659–3671, 2016.

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

NEKKANTI, V. et al. Development and characterization of solid oral dosage form incorporating candesartan nanoparticles. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 14, n. 3, p. 290–298, jun. 2009.

NEKKANTI, V. et al. Solid self-microemulsifying formulation for candesartan cilexetil. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 9–17, 15 mar. 2010.

NEWMAN, A. (PHARMACEUTICAL SCIENTIST). **Pharmaceutical amorphous solid dispersions**. Wiley, 2015.

PARK, H. J. et al. Coprecipitation of hydrochlorothiazide/PVP for the dissolution rate improvement by precipitation with compressed fluid antisolvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 126, p. 37–46, 2017.

PATEL, R. B. et al. Bioavailability of Hydrochlorothiazide from Tablets and Suspensions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 3, p. 359–361, mar. 1984.

PAUDEL, A. et al. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 253–284, 2013.

PINTO, J. M. O. et al. HPMCAS as an effective precipitation inhibitor in amorphous solid dispersions of the poorly soluble drug candesartan cilexetil. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, n. September 2017, p. 199–206, 2018.

PIRES, M. A. S.; DOS SANTOS, R. A. S.; SINISTERRA, R. D. Pharmaceutical composition of hydrochlorothiazide:cyclodextrin: preparation by three different methods, physico-chemical characterization and *in vivo* diuretic activity evaluation. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4482–4499, 2011.

QIU, Y. et al. **Developing solid oral dosage forms**. Academic Press, 2017.

RAINA, S. A. et al. Trends in the precipitation and crystallization behavior of supersaturated aqueous solutions of poorly water-soluble drugs assessed using synchrotron radiation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 6, p. 1981–1992, jun. 2015.

REINTJES, T. Solubility enhancement with BASF pharma polymers. **BASF The Chemical Company**, 2011.

RIETHORST, D. et al. An in-depth view into human intestinal fluid colloids: intersubject variability in relation to composition. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 3484–3493, 3 out. 2016.

RUBBENS, J. et al. Gastrointestinal dissolution, supersaturation and precipitation of the weak base indinavir in healthy volunteers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 109, p. 122–129, dez. 2016.

SATTURWAR, P. et al. pH-responsive polymeric micelles of poly(ethylene glycol)-b-poly(alkyl(meth)acrylate-co-methacrylic acid): influence of the copolymer composition on self-assembling properties and release of candesartan cilexetil. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 379–387, mar. 2007.

SAYYAD, F. J.; TULSANKAR, S. L.; KOLAP, U. B. Design and

development of liquisolid compact of candesartan cilexetil to enhance dissolution. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 5, p. 381–388, 2013.

SCHAMMÉ, B. et al. Crystallization kinetics and molecular mobility of an amorphous active pharmaceutical ingredient: a case study with biclotymol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, p. 248–257, 2015.

SCHMIEDER, R. E. Mechanisms for the clinical benefits of angiotensin II receptor blockers. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 5, p. 720–730, 2005.

SHAH, N. et al. **Amorphous solid dispersions**. New York, NY: Springer New York, 2014.

SHAMMA, R. N.; BASHA, M. Soluplus: a novel polymeric solubilizer for optimization of carvedilol solid dispersions: formulation design and effect of method of preparation. **Powder Technology**, v. 237, p. 406–414, mar. 2013.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. **Spectrometric identification of organic compounds**, 1998.

SINGH, A.; VAN DEN MOOTER, G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 27–50, maio 2016.

SOTTHIVIRAT, S. et al. Development of amorphous solid dispersion formulations of a poorly water-soluble drug, MK-0364. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 452, n. 1-2, p. 73–81, ago. 2013.

SUN, D. D.; WEN, H.; TAYLOR, L. S. Non-Sink dissolution conditions for predicting product quality and *in vivo* performance of supersaturating drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2477–2488, set. 2016.

SUN, M. et al. Solvent-shift strategy to identify suitable polymers to inhibit humidity-induced solid-state crystallization of lacidipine amorphous solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 503, n. 1-2, p. 238–246, abr. 2016.

SURAMPALLI, G. et al. Novel tablet formulation of amorphous candesartan cilexetil solid dispersions involving P-gp inhibition for optimal drug delivery:

*in vitro* and *in vivo* evaluation. **Drug Delivery**, p. 1–15, 31 jul. 2014.

TANNO, F. et al. Evaluation of hypromellose acetate succinate (HPMCAS) as a carrier in solid dispersions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 1, p. 9–17, 2 jan. 2004.

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

THAKRAL, S. et al. Recent advances in the characterization of amorphous pharmaceuticals by X-ray diffractometry. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 183–193, 2016.

THIRY, J. et al. Investigation of a suitable *in vitro* dissolution test for itraconazole-based solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 94–105, mar. 2016.

TSUME, Y. et al. The biopharmaceutics classification system: subclasses for *in vivo* predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 152–163, 2014.

UEDA, K. et al. Inhibition mechanism of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug crystallization in gastrointestinal fluid and drug permeability from a supersaturated solution. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 293–300, 2014a.

UEDA, K. et al. The effect of HPMCAS functional groups on drug crystallization from the supersaturated state and dissolution improvement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 464, n. 1-2, p. 205–213, abr. 2014b.

UEDA, K. et al. Equilibrium state at supersaturated drug concentration achieved by hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate: molecular characterization using NMR technique. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, p. 1096–1104, 6 abr. 2015.

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

VACULIKOVA, E. et al. Preparation of hydrochlorothiazide nanoparticles

for solubility enhancement. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1–8, 2016.

VAN EERDENBRUGH, B.; BAIRD, J. A.; TAYLOR, L. S. Crystallization tendency of active pharmaceutical ingredients following rapid solvent evaporation - Classification and comparison with crystallization tendency from undercooled melts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 9, p. 3826–3838, 2010.

VANDECRUYS, R. et al. Use of a screening method to determine excipients which optimize the extent and stability of supersaturated drug solutions and application of this system to solid formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, n. 1-2, p. 168–175, 2007.

VASCONCELOS, T. et al. Amorphous solid dispersions: rational selection of a manufacturing process. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 85–101, maio 2016.

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

WARREN, D. B. et al. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: a mechanistic basis for utility. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 10, p. 704–731, 26 dez. 2010.

WEBSTER, G. K.; JACKSON, J. D.; BELL, R. G. **Poorly soluble drugs: dissolution and drug release**. Pan Stanford, 2017.

WHO. **Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products** WHO Technical Report, 2005.

WILLIAMS, H. D. et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 315–499, 3 fev. 2013.

XIA, D. et al. Supersaturated polymeric micelles for oral cyclosporine A delivery: the role of Soluplus–sodium dodecyl sulfate complex. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 301–310, maio 2016.

XU, S.; DAI, W.-G. Drug precipitation inhibitors in supersaturable

formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 36–43, ago. 2013.

YAMASHITA, T.; OZAKI, S.; KUSHIDA, I. Solvent shift method for anti-precipitant screening of poorly soluble drugs using biorelevant medium and dimethyl sulfoxide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1-2, p. 170–174, out. 2011.

YUCE, M. et al. Preformulation of immediate release candesartan cilexetil tablets using full factorial experimental design. **Latin America Journal of Pharmacy**, v. 35, n. 5, p. 921–930, 2016.

ZHOU, D. et al. Physical stability of amorphous pharmaceuticals: Importance of configurational thermodynamic quantities and molecular mobility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 8, p. 1863–1872, 2002.

ZHOU, L. et al. Transport characteristics of candesartan in human intestinal Caco-2 cell line. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 30, n. 5, p. 259–264, jul. 2009.