

Gabriela Julianelly Sartori

**Desenvolvimento de nanocristais de efavirenz para incremento  
do perfil de dissolução**

Rio de Janeiro

2016

Gabriela Julianelly Sartori

**Desenvolvimento de nanocristais de efavirenz para incremento do perfil  
de dissolução**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientador: Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Rio de Janeiro  
2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos /  
FIOCRUZ - RJ

S251d

Sartori, Gabriela Julianelly

Desenvolvimento de nanocristais de efavirenz para incremento do perfil de dissolução. / Gabriela Julianelly Sartori . – Rio de Janeiro, 2016.

xv, 138f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2016.

Bibliografia: f. 142-150

1. Efavirenz. 2. Nanocristais. 3. Precipitação por antissolvente.  
4. Tamanho de partícula. 5. Potencial zeta. 6. Perfil de dissolução.  
7. Título.

CDD 615.1

Gabriela Julianelly Sartori

**Desenvolvimento de nanocristais de efavirenz para incremento do perfil  
de dissolução**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha  
(Orientador – Presidente da Banca)  
Farmanguinhos – FIOCRUZ

---

Prof. Dr. Jorge Carlos Santos da Costa  
Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde – FIOCRUZ

---

Profa. Dra. Karen Medeiros Gonçalves  
Farmanguinhos – FIOCRUZ

---

Prof. Dr. Jackson Antônio Lamounier Camargos Resende  
Instituto de Química – UFF

Rio de Janeiro

2016

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar determinação para completar mais esta etapa em minha vida.

Aos meu pais Sandra e Oswaldo por seu apoio e conselhos obtidos para cada uma das decisões que enfrentei.

Ao meu marido Gustavo R. M. Sales por toda sua compreensão e seu amor nunca me deixando esmorecer, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Helvécio V. A. Rocha pela sua disponibilidade em ouvir minhas ideias e sanar minhas dúvidas assim como por acreditar na minha capacidade de realizar esse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pelo ambiente de trabalho convidativo e agradável, em especial às colegas Livia D. Prado e Karen M. Gonçalves que me ajudaram em muitos momentos me transmitindo seus conhecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica por permitirem a utilização de seu espaço para meus experimentos.

Aos laboratórios parceiros bem como todos os funcionários envolvidos no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim aos professores do curso com que eu pude ter a grande oportunidade de aprender, melhorar profissionalmente e crescer como indivíduo.

## EPÍGRAFE

A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda

Albert Einstein

## RESUMO

SARTORI, Gabriela Julianelly. Desenvolvimento de nanocristais de efavirenz para incremento do perfil de dissolução. 2016. 155f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

O efavirenz é um antirretroviral amplamente utilizado no tratamento de HIV, porém este fármaco encontra problemas de biodisponibilidade devido à sua baixa dissolução em meio aquoso. Nanocristais de fármaco são uma forma considerada segura de aumentar a dissolução sem promover uma alteração na molécula. Seu preparo pode ser feito por diferentes técnicas, uma delas é a nanocristalização por antissolvente. Que consiste na precipitação de fármaco a partir de uma fase orgânica, inserindo-a em uma fase aquosa, na qual o fármaco é pouco solúvel. Esta técnica é considerada promissora pois frente a outros tipos de método de preparo tem menor demanda energética, de tempo e custo. O uso de nanocristais preparados por esta técnica é uma alternativa promissora para alcançar o incremento da dissolução. No presente trabalho foram preparados nanocristais de efavirenz testando-se diferentes condições experimentais. Como resultado foram obtidas suspensões que foram levadas então a secagem. O pó obtido foi caracterizado por técnicas de espectroscopia de IV, para identificação da estrutura química; DRX para verificação da cristalinidade e MEV a fim de observar a morfologia das partículas formadas. Também foi realizado ensaio de dissolução por dispersão. Uma vez obtidos os perfis das amostras, foi possível comparar os resultados e realizar alterações necessárias a fim de otimizar uma formulação como alterações nas concentrações de estabilizantes, no grau de saturação do sistema, no método de agitação, dentre outras. Também foi realizado um estudo inicial acerca da estabilidade física das suspensões formadas utilizando técnicas de espalhamento de luz. Por fim, foram encontradas algumas formulações que promoveram grande incremento na dissolução, a que teve melhor desempenho combinava uso de precipitação seguida por moagem em moinho coloidal. A análise da suspensão mostrou controle eficaz do tamanho de partícula, no que diz respeito tanto ao tamanho em escala nanométrica quanto redução na polidispersão das partículas; foi visto por DRX que esta amostra manteve a mesma estrutura cristalina da matéria-prima, no IV não foi revelada qualquer reação química entre EFV e estabilizantes. O ensaio de dissolução apresentou incremento significativo do perfil, atingindo 98% de eficiência de dissolução.

Palavras-chave: Efavirenz. Nanocristais. Precipitação por antissolvente. Tamanho de partícula. Potencial zeta. Perfil de dissolução.

## ABSTRACT

Development of efavirenz nanocrystals for enhancing the dissolution profile.

Efavirenz is an antiretroviral widely used in the treatment of HIV, but this drug has bioavailability problems due to their low dissolution in an aqueous medium. Drug nanocrystals are considered a safe way to enhance dissolution without causing a change in the molecule. They can be prepared by different techniques, one of which is nanocrystallization by antisolvent. It constitutes in drug precipitation from an organic phase by adding it in an aqueous phase, in which the drug is poorly soluble. This technique is considered promising when compared to other preparation methods due to low energy, time and cost required. The use of nanocrystals prepared by this technique is a promising alternative to achieve a dissolution enhancement. In the present work, we prepared efavirenz nanocrystals by testing different experimental conditions. The obtained suspensions were dried. The powder was characterized by IR spectroscopy techniques for identification of chemical structure, XRD for verifying the crystallinity and SEM in order to observe the morphology of the particles. The dissolution test by dispersion was also conducted. Once obtained the profiles of the samples, it was possible to compare the results and make necessary changes to optimize the formulations such as, changes in stabilizers concentrations, the degree of system saturation and the agitation method, among others. An initial study on the physical stability of the suspensions formed, using light scattering techniques was also carried out. Finally, we found some formulations that promoted large increase in dissolution profile. The one with the best performance combined precipitation followed by grinding in colloid mill. The suspension analysis exhibited effective control of particle size, as regards both the size at the nanometer scale as the reduction in the polydispersity of the particles; XRD showed that the sample maintained the same crystal structure of the raw material; the IV did not revealed any chemical reaction between EFV and stabilizers. The dissolution test presented large enhancement of the profile, reaching 98% dissolution efficiency.

Keywords: Efavirenz. Nanocrystals. Anti-solvent precipitation. Bioavailability. Dissolution profile

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do EFV (BRASIL, 2010)	18
Figura 2. DSC da forma II do EFV (modificado de RADESCA et al., 1999)	21
Figura 3. EFV forma I: (a) dupla hélice vista sobre o eixo c. A inserção mostra a formação das cadeias de dupla hélice; (b) empacotamento das hélices.	21
Figura 4. Sequência de eventos decorrentes desde a administração até o momento do efeito desejado (adaptado de AULTON, 2002)	23
Figura 5. Diagrama espinha de peixe mostrando vários fatores independentes que podem influenciar a qualidade do processo de precipitação (Adaptado de SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).	29
Figura 6. Fórmulas estruturais do LSS e dos monômeros de HPMC, PVP e PVA.	33
Figura 8. Fluxograma dos processos de cristalização de EFV	47
Figura 9. Esquema básico dos experimentos de precipitação por antissolvente	48
Figura 10. Fluxograma representativo da marcha experimental seguida (as formulações referentes às amostras citadas encontram-se descritas na Tabela 4 e na Tabela 5)	48
Figura 11. Aspecto das amostras: a) amostra TX2 logo após o preparo; b) matéria-prima; c) amostra TX7 após secagem.	58
Figura 12. Comparação da morfologia das partículas da matéria-prima com as das amostras TX1, TX2 e TX3.	60
Figura 13. Comparação dos espectros de IV obtidos das amostras com o espectro obtido a partir do EFV matéria-prima.	61
Figura 14. Padrões de difração das amostras TX1, TX2 e TX3 em comparação com padrão de difração da matéria-prima e padrão calculado do polimorfo I	63
Figura 15. Imagens das amostras relativas ao aumento de HPMC obtidas no MEV.	65
Figura 16. Comparação dos espectros de IV de amostras TX3, TX4, TX6 e TX7 com o espectro do EFV.	66
Figura 17. Padrões de difração das amostras TX4, TX6 e TX7 em comparação com padrão de difração da matéria-prima e padrão calculado do polimorfo I	68
Figura 18. Imagens das amostras relativas ao aumento de LSS obtidas no MEV. Aumento utilizado: 10000 vezes.	70
Figura 19. Comparação do espectro de IV obtido com a amostra TX5 com o espectro no IV da matéria-prima.	71
Figura 20. Padrão de difração da amostra TX5 em comparação com padrão de difração da matéria-prima e padrão calculado do polimorfo I	72
Figura 21. Perfis de dissolução obtidos nos meios LSS 0,5% e LSS 0,1%.	74
Figura 22. Comparação dos perfis de dissolução de TX1, TX2 e TX3 com EFV matéria-prima.	75
Figura 23. Comparação entre os perfis da matéria-prima e amostras TX4, TX6 e TX7	76
Figura 24. Comparação dos perfis de dissolução de TX5 e TX4 com o da matéria-prima.	78
Figura 25. Comparação dos ângulos de contato sólido-líquido das amostras TX1, TX5 e TX7 com a matéria-prima.	79
Figura 26. Comparação dos perfis de dissolução de TX7 e TX5, relacionando-os aos seus ângulos de contato.	81
Figura 27. Distribuição de tamanho de partícula de TX10.	83
Figura 28. Distribuição de tamanho de partícula de TX11.	84
Figura 29. Fotomicrografias de TX8, TX9 e TX10.	86

Figura 30. Comparação dos espectros de absorção no IV das amostras TX8, TX9 e TX10 com o da matéria-prima. _____	87
Figura 31. Comparação dos padrões de difração de TX8, TX9 e TX10 com o padrão calculado para Forma I do EFV. _____	89
Figura 32. Comparação dos perfis de dissolução de TX8, TX9 e TX10 como o do EFV. _____	92
Figura 33. Distribuição de tamanho de partícula de TX12 _____	93
Figura 34. Comparação das distribuições de tamanho de partícula de TX13 pré-moagem e pós-moagem. _____	95
Figura 35. Distribuição de tamanho de partícula de TX15 e TX16. _____	97
Figura 36. Fotomicrografias de TX12, TX13 e TX14. _____	99
Figura 37. Ordem decrescente de solubilidade dos solventes (SCHIRMER, 2000). _	100
Figura 38. Comparação dos espectros de absorção das amostras TX12, TX13 e TX14 com o da matéria-prima. _____	101
Figura 39. Comparação dos padrões de difração de TX12, TX13 e TX14, com tempo de 0,01 segundos, com o calculado para a forma I. _____	103
Figura 40. Resultados de DRX de TX12 e TX13 com tempo de 0,5 segundos. _____	104
Figura 41. Comparação entre os perfis de dissolução de TX9, TX12, TX13 e TX14. _____	107
Figura 42. Aspecto das suspensões logo após o preparo e passados 90 minutos. _____	112
Figura 43. Comparação dos resultados obtidos nas análises de tamanho de partícula. _____	114
Figura 44. Comparação entre as distribuições de tamanho de partícula de SN5, SN6, SN7 e SN8. _____	118
Figura 45. Curvas de distribuição de tamanho de partículas de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14. _____	121
Figura 46. Comparação entre as magnitudes de potencial zeta nas amostras SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14. _____	122
Figura 47. Comparação entre os dados brutos de retroespalhamento das amostras SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14. O eixo das abcissas é composto pela altura do tubo de amostra (mm) e o eixo das ordenadas é composto pelo $\Delta$ BS (%). _____	125
Figura 48. Comparação dos TSI globais de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14 ao longo de uma hora de análise. _____	126
Figura 49. Fotomicrografias de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14. _____	127
Figura 50. Espectros de absorção no IV de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14. _____	129
Figura 51. Padrões de difração de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14. _____	130
Figura 52. Padrões de difração de SN9, SN10, SN12 e SN13 com tempo 0,5 segundos. _____	130
Figura 53. Comparação dos perfis de dissolução de SN9, SN10 e SN11 com o do EFV. _____	132
Figura 54. Comparação dos perfis de dissolução de SN12, SN13 e SN14 com o EFV. _____	134
Figura 55. Comparação dos perfis de dissolução das amostras TX7, TX9, TX13 e SN11 com a matéria-prima. _____	136

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aspectos gerais das diferentes técnicas bottom-up de preparo de nanocristais (modificado de DE WAARD; FRIJLINK; HINRICHS, 2011).	27
Tabela 2. Métodos para atingir supersaturação e possíveis resultados obtidos com relação ao processo de nucleação e ao tamanho das partículas em suspensão.	31
Tabela 3. Comparação dos estudos sobre nanocristais de Jain e colaboradores (2013); Patel e colaboradores (2014); Ye e colaboradores (2015).	40
Tabela 4. Relação dos experimentos realizados com ultra-turrax.	49
Tabela 5. Relação dos experimentos realizados com sonicador.	50
Tabela 6. Teste de solubilidade para determinar o solvente para a precipitação	56
Tabela 7. Teor de EFV das amostras.	73
Tabela 8. Relação do ângulo de contato líquido-sólido com a quantidade de EFV dissolvida em 90 minutos.	80
Tabela 9. Relação dos picos de diâmetro médio e potencial zeta de TX10	83
Tabela 10. Relação dos picos de diâmetro médio e potencial zeta de TX11	84
Tabela 11. Teor de EFV das amostras TX8, TX9 e TX10.	90
Tabela 12. Comparação dos dados obtidos a partir da dissolução de TX8, TX9 e TX10, com os da dissolução da matéria-prima.	90
Tabela 13. Relação dos picos de diâmetro médio e potencial zeta de TX12.	94
Tabela 14. Relação dos picos de diâmetro médio, PDI e potencial zeta de TX13 antes e depois da moagem.	95
Tabela 15. Relação dos picos de diâmetro médio, PDI e potencial zeta de TX15 e TX16.	97
Tabela 16. Relação de bandas de absorção no IV da PVP (modificado de LAOT; MARAND; OYAMA, 1999)	102
Tabela 17. Teores de EFV das amostras TX12, TX13 e TX14	106
Tabela 18. Comparação dos percentuais de EFV dissolvido e da eficiência de dissolução das amostras com a matéria prima.	106
Tabela 19. Dados correspondentes às análises de tamanho de partícula e potencial zeta	116
Tabela 20. Comparação de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das amostras SN5, SN6, SN7 e SN8.	119
Tabela 21. Resultados da análise de tamanho de partícula.	122
Tabela 22. Teores de EFV das amostras SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14.	131
Tabela 23. Comparação dos percentuais de EFV dissolvidos e da eficiência de dissolução das amostras SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14 com a matéria prima.	132

## LISTA DE SIGLAS

<b>AFM</b>	Microscopia de força atômica
<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ARV</b>	Antirretroviral
<b>ASC</b>	Área sob a curva
<b>ATR</b>	Acessório de reflectância atenuada
<b>CETEM</b>	Centro de Tecnologia Mineral
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentração plasmática máxima
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentração de soluto dissolvido em um tempo <i>t</i>
<b>CMC</b>	Concentração micelar crítica
<b>C<sub>s</sub></b>	Concentração de saturação
<b>D</b>	Coefficiente de difusão
<b>dC/dt</b>	Taxa de dissolução
<b>DLS</b>	Espalhamento dinâmico de luz
<b>DLVO</b>	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>DRX</b>	Difração de raios X
<b>DSC</b>	Calorimetria exploratória diferencial
<b>EFV</b>	Efavirenz
<b>Engepol</b>	Laboratório de Engenharia de Polimerização
<b>FA</b>	Fase aquosa
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FO</b>	Fase orgânica
<b>h</b>	Espessura da camada de difusão
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HPC</b>	Hidroxipropilcelulose
<b>HPH</b>	Homogeneização de alta pressão
<b>HME</b>	<i>Hot-melt extrusion</i>
<b>HPMC</b>	Hidroxipropilmetilcelulose
<b>IFA</b>	Insumo farmacêutico ativo
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>LADEQ</b>	Laboratório do Departamento de Engenharia Química
<b>LAFEPE</b>	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
<b>LaSiFA</b>	Laboratório de Sistemas Farmacêuticos Avançados
<b>LDRX</b>	Laboratório de Difração de Raios X
<b>LSS</b>	Laurilsulfato de sódio
<b>LTF</b>	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde

<b>PA</b>	Para análise
<b>PDI</b>	Índice de polidispersão
<b>PN</b>	Departamento de Produtos Naturais
<b>PVA</b>	Poli (álcool vinílico)
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>S</b>	Área superficial
<b>SCB</b>	Sistema de classificação biofarmacêutica
<b>SCT</b>	Setor de Caracterização Tecnológica
<b>SMA</b>	Serviço de métodos analíticos
<b>SN</b>	Sonicador
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>T<sub>máx</sub></b>	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
<b>TSI</b>	Índice de estabilidade Turbiscan
<b>TX</b>	Ultra-turrax
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia
<b>V</b>	Volume do meio de dissolução

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Relevância do efavirenz</b>	<b>18</b>
<b>1.2. Características farmacocinéticas do efavirenz</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Características físico-químicas do efavirenz</b>	<b>20</b>
1.3.1. <u>Cristalinidade</u>	20
1.3.2. <u>Solubilidade e dissolução</u>	22
<b>1.4. Nanocristais para melhora da dissolução</b>	<b>24</b>
<b>1.5. Técnicas de preparo dos nanocristais</b>	<b>25</b>
<b>1.6. Precipitação por antissolvente</b>	<b>28</b>
1.6.1. <u>Relação entre solvente e antissolvente</u>	30
1.6.2. <u>Grau de supersaturação</u>	30
1.6.3. <u>Influência da homogeneização</u>	31
<b>1.7. Estabilidade física das suspensões</b>	<b>32</b>
1.7.1. <u>Estabilização estérica</u>	33
1.7.2. <u>Estabilização de cargas</u>	34
<b>1.8. Secagem das suspensões</b>	<b>34</b>
<b>1.9. Revisão de trabalhos sobre nanocristais de EFV</b>	<b>35</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Geral</b>	<b>43</b>
<b>3.2. Específicos</b>	<b>43</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Material</b>	<b>44</b>
<b>4.2. Equipamento</b>	<b>44</b>
<b>4.3. Métodos</b>	<b>46</b>
4.3.1. <u>Experimentos de precipitação</u>	46
4.3.2. <u>Caracterização das suspensões</u>	51
4.3.3. <u>Secagem</u>	52
4.3.4. <u>Caracterização do estado sólido</u>	52
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
<b>5.1. Definição dos parâmetros iniciais</b>	<b>55</b>
5.1.1. <u>Escolha do solvente</u>	55
5.1.2. <u>Escolha dos estabilizantes</u>	56
5.1.3. <u>Primeiros experimentos de precipitação</u>	57
5.1.4. <u>Aumento gradativo do teor de polímero</u>	64
5.1.5. <u>Aumento da concentração de LSS</u>	69
5.1.6. <u>Dissolução</u>	73
<b>5.2. Mudança da saturação do sistema</b>	<b>82</b>

5.2.1.	<u>Mesma proporção entre as fases</u>	82
5.2.1.	<u>Redução da massa de EFV</u>	82
5.2.2.	<u>Supersaturação do solvente</u>	84
5.2.3.	<u>Caracterização</u>	85
5.2.4.	<u>Dissolução</u>	90
<b>5.3.</b>	<b>Testes de condições diversas</b>	<b>92</b>
5.3.1.	<u>Troca de estabilizante estérico</u>	93
5.3.2.	<u>Uso de moagem após cristalização</u>	94
5.3.3.	<u>Mudança de solvente</u>	96
5.3.4.	<u>Caracterização</u>	98
5.3.5.	<u>Dissolução</u>	105
<b>5.4.</b>	<b>Troca do método de agitação durante a precipitação</b>	<b>108</b>
<b>5.5.</b>	<b>Triagem de polímeros</b>	<b>110</b>
5.5.1.	<u>Aspecto das amostras</u>	110
5.5.2.	<u>Caracterização física das suspensões</u>	113
5.5.3.	<u>Alteração da concentração de PVP</u>	116
<b>5.6.</b>	<b>Redução de massa de EFV somada à sonicação</b>	<b>119</b>
5.6.1.	<u>Estabilidade física das suspensões</u>	120
5.6.2.	<u>Caracterização do estado sólido</u>	126
5.6.3.	<u>Dissolução</u>	131
<b>5.7.</b>	<b>Considerações finais</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>138</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>140</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO I.</b>	<b>CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EFV EM METANOL</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO II.</b>	<b>CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EFV EM LSS 0,1%</b>	<b>152</b>
<b>ANEXO III.</b>	<b>CURVA DE CALIBRAÇÃO EFV EM LSS 0,5%</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO IV.</b>	<b>CURVA DE CALIBRAÇÃO EFV EM ÁGUA DEIONIZADA</b>	<b>154</b>
<b>ANEXO V.</b>	<b>ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO EXCIPIENTES UTILIZADOS</b>	<b>155</b>
<b>ANEXO VI.</b>	<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO COMPARADOS EM PARES ENTRE SI</b>	<b>156</b>

## INTRODUÇÃO

Estima-se que no ano de 2014 havia 734 mil pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) no Brasil, 44 mil dos casos referidos somente tiveram seu diagnóstico fechado em 2014. Neste mesmo ano foram estimados 16 mil óbitos decorrentes de infecções por HIV, porém este número não é exato uma vez que os pacientes vão a óbito não pelo desenvolvimento de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), mas sim pelas comorbidades associadas ou mesmo por infecções oportunistas decorrentes da depressão do sistema imunitário dos pacientes (UNAIDS, 2014).

O efavirenz (EFV) é um antirretroviral inibidor não nucleosídico da enzima transcriptase reversa, a qual transforma o ácido ribonucleico (RNA) viral em ácido desoxirribonucleico (DNA), passível então de se integrar ao DNA do hospedeiro e utilizar o aparato celular para a multiplicação de cópias virais (SOUZA; ALMEIDA, 2003). Sendo assim o fármaco inibe uma etapa limitante para a multiplicação do vírus no organismo. O EFV é amplamente usado na terapia anti-HIV de adultos e crianças, o uso das doses adequadas de EFV tende a atingir excelentes resultados terapêuticos, porém quando não administrado corretamente pode incorrer em falha completa da farmacoterapia.

No Brasil, o EFV está disponível na forma de comprimidos revestidos e solução oral, contudo a biodisponibilidade destes medicamentos atinge um máximo de 45%, sendo considerada baixa (CHIAPPETTA *et al.*, 2011). Isso ocorre porque, devido à sua natureza hidrofóbica, o EFV se inclui na classe II do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), com baixa solubilidade e alta permeabilidade.

A baixa hidrofília deste fármaco afeta diretamente a sua dissolução em meio aquoso (SHAH; AMIDON, 2014), sendo esta considerada uma etapa limitante para a absorção de um fármaco. Logo, na busca por uma maior biodisponibilidade do EFV, é natural procurar estratégias que incrementem o perfil de dissolução do fármaco.

A taxa de dissolução de um sólido em um sistema líquido é regulada pela área superficial das partículas, dentre outros aspectos, onde quanto maior a área superficial maior será a taxa de dissolução (MARTIN, 1993). Desta forma, uma

das alternativas para aumentar área de superfície é a redução do tamanho de partícula.

É esperado que a redução do tamanho de partícula de EFV à escala nanométrica promova aumento da dissolução do fármaco. Para atingir este objetivo estão disponíveis diversas técnicas. Na procura por melhores métodos produtivos, foi escolhida a cristalização por antissolvente como alternativa para a produção dos nanocristais de EFV.

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. Relevância do efavirenz

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da UNAIDS, programa conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS, estimam que no ano de 2014 aproximadamente 37 milhões de pessoas, dentre elas adultos e crianças, conviviam com o HIV/AIDS (UNAIDS, 2015). Outros dados divulgados pelo Ministério da Saúde sugerem que somente no Brasil residam 734.000 pessoas com AIDS (BRASIL, 2015) e que apenas no ano de 2013, dados mais recentes, foram identificados 44.000 novos casos de infecção por HIV (UNAIDS, 2014). A principal forma de contenção da multiplicação viral e aumento da expectativa de vida dos pacientes é o tratamento com antirretrovirais (SMITH, 2001).

O EFV, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 1, é um antirretroviral (ARV) inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa, amplamente usado na terapia anti-HIV. O tratamento pediátrico, para crianças acima de 3 anos de idade, usualmente inicia-se com a administração de EFV, podendo estar associado ou não a outros ARVs (WINTERGERST *et al.*, 2008). Quando o medicamento é administrado corretamente, a terapia chega a atingir uma contagem viral abaixo do limite de detecção em 80% dos casos, no entanto a não aderência ao tratamento pode gerar falha do mesmo e aumento na mortalidade (BURGER *et al.*, 2006).

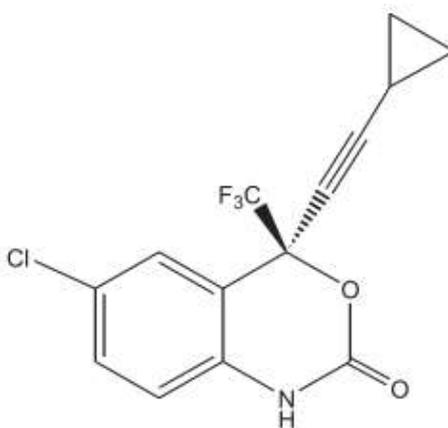


Figura 1. Fórmula estrutural do EFV (BRASIL, 2010)

O medicamento referência do EFV registrado no Brasil é o Stocrin, presente em duas possíveis formas farmacêuticas, comprimidos revestidos de 600 mg e solução oral com 30 mg/mL (BRASIL, 2014). Sendo a forma sólida mais utilizada em adultos e a forma líquida para o ajuste no tratamento infantil.

O EFV chega a ser utilizado por aproximadamente 40% dos pacientes em tratamento ARV. Sendo assim, em 2007, o governo brasileiro realizou um processo de licenciamento compulsório, possibilitando a produção de medicamento genérico do comprimido de EFV pelos laboratórios oficiais (CHAVES, 2007). Atualmente, o laboratório farmacêutico oficial que produz EFV genérico é Farmanguinhos (ANVISA, 2015).

Fora do Brasil também estão disponíveis outras versões do EFV, em comprimidos revestidos de 600 mg ou cápsulas duras de 200 mg sob o nome comercial Efavir, produzido pelo laboratório Cipla Pharmaceuticals (CIPLA PHARMACEUTICALS, 2015); Sustiva oferecido em cápsulas duras de 50, 100 ou 200 mg e produzido pela Bristol, Meyers & Squibb (BRISTOL-MEYES SQUIBB, 2015).

## 1.2. Características farmacocinéticas do efavirenz

A biodisponibilidade dos comprimidos revestidos de EFV fica em torno de 40-45%, no entanto estudos clínicos apontam que a biodisponibilidade da forma líquida é 20% menor que a biodisponibilidade da forma sólida oral, variando entre os estados de jejum e após alimentação (CHIAPPETTA *et al.*, 2011).

A meia-vida do EFV é de pelo menos 52 horas após a administração, o que faz com que este fármaco seja apropriado para uma posologia de uma dose diária. Os principais efeitos adversos associados à terapia com EFV são *rash* cutâneo e efeitos no sistema nervoso central (SNC) (MAGGILOLO, 2009).

Os efeitos no SNC mais comuns são tonturas, cefaleia, confusão mental, dificuldade de concentração, amnésia, psicose e insônia, sendo esta uma das principais causas da descontinuação precoce do tratamento. Porém a maioria dos efeitos neurológicos tende a desaparecer após algumas semanas desde o início da terapia (MAGGILOLO, 2009).

### 1.3. Características físico-químicas do efavirenz

#### 1.3.1. Cristalinidade

Os sólidos podem cristalizar sob diferentes formas, a existência de várias fases sólidas depende das interações moleculares que governam a orientação do empacotamento cristalino. Diferenças entre as formas cristalinas alteram a energia livre dos possíveis estados dos sólidos (CHADHA *et al.*, 2013). Uma vez que propriedades como ponto de fusão, densidade, solubilidade e estabilidade do fármaco dependem da sua capacidade de se desvencilhar de sua estrutura cristalina, esta passa a ser de extrema importância na definição das propriedades de um sólido (DURÁN *et al.*, 2010).

Diferentes formas cristalinas podem ser compostas apenas do fármaco em questão, sendo chamadas de polimorfos, ou possuem também outros componentes ligados ao fármaco de modo não covalente como sais, hidratos, solvatos e cocristais, sendo importante ressaltar que essas fases podem se organizar sob diferentes arranjos cristalinos (CHADHA *et al.*, 2013).

O EFV possui diversos sítios de ligações de hidrogênio, o que lhe confere a possibilidade cristalizar sob diferentes formas (CHADHA *et al.*, 2012b). A patente depositada por Radesca e colaboradores (1999) faz referência a cinco polimorfos do EFV caracterizadas utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X de pós (DRX).

A patente aponta o polimorfo I como estável, devido ao seu ponto de fusão (PF) ser o mais elevado dentre as formas encontradas. Também é relatado que os outros polimorfos encontrados sofrem transição para a forma I frente ao aumento da temperatura. Isto fica exemplificado na Figura 2 que apresenta o DSC da forma II do EFV. É possível observar um evento endotérmico relativo a fusão da forma II seguido de uma cristalização em EFV forma I e posterior fusão.

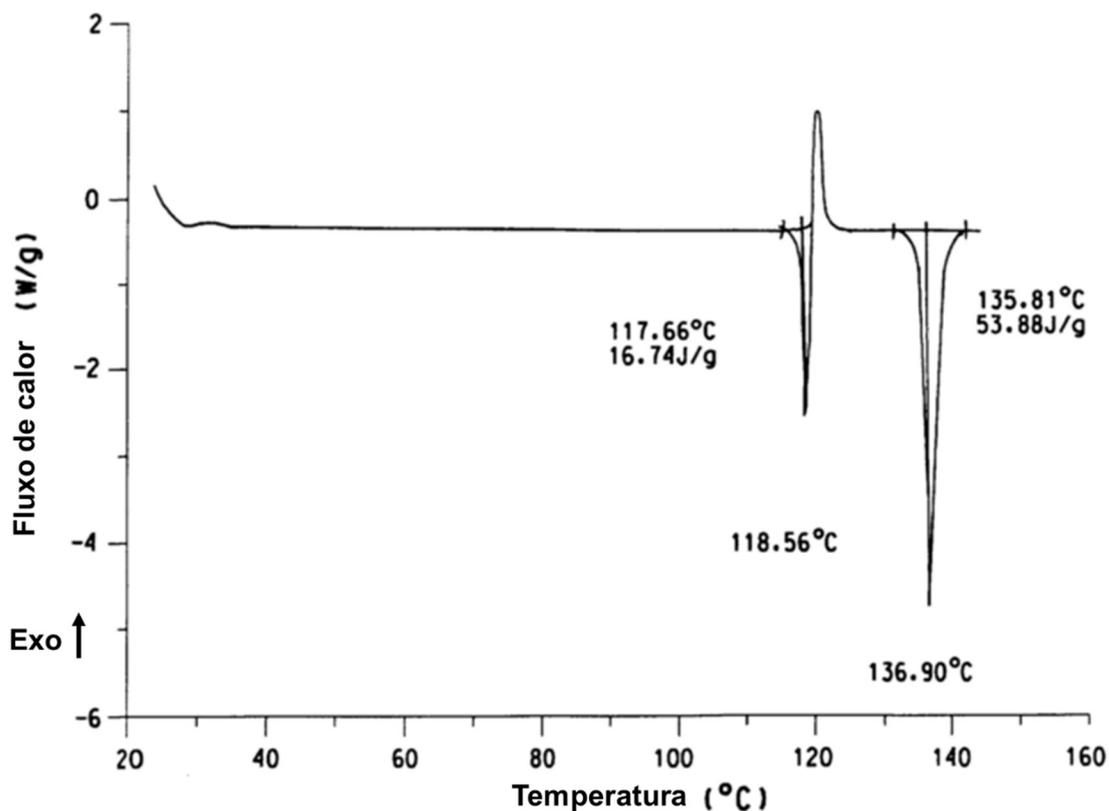


Figura 2. DSC da forma II do EFV (modificado de RADESCA *et al.*, 1999)

A forma I cristaliza sob uma hélice de cadeia dupla, estabilizada pelas ligações de hidrogênio N-H $\cdots$ O; estas hélices formam uma estrutura hexagonal de três dimensões, Figura 3 (MAHAPATRA *et al.*, 2010b). Além dos polimorfos patenteados, incluindo a forma I, há também relato de que o EFV recristalize sob a forma de solvatos, hidratos e cocristais (FANDARUFF *et al.*, 2014).

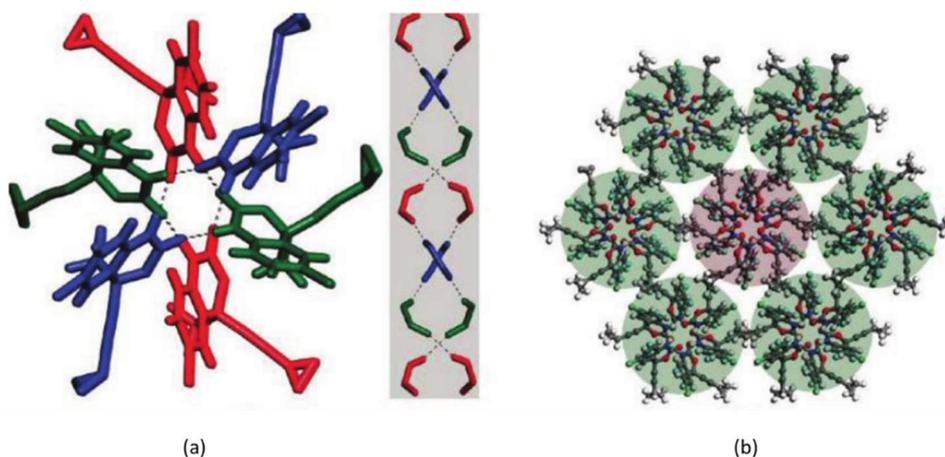


Figura 3. EFV forma I: (a) dupla hélice vista sobre o eixo c. A inserção mostra a formação das cadeias de dupla hélice; (b) empacotamento das hélices.

Estudos indicam a forma I do EFV como o polimorfo mais estável (CHADHA *et al.*, 2013; MAHAPATRA *et al.*, 2010). Porém, ao fazer uso de estudos termodinâmicos Fandaruff e colaboradores (2014) concluem que o polimorfo II do EFV é mais estável que o polimorfo I à temperatura ambiente

### 1.3.2. Solubilidade e dissolução

O EFV é um pó cristalino de baixa solubilidade em água, entre 3-9 µg/mL, e uma baixa taxa de dissolução intrínseca (TDI) de 0,037 mg/cm<sup>2</sup>/min (PATEL *et al.*, 2014). No sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) ele se encontra na classe II, dos fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade (CHIAPPETTA *et al.*, 2010).

A dissolução é o fenômeno no qual uma determinada substância dissolve-se em uma solução. Em 1970 foi publicado na United States Pharmacopeia (USP) XVIII o primeiro ensaio de dissolução oficial para uma forma farmacêutica sólida. Logo a Food and Drugs Administration (FDA) passou a considerar o teste de dissolução um importante parâmetro de qualidade. Atualmente a dissolução é amplamente aceita como ferramenta para previsão de comportamento *in vivo*, além de auxiliar na diminuição de custos e tempo durante a etapa de desenvolvimento (WONG; COLLINS, 2008).

De acordo com a sequência básica de fenômenos farmacocinéticos que ocorrem com os medicamentos de administração oral, a dissolução é uma etapa prévia a absorção (Figura 4). Baseando-se nestas etapas é seguro dizer que para um medicamento de liberação imediata e pertencente à classe II do SCB, como é o caso do EFV, o incremento da taxa de dissolução tende a estender a absorção do fármaco, aumentando assim a biodisponibilidade (CHO *et al.*, 2010).

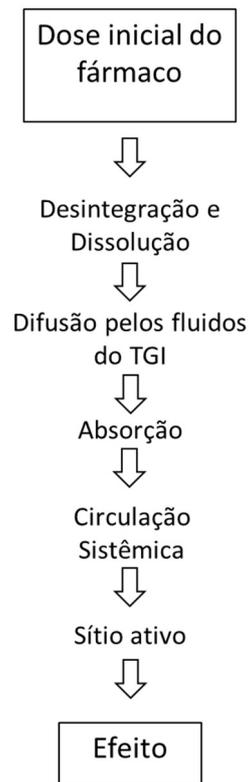


Figura 4. Sequência de eventos decorrentes desde a administração até o momento do efeito desejado (adaptado de AULTON, 2002)

No entanto, é importante ressaltar que mesmo o ensaio de dissolução sendo uma ferramenta útil, de forma alguma pode ser considerada uma simulação do que ocorre dentro do trato gastrointestinal. Uma vez que *in vivo* ocorre simultaneamente o fenômeno da absorção, que retira o fármaco do lúmen do trato gastrointestinal (TGI) e, portanto, não permite a saturação do meio (WONG; COLLINS, 2008).

Na busca do incremento de biodisponibilidade, procura-se aumentar a dissolução do insumo farmacêutico ativo (IFA). Observando a equação proposta por Noyes-Whitney, Equação 1, é possível perceber que esse objetivo pode ser alcançado, de modo geral, por duas diferentes estratégias, sendo uma a expansão da área superficial do pó e outra, o aumento da solubilidade intrínseca do fármaco, acarretando em incremento da concentração de saturação do IFA no meio (MARTIN, 1993; MULLER; KECK, 2004).

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} (C_s - C)$$

Equação 1

Onde:

$dC/dt$  = Taxa de dissolução

$C$  = Concentração de soluto dissolvido em um tempo  $t$

$C_s$  = Concentração de saturação do fármaco no meio

$D$  = Coeficiente de difusão

$S$  = Área superficial

$V$  = Volume do meio de dissolução

$h$  = Espessura da camada de difusão

A estratégia tradicional para aumentar a área de superfície é a micronização de pós cristalinos. Contudo alguns IFAs, incluindo o EFV, possuem solubilidade tão baixa que esta técnica não é suficiente para atingir níveis plasmáticos mais adequados. Consequentemente, o próximo passo seria levar o pó à escala nanométrica (MULLER; KECK, 2004).

#### 1.4. Nanocristais para melhora da dissolução

Nanocristais de fármaco são partículas cristalinas, ou seja, encontram-se agrupadas em arranjos ordenados, com diâmetro médio menor do que 1000 nm, compostas apenas ou essencialmente de fármaco e que, portanto, não estão inseridas em nenhuma matriz (PATEL *et al.*, 2011). Apesar de o termo nanocristal implicar na presença de material cristalino, o material obtido pode ser total ou parcialmente amorfo dependendo do método de preparo (KATTEBOINAA; CHANDRASEKHAR; BALAJI, 2009).

Nanocristais são geralmente apontados como uma forma segura de melhorar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis. Outro efeito reportado da grande diminuição do tamanho de partícula seria melhorar a distribuição do IFA no TGI. Isto evitaria um contato prolongado de um mesmo ponto da mucosa

com uma alta concentração de fármaco, há relatos de que o uso de nanocristais pode diminuir efeitos adversos relacionados ao TGI, como irritação de mucosas (GAO *et al.*, 2012).

Com o uso de nanocristais, podem ser observadas mudanças nos parâmetros farmacocinéticos dos fármacos, incluindo aumento da concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), redução do tempo para atingir a concentração plasmática máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ), aumento da área abaixo da curva concentração-tempo (ASC) e redução da variabilidade das concentrações plasmáticas nos estados pré/pós-prandial (GAO *et al.*, 2012).

Um exemplo do uso de nanocristais como forma de incremento do perfil de dissolução e da biodisponibilidade é o estudo conduzido por Ochi e colaboradores (2014). Neste trabalho foram desenvolvidos, por técnica de moagem, nanocristais de meloxicam. Uma comparação entre os perfis de dissolução dos nanocristais com os do fármaco puro, obtidos em meios ácido e neutro, mostrou que os nanocristais demonstram um grande incremento no perfil de dissolução.

Por sua vez, quando montada a curva de concentração plasmática no tempo, os nanocristais mostraram aumento maior que 600% na  $C_{m\acute{a}x}$ , diminuição de 23% no  $T_{m\acute{a}x}$ , aumento de mais de 1000% na ASC no período de 2 horas e aumento maior que 500% na ASC no intervalo total de 8 horas, em comparação com o fármaco, após a administração oral (OCHI *et al.*, 2014).

A concentração de saturação ( $C_s$ ) é uma constante que depende da substância, do meio de dissolução e da temperatura do sistema (PATEL *et al.*, 2011). No entanto, em pós com tamanho de partícula menor que 1  $\mu\text{m}$  (1000 nm) a  $C_s$  passa a responder também ao tamanho de partícula, aumentando a solubilidade conforme diminui o tamanho de partícula (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008).

### 1.5. Técnicas de preparo dos nanocristais

Existem diferentes métodos para o preparo de nanocristais. De modo geral as técnicas dividem-se em dois tipos: *top-down* e *bottom-up*.

As técnicas *top-down* envolvem diferentes métodos de moagem, de forma que seja possível alcançar escalas de tamanho menores partindo de estruturas maiores como, por exemplo, atingir uma escala nanométrica tendo como ponto inicial partículas micrométricas (GÜLSÜN; GÜRSOY; ÖNER, 2009). De modo geral, são processos de alta energia, com uma baixa produtividade e, devido à grande quantidade de calor gerado, podem ser ineficazes para materiais termolábeis. O processo de moagem pode também ocasionar transições no estado sólido, o que poderia afetar diretamente a estabilidade do produto ao longo do tempo de armazenagem assim como as propriedades de dissolução do fármaco. Além disso o processo tende a formar cristais com uma distribuição de tamanho de partícula muito variada (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

Metodologias *bottom-up* consistem na solubilização do fármaco em um sistema solvente seguida da transformação deste em um ambiente onde o fármaco seja insolúvel (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009); neste caso a força que direciona a formação dos cristais é a supersaturação do fármaco no meio final sendo comum que sejam referidos como métodos de precipitação (DE WAARD *et al.*, 2009). Na área farmacêutica, o foco desta abordagem tem sido os fármacos com baixa solubilidade solúveis em água. Em estudo de revisão De Waard e colaboradores (2011) apresentam um panorama geral das técnicas *bottom-up* disponíveis para o preparo de nanocristais (Tabela 1).

Como desvantagens apresentam principalmente a possível obtenção de outras formas cristalinas (polimorfos, hidratos e solvatos), resíduo de solvente orgânico utilizado no processo e tendência dos cristais a possuírem forma de agulha, também são técnicas consideradas mais complexas para o aumento de escala (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

Analisando de forma mais ampla essas técnicas são consideradas mais simples, de baixo custo, com menor gasto energético e menor consumo de tempo, quando comparadas às metodologias *top-down* (PATEL *et al.*, 2011).

Esses benefícios são relativos principalmente à precipitação por antissolvente, uma vez que analisando a Tabela 1 é possível perceber que dentre as técnicas listadas há algumas que também exigem alto custo e demanda energética como *hot melt* e uso de fluido supercrítico.

Tabela 1. Aspectos gerais das diferentes técnicas *bottom-up* de preparo de nanocristais (modificado de DE WAARD; FRIJLINK; HINRICHES, 2011).

<b>Técnica de preparo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Principal desvantagem</b>
<i>Hot melt</i>	Resfriamento rápido de uma mistura eutética de IFA e matriz fundidos	Possível decomposição do fármaco
Evaporação de solvente	Evaporação de solvente no qual IFA e matriz estão dissolvidos	Contaminação por solventes orgânicos
Antissolvente	Precipitação a partir de um solvente orgânico por adição de antissolvente (água)	Dificuldade no controle do tamanho de partícula
Recristalização em antissolvente gasoso	Saturação de uma solução de IFA em fluido supercrítico	Dificuldade de remoção do solvente orgânico
Rápida expansão de soluções supercríticas	Queda rápida na pressão de fluido supercrítico no qual está dissolvido o IFA	Solubilidade do IFA no solvente
Cristalização controlada por liofilização	Liofilização de uma mistura de IFA, matriz, solvente e água	Longo tempo de processamento

Sendo assim, das possíveis técnicas de preparo de nanossuspensões, ou suspensão de nanocristais, a precipitação por antissolvente foi a escolhida no presente trabalho. Muitos parâmetros podem influenciar na execução dessa metodologia, divididos entre aqueles relacionados com a cinética de cristalização (de modo a alterar o grau de supersaturação), ou mesmo os ligados ao crescimento e agregação das partículas (relativos ao uso de estabilizantes).

Na formação das nanossuspensões, pela técnica de antissolvente, os estabilizantes possuem um papel fundamental: são eles que limitam o posterior crescimento dos cristais assim como sua aglomeração. É possível utilizar dois tipos de estabilizantes, em conjunto ou mesmo separadamente.

Primeiramente existem os que geram impedimento estérico, pois se adsorvem à superfície hidrofóbica das moléculas e asseguram a sua estabilidade durante o processo de cristalização. Para tal finalidade podem ser utilizados polímeros e tensoativos não iônicos, com a tendência de que quanto menor for a massa molar do estabilizante estérico, menor será sua taxa de adsorção na partícula do fármaco. Outro tipo de estabilização faz uso da repulsão de forças

eletrostáticas presentes na superfície das partículas de fármaco; para isso utilizam-se tensoativos iônicos, como o laurilsulfato de sódio (WANG *et al.*, 2013).

### 1.6. Precipitação por antissolvente

De modo geral, a técnica de cristalização por antissolvente consiste em dissolver o fármaco de interesse em um solvente orgânico e depois adicionar ao sistema uma substância antissolvente. Estabilizantes podem ser incorporados ao antissolvente a fim de controlar o tamanho da partícula gerada, e a adição pode ocorrer utilizando diferentes métodos de homogeneização (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).

A supersaturação do fármaco no sistema promove nucleação seguida de crescimento dos cristais (THORAT; DALVI, 2012). Este tipo de processo permite que seja feito um controle do tamanho de partícula obtido, através da manipulação dos parâmetros físico-químicos utilizados durante a cristalização (BECK; DALVI; DAVE, 2010). Logo esta metodologia pode ser utilizada para o preparo tanto de microcristais quanto de nanocristais (CHO *et al.*, 2010; THORAT; DALVI, 2012).

As condições que podem ser influenciadas em um processo de cristalização por antissolvente são variadas, tendo diferentes efeitos nas suspensões obtidas. Em um estudo de revisão Sinha; Müller e Möschwitzer (2013) elaboraram um diagrama espinha-de-peixe mostrando os possíveis parâmetros e desafios a serem adequados quando utilizada uma metodologia de cristalização *bottom-up*, Figura 5.

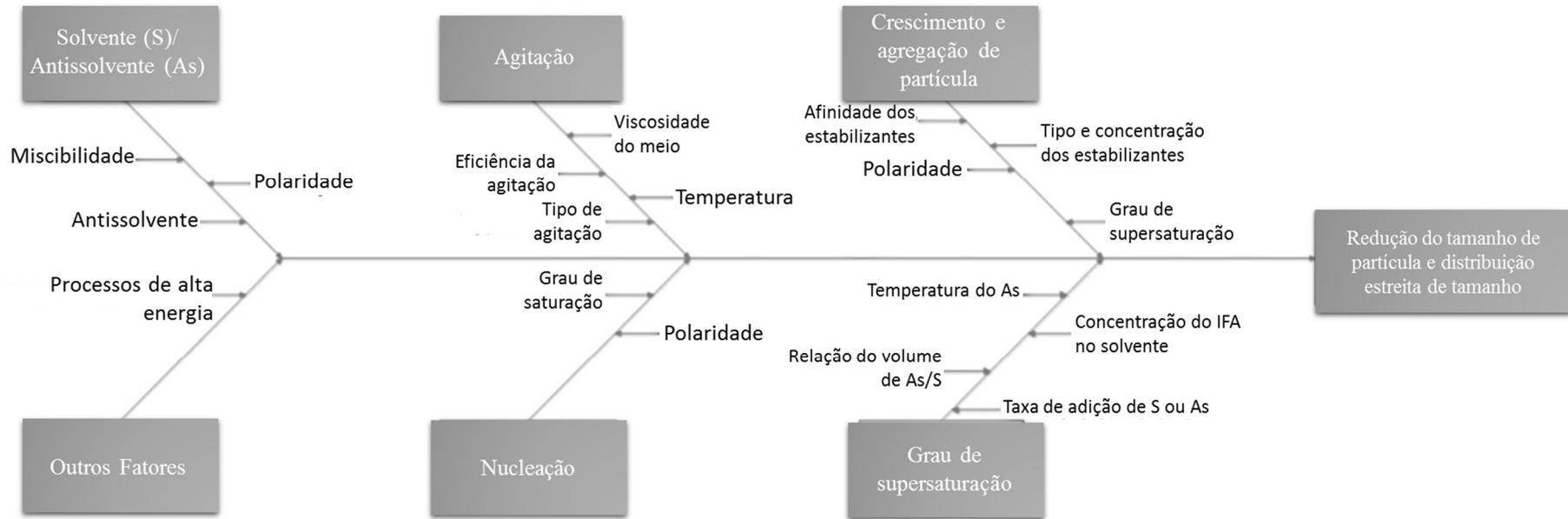


Figura 5. Diagrama espinha de peixe mostrando vários fatores independentes que podem influenciar a qualidade do processo de precipitação (Adaptado de SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).

### 1.6.1. Relação entre solvente e antissolvente

A escolha do solvente e do antissolvente tem influência direta sobre as propriedades físico-químicas resultantes de partículas obtidas por este processo de precipitação como cristalinidade e polimorfismo. Para uso farmacêutico, o antissolvente mais utilizado é a água; neste caso, é maior a possibilidade de que o produto formado seja cristalino (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).

A polaridade do solvente escolhido mostra exercer efeito sobre o tamanho de partícula gerado. Solventes com menor polaridade, e portanto menor miscibilidade em água, são capazes de levar a tamanho de partícula menor (CHEN *et al.*, 2002). Outro ponto é que aumentando a polaridade do solvente a constante dielétrica aumenta e assim decresce a energia molecular, que tem efeito direto sobre o polimorfo obtido. Logo, para controlar o polimorfo resultante da cristalização é necessário controlar a polaridade do sistema solvente (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).

### 1.6.2. Grau de supersaturação

Como mencionado anteriormente, item 1.5, a força que promove a nucleação é a supersaturação. Portanto, é de se esperar que fatores relacionados à solubilidade do IFA no sistema como, por exemplo, a massa de fármaco dissolvida na FO ou a temperatura da FA possam influenciar no processo de cristalização, (Tabela 2).

O grau de supersaturação, que é a relação entre a massa de fármaco dissolvido e a solubilidade deste fármaco no sistema, é responsável pela rápida nucleação (LIU *et al.*, 2012). No caso, o baixo grau de supersaturação favorece o crescimento em detrimento da nucleação, o que leva a uma suspensão com tamanho de partícula maior que o intencionado e mais polidispersa (MATTEUCCI *et al.*, 2006).

Tabela 2. Métodos para atingir supersaturação e possíveis resultados obtidos com relação ao processo de nucleação e ao tamanho das partículas em suspensão.

Método de supersaturação	Processo de nucleação	Tamanho de partícula obtido
Aumento da solubilidade do IFA	A partir de certo ponto há maior disponibilidade das moléculas em solução, favorecendo crescimento.	Até certo ponto, se a saturação aumenta o tamanho diminui. A partir do ponto adequado maior supersaturação aumenta tamanho
Uso de menor volume de solvente	Aumento na proporção entre solvente e antissolvente, promovendo maior supersaturação	Menor tamanho de partícula obtido. No entanto após atingir um valor crítico da razão entre solvente e antissolvente não há mais diminuição das partículas.
Uso de maior quantidade de fase líquida (mais antissolvente)	Influencia no processo de agitação. Pode gerar uma mistura ineficaz e afetar a nucleação.	Tamanho de partícula aumenta com o crescimento do volume do sistema
Redução da temperatura do antissolvente	Menor solubilidade do IFA no sistema além de aumentar a viscosidade do sistema e diminuir mobilidade das partículas	Alta supersaturação gera alta taxa de nucleação enquanto baixa mobilidade melhora adsorção dos estabilizantes. Tamanho diminui e suspensão é menos polidispersa

### 1.6.3. Influência da homogeneização

O processo de agitação é vital para obter um grau de supersaturação adequado para a cristalização, sendo capaz de promover uma nucleação homogênea e adequada para a geração dos nanocristais (LIU *et al.*, 2012). Sob condições de agitação não apropriadas o grau de supersaturação gerado pode não ser o suficiente, tendendo à redução da taxa de nucleação e portanto a distribuição do tamanho de partícula pode tornar-se muito ampla (MATTEUCCI *et al.*, 2006).

O tempo total de mistura é dividido entre tempo de micromistura e tempo de mesomistura. Micromistura é a difusão molecular no sistema enquanto mesomistura, também conhecida como agitação turbulenta, é a transferência de massa em larga escala através da solução (THORAT; DALVI, 2012). A

distribuição do tamanho de partícula está relacionada a um balanço entre micro e mesomistura. O aumento da etapa de micromistura induz a uma rápida nucleação e portanto a um menor tamanho de partícula, por outro lado o aumento da mesomistura gera maior turbilhonamento, e apenas nos turbilhões formados aumenta a supersaturação (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013). Logo é evidente que no caso de uma metodologia de agitação mais turbulenta é necessário garantir que o turbilhonamento atinja amplamente o sistema, para que se possa garantir uma nucleação homogênea.

### 1.7. Estabilidade física das suspensões

A diminuição do tamanho de partícula provoca aumento da área de superfície e por consequência o incremento da energia livre total do sistema. Portanto, o uso de estabilizantes durante o preparo de nanossuspensões é fundamental, pois eles diminuem a tensão interfacial entre o ponto de contato do sólido com o líquido, o que reduz a energia livre do sistema (VERMA; HUEY; BURGESS, 2009).

Os estabilizantes ficam adsorvidos na superfície dos nanocristais prevenindo a aproximação através de forças entrópicas repelentes entre si (LEE *et al.*, 2005). Para uma eficiente estabilização de superfície é possível utilizar polímeros sintéticos como polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinílico (PVA) e derivados de celulose, a exemplo do hidroxipropilmetilcelulose (HPMC); tensoativos iônicos como laurilsulfato de sódio (LSS) e não-iônicos como polissorbato 80 ou mesmo uma combinação de polímero e tensoativo (VERMA *et al.*, 2011). A Figura 6 apresenta as estruturas químicas de alguns dos estabilizantes mencionados.

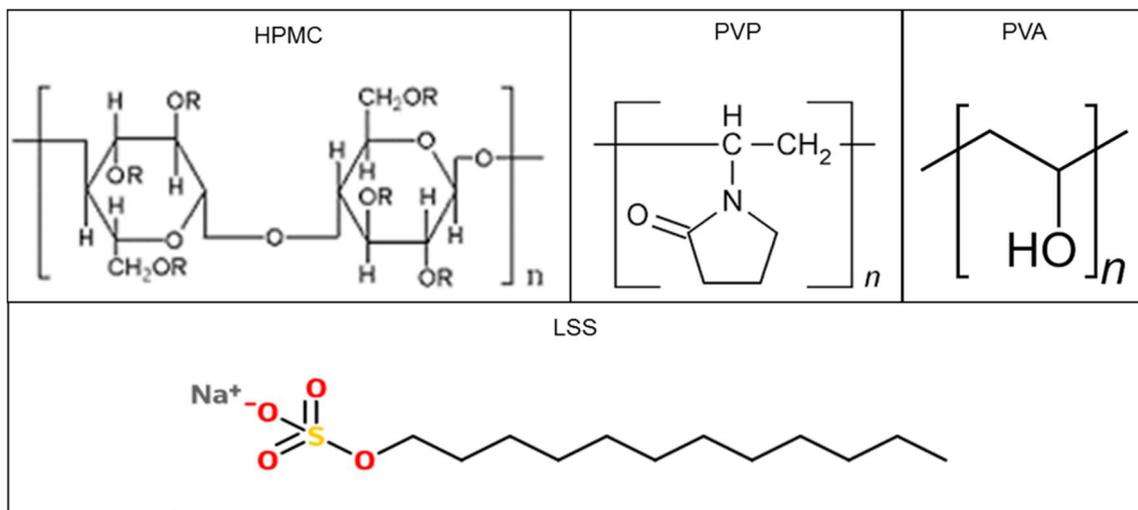


Figura 6. Fórmulas estruturais do LSS e dos monômeros de HPMC, PVP e PVA.

A seguir serão detalhados os tipos de estabilização de partículas existentes e também a característica química dos possíveis compostos a serem utilizados.

### 1.7.1. Estabilização estérica

Polímeros adsorvidos aos nanocristais reduzem a tensão superficial entre sólido e líquido e ocupam toda a superfície da partícula gerando impedimento estérico, o que previne o agrupamento das partículas e portanto o seu crescimento (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).

Diferentes propriedades físico-químicas governam a interação entre o polímero e o fármaco de interesse. Logo diferentes fármacos podem exigir diferentes tipos e quantidades de polímeros para que ocorra a estabilização estérica dos nanocristais (CHOI *et al.*, 2005).

É necessário garantir que a massa de polímero utilizado seja suficiente para cobrir as partículas completamente. Uma má adsorção do estabilizante ou seu uso em uma quantidade abaixo do ideal resulta em uma cobertura ineficaz dos cristais, o que promove o crescimento destas partículas (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).

### 1.7.2. Estabilização de cargas

De acordo com a teoria proposta por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (DLVO), as partículas em um sistema coloidal sofrem forças repulsivas e atrativas. As forças de repulsão são formadas pela dupla camada elétrica que circunda as partículas e evitam a aglomeração (WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

O uso de surfactantes na estabilização de partículas reduz a tensão superficial e aumenta a taxa de nucleação, além de estabilizar as cargas em torno das partículas aumentando as forças repulsivas (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013). A eficácia da utilização de surfactante como estabilizante eletrostático tem como reflexo o aumento do valor absoluto do potencial zeta da suspensão, quanto maior é o valor absoluto maior é a estabilidade da suspensão (WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

### 1.8. **Secagem das suspensões**

Para a retirada do veículo da nanossuspensão, um dos possíveis métodos a serem utilizados é a liofilização (ou *freeze-drying*). A secagem é uma etapa importante na obtenção dos nanocristais pois uma secagem que ocorra de forma inadequada pode resultar na ineficácia das compensações cinéticas e termodinâmicas realizadas pelos estabilizantes e controle dos parâmetros experimentais (LEE; CHENG, 2006).

O processo de liofilização pode ser dividido em três etapas: congelamento, secagem primária (sublimação dos cristais de gelo) e secagem secundária (dessorção da água de ligação) (ABDELWAHED *et al.*, 2006). Parâmetros experimentais em cada um dos processos citados podem ter efeitos sobre propriedades físico-químicas do pó liofilizado (LEE; CHENG, 2006).

A velocidade do congelamento pode afetar diretamente a redispersibilidade do pó obtido, assim como pode prevenir o crescimento dos cristais, enquanto em solução. Um congelamento mais lento leva à exclusão das

partículas pelas moléculas de água o que tende a aproximá-las e por isso promove o crescimento. Para que se possa prevenir este efeito é ideal que seja realizado um congelamento rápido das suspensões (LEE; CHENG, 2006)

### 1.9. Revisão de trabalhos sobre nanocristais de EFV

Para que seja possível compreender melhor a situação atual das pesquisas relacionadas ao tema proposto bem como a relevância do presente trabalho, é importante realizar uma análise crítica dos estudos disponíveis. Com relação aos trabalhos envolvendo nanocristais de EFV, pode-se mencionar a produção de nanossuspensão preparada por método de antissolvente (JAIN *et al.*, 2013) e por cominuição através de moinho de pérolas (PATEL *et al.*, 2014). A Tabela 3 compara ambos os trabalhos.

Em seus estudos, Jain e colaboradores (2013) desenvolveram nanocristais de EFV através de algumas modificações na técnica de antissolvente aliada à homogeneização de alta pressão, utilizando liofilização como método de secagem. Para o experimento, foi adicionado apenas estabilizante estérico, que neste caso foi o HPMC. A escolha do estabilizante foi baseada em testes de compatibilidade físico-química usando IV e DSC.

Apesar de basear-se em uma precipitação por antissolvente a metodologia de preparo de nanocristais de EFV proposta é composta de diversas etapas, sendo elas a precipitação, seguida de dispersão em água, evaporação do solvente, homogeneização de alta pressão e homogeneização por alto cisalhamento (JAIN *et al.*, 2013).

Desta forma, a técnica prova-se mais complexa do que o observado na literatura (BADAWI *et al.*, 2011; BECK; DALVI; DAVE, 2010b; DONG *et al.*, 2011; MAHESH; SINGH; GULATI, 2014), o que pode ser considerado uma desvantagem, uma vez que é preferencial a busca por métodos mais simples, com menor gasto energético e menores custos. Além disso a presença de várias etapas pode provar-se um desafio frente ao aumento de escala.

Além da relativa complexidade da metodologia, como é visto na Tabela 3, a suspensão de EFV resultante ainda possui uma concentração baixa de

fármaco, enquanto um dos pontos positivos da cristalização por antissolvente é justamente a capacidade de utilizar grandes quantidades do fármaco de interesse.

Com relação à caracterização do pó obtido após a precipitação, foi observada na microscopia de força atômica (AFM) a formação de partículas esferoides de diâmetro menor que 1  $\mu\text{m}$ . Nesse pó foi realizado ensaio de DRX, onde foi observado um leve deslocamento dos picos de difração, bem como a redução de sua intensidade, o que poderia estar relacionado a uma mistura de fases cristalinas na amostra, apesar de tal fenômeno não ter sofrido uma investigação mais profunda.

Um ponto não ficou bem esclarecido neste trabalho. Um dos critérios para que se tivesse uma medida de estabilidade das suspensões foi o potencial zeta, contudo a magnitude dos valores apresentados é baixa, entre 7 mV e 9 mV, e não atende ao quesito, uma vez que seria necessário um valor absoluto de 30 mV para garantir uma estabilidade adequada (LIU *et al.*, 2012).

A pesquisa de Patel e colaboradores (2014) utiliza planejamento Box-Behnken para otimizar os parâmetros experimentais e reduzir a quantidade de experimentos necessários, elegendo como fatores principais a serem analisados a concentração de polímero, concentração de surfactante e o tempo de moagem. A formulação com melhores resultados de tamanho de partícula e potencial zeta foi levada aos ensaios biofarmacêuticos, sendo eles permeabilidade *in vitro* e *in situ*, além de um estudo de biodisponibilidade em coelhos.

Os resultados farmacocinéticos mostraram que os nanocristais têm maior biodisponibilidade quando comparados ao IFA puro e à formulação comercial. Foi também evidenciada uma maior permeação nos ensaios *in situ* e *in vitro* pelos nanocristais quando comparados ao EFV matéria-prima. Todavia são pertinentes algumas ressalvas.

Primeiramente, o preparo via moinho de pérolas é uma técnica do tipo *top-down* e como tal apresenta desvantagens como alta demanda energética e tempo de preparo longo, no caso do estudo em questão a moagem leva um total de 22 horas. Com relação ao método de preparo uma outra ressalva seria que logo após a moagem a suspensão é decantada a fim de separar partículas de escala micrométrica. Isso significa que poderia ocorrer uma grande perda de fármaco no processo.

No ensaio de dissolução, os nanocristais são comparados com uma formulação comercial de EFV. Contudo, não são reveladas informações acerca de qual forma farmacêutica foi utilizada (cápsulas, comprimidos revestidos ou solução) ou mesmo qual foi a quantidade de medicamento utilizada no ensaio. Sem essas informações não é possível relacionar o expressivo incremento do perfil de dissolução apenas com a redução do tamanho de partícula. Outros fatores relacionados ao método de análise ou mesmo aos excipientes presentes na formulação podem influenciar no perfil obtido.

Os ensaios referentes à cristalinidade não estão muito claros. Ao apresentar os padrões de DRX da matéria-prima, dos estabilizantes e da mistura física destes componentes são observados os picos de difração relativos a cada um dos excipientes, exceto do polímero estabilizante, que é amorfo; no entanto, ao comparar estes padrões com o dos nanocristais a intensidade dos picos se reduz muito, de modo que não é possível identificar os picos que caracterizam a presença de EFV na formulação. Uma justificativa, inclusive apontada pelos autores, é a de que o tamanho nanométrico das partículas geraria este fenômeno, mas isso não fica claro pelos experimentos realizados.

A análise térmica dos nanocristais e da matéria-prima apresenta um evento endotérmico indicando a fusão do EFV. Contudo nos nanocristais esse pico é alargado, devido ao polímero adsorvido à superfície, e há uma queda da temperatura *onset*, deslocando o pico, o que pode apontar para uma possível interação entre o fármaco e os excipientes o que não é necessariamente ruim, porém requer uma atenção maior.

Os resultados de DRX e DSC levam à conclusão de que mesmo se mantendo a presença de estrutura cristalina, não há como certificar-se de que não houve transição entre os possíveis estados cristalinos do EFV. Essa é uma questão que requer uma investigação mais minuciosa, uma vez que este aspecto influencia diretamente no perfil de dissolução dos fármacos.

Em geral, as técnicas mais utilizadas para secagem das nanosuspensões são *spray-drying* e liofilização (LEE; CHENG, 2006), mas no estudo de Ye e colaboradores (2015) foi utilizada uma abordagem diferente, visando combinar o preparo de nanocristais de EFV por homogeneização de alta pressão (HPH - do inglês *high pressure homogenization*) com secagem por *hot-melt extrusion* (HME).

Foram preparadas nanosuspensões contendo 2 e 4% de EFV (m/v), primeiramente o IFA permaneceu em agitação lenta em contato com água por 12 horas, depois seguiu uma etapa de agitação com ultra-turrax a 15000 rpm por 5 minutos e assim a dispersão foi levada ao homogeneizador de alta pressão. Suspensões com tamanho uniforme de aproximadamente 300 nm foram obtidas após 25 ciclos e 45 ciclos para as concentrações de 2% e 4% de EFV respectivamente.

Neste ponto, já pode ser observada uma desvantagem da técnica utilizada para o preparo. Para que seja possível atingir uma suspensão com uniformidade de tamanho, foi necessária uma grande quantidade de ciclos além de uma etapa anterior que tem uma longa duração (12 horas). Outro desafio é a concentração de fármaco nas suspensões. Uma vez que uma maior massa de fármaco pode gerar uma suspensão muito espessa e que pode entupir o equipamento, há uma dificuldade em produzir suspensões com alto conteúdo de fármaco (YE et al., 2015).

Para a secagem por extrusão foi utilizado o Soluplus<sup>®</sup>, que é um copolímero composto por polivinil caprolactama, poliacetato de vinila e propilenoglicol. Os componentes foram adicionados ao equipamento em diferentes localizações, divididas em zonas (este termo refere-se aos segmentos em uma rosca extrusora, ao longo do equipamento). Na zona 1 foi adicionado o polímero, sendo mantida a temperatura de 140 °C para garantir o derretimento do Soluplus<sup>®</sup>; contudo, nas zonas 4 e 5, onde foi adicionado o fármaco, a temperatura foi mantida entre 110 e 120 °C para garantir a manutenção do estado cristalino do EFV.

A caracterização da cristalinidade do fármaco após a extrusão foi realizada apenas por DSC. Apesar de recomendável os autores não utilizam DRX de pós para caracterização. A necessidade de complementação com técnica mais adequada advém do fato de que graças à grande concentração de polímero presente nos extrudatos, há uma maior dificuldade de observação dos picos endotérmicos referentes à fusão do EFV. Neste caso a observação da posição dos picos de difração seria mais adequada para a verificação da estrutura cristalina do EFV. Outra questão é que a condição analítica do DSC pode não ter sido ideal, alterando a razão de aquecimento de 20 °C/min para

promover um aquecimento mais lento, seria possível obter maior definição do pico endotérmico de fusão (CRAIG; READING, 2007).

Os ensaios de dissolução apontaram incremento da dissolução do EFV após os processos de HPH e HME, enquanto o fármaco atinge uma dissolução máxima de 14,04% em 120 minutos os extrudatos chegaram a 96% de EFV dissolvido no mesmo tempo. Os autores apontam que a dissolução do extrudato B é um pouco mais lenta do que a do extrudato A. Como o A tem maior quantidade de Soluplus<sup>®</sup>, do que o B é possível que a adição de polímero aumente a molhabilidade do pó o que facilitaria a sua dissolução.

Após uma análise mais minuciosa sobre alguns dos autores que reportam pesquisas sobre nanocristais de EFV, é visto que mesmo este fármaco sendo de interesse mundial e ampla utilização, ainda não há uma extensa literatura sobre o assunto, o que torna ainda mais relevante o presente trabalho. Na Tabela 3 foi feita uma comparação dos estudos apresentados para que fosse possível a melhor compreensão da literatura acerca dos nanocristais de EFV assim como a relevância do presente trabalho.

Tabela 3. Comparação dos estudos sobre nanocristais de Jain e colaboradores (2013); Patel e colaboradores (2014); Ye e colaboradores (2015).

<b>Autores</b>	Jain <i>et al.</i> (2013)	Patel <i>et al.</i> (2014)	Ye <i>et al.</i> (2015)
<b>Estabilizantes</b>	HPMC	PVP e LSS	PVP e LSS
<b>Concentração de EFV</b>	0,5% (m/v)	0,8% (m/v)	2% (m/v)
<b>Técnica</b>	<i>Bottom-up</i> : Antissolvente	<i>Top-down</i> : moinho de pérolas	<i>Top-down</i> : homogeneização de alta pressão
<b>Preparo</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Precipitação em água</li> <li>2. Dispersão em volume maior e evaporação do solvente</li> <li>3. Homogeneização de alta pressão</li> <li>4. Homogeneização de alto cisalhamento</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dispersão do EFV em água</li> <li>2. Adição a uma solução com estabilizantes</li> <li>3. Moagem por 22 horas</li> <li>4. Decantação</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dispersão do EFV em água</li> <li>2. Agitação de 500 rpm por 12 horas</li> <li>3. Agitação com ultra-turrax por 5 minutos</li> <li>4. 25 ciclos em homogeneizador de alta pressão</li> </ol>
<b>Secagem</b>	Liofilização Crioprotetor: trealose	Liofilização Crioprotetor: trealose	Hot-melt Extrusion Polímero: Soluplus®
<b>Caracterização</b>	<p><i>In vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dissolução</li> <li>• Cápsulas</li> <li>• Meio: LSS 1% e HCl 0,1N</li> <li>• Biodisponibilidade em ratos</li> </ul> <p><i>In vivo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Análise estatística de dados</li> <li>• Correlação <i>in vivo in vitro</i></li> </ul> <p><b>Físico-química</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamanho de partícula (suspensão)</li> <li>• AFM</li> <li>• DRX de pó</li> <li>• Solubilidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dissolução de cápsulas; Meio LSS 1,0%</li> <li>• Permeabilidade</li> <li>• Biodisponibilidade em coelhos</li> <li>• Análise estatística dos dados</li> <li>• Tamanho de partícula (suspensão)</li> <li>• Potencial Zeta (suspensão)</li> <li>• DSC</li> <li>• DRX de pó</li> <li>• MEV</li> <li>• MET</li> <li>• Uso de Box-Behnken para fazer planejamento experimental</li> <li>• Permeação <i>in situ</i> em ratos</li> <li>• Estabilidade de 6 meses (estoque em refrigerador a -4°C e fora dele a 25°C)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dissolução</li> <li>• Cápsulas</li> <li>• Meio: LSS 0,2% e HCl 0,1N</li> </ul> <p>Não foram realizados</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamanho de partícula (suspensão)</li> <li>• Potencial Zeta (suspensão)</li> <li>• DSC</li> <li>• MEV</li> </ul>
<b>Observações</b>	Estabilidade física do pó durante 3 meses <ul style="list-style-type: none"> <li>• Câmara 1: 25°C e 60% UR</li> <li>• Câmara 2: 40°C e 75% UR</li> </ul>		Estabilidade por 6 meses <ul style="list-style-type: none"> <li>• 25°C e 60% UR</li> <li>• Amostras: 1, 2, 3 e 6 meses</li> <li>• Caracterização: dissolução e tamanho de partícula</li> </ul>

## 2. JUSTIFICATIVA

Como foi demonstrado, o EFV é de suma importância clínica no tratamento da AIDS, sendo o fármaco de escolha para o início da terapia ARV em crianças acima de 3 anos de idade. Quando aplicado corretamente o tratamento com EFV pode chegar a reduzir a carga viral a uma quantidade abaixo dos limites de detecção; no entanto, pacientes com baixa exposição ao medicamento possuem grande chance de falha no tratamento (BURGER *et al.*, 2006).

A alternativa presente no mercado para o tratamento pediátrico com EFV é uma solução oral que possui uma biodisponibilidade 20% menor do que os comprimidos revestidos, utilizados no tratamento de adultos. Esses fatores dificultam a terapia ARV, o que pode contribuir para o aumento na gravidade dos casos de infecção por HIV em crianças.

A Organização Mundial de Saúde recomenda que sejam desenvolvidas formulações mais adequadas de antirretrovirais para uso pediátrico, elegendo os comprimidos dispersíveis e os orodispersíveis como os tipos de formulações ideais, capazes de garantir maior eficácia do tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Para o desenvolvimento de uma formulação sólida adequada de uso pediátrico, é indicado que esta possua uma biodisponibilidade mais alta dos que as presentes formulações disponíveis.

Uma estratégia para o incremento da biodisponibilidade de fármacos muito pouco solúveis em água costuma ser o aumento da sua taxa de dissolução, o que pode ser atingido com processos de diminuição do tamanho de partícula. Porém, para alguns fármacos de baixíssima solubilidade em água, apenas a micronização não é o suficiente para que se atinja a dissolução almejada, sendo necessário trazer o tamanho de partícula para a escala nanométrica.

A nanotecnologia promove diferentes possibilidades de inovação em diversas áreas tecnológicas. No contexto farmacêutico o uso de nanocristais de fármaco pode mostrar simultaneamente um aumento na taxa de dissolução e na concentração de saturação do fármaco no meio. Sendo assim, o preparo de nanocristais de EFV surge como uma alternativa promissora para o incremento

da biodisponibilidade do mesmo e futuramente para sua utilização em uma forma sólida mais adequada ao tratamento pediátrico.

Com relação aos métodos de preparo de nanocristais, há duas vertentes diferentes. As do tipo *top-down*, que se baseiam principalmente em processos de moagem e as do tipo *bottom-up*, ou métodos de precipitação, que partem da molécula de fármaco, controlando seu crescimento. Sendo essas mais simples, menos custosas e demandam menor gasto energético.

Durante a pesquisa bibliográfica foram encontrados dois estudos, um de preparo de nanocristais de EFV por moagem (PATEL *et al.*, 2014) e outro utilizando uma técnica de antissolvente associada à homogeneização de alta pressão (JAIN *et al.*, 2013). Todavia não foram encontradas pesquisas de metodologia de precipitação simples e de baixo custo para o preparo de nanocristais de EFV. Pelas vantagens observadas nos métodos de precipitação, em relação aos métodos de alta demanda energética, foi escolhida para o desenvolvimento dos nanocristais de EFV a metodologia de cristalização por antissolvente.

Por fim, é possível afirmar que o desenvolvimento de uma formulação baseada em uma metodologia de cristalização do EFV por antissolvente mostrou-se como uma possível alternativa para a produção de nanocristais visando o incremento de sua biodisponibilidade oral, que possam, por sua vez, ser utilizados em uma formulação sólida no tratamento pediátrico ARV.

Não obstante, o estudo de uma forma de preparo de nanocristais de EFV por método de antissolvente também pode promover um maior acúmulo de conhecimento para Farmanguinhos acerca do uso e produção de nanotecnologia voltada para o setor farmacêutico. Conhecimento esse que pode ser futuramente extrapolado para preparo de nanocristais de outros fármacos presentes no portfólio da instituição.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Desenvolver nanocristais de efavirenz utilizando método de precipitação por antissolvente.

#### 3.2. Específicos

- Preparar e caracterizar nanossuspensões de EFV.
- Estabelecer as melhores condições operacionais para obtenção das nanossuspensões de EFV.
- Avaliar os nanocristais formados por diferentes técnicas físico-químicas e biofarmacêuticas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

- Efavirenz: dois lotes de fabricantes diferentes, os quais, por questões de confidencialidade, não terão seus nomes aqui divulgados. Ao longo do texto, serão denominados “fabricante 1” e “fabricante 2”.
- Etanol P.A. fabricante Tedia.
- Metanol P.A. fabricante Tedia.
- Acetonitrila P.A. fabricante Tedia.
- Água deionizada (Farmanguinhos).
- Hidroxipropilcelulose (HPC) E LF fabricante Ashland.
- Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) E5 fabricante Colorcon.
- Lutrol F68 fabricante BASF.
- Lutrol F127 fabricante BASF.
- Polivinilpirrolidona (PVP) K30 fabricante Boai NKY.
- Laurilsulfato de sódio (LSS) fabricante VETEC.

### 4.2. Equipamento

- Espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 pertencente ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF – Farmanguinhos).
- Difratorômetro Bruker modelo D8 Advance pertencente ao Laboratório de Difração de Raios X (LDRX – UFF).
- Analisador de partículas Malvern modelo Zetasizer Nano ZS90 pertencente ao Laboratório de Sistemas Farmacêuticos Avançados (LaSiFA – Farmanguinhos).

- Microscópio Eletrônico de Varredura Hitachi modelo TM3030Plus pertencente ao Setor de Caracterização Tecnológica (SCT) do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM).
- Microscópio Eletrônico de Varredura FEI modelo Quanta 400 pertencente ao Setor de Caracterização Tecnológica (SCT) do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM).
- Metalizador Sputter BalTech modelo SCD 050 pertencente ao SCT (CETEM)
- Tensiômetro Krüss modelo DSA100 pertencente ao Laboratório do Departamento de Engenharia Química (LADEQ – UFRJ).
- Agitador Ultra-turrax IKA modelo T25 pertencente ao LTF (Farmanguinhos).
- Dissolutor Distek modelo Evolution 6000 pertencente ao LaSiFA (Farmanguinhos).
- Sonicador Branson Digital Sonifier modelo S-450DS pertencente ao Laboratório de Engenharia de Polimerização (Engepol – UFRJ).
- Sonicador Qsonica modelo Q700 pertencente ao LaSiFA (Farmanguinhos).
- Turbiscan™ Lab Formulation pertencente ao LaSiFA (Farmanguinhos).
- Liofilizador Christ modelo BETA 1-16 pertencente ao Departamento de Produtos Naturais (PN – Farmanguinhos).
- Espectrômetro de infravermelho Thermo-Nicolet modelo Nicolet 6700 pertencente ao Serviço de Métodos Analíticos (SMA – Farmanguinhos).
- Moinho Coloidal Meteor modelo REX 1-K/B90-52 pertencente ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF – Farmanguinhos).

### 4.3. Métodos

#### 4.3.1. Experimentos de precipitação

##### 4.3.1.1. Escolha do solvente

Pesou-se um béquer com aproximadamente 5 mL de solvente seguindo-se a adição de EFV, sob agitação, até que fosse observada turvação do meio. Após 48 horas, mantendo-se a agitação, o sistema foi filtrado e novamente pesado; por diferença foi calculada a massa de efavirenz dissolvida em cada solvente. Os solventes testados foram metanol, etanol, acetonitrila e acetona.

##### 4.3.1.2. Preparo das suspensões

As amostras preparadas seguem o fluxograma apresentado na Figura 7 indicando que uma vez realizadas as cristalizações, as suspensões resultantes foram levadas para secagem. O pó obtido foi caracterizado por diferentes técnicas e foi realizado o ensaio de dissolução por dispersão, tendo este caráter discriminatório entre as amostras. A marcha experimental resultante está descrita na Figura 9.

Foram preparadas duas soluções. Uma solução de fase orgânica (FO) contendo o EFV solubilizado em solvente orgânico apropriado, outra de fase aquosa (FA) composta de água, um estabilizante polimérico e um estabilizante de cargas (tensoativo iônico). Foi adicionada à FA, sob agitação vigorosa, a FO, mantendo a agitação por um minuto.

Todos os experimentos de cristalização foram realizados de acordo com o método descrito, as quantidades de insumos utilizados bem como os parâmetros de preparo das suspensões estão descritas a frente (Tabela 4 e Tabela 5) e o esquema básico dos experimentos está ilustrado na Figura 8. As

quantidades de estabilizantes utilizados são calculadas em percentual relacionado à massa de EFV contido na formulação.

Em destaque estão os experimentos para o preparo de TX10 e TX11. Para a precipitação de TX10 o béquer contendo antissolvente foi levado à banho de gelo. O procedimento foi então realizado quando a FA atingiu estabilizou-se em uma temperatura de aproximadamente 7 °C.

Para o preparo de TX11 foi produzida uma solução supersaturada de EFV em metanol. Para tal o solvente foi levemente aquecido, a uma temperatura suficiente para dissolver 14 g de EFV (acima da concentração de saturação). O béquer contendo a solução foi vedado e reservado, permitindo um resfriamento lento e *overnight* da solução. A FO resultante foi então utilizada no experimento de precipitação de TX11.

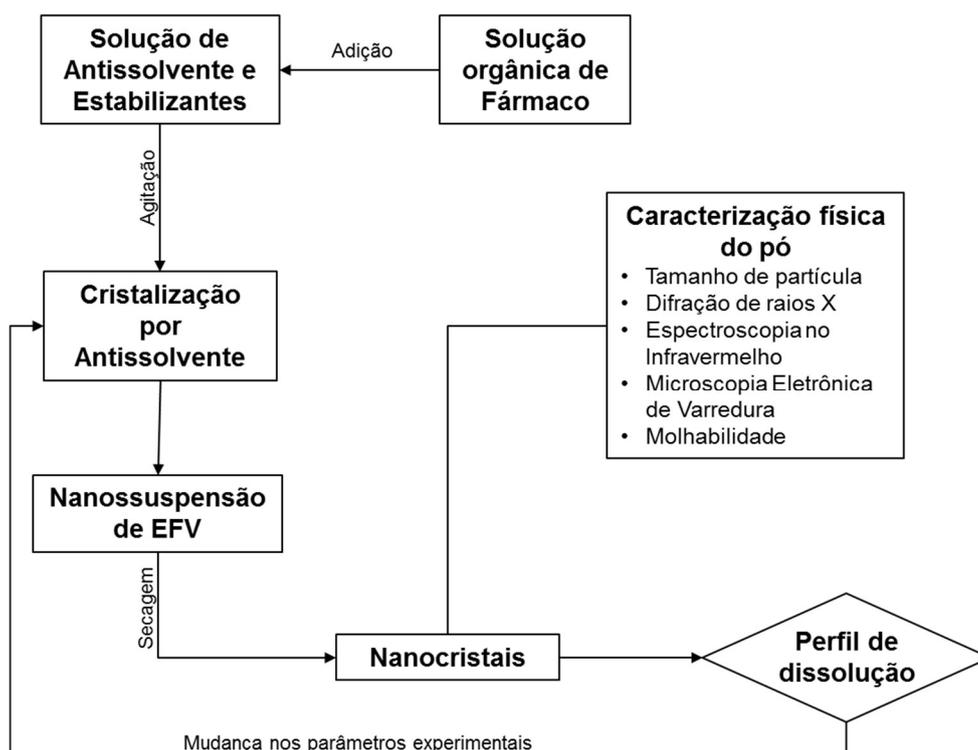


Figura 7. Fluxograma dos processos de cristalização de EFV

Os equipamentos utilizados para agitação foram ultra-turrax e sonicador, destaque para a amostra TX13, que após o preparo passou por uma moagem em moinho coloidal por um período de uma hora. As amostras foram separadas em dois grupos, as que foram preparadas com ultra-turrax (TX) e as que

utilizaram sonicador (SN), ambos descritos no item 4.2, sendo numeradas na ordem do preparo das diferentes formulações, como exposto na Tabela 4.

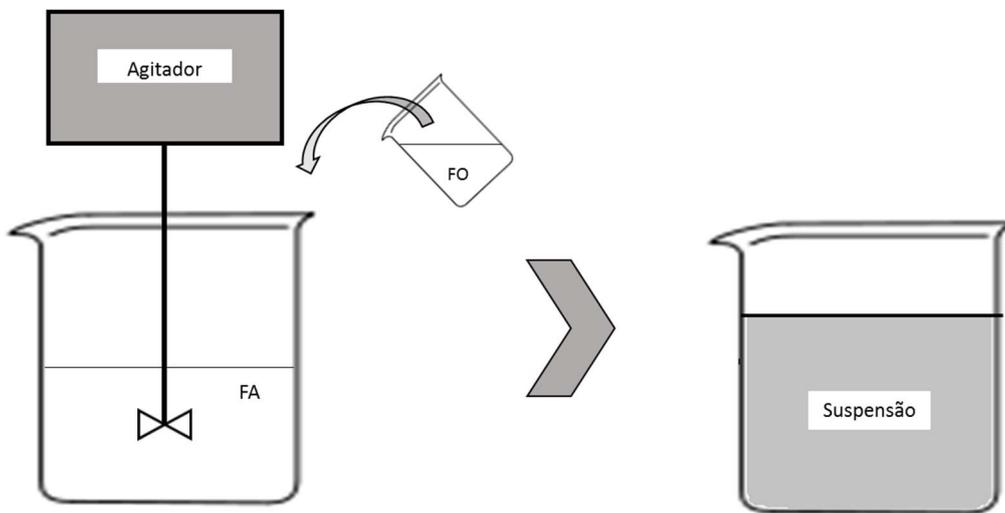


Figura 8. Esquema básico dos experimentos de precipitação por antissolvente

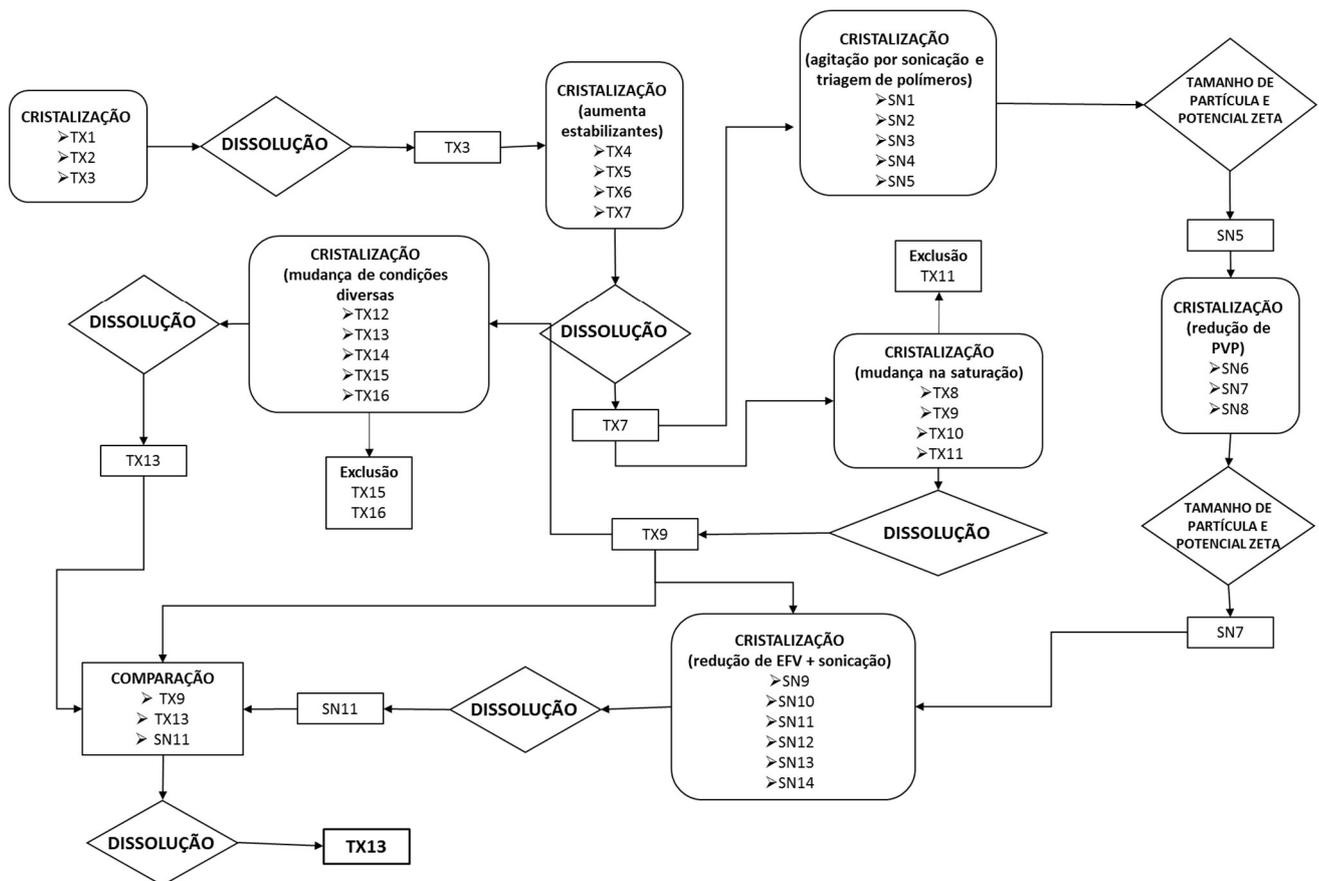


Figura 9. Fluxograma representativo da marcha experimental seguida (as formulações referentes às amostras citadas encontram-se descritas na Tabela 4 e na Tabela 5)

Tabela 4. Relação dos experimentos realizados com ultra-turrax.

Amostra <sup>1</sup>	EFV	Solvente		Água <sup>2</sup>	LSS		Polímero			Agitação	
	(g)	Tipo	(mL)	(mL)	(% mEFV)	Massa (g)	tipo	Massa (g)	(% mEFV)	potência	tempo (min)
TX1	8,000	Metanol	15,0	140,0	1%	0,080	HPMC E5	0,080	1%	22 000 rpm	1 min
TX2	8,000	Metanol	15,0	140,0	1%	0,080	HPMC E5	0,400	5%	22 000 rpm	1 min
TX3	8,000	Metanol	15,0	140,0	2%	0,160	HPMC E5	0,400	5%	22 000 rpm	1 min
TX4	8,000	Metanol	15,0	140,0	2%	0,160	HPMC E5	0,800	10%	22 000 rpm	1 min
TX5	8,000	Metanol	15,0	140,0	4%	0,320	HPMC E5	0,800	10%	22 000 rpm	1 min
TX6	8,000	Metanol	15,0	140,0	2%	0,160	HPMC E5	1,600	20%	22 000 rpm	1 min
TX7	8,000	Metanol	15,0	140,0	2%	0,160	HPMC E5	3,200	40%	22 000 rpm	1 min
TX8	8,000	Metanol	100,0	100,0	2%	0,160	HPMC E5	3,200	40%	22 000 rpm	1 min
TX9	2,670	Metanol	20,0	180,0	2%	0,053	HPMC E5	1,068	40%	22 000 rpm	1 min
TX10	2,670	Metanol	20,0	180,0	2%	0,053	HPMC E5	1,068	40%	22 000 rpm	1 min
TX11	14,000	Metanol	20,0	180,0	2%	0,280	PVP K30	5,600	40%	22 000 rpm	1 min
TX12	2,670	Metanol	20,0	180,0	2%	0,040	PVP K30	0,800	40%	22 000 rpm	1 min
TX13 <sup>3</sup>	5,340	Metanol	40,0	3600	2%	0,107	HPMC E5	2,136	40%	22 000 rpm	1 min
TX14	2,670	Etanol	20,0	180,0	2%	0,053	HPMC E5	1,068	40%	22 000 rpm	1 min
TX15	2,670	Acetona	20,0	180,0	2%	0,053	HPMC E5	1,068	40%	22 000 rpm	1 min
TX16	2,670	Acetonitrila	20,0	180,0	2%	0,053	HPMC E5	1,068	40%	22 000 rpm	1 min

<sup>1</sup> Amostras TX1; TX2 TX3 TX4 TX5 TX6 e TX7 foram preparadas utilizando EFV do fabricante 1, os outros experimentos foram realizados utilizando EFV proveniente do fabricante 2.

<sup>2</sup> Amostras TX9 e TX10 foram preparadas utilizando o antissolvente a temperaturas nas faixas: 25 - 27 °C e 7,2 – 7,5 °C, respectivamente.

<sup>3</sup> Amostra TX13 foi levada ao moinho coloidal após o preparo, permanecendo por uma hora.

Tabela 5. Relação dos experimentos realizados com sonificador.

Amostra	EFV (g)	Solvente		Água (mL)	LSS		Polímero			Agitação <sup>4</sup>	
		Tipo	(mL)		(%mEFV)	Massa (g)	Tipo	(%mEFV)	Massa (g)	Potência	Tempo (min)
SN1	8,000	Metanol	15	140	2%	0,160	HPMC E5	40%	3,200	amp. 50%	1 min
SN2	4,270	Metanol	8	250	2%	0,085	HPC	30%	1,708	amp. 50%	1 min
SN3	4,270	Metanol	8	140	2%	0,085	Lutrol F68	40%	1,708	amp. 50%	1 min
SN4	4,270	Metanol	8	250	2%	0,085	Lutrol F127	30%	1,708	amp. 50%	1 min
SN5	4,270	Metanol	8	140	2%	0,085	PVP K30	40%	1,708	amp. 50%	1 min
SN6	4,270	Metanol	8	140	2%	0,085	PVP K30	30%	1,708	amp. 50%	1 min
SN7	4,270	Metanol	8	140	2%	0,085	PVP K30	20%	1,708	amp. 50%	1 min
SN8	4,270	Metanol	8	140	2%	0,085	PVP K30	10%	1,708	amp. 50%	1 min
SN9	2,670	Metanol	20	180	2%	0,053	HPMC E5	40%	1,068	amp. 50%	1 min
SN10	2,670	Metanol	20	180	2%	0,053	HPMC E5	20%	1,068	amp. 50%	1 min
SN11	2,670	Metanol	20	180	2%	0,053	HPMC E5	10%	1,068	amp. 50%	1 min
SN12	2,670	Metanol	20	180	2%	0,053	PVP K30	40%	1,068	amp. 50%	1 min
SN13	2,670	Metanol	20	180	2%	0,053	PVP K30	20%	1,068	amp. 50%	1 min
SN14	2,670	Metanol	20	180	2%	0,053	PVP K30	10%	1,068	amp. 50%	1 min

<sup>4</sup> As amostras SN1 até SN8 foram preparadas utilizando sonificador Bransonic Digital Sonifier enquanto as amostras SN9 até SN14 foram preparadas utilizando sonificador Qsonica modelo Q700.

#### 4.3.2. Caracterização das suspensões

##### 4.3.2.1. Análise do tamanho de partícula

O tamanho de partícula foi analisado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz, em Zetasizer mencionado no item 4.2, em equipamento com LASER de He-Ne ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) e detector de ângulo fixo em  $90^\circ$ . As amostras foram diluídas até uma concentração de aproximadamente 0,1% (v/v). O meio dispersante foi água deionizada e a análise foi realizada à temperatura ambiente.

##### 4.3.2.2. Estabilidade física das suspensões

A estabilidade foi verificada pelo potencial zeta medido em aparelho Zetasizer, descrito no item 4.2, determinando a mobilidade eletroforética pela equação de Smoluchowski (SZE *et al.*, 2003). As amostras foram diluídas até uma concentração de aproximadamente 0,1%. O meio dispersante foi água deionizada e a análise foi realizada à temperatura ambiente.

##### 4.3.2.3. Análise de sedimentação das suspensões

A sedimentação foi medida utilizando Turbiscan<sup>TM</sup>. A análise foi efetivada a  $27^\circ \text{C}$ , iniciada após 5 minutos desde o preparo das amostras. As varreduras foram realizadas a cada 1 minuto, totalizando 91 varreduras com duração de 90 minutos de análise.

#### 4.3.3. Secagem

A técnica utilizada para a secagem das suspensões foi a liofilização, equipamento descrito no item 4.2. Antes de serem colocadas no aparelho as amostras foram transferidas para frasco de vidro apropriado, congeladas utilizando banho de gelo seco e acetona (faixa de temperatura -40 °C a -70 °C), fazendo movimentos circulares com o frasco de modo a formar uma fina camada de suspensão. Após o congelamento foram levadas ao aparelho até sua secagem, finalizada depois de um prazo de aproximadamente 48 horas.

#### 4.3.4. Caracterização do estado sólido

##### 4.3.4.1. Difração de raios X em pó

As análises foram realizadas em difratômetro descrito no item 4.2, equipado com detector LYNXEYE XE, à temperatura ambiente, com radiação de Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ), a voltagem e corrente durante operação foram de 40 kV e 40 mA, respectivamente. O passo foi de  $0,02^\circ$  e um tempo de contagem de 0,01 segundo por passo na faixa 2 de  $4-40^\circ$ .

Para amostras TX10, TX11, TX12, TX13, TX15, SN9, SN10, SN12 e SN13 foi realizada uma segunda análise, utilizando o mesmo difratômetro descrito no item 4.2, à temperatura ambiente, com radiação de Co-K $\alpha$  ( $\lambda=1.7902 \text{ \AA}$ ) e um tempo de contagem de 0,5 segundo por passo. Todas as outras condições experimentais foram mantidas as mesmas.

Todos os gráficos relativos aos padrões de difração possuem eixo das abcissas  $2\theta$  relacionado ao cobre. No caso dos padrões obtidos os experimentos com fonte de cobalto, foi realizada transformação matemática para adequação da unidade.

#### 4.3.4.2. Espectroscopia no infravermelho

Em espectrômetro, descrito no item 4.2, equipado com *software* OMNIC 7.0 foram depositadas pequenas quantidades de amostra, em contato direto com o cristal do acessório de reflectância atenuada (ATR). Os espectros foram registrados de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 scans.

#### 4.3.4.3. Morfologia

Pequenas quantidades de amostra foram aderidas *in natura* sobre um suporte usando-se fita adesiva de carbono dupla face, e recobertas com ouro em metalizador por 150 segundos a 30 mA. Foram observados diferentes aumentos, em microscópio eletrônico de varredura (MEV), equipamento descrito no item 4.2, variando desde 500 até 30.000 vezes, em função das características particulares de cada amostra.

#### 4.3.4.4. Molhabilidade

Foram preparadas pastilhas de 100 mg de amostras em prensa manual, com uma pressão de 800 psi mantida por 1 minuto. Usando tensiômetro, equipamento descrito no item 4.2, foi medido o ângulo de contato do meio líquido (solução saturada de efavirenz em água, evitando qualquer efeito resultante da solubilização do pó da pastilha) com a pastilha. O volume da gota foi de 8  $\mu\text{L}$  e taxa de adição de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

#### 4.3.4.5. Doseamento das amostras

Foi feita uma solução mãe de concentração 1mg/mL em metanol. Para a leitura em espectrofotômetro, equipamento descrito no item 4.2, no comprimento de onda de 248 nm, sendo necessária diluição. O cálculo do teor de EFV foi feito com base na curva analítica descrita no Anexo I.

#### 4.3.4.6. Dissolução

Foram utilizados 900 mL de meio aquoso, com laurilsulfato de sódio (LSS) 0,1% (m/v), a 37 °C sob agitação constante de 50 rpm. O meio passou por banho de ultrassom por 20 minutos antes de ser colocado nas cubas, com o intuito de retirar eventuais bolhas que tenham sido formadas durante seu preparo. Foram retiradas alíquotas de 11 mL nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 e 90 minutos, não havendo reposição do meio de dissolução, sendo mantida a condição *sink* durante todo o ensaio.

As análises foram realizadas de acordo com o Método 2 da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010), de agitação por pás. A massa de amostra utilizada foi o equivalente em formulação a 100 mg de EFV. As alíquotas foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 248 nm. O cálculo da quantidade de EFV dissolvido foi realizado com base na curva de calibração presente no Anexo II.

Para comparação dos meios um dos ensaios de dissolução utilizou meio LSS 0,5% repetindo todos os outros parâmetros experimentais utilizados nos outros ensaios. O cálculo da quantidade de EFV dissolvido foi realizado com base na curva de calibração presente no Anexo III.

Os perfis de dissolução obtidos a partir de cada amostra foram divididos em dois grupos: amostras de cisalhamento e amostras de sonicação. Foram realizadas comparações, aos pares, de cada perfil utilizando análise de variância (ANOVA), utilizando programa Excel, para determinar se os perfis eram efetivamente distintos entre si.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Definição dos parâmetros iniciais

#### 5.1.1. Escolha do solvente

No ensaio da solubilidade do EFV realizado para determinar o solvente adequado para ser utilizado nos experimentos de precipitação, foram testados os seguintes solventes orgânicos: etanol, metanol, acetonitrila e acetona. Todos os solventes testados são miscíveis em água, sendo esse um pré-requisito fundamental, uma vez que o processo de precipitação exige a mistura do solvente com o antissolvente.

Em uma revisão bibliográfica sobre preparo de nanopartículas via precipitação por antissolvente Thorat e Dalvi (2012) compilaram uma grande lista com estabilizantes e solventes possíveis de serem utilizados para este tipo de processo onde constam, junto com outros, os solventes propostos no presente trabalho. A acetonitrila foi testada por ser descrita como solvente do EFV na Farmacopeia Brasileira 5ª ed (BRASIL, 2010). Estudos específicos do preparo de nanocristais via precipitação por antissolvente utilizam metanol (QUAN *et al.*, 2011), etanol (HU *et al.*, 2011) e acetona (BECK; DALVI; DAVE, 2010b). Logo, devido à sua disponibilidade e confirmação de seu uso prévio reportado na literatura, esses solventes foram testados para dar início aos experimentos de cristalização.

É possível observar (Tabela 6) que o EFV é livremente solúvel em todos os solventes testados, o que os tornaria, a princípio, adequados para o processo em questão. A Tabela 6 também informa a polaridade de cada um dos solventes testados, segundo o índice de polaridade proposto por Snyder (SCHIRMER, 2000).

Tabela 6. Teste de solubilidade para determinar o solvente para a precipitação

<b>Solvente</b>	<b>Polaridade</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>EFV solúvel (g)</b>	<b>Concentração (mol/L)</b>
Etanol	5,2	5	7	4,435
Metanol	6,6	5	3	1,901
Acetonitrila	6,2	5	2,5	1,584
Acetona	5,4	5	8,5	5,385

O EFV é amplamente solúvel em acetona e em etanol, como apresentado na Tabela 6. A grande quantidade de fármaco utilizado no preparo da FO tende a gerar sistemas altamente viscosos uma vez que seja adicionada a solução solvente ao antissolvente. Sendo assim é reduzida a eficiência da agitação e prejudicada a dispersão das partículas, o que pode dificultar o preparo dos nanocristais. Logo, esses dois solventes foram inicialmente descartados.

Tanto metanol quanto acetonitrila possuem polaridade alta e dissolvem quantidades semelhantes de fármaco. Contudo, devido à sua maior disponibilidade, seu amplo uso na indústria farmacêutica e também no preparo de nanocristais (KIM *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009), o solvente escolhido para ser utilizado nesta fase inicial de experimentos foi o metanol.

É importante frisar que mesmo sendo necessária a escolha de apenas um solvente para a fase inicial do estudo, o efeito da troca de solvente no preparo dos nanocristais será avaliado em um momento posterior.

### 5.1.2. Escolha dos estabilizantes

Para evitar que as forças atrativas da superfície das partículas promovam agregação é necessário o uso de estabilizantes no preparo de uma nanossuspensão (GHOSH *et al.*, 2011). Os estabilizantes estéricos adsorvem-se à superfície hidrofóbica das moléculas e para esta finalidade podem ser utilizados polímeros e tensoativos não iônicos, enquanto a estabilização de cargas das partículas é realizada por tensoativos iônicos (WANG *et al.*, 2013).

As suspensões podem ser estabilizadas por polímeros ou surfactantes, ou mesmo uma mistura de ambos (VERMA *et al.*, 2011).

Na busca de uma maior estabilização das suspensões, através de um efeito sinérgico dos diferentes tipos de estabilização, foi feita a opção de utilizar uma mistura de estabilizante polimérico com tensoativo.

O LSS é um excipiente amplamente utilizado na indústria farmacêutica, sendo possível observá-lo em trabalhos relacionados a nanocristais (NIWA; MIURA; DANJO, 2011; VERMA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013), além de também estar presente na formulação dos comprimidos de efavirenz 600 mg fabricados por Farmanguinhos, não demonstrando nenhum tipo de incompatibilidade com o fármaco. Desta forma foi o tensoativo escolhido como estabilizante de cargas para o preparo dos primeiros experimentos de precipitação.

Para a estabilização estérica dos nanocristais é comum o uso de um polímero. Os derivados de celulose são excipientes de uso difundido em muitos processos industriais farmacêuticos, com destaque para o HPMC, devido à sua natureza atóxica e compatibilidade com uso oral (GUIMARÃES *et al.*, 2008). Cabe lembrar que na formulação de efavirenz comprimidos de 600 mg está presente HPC, outro derivado de celulose, com estrutura química semelhante à do HPMC. Com relação à obtenção de nanocristais, o HPMC é um polímero de uso comum (BADAWI *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2011), o que fez com que fosse escolhido como estabilizante estérico para os ensaios iniciais. Portanto, os primeiros experimentos foram realizados utilizando HPMC e LSS como estabilizantes.

### 5.1.3. Primeiros experimentos de precipitação

As primeiras amostras a serem preparadas foram TX1, TX2 e TX3 contendo diferentes quantidades de estabilizantes HPMC e LSS (Tabela 4). As soluções foram homogeneizadas utilizando agitação alto cisalhamento (ultra-turrax).

Logo após o preparo, as amostras apresentavam um aspecto muito espumoso na região do topo do béquer, o que poderia estar relacionado à alta quantidade de LSS e também ao método de agitação utilizado, enquanto na parte de baixo a amostra possuía aspecto de uma pasta branca granulosa e espessa (Figura 10) e não o de uma suspensão, o que a torna de difícil manuseio; focando em um aspecto produtivo, uma suspensão de baixa viscosidade seria mais adequada para processamento.

As amostras foram congeladas e levadas para secagem em liofilizador, e obteve-se um pó branco visivelmente mais fino que o pó da matéria-prima, como é possível observar na comparação feita na Figura 10.



Figura 10. Aspecto das amostras: a) amostra TX2 logo após o preparo; b) matéria-prima; c) amostra TX7 após secagem.

Após a secagem as amostras puderam ser conduzidas à caracterização que ocorre em três etapas, sendo a primeira a análise de morfologia e tamanho das partículas formadas, a segunda composta por análises de identificação e avaliação da estrutura cristalina e, por fim, o perfil de dissolução.

São apresentados a seguir os resultados obtidos pela caracterização das amostras. As etapas seguintes da pesquisa consistiram em avaliar os efeitos do aumento da concentração de estabilizantes, tanto do HPMC quanto do LSS. Em tópico separado foram reunidos os perfis de dissolução das amostras e comparados tanto entre si como com o do IFA puro e não processado. De modo que foi possível analisar o efeito das alterações executadas sobre o incremento da dissolução, sendo este ensaio eleito como o determinante acerca das características das formulações.

### 5.1.3.1. Caracterização do estado sólido

#### 5.1.3.1.1. Morfologia das partículas

Para a análise das partículas obtidas pelo processo de precipitação foi utilizado MEV. A Figura 11 mostra uma comparação entre o EFV matéria-prima e as amostras TX1, TX2 e TX3. É observada uma evidente mudança na morfologia das partículas. A matéria-prima é composta por partículas irregulares enquanto nas amostras precipitadas as partículas tomam um formato alongado, com espessuras nanométricas.

A partir da análise microscópica é possível perceber a diminuição no tamanho de partícula: enquanto na matéria-prima o tamanho varia entre 1 e 2  $\mu\text{m}$  (comprimento), na amostra a espessura das partículas oscila entre 200 e 800 nm (largura).

De acordo com Rabinow (2004), a obtenção de formato de agulha nas partículas pode ocorrer em processos de precipitação sob condição de alto grau de saturação e com rápida nucleação.

Porém este aspecto não é necessariamente positivo, uma vez que é sabido que esta morfologia tem efeito negativo sobre as prosperidades de fluxo do pó, sendo o ideal do ponto de vista de processamento um pó composto por partículas o mais esféricas possível (CARSTENSEN, 2001).

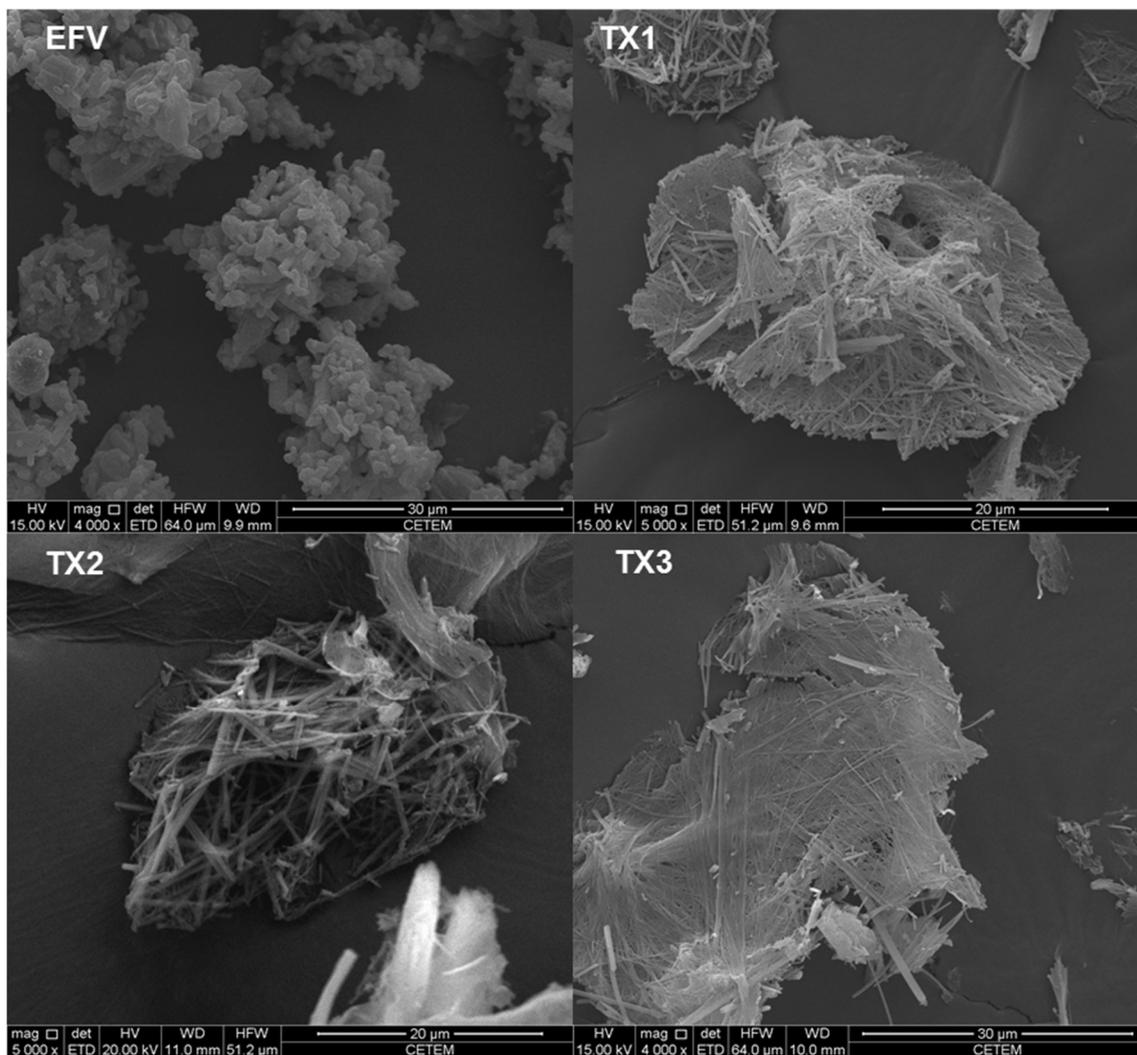


Figura 11. Comparação da morfologia das partículas da matéria-prima com as das amostras TX1, TX2 e TX3.

Uma possível estratégia para contornar este problema seria o uso de técnicas de homogeneização subsequentes à cristalização, como sonicação (NALAJALA; MOHOLKAR, 2011).

#### 5.1.3.1.2. Espectroscopia de infravermelho

Para a identificação da presença EFV nas amostras foram feitas análises de espectroscopia de infravermelho (IV). Esta técnica consiste em analisar as vibrações das ligações quando a molécula é atingida por uma radiação

eletromagnética, utilizando as transformadas de Fourier para montar um espectro de absorção na faixa do IV. Uma vez que cada substância possui espectro único, é possível então identificar a presença de um determinado composto em um mistura (BRITTAIN, 2008).

No espectro de absorção obtido através da análise da matéria-prima, Figura 12, foram identificadas as seguintes bandas em  $3311,99\text{ cm}^{-1}$ , relacionada ao estiramento da ligação N—H; em  $2248,21\text{ cm}^{-1}$ , relacionada à vibração da tripla ligação; uma banda intensa em  $1740,86\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento de C=O; as vibrações relacionadas às duplas ligações do anel aromático aparecem em  $1601,17\text{ cm}^{-1}$  e  $1493,97\text{ cm}^{-1}$ ; por fim, é possível observar a banda referente à ligação C—F em  $1182,50\text{ cm}^{-1}$  (GOMES *et al.*, 2013).

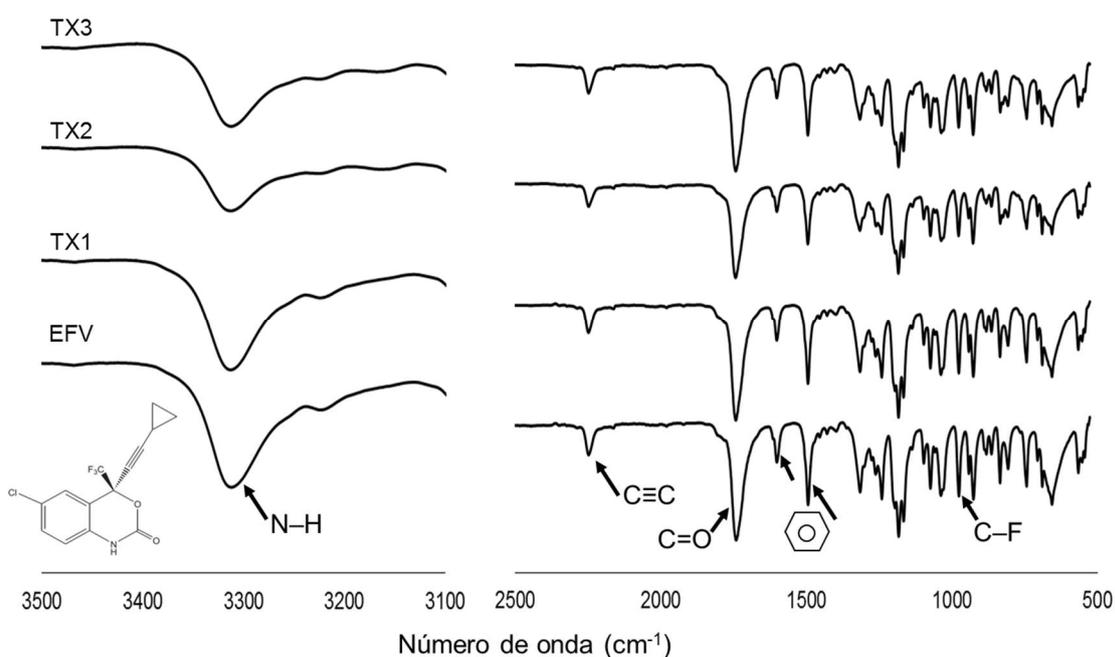


Figura 12. Comparação dos espectros de IV obtidos das amostras com o espectro obtido a partir do EFV matéria-prima.

Foram então obtidos os espectros de IV relativos a TX1, TX2 e TX3. Na Figura 12 percebe-se que cada um dos espectros tem presença das bandas características que são usadas na identificação do EFV, confirmando a presença de fármaco no pó seco das amostras. Não foram observados deslocamentos das bandas nem modificação do espectro de absorção, indicando que não ocorre interação entre o EFV e os estabilizantes (MAHAPATRA; MURTHY, 2014). No

espectro da amostra TX3 é percebida uma diminuição da intensidade das bandas de absorção, mais visível nas bandas referentes à ligação N—H do anel aromático, o que pode estar relacionado ao aumento da concentração de polímero na formulação, os espectros de IV dos excipientes encontram-se em anexo V.

#### 5.1.3.1.3. Difração de raios X

Na Figura 13 é feita uma comparação dos padrões de difração de raios X das amostras e da matéria-prima com o padrão calculado para o polimorfo I EFV (MAHAPATRA *et al.*, 2010a) e o padrão obtido com o LSS (dos excipientes o único com estrutura cristalina). As intensidades dos picos referentes às amostras são diferentes entre si, possivelmente devido ao incremento na concentração de polímero de cada formulação, além do fato de que em cada um dos processos de preparo foram obtidos diferentes teores de fármaco. Para que fosse possível uma análise mais concisa os padrões de difração obtidos a partir da matéria-prima e das amostras foram normalizados em relação ao padrão calculado.

Percebe-se que as amostras mantêm seu caráter cristalino após a precipitação. É possível identificar os picos característicos referentes ao polimorfo I nas amostras, indicando ser esta a forma cristalina presente. Também é observado o alargamento dos picos, o que está relacionado com a diminuição do domínio cristalino, que costuma ser associada à redução do tamanho de partícula (BLACHÉRE; BRITAIN, 2008). O que condiz com o observado na análise de microscopia, que mostrou partículas alongadas e de espessura nano.

As amostras TX2 e TX3 apresentam picos de difração em  $2\theta$  de aproximadamente  $7^\circ$  que não são referentes ao polimorfo I do EFV e também não estão relacionados à presença de LSS nas amostras. Isto pode ser confirmado observando a localização dos picos de difração do excipiente em  $2\theta$  de  $4,4^\circ$  e  $6,6^\circ$  (Figura 13).

De modo geral observa-se manutenção da cristalinidade, o que sugere que qualquer incremento que possa ocorrer futuramente no perfil de dissolução das amostras em relação ao perfil do IFA não estaria relacionado à amorfização

do material, mas sim à redução do tamanho. Porém ainda se fazem necessários ensaios mais detalhados para melhor compreender a fase cristalina apresentada pelas amostras. Para tanto, é possível fazer uso de análise térmica e também da modificação de parâmetros experimentais da análise de DRX.

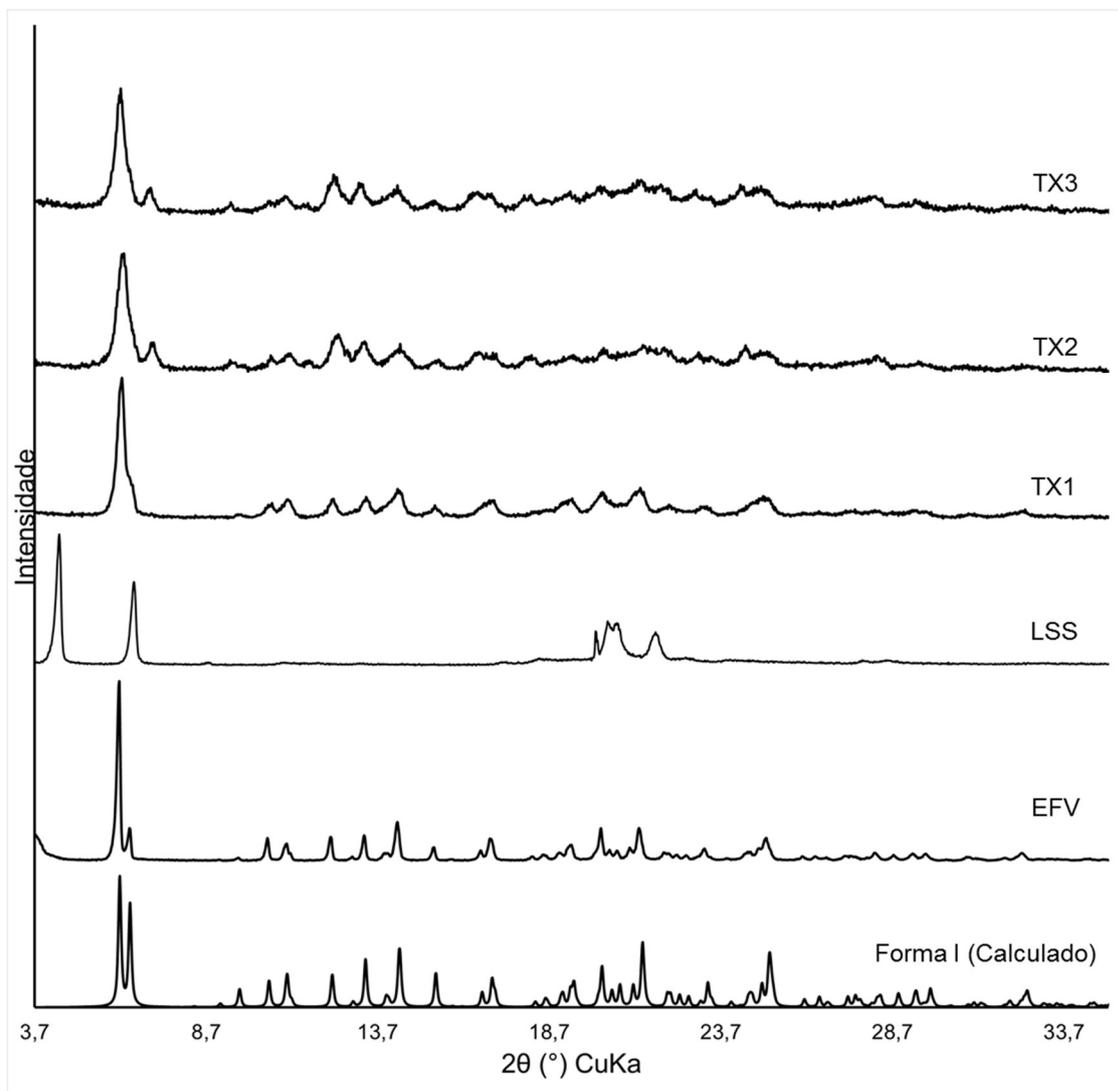


Figura 13. Padrões de difração das amostras TX1, TX2 e TX3 em comparação com padrão de difração da matéria-prima e padrão calculado do polimorfo I

Para dar sequência aos experimentos foram modificadas as concentrações de estabilizantes utilizados, de modo que fosse possível observar os efeitos destas alterações relativos ao aspecto das suspensões, morfologia das partículas, cristalinidade do pó e dissolução das amostras.

#### 5.1.4. Aumento gradativo do teor de polímero

Foram preparadas amostras aumentando gradativamente a concentração de HPMC, sendo elas TX4, TX6 e TX7, que foram comparadas com TX3 (que possui 5% de HPMC em relação à massa de EFV). Dessa forma foi possível analisar o efeito do polímero nas características das amostras e, conseqüentemente, o seu efeito em relação à estabilização dos nanocristais.

O aspecto das amostras TX4, TX6 e TX7 logo após o preparo foi o de uma pasta branca espessa, bem diferente de uma suspensão fluida, que seria ideal para processamento. Depois da secagem por liofilização foi obtido um pó fino e branco. Com relação ao aspecto (Figura 14) as amostras encaixam-se no que foi previamente discutido do item 5.1.3 referente às amostras TX1, TX2 e TX3.

##### 5.1.4.1. Caracterização do estado sólido

###### 5.1.4.1.1. Morfologia das partículas

Na Figura 14 são apresentadas as fotomicrografias obtidas a partir da análise de TX3, TX4, TX6 e TX7 no MEV, sendo observadas partículas de morfologia alongada cuja espessura encontra-se dentro da escala nanométrica. Enquanto TX3, TX4 e TX6 apresentam suas partículas presas em aglomerados, TX7 as tem inseridas em um filme. É possível que o processo de secagem esteja gerando estes aglomerados.

Ao longo do processo de congelamento da suspensão ocorre a nucleação de cristais de gelo, seguida pelo seu crescimento, que podem acabar repelindo os nanocristais da porção congelada, gerando uma fase líquida altamente concentrada (CHUNG; LEE; LEE, 2012). Devido à proximidade desses cristais é possível que se ocasione o enredamento ou mesmo fusão das cadeias poliméricas dos estabilizantes de superfície, semelhante a uma ponte (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013), o que resulta em formação de agregados

irreversíveis prejudicando uma posterior redispersão do pó formado (CHUNG; LEE; LEE, 2012).

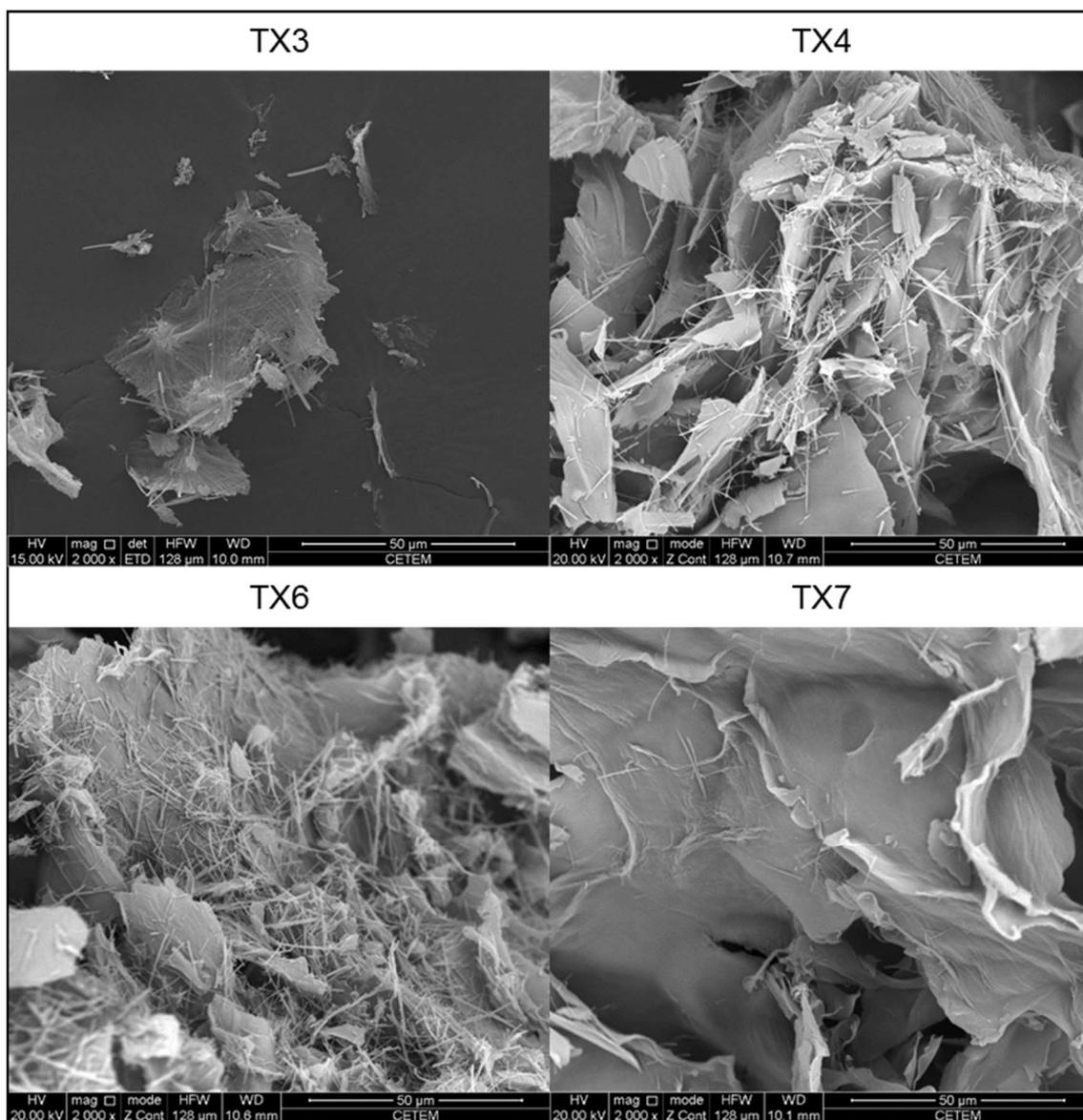


Figura 14. Imagens das amostras relativas ao aumento de HPMC obtidas no MEV.

A secagem por liofilização foi realizada, mesmo com suas potenciais dificuldades, uma vez que era a metodologia mais acessível durante a fase de pesquisa. A metodologia utilizada foi a mesma para todas as amostras, de modo que fossem minimizadas as possíveis diferenças geradas durante a etapa de congelamento.

#### 5.1.4.1.2. Espectroscopia de infravermelho

Na Figura 15 comparam-se os espectros de IV das amostras com o da matéria-prima. Mais uma vez podem ser vistas as bandas utilizadas para a identificação do EFV, como citado anteriormente (GOMES *et al.*, 2013).

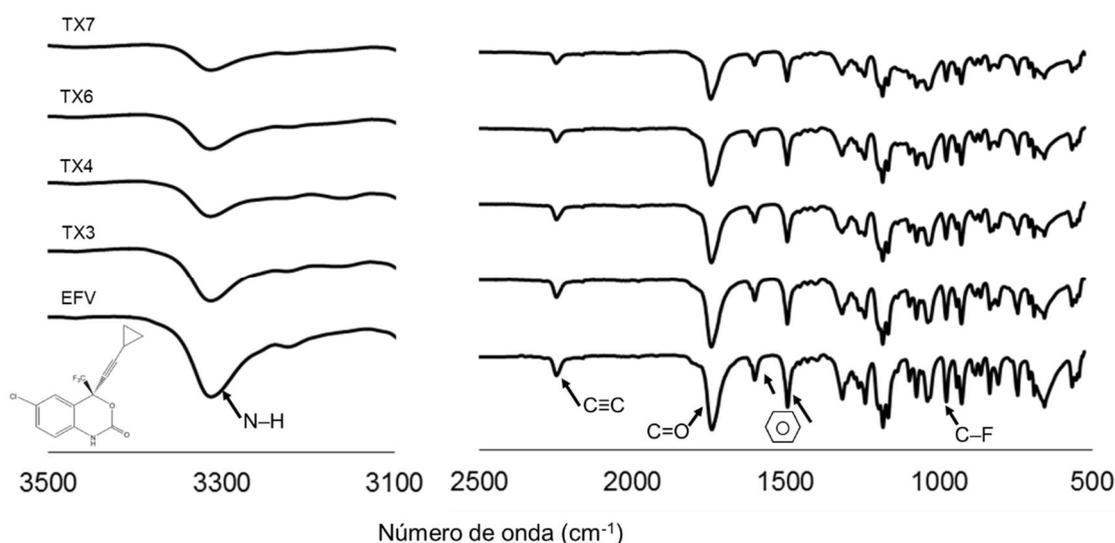


Figura 15. Comparação dos espectros de IV de amostras TX3, TX4, TX6 e TX7 com o espectro do EFV.

Observando os espectros é visto que o aumento da concentração de polímero na formulação é acompanhado por uma redução na intensidade das bandas características do fármaco. Uma possível explicação para este fenômeno é que ao se adicionar mais polímero à formulação, diminui-se a proporção de EFV em relação à massa total do pó, reduzindo a intensidade do sinal.

Este efeito é mais proeminente na banda em  $3311,99\text{ cm}^{-1}$ , relativa ao estiramento de NH. Outra hipótese que pode explicar o fenômeno observado é a ocorrência de ligações de hidrogênio entre o polímero e o fármaco. Uma vez que o HPMC possui diversos pontos apropriados para a formação de ligações de hidrogênio, é possível que o hidrogênio pertencente à porção lactâmica do EFV esteja fazendo uma ligação intermolecular com um desses pontos. Isto

aumentaria o rigidez da ligação NH, reduzindo sua vibração; logo a intensidade da banda  $3311\text{ cm}^{-1}$  ficaria reduzida (STUART, 2004), como apresentado na Figura 15.

A manutenção da presença de picos relativos ao EFV indica não apenas sua presença nas amostras, mas também a ausência de algum tipo de reação química entre fármaco e excipientes, que poderia levar à incompatibilidade (MAHAPATRA; MURTHY, 2014).

#### 5.1.4.1.3. Difração de raios X

A Figura 16 apresenta comparação dos padrões de difração de raios X das amostras e da matéria-prima com o padrão calculado para a forma I do EFV, com suas intensidades normalizadas para que se torne possível uma análise mais precisa das posições dos picos encontrados, permitindo identificar a presença de mistura de estados cristalinos, caso haja alguma.

Assim como discutido no item anterior para TX1, TX2 e TX3, as amostras TX4, TX6 e TX7 possuem os picos característicos que indicam a presença de polimorfo I de EFV. As amostras também possuem seus picos de difração mais largos do que o apresentado pela matéria-prima. Mais uma vez esta pode ser uma indicação da redução do cristalito, comumente acompanhada da diminuição do tamanho de partícula. Este fato é condizente com as fotomicrografias que mostravam partículas alongadas de espessura nanométrica.

Assim como visto em TX2 e TX3 a amostra TX4 apresenta pico  $2\theta$  de  $7^\circ$ . Isso não ocorre com TX6 e TX7, o que não necessariamente significa sua ausência, uma vez que o aumento da concentração de HPMC, que é amorfo, pode mascarar os picos de menor intensidade. O aumento na concentração de polímero também diminui a relação sinal/ruído e altera a linha base, o que é observado de forma mais pronunciada em TX7, onde a concentração de HPMC é de 40%.

Assim como discutido em outras amostras, é mantida a presença de material no seu estado cristalino, uma vez que são encontrados picos de difração. Isto indica que o incremento da dissolução, que será discutido

posteriormente, pode estar relacionado ao tamanho de partícula nanométrico e não a uma amorfização da amostra. Ainda há, contudo, a ressalva de que seriam necessárias outras técnicas para caracterizar mais precisamente a estrutura cristalina das amostras.

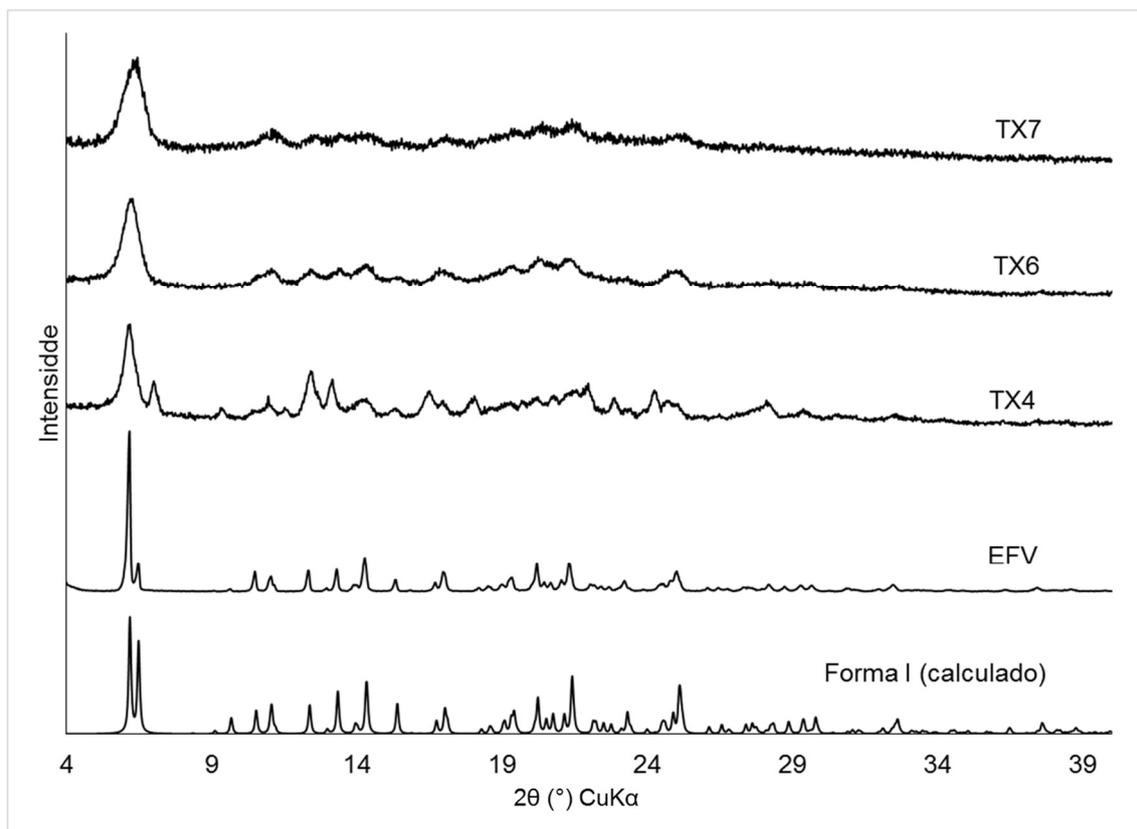


Figura 16. Padrões de difração das amostras TX4, TX6 e TX7 em comparação com padrão de difração da matéria-prima e padrão calculado do polimorfo I

As técnicas de caracterização mostraram, de modo geral, que o aumento de polímero na formulação, apesar de gerar pequenas alterações nos espectros de IV e aumentar o ruído (presença de material amorfo) no padrão de difração, mantém tanto a estrutura química quanto a estrutura cristalina do EFV. Também é indicado pelo alargamento dos picos de DRX que ocorre redução no tamanho do cristalito, o que pode ser resultado de um tamanho de partícula nanométrico. Os efeitos do aumento da concentração de HPMC na dissolução das amostras serão discutidos posteriormente.

Uma vez analisados os efeitos provenientes do aumento do teor de HPMC nos resultados obtidos a partir dos experimentos de cristalização, torna-se necessário conhecer o efeito do aumento de LSS nas formulações.

#### 5.1.5. Aumento da concentração de LSS

Foi feita uma amostra TX5 (que continha 4% de LSS em relação à massa de EFV) e os resultados das análises realizadas foram comparados com os resultados obtidos na amostra TX4, que contém mesmo teor de polímero, no entanto com apenas 2% de LSS.

Sabe-se que o LSS possui efeito irritante à mucosa quando em altas concentrações (NEPPELBERG *et al.*, 2007); sendo assim, uma formulação com maior quantidade de LSS pode não ser indicada para um medicamento que será administrado por via oral e que entrará em contato direto com a mucosa do TGI. Outro efeito indesejável do LSS é a formação intensa de espuma durante o processo (KIBBE, 2000), que pode dificultar tanto as etapas laboratoriais quanto o desenvolvimento de método de cristalização em larga escala. Logo, a amostra TX5 teve caráter elucidativo em relação ao efeito do aumento da concentração de LSS como estabilizante de cargas na precipitação por antissolvente, não sendo esta uma amostra considerada adequada para uma futura formulação devido ao seu alto teor de surfactante.

O aspecto obtido com a amostra TX5 tanto após o preparo como após a secagem foi o mesmo verificado nas amostras anteriores, porém com maior formação de espuma durante o processo. A seguir são mostrados os resultados referentes à caracterização de TX5.

### 5.1.5.1. Caracterização do estado sólido

#### 5.1.5.1.1. Morfologia das partículas sólidas

Analisando as imagens obtidas no MEV e mostradas na Figura 17 percebe-se que o aumento da concentração de LSS tem efeito direto na morfologia das partículas. Enquanto na amostra TX4 é possível observar a presença de cristais em forma de agulha, na amostra TX5 praticamente não são mais vistas partículas isoladas.

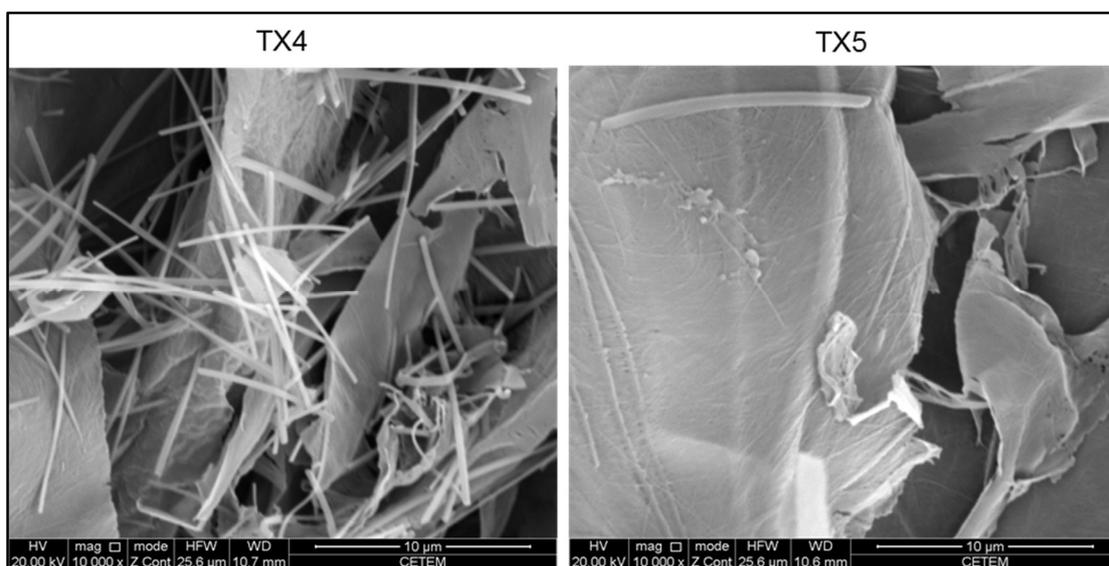


Figura 17. Imagens das amostras relativas ao aumento de LSS obtidas no MEV. Aumento utilizado: 10000 vezes.

Uma possível explicação para este fenômeno é que nesta formulação a massa de estabilizante utilizada é muito próxima à sua concentração micelar crítica (CMC) de 0,23% m/v (KIBBE, 2000). A formação de filme polimérico pode estar sendo auxiliada pela maior concentração do tensoativo LSS (STEWART; HEARN; WILKINSON, 2000), explicando o porquê de TX4 possuir partículas mais evidenciadas do que TX5. No entanto, não foram realizados experimentos para investigar mais a fundo esta questão.

### 5.1.5.1.2. Espectroscopia de infravermelho

Após a secagem, a análise de infravermelho do pó apontou a presença de fármaco na amostra de acordo com o surgimento das bandas características do EFV no espectro, Figura 18.

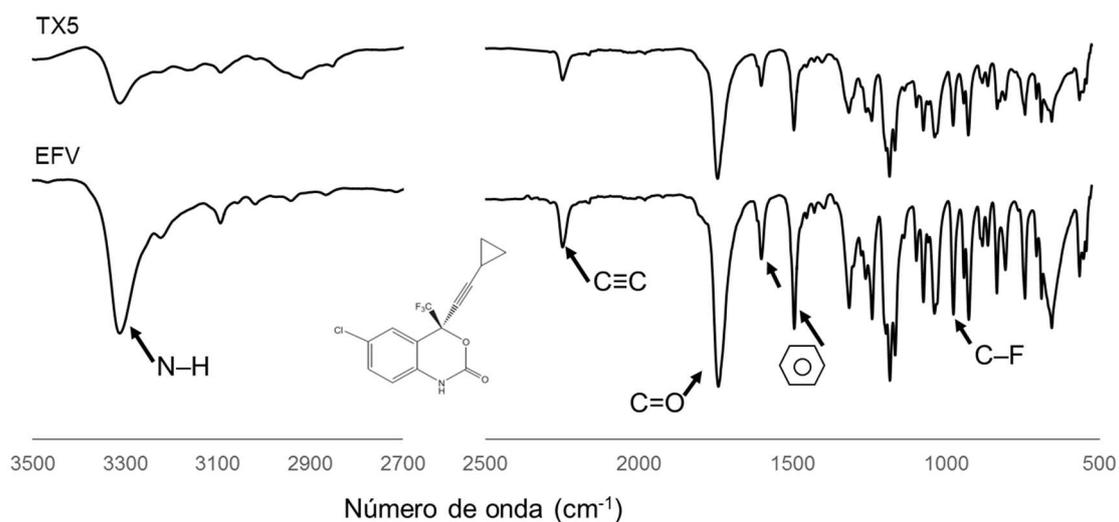


Figura 18. Comparação do espectro de IV obtido com a amostra TX5 com o espectro no IV da matéria-prima.

Mais uma vez é possível observar as bandas utilizadas para a identificação do EFV (GOMES *et al.*, 2013), confirmando a presença de fármaco na amostra, porém com menor intensidade do que na matéria-prima, especialmente a banda relativa ao estiramento da ligação NH. Novamente esta alteração parece estar ligada à formação de ligações de hidrogênio entre o EFV e o HPMC, como discutido anteriormente para as outras amostras.

### 5.1.5.1.3. Difração de raios X

Na Figura 19 é feita uma comparação do padrão de difração de raios X da amostra TX5 e da matéria-prima com o padrão calculado para o polimorfo I EFV, com suas intensidades corrigidas para que fosse possível uma análise mais

precisa, sendo possível identificar qualquer possível de mistura de fases cristalinas.

O padrão de DRX de TX5 é muito semelhante àquele visto para TX4. Ambas possuem picos característicos à forma I do EFV, porém mais largos, indicando redução do tamanho de cristalito, e há pico em  $7^\circ 2\theta$ .

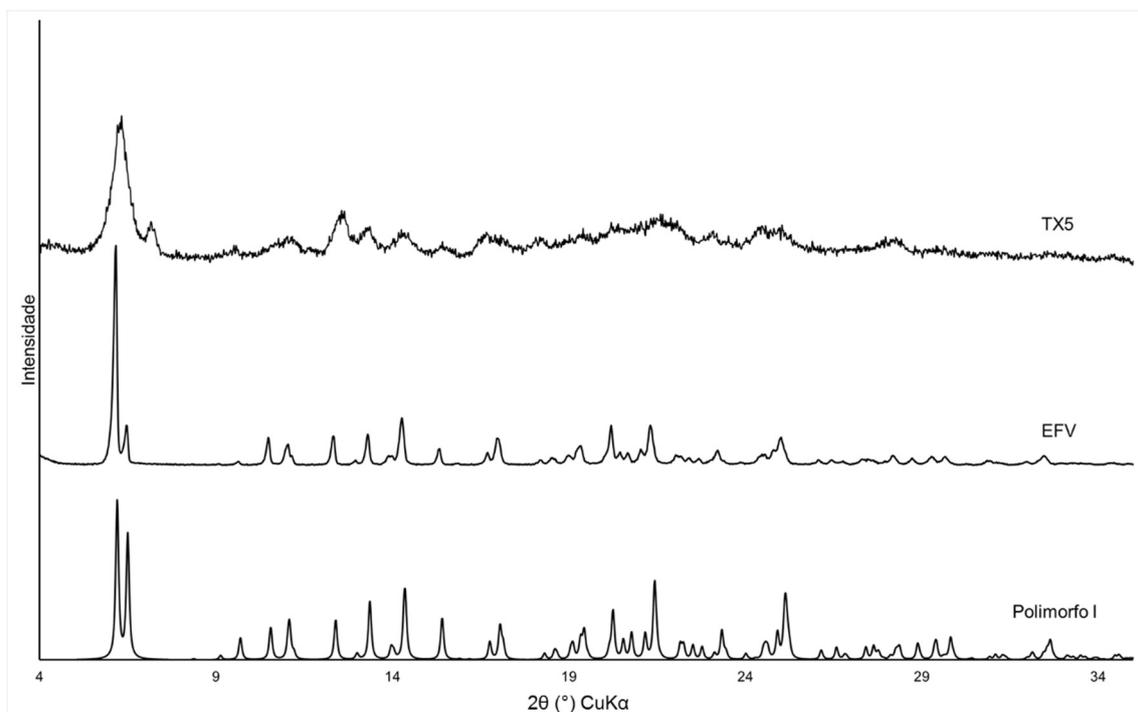


Figura 19. Padrão de difração da amostra TX5 em comparação com padrão de difração da matéria-prima e padrão calculado do polimorfo I

De acordo com os resultados de caracterização não há diferença química ou mesmo no arranjo espacial entre as amostras TX4 e TX5, indicando que os estabilizantes não possuem influência sobre essas características. A maior distinção ocorreu na análise da morfologia. É possível que a redução da tensão superficial causada pelo incremento na concentração de tensoativo tenha provocado a formação de filme mais intensa em TX5 do que em TX4.

Após a caracterização do estado sólido e observações relativas à morfologia e ao tamanho de partícula das amostras, faz-se necessária a comparação dos perfis de dissolução. Somente com a interpretação destes resultados podem ser feitas considerações sobre quais parâmetros experimentais da cristalização são passíveis de otimização.

### 5.1.6. Dissolução

Após observar todos os resultados referentes às amostras provenientes dos experimentos de precipitação, foram realizados ensaios de perfil de dissolução. Estes foram comparados entre si de modo a entender o efeito do processo de precipitação e o reflexo das alterações nas formulações sobre a dissolução das amostras.

Primeiramente foi realizado o doseamento das amostras de modo que fosse possível obter o teor de EFV e, portanto, quantificar o EFV dissolvido ao longo do ensaio de dissolução. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos com relação ao teor das amostras, obtidos nos ensaios de doseamento.

Tabela 7. Teor de EFV das amostras.

<b>Amostra</b>	<b>Teor de EFV (%) (Média ± desvio padrão)</b>
TX1	88,04 ± 9,24
TX2	77,06 ± 0,97
TX3	65,74 ± 0,51
TX4	75,94 ± 9,92
TX5	73,25 ± 7,49
TX6	53,63 ± 6,79
TX7	57,19 ± 3,55

Os teores obtidos são considerados baixos, o que provavelmente está relacionado ao método de preparo. Como apresentado na Figura 8, a solução de metanol e EFV altamente concentrada, 53,3% m/v, é adicionada sobre a fase antissolvente; sendo assim, mesmo poucos mililitros de solução (resíduos de solução no béquer ou na seringa) contêm grandes quantidade de IFA. Ou seja, uma pequena perda de solução pode gerar grande impacto no rendimento como um todo. Este tipo de problema é muitas vezes verificado nas etapas de bancada, apresentando um desafio a ser superado na fase de escalonamento do processo laboratorial para o nível industrial.

Para que fosse determinado o meio de dissolução apropriado para a análise das amostras provenientes do preparo por cristalização primeiramente foi testado o meio LSS 0,5% (m/v), já utilizado para análise dos comprimidos de 600 mg fabricados em Farmanguinhos (HONÓRIO *et al.*, 2013). A Figura 20 mostra a diferença entre os perfis obtidos a partir da matéria-prima e da amostra TX2. No meio LSS 0,5% a dissolução do EFV supera a da amostra TX2, mas a curva relativa à amostra apresenta desvio padrão muito alto em todos os pontos, indicando não ser possível diferir entre a dissolução do EFV e a da amostra. Quando o meio de dissolução utilizado é o LSS 0,1% é possível obter perfis com desvio padrão menor e há uma separação entre eles. Também se observa que a dissolução do EFV é bem menor nesse meio do que no outro, devido à menor concentração de LSS.

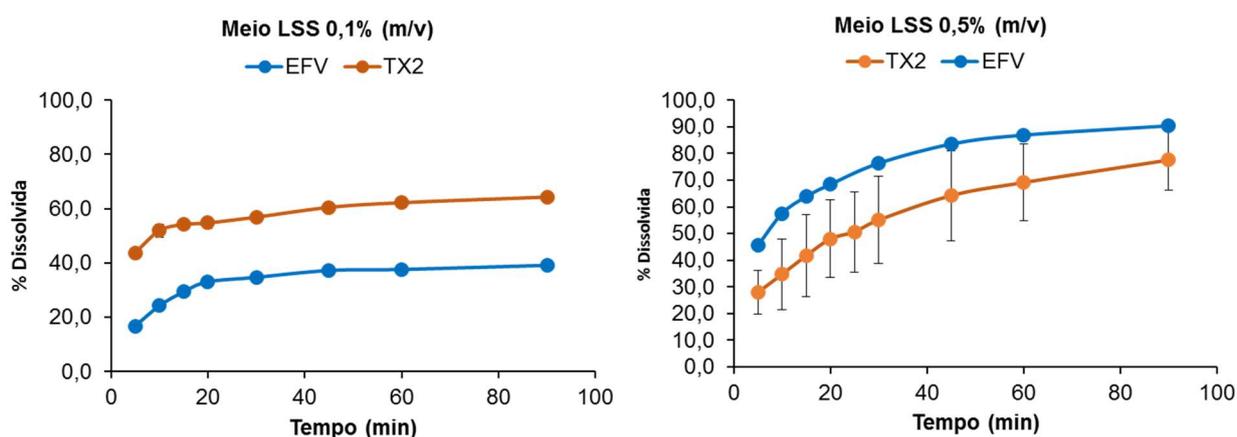


Figura 20. Perfis de dissolução obtidos nos meios LSS 0,5% e LSS 0,1%.

Foi reportado que quando HPMC está em solução em presença de LSS ocorre um aumento da viscosidade do sistema, inclusive retardando a liberação de fármaco disperso em matriz hidrofílica (PYGALL *et al.*, 2014). Portanto, uma hipótese que explicaria o resultado obtido na dissolução de TX2 em LSS 0,5% é que pode ter ocorrido a formação de uma matriz em torno das partículas, gerando uma barreira física e retardando a dissolução do EFV, indicando que o meio LSS 0,1% é mais adequado para realização das dissoluções das amostras de nanocristais de EFV que o meio LSS 0,5%.

Os perfis foram comparados através de ANOVA a fim de garantir a presença de diferença estatística significativa. Havendo influência da troca de

amostra, os perfis de dissolução podem ser considerados estatisticamente diferentes.

Após a comparação, em meio mais discriminativo LSS 0,1%, das amostras preparadas (Figura 21) é possível obter algumas conclusões. Primeiramente foi observado incremento no perfil de dissolução do EFV nas formulações TX1, TX2 e TX3 indicando que a metodologia utilizada é eficaz como alternativa para aumentar a dissolução.

Outro ponto interessante é que o aumento da concentração dos estabilizantes tem como efeito um maior incremento na dissolução, isso é verificado a partir do fato que TX3 tem a maior dissolução entre as amostras testadas e também a maior concentração de estabilizantes, até então. Todavia mesmo com o aumento referido, não foram atingidos 100% de fármaco dissolvido, o que mostra a necessidade de otimizar a formulação para que possa ser atingido este quesito.

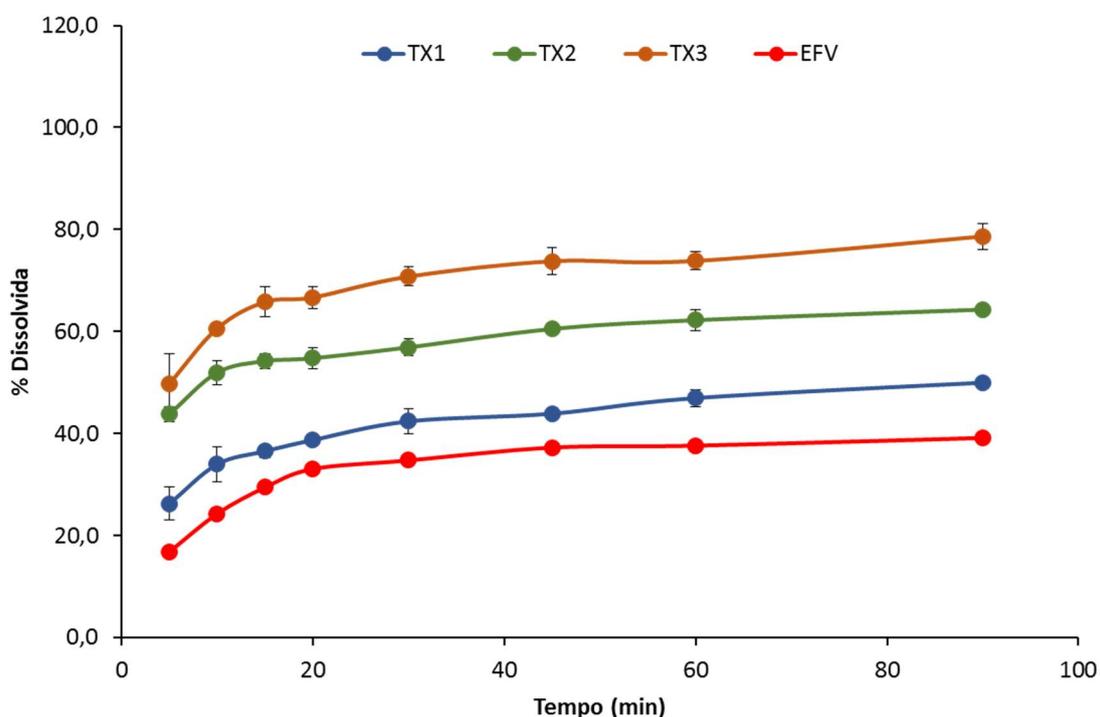


Figura 21. Comparação dos perfis de dissolução de TX1, TX2 e TX3 com EFV matéria-prima.

Foi visto que os nanocristais obtidos por este método de preparo têm perfil de dissolução mais rápido do que o da matéria-prima. Ao modificar a concentração de HPMC presente nas amostras, percebem-se novas diferenças entre os perfis de dissolução.

De acordo com o verificado na Figura 22, cuja diferença entre os perfis foi verificada através de ANOVA, é possível ver que o aumento na massa de polímero utilizado, neste caso o HPMC, provoca incremento no perfil de dissolução, quando comparadas as amostras com a matéria-prima. Outro ponto a ser levantado é a proximidade entre os perfis de TX6 e TX7.

Observando o gráfico da Figura 22 é possível ver que nos primeiros 60 minutos da dissolução a amostra TX6 dissolve aproximadamente 85% do seu conteúdo de fármaco no meio, contra apenas 73% da amostra TX7; ao final da dissolução TX6 excede 90% de EFV dissolvido.

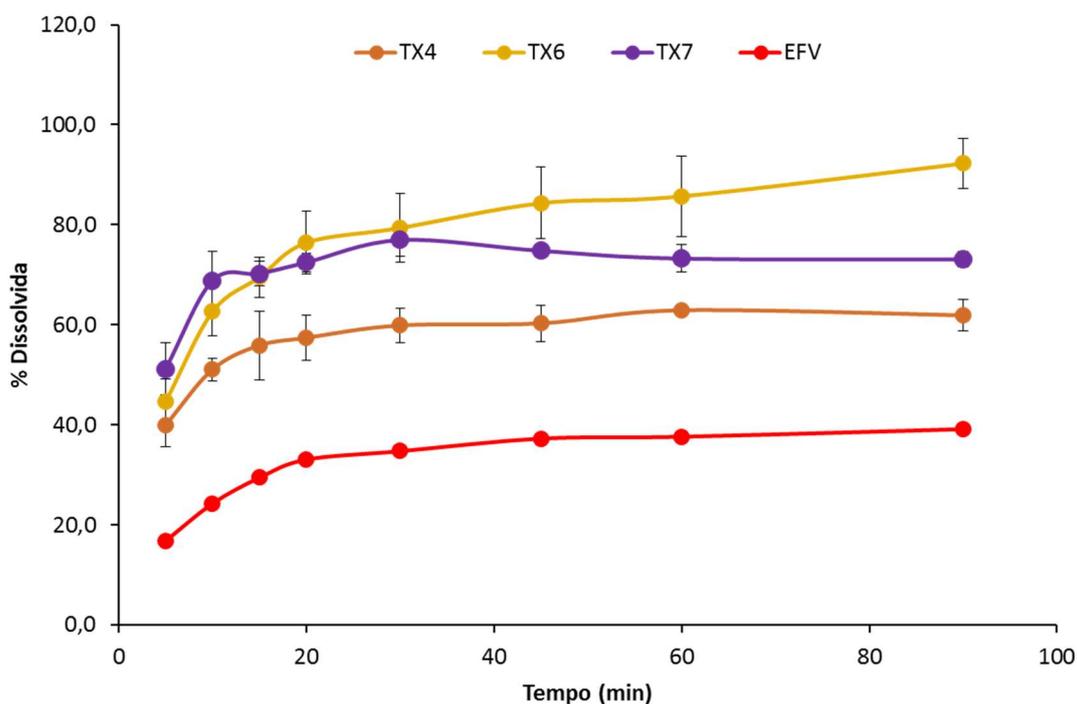


Figura 22. Comparação entre os perfis da matéria-prima e amostras TX4, TX6 e TX7

No entanto, ao analisar o desvio padrão na curva do perfil de TX6 e TX7, percebe-se que a amostra com 20% de HPMC possui um desvio padrão relativo (DPR) muito mais alto, com valores acima do aceitável de 5% (ANVISA, 2004) em todos pontos de coleta. Isto indica pouca uniformidade do pó, ao contrário da amostra TX7, cujo desvio padrão indica uma uniformidade maior.

Uma vez que foi percebido em amostras anteriores que o aumento do polímero estabilizante tende a promover uma maior dissolução, o esperado seria que o perfil de TX7 (40% de HPMC) fosse significativamente maior do que o de TX6 (20% de HPMC), no entanto, isso não se comprovou experimentalmente.

Isto pode estar relacionado à falta de uniformidade de TX6. O desvio padrão presente nesta amostra é muito alto, onde os resultados no seu limite inferior são bastante semelhantes aos obtidos com TX7, exceto no ponto de 90 minutos. Uma hipótese é que ao final da dissolução algum aglomerado de pó com maior quantidade de EFV possa ter se inserido na cânula coletora e isso resultaria em uma coleta de alíquota mais concentrada de fármaco. No entanto, não é possível afirmar com certeza que esta seja a causa real do efeito observado sem antes realizar uma investigação mais profunda deste fenômeno.

Seguindo as comparações, foi necessário avaliar a relação que o aumento da concentração de LSS tem com o ensaio de dissolução. Como já foi exposto, uma amostra com alto teor de LSS não é interessante para uma administração por via oral pois seu contato direto com as mucosas pode ser prejudicial, além de gerar uma quantidade de espuma excessiva durante a cristalização, podendo prejudicar o processo industrial. Contudo, é importante entender o papel dos estabilizantes nos experimentos de cristalização e seu reflexo no perfil de dissolução.

Na Figura 23 há uma comparação entre os perfis de dissolução de TX3 e TX4 (formulação na Tabela 4). O que se observa é que quando aumentada apenas a concentração de LSS de 2% para 4% isso se reflete em algum incremento na dissolução. Porém, o impacto do aumento do teor de LSS não se mostra tão expressivo quanto aquele observado com o aumento da quantidade de HPMC, com a ressalva de que o percentual de aumento do LSS foi bem menos significativo que o do HPMC. Novamente foi utilizada ANOVA para certificação da diferença estatística entre os perfis de dissolução.

Um fator que tem influência sobre a dissolução é a molhabilidade, que pode ser definida como a capacidade de um sólido, quando em contato com um líquido, de adsorvê-lo à sua superfície (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008), sendo um reflexo das interações entre a interface sólido-líquido. O fenômeno da molhabilidade é essencial para processos como desintegração, dispersão e solubilização, além de influenciar diretamente na dissolução dos fármacos (PURI *et al.*, 2010).

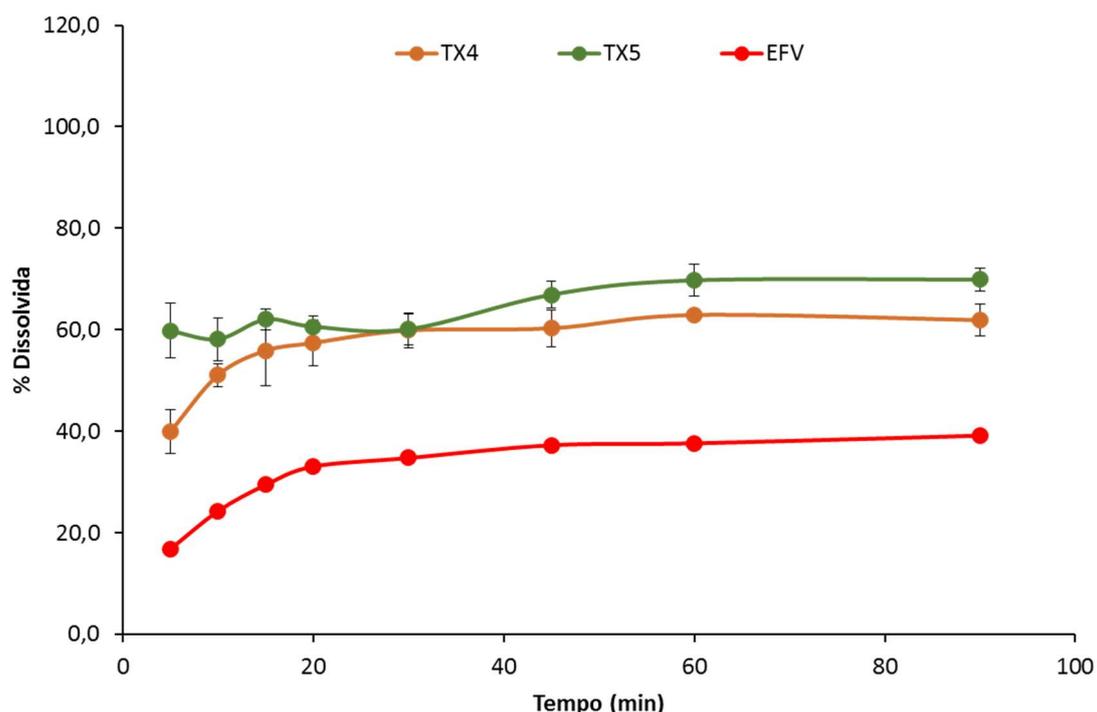


Figura 23. Comparação dos perfis de dissolução de TX5 e TX4 com o da matéria-prima.

Uma forma de determinar a molhabilidade é medindo o ângulo de contato  $\theta$  de uma gota de líquido com a superfície do sólido: quanto menor for o ângulo  $\theta$  maior é o molhamento do pó, indicando que o líquido espalha-se espontaneamente. Quando o meio testado é a água, o ângulo de contato é uma medida de hidrofilia do sólido (LAZGHAB *et al.*, 2005).

Na Figura 24 são apresentados as imagens e os ângulos de contato  $\theta$  de uma gota de água com a superfície de uma pastilha. Enquanto na Tabela 8 são comparados o percentual de fármaco dissolvido em 90 minutos de ensaio; a eficiência de dissolução obtida e o ângulo  $\theta$  para cada amostra assim como para o IFA.

Enquanto a matéria-prima apresenta  $\theta$  de  $77,9^\circ$ , TX1 tem  $\theta$  de  $43,6^\circ$ , indicando que o processo de precipitação aumentou a molhabilidade do sólido pela água. Essa redução no ângulo de contato aparece de modo semelhante para todas as amostras preparadas, exceto para TX5 onde a redução do ângulo  $\theta$  é mais pronunciada como será discutido em breve. Na Figura 24 é feita uma comparação apenas dos resultados de  $\theta$  de TX1, TX5 e TX7 com o do EFV, de modo que possa ser visto mais claramente o efeito do processo de cristalização assim como os efeitos referentes à alteração nas concentrações de estabilizantes.

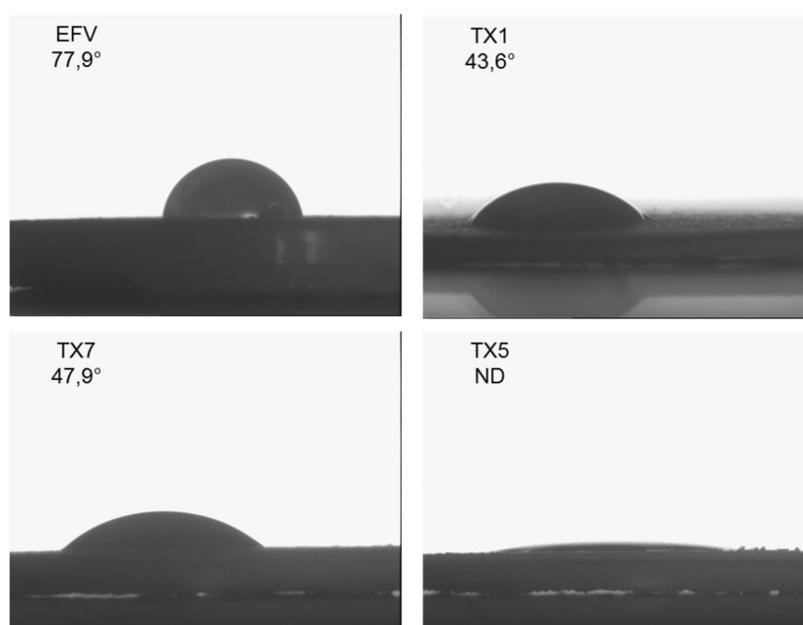


Figura 24. Comparação dos ângulos de contato sólido-líquido das amostras TX1, TX5 e TX7 com a matéria-prima.

Comparando TX1 com TX5 (teores de estabilizantes na Tabela 4) observa-se uma redução significativa de  $\theta$ , que passa de  $43,6^\circ$  para tender a zero. É possível ver em TX5 (Figura 24) o espalhamento quase total da gota de água, indicando que o aumento da concentração de LSS, como estabilizante das cargas de superfície, gera aumento na molhabilidade.

Ainda observando a comparação feita na Figura 24 é possível ver que o aumento da molhabilidade não acompanha o aumento da concentração de HPMC, como faz no caso do LSS. Para as amostras TX1 e TX7, aquela com o menor ângulo de contato, logo com maior molhabilidade, é a que contém menor

teor de HPMC. Portanto, o aumento da concentração do polímero tem efeito negativo sobre a molhabilidade da amostra.

Ao correlacionar os resultados obtidos nos ensaios de molhabilidade com o percentual dissolvido de EFV durante a dissolução das amostras e do próprio EFV matéria-prima, (Tabela 8), percebe-se que o aumento da molhabilidade, gerado pela maior concentração de LSS, reflete-se na dissolução de TX5. Contudo, não há incremento de molhabilidade resultante do aumento de HPMC, de toda forma ainda sim é observada maior dissolução de TX7 quando comparada a TX5, Figura 25.

Tabela 8. Relação do ângulo de contato líquido-sólido com a quantidade de EFV dissolvida em 90 minutos.

<b>Material</b>	<b>% dissolvida 90 min (média ± desvio padrão)</b>	<b>Eficiência de dissolução (média ± desvio padrão)</b>	<b><math>\theta</math> (°)</b>
EFV	39,15 ± 0,22	33,65 ± 0,02	77,9
TX1	50,00 ± 0,5	41,89 ± 1,34	43,6
TX2	64,31 ± 0,72	57,17 ± 1,48	42,5
TX3	78,66 ± 2,53	69,05 ± 1,29	11,8
TX4	61,91 ± 3,14	57,37 ± 2,52	31,2
TX5	69,89 ± 3,11	63,64 ± 1,99	ND <sup>1</sup>
TX6	92,25 ± 5,00	78,07 ± 6,08	53,3
TX7	73,07 ± 1,54	70,26 ± 1,39	47,9

Estes resultados indicam que, apesar de a molhabilidade ser uma característica importante para o processo de dissolução, não é o único fator determinante para garantir seu aumento. Isto pode ser comprovado pelo fato de a amostra que apresentou maior incremento na dissolução não foi a de maior molhabilidade.

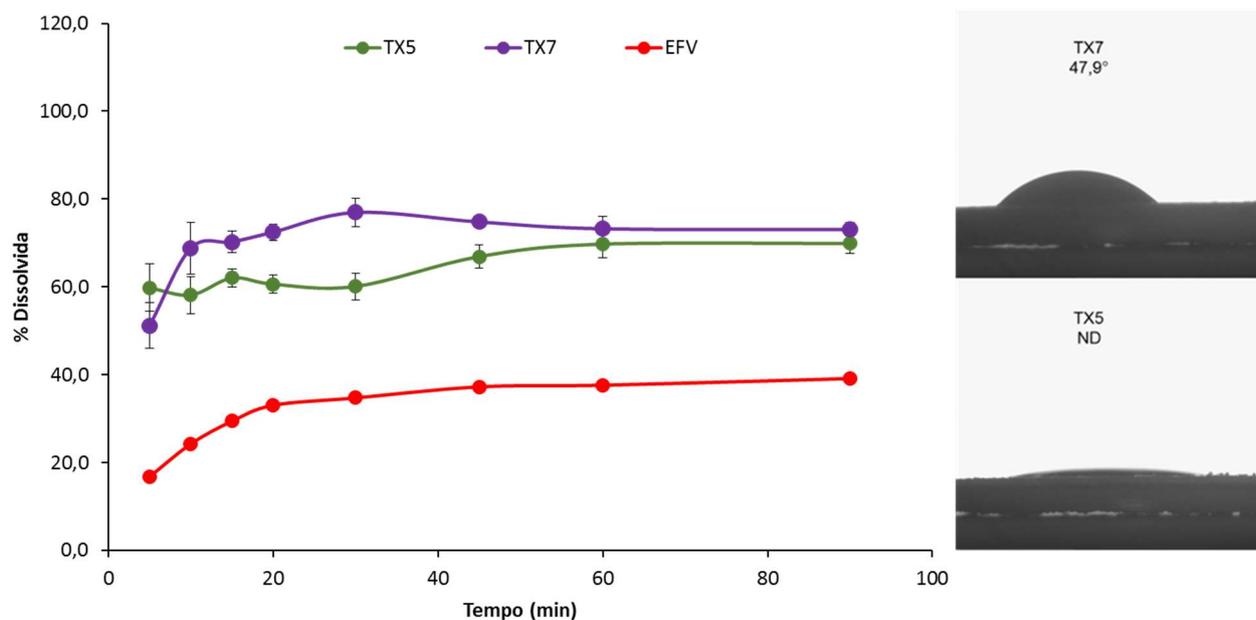


Figura 25. Comparação dos perfis de dissolução de TX7 e TX5, relacionando-os aos seus ângulos de contato.

Dentre as formulações preparadas e avaliadas algumas são mais promissoras. Apesar de TX7 não ter tido a maior dissolução, sua formulação foi escolhida como formulação base para avaliar outros parâmetros experimentais. Isso ocorreu devido ao fato de que se optou por utilizar uma alta concentração de estabilizante para os testes relativos ao tipo de polímero, pois assim é maior a probabilidade de uma cobertura eficiente dos nanocristais, uma vez que diferentes polímeros podem ter capacidades de adsorção diversas frente ao fármaco de escolha e que a cobertura ineficaz dos cristais tende a resultar em aumento do tamanho de partícula (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013). Contudo, a escolha de uma alta concentração polimérica não significa que, sendo necessário, a concentração do estabilizante estérico não poderá ser reduzida novamente sendo encontrado um polímero com maior capacidade de estabilização das partículas.

## 5.2. Mudança da saturação do sistema

### 5.2.1. Mesma proporção entre as fases

A formulação TX7 foi preparada com 15 mL de solvente e 140 mL de antissolvente, resultando em uma razão solvente/antissolvente de aproximadamente 1:9. É esperado que quanto maior a diferença de volume entre as fases maior será a taxa de nucleação, reduzindo o tamanho de partícula obtido. Logo, foi proposta uma modificação radical nesta razão.

Em via de melhorar a fluidez do sistema, promovendo uma melhor agitação, e testar o efeito de uma redução drástica na proporção entre as fases foi realizado um experimento de cristalização utilizando 100 mL de metanol (solvente) e 100 mL de água (antissolvente) e que recebeu o código TX8.

A suspensão resultante foi semelhante a uma pasta, com pouca ou mesmo nenhuma fluidez (observação do aspecto). Outra característica foi sua incapacidade de dispersar em água, o que impossibilitou a realização de análise de tamanho de partícula (espalhamento dinâmico de luz) e de potencial zeta (cálculo da mobilidade eletroforética) uma vez que ambas as técnicas envolvem uma etapa de diluição da suspensão. Após a secagem, o pó resultando de TX8 passou por caracterização do estado sólido

### 5.2.1. Redução da massa de EFV

Ainda com o intuito de melhorar a eficiência de agitação reduzindo a viscosidade do sistema, foram realizados experimentos diminuindo a massa de EFV dissolvido no solvente.

Foram preparadas duas suspensões, cuja formulação dos estabilizantes baseia-se em TX7 assim como a razão solvente/antissolvente: TX9, na qual o antissolvente foi mantido à temperatura entre 25 a 27 °C; TX10 onde a

temperatura do antissolvente foi mantida a 7,0 e 7,5 °C, utilizando um banho de gelo.

Em relação ao aspecto das amostras, a suspensão TX9 mostrou-se próxima às outras preparadas por ultra-turrax, muito espumosa e viscosa, também se assemelhando a uma pasta densa.

A suspensão TX10 apresentou um aspecto pouco viscoso e leitoso, não sendo identificada a presença de qualquer grumo, havendo apenas uma leve sedimentação. Devido ao seu aspecto mais fluido, foi possível realizar análise de tamanho de partícula e potencial zeta (Figura 26).

De acordo com a análise de DLS foi possível identificar que a suspensão TX10 possui distribuição de tamanho com população majoritária em aproximadamente 200 nm, porém também foi identificada a presença de uma população de menor intensidade, mas de diâmetro micrométrico, como pode ser observado na Tabela 9 que exibe os picos obtidos na análise de tamanho, os picos estão relacionados em ordem decrescente a sua intensidade, sendo o pico 1 de maior intensidade e o 2 de menor intensidade.

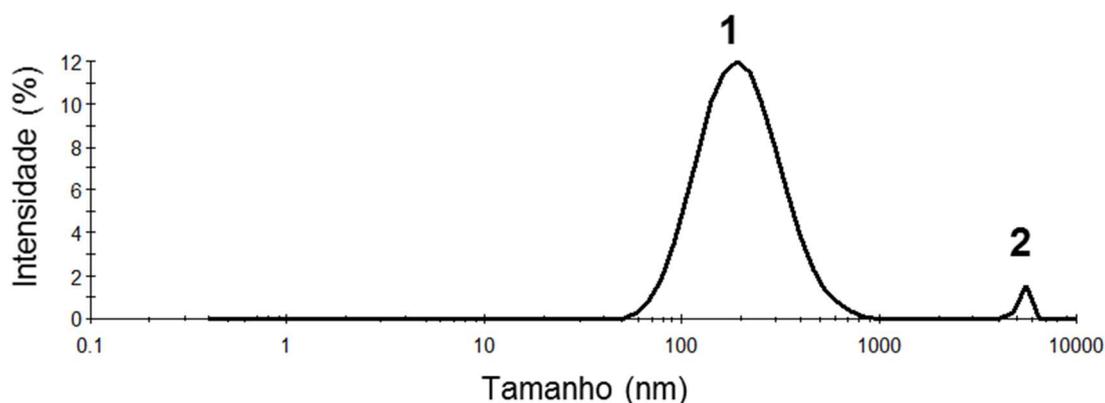


Figura 26. Distribuição de tamanho de partícula de TX10.

Tabela 9. Relação dos picos de diâmetro médio e potencial zeta de TX10

Amostra	Diâmetro Médio (nm)		PDI	Potencial zeta (mV)
	Pico 1	Pico 2		
TX10	222,6	5440	0,419	-37,6

A redução da massa de EFV e da temperatura de antissolvente promoveu uma suspensão com diâmetro médio de partícula 222,6 nm (Tabela 9). O

sedimento que pode ser observado foi identificado na análise, uma vez que aparece um pico maior de 5  $\mu\text{m}$ . Também foi visto que tanto o PDI quanto o  $\zeta$  foram considerados adequados. Após a secagem por liofilização, seguiu-se com a caracterização do pó obtido.

### 5.2.2. Supersaturação do solvente

Em uma tentativa de aumentar ao máximo possível o grau de saturação durante a cristalização e aumentar a carga de fármaco na suspensão resultante, foi realizado um experimento de precipitação a partir de uma solução supersaturada de EFV em metanol.

A suspensão TX11 obtida a partir deste experimento, assim como outras, tinha aspecto viscoso e com grumos, contudo foi possível dispersá-la o suficiente para realizar análise de tamanho de partícula por DLS.

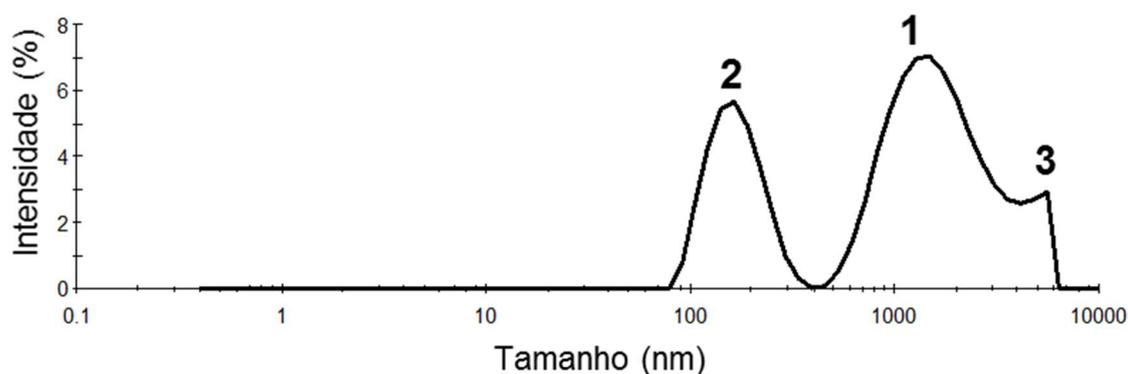


Figura 27. Distribuição de tamanho de partícula de TX11.

Tabela 10. Relação dos picos de diâmetro médio e potencial zeta de TX11

Amostra	Diâmetro Médio (nm)			PDI	Potencial zeta (mV)
	Pico 1	Pico 2	Pico 3		
TX11	1756	170,6	4863	0,857	-55,7

A Tabela 10 deixa claro que a distribuição partículas de TX11 é multimodal e composta por três populações de tamanhos distintos, sendo elencados como picos 1, 2 e 3 em ordem decrescente das intensidades apresentadas.

O pico 1 é formado por partículas com diâmetro médio de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , o pico 2 indica o segundo conjunto de partículas com diâmetro médio de 170,6 nm. Apesar da presença de partículas nanométricas, elas claramente não são a população principal desta suspensão. Logo, isto indica que estas condições não foram ideais para a cristalização.

Vale ressaltar que mesmo após a dispersão de TX11 em água, foram observadas partículas discretas (olho nu), estas possivelmente estão relacionadas com terceira população, pico 3 com 4863 nm. Outra questão é que, apesar da suspensão apresentar  $\zeta$  considerado adequado, seu PDI foi muito alto, refletindo a existência de duas populações de partículas muito relevantes e de tamanho muito distinto.

Apenas pela análise da estabilidade física da suspensão é possível concluir que esta amostra não foi bem-sucedida na estabilização do tamanho de partícula em uma faixa menor do que 1  $\mu\text{m}$ . Devido aos resultados pouco promissores sobre a estabilidade física de TX11, essa amostra não foi levada à caracterização e dissolução.

### 5.2.3. Caracterização

Após o preparo as suspensões TX8, TX9, TX10 foram levadas à secagem por liofilização, de acordo com o método descrito no item 4.3.3. Seguida a secagem, foi realizada a caracterização do pó formado. Para este fim avaliou-se a morfologia por MEV, a identidade química por IV e o arranjo espacial por DRX.

#### 5.2.3.1. Morfologia das partículas

As fotomicrografias referentes à análise da morfologia das partículas está representada na Figura 28. Enquanto TX8 apresenta agregados grandes compostos por partículas alongadas, de espessura nanométrica. As amostras TX9 e TX10 mostraram formação de filme polimérico.

É interessante observar que a formação de filme em TX8 é visivelmente menor que as outras amostras. Isto pode levar a crer que o volume de água utilizado durante o preparo favorece a gelificação do polímero adsorvido na superfície das partículas. Uma outra hipótese para este fenômeno é que o grande volume de metanol utilizado possa ter impedido a formação de filme pelo polímero, uma vez que já foi reportado o uso de metanol para desarranjar matriz de HPMC em comprimidos (NICKERSON *et al.*, 2009).

Comparando as imagens obtidas de TX9 e TX10 pode ser visto que o filme formado em TX9 é mais intenso e homogêneo, enquanto na outra amostra há maior desorganização.

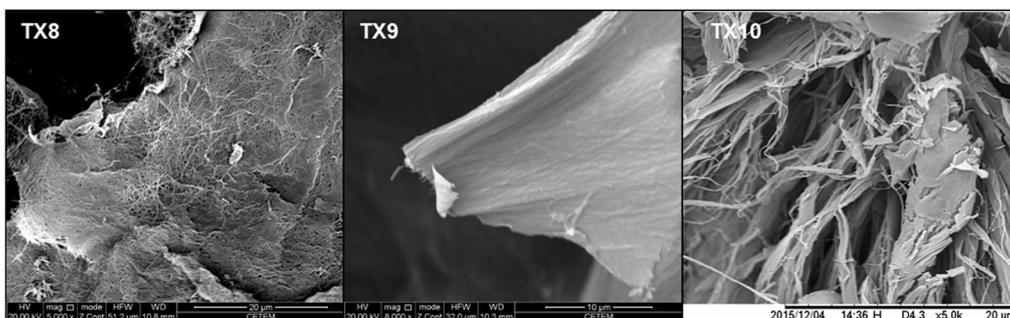


Figura 28. Fotomicrografias de TX8, TX9 e TX10.

É possível que após o preparo das suspensões tenha ocorrido crescimento das partículas, contudo também há a possibilidade de que a forma de secagem esteja interferindo na morfologia das amostras. Isso pode ocorrer devido a deformações das partículas durante a etapa de congelamento da liofilização, já tendo sido reportado o efeito expressivo que a taxa de congelamento exerce sobre o tamanho de partícula e a redispersibilidade do pó (LEE; CHENG, 2006).

#### 5.2.3.2. Espectroscopia de infravermelho

Para a identificação do fármaco nas amostras foi utilizada espectroscopia de infravermelho. Os espectros de absorção obtidos para TX8, TX9 e TX10 estão representados na Figura 29.

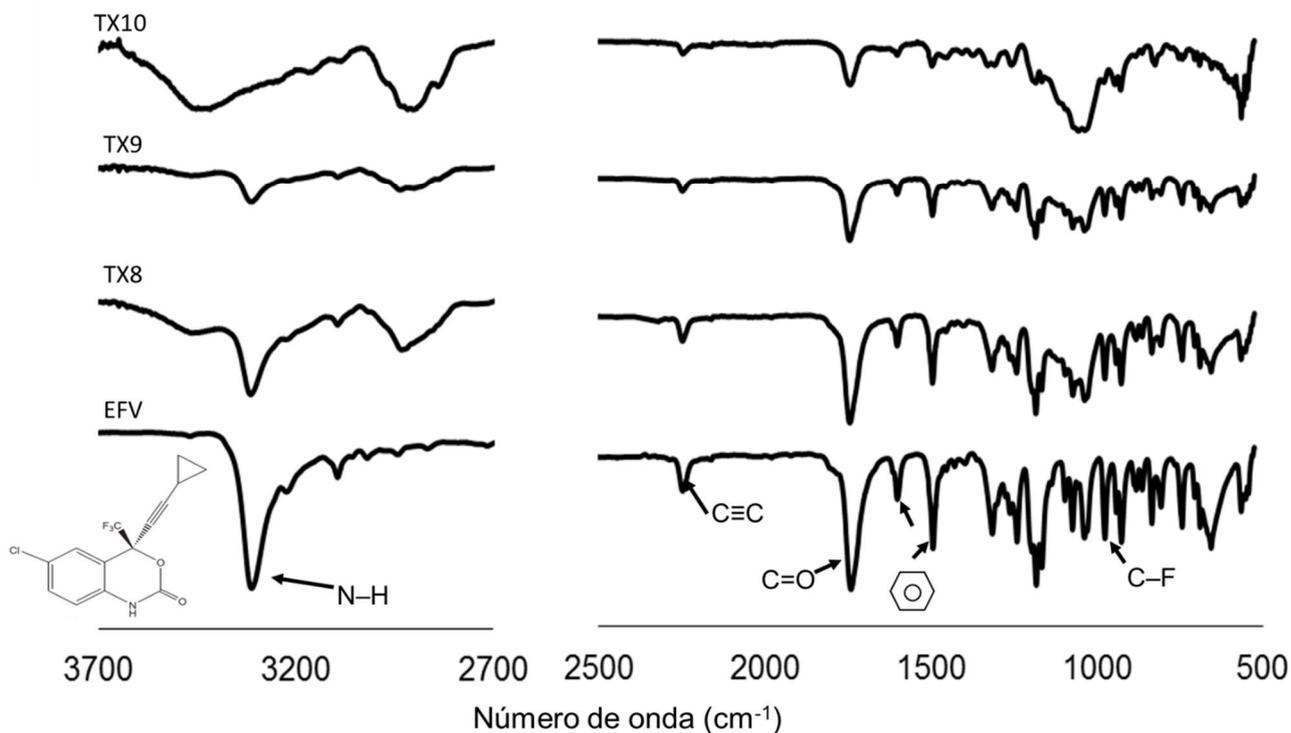


Figura 29. Comparação dos espectros de absorção no IV das amostras TX8, TX9 e TX10 com o da matéria-prima.

Ao comparar os espectros de TX8, TX9 e TX10 é vista uma redução na intensidade das bandas, principalmente a banda relacionada à ligação N-H. Como discutido anteriormente, a presença de ligações de hidrogênio da porção lactâmica do EFV com os estabilizantes (HPMC) pode reduzir a vibração deste grupo funcional reduzindo sua energia, tendendo a apresentar banda de menor intensidade (STUART, 2004).

Apesar das alterações encontradas, a manutenção das bandas características de EFV indica que não há qualquer tipo de incompatibilidade entre o fármaco e seus estabilizantes (MAHAPATRA; MURTHY, 2014).

Porém nos espectros dessas amostras também foi observada uma banda em aproximadamente  $2930\text{ cm}^{-1}$  para TX8 e TX9 e em  $2902\text{ cm}^{-1}$  para TX10, esta não é característica do IFA. Bandas nessa região são comumente associadas às vibrações de ligações CH e CH<sub>2</sub> (RICHARDSON, 2011), possivelmente relacionadas à presença de polímero, devido à sua extensa cadeia carbônica.

### 5.2.3.3. Difração de raios X

Os padrões de difração de raios X de TX8 e TX9 estão apresentados na Figura 30 a seguir, também são expostos no gráfico os padrões calculados para a forma I (MAHAPATRA *et al.*, 2010a) do EFV.

As amostras TX8 e TX9 encontram-se cristalizadas sob a forma I do fármaco. Como visto anteriormente, os dois picos em  $2\theta$  de  $6^\circ$  sofrem alargamento de forma tal que aparentam se somente um pico na mesma localização. Isto pode ocorrer devido à redução do tamanho de cristalito, que é comum de ocorrer em conjunto com a diminuição do tamanho de partícula (BLACHÉRE; BRITAIN, 2008).

Apesar de possuírem a mesma proporção de polímero em sua formulação (ambas com 40% de HPMC relativo à massa de EFV) a relação sinal/ruído de TX8 é muito maior que a de TX9. Uma vez que na microscopia foi observado que a amostra TX8 não possui formação de filme tão pronunciada quanto no caso de TX9, é possível que a formação de filme tenha alguma relação com o ruído notado no padrão de difração de TX9. Contudo esta hipótese não foi investigada mais a fundo.

Na Figura 30 é apenas representado o padrão calculado para Forma I mas o padrão adquirido a partir de TX10 foi comparado os de outros polimorfos do fármaco (dados não mostrados) e não foi vista nenhuma semelhança clara. Em estudo sobre as relações termodinâmicas entre diferentes polimorfos de EFV Chadha e colaboradores (2012a) prepararam polimorfos de EFV a partir de recristalização utilizando diversos solventes orgânicos.

Neste trabalho foi encontrado um polimorfo, recristalizado lentamente a partir de hexano, que possui o mesmo padrão de DRX encontrado para TX10. O autor o chama de forma II (que não é a mesma cuja estrutura foi elucidada por Ravikumar e Sridhar em 2009). O surgimento de uma forma diferente da apresentada pela matéria-prima pode afetar a dissolução do fármaco, além de abrir uma oportunidade para pesquisa mais minuciosa.

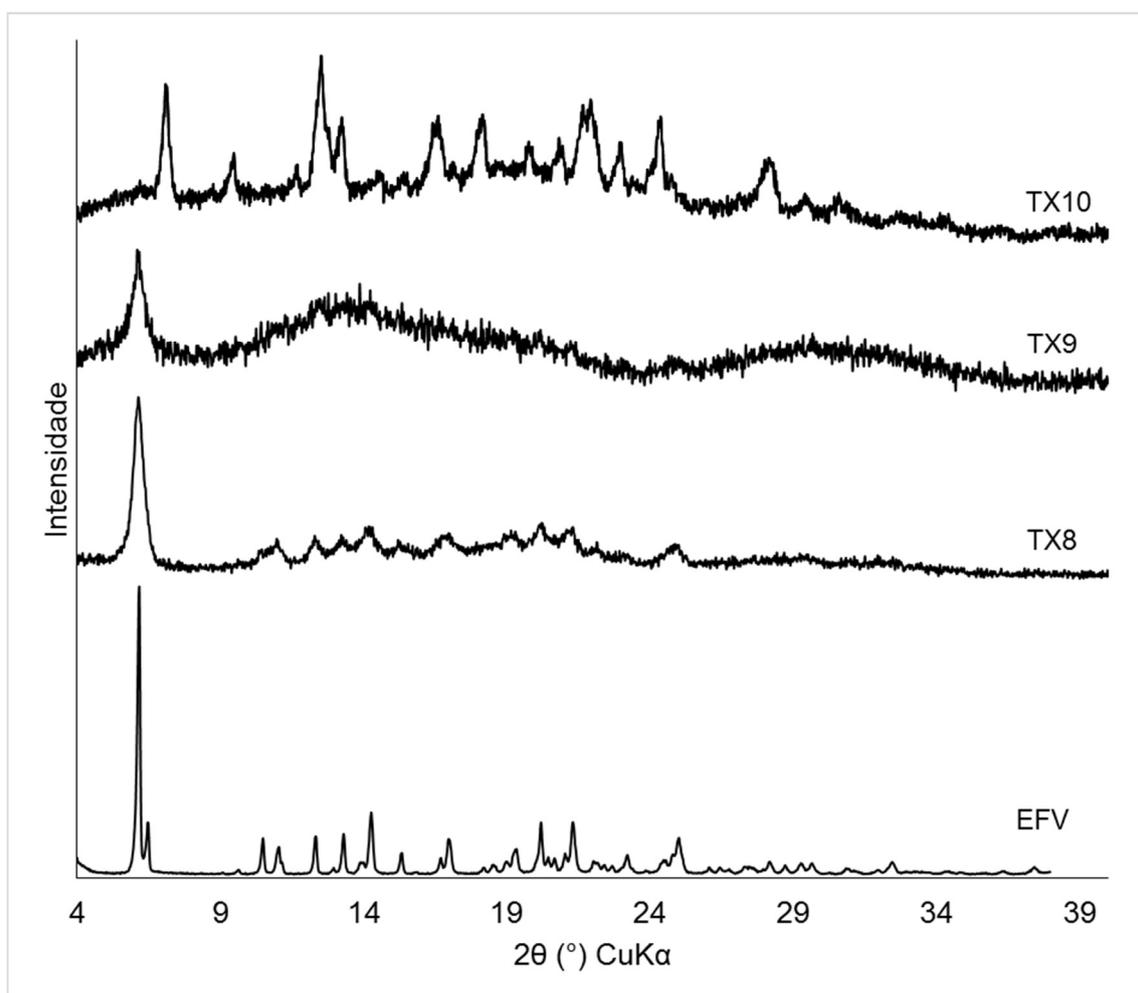


Figura 30. Comparação dos padrões de difração de TX8, TX9 e TX10 com o padrão calculado para Forma I do EFV.

Neste ponto apenas as condições de TX11 mostraram não ser apropriadas para o preparo de uma nanossuspensão, conseqüentemente não adequadas para nanocristalização. O IV indica que não houve nenhum tipo de reação química entre os componentes da formulação, como já era esperado, e houve a manutenção da característica cristalina das amostras. Logo, é necessário seguir para a dissolução a fim de visualizar os efeitos das modificações realizadas.

#### 5.2.4. Dissolução

Após os ensaios de caracterização das amostras secas, foi verificado o teor de cada uma (Tabela 11) e então foram realizados os ensaios para obtenção dos perfis de dissolução.

Tabela 11. Teor de EFV das amostras TX8, TX9 e TX10.

<b>Amostra</b>	<b>Teor de EFV (%)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
TX8	57,46	2,21
TX9	55,67	4,01
TX10	58,30	3,52

A Tabela 12 compara o percentual de EFV dissolvido após 90 minutos de análise, sob as mesmas condições, assim como a eficiência de dissolução de cada uma das amostras, com os valores obtidos no perfil de dissolução da matéria-prima. ANOVA foi realizada para que fosse certificado que havia diferença estatística significativa entre os perfis apresentados na Figura 31.

Tabela 12. Comparação dos dados obtidos a partir da dissolução de TX8, TX9 e TX10, com os da dissolução da matéria-prima.

<b>Material</b>	<b>% dissolvida 90 min (média ± desvio padrão)</b>	<b>Eficiência de dissolução em % (média ± desvio padrão)</b>
EFV	39,15 ± 0,22	33,65 ± 0,02
TX8	18,81 ± 7,29	11,70 ± 2,30
TX9	103,44 ± 3,40	91,25 ± 3,98
TX10	66,37 ± 12,73	56,47 ± 4,90

Nota: Os valores de EFV são referentes à dissolução da matéria-prima apresentada na Figura 21.

É possível observar que a amostra TX8 possui a menor dissolução de todas, inclusive quando comparada com o EFV, como fica exposto pela Tabela 12. Enquanto a eficiência de dissolução do IFA é de aproximadamente 33,65% a amostra TX8 tem o valor de sua eficiência de dissolução reduzido a aproximadamente 11,70%.

Este resultado já era esperado, uma vez que durante a precipitação foi igualado o volume de solvente com o volume de antissolvente. Como mencionado anteriormente, esta modificação reduziria a saturação do sistema consideravelmente, favorecendo o crescimento dos cristais.

Além disso, foi observado na microscopia de varredura a ausência do filme, presente em outras amostras como TX7 e TX9. No ponto em que as amostras que apresentam formação de filme também possuem maior incremento na dissolução, é possível que ausência dessa morfologia possa afetar na dissolução do EFV nas formulações.

O resultado de dissolução de TX8, quando em comparação com o IFA e todas as outras amostras produzidas anteriormente, apenas vem a confirmar o que a literatura já afirma acerca da redução na razão solvente/antissolvente.

Seguindo na ordem de preparo das amostras, TX9 e TX10 levaram em consideração a viscosidade do sistema, sendo assim a massa de IFA utilizada diminuiu, e por sua vez, esperava-se que o grau de saturação também. Para que pudesse ser observado o efeito da temperatura, durante o experimento de precipitação de TX10 o antissolvente foi mantido a 7 °C.

Observando a Tabela 12, TX9 obteve uma eficiência de dissolução de 91,25%, já TX10 obteve um incremento de eficiência menor (em comparação com o IFA), de 56,47% (Figura 31).

A princípio era esperado que entre estas amostras, TX10 obtivesse maior dissolução do que TX9, devido à maior saturação provocada pela redução da temperatura do antissolvente (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013). Contudo o que foi observado é que no caso do EFV, utilizando a formulação de estabilizantes nas concentrações já estabelecidas, a manutenção da temperatura ambiente assomada à redução da massa de EFV utilizada foi mais favorável ao aumento da dissolução.

Isso pode ser decorrente de TX10 possuir estrutura cristalina diferente de TX9, esta mudança pode alterar diversas propriedades físico-químicas da amostra e por isso cabe um estudo mais específico dessas características.

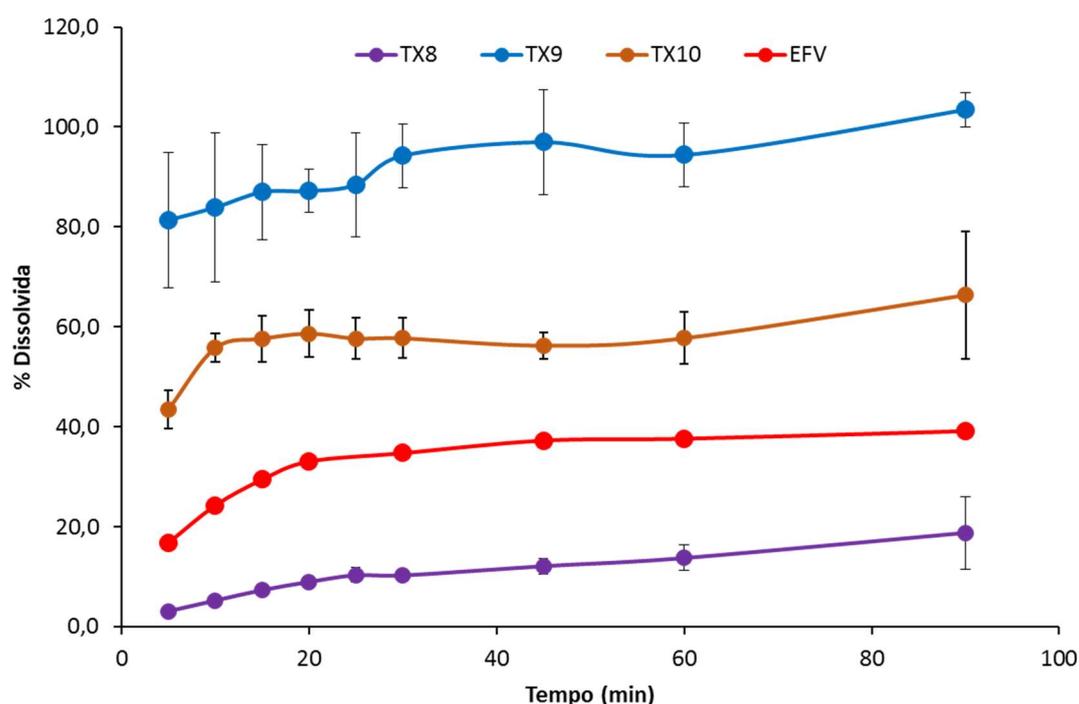


Figura 31. Comparação dos perfis de dissolução de TX8, TX9 e TX10 como o do EFV.

A amostra TX9 apresenta grande incremento na dissolução, ainda quando comparada com TX7 (Figura 31), sendo considerada uma formulação promissora para os experimentos seguintes.

Sendo assim, baseado nos ensaios de dissolução e na caracterização do pó, pode-se concluir que as condições utilizadas no preparo de TX9 foram mais adequadas para a formação dos nanocristais. Isso se reflete nos perfis de dissolução de cada uma das amostras e assim a formulação TX9 seguiu adiante no processo como a mais promissora.

### 5.3. Testes de condições diversas

Baseando-se nas condições de cristalização de TX9, foram analisadas as possíveis influências de diferentes parâmetros. Mais uma vez houve a troca do polímero estabilizante, uso de moagem após a precipitação, mudança no

solvente. Por fim todas as seguintes amostras foram liofilizadas e levadas para caracterização. Após foi feita uma comparação entre os perfis de dissolução.

### 5.3.1. Troca de estabilizante estérico

O derivado de celulose em concentração de 40% (relativa à massa de EFV) comprovou originar amostras com boa dissolução, a exemplo de TX7 e TX 9. Uma vez que em outros trabalhos com EFV foi utilizada a PVP (ALVES et al., 2014; JAIN et al., 2013; PATEL et al., 2014) seria então lógico testar a eficiência da PVP sob as mesmas condições de precipitação.

Foi realizado experimento utilizando os mesmos parâmetros de TX9, contudo o polímero utilizado foi a PVP em concentração de 40%, a suspensão obtida recebeu o código de TX12.

O aspecto desta suspensão foi leitoso e pouco viscoso; contudo, com o passar das horas foi perceptível o surgimento de grumos espessos. Logo após o ensaio de precipitação foi feita análise do tamanho de partícula e potencial zeta de TX12, mas para que ocorresse a dispersão em água foi necessário auxílio de 5 minutos em banho de ultrassom. A Figura 32 e a Tabela 13 mostram os resultados da análise de tamanho de partícula e potencial zeta.

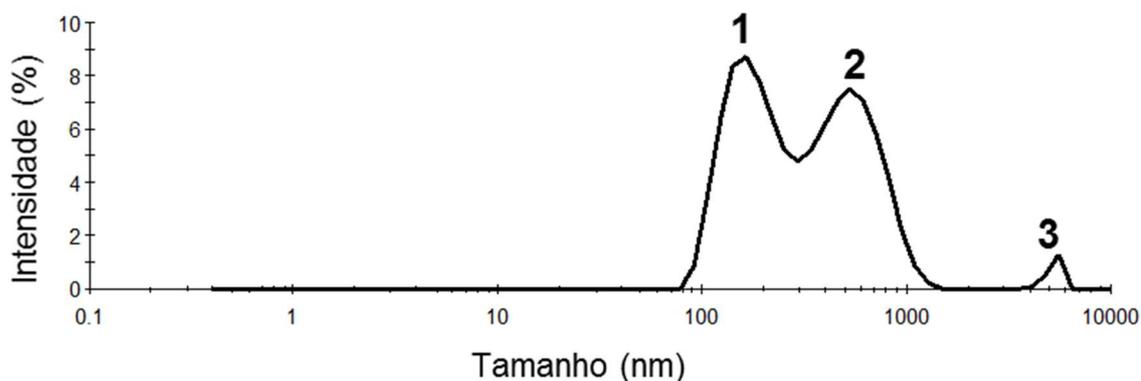


Figura 32. Distribuição de tamanho de partícula de TX12

Tabela 13. Relação dos picos de diâmetro médio e potencial zeta de TX12.

Amostra	Diâmetro Médio (nm)			PDI	Potencial zeta (mV)
	Pico 1	Pico 2	Pico 3		
TX12	182,2	550,2	5306	0,408	-57,6

A distribuição de tamanho da Figura 32 apresenta duas populações de partículas com diâmetros de 182 nm e 550,2 nm de maior intensidade. Mesmo sendo uma suspensão de distribuição bimodal, ambos seus picos indicam populações nanométricas o que possivelmente é o motivo do PDI ainda encontrar-se dentro de uma faixa considerada adequada. O  $\zeta$  encontrado foi de -57,6 mV, também indicando uma suspensão com boa estabilidade física.

### 5.3.2. Uso de moagem após cristalização

Em seu estudo Jain e colaboradores (2013) preparam nanopartículas de EFV utilizando precipitação por antissolvente seguida de HPH. A combinação de técnicas *bottom-up* seguidas de procedimentos do tipo *top-down*, para impedir da agregação e crescimento das nanopartículas já foi reportada em literatura (SALAZAR et al., 2012; YANG et al., 2016). Sendo assim, havendo a disponibilidade do uso de moinho coloidal, foi preparada amostra TX13, utilizando as mesmas concentrações e modo de precipitação da formulação TX9. Porém à TX13 foi adicionada uma etapa de moagem, em moinho coloidal, seguida à precipitação.

O estresse mecânico gerado dentro do moinho, pela colisão das partículas, impede o seu crescimento. De modo geral partículas que são submetidas a este tipo de força tendem a ter uma deformação elástica, mantendo o tamanho sem deformar permanentemente (CARSTENSEN, 2001).

A suspensão obtida apresentava aspecto semelhante ao de TX9; após a 1 hora de moagem apresentou menor viscosidade e maior quantidade de espuma incorporada. Foi possível perceber que antes da passagem pelo moinho a espuma e a suspensão formavam duas fases distintas. Após a moagem toda a suspensão incorporou o aspecto espumoso formando apenas uma fase visível.

Uma vez que ambas as suspensões foram dispersíveis em água, foi possível realizar análise DLS para verificar a estabilidade da suspensão antes e depois do processo de moagem. A Figura 33 e a Tabela 14 mostram comparações entre as distribuições obtidas e os valores estatísticos das análises de TX13, respectivamente, nos dois momentos mencionados.

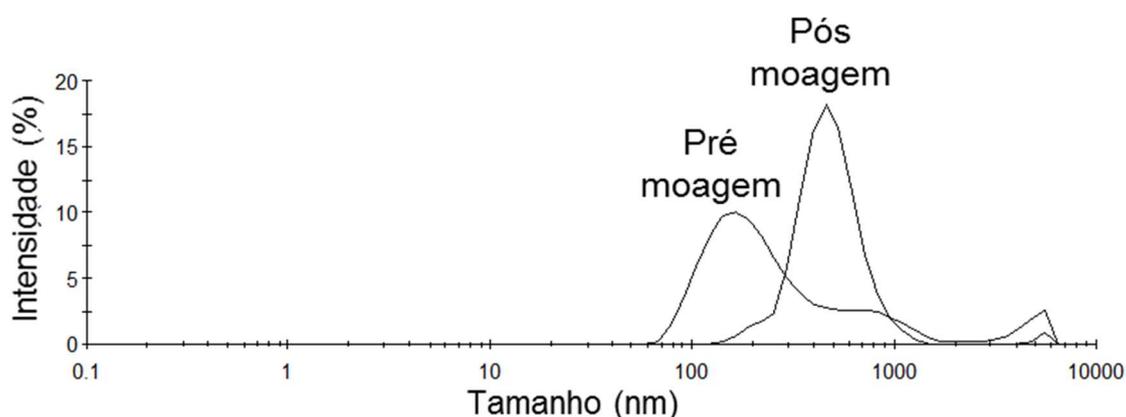


Figura 33. Comparação das distribuições de tamanho de partícula de TX13 pré-moagem e pós-moagem.

Tabela 14. Relação dos picos de diâmetro médio, PDI e potencial zeta de TX13 antes e depois da moagem.

TX13	Diâmetro Médio (nm)			PDI	Potencial zeta (mV)
	Pico 1	Pico 2	Pico 3		
Pré-moagem	210,5	840,4	4737	0,431	-28,7 mV
Pós-moagem	491,9	5429	-	0,389	-29,2 mV

Ambas as distribuições apresentam picos relativos a populações de partículas de tamanhos distintos. TX13 pré-moagem tem seu pico de maior intensidade em 210,5 nm, que é menor do que o pico mais intenso de TX13 pós-moagem, de 491,9 nm. Isso demonstra que o uso de moinho coloidal pode ser uma forma de controlar, ainda que parcialmente, o crescimento pois mesmo sendo perceptível que houve algum aumento no tamanho estas partículas ainda se encontram dentro de uma escala nanométrica.

Porém após a moagem é observada uma redução na quantidade de populações de partícula, além da queda na polidispersão (Tabela 14). O valor de  $\zeta$  para cada um dos momentos de análise da suspensão foi próximo e considerado adequado em ambos os casos.

Estes resultados indicam que o uso de uma etapa de moagem após a precipitação pode ter efeito positivo na manutenção de tamanho de partícula assim como promover maior uniformidade à suspensão.

### 5.3.3. Mudança de solvente

Como mencionado anteriormente no item 5.1.1, solubilidade do EFV foi observada em quatro solventes orgânicos diferentes, foram eles: etanol, metanol, acetona e acetonitrila. Inicialmente, o solvente escolhido para fazer parte da FO nos primeiros experimentos de caracterização foi o metanol.

Neste primeiro momento houve a necessidade de designar apenas um solvente para que fosse possível variar e avaliar outros parâmetros referentes à cristalização. Todavia, em um estágio mais avançado do estudo torna-se necessário observar as suspensões e pós resultantes do uso de outros solventes. Para testar essas modificações foi escolhida como base a formulação de TX9, uma vez que seu perfil de dissolução é apontado como o mais promissor.

Contudo, ainda há a necessidade de observar o efeito da troca de solvente no processo de cristalização e também na dissolução do pó liofilizado. Devido ao seu elevado perfil de dissolução, a amostra TX9 foi considerada como base de formulação para as suspensões seguintes.

Em vista dessa necessidade foram realizados ensaios de precipitação utilizando os outros solventes testados resultando nas seguintes suspensões: TX14 (etanol), TX15 (acetona) e TX16 (acetonitrila). Os solventes escolhidos foram os mesmos testados nos primeiros experimentos, pelos mesmos motivos discutidos no item 5.1.1 de Escolha do Solvente.

Com relação ao aspecto, as suspensões preparadas eram pouco viscosas, com pequenas partículas visíveis. Decorridas duas horas após o preparo não foi observada gelificação em nenhuma das amostras, contudo todas as suspensões apresentaram uma separação entre fases sendo uma um líquido levemente turvo e a outra, uma densa espuma.

A Figura 34 e a Tabela 15 mostram os resultados obtidos a partir do ensaio de tamanho de partícula e potencial zeta das suspensões TX15 e TX16. Dentre as suspensões preparadas apenas TX14 não dispersou adequadamente em água, o que impediu sua análise.

As duas amostras exibiram distribuições multimodais, com populações de partículas de diferentes tamanhos. Ambas tiveram como picos de maior intensidade aqueles representando partículas de diâmetros próximos a 1  $\mu\text{m}$ . TX15 e TX16 também apresentaram uma quantidade relevante de partículas acima de 4  $\mu\text{m}$ . Estes efeitos refletem-se no PDI de cada uma das amostras, ambos acima de 0,50, indicando uma alta polidispersão das suspensões.

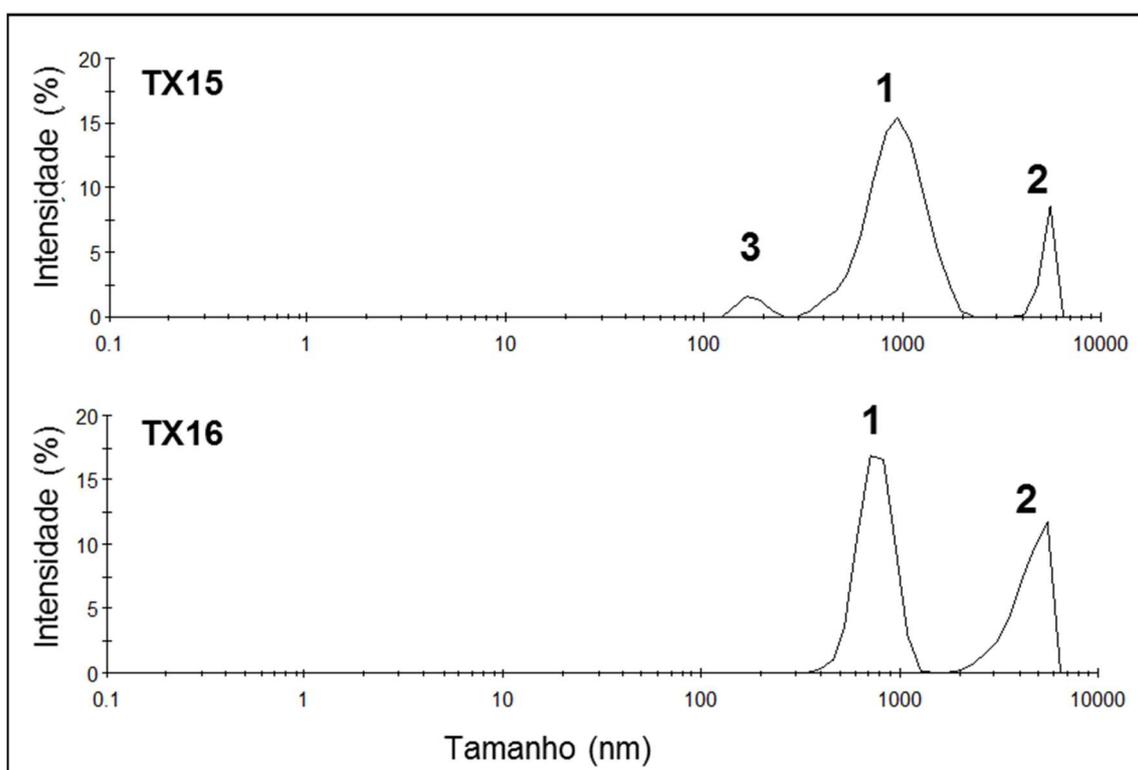


Figura 34. Distribuição de tamanho de partícula de TX15 e TX16.

Tabela 15. Relação dos picos de diâmetro médio, PDI e potencial zeta de TX15 e TX16.

Amostra	Diâmetro Médio (nm)			PDI	Potencial zeta (mV)
	Pico 1	Pico 2	Pico 3		
TX15	960,6	5378	174,2	0,652	-29,5 mV
TX16	768,7	4526	-	0,639	-3,74 mV

Com relação ao potencial zeta as amostras TX15 e TX16 demonstraram comportamentos distintos. A suspensão TX15 mostrou valor de  $\zeta$  considerado adequado para manter sua estabilidade e impedir maior crescimento. Contudo suas partículas já se encontram acima da faixa de interesse.

Em relação à amostra TX16, esta teve como resultado  $\zeta$  de -3,74 mV. Tendo sido reportado que em um sistema que possua tanto estabilização eletrostática quanto estérica é desejado um  $\zeta$  com valor absoluto mínimo de 20 mV (LIU *et al.*, 2012). Portanto o  $\zeta$  apresentado por TX16 não foi considerado adequado, ademais a suspensão continha partículas muito acima do tamanho desejado.

As amostras TX15 e TX16 não foram consideradas promissoras no que tem relação com o tamanho das partículas dispersas, na uniformidade dessas partículas e da estabilidade das suspensões ( $\zeta$ ) portanto, essas amostras não foram levadas para secagem e caracterização do pó.

#### 5.3.4. Caracterização

Após o preparo as TX12, TX13 e TX14 foram levadas à secagem por liofilização, de acordo com o método descrito anteriormente. Após a secagem foi realizada a caracterização do pó formado. Para este fim foram avaliadas as partículas por MEV, a identidade química por IV e o arranjo espacial por DRX.

##### 5.3.4.1. Morfologia das partículas

A morfologia das partículas das amostras foi avaliada por MEV. A Figura 35 apresenta as fotomicrografias obtidas a partir deste ensaio.

A amostra TX12 apresenta partículas alongadas e de espessura nanométrica. Também foi visto que TX12 possui aglomerados e partículas mais espessas, isto pôde ser observado na análise por DLS onde foi encontrada uma variedade de populações de partículas, Figura 32.

A análise da morfologia de TX12 (Figura 35) indica um crescimento das partículas após o preparo da suspensão, o que demonstra que o uso de PVP somado a uma agitação por cisalhamento não foi eficaz para a estabilização da amostra.

Com a aproximação de 1500 vezes é possível perceber que TX13 é composta por aglomerados grandes e de tamanhos variados (Figura 35), dentro de uma mesma escala. Analisando outro campo e com maiores aumentos foi visto que esses aglomerados são porções partidas de filme que é formado por partículas finas e alongadas.

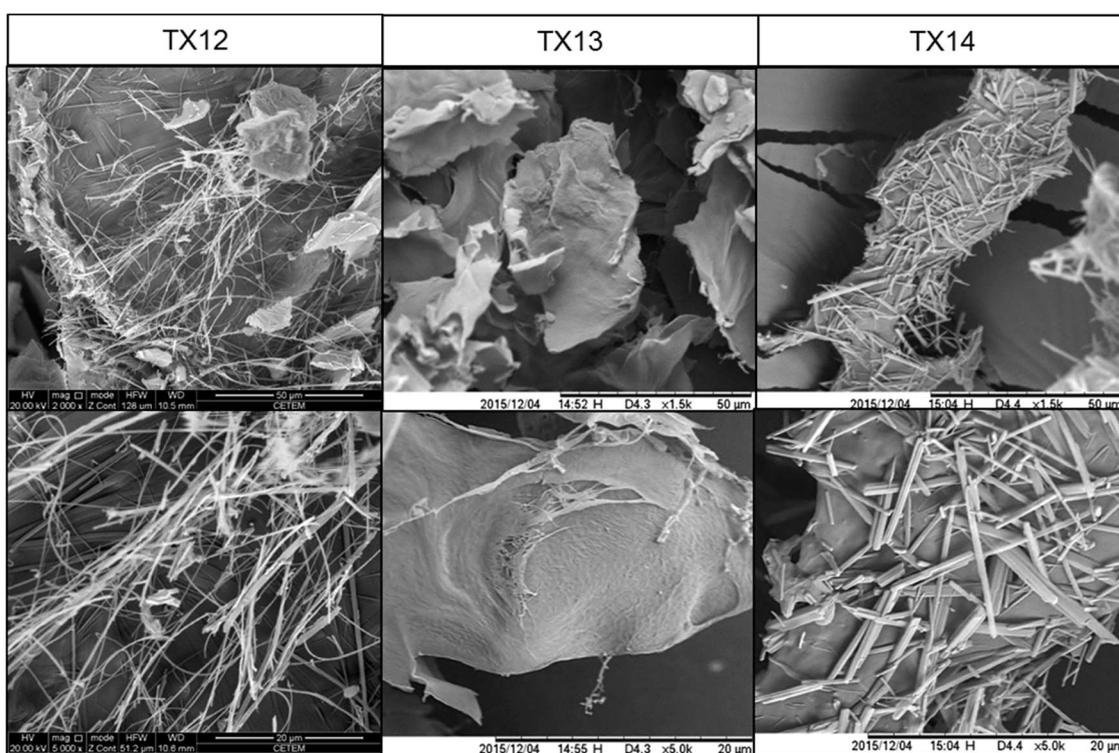


Figura 35. Fotomicrografias de TX12, TX13 e TX14.

A amostra TX14 foi baseada na formulação de TX9 porém o solvente utilizado foi o etanol. É possível observar que apenas quando se utilizou metanol, amostra TX9, como solvente foi formado o filme polimérico. Em TX14 podem ser vistas tanto partículas com morfologia de agulha quanto aglomerados grandes (Figura 35).

Aparentemente estas partículas não possuem nenhuma de suas dimensões, espessura ou comprimento, nanométricas. Mas ao analisar as partículas com um aumento de 5000 vezes é possível perceber que as partículas

em alongadas, vistas no aumento de 1500 vezes, são na verdade compostas por outras partículas mais finas, em forma de agulha.

Isso leva a crer que apesar da formação de partículas alongadas e de espessura nanométrica, a suspensão TX14 não se estabilizou adequadamente e, portanto, houve formação de agregados de partículas.

Como discutido anteriormente existem muitos fatores que podem influenciar no balanço entre nucleação e crescimento em uma cristalização. Para o preparo de nanocristais, é necessário que este equilíbrio seja deslocado de modo a favorecer a nucleação e controlar o crescimento. A polaridade do solvente escolhido também pode afetar esse balanço.

De acordo com um trabalho publicado por Beck e colaboradores (2010) para fármacos com baixa solubilidade, o uso de solvente com menor polaridade promove uma maior taxa de nucleação e por isso tende a formar partículas menores. A polaridade do solvente afeta a taxa de difusão das moléculas de fármaco dentro do solvente para a massa de pó disperso. Quanto menor a solubilidade de um fármaco, mais dificultada será sua difusão na presença de um solvente com menor polaridade, o que promove uma maior adsorção das moléculas de estabilizante sob a superfície da nanopartícula durante sua formação (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).

A Figura 36 apresenta a polaridade dos solventes utilizados em ordem decrescente. Baseado nos estudos referidos o esperado era que o EFV produzisse partículas de menor tamanho quando o solvente utilizado para a cristalização fosse a acetona.

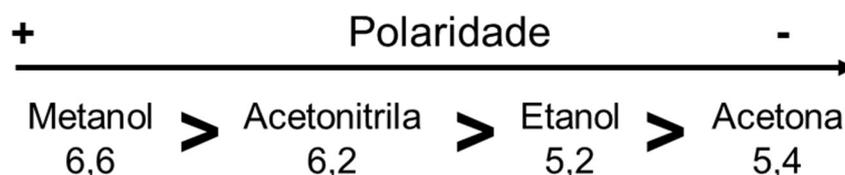


Figura 36. Ordem decrescente de solubilidade dos solventes (SCHIRMER, 2000).

Seguindo a literatura seria de se esperar que a cristalização do EFV produzisse partículas menores em solventes de menor polaridades, porém isto

não foi observado em TX15 e TX16. As análises de DLS dessas amostras apresentaram partículas em escala micrométrica majoritariamente.

Como discutido anteriormente, uma vez que a solubilidade do EFV é muito maior em etanol e acetona ocorre uma redução do grau de saturação do IFA no sistema, o que pode ter levado na redução da taxa de nucleação e então um crescimento de partícula. Além disso também foi constatado que a suspensão formada em TX14 não era estável, esse resultado foi verificado quando foram observadas grandes quantidades de agregados de partículas na análise por MEV.

#### 5.3.4.2. Espectroscopia de infravermelho

Para a identificação do fármaco nas amostras foi utilizada espectroscopia de infravermelho. Os espectros de absorção obtidos para TX12, TX13 e TX14 estão representados na Figura 37.

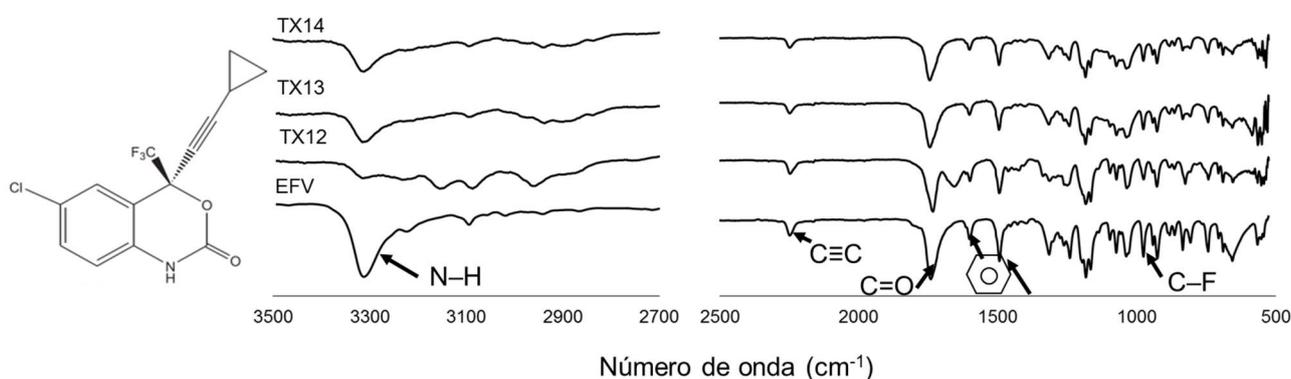


Figura 37. Comparação dos espectros de absorção das amostras TX12, TX13 e TX14 com o da matéria-prima.

A amostra TX12 utiliza como polímero a PVP. Observando o seu espectro de absorção (Figura 37) foi verificada banda em  $1652\text{ cm}^{-1}$  referente às vibrações do anel pirrólico do polímero (Tabela 16). No mais há uma fusão de bandas diferentes na faixa entre  $2860$  e  $3304\text{ cm}^{-1}$ .

Sabe-se que a presença de ligações de hidrogênio reduz a vibração de grupos amina, amida e hidroxilas gerando uma redução da intensidade das bandas referentes a estes grupamentos ou mesmo a queda no número de onda onde são identificadas (THEOPHILE, 2012).

Sendo a rigidez da ligação de hidrogênio formada entre o EFV e a PVP tamanha, é possível que tenha mascarado o sinal de forma que as bandas relativas aos grupos capazes de realizar ligações de hidrogênio tenham praticamente desaparecido e acabam confundindo-se com a banda referente ao estiramento da cadeia carbônica alifática presente na PVP (Tabela 16, espectro da PVP em anexo V).

Tabela 16. Relação de bandas de absorção no IV da PVP (modificado de LAOT; MARAND; OYAMA, 1999)

<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>
3418	Estiramento OH
2952	Estiramento CH e CH <sub>2</sub>
1652	Contribuição das vibrações de C=O e N-C
1497/ 1462/ 1420/ 1369	Deformação da ligação CH, dos grupos CH <sub>2</sub> cíclicos
1282/ 1267	Estiramento C-N (banda de amida terciária)

As amostras TX13 e TX14 possuem banda em 2936 cm<sup>-1</sup>, indicativa de ligações CH de alcanos (RICHARDSON, 2011), estas podem estar ligadas à presença do HPMC em concentração de 40%.

De modo geral, não foram observadas modificações nos espectros de IV das amostras que pudessem indicar algum tipo de reação química entre os componentes da formulação. Logo é possível deduzir que não houve qualquer tipo de incompatibilidade entre o EFV e os estabilizantes.

#### 5.3.4.3. Difração de raios X

Os padrões de DRX das amostras TX12, TX13 e TX14 são apresentados a seguir. Na amostra TX12, quando comparadas as posições dos seus picos

com as dos picos do padrão calculado, é possível confirmar a presença de EFV na forma I. Contudo as intensidades apresentadas são muito diferentes do que mostra o calculado. Uma possível explicação para esse fato seria o efeito de planos preferenciais de modo que uma vez que os picos entre 19 e 25 °2 $\theta$  passam a difratar mais, devido ao preparo da amostra durante a análise, e por isso mascaram a presença dos outros picos relativos à Forma I (BLACHÉRE; BRITAIN, 2008).

De modo geral, TX12 e TX14 apresentam-se sob forma I e com alargamento dos picos, o que corrobora com a redução do tamanho de partícula das amostras, fenômeno já observado em formulações anteriores como TX7 e TX9. Já a amostra TX13 apresenta pico de difração em 2 $\theta$  de 6 °, referente à forma I do EFV, e também halo.

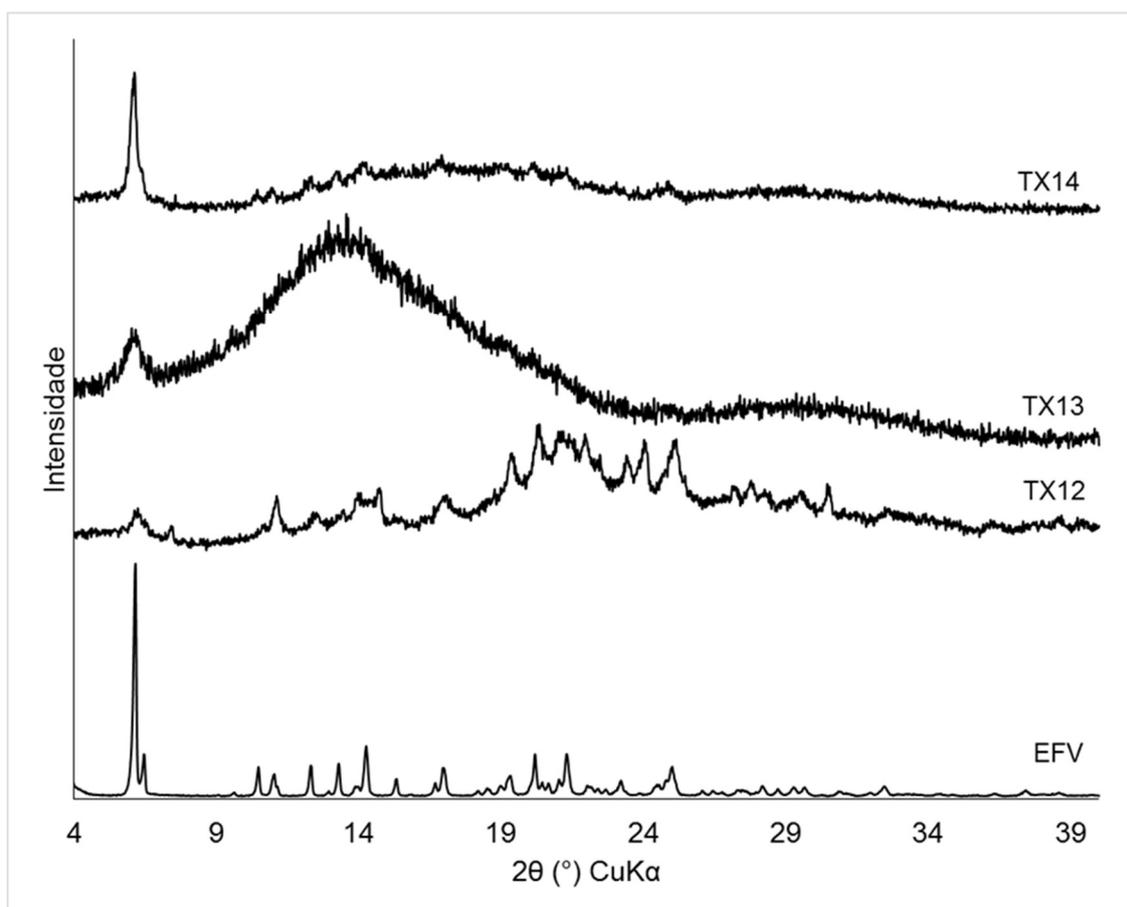


Figura 38. Comparação dos padrões de difração de TX12, TX13 e TX14, com tempo de 0,01 segundos, com o calculado para a forma I.

Para que fosse possível analisar de forma mais clara, a análise de DRX foi refeita aumentando o tempo despendido em cada passo. Desta forma é possível aumentar a intensidade dos picos de difração e melhorar a relação entre sinal e ruído (BLACHÉRE; BRITAIN, 2008). O resultado é apresentado com as intensidades normalizadas na Figura 39.

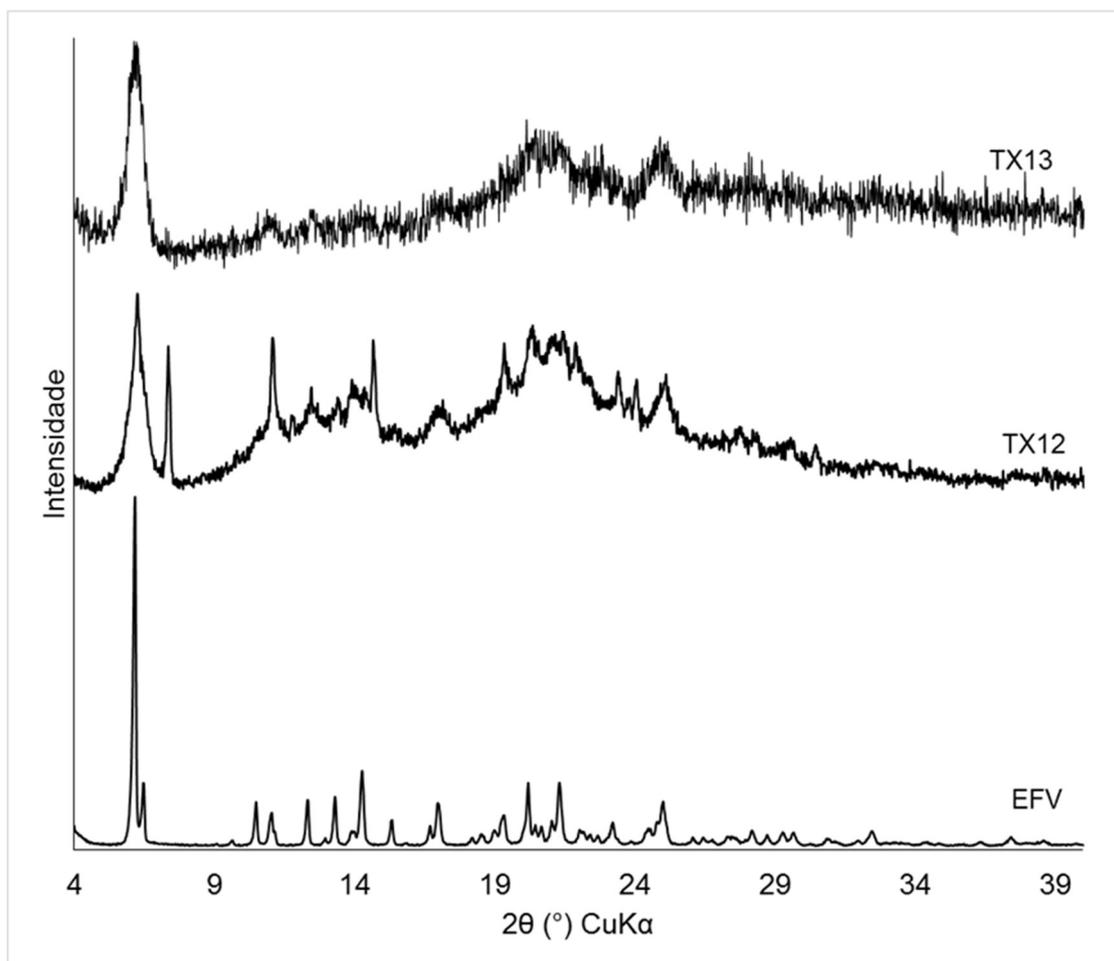


Figura 39. Resultados de DRX de TX12 e TX13 com tempo de 0,5 segundos.

Apesar da quantidade de ruído presente no espectro de difração, foi possível identificar de forma mais evidente a presença dos picos de difração da forma I. O alargamento referente à redução do tamanho de cristalito é observado mais claramente em TX13, quando comparado ao padrão calculado da forma I, indicando que a moagem pode ter sido eficaz na manutenção do tamanho dos nanocristais.

A amostra TX13 mantém sua estrutura cristalina, indicando que a presença de halo na análise anterior possivelmente ocorre devido à uma

alteração de linha base que pode ter sido causada pela grande quantidade de polímero amorfo na formulação.

Com relação a amostra TX12, o aumento da intensidade dos picos de difração permite observar pico em  $2\theta$  de  $6^\circ$ , além de outros picos relacionados à forma I do EFV. Contudo é observado o efeito de orientação preferencial, principalmente nos picos localizados em  $2\theta$  de  $11^\circ$  e  $14^\circ$  que tem suas intensidades aumentadas na análise. Este efeito ocorre devido ao preparo da amostra, porém graças ao fato de que o pó de TX12 é mais volumoso e teve pouca aderência no porta-amostra não foi possível anular este efeito durante o preparo da amostra para análise.

Mesmo assim foi possível identificar TX12 como forma I. Também é importante observar que em seu padrão de difração foi identificada novamente a presença de pico em  $2\theta$  de  $7^\circ$ , que não é relacionado a nenhuma estrutura elucidada de EFV. Mais uma vez fica evidente a necessidade de investigação mais minuciosa da fase cristalina apresentada pelas amostras.

Uma vez que a amostra TX14 foi feita com a mesma formulação de TX9, modificando apenas o solvente, é possível inferir que a troca de metanol para etanol, durante o preparo das amostras, não altera a forma cristalina do fármaco, se mantidas as mesmas condições experimentais. Isso fica claro pois o padrão de DRX de TX14 (Figura 38) possui os mesmos picos de difração referentes à forma I.

#### 5.3.5. Dissolução

Após toda a caracterização, foram realizados ensaios de dissolução. Primeiramente as amostras passaram por doseamento, sendo possível verificar o teor de EFV em cada uma. Os teores de cada uma das amostras estão relacionados na Tabela 17 enquanto a Tabela 18 compara os percentuais dissolvidos em 90 minutos e a eficiência de dissolução das amostras com o da matéria-prima, a esta tabela também foram incluídos os valores referentes a TX9 uma vez que esta amostra é a base das formulações de TX12, TX13 e TX14.

Tabela 17. Teores de EFV das amostras TX12, TX13 e TX14

<b>Amostra</b>	<b>Teor de EFV (%)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
TX12	48,94	5,3
TX13	61,17	3,23
TX14	63,46	7,51

Tabela 18. Comparação dos percentuais de EFV dissolvido e da eficiência de dissolução das amostras com a matéria prima.

<b>Material</b>	<b>% dissolvida 90 min (média ± desvio padrão)</b>	<b>Eficiência de dissolução em % (média ± desvio padrão)</b>
EFV	39,15 ± 0,22	33,65 ± 0,02
TX9	103,44 ± 3,40	91,25 ± 3,98
TX12	35,81 ± 4,62	29,23 ± 4,00
TX13	98,50 ± 3,09	98,41 ± 1,07
TX14	28,91 ± 3,65	19,79 ± 1,52

Nota: Os valores de EFV são referentes à dissolução da matéria-prima apresentada na Figura 21.

Ao comparar os perfis de dissolução de TX9 e TX12 (Figura 40), sob as mesmas condições de cristalização, mas utilizando PVP ao invés de HPMC como estabilizante estérico, TX12 não promoveu a mesma dissolução de TX9.

Quando TX12 é comparada ao EFV, percebe-se que a amostra tem uma eficiência de dissolução semelhante, porém um pouco menor que a do IFA. A análise de tamanho de partícula por DLS mostrou que TX12 era polidispersa e que apresentava duas populações de partículas de tamanho micrométrico.

Nas micrografias não foi observado filme e as partículas eram alongadas, com um comprimento extenso. É possível que após o preparo as partículas presentes na suspensão tenham continuado crescendo e por isso após a secagem não se encontravam em escala nanométrica. Este fenômeno tem reflexo na dissolução.

Na Figura 40 foram comparados os perfis de dissolução de TX9 e TX13. O percentual dissolvido de ambas as amostras é semelhante, porém o uso do moinho resulta em algumas diferenças entre os perfis. Foi garantida a presença de diferença estatística relevante através de ANOVA (Anexo VI).

A dissolução do EFV em TX13 é mais rápida quando comparada à TX9. Também foi observado que os desvios padrão de cada um dos pontos são

menores em TX13. Estes dados indicam que a amostra é mais uniforme em relação às suas partículas, o que comprova a eficácia da moagem como forma de prevenir o crescimento dos cristais.

Para avaliar o efeito da troca de solvente utilizado na cristalização sobre a dissolução foram comparados os perfis de TX9 (metanol) e TX14 (etanol), apresentados na Figura 40. A amostra TX14 possui perfil com dissolução abaixo daquela mostrada pelo IFA, o que não estaria de acordo com o que é reportado pela literatura (BECK; DALVI; DAVE, 2010a) e portanto seria passível de investigação mais minuciosa.

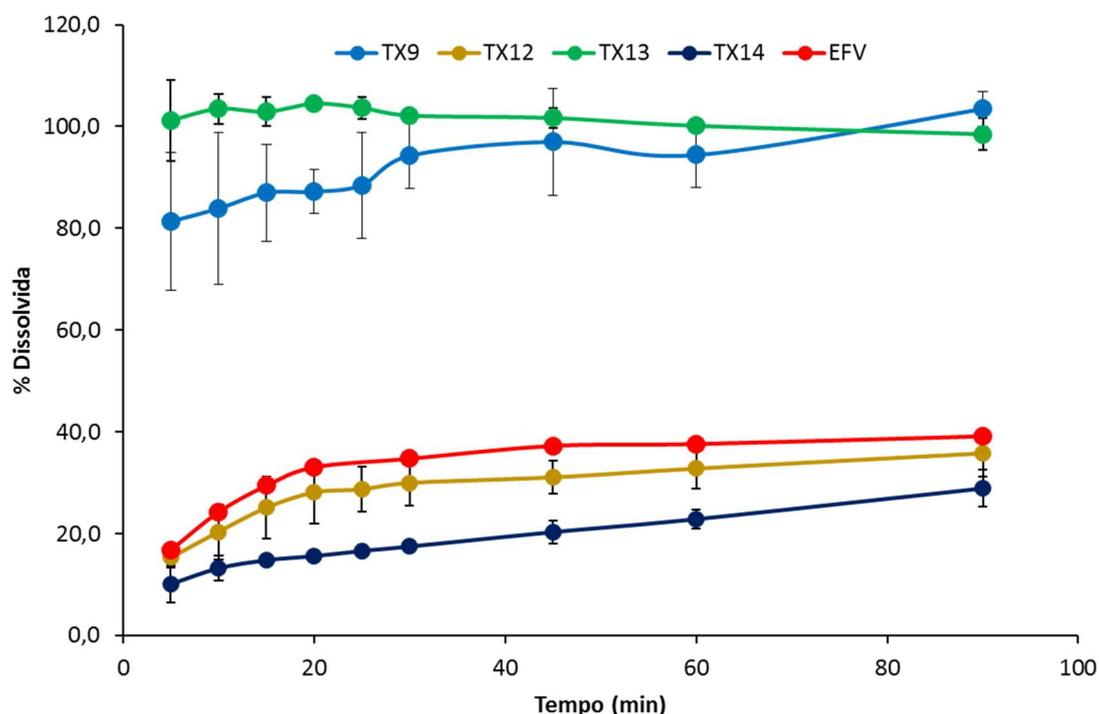


Figura 40. Comparação entre os perfis de dissolução de TX9, TX12, TX13 e TX14.

Após a análise dos perfis de dissolução das amostras foi visto que apesar da PVP ter sido utilizada como estabilizante em outros estudos, quando a utilizada sob as mesmas condições experimentais de TX9, este efeito não foi observado. Mesmo com tamanhos de partícula considerados adequados, as amostras com PVP tiveram dissolução baixa.

O uso de moinho coloidal seguido ao experimento de precipitação parece uma técnica promissora no controle do tamanho de partícula, formando uma suspensão com distribuição de tamanho monomodal e com grande incremento na dissolução e uniformidade da amostra.

Na busca de mais alternativas para o processo de cristalização foi revisitado o uso de sonificador associado à redução na massa de EFV, pois este parâmetro foi promissor durante as análises prévias.

#### 5.4. Troca do método de agitação durante a precipitação

O aspecto e a viscosidade das suspensões são importantes do ponto de vista produtivo. Em um possível aumento de escala seria necessário o transporte da suspensão através dos diversos equipamentos vinculados ao processo de fabricação; sendo assim é interessante que as amostras resultantes da precipitação sejam fluidas, podendo inclusive ser adequadas à secagem através de outras técnicas, como o leito fluidizado e *spray-drying*.

Porém, as amostras até então obtidas durante os experimentos de precipitação formavam suspensões com aspecto semelhante a pastas muito espessas que continham também uma camada de espuma densa no topo. Para a utilização da secagem por liofilização estas amostras não oferecem problemas significativos; contudo, para uma futura pretensão do uso de leito fluidizado seria necessário que elas fossem consideravelmente mais fluidas.

Uma hipótese do que poderia causar este aspecto das amostras seria o método de agitação. O método atual (ultra-turrax) utiliza alto cisalhamento. Galindo-Rosales e colaboradores (2011), em estudo que relaciona a tensão de cisalhamento com a viscosidade dos fluidos, definem que alguns materiais têm como característica o aumento da viscosidade quando a tensão de cisalhamento supera um determinado ponto crítico. Segundo o mesmo estudo, este comportamento é bastante comum nas suspensões concentradas e ocorre devido à formação de aglomerados que se unem uns aos outros formando agrupamentos que se mantêm próximos devido às forças hidrodinâmicas

Sendo assim o que poderia causar o aspecto indesejável às amostras, logo após o processo de cristalização, poderia ser o método de agitação

utilizado. Uma possibilidade de alterar esse aspecto de modo a adequar as amostras seria modificar a agitação, passando à utilização de sonicação (cavitação) ao invés de cisalhamento.

Na agitação por ultrassom são emitidas ondas sonoras, com frequências na faixa de 20 a 100 kHz. Ao se propagarem pelo líquido as ondas mecânicas do som formam bolhas de vapor, que, por sua vez, rompem-se conforme sua pressão interna excede a tensão superficial do líquido; a este fenômeno é dado o nome de cavitação e este é utilizado em diferentes processos físico-químicos (CHEN; SHARMA; MUDHOO, 2011).

Para a troca do método de agitação foi escolhida a sonicação. O uso de sonicação para processos de cristalização é bem difundido e têm sido reportados efeitos dessa metodologia como a redução da quantidade necessária de antissolvente utilizado, além da redução da distribuição do tamanho de partícula (BADAWI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2011; NALAJALA; MOHOLKAR, 2011; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009). Com base na formulação TX7 foi preparada uma suspensão com as mesmas proporções de estabilizantes porém utilizando agitação de sonicador durante 1 minuto e amplitude de 50%, semelhante ao processo descrito por Badawi e colaboradores (2011).

A suspensão SN1 apresentou certa viscosidade e formou um gel firme e opaco logo nos primeiros 5 minutos após o preparo, o qual não apresentou nenhuma alteração visível ao longo de 90 minutos. No entanto, mostrou-se bem mais fluida, logo após o preparo, quando comparada à TX7, que, mesmo em seus primeiros momentos, mostrou-se como uma pasta espessa. Outra vantagem da amostra produzida por sonicação é que devido à sua fluidez foi possível realizar análise de tamanho de partícula com técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e também ensaios relativos à estabilidade física de suspensão, como será discutido mais à frente.

Portanto, foi adotado o uso da sonicação para os próximos experimentos de cristalização, de modo que o passo seguinte tornou-se a observar as suspensões formadas por diferentes polímeros, podendo, desta forma, escolher um polímero específico como estabilizante estérico.

## 5.5. Triagem de polímeros

Como mencionado anteriormente, os estabilizantes têm a função de impedir o crescimento e agregação dos cristais enquanto estes permanecem em suspensão (VERMA *et al.*, 2011). A eficácia da estabilização das nanossuspensões depende das interações existentes entre o polímero e a superfície das partículas; sendo assim, para cada fármaco diferentes polímeros serão avaliados (CHOI *et al.*, 2005).

Foi então realizada uma triagem de polímeros candidatos à estabilização estérica dos nanocristais de EFV. Como formulação base foi tomada a amostra SN1 que contém 40% de HPMC e 2% de LSS, ambos relacionados à massa utilizada de EFV (os detalhes sobre o seu preparo encontram-se na Tabela 5). Os polímeros testados foram HPC, Lutrol F68 (poloxâmero), Lutrol F127 (poloxâmero) e PVP K30. Lembrando que mesmo resultados de dissolução da amostra com PVP não terem sido considerados promissores, uma vez que se modificam os parâmetros experimentais seria interessante testar novamente o polímero como estabilizante. As amostras foram denominadas SN2, SN3, SN4 e SN5, respectivamente (detalhes da formulação na Tabela 5). Os polímeros utilizados são de comum escolha na estabilização de nanocristais (VERMA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013).

As amostras produzidas foram avaliadas de acordo com o aspecto apresentado (logo após o preparo e também depois de 1 hora e 30 minutos), assim como pelo tamanho de partícula, além de medidas de estabilidade física como potencial zeta e sedimentação.

### 5.5.1. Aspecto das amostras

A Figura 41 apresenta um quadro comparativo do aspecto das amostras, compostas por diferentes polímeros, uma análise mais atenta ao aspecto das suspensões aponta diferentes comportamentos. O aspecto obtido na amostra SN2 foi bastante semelhante ao da amostra SN1, no entanto o gel formado

possuía grande quantidade de partículas sólidas visíveis. Outra peculiaridade desta amostra foi a ocorrência tanto de sedimentação quanto de floculação, enquanto na amostra SN1 ocorre apenas sedimentação.

A sedimentação que ocorre nas suspensões pode ter sido causada pelo efeito da gravidade sobre partículas que não tem superfície eletrostaticamente estabilizada (CARRIQUE; ARROYO; DELGADO, 2000) É possível que estas partículas sejam polímero em excesso que não teria sido adsorvido ao fármaco, formando aglomerados que sedimentam, ou mesmo partículas de EFV que não tiveram sua superfície estabilizada adequadamente. Já a floculação pode ter sido resultado da formação de pontes poliméricas entre as partículas (NASSER; JAMES, 2006).

Tanto SN3 quanto SN4 formaram suspensões pouco viscosas, sendo a suspensão SN3 menos turva do que SN4. Em ambos os casos ocorreu grande sedimentação de partículas logo após o preparo, formando um *cake* (precipitado não redispersível) denso na suspensão; as amostras também apresentaram alguma floculação de partículas. Após o período de 90 minutos as suspensões transformaram-se em géis firmes; no caso específico de SN4 o gel formado foi uniforme e tinha aparência levemente perolada. Já em SN3 o gel obtido apresentava aglomerados visíveis.

A suspensão SN5 foi de aspecto leitoso e alta fluidez. A sedimentação visível ocorre logo que se finda o processo de preparo e de forma rápida. Também foi observada tixotropia no comportamento de SN5. Após 90 minutos houve formação de gel com aparência menos espessa, que sob leve agitação tinha sua viscosidade diminuída, retornando ao estado de suspensão, porém com maior viscosidade do que a suspensão inicial.

Como descrito no fluxograma apresentado na Figura 9, nesta etapa da marcha experimental os ensaios de tamanho de partícula e potencial zeta foram eleitos como método de avaliação principal acerca da qualidade das formulações. Seguem os resultados e discussão relativos à comparação das análises.

	SN1 (HPMC)	SN2 (HPC)	SN3 (Lutrol F68)	SN4 (Lutrol F127)	SN5 (PVP)
<b>Após o preparo</b>					
	Suspensão viscosa. Forma gel firme e opaco nos primeiros 5 minutos	Suspensão viscosa. Gel firme e opaco nos primeiros 5 minutos. Floculação de partículas	Suspensão pouco viscosa. Sedimentação e <i>caking</i> . Pequena floculação de partículas	Suspensão pouco viscosa. Intensa sedimentação e <i>caking</i> . Foculação de partículas	Aspecto leitoso de baixa viscosidade, ocorrência de sedimentação.
<b>90 minutos após preparo</b>					
	Não apresenta nenhuma alteração visível	Ocorrência de sedimentação e de floculação	Gel com aglomerados visíveis	Gel firme e uniforme com aparência levemente perolada	Gel menos espesso. Sob leve agitação retorna ao estado de suspensão

Figura 41. Aspecto das suspensões logo após o preparo e passados 90 minutos.

### 5.5.2. Caracterização física das suspensões

Comparando os gráficos de distribuição de tamanho de partícula apresentados na Figura 42 (não foi possível obter gráfico de distribuição de SN4 pois os resultados encontravam-se muito fora dos limites de detecção do equipamento) é possível ver que em SN2 e SN3 foram detectadas diversas populações de tamanho de partícula, tanto em escala nanométrica quanto partículas de tamanho micrométrico, formando uma distribuição multimodal, dados referentes aos diâmetros médios encontrados nestas amostras estão relacionados na Tabela 19.

As amostras SN2 e SN3 não mantiveram uma distribuição uniforme de tamanho de partícula; no caso de SN3 o diâmetro médio é de 2819 nm. SN4 apresenta diâmetro médio de 6764 nm, o que excede muito o limite de detecção do equipamento que, de acordo com o manual do fabricante, é na faixa de 2 nm a 3  $\mu\text{m}$ , não sendo possível observar a distribuição das partículas. Assim sendo é possível assumir que os polímeros utilizados não promovem estabilização estérica eficiente, ao menos nas concentrações testadas.

Contudo, é possível ver que SN1 e SN5, formulações contendo HPMC e PVP, respectivamente, possuem uma distribuição de tamanho de partícula mais adequada. SN1 possui diâmetro médio de 168,9 nm e SN5 possui diâmetro ligeiramente maior de 178,8 nm; observando-se as curvas de distribuição é visível que SN5 tem base mais estreita e, portanto, pode-se considerar que suas partículas têm tamanho mais uniforme.

Ambas as distribuições (SN1 e SN5) possuem uma segunda população de diâmetro médio em escala micrométrica, o que condiz com o observado relativo ao aspecto das suspensões. Este sedimento identificado pode ser composto por cristais não estabilizados que sofreram crescimento após a cristalização, ou mesmo de excesso de partículas poliméricas, uma vez que a concentração de polímero utilizada nessas formulações foi alta.

O índice de polidispersão (PDI) é um indicador comumente associado à variação de tamanho entre as partículas encontradas em uma amostra. Para o caso de distribuições monomodais pode ser relacionado à largura do pico (SAWANT *et al.*, 2011).

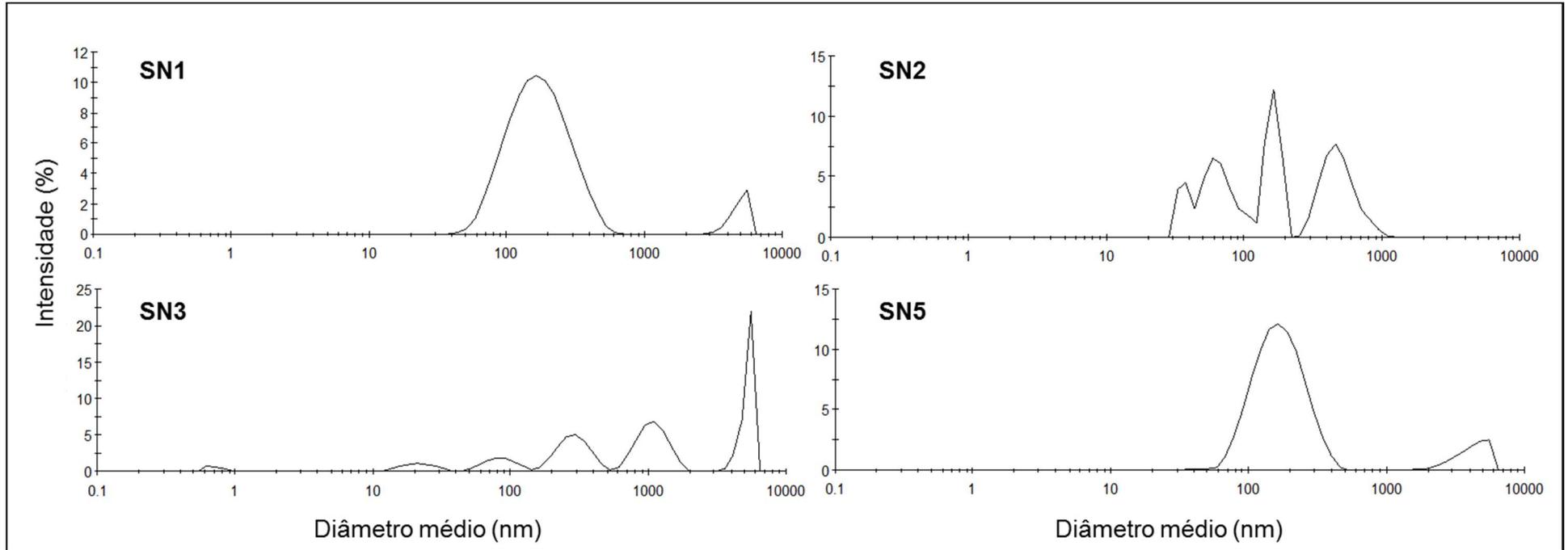


Figura 42. Comparação dos resultados obtidos nas análises de tamanho de partícula.

O PDI pode variar entre 0 (apenas partículas com um diâmetro) e 1 (grande quantidade de diferentes diâmetros encontrados), não havendo um valor pré-estabelecido para este índice, contudo é uma convenção que quanto menor seu valor mais estável é a amostra (SAWANT *et al.*, 2011). Como fica claro na Tabela 19 apenas SN1 e SN5 apresentam PDI menor que 0,5 (0,365 e 0,320, respectivamente). As outras suspensões são mais polidispersas, o que indica maior variedade nas populações de partículas encontradas e, portanto, menor estabilidade da suspensão.

Também é possível relacionar o PDI com a largura dos picos na distribuição de partículas. SN5 tem PDI menor que SN1, podendo ser observado que o pico de maior intensidade da amostra SN5 é mais estreito que o pico mais relevante apresentado pela suspensão SN1.

Na superfície das partículas em suspensão é formada uma dupla camada de contra-íons divididos entre camada compacta, composta por íons adjacentes à superfície carregada da partícula, e camada difusa, formada por íons atraídos eletrostaticamente aos contra-íons da camada compacta. O potencial eletrostático da zona de interseção entre a camada compacta e a camada difusa é chamado de potencial zeta ( $\zeta$ ) (SZE *et al.*, 2003).

Do potencial zeta é considerado apenas seu valor absoluto, sendo uma das formas de avaliação da estabilidade de suspensões, de modo que para suspensões contendo apenas estabilizantes de cargas é tido como ideal um  $\zeta$  de magnitude maior que  $\pm 30$  mV. Já no caso de suspensões que combinam estabilização estérica e eletrostática, um  $\zeta$  de  $\pm 20$  mV já é considerado adequado (LIU *et al.*, 2012).

De acordo com os valores de  $\zeta$  observados na Tabela 19, é possível ver que a única suspensão que possui valor absoluto considerado adequado é SN5. Não foi possível obter valores confiáveis de  $\zeta$  das amostras SN2 e SN4 (que foram identificadas como “Não Detectado”) enquanto SN1 e SN3 tiveram análises confiáveis, porém os resultados de  $\zeta$  estão abaixo da magnitude considerada adequada.

Tabela 19. Dados correspondentes às análises de tamanho de partícula e potencial zeta

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro médio (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
SN1	168,9	0,365	-16,7
SN2	457,5	0,532	Não detectado
SN3	2819	0,898	-17
SN4	6764	0,919	Não detectado
SN5	178,8	0,320	-29,5

Por fim, compilando os resultados de tamanho de partícula e  $\zeta$  das suspensões conclui-se que a formulação mais promissora seria SN5, ou seja, o PVP K30 mostrou-se superior aos outros polímeros na estabilização do sistema e na obtenção de um tamanho de partícula interessante para continuidade dos ensaios.

### 5.5.3. Alteração da concentração de PVP

As distribuições de tamanho de SN1 e SN5 apresentaram uma segunda população de partículas micrométricas. Uma das hipóteses formuladas é que este fenômeno ocorra devido à alta concentração de polímero nas suspensões. Conforme ocorre a cristalização, sugere-se que as cadeias poliméricas adsorvem-se na superfície dos nanocristais, até o momento em que toda a estabilização necessária seja concluída e, assim, ainda há partículas poliméricas em suspensão. Sem ter onde adsorver, estas partículas sedimentam e formam aglomerados de tamanho micrométrico, que são então observados durante a análise de tamanho de partícula.

Uma vez que a amostra com PVP apresentou distribuição de tamanho mais uniforme, dentro da extensão de interesse, e o valor de potencial zeta obtido indicou eficiência na estabilização eletrostática da suspensão foram feitas novas amostras variando a concentração do polímero. Tendo em vista a hipótese de que a população de partículas micrométricas observada pode ser composta

de polímero, a redução da concentração de PVP pode diminuir o seu aparecimento.

Na Figura 43 são comparadas as distribuições de tamanho de partícula das suspensões preparadas com a de SN5. SN6, SN7 e SN8 possuem, respectivamente, 30, 20 e 10% de PVP (em relação à massa de EFV utilizada), como evidenciado da Tabela 5.

Em geral todas as suspensões apresentaram PDI menor que 0,5 (considerado adequado) exceto SN8, cujo PDI foi de 0,693. Conforme a concentração de PVP foi reduzida, até 20%, percebe-se que o PDI também se reduz, indicando que as suspensões possuem menor variação no tamanho de partícula. Isto fica evidente ao observar a largura dos principais picos nos gráficos de distribuição.

O gráfico aponta que ao reduzir-se a concentração de PVP até 20% utilizada no preparo das suspensões, diminui o aparecimento da segunda população de partículas maiores. Na formulação SN7 a intensidade relativa a partículas maiores aproxima-se de zero, mantendo o diâmetro médio das partículas inferior a 200 nm. Os dados obtidos apontam para a confirmação da hipótese formulada anteriormente, contudo não foram realizados ensaios que confirmassem de forma definitiva as inferências sugeridas.

Comparando os resultados de tamanho e  $\zeta$  de SN5, SN6, SN7 e SN8 foi observado que a redução da concentração de polímero na formulação leva a um aumento do potencial zeta.

Sendo  $\zeta$  o potencial entre as camadas de contra-íons que envolvem as partículas em suspensão não é de se esperar que a modificação da concentração de polímero neutro na formulação (neste caso PVP), altere seu valor. Porém o que se percebe é que com 30% e 20% de estabilizante o  $\zeta$  aumenta em valor absoluto, quando comparado à concentração de 40%.

Uma possível explicação seria que a redução de polímero possa expor mais as cargas do LSS (utilizado a 2% em todas as formulações SN), permitindo uma melhor atuação do estabilizante eletrostático. Todavia não foram realizados ensaios de estudo da relação de cada estabilizante com o potencial zeta, uma vez que este objetivo não se encontrava no escopo do trabalho.

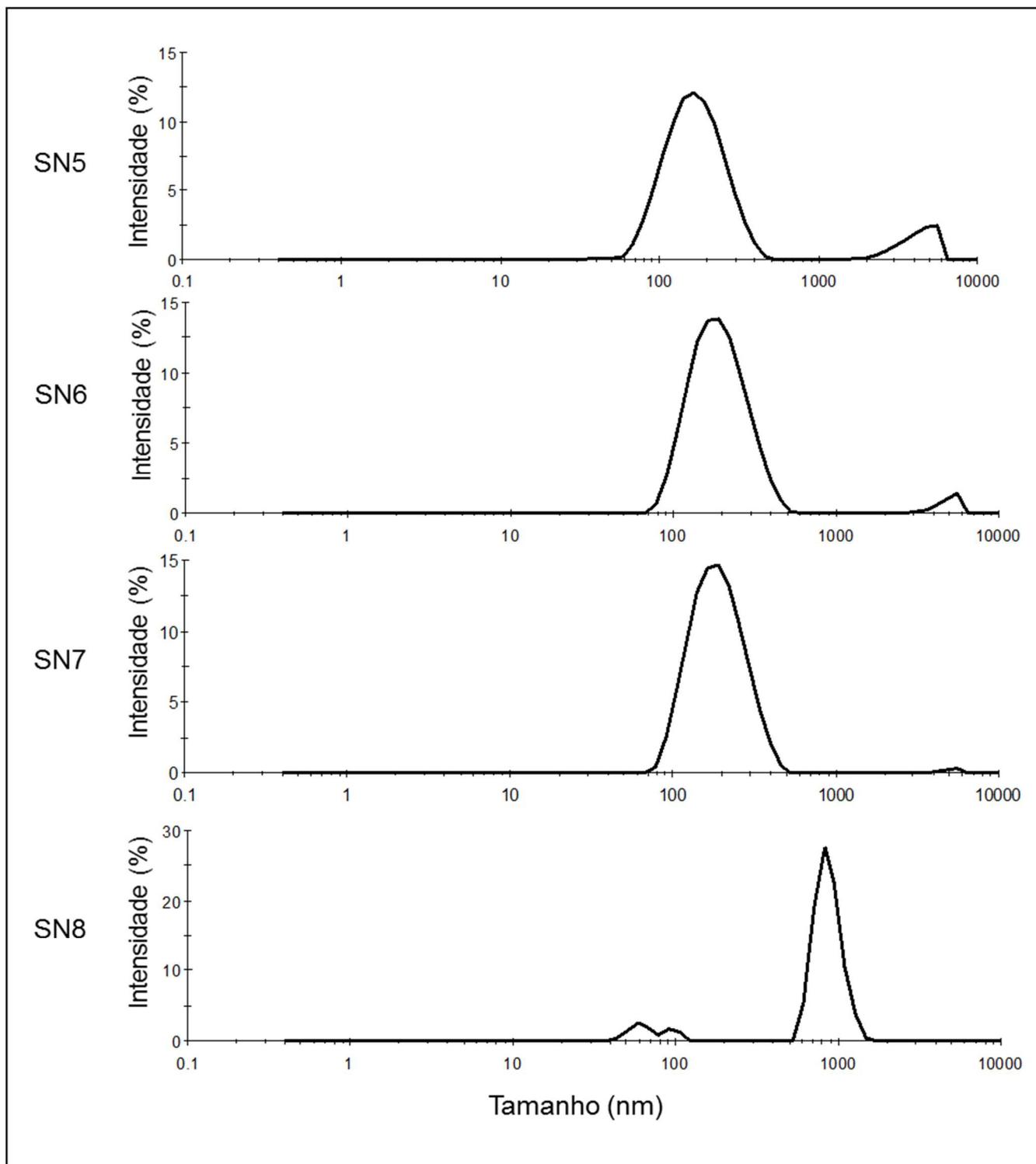


Figura 43. Comparação entre as distribuições de tamanho de partícula de SN5, SN6, SN7 e SN8.

Tabela 20. Comparação de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das amostras SN5, SN6, SN7 e SN8.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro médio (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
SN5	178,8	0,320	- 30,1
SN6	187,0	0,216	- 50,1
SN7	177,8	0,152	-47,0
SN8	1490	0,693	ND

De modo geral, observando os gráficos e analisando a Tabela 20, é possível assumir que o uso de PVP e sonicação permite reduzir a concentração de estabilizante estérico sem perder sua eficácia, mantendo assim o tamanho de partícula dentro da faixa de interesse.

#### 5.6. Redução de massa de EFV somada à sonicação

Como já discutido, a agitação e a viscosidade do meio mostraram ter influência sobre a formação dos nanocristais de EFV pela técnica de precipitação. Tendo a sonicação se apresentado como um método de agitação promissor, assomada ao uso de PVP e HPMC, que tende a promover suspensões menos viscosas, com tamanho de partícula e  $\zeta$  adequado, além de não provocar formação de espuma. Em paralelo também foi observado que a redução da massa utilizada de EFV tende a melhorar a dissolução final do pó.

Portanto chegou o momento de testar o efeito da junção dos dois fatores, verificando se seria possível utilizar uma metodologia de escalonamento mais simples e ainda manter a alta dissolução. Nesta etapa as suspensões foram secas e depois o pó resultante foi caracterizado.

Foram preparadas 6 suspensões com a mesma massa de fármaco usada em TX9 mas modificando os estabilizantes estéricos: três amostras com HPMC e três com PVP. As concentrações de polímero usadas foram 40, 20 e 10%. As formulações estão contidas na Tabela 5.

As suspensões obtidas possuíram aspecto leitoso e pouco viscoso. Não houve nenhuma sedimentação visível. Para a avaliação da estabilidade física foram verificados o potencial zeta, a distribuição do tamanho de partícula e a sedimentação das suspensões.

#### 5.6.1. Estabilidade física das suspensões

##### 5.6.1.1. Tamanho de partícula e potencial zeta

Após o preparo foram avaliados o tamanho de partícula e o potencial zeta de cada uma das suspensões. A princípio todas as suspensões preparadas com menor massa de EFV apresentou características físicas de estabilidade adequadas, em todas as concentrações de estabilizante testadas e com ambos os polímeros.

Na Tabela 21 é possível observar que para ambos os polímeros há uma ligeira redução no diâmetro médio das partículas quando a concentração de estabilizante é reduzida a 20% em relação à massa de EFV utilizado.

Este efeito está presente não apenas no tamanho, mas também no seu PDI, o que é confirmado nos gráficos da Figura 44, onde as curvas destas amostras apresentam-se mais estreitas.

A menor concentração de polímero tem efeito mais intenso em 10%. Neste caso o PDI aumenta consideravelmente. As curvas exibem um padrão monomodal, e PDI próximo de 0,1, com exceção de SN14. A utilização de apenas 10% de PVP como estabilizante estérico resultou em uma amostra com uma curva de distribuição onde são encontradas duas populações de partículas.

A população de maior intensidade tem diâmetro médio de 387 nm enquanto a segunda população encontrada durante a análise possui um diâmetro médio de 103 nm. Mesmo com uma distribuição bimodal é possível ver que SN14 mantém suas partículas dentro de uma faixa nanométrica, sendo assim o PDI obtido nesta amostra foi considerado baixo (0,281).

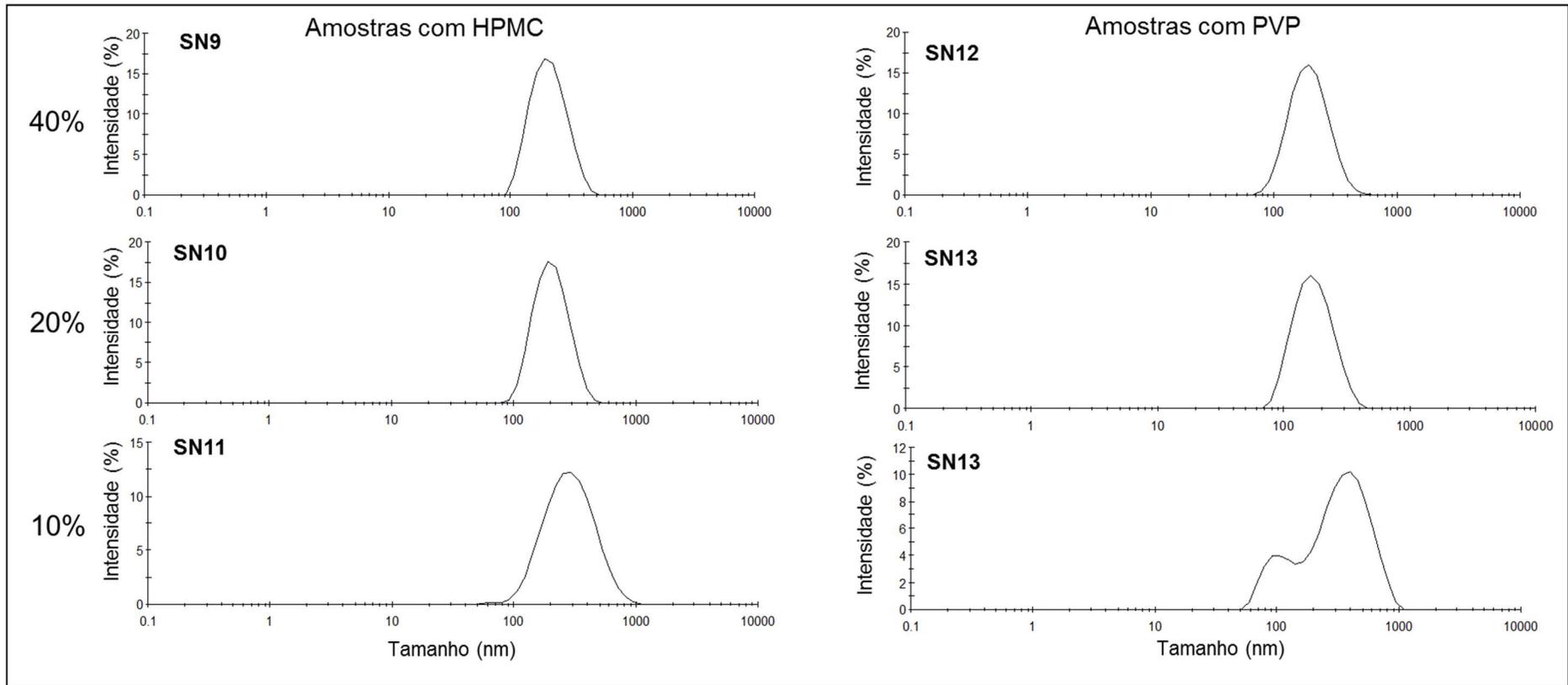


Figura 44. Curvas de distribuição de tamanho de partículas de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14.

Tabela 21. Resultados da análise de tamanho de partícula.

Amostra	Diâmetro médio (nm)		PDI	
	Pico 1	Pico 2		
HPMC	(40%) SN9	194,2	-	0,108
	(20%) SN10	192,7	-	0,097
	(10%) SN11	252,1	-	0,170
PVP	(40%) SN12	177,8	-	0,103
	(20%) SN13	161,1	-	0,114
	(10%) SN14	387,4	103,3	0,281

A Figura 45 possui os valores de  $\zeta$  obtidos para cada suspensão agrupados em pares de acordo com a sua concentração de polímero.

Primeiramente é visto que os valores absolutos de  $\zeta$  nas amostras que utilizam PVP são muito maiores que aqueles das suspensões contendo HPMC, em todas as concentrações testadas.

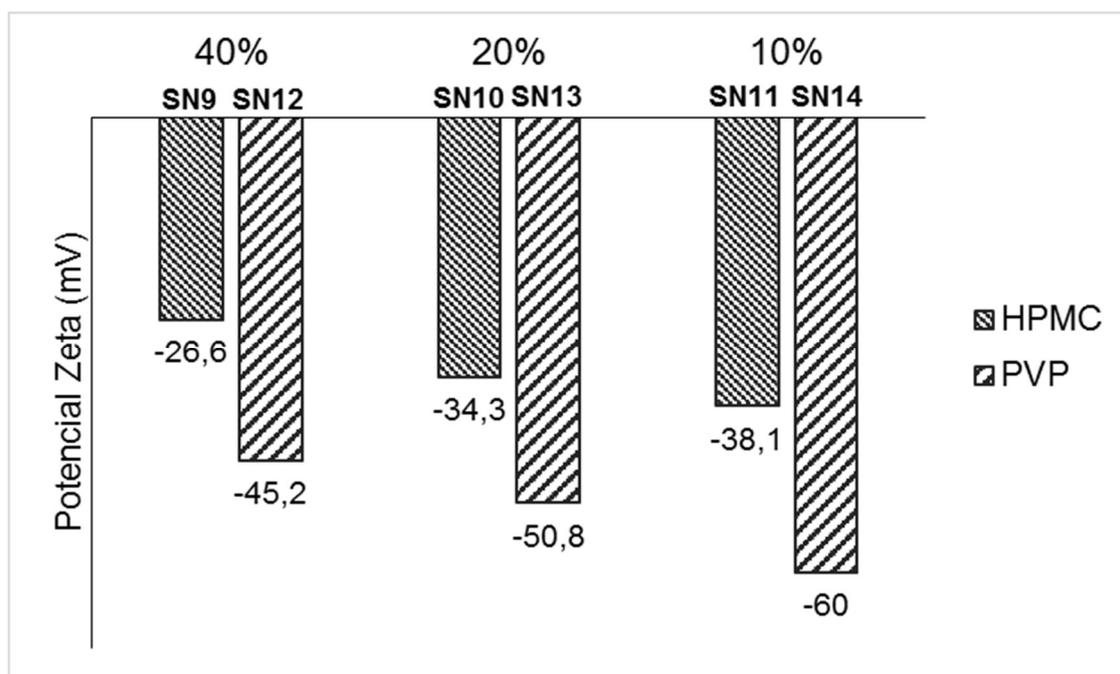


Figura 45. Comparação entre as magnitudes de potencial zeta nas amostras SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14.

Outro ponto é que conforme foi reduzida a quantidade de polímero utilizado, aumentou o valor absoluto de  $\zeta$ . O equipamento utilizado para a análise de  $\zeta$  verifica a mobilidade das nanopartículas em um meio durante a passagem de uma corrente elétrica. A partir da mobilidade eletroforética observada, é realizado o cálculo do potencial  $\zeta$  através da equação de Smoluchowski (SZE *et al.*, 2003).

O potencial zeta é relacionado com a mobilidade eletroforética das partículas, o que significa que qualquer evento que possa interferir nesta mobilidade afeta o  $\zeta$ . Sendo assim é possível que o HPMC, por se um polímero que promove uma viscosidade aparente maior, tenda a reduzir a mobilidade eletroforética das partículas dispersas no meio e por isso seja observada diferença no  $\zeta$  (SZE *et al.*, 2003).

Ainda seguindo o mesmo racional é possível deduzir que a redução na quantidade de polímero utilizado também tende a diminuir a viscosidade do meio, logo aumentar a mobilidade das partículas e, por consequência, o  $\zeta$ .

#### 5.6.1.2. Sedimentação das suspensões

Nos primeiros ensaios utilizando agitação por sonicador, foi visto que apesar de terem sido geradas suspensões com  $\zeta$  e tamanho de partícula adequados, houve uma sedimentação perceptível a olho nu. Para uma caracterização mais detalhada da estabilidade das suspensões foi realizado um teste de sedimentação de longa duração (tempo real) utilizando o Turbiscan.

Esta técnica emite uma luz em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 850 nm e que varre um tubo contendo a amostra desde o fundo até o topo. Uma vez que a suspensão é opaca reflete a luz que é captada por um detector, e é gerado um gráfico que retrata o retorno da luz ou retroespalhamento (BS%) ao longo do topo em um determinado tempo  $t$ . A primeira varredura em  $t_0$  é considerada o BS% inicial, logo tomado como linha base. Para as varreduras seguintes é verificada a variação no retroespalhamento ( $\Delta$ BS).

A presença de bolhas dentro da suspensão gera erro na análise. Assim sendo partir do momento que a técnica esteve disponível, foi visto que ela

somente poderia ser utilizada para suspensões feitas por sonicação pois, ao contrário daquelas que passaram por ultra-turrax, não ocorreu formação de espuma.

Os gráficos da Figura 46 apresentam o comportamento das suspensões durante a primeira hora após o preparo. No topo de todos os frascos de amostra o  $\Delta$ BS cai ao longo do tempo, isto indica a saída de partículas do topo do tubo, migrando para região central. Conforme há uma redução na quantidade de partículas, é reduzida a reflexão da luz e também do  $\Delta$ BS. Isto pode ser um indicativo de sedimentação.

O fenômeno de sedimentação é confirmado de SN9 a SN13 quando observado o incremento do  $\Delta$ BS na parte referente ao fundo do tubo. Conforme as partículas se depositam, ocorre maior reflexão da luz e o  $\Delta$ BS aumenta (MENGUAL, 1999).

Enquanto as partículas possuem tamanho menor que o comprimento de onda emitido pelo equipamento (850 nm) o aumento de tamanho é acompanhado por acréscimo no  $\Delta$ BS (MENGUAL *et al.*, 1999), como é o caso de SN9, SN10 e SN12. Uma vez que as partículas são maiores que este comprimento de onda o crescimento passa a ser representado por uma redução no  $\Delta$ BS (MENGUAL, 1999), como pode ser visto em SN11 e SN14, até 35 minutos. Esses efeitos não ocorrem em SN13.

De modo geral, a análise dos gráficos de  $\Delta$ BS na Figura 46 mostra que apenas a formulação SN13 não apresentou crescimento das partículas em suspensão e que em todas as amostras ocorre sedimentação das partículas. No caso de SN14 após decorridos 35 minutos o  $\Delta$ BS apresenta um comportamento errático, o que indica completa desestabilização da suspensão.

Outra informação relatada pelo ensaio de sedimentação, utilizando o Turbiscan, é o índice de estabilidade Turbiscan (TSI), um índice obtido que leva em conta todos os fenômenos que podem estar ocorrendo em um tempo  $t$  na amostra. De forma geral quanto maior o TSI, menor a estabilidade da amostra (KANG *et al.*, 2011).

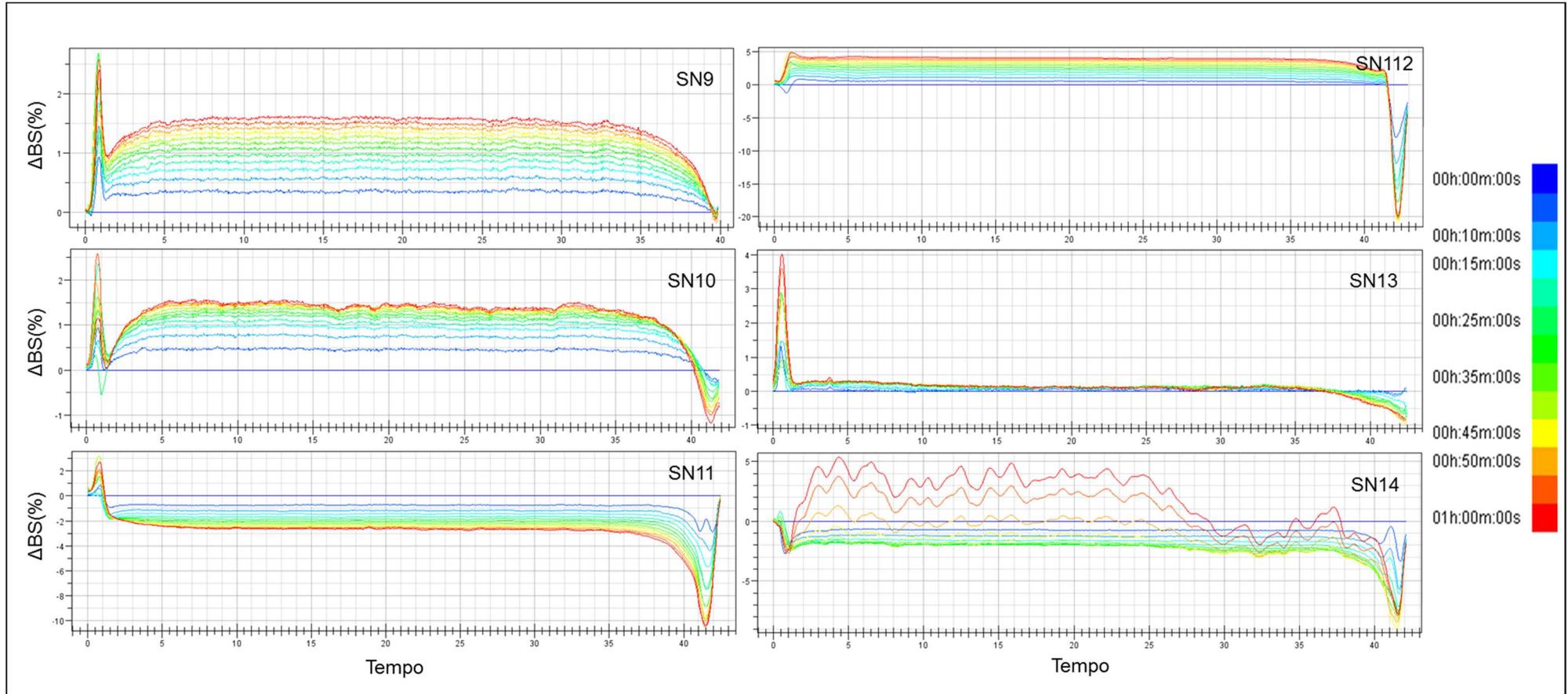


Figura 46. Comparação entre os dados brutos de retrospalhamento das amostras SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14. O eixo das abcissas é composto pela altura do tubo de amostra (mm) e o eixo das ordenadas é composto pelo  $\Delta BS$  (%).

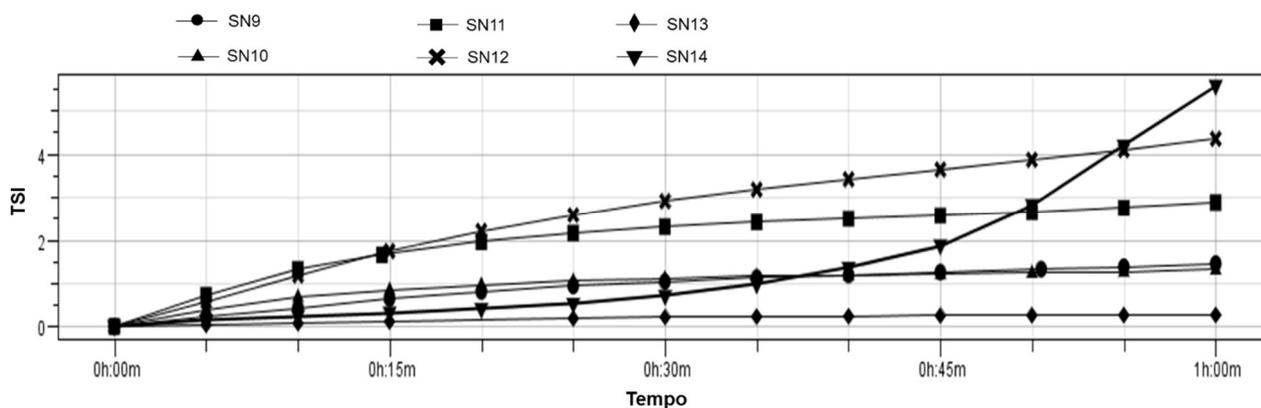


Figura 47. Comparação dos TSI globais de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14 ao longo de uma hora de análise.

A desestabilização de SN14 é confirmada a partir de 30 minutos. Todas as amostras com exceção de SN13 têm o TSI aumentado, o que indica uma maior ocorrência de fenômenos como sedimentação e crescimento de partículas.

Uma vez observadas a análise de tamanho, juntamente com a análise de sedimentação, foi visto que utilizando o método de preparo com sonicação e menor massa de EFV, o estabilizante mais adequado é a PVP em uma concentração de 20% relativa à massa de fármaco.

Após a avaliação das nanosuspensões, estas foram levadas a secagem por liofilização. Assim, foi então realizada a caracterização do pó obtido e também foram feitos ensaios de dissolução. Os resultados serão expostos e discutidos mais à frente.

## 5.6.2. Caracterização do estado sólido

### 5.6.2.1. Morfologia das partículas

Para a análise da morfologia das amostras preparadas por sonicação foi utilizado MEV. A Figura 48 apresenta as fotomicrografias obtidas neste ensaio.

Todas as amostras apresentaram partículas alongadas assim como as amostras anteriores.

Comparando as SN9, SN10 e SN11, preparadas com HPMC em diferentes concentrações, é possível perceber que conforme se reduz a massa de polímero no preparo também se torna menos expressiva a formação de filme. SN9 que possui mais concentração de HPMC também é a amostra com filme mais evidente.

Observando SN12, SN13 e SN14, que utilizaram diferentes concentrações de PVP em sua formulação, foi obtido o mesmo resultado. Isto demonstra que a formação de filme está diretamente ligada a quantidade de polímero utilizado durante a preparação das amostras.

A observação de filme pode ser significativa uma vez que amostras que tiveram esta mesma morfologia também obtiveram bons resultados de dissolução.

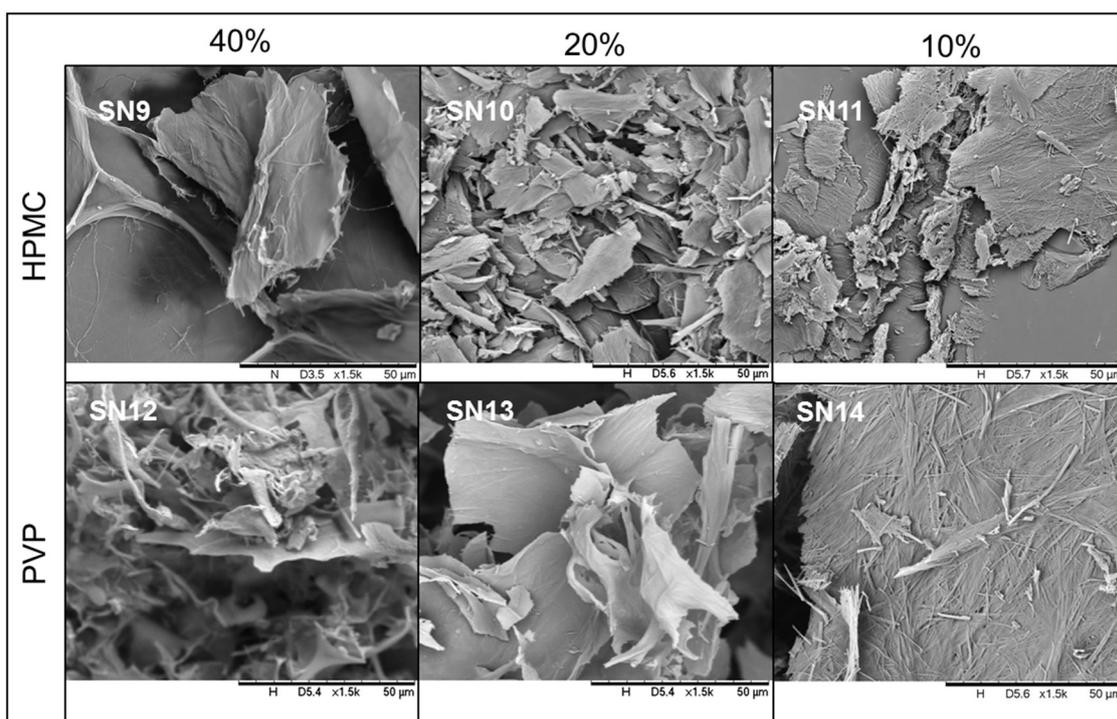


Figura 48. Fotomicrografias de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14.

Comparando resultados adquiridos de polímeros diferentes (HPMC e PVP) percebe-se que em uma concentração de 40% o HPMC produz um filme mais uniforme enquanto aquele visto na PVP é mais fraturado. O contrário ocorre

a uma concentração de 20%, onde a película mais uniforme foi observada na amostra contendo PVP enquanto a amostra SN13 (HPMC) possui partículas inseridas em filme mais fragmentado.

Para ambas as amostras SN10 e SN14, com 10% de HPMC e PVP respectivamente foi possível uma melhor observação das partículas. Estas não se encontravam inseridas em filme polimérico, mas por sua vez estavam aglomeradas. Seguiu-se então para a identificação química destas amostras.

#### 5.6.2.2. Espectroscopia de infravermelho

Assim como observado nas amostras anteriores, a banda de 3300  $\text{cm}^{-1}$  presente na matéria-prima indicativa da vibração do grupo NH perde intensidade conforme ocorre o aumento da quantidade de estabilizante estérico. Este efeito é mais proeminente em SN9 e SN12, ambas com 40% de polímero, este fenômeno está possivelmente relacionado às ligações de hidrogênio entre o estabilizante e o fármaco.

Nas amostras com PVP também podem ser vistas as bandas relativas ao polímero (Tabela 16). Elas também se apresentam mais intensas conforme aumenta a contração de PVP utilizada.

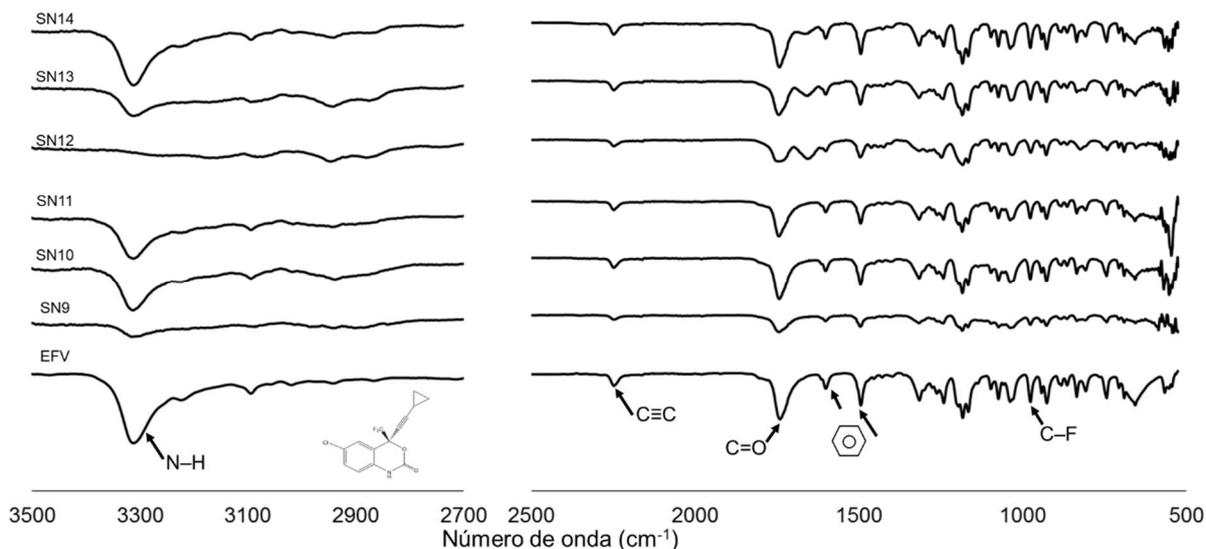


Figura 49. Espectros de absorção no IV de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14.

Os resultados obtidos no IV das amostras foram bastante semelhantes aqueles discutidos para amostras anteriores. A análise destes espectros não indica a ocorrência de qualquer reação química entre os componentes da formulação e sendo assim não há qualquer motivo para suspeita de incompatibilidade entre o fármaco e os excipientes utilizados.

#### 5.6.2.3. Difração de raios X

Para a verificação da estrutura cristalina das amostras foram obtidos os padrões de DRX, apresentados na Figura 50. Analisando os resultados é perceptível que conforme é reduzida a concentração de polímero de 40% para 10%, tanto com o uso de PVP quanto no uso de HPMC, há formação de halo referente à quantidade de material amorfo presente nas amostras. Para que fosse possível observar melhor os picos de difração uma nova análise foi realizada.

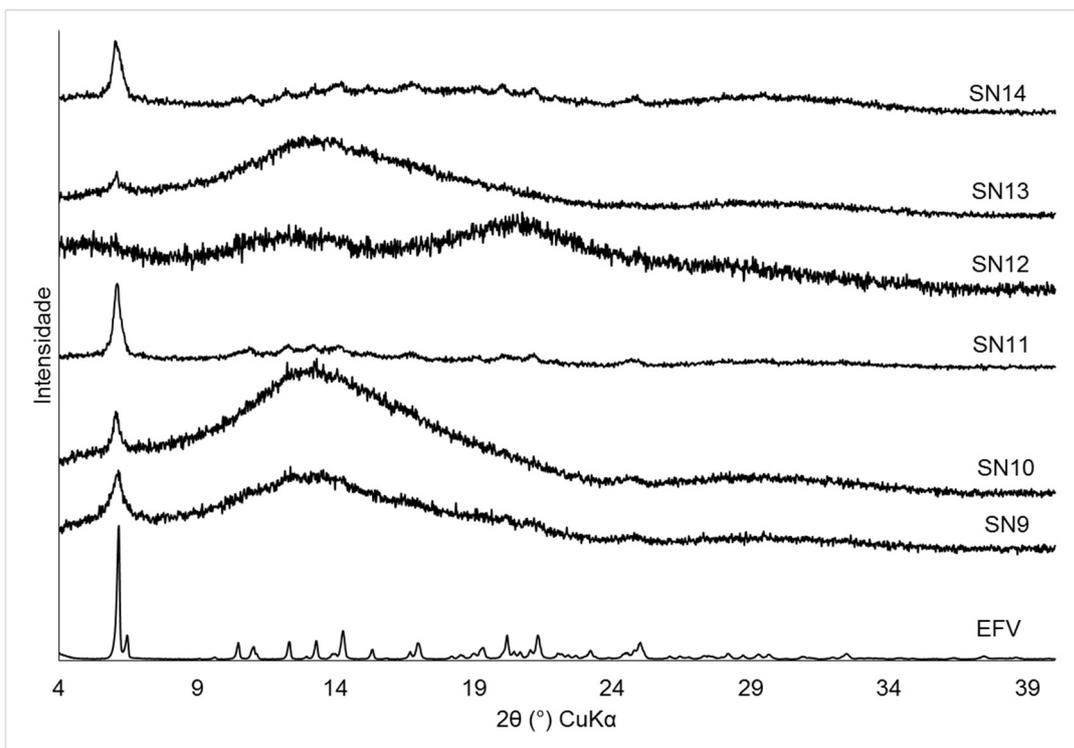


Figura 50. Padrões de difração de SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14.

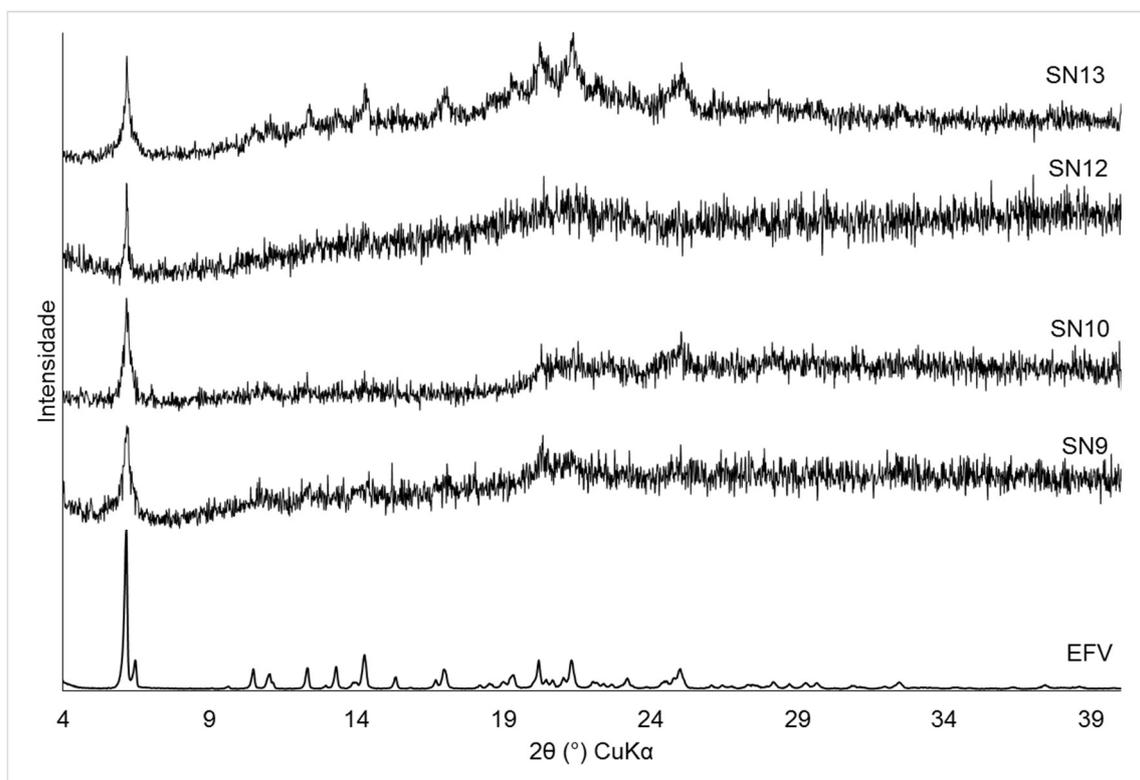


Figura 51. Padrões de difração de SN9, SN10, SN12 e SN13 com tempo 0,5 segundos.

As amostras SN9, SN10, SN12 e SN13 foram analisadas novamente, porém tomando uma maior quantidade de tempo em cada ângulo analisado, de modo que fosse possível aumentar a intensidade dos picos de difração (BLACHÉRE; BRITAIN, 2008).

A reanálise de SN9, SN10 e SN13 deixou mais claro o resultado obtido no primeiro ensaio, onde pode ser observado pico em  $2\theta$  de  $6^\circ$ , relativo à forma I do EFV (MAHAPATRA *et al.*, 2010b). Entretanto, no caso de SN12, cujo primeiro experimento de DRX apontava para material amorfo, pode ser visto que há a presença de picos de difração e que o fármaco foi cristalizado no polimorfo I.

É possível que o baixo teor de EFV no pó (Tabela 22) somado à grande concentração de excipiente amorfo dificulte a visualização dos picos de difração do fármaco em sua fase cristalina.

### 5.6.3. Dissolução

Uma vez realizada a caracterização as amostras preparadas por sonicação foram levadas para ensaio de dissolução, nas mesmas condições utilizadas nas amostras anteriores. Primeiramente foi quantificado o teor de EFV presente em cada amostra (Tabela 22). A Tabela 23 compara a porcentagem de EFV dissolvida após 90 minutos de análise e a eficiência de dissolução de cada amostra com a do IFA.

Tabela 22. Teores de EFV das amostras SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14.

<b>Amostra</b>	<b>Teor de EFV (%)</b>	<b>Desvio padrão</b>
SN9	63,54	4,44
SN10	77,61	5,01
SN11	80,19	8,64
SN12	57,86	5,21
SN13	69,11	7,13
SN14	84,68	8,34

Tabela 23. Comparação dos percentuais de EFV dissolvidos e da eficiência de dissolução das amostras SN9, SN10, SN11, SN12, SN13 e SN14 com a matéria prima.

Material	% dissolvida 90 min (Média ± desvio padrão)	Eficiência de dissolução em % (Média ± desvio padrão)
EFV	39,15 ± 0,22	33,65 ± 0,02
SN9	77,59 ± 5,05	61,23 ± 6,29
SN10	75,26 ± 4,50	71,05 ± 3,92
SN11	77,53 ± 3,25	78,28 ± 2,14
SN12	58,06 ± 0,73	49,44 ± 0,90
SN13	56,38 ± 4,41	51,99 ± 1,68
SN14	63,76 ± 6,55	64,58 ± 6,43

Nota: Os valores de EFV são referentes à dissolução da matéria-prima apresentada na Figura 21.

A Figura 52 mostra os perfis de dissolução das amostras SN9, SN10 e SN11 (40, 20 e 10% de HPMC, respectivamente) comparando-os com o do IFA. Através de ANOVA foi possível observar que todos os perfis são diferentes entre si (Anexo VI). Todas as formulações obtiveram incremento na sua dissolução.

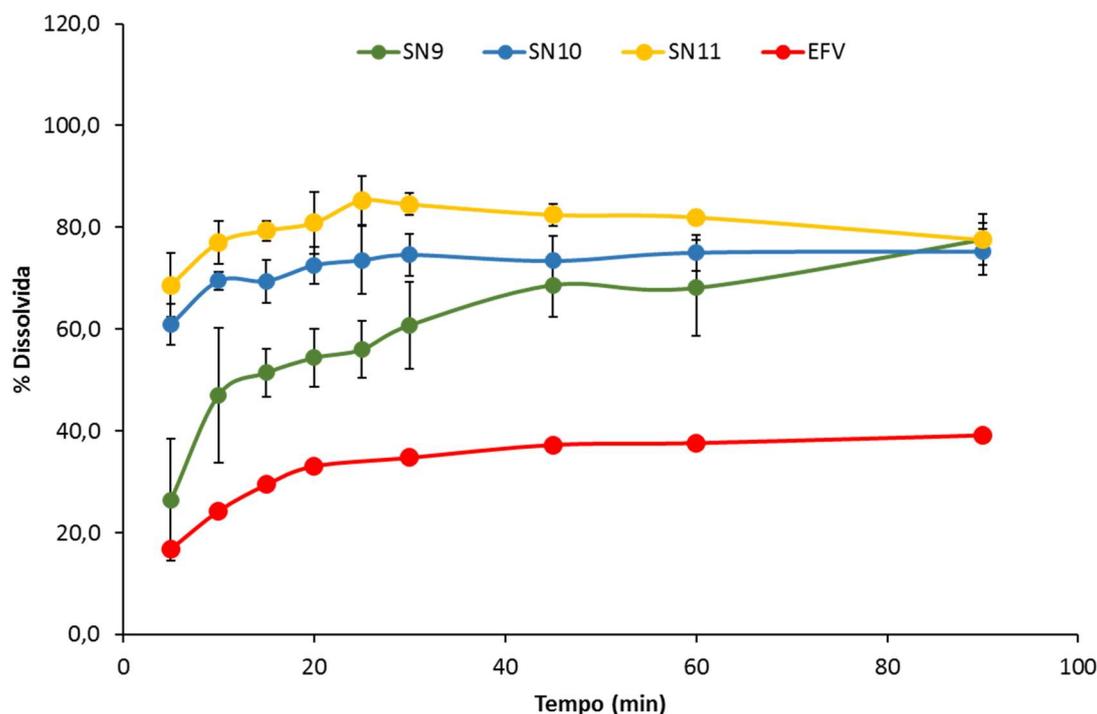


Figura 52. Comparação dos perfis de dissolução de SN9, SN10 e SN11 com o do EFV.

Ao final de 90 minutos de análise as amostras preparadas por sonicação apresentaram percentuais de EFV dissolvido semelhante, em torno de 75%. Porém ao analisar os perfis durante toda o tempo de experimento percebe-se que SN11 percentuais mais altos de fármaco dissolvido em um tempo menor. Portanto a eficiência de dissolução de SN9 é consideravelmente menor

Uma diferença encontrada nos perfis de dissolução é que, ao contrário do que foi visto para as amostras do ultra-turrax, a redução da concentração de HPMC aumentou a dissolução da amostra.

Uma hipótese para este resultado inesperado baseia-se na viscosidade do sistema. O uso do ultra-turrax resultou em suspensões de aspecto pastoso e espumoso, com a troca do método de agitação foram atingidas suspensões visivelmente menos viscosas, como discutido anteriormente no item 5.5.1.

É possível que a redução da viscosidade do sistema facilite a dispersão dos cristais de EFV através do antissolvente, o que melhora a eficiência dos estabilizantes, pois facilita sua adesão nos nanocristais (MATTEUCCI *et al.*, 2006). A maior eficiência da agitação também resultou em uma amostra mais uniforme, isso se reflete nos desvios padrão vistos em SN11.

A Figura 53 compara os perfis de dissolução se SN12, SN13 e SN14 com o da matéria-prima, utilizando ANOVA foi verificada a diferença estatística entre todos os perfis (Anexo VI). Foi observado que, assim como no caso das amostras com HPMC, ao final da dissolução todas as três formulações tiveram quantidades de EFV dissolvido semelhantes (Tabela 23).

Novamente foi possível perceber que ao utilizar sonicação como forma de agitação a menor concentração de polímero obteve maior incremento no perfil. Esta conclusão se baseia no fato de que SN12 tem uma dissolução mais veloz, chegando a maiores percentuais de fármaco dissolvido mais rápido do que SN12 e SN13 (Figura 53). Fato que pode ser confirmado pelo cálculo da eficiência de dissolução, enquanto SN12 atinge apenas 49,44% SN14 atinge a 64,58%.

Mais uma vez os resultados de dissolução podem indicar que a redução da viscosidade do sistema permita uma melhor difusão do EFV entre as moléculas de estabilizantes, dissolvidas na FA, e conseqüentemente, a sua adsorção sobre os cristais de EFV é facilitada. Logo, menores concentrações de estabilizantes são necessárias para obter aumento na dissolução.

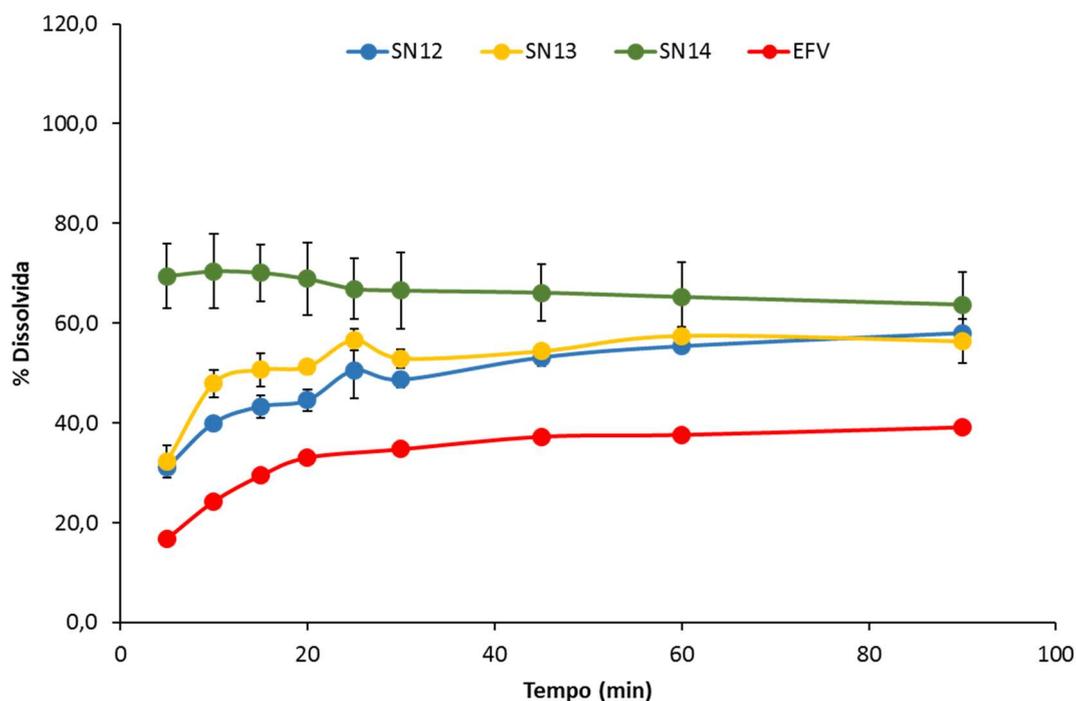


Figura 53. Comparação dos perfis de dissolução de SN12, SN13 e SN14 com o EFV.

Comparando a dissolução das amostras com diferentes polímeros, foi visto que, apesar do uso de PVP resultar em amostras mais uniformes, o que se confirma pelos menores valores de desvio padrão nos perfis apresentados, sua dissolução é menor do que as das amostras com HPMC.

Esta diferença pode ser explicada pela adsorção dos polímeros à superfície dos cristais. A presença das cadeias poliméricas ocupando sítios de crescimento, forma uma barreira mecânica para a adição de novas moléculas de fármaco à estrutura do cristal (ILEVBARE et al., 2012).

Em seu estudo com ritonavir llevbare e colaboradores (2012) demonstraram que a hidrofobicidade do polímero escolhido como estabilizante tende a influenciar na adesão dessas cadeias ao fármaco reduzindo a taxa de crescimento dos cristais. Polímeros mais hidrofílicos tendem a interagir melhor com o solvente e por isso não se adsorvem tão bem à superfície do fármaco quanto os mais hidrofóbicos. É importante lembrar que há necessidade de que o polímero seja solúvel no sistema aquoso, logo algum grau de hidrofília é necessário.

Ao comparar capacidade de inibição de crescimento do HPMC e da PVP, não há qualquer diferença; todavia, o primeiro é mais hidrofóbico (ILEVBARE et al., 2013) e, portanto, tende a adsorver-se mais intensamente aos cristais de EFV. Isso é uma possível explicação para o efeito da maior dissolução das amostras contendo HPMC.

### 5.7. Considerações finais

De modo geral foram realizados ensaios de cristalização testando diferentes condições experimentais, baseado no que foi observado na literatura. Uma vez que o objetivo geral deste trabalho é o incremento da dissolução do EFV, é necessário reavaliar os perfis de dissolução para que seja possível elencar quais as formulações que podem ser promissoras para futuros estudos. A Figura 54 apresenta uma comparação dos perfis de dissolução das amostras TX7, TX9, TX13 e SN11 com a matéria-prima.

Como resultado das primeiras tentativas de cristalização, TX7 mostrou-se promissora pois não somente tinha uma dissolução maior que a do fármaco e das outras formulações preparadas, como também foi a amostra que teve maior uniformidade após a secagem.

Foi então observado que o aumento da concentração de polímero na formulação era acompanhado por um aumento na dissolução das amostras. Sendo assim, a formulação de TX7 foi utilizada como base para realização de outros experimentos de cristalização.

A amostra TX9 reduz a concentração de fármaco na FO de modo que isto gera um sistema menos viscoso e permite uma melhor dispersão dos cristais pelo antissolvente, facilitando a transferência de massa da solução para fase sólida dispersa. Por sua vez, TX13 visou observar se o uso de técnica de moagem posterior à cristalização conseguiria prevenir o crescimento dos cristais.

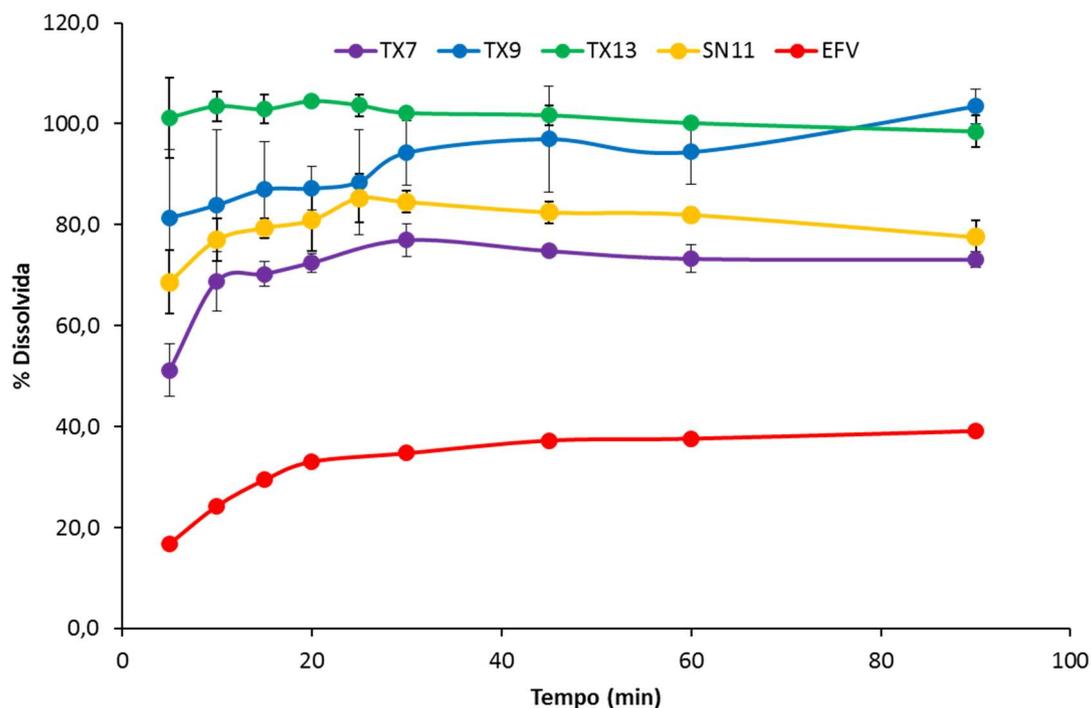


Figura 54. Comparação dos perfis de dissolução das amostras TX7, TX9, TX13 e SN11 com a matéria-prima.

Foi visto que não houve qualquer modificação na estrutura cristalina do fármaco ou mesmo reação entre o EFV e os excipientes. As análises das suspensões indicam uma maior quantidade de partícula nanométricas quando utilizada a técnica de cavitação, ao passo que o aspecto das suspensões com ultra-turrax por vezes impediu a análise do espalhamento de luz nas amostras TX.

Ao contrário do que seria esperado, as amostras preparadas por ultra-turrax tiveram maior dissolução do que aquelas que fizeram uso de agitação por sonificador. Uma hipótese que pode explicar este fenômeno é a diferença na viscosidade das suspensões.

Enquanto as suspensões que passaram por ultra-turrax são muito mais viscosas, as que utilizam sonicação são bem mais fluidas. Esta diferença é grande o suficiente para ser percebida a olho nu. Em um sistema supersaturado voltado para a nanocristalização, a transferência de massa entre as fases orgânica e aquosa pode ser prejudicada por uma alta viscosidade (TUNG et al., 2008).

Contudo, também se sabe que em uma suspensão os cristais encontram-se em constante movimento Browniano, mais intenso para o caso de suspensões menos viscosas, o que aumenta a probabilidade de colisão entre as partículas seguida de crescimento (COMBA; SETHI, 2009). Logo, uma forma de aumentar a estabilidade de suspensões muito concentradas, ou mesmo tornar mais eficaz a estabilização já existente, seria aumentar a viscosidade (PELTONEN; HIRVONEN, 2010).

Assim seria possível compreender que as amostras TX9 e TX13 possuem maior dissolução em relação a SN11. Contudo, é importante ressaltar que a viscosidade é uma característica a ser otimizada e não maximizada. É necessário que ela não exceda um determinado nível (a ser avaliado caso a caso) para que não haja prejuízo na cristalização, como já foi observado em outras amostras.

Um exemplo disso é o fato de que SN11 tem dissolução maior do que TX7, mesmo possuindo uma menor concentração de estabilizante estérico. A menor viscosidade do sistema favorece a nucleação e manutenção dos cristais na escala nanométrica.

Comparando TX9 e TX13 é possível concluir que o uso de moagem para manutenção do tamanho de partícula é competente e que a menor dissolução de TX9 pode ser devido ao crescimento dos cristais, ocorrido entre o preparo e a secagem.

## 6. CONCLUSÃO

Os primeiros experimentos mostraram que a técnica de nanocristalização por antissolvente, através de cisalhamento, resultou em suspensões viscosas. A caracterização do pó após a secagem revelou que não ocorre alteração na forma cristalina do EFV e o infravermelho indicou que ocorre interação por ligações de hidrogênio com o polímero estabilizante. Na microscopia foram vistas partículas alongadas de espessura nanométrica.

A dissolução dessas amostras apontou para o fato de que o aumento na concentração de estabilizantes promove incremento maior na dissolução do EFV; contudo este fenômeno está claramente ligado aos nanocristais e não ao aumento da molhabilidade, que tende a ocorrer devido à adição de polímero hidrofílico e tensoativo.

A troca do método de agitação promoveu suspensões menos viscosas e de aspecto leitoso. A triagem de polímeros apontou que, dentre os que foram testados, apenas PVP K30 e HPMC E5 são indicados para a estabilização estérica das nanossuspensões. Também foi visto que quando utilizada a sonicação é possível reduzir a quantidade de polímero sem prejudicar o efeito estabilizante.

A redução da concentração de EFV na FO, visando diminuir a viscosidade da suspensão formada resultou em grande incremento da dissolução. Essa redução da massa de fármaco somada ao uso de moinho coloidal resultou em bom controle do tamanho de partícula, de modo que a melhor dissolução encontrada foi a da amostra TX13.

Diminuir a quantidade de fármaco aliado ao uso de sonicação também se provou eficaz no aumento da dissolução. Porém, nem mesmo essa formulação obteve maior incremento no perfil do que quando a moagem foi acoplada à cristalização.

Com este estudo foi possível perceber que são necessárias mais investigações a fim de melhor compreender a cinética de cristalização do EFV, para que seja possível desenvolver uma técnica ideal para o preparo de nanocristais via precipitação.

Os dois parâmetros que mostraram ser de maior influência neste processo são a agitação, tanto o tipo como a intensidade utilizada, e a viscosidade da suspensão formada. Como dito anteriormente é necessário encontrar uma agitação eficiente para que seja possível dispersar adequadamente as partículas. Além disso é importante que a suspensão tenha uma viscosidade alta o bastante para reduzir o movimento browniano das partículas, mas não o suficiente para impedir a transferência de massa entre as fases.

De modo geral os objetivos do trabalho foram concluídos, principalmente tendo em vista que foi encontrada uma formulação realmente promissora para o preparo de nanocristais de EFV e que fez sua dissolução chegar em aproximadamente 100% logo nos primeiros minutos de ensaio.

## 7. PERSPECTIVAS

De acordo com todos os resultados discutidos no presente estudo, além das conclusões mencionadas no item anterior, com as amostras mais promissoras deste estudo ainda é passível a realização de outros trabalhos.

Com relação à cristalização do EFV foi visto que ainda falta a compreensão dos fatores que têm influência predominante sobre os fenômenos de nucleação e crescimento. Além disso também há a necessidade de investigar a precipitação do EFV sob novas fases cristalinas, como em TX10.

A morfologia das amostras também apresentou resultados diferenciados. Quando utilizado cisalhamento, a formação de filme esteve presente nas formulações com boa dissolução. Uma possibilidade de estudo seria o esclarecimento da relação entre a formação de filme e o incremento no perfil de dissolução.

As nanosuspensões formadas também levantaram pontos interessantes. É necessário um estudo mais pronunciado sobre a reologia dessas suspensões; compreensão maior em relação ao potencial zeta e sua significância como parâmetro físico-químico; também é necessário explorar os ensaios de estabilidade, como o realizado por Turbiscan onde é possível perceber sedimentação, floculação e alteração no tamanho de partícula; por fim, também seria interessante padronizar metodologia para avaliação de tamanho de partícula em nanosuspensões.

Com relação à secagem ainda ficaram alguns pontos a serem desenvolvidos. A começar pelo uso de diferentes técnicas, como *spray-dryer* e leito fluidizado, e testes de novas condições experimentais para este processo.

Os nanocristais obtidos não foram levados à compressão. Essa seria mais uma questão a ser investigada, já que para produção de um medicamento são necessários estudos para otimização dos parâmetros de compressão.

Outra perspectiva a ser investigada são os ensaios de biodisponibilidade. O presente trabalho não teve como objetivo contemplar esta questão, sendo importante no futuro a realização de comparação entre resultados *in vitro* e *in vivo*.

Mais do que desenvolver uma forma de produção de nanocristais de EFV, este estudo também pode abrir diferentes visões para questões ainda não consideradas em relação ao fármaco, sua cristalinidade, sua forma de cristalização e os nanocristais produzidos a partir deste.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–713, 30 dez. 2006.

ALVES, L. D. S. et al. Solid dispersion of efavirenz in PVP K-30 by conventional solvent and kneading methods. **Carbohydrate polymers**, v. 104, p. 166–74, 15 abr. 2014.

ANVISA, A. N. DE V. S. **GUIA PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO E ELABORAÇÃO DO RELATÓRIO DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA E PERFIL DE DISSOLUÇÃO**. Disponível em:

<[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[7885-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[7885-1-0].PDF)>. Acesso em: 14 fev. 2016.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resultado da Consulta de Produtos de Empresas**. Disponível em:

<[http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta\\_Produto\\_correlato/consulta\\_correlato.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/consulta_correlato.asp)>. Acesso em: 1 jan. 2016.

AULTON, M. E. **Pharmaceutics: the science of dosage form design**. 2nd ed. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002.

BADAWI, A. A et al. Formulation and stability testing of itraconazole crystalline nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 3, p. 811–20, set. 2011.

BECK, C.; DALVI, S. V.; DAVE, R. N. Controlled liquid antisolvent precipitation using a rapid mixing device. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 21, p. 5669–5675, nov. 2010a.

BECK, C.; DALVI, S. V.; DAVE, R. N. Controlled liquid antisolvent precipitation using a rapid mixing device. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 21, p. 5669–5675, nov. 2010b.

BLACHÉRE, J. R.; BRITAIN, H. G. X-Ray diffraction methods for the characterization of solid pharmaceutical materials. In: ADEYEYE, M.; BRITAIN, H. G. (Eds.). **Drugs and Pharmaceutical Sciences: Preformulation in Solid Dosage Form Development**. v.178. ed. New York, NY: Informa Healthcare, 2008. p. 229–252.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5<sup>a</sup>. ed. [s.l.] Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2010.

BRASIL. **LISTA A DE MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/14ebd8804597252a8a8c8fa9166895f7/Lista+A+23-09-2014.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 25 out. 2014.

BRASIL. **The Brazilian Response to HIV and AIDS**. Brasília: [s.n.]. Disponível em:

<[http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/BRA\\_narrative\\_report\\_2015.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/BRA_narrative_report_2015.pdf)>.

- BRISTOL-MEYES SQUIBB. **Key Products**. Disponível em: <<http://www.bmsireland.ie/products/pages/Home.aspx>>. Acesso em: 15 jan. 2015.
- BRITTAİN, H. G. Spectroscopic Methods for the Characterization of Drug Substances. In: ADEYEYE, M. C.; BRITTAİN, H. G. (Eds.). . **Drugs and Pharmaceutical Sciences: Preformulation in Solid Dosage Form Development**. Nova York: Informa Healthcare, 2008. p. 253–277.
- BURGER, D. et al. Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. **British journal of clinical pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 148–54, fev. 2006.
- CARRIQUE, F.; ARROYO, F.; DELGADO, A. Effect of a Dynamic Stern Layer on the Sedimentation Velocity and Potential in a Dilute Suspension of Colloidal Particles. **Journal of colloid and interface science**, v. 227, n. 1, p. 212–222, 1 jul. 2000.
- CARSTENSEN, J. T. **Drugs and the pharmaceutical sciences: Advanced Pharmaceutical Solids**. 1, v. 110 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001.
- CHADHA, R. et al. An insight into thermodynamic relationship between polymorphic forms of efavirenz. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 234–251, 2012a.
- CHADHA, R. et al. Crystal Forms of Anti-HIV Drugs: Role of Recrystallization Renu. In: SZTWIERTNIA, K. (Ed.). . **Recrystallization**. Rijeka: InTech, 2012b. p. 449–464.
- CHADHA, R. et al. Retrospection on Polymorphism and Cocrystallization of Anti-Retrovirals. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1933–1962, 1 set. 2013.
- CHAVES, G. C. **PERGUNTAS E RESPOSTAS SOBRE O LICENCIAMENTO COMPULSÓRIO DO MEDICAMENTO EFAVIRENZ NO BRASIL** Rio de Janeiro Associação Brasileira Interdisciplinar de AIDS, , 2007.
- CHEN, D.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. **Handbook on Applications of Ultrasound**: Boca Raton: CRC Press, 2011.
- CHEN, H. et al. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. **Drug discovery today**, v. 16, n. 7-8, p. 354–60, abr. 2011.
- CHEN, X. et al. Preparation of cyclosporine A nanoparticles by evaporative precipitation into aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1-2, p. 3–14, ago. 2002.
- CHIAPPETTA, D. A. et al. Efavirenz-Loaded Polymeric Micelles for Pediatric Anti-HIV Pharmacotherapy with Significantly Higher Oral Biavailability. **Nanomedicine (London, England)**, v. 5, n. 1, p. 11–23, 2010.
- CHIAPPETTA, D. A. et al. Synergistic encapsulation of the anti-HIV agent efavirenz within mixed poloxamine/poloxamer polymeric micelles. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 7, n. 5, p. 624–37, out. 2011.

- CHO, E. et al. Enhanced dissolution of megestrol acetate microcrystals prepared by antisolvent precipitation process using hydrophilic additives. **International journal of pharmaceutics**, v. 396, n. 1-2, p. 91–8, 30 ago. 2010.
- CHOI, J.-Y. et al. Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. **Current Applied Physics**, v. 5, n. 5, p. 472–474, jul. 2005.
- CHUNG, N.-O.; LEE, M. K.; LEE, J. Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions. **International journal of pharmaceutics**, v. 437, n. 1-2, p. 42–50, 1 nov. 2012.
- CIPLA PHARMACEUTICALS. **Formulations**. Disponível em: <<http://www.cipla.com/Home/Products/Formulations.aspx?mid=1292>>. Acesso em: 15 jan. 2015.
- COMBA, S.; SETHI, R. Stabilization of highly concentrated suspensions of iron nanoparticles using shear-thinning gels of xanthan gum. **Water research**, v. 43, n. 15, p. 3717–26, ago. 2009.
- CRAIG, D. Q. M.; READING, M. Principles of Differential Scanning Calorimetry. In: CRAIG, D. Q. M.; READING, M. (Eds.). **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 1–20.
- DE WAARD, H. et al. Preparation of drug nanocrystals by controlled crystallization: application of a 3-way nozzle to prevent premature crystallization for large scale production. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 224–9, 8 out. 2009.
- DE WAARD, H.; FRIJLINK, H. W.; HINRICHS, W. L. J. Bottom-up preparation techniques for nanocrystals of lipophilic drugs. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 5, p. 1220–3, maio 2011.
- DONG, Y. et al. Controlled antisolvent precipitation of spironolactone nanoparticles by impingement mixing. **International journal of pharmaceutics**, v. 410, n. 1-2, p. 175–9, 30 maio 2011.
- DURÁN, N. et al. TECNOLOGIA DE NANOCRISTAIS EM FÁRMACOS Nelson. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.
- FANDARUFF, C. et al. Polymorphism of Anti-HIV Drug Efavirenz : Investigations on Thermodynamic and Dissolution Properties. **Crystal Growth & Design**, v. 14, p. 4968–4975, 2014.
- GALINDO-ROSALES, F. J.; RUBIO-HERNÁNDEZ, F. J.; SEVILLA, A. An apparent viscosity function for shear thickening fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 166, n. 5-6, p. 321–325, mar. 2011.
- GAO, L. et al. Drug nanocrystals: In vivo performances. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 160, n. 3, p. 418–30, 28 jun. 2012.
- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B. DA; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.
- GHOSH, I. et al. Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth.

**International journal of pharmaceutics**, v. 409, n. 1-2, p. 260–8, 16 maio 2011.

GOMES, E. C. DE L. et al. Chemical Interactions Study of Antiretroviral Drugs Efavirenz and Lamivudine Concerning the Development of Stable Fixed-Dose Combination Formulations for AIDS Treatment. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 24, n. 4, p. 573–579, 2013.

GUIMARÃES, G. G. et al. Avaliação da pectina-HPMC no processo de revestimento por compressão: I - Estudo da propriedade de intumescimento em núcleos revestidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 133–141, mar. 2008.

GÜLSÜN, T.; GÜRSOY, R. N.; ÖNER, L. Nanocrystal Technology For Oral Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. **Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 55–65, 2009.

HONÓRIO, T. D. S. et al. In vitro-in vivo correlation of efavirenz tablets using GastroPlus®. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 3, p. 1244–54, 2013.

HU, J. et al. Continuous and scalable process for water-redispersible nanoformulation of poorly aqueous soluble APIs by antisolvent precipitation and spray-drying. **International journal of pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 198–204, 14 fev. 2011.

ILEVBARE, G. A et al. Impact of polymers on crystal growth rate of structurally diverse compounds from aqueous solution. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2381–93, 3 jun. 2013.

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 and Design**, v. 12, n. 6, p. 3133–3143, 2012.

JAIN, S. et al. Surface Stabilized Efavirenz Nanoparticles for Oral Bioavailability Enhancement. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1862–1874, 1 set. 2013.

JUNGHANNS, J.-U. A H.; MÜLLER, R. H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. **International journal of nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 295–309, jan. 2008.

KANG, W. et al. Stability mechanism of W/O crude oil emulsion stabilized by polymer and surfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 384, n. 1-3, p. 555–560, jul. 2011.

KATTEBOINAA, S.; CHANDRASEKHAR, P.; BALAJI, S. DRUG NANOCRYSTALS : A NOVEL FORMULATION APPROACH FOR POORLY. **International journal of pharmaceutical Technology Research**, v. 1, n. 3, p. 682–694, 2009.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3 ed. ed. Washinton: American Pharmaceutical Association, 2000.

KIM, M.-S. et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of amorphous atorvastatin calcium nanoparticles using supercritical antisolvent (SAS) process. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics** :

**official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 69, n. 2, p. 454–65, jun. 2008.

LAOT, C. M.; MARAND, E.; OYAMA, H. T. **Spectroscopic characterization of molecular interdiffusion at a poly(vinyl pyrrolidone)/vinyl ester interface.** [s.l: s.n.].

LAZGHAB, M. et al. Wettability assessment of finely divided solids. **Powder Technology**, v. 157, n. 1-3, p. 79–91, set. 2005.

LEE, J. et al. Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 5, p. 441–9, abr. 2005.

LEE, J.; CHENG, Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. **Journal of controlled release**, v. 111, n. 1-2, p. 185–92, 10 mar. 2006.

LIU, G. et al. Comparison of different methods for preparation of a stable riccardin D formulation via nano-technology. **International journal of pharmaceuticals**, v. 422, n. 1-2, p. 516–22, 17 jan. 2012.

MAGGILOLO, F. Efavirenz: a decade of clinical experience in the treatment of HIV. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, n. 5, p. 910–28, nov. 2009.

MAHAPATRA, A. K.; MURTHY, P. N. Solubility and dissolution rate enhancement of efavirenz by inclusion complexation and liquid anti-solvent precipitation technique. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 1099–1106, 2014.

MAHAPATRA, S. et al. New solid state forms of the anti-HIV drug efavirenz. Conformational flexibility and high Z' issues. **Crystal Growth and Design**, v. 10, p. 3191–3202, 2010a.

MAHAPATRA, S. et al. New Solid State Forms of the Anti-HIV Drug Efavirenz. Conformational Flexibility and High Z' Issues. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 7, p. 3191–3202, 7 jul. 2010b.

MAHESH, K. V.; SINGH, S. K.; GULATI, M. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of nanosuspensions of glipizide. **Powder Technology**, v. 256, p. 436–449, abr. 2014.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy - Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences**. 4<sup>a</sup> ed. ed. Philadelphia, London: Lea & Febiger, 1993.

MATTEUCCI, M. E. et al. Drug nanoparticles by antisolvent precipitation: mixing energy versus surfactant stabilization. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 21, p. 8951–9, 10 out. 2006.

MENGUAL, O. et al. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1-2, p. 111–123, jul. 1999.

MENGUAL, O. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. **Talanta**, v. 50, n. 2, p. 445–456, 13 set. 1999.

MULLER, R. H.; KECK, C. M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. **Journal of biotechnology**, v. 113, n. 1-3, p. 151–70, 30 set. 2004.

NALAJALA, V. S.; MOHOLKAR, V. Investigations in the physical mechanism of sonocrystallization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 345–355, 2011.

NASSER, M. S.; JAMES, A. E. The effect of polyacrylamide charge density and molecular weight on the flocculation and sedimentation behaviour of kaolinite suspensions. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 2, p. 241–252, dez. 2006.

NEPPELBERG, E. et al. Dual effects of sodium lauryl sulphate on human oral epithelial structure. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 8, p. 574–579, 2007.

NICKERSON, B. et al. Analytical method development: Challenges and solutions for low-dose oral dosage forms. In: ZHENG, J. (Ed.). . **Formulation and Analytical Development for Low-Dose Oral Drug Products**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, LTD, 2009. p. 241–264.

NIWA, T.; MIURA, S.; DANJO, K. Design of dry nanosuspension with highly spontaneous dispersible characteristics to develop solubilized formulation for poorly water-soluble drugs. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 9, p. 2339–49, set. 2011.

OCHI, M. et al. Development of nanocrystal formulation of meloxicam with improved dissolution and pharmacokinetic behaviors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1-2, p. 151–156, 2014.

PATEL, A. P. et al. A REVIEW ON DRUG NANOCRYSTAL A CARRIER FREE DRUG DELIVERY. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 448–458, 2011.

PATEL, G. V et al. Nanosuspension of efavirenz for improved oral bioavailability: formulation optimization, in vitro, in situ and in vivo evaluation. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 40, n. 1, p. 80–91, jan. 2014.

PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: Critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1569–1579, 2010.

PURI, V. et al. Wettability and surface chemistry of crystalline and amorphous forms of a poorly water soluble drug. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 84–93, 12 maio 2010.

PYGALL, S. R. et al. A formulation development perspective on critical interactions affecting the performance of hydrophilic matrix tablets. In: TIMMINS, P.; PYGALL, S. R.; MELIA, C. R. (Eds.). . **Hydrophilic matrix tablet for oral controlled release**. New York, NY: America Association of Pharmaceutical Scientists 2014, 2014. p. 143–164.

QUAN, P. et al. Nitrendipine nanocrystals: its preparation, characterization, and

in vitro-in vivo evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1136–43, dez. 2011.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 9, p. 785–96, set. 2004.

LILIAN A. RADESCA, MICHAEL B. MAURIN, SHELLEY R. RABEL, JAMES R. MOORE. Crystalline efavirenz. 6,673,372, 10 jun. 1999, 06 jan. 2004.

RAVIKUMAR, K.; SRIDHAR, B. Molecular and Crystal Structure of Efavirenz, a Potent and Specific Inhibitor of HIV-1 Reverse Transcriptase, and Its Monohydrate. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 515, p. 190–198, 2009.

RICHARDSON, J. **Table of Characteristic IR Absorptions** University of Colorado, Boulder, Chemistry and Biochemistry Department, 2011.

Disponível em:

<<http://orgchem.colorado.edu/Spectroscopy/specttutor/irchart.html>>

SALAZAR, J. et al. Nanocrystals: comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 81, n. 1, p. 82–90, maio 2012.

SAWANT, S. V et al. Drug Nanocrystals: Novel technique for delivery of poorly soluble drugs. **International Journal of science innovations and Discoveries**, v. 1, n. 3, p. 1–15, 2011.

SCHIRMER, R. E. **Modern methods of pharmaceutical analysis**. 2° ed. ed. El dorado Hills, California: CRC Press, 2000.

SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability, *Pharm Res* 12, 413-420, 1995-Backstory of BCS. **The AAPS journal**, n. 3, 25 jun. 2014.

SINHA, B.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size. **International journal of pharmaceuticals**, v. 453, n. 1, p. 126–41, 30 ago. 2013.

SMITH, K. A. To cure chronic HIV infection, a new therapeutic strategy is needed. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 5, p. 617–624, out. 2001.

SOUZA, M. V. N. DE; ALMEIDA, M. V. DROGAS ANTI-VIH: PASSADO, PRESENTE E PERSPECTIVAS FUTURAS *Quim.* **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 366–372, 2003.

STEWART, P. A.; HEARN, J.; WILKINSON, M. C. An overview of polymer latex film formation and properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 86, n. 3, p. 195–267, jul. 2000.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. [s.l: s.n.]. v. 8

SZE, A. et al. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation

and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. **Journal of colloid and interface science**, v. 261, n. 2, p. 402–10, 15 maio 2003.

THEOPHILE, T. (ED.). **Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology**. [s.l.: s.n.]. InTech, 2012.

THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions Recent developments and future perspective.pdf. **Chemical Engineering Journal**, 2012.

TUNG, H. H. et al. **Crystallization of Organic Compounds: An Industrial Perspective**. [s.l.: s.n.].

UNAIDS. **HIV Estimates with uncertainty bounds**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourepidemic/epidemiologypublications/>>.

UNAIDS. **FACT SHEET 2015**. [s.l.: s.n.].

VERMA, S. et al. Physical stability of nanosuspensions: investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. **International journal of pharmaceutics**, v. 406, n. 1-2, p. 145–52, 15 mar. 2011.

VERMA, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. **International journal of pharmaceutics**, v. 380, n. 1-2, p. 216–22, 1 out. 2009.

VERMA, S.; HUEY, B. D.; BURGESS, D. J. Scanning probe microscopy method for nanosuspension stabilizer selection. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 21, p. 12481–7, 3 nov. 2009.

WANG, Y. et al. Stability of nanosuspensions in drug delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 172, n. 3, p. 1126–41, 28 dez. 2013.

WINTERGERST, U. et al. Antiviral efficacy, tolerability and pharmacokinetics of efavirenz in an unselected cohort of HIV-infected children. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1336–9, jun. 2008.

WONG, G.; COLLINS, C. C. Dissolution Testing. In: ADEYEYE, M. C.; BRITAIN, H. G. (Eds.). **Drugs and Pharmaceutical Sciences: Preformulation in Solid Dosage Form Development**. Nova York: Informa Healthcare, 2008. p. 477–555.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children: Towards universal access**. 2010 revis ed. Geneva: WHO Press, 2010.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 6, p. 456–69, 30 maio 2011.

YANG, L. et al. Facile synthesis of porous flower-like SrCO<sub>3</sub> nanostructures by integrating bottom-up and top-down routes. **Materials Letters**, v. 167, p. 4–8, mar. 2016.

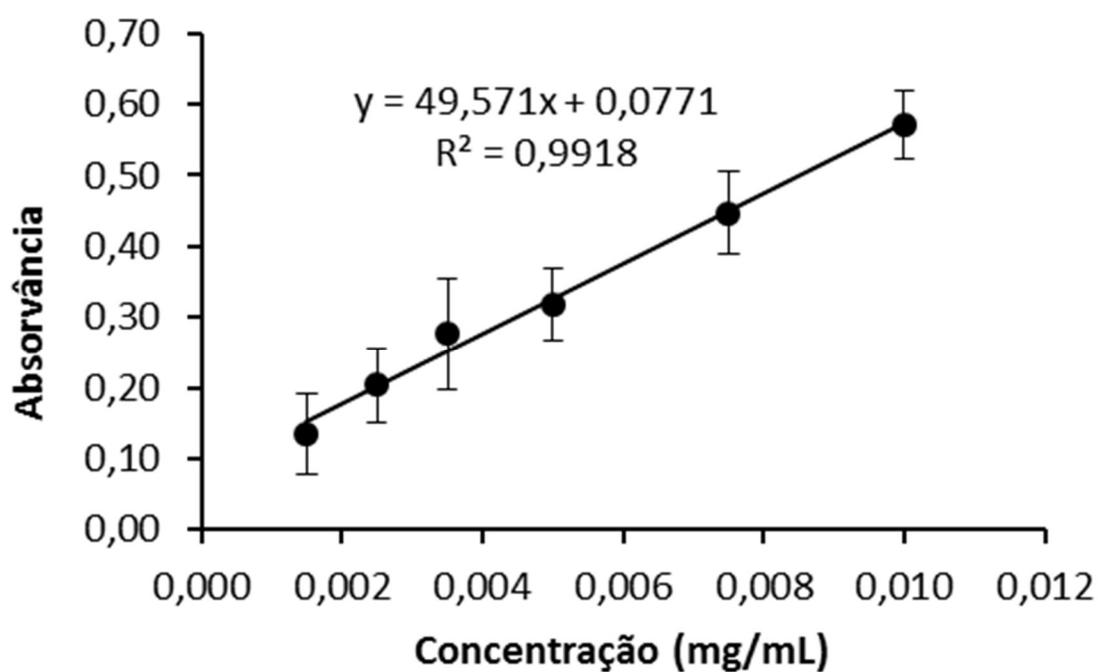
YE, X. et al. Conjugation of Hot-Melt Extrusion with High-Pressure

Homogenization: a Novel Method of Continuously Preparing Nanocrystal Solid Dispersions. **AAPS PharmSciTech**, n. 7, 2015.

ZHANG, H.-X. et al. Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process. **International journal of pharmaceutics**, v. 374, n. 1-2, p. 106–13, 5 jun. 2009.

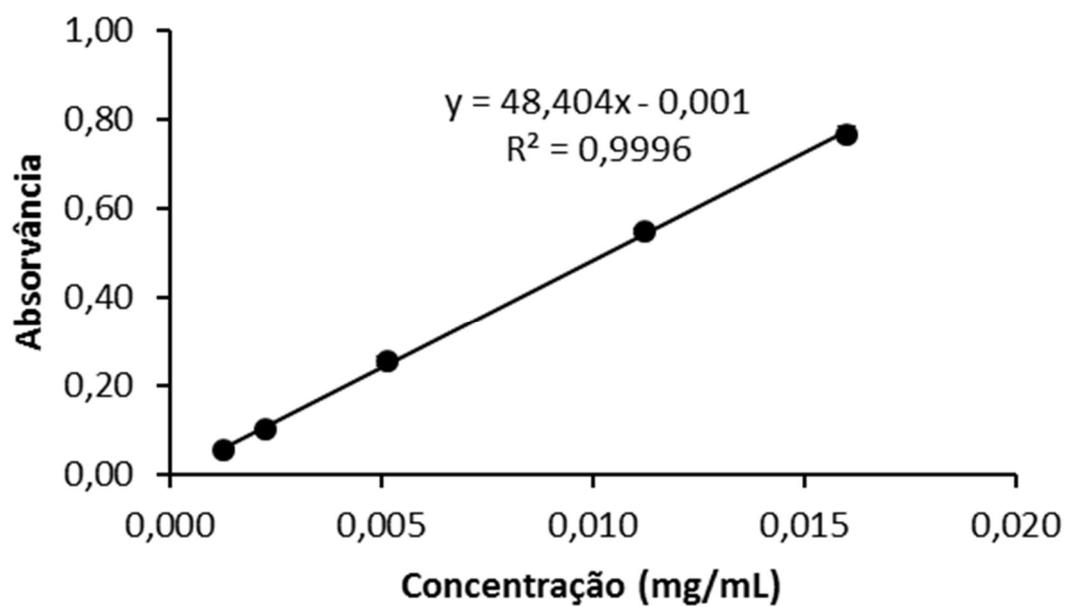
### ANEXO I. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EFV EM METANOL

Concentração (mg/mL)	Absorvância			Média	DP	DPR
	1	2	3			
0,0015	0,099	0,103	0,201	0,134	0,058	43,005%
0,0025	0,222	0,143	0,244	0,203	0,053	26,164%
0,0035	0,292	0,192	0,347	0,277	0,079	28,369%
0,0050	0,368	0,265	0,321	0,318	0,052	16,216%
0,0075	0,510	0,433	0,398	0,447	0,057	12,818%
0,0100	0,626	0,542	0,544	0,571	0,048	8,399%



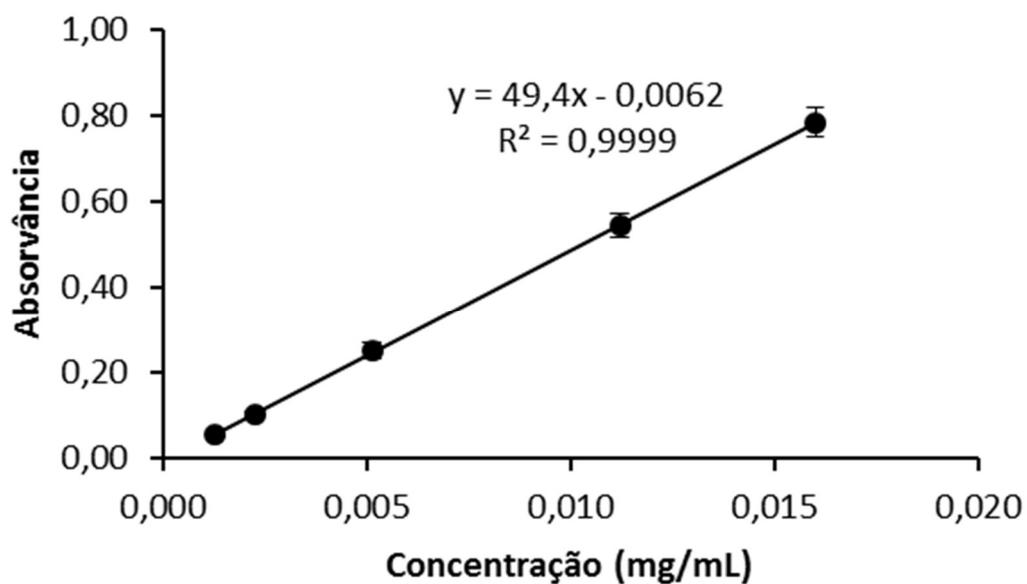
**ANEXO II. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EFV EM LSS 0,1%**

Concentração (mg/mL)	Absorvância			Média	DP
	1	2	3		
0,0013	0,055	0,053	0,061	0,056	0,004
0,0022	0,103	0,104	0,106	0,104	0,001
0,0051	0,267	0,248	0,247	0,254	0,011
0,0112	0,554	0,542	0,547	0,548	0,006
0,0160	0,786	0,757	0,759	0,767	0,016



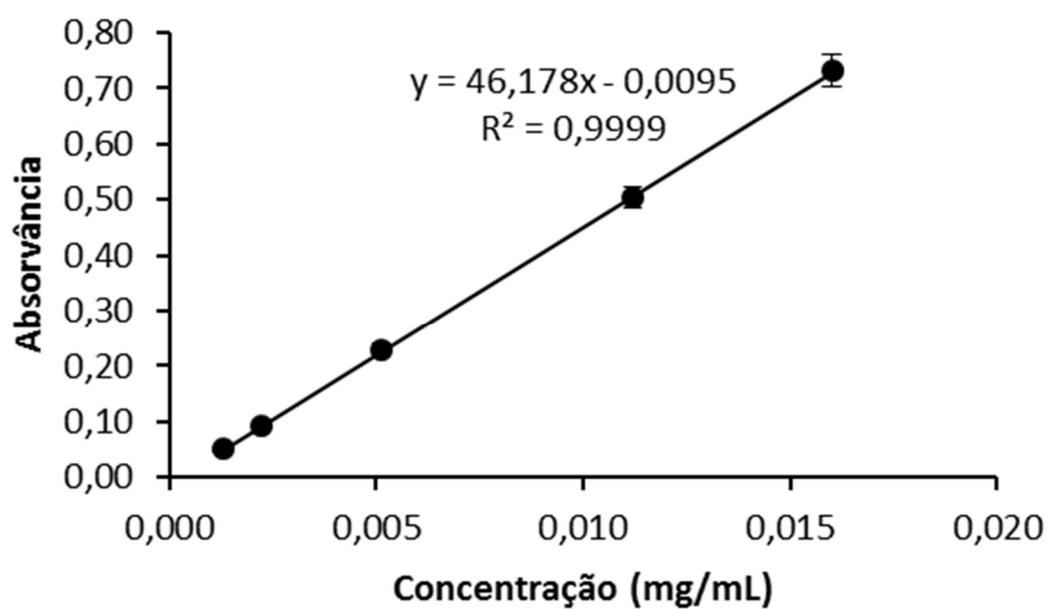
**ANEXO III. CURVA DE CALIBRAÇÃO EFV EM LSS 0,5%**

Concentração (mg/mL)	Absorvância			Média	DP
	1	2	3		
0,0013	0,063	0,049	0,059	0,057	0,007
0,0022	0,108	0,094	0,102	0,101	0,007
0,0051	0,270	0,231	0,253	0,251	0,020
0,0112	0,567	0,514	0,557	0,546	0,028
0,0160	0,803	0,746	0,803	0,784	0,033

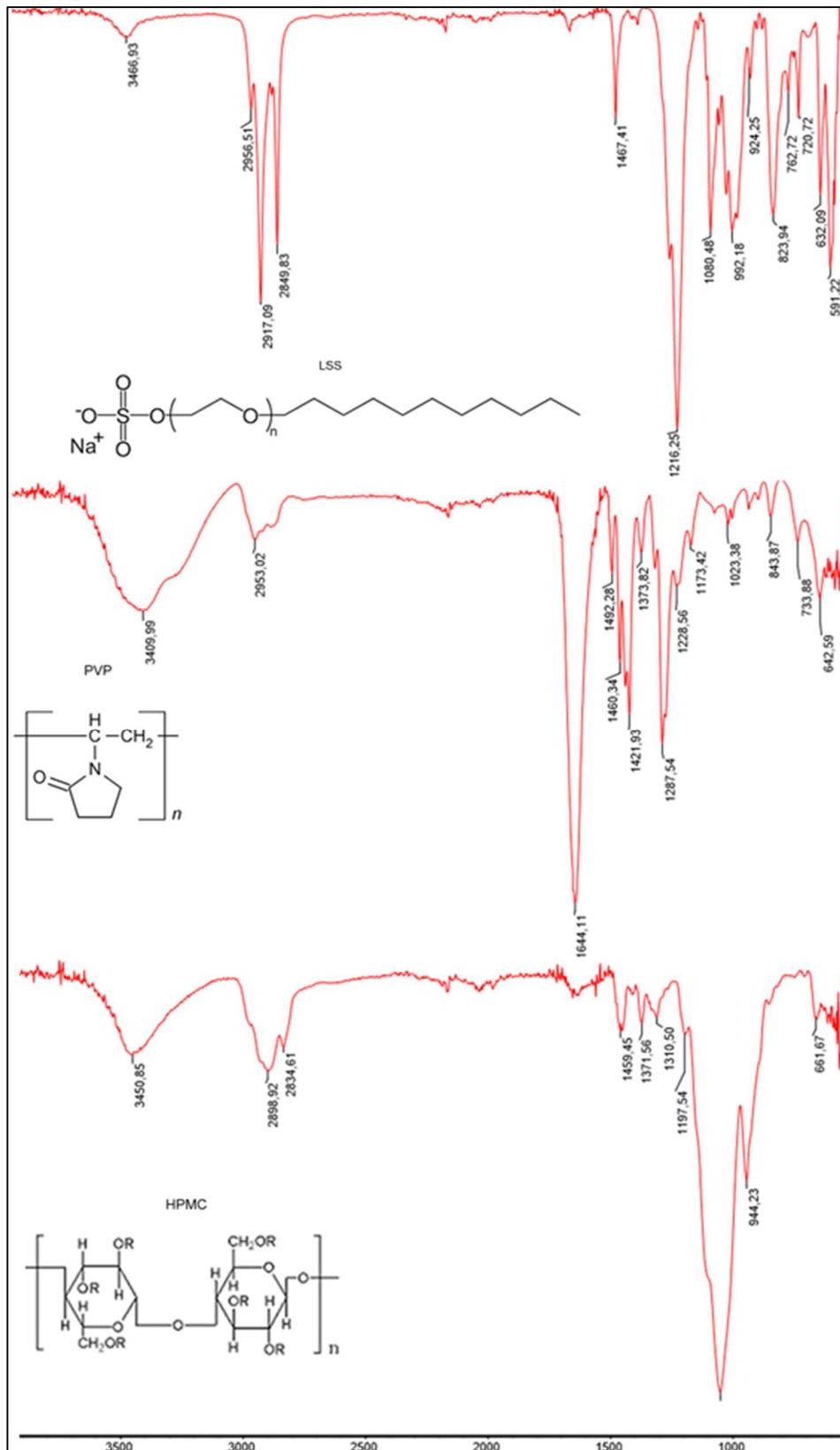


**ANEXO IV. CURVA DE CALIBRAÇÃO EFV EM ÁGUA DEIONIZADA**

Concentração (mg/mL)	Absorvância			Média	DP
	1	2	3		
0,0013	0,050	0,048	0,055	0,051	0,004
0,0022	0,090	0,089	0,096	0,092	0,004
0,0051	0,216	0,239	0,234	0,230	0,012
0,0112	0,482	0,514	0,516	0,504	0,019
0,0160	0,708	0,722	0,764	0,731	0,029



## ANEXO V. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO EXCIPIENTES UTILIZADOS



**ANEXO VI. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO COMPARADOS EM PARES ENTRE SI**

<b>Perfis dissolução comparados</b>	<b>Somas de quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Valor de F crítico</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Semelhança entre perfis</b>
TX1 – TX2	3166,755	1	3166,755	896,925	4,149	$5,60 \times 10^{-25}$	Não semelhantes
TX1 – TX3	9174,191	1	9174,191	1461,040	4,149	$2,803 \times 10^{-28}$	Não semelhantes
TX1 – TX4	3198,971	1	3198,971	320,670	4,149	$3,089 \times 10^{-18}$	Não semelhantes
TX1 – TX5	6666,113	1	6666,113	888,982	4,149	$6,421 \times 10^{-25}$	Não semelhantes
TX1 – TX6	14290,234	1	14290,234	714,044	4,149	$1,875 \times 10^{-23}$	Não semelhantes
TX1 – TX7	10988,789	1	10988,789	1397,178	4,149	$1,875 \times 10^{-23}$	Não semelhantes
TX1 – TX8	3410,896	1	3410,896	174,760	4,149	$1,641 \times 10^{-14}$	Não semelhantes
TX1 – TX9	31484,625	1	31484,625	669,211	4,149	$5,062 \times 10^{-23}$	Não semelhantes
TX1 – TX10	3410,896	1	3410,896	174,760	4,149	$1,641 \times 10^{-14}$	Não semelhantes
TX1 – TX12	1876,399	1	1876,399	144,261	4,149	$2,141 \times 10^{-13}$	Não semelhantes
TX1 – TX13	46103,492	1	46103,492	5675,621	4,149	$1,337 \times 10^{-37}$	Não semelhantes
TX1 – TX14	6376,770	1	6376,770	2100,974	4,149	$9,283 \times 10^{-31}$	Não semelhantes
TX2 – TX3	1560,887	1	1560,887	276,215	4,149	$2,686 \times 10^{-17}$	Não semelhantes
TX2 – TX4	0,082	1	0,082	0,009	4,149	$9,262 \times 10^{-1}$	Semelhantes
TX2 – TX5	643,756	1	643,756	93,700	4,149	$4,995 \times 10^{-11}$	Não semelhantes
TX2 – TX6	4002,819	1	4002,819	206,492	4,149	$1,652 \times 10^{-15}$	Não semelhantes
TX2 – TX7	2357,442	1	2357,442	325,759	4,149	$2,455 \times 10^{-18}$	Não semelhantes
TX2 – TX8	4,532	1	4,532	0,240	4,149	$6,276 \times 10^{-1}$	Semelhantes
TX2 – TX9	14680,992	1	14680,992	316,270	4,149	$3,779 \times 10^{-18}$	Não semelhantes
TX2 – TX10	4,532	1	4,532	0,240	4,149	$6,276 \times 10^{-1}$	Semelhantes
TX2 – TX12	9918,437	1	9918,437	801,249	4,149	$3,191 \times 10^{-24}$	Não semelhantes
TX2 – TX13	25104,281	1	25104,281	3349,538	4,149	$5,814 \times 10^{-34}$	Não semelhantes
TX2 – TX14	18530,999	1	18530,999	7699,041	4,149	$1,041 \times 10^{-39}$	Não semelhantes
TX3 – TX4	1538,408	1	1538,408	127,181	4,149	$1,106 \times 10^{-12}$	Não semelhantes
TX3 – TX5	199,819	1	199,819	20,774	4,149	$7,149 \times 10^{-5}$	Não semelhantes
TX3 – TX6	564,527	1	564,527	25,506	4,149	$1,717 \times 10^{-5}$	Não semelhantes
TX3 – TX7	81,820	1	81,820	8,194	4,149	$7,354 \times 10^{-3}$	Não semelhantes

### ANEXO VI. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO COMPARADOS EM PARES ENTRE SI

Perfis dissolução comparados	Somas de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor de F	Valor de F crítico	p-Valor	Semelhança entre perfis
TX3 – TX8	1397,198	1	1397,198	64,572	4,149	$3,565 \times 10^{-9}$	Não semelhantes
TX3 – TX9	6667,879	1	6667,879	135,615	4,149	$4,813 \times 10^{-13}$	Não semelhantes
TX3 – TX10	1397,198	1	1397,198	64,572	4,149	$3,565 \times 10^{-9}$	Não semelhantes
TX3 – TX12	19348,647	1	19348,647	1279,058	4,149	$2,246 \times 10^{-27}$	Não semelhantes
TX3 – TX13	14145,592	1	14145,592	1380,949	4,149	$6,777 \times 10^{-28}$	Não semelhantes
TX3 – TX14	30848,242	1	30848,242	5983,604	4,149	$5,768 \times 10^{-38}$	Não semelhantes
TX4 – TX5	629,349	1	629,349	47,264	4,149	$8,854 \times 10^{-8}$	Não semelhantes
TX4 – TX6	3966,773	1	3966,773	153,572	4,149	$9,347 \times 10^{-14}$	Não semelhantes
TX4 – TX7	2329,798	1	2329,798	170,282	4,149	$2,334 \times 10^{-14}$	Não semelhantes
TX4 – TX8	3,398	1	3,398	0,134	4,149	$7,166 \times 10^{-1}$	Semelhantes
TX4 – TX9	14611,885	1	14611,885	276,403	4,149	$2,659 \times 10^{-17}$	Não semelhantes
TX4 – TX10	3,398	1	3,398	0,134	4,149	$7,166 \times 10^{-1}$	Semelhantes
TX4 – TX12	9975,388	1	9975,388	529,931	4,149	$1,760 \times 10^{-21}$	Não semelhantes
TX4 – TX13	25013,888	1	25013,888	1794,387	4,149	$1,113 \times 10^{-29}$	Não semelhantes
TX4 – TX14	18608,814	1	18608,814	2102,180	4,149	$9,199 \times 10^{-31}$	Não semelhantes
TX5 – TX6	1436,069	1	1436,069	61,494	4,149	$6,030 \times 10^{-9}$	Não semelhantes
TX5 – TX7	537,366	1	537,366	47,959	4,149	$7,679 \times 10^{-8}$	Não semelhantes
TX5 – TX8	540,255	1	540,255	23,636	4,149	$2,969 \times 10^{-5}$	Não semelhantes
TX5 – TX9	9176,261	1	9176,261	182,115	4,149	$9,353 \times 10^{-15}$	Não semelhantes
TX5 – TX10	540,255	1	540,255	23,636	4,149	$2,969 \times 10^{-5}$	Não semelhantes
TX5 – TX12	15615,924	1	15615,924	955,299	4,149	$2,108 \times 10^{-25}$	Não semelhantes
TX5 – TX13	17707,882	1	17707,882	1544,818	4,149	$1,170 \times 10^{-28}$	Não semelhantes
TX5 – TX14	26082,558	1	26082,558	4091,485	4,149	$2,431 \times 10^{-35}$	Não semelhantes
TX6 – TX7	216,512	1	216,512	9,128	4,149	$4,920 \times 10^{-3}$	Não semelhantes
TX6 – TX8	3737,963	1	3737,963	105,676	4,149	$1,149 \times 10^{-11}$	Não semelhantes
TX6 – TX9	3352,098	1	3352,098	53,291	4,149	$2,683 \times 10^{-8}$	Não semelhantes
TX6 – TX10	3737,963	1	3737,963	105,676	4,149	$1,149 \times 10^{-11}$	Não semelhantes

**ANEXO VI. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO COMPARADOS EM PARES ENTRE SI**

<b>Perfis dissolução comparados</b>	<b>Somas de quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Valor de F crítico</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Semelhança entre perfis</b>
TX6 – TX12	26523,114	1	26523,114	918,990	4,149	$3,842 \times 10^{-25}$	Não semelhantes
TX6 – TX13	9058,371	1	9058,371	377,790	4,149	$2,780 \times 10^{-19}$	Não semelhantes
TX6 – TX14	39758,943	1	39758,943	2104,833	4,149	$9,018 \times 10^{-31}$	Não semelhantes
TX7 – TX8	2155,238	1	2155,238	92,803	4,149	$5,608 \times 10^{-11}$	Não semelhantes
TX7 – TX9	5272,452	1	5272,452	103,884	4,149	$1,420 \times 10^{-11}$	Não semelhantes
TX7 – TX10	2155,238	1	2155,238	92,803	4,149	$5,608 \times 10^{-11}$	Não semelhantes
TX7 – TX12	21946,894	1	21946,894	1313,161	4,149	$1,489 \times 10^{-27}$	Não semelhantes
TX7 – TX13	12075,771	1	12075,771	1020,848	4,149	$7,530 \times 10^{-26}$	Não semelhantes
TX7 – TX14	358,594	1	358,594	7,599	4,149	$2,107 \times 10^{-5}$	Não semelhantes
TX8 – TX9	14169,616	1	14169,616	227,055	4,149	$4,375 \times 10^{-16}$	Não semelhantes
TX8 – TX10	14169,616	1	14169,616	227,055	4,149	$4,375 \times 10^{-16}$	Não semelhantes
TX8 – TX12	38042,935	1	38042,935	2181,177	4,149	$5,141 \times 10^{-31}$	Não semelhantes
TX8 – TX13	10347,019	1	10347,019	364,773	4,149	$4,665 \times 10^{-19}$	Não semelhantes
TX8 – TX14	19115,153	1	19115,153	1039,214	4,149	$5,709 \times 10^{-26}$	Não semelhantes
TX9 – TX10	14169,616	1	14169,616	227,055	4,149	$4,375 \times 10^{-16}$	Não semelhantes
TX9 – TX12	48733,430	1	48733,430	871,868	4,149	$8,671 \times 10^{-25}$	Não semelhantes
TX9 – TX13	1389,661	1	1389,661	27,242	4,149	$1,050 \times 10^{-5}$	Não semelhantes
TX9 – TX14	66200,077	1	66200,077	1441,526	4,149	$3,460 \times 10^{-28}$	Não semelhantes
TX10 – TX12	10347,019	1	10347,019	364,773	4,149	$4,665 \times 10^{-19}$	Não semelhantes
TX10 – TX13	24434,178	1	24434,178	1040,559	4,149	$5,595 \times 10^{-26}$	Não semelhantes
TX10 – TX14	19115,153	1	19115,153	1039,214	4,149	$5,709 \times 10^{-26}$	Não semelhantes
TX12 – TX13	66581,885	1	66581,885	3923,247	4,149	$4,734 \times 10^{-35}$	Não semelhantes
TX12 – TX14	1334,972	1	1334,972	112,341	4,149	$5,358 \times 10^{-12}$	Não semelhantes
TX13 – TX14	86772,616	1	86772,616	12397,297	4,149	$5,221 \times 10^{-43}$	Não semelhantes

**ANEXO VI. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO COMPARADOS EM PARES ENTRE SI**

<b>Perfis dissolução comparados</b>	<b>Somas de quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Valor de F crítico</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Semelhança entre perfis</b>
SN9 – SN10	2534,730	1	2534,730	56,056	4,149	$1,597 \times 10^{-8}$	Não semelhantes
SN9 – SN11	5934,415	1	5934,415	132,432	4,149	$6,555 \times 10^{-13}$	Não semelhantes
SN9 – SN12	1204,868	1	1204,868	31,193	4,149	$3,620 \times 10^{-6}$	Não semelhantes
SN9 – SN13	3177,803	1	3177,803	49,856	4,149	$5,241 \times 10^{-8}$	Não semelhantes
SN9 – SN14	1391,622	1	1391,622	23,085	4,149	$3,503 \times 10^{-5}$	Não semelhantes
SN10 – SN11	712,305	1	712,305	46,875	4,149	$9,595 \times 10^{-8}$	Não semelhantes
SN10 – SN12	7234,748	1	7234,748	802,842	4,149	$3,095 \times 10^{-24}$	Não semelhantes
SN10 – SN13	11388,756	1	11388,756	333,737	4,149	$1,723 \times 10^{-18}$	Não semelhantes
SN10 – SN14	170,085	1	170,085	5,546	4,149	$2,482 \times 10^{-2}$	Não semelhantes
SN11 – SN12	12487,251	1	12487,251	1451,192	4,149	$3,117 \times 10^{-28}$	Não semelhantes
SN11 – SN13	17797,471	1	17797,471	527,827	4,149	$1,869 \times 10^{-21}$	Não semelhantes
SN11 – SN14	1578,529	1	1578,529	52,163	4,149	$3,333 \times 10^{-8}$	Não semelhantes
SN11 – TX7	959,021	1	959,021	72,762	4,149	$9,524 \times 10^{-10}$	Não semelhantes
SN11 – TX9	1734,189	1	1734,189	103,884	4,149	$1,420 \times 10^{-11}$	Não semelhantes
SN11 – TX13	1734,189	1	1734,189	33,119	4,149	$2,209 \times 10^{-6}$	Não semelhantes
SN12 – SN13	469,190	1	469,190	17,041	4,149	$2,441 \times 10^{-4}$	Não semelhantes
SN12 – SN14	5186,255	1	5186,255	215,401	4,149	$9,165 \times 10^{-16}$	Não semelhantes
SN13 – SN14	8775,278	1	8775,278	178,393	4,149	$1,240 \times 10^{-14}$	Não semelhantes