



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ANA CRISTINA SOUSA GRAMOZA VILARINHO SANTANA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO BASEADOS EM
POSACONAZOL E POSACONAZOL: BENZNIDAZOL COM POTENCIAL EFEITO
TRIPANOCIDA**

Recife

2019

ANA CRISTINA SOUSA GRAMOZA VILARINHO SANTANA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO BASEADOS EM
POSACONAZOL E POSACONAZOL:BENZNIDAZOL COM POTENCIAL EFEITO
TRIPANOCIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santana, Ana Cristina Sousa Gramoza Vilarinho

Desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em posaconazol e posaconazol:benznidazol com potencial efeito tripanocida / Ana Cristina Sousa Gramoza Vilarinho Santana - 2019.

113 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Lamartine Soares Sobrinho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices

1. Doença de Chagas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Posaconazol
I. Soares Sobrinho, José Lamartine (orient.) II. Título

615.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-099

ANA CRISTINA SOUSA GRAMOZA VILARINHO SANTANA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO BASEADOS EM
POSACONAZOL E POSACONAZOL:BENZNIDAZOL COM POTENCIAL EFEITO
TRIPANOCIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 22/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Livio Cesar Cunha Nunes
Universidade Federal de Piauí

Prof. Dr. Adley Antonini Neves De Lima
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno
Universidade Federal da Paraíba

DEDICATÓRIA

À Deus, a meus pais e ao meu esposo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois ele me guia e me fortalece em todos os momentos.

Aos meus pais, **José** e **Marlene** que são os alicerces da minha vida. Ao meu esposo **Pedro** pela compreensão, apoio, amor e companheirismo. Aos meus irmãos, **Alexandrina**, **Elyssandra**, **José Filho** e aos meus sobrinhos, pelo apoio, carinho e amor. À **Rosário**, que mesmo longe torce por mim.

Ao meu orientador professor **Dr. José Lamartine** e à professora **Dra. Monica Felts** pelo auxílio e apoio durante toda a minha vida científica.

Ao laboratório **NCQM** pelo suporte e aos amigos conquistados, pelos momentos de estudo e experimentos, produzindo novos conhecimentos, e pelas descontrações necessárias.

Aos Laboratórios **LIMAV-UFPI**, ao **LITE-UPFI** e ao **LTM-UFPE** pelas parcerias realizadas.

Aos professores **Dr. Alejandro Ayala** e **Dra. Gardênia** pelo auxílio material e intelectual quanto a engenharia de cristais.

Ao **CETENE** pelas análises realizadas.

À **FACEPE** pelo auxílio financeiro.

A todos os professores que já passaram pela minha vida, pois cada um foi importante para a formação do meu conhecimento.

Floresça onde Deus te plantar.

RESUMO

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas com o intuito de alcançar terapias medicamentosas eficazes contra doença de Chagas, uma alternativa mais barata tem sido o desenvolvimento de sistemas de liberação com fármacos já aprovados no mercado e que possuam atividade contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, como o posaconazol (POS). Assim, esta tese teve como objetivo o desenvolvimento de sistemas de liberação baseados na associação dos fármacos posaconazol e benznidazol (BNZ) para obtenção de um sistema com potencial ação antichagásica. Inicialmente, foi analisado a influência da β -ciclodextrina na melhoria da utilidade do POS obtendo-se o complexo de inclusão β -CD:POS (2:1) o qual aumentou a estabilidade oxidativa do fármaco com tempo de meia vida (de 29,2 pra 46,5 h), solubilidade aparente (cerca de 5 vezes) promovendo a supersaturação do fármaco com aumento da disponibilidade de fármaco para a promoção de atividade antifúngica *in vitro*. Posteriormente, realizou-se o desenvolvimento e otimização do método de quantificação simultânea envolvendo os fármacos benznidazol (BNZ) e POS por meio cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fotodiodo (CLAE-DAD) associada a ferramentas de planejamento experimental. O método desejável utilizou fase móvel metanol:tampão acetato (pH 3,5)(71:29) sob vazão de 1,2 mL.min⁻¹, comprimento de onda de 260 nm e tempo de corrida inferior a 10 min. Por fim, para obter a associação BNZ:POS, realizou-se a cocristalização com coformadores ácido succínico (AS) e ácido fumárico (AF) por método de moagem assistida por líquido. A formação dos cristais foi observada por modificações quanto aos deslocamentos e redução de intensidade nas bandas de $-\text{NO}_2$ e $\text{C}=\text{O}$, alteração na estrutura cristalina visualizado por DRX e MEV e alterações no comportamento térmico, sugerindo-se a formação de uma mistura eutética (POS:BNZ:AF) e um cocristal (POS:BNZ:AS). A performance de dissolução dos fármacos foi ainda analisada a qual evidenciou que POS:BNZ:AF apresentou aumento de eficiência de 33,07% (POS) e 31,38% (BNZ) para 49,05% (POS) e 72,21% (BNZ). Para POS:BNZ:AS o aumento foi para 52,56% (POS) e 95,18% (BNZ). Assim, esta tese contém informações valiosas e inovadoras acerca dos sistemas para o desenvolvimento de futuros medicamentos visando o efeito tripanocida.

Palavra-chave: Quantificação simultânea. Dissolução. Cristalização. Doença de Chagas. *T. cruzi*. Planejamento experimental.

ABSTRACT

Several strategies have been developed with the aim of achieving effective drug therapies against Chagas disease, a cheaper alternative has been the development of drug release systems already approved in the market and that have activity against the parasite *Trypanosoma cruzi*, such as posaconazole (POS). Thus, this thesis had the objective of developing release systems based on the association of the drugs posaconazole and benznidazole (BNZ) to obtain a system with potential antichagasic action. Initially, the influence of β -cyclodextrin on improving the utility of POS was analyzed by obtaining the β -CD: POS inclusion complex (2:1) which increased the oxidative stability of the drug with half-life (from 29.2 to 46.5 h), apparent solubility (about 5-fold) promoting drug supersaturation with increased drug availability to promote antifungal activity in vitro. Subsequently, the development and optimization of the simultaneous quantification method involving benznidazole (BNZ) and POS by high performance liquid chromatography with photodiode detector (CLAE-DAD) associated with experimental planning tools was carried out. The preferred method used mobile phase methanol: acetate buffer (pH 3.5) (71:29) under a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹, wavelength 260 nm and run time less than 10 min. Finally, to obtain the BNZ: POS association, co-crystallization with succinic acid (AS) and fumaric acid (FA) cocrystals was performed by liquid-assisted grinding method. The formation of the crystals was observed by changes in the displacements and reduction of intensity in the bands of -NO₂ and C=O, alteration in the crystalline structure visualized by XRD and SEM and changes in the thermal behavior, suggesting the formation of eutectic mixture (POS:BNZ:AF) and cocrystal (POS:BNZ:AS). The dissolution performance of the drugs was also analyzed which showed that POS: BNZ: AF presented an efficiency increase from 33.07% (POS) and 31.38% (BNZ) to 49.05% (POS) and 72.21 % (BNZ). For POS:BNZ:AS the increase was to 52.56% (POS) and 95.18% (BNZ). Thus, this thesis contains valuable and innovative information about the systems for the development of future drugs aimed at the trypanocidal effect.

Keywords: Simultaneous quantification. Dissolution. Crystallization. Chagas disease. *T. cruzi*. Experimental planning.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -CD	β -ciclodextrina
ΔH_d	Razão entre a entalpia do ponto de fusão do fármaco puro
ΔH_{sam}	Razão entre a entalpia do ponto de fusão da amostra
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ATR	Reflectância total atenuada
ASC	Área sob a curva
AS	Ácido succínico
AF	Ácido fumárico
BNZ	Benznidazol
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C_{eq}	Concentração de saturação do fármaco
DNDi	Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DOE	Desenho estatístico de experimentos
DRX	Difração de raio X
DS	Grau de supersaturação
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria derivativa
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
EI	Eficiência de inclusão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fator de supersaturação
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
HIV/AIDS	Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da imunodeficiência adquirida
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
MX	Malaxagem
NFX	Nifurtimox
POS	Posaconazol
QbD	<i>Quality by design</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Cristalinidade relativa do fármaco
Rs	Resolução
SI	<i>Sink Index</i>
TG	Termogravimetria
T _R	Tempo de retenção

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial Teórico

Figura 1 - Distribuição da doença de Chagas mundialmente.	20
Figura 2 - Ciclo de vida do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> .	21
Figura 3 - Estrutura molecular do fármaco benznidazol.	22
Figura 4 - Número de publicações em relação aos países baseados em sistemas de liberação contendo benznidazol, utilizando a base de dados Scopus.	23
Figura 5 - Estrutura molecular do fármaco posaconazole.	24
Figura 6 - Fármaco POS acoplado à CYP 51 (a) e ligado ao grupo heme do citocromo (b).	25
Figura 7 - Principais formas de ionização do POS de acordo com o pH, obtido por predição teórica. Forma com dois pontos de ionização (1); forma com um ponto de ionização (2); e forma não ionizada (3).	26
Figura 8 - Estratégias mais comuns utilizados para o carreamento de fármacos para o incremento da solubilidade.	27
Figura 9 - Estrutura molecular e diâmetro interno inerentes aos principais tipos de ciclodextrina	28
Figura 10 - Representação das diferentes formas de estado sólido.	29
Figura 11 - <i>Synthons</i> supramoleculares: interações pi-pi (a), ácido-piridina (b), fenol-piridina (c) e ligação de halogênio (d).	30

Artigo 1

Figura 1 - Espectros dos materiais β -CD, POS, MF e MX obtidos por FTIR.	40
Figura 2 - Difractogramas do β -CD, POS, MF e MX.	41
Figura 3 - Imagens dos materiais β -CD, POS, MF e MX obtidas por MEV. Magnitude de 2500x.	41
Figura 4 - Dados de DSC (a), TG e DTG (b) dos materiais.	42
Figura 5 - Cromatogramas do POS (a) e MX (b) bem como o fármaco degradado após ensaio de degradação oxidativa.	44
Figura 6 - Cinética de degradação na ausência e na presença de β -CD sob condições de estresse oxidativo avaliados por zero (a), primeira (b) e segunda (c) ordem.	45
Figura 7. Posaconazol e produtos de degradação obtidos em condições de estresse oxidativo.	46

- Figura 8. Conformações inicial (0 ns) e final (100 ns) baseadas na simulação computacional do POS isolado (a) e complexado (b) com β -CD. Peróxido de hidrogênio e moléculas de água foram ocultadas. 47
- Figura 9. Distância entre moléculas de peróxido de hidrogênio e átomos de nitrogênio do anel piperazínico – N1 (vermelho) e N2 (preto) – antes (a) e depois (b) do estresse oxidativo. 47
- Figura 10. Número de ligações de hidrogênio entre moléculas de peróxido de hidrogênio e átomos de nitrogênio do anel piperazínico – N1 (vermelho) e N2 (preto) – antes (a) e depois (b) do estresse oxidativo. 48
- Figura 11. Perfil de liberação do fármaco utilizando as condições de saturação (a) e supersaturação (b) em tampão fosfato pH 6,8. Linha tracejada relacionada a concentração de equilíbrio. 48
- Figura 12. Atividade antifúngica do POS presente nos materiais MF e MX pelo teste de disco difusão associado a liberação do fármaco POS utilizando as espécies: *Aspergillus niger* (a), *Candida tropicalis* (b) e *Candida parapsilosis* (c). Para análise estatística utilizou-se two-way ANOVA, Bonferroni como *post teste* adotando o nível de significância de $p < 0.05$. * diferença não significativa. 50

Artigo 2

- Figura 1 - Estrutura molecular dos fármacos BNZ (a) e POS (b). 54
- Figura 2 - Perfis para valores previstos e desejáveis. As barras indicam o intervalo de confiança (nível de confiança de 95%). A linha tracejada vertical indica a melhor condição encontrada que se adapta à função desejabilidade para todas as variáveis independentes. 63
- Figura 3 - Cromatograma da solução de BNZ/POS degradado por degradação oxidativa. 64
- Figura 4 - Cromatograma do método utilizado para a validação combinado com a equação da reta obtido por regressão linear. 65

Artigo 3

- Figura 1 - Espectros FTIR das amostras. 73
- Figura 2 - Mapa do potencial eletrostático dos fármacos (a)BNZ, (b) POS, (c)AF e (d) AS. As cores representam as densidades de cargas negativas (vermelho) e positivas (azul). Imagens obtidas utilizando o programa Gaussview. 74

- Figura 3 - Espectro Raman das amostras engobando faixas com bandas características aos materiais: 1300-1500 (a) e 1500-1800 (b,c). 75
- Figura 4 - Imagens dos materiais obtidos após cocristalização. POS:BNZ:AF (a) e POS:BNZ:AS (b). 75
- Figura 5 - Microscopia Raman confocal das análises de acordo com os picos característicos dos materiais obtidos pelo espectro dos cristais POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS. Faixa de frequência utilizadas: 1346-1386 cm^{-1} (a), 1539-1646 cm^{-1} (b), 1666-1712 cm^{-1} (c), 1340-1393 cm^{-1} (d) e 1593-1639 cm^{-1} (e). 77
- Figura 6 - DSC dos fármacos, cofôrmers e cristais obtidos. 77
- Figura 7 - Curva TG dos materiais isolados (a) e dos cristais obtidos (b), bem como a curva DTG (c) das amostras. 79
- Figura 8 - DRX dos materiais utilizados. 79
- Figura 9 - MEV das amostras POS (a,b), BNZ (c,d), POS:BNZ:AF (e, f) e POS:BNZ:AS (g,h). Magnitude de 10000x (a,c,e,g) e 50000x (b, d, f, h). 80
- Figura 10 - Perfis de dissolução dos fármacos isolados bem como nas formas cristalinas formadas, separados em POS (a) e BNZ (b). Meio tampão pH 1,2. 82

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

Tabela 1 - Exemplos de estruturas moleculares de cocristais já desenvolvidos. 31

Artigo 1

Tabela 1 - Ordens cinéticas utilizadas para a análise do perfil de degradação do POS. 37

Tabela 2 - Parâmetros obtidos a partir das cinéticas de reação aplicadas à degradação do POS. 45

Artigo 2

Tabela 1 - Métodos de quantificação dos fármacos BNZ ou POS por CLAE-DAD. 55

Tabela 2 - Variáveis e níveis considerados para otimização do sistema cromatográfico. 58

Tabela 3 - Lote de corridas e resultados utilizando planejamento experimental fatorial completo. 60

Tabela 4. Média estimada dos efeitos a partir da influência de cada fator independente e suas interações de segunda ordem nas respostas obtidas a partir da análise dos resultados a partir do planejamento fatorial completo. Fatores de influência ($p > 0,05$) estão em negrito. 61

Artigo 3

Tabela 1 - Modelos cinéticos utilizados para avaliação da liberação dos fármacos POS e BNZ. 72

Tabela 2 - Temperaturas iniciais ($T_{inicial}$), finais (T_{final}) e a de máxima ($T_{pico\ máx.}$) bem como a entalpia envolvida (ΔH) no perfil térmil das amostras. 78

Tabela 3 - Cinética de liberação dos fármacos POS e BNZ isolados e a partir dos cristais obtidos. 83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	19
2.2 DOENÇA DE CHAGAS.....	20
2.3 BENZNIDAZOL	22
2.4 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	23
2.5 POSACONAZOL.....	24
2.6 ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO DE SOLUBILIDADE	26
2.7 CICLODEXTRINA (CD).....	27
2.8 ENGENHARIA DE CRISTAIS	29
2.9 DESEMPENHO DE DISSOLUÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	32
3 DESENVOLVIMENTO: MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1 ARTIGO 1 - INFLUÊNCIA DA CICLODEXTRINA NA ESTABILIDADE, LIBERAÇÃO E ATIVIDADE DO POSACONAZOL: MELHORANDO A UTILIDADE DO FÁRMACO.....	34
3.2 ARTIGO 2 - QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE BENZNIDAZOL E POSACONAZOL POR CLAE-DAD UTILIZANDO FERRAMENTA DE <i>QUALITY BY DESIGN</i>	54
3.3 ARTIGO 3 - DESENVOLVIMENTO DE NOVOS CRISTAIS POSACONAZOL: BENZNIDAZOL PARA O INCREMENTO DE SOLUBILIDADE E VELOCIDADE DE DISSOLUÇÃO.....	70
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE.....	92
APÊNDICE B - TRABALHO APRESENTADO NO XII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO (CONNEPI).....	113

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas correspondem a um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países. Elas afetam mais de um bilhão de pessoas e custam bilhões de dólares a economias em desenvolvimento por ano, isto porque existem populações vivendo na pobreza, sem saneamento adequado e em contato próximo com vetores infecciosos e animais domésticos e gado são os mais afetados. Dentre estas doenças, há a doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2017a).

Atualmente, a utilização do benznidazol (BNZ) é o tratamento de primeira linha para doença de Chagas, mesmo lançado a mais de 40 anos, e somente em 2017 tal fármaco foi aprovado para o tratamento em crianças entre 2 e 12 anos. No entanto, o tratamento com BNZ promove efeitos adversos desagradáveis como hipersensibilidade, *rashes* cutâneos, desconforto gastrointestinais e supressão da medula óssea o que prejudica a adesão do paciente ao tratamento (BERMUDEZ et al., 2016; FDA, 2017).

Com base nisto, muitas estratégias têm sido avaliadas a fim de alcançar um novo tratamento contra o parasita *T. cruzi* como o estudo de novos alvos biológicos (CAZZULO, 2002; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011), sistemas de liberação (SOARES-SOBRINHO et al., 2012) e síntese de protótipos (SOARES-SOBRINHO et al., 2012). Entretanto, o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo lento e caro, visto isso, a iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) tem incentivado o reposicionamento ou redirecionamento de fármacos, que consiste em encontrar novas funcionalidades, fora do escopo da indicação médica original, para fármacos já aprovados, oferecendo uma melhor perspectiva sobre o risco-recompensa (ASHBURN; THOR, 2004; KAISER et al., 2015). O principal objetivo é a redução de custos e tempo a fim de fornecer um substituto ao BNZ tóxico (MORILLA; ROMERO, 2015).

Dentre os fármacos propostos para o reposicionamento, destacam-se os pertencentes à classe dos antifúngicos azóis para uso auxiliar ao benznidazol, como o fármaco posaconazol (POS). O mecanismo de ação contra o *Trypanosoma cruzi* se deve à inibição da enzima esterol 14- α -demetilase ou citocromo P51 (CYP 51), importante para a síntese do colesterol alterando a permeabilidade da membrana celular do parasita, levando-o à morte. Além disso, os efeitos adversos possuem maior tolerabilidade comparado aos do benznidazol, como: náuseas, dores de cabeça e abdominal, vômitos e diarreia. Isto se deve ao fato da pequena similaridade entre a

CYP51 dos humanos e do parasita, que é próximo de 25%, incapaz de causar a inibição nos primeiros (LEPECHEVA; VILLALTA; WATERMAN, 2011; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

Acerca disto, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação envolvendo os fármacos BNZ e POS é o foco principal desta pesquisa. Esta visou avaliar, inicialmente, as propriedades do POS a fim de alcançar um sistema para o incremento de solubilidade deste. Além disso, desenvolver método de quantificação simultânea de POS:BNZ com o intuito de dosear futuros sistemas desenvolvidos a partir de engenharia de cristais, Tais abordagens, tem por fim apresentar um novo sistema com potencial utilização para a terapia antichagásica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de sistemas de liberação utilizando os fármacos posaconazol (POS) e benznidazol (BNZ), a fim de alcançar uma terapia combinada com propriedades para tratamento das fases aguda e crônica da doença de Chagas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver complexo de inclusão a partir de β -ciclodextrina (β -CD) e posaconazol caracterizando por técnicas analíticas, tais como: espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raio X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG).
- Avaliar a estabilidade oxidativa do fármaco POS na ausência e na presença de β -CD, assistida por simulação computacional.
- Efetuar o estudo de liberação em condições saturadas e supersaturadas do fármaco correlacionando com estudo de atividade antifúngica *in vitro*.
- Desenvolver um método de quantificação simultânea dos fármacos BNZ e POS por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado ao detector com arranjo de fotodiodo (DAD, *diodo array detector*) utilizando ferramentas de planejamento experimental.
- Desenvolver cristais por técnica de cocristalização.
- Determinar o tipo de cristais desenvolvidos por técnicas analíticas, tais como: FTIR, DRX, MEV, espectroscopia Raman, DSC e TG.
- Avaliar o desempenho de dissolução dos novos cristais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo diverso de doenças transmissíveis que afetam mais de um bilhão de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento (AERTS et al., 2017). De acordo com OMS (2017), 20 doenças fazem parte deste grupo e são elas: dengue e chikungunha; doença de Chagas (triplanossomíase humana americana); raiva; tracoma; úlcera de buruli; leishmaniose; lepra (hanseníase); filariose; doença do sono (triplanossomíase humana africana); esquistossomose; equinococose; teníase e cisticercose; drancunculíase (doença do verme da Guiné); trematodíases transmitidas por alimentos; micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas; oncocercose (cegueira dos rios); sarna e outros ectoparasitas; helmintíases transmitidas pelo solo; envenenamento de picada de cobra; e bouba (treponematoses endêmicas).

Segundo a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas ou *Drug for Neglected Disease initiative* (DNDi, 2014), as doenças negligenciadas atingem mais de 1 bilhão de pessoas, dentre elas 500 milhões de crianças, ainda sofrem de doenças das quais não há tratamentos adequados disponíveis. Elas podem manter pacientes acamados e improdutivos por semanas ou meses, muitos chegando a óbito, perpetuando a pobreza. Os mais carentes – especialmente mulheres e crianças da África, Ásia e América Latina – que sobrevivem com um ou dois dólares por dia são os mais atingidos.

Apesar de sua grande carga de doenças, elas foram amplamente ignoradas no debate sobre a política global de saúde até recentemente. As DNTs impedem o desenvolvimento econômico, causam incapacidade crônica ao longo da vida e prejudicam o desenvolvimento infantil em comunidades pobres e marginalizadas, nas quais elas são mais prevalentes. De acordo com a medida em anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYs), este grupo de doenças representa um dos mais sérios ônus da saúde pública global, com destaque para malária e tuberculose (LIESE; ROSENBERG; SCHRATZ, 2010).

Há pouco incentivo para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de tratamentos melhores ou inteiramente novos para as DNTs. Os tratamentos atualmente disponíveis podem ser muito caros ou não adequados às necessidades médicas dos pacientes, ou, até mesmo, inexistentes em alguns casos. De acordo com Pedrique e colaboradores (2013), de 850 novos produtos terapêuticos aprovados entre 2000 e 2011, somente 4% deles foram direcionados a doenças

negligenciadas, dos quais a grande maioria corresponde a vacinas, caindo para 1% no que se refere a novas entidades químicas.

2.2 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma DNT causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* e corresponde a uma zoonose identificada primeiramente pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909, o qual descreveu todo o ciclo de vida do parasita, vetores, animais e humanos que atuam como hospedeiros reservatórios. Ela é considerada uma das doenças mais prevalentes e negligenciadas no mundo e ocorre, principalmente, na América Latina (Figura 1) com cerca 5,7 milhões de infectados em 21 países da região e aproximadamente 7 mil mortes por ano. Mais recentemente, ela também emergiu em algumas regiões do sul dos EUA, conferindo uma séria carga de doenças, fig. 2 (GASPAR et al., 2018; SALOMON, 2012).

Figura 1 - Distribuição da doença de Chagas mundialmente.

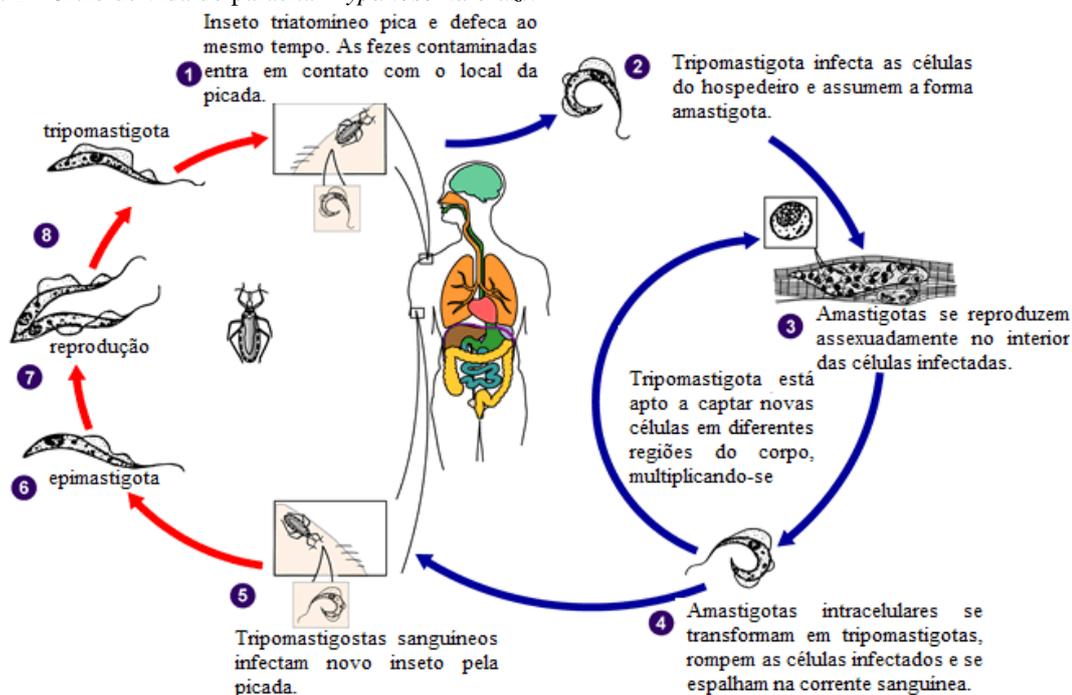


Fonte: Adaptado de DNDI (2018).

O complexo ciclo de vida do *T. cruzi* envolve hospedeiros vertebrados (humanos e outros mamíferos) e invertebrados (vetor de triatomíneos), Figura 2, e podem ser separados em três estágios morfológicos distintos: dois estágios replicativos, os epimastigotas flagelados (6), encontrados no vetor triatomíneo, e os amastigotas (3), que crescem e se multiplicam dentro das células hospedeiras dos mamíferos. Ambos os estágios replicativos podem originar a forma flagelada não-replicativa, mas infecciosa, o tripomastigota (2). Este último é transmitido pelo

vetor triatomíneo e é responsável por invadir células de mamíferos e perpetuar a infecção (MORAES; FRANCO, 2016).

Figura 2 - Ciclo de vida do parasita *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de CDC (2018).

A transmissão pode ocorrer por via oral através de alimentos contaminados, transmissão congênita, transplante de órgãos ou transfusão de sangue infectados e acidentes laboratoriais (DNDI, 2018).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda dura cerca de dois meses com alta parasitemia e pode ser oligossintomática, apresentando sintomas como febre, reações alérgicas e linfadenopatia, ou assintomática. Cerca de 20 a 30 % evoluem para a fase crônica, geralmente décadas depois, os parasitas ficam escondidos no interior dos tecidos, especialmente cardíaco e muscular do sistema digestório, causando cardiomegalia (maioria das vezes), megaesôfago e/ou megacólon, por exemplo. Esta doença pode ser mais severa em crianças < 5 anos de idade, pacientes imunocromprometidos (principalmente os acometidos por HIV/AIDS), idosos e indivíduos infectados com um elevado número de parasitas (DAVANÇO et al., 2016; GASPAR et al., 2018)

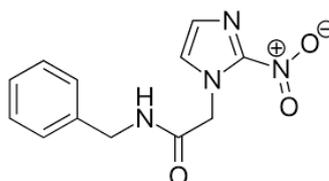
Mesmo que a doença tenha sido descoberta a mais de 100 anos, ainda há a falta de formulações adequadas para o tratamento. Existem somente dois fármacos disponíveis especificamente para a Doença de chagas, são eles: benznidazol (BNZ) e nifurtimox (NFX). O

benznidazol, fármaco lançado pela Roche (Rodanil ®) em 1972 e no Brasil é produzido pelo Laboratório Farmacêutico Pernambucano (LAFEPE), é o fármaco de primeira linha e único tripanocida aprovado no Brasil (LEONARDI; SALOMON, 2012; LIMA et al., 2011; SILVA et al., 2009).

2.3 BENZNIDAZOL

O fármaco BNZ, N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida (Figura 3) possui a capacidade de promover a formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos pois o grupo nitro (-NO₂) é reduzido a amino (-NH₂) por enzimas nitrorredutase. Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase, leva à formação de um intermediário nitro radicalar (R-NO₂) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). O radical nitro formado está envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* (e.g., DNA e citocromo P450). Desta forma, há o aumento da fagocitose e a lise do *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama (IFN- γ), e a inibição do crescimento do *T. cruzi* através da enzima NADH-fumarato redutase. No entanto, por ter elevada reatividade, o BNZ pode ter efeitos danosos no hospedeiro (SILVA et al., 2009).

Figura 3 - Estrutura molecular do fármaco benznidazol.



Fonte: Acervo próprio.

A baixa solubilidade em água (0,4 mg/mL) do BNZ combinada à alta dosagem de tratamento (5-7 mg/kg para adultos e 10 mg/kg para crianças) por um longo período de tempo (60 dias) desencadeia uma série de efeitos adversos que incluem hipersensibilidade à luz, supressão da medula óssea (trombocitopenia, neutropenia e agranulocitose), linfadenopatia e neuropatia periférica. Como consequência disso, muitas vezes o tratamento é descontinuado (BERMUDEZ et al., 2016; MORILLA et al., 2004).

Além disso, BNZ é efetivo no início da fase aguda e crônica e em infecções congênitas, chegando a 80% de cura na fase aguda e 5 a 20% na fase crônica. Isto porque o BNZ não

consegue adentrar seletivamente nos tecidos afetados, uma vez que após a absorção intestinal, o BNZ liga-se a proteínas plasmáticas, glóbulos vermelhos e distribui-se em muitos tecidos, impossibilitando a erradicação das formas amastigotas (LIMA et al., 2011; MORILLA et al., 2004; SALOMON, 2012). Assim, faz-se necessário estratégias terapêuticas mais eficazes bem como o estímulo a pesquisas científicas na área uma vez que este ainda é precário e concentrado em países latinos (Figura 4).

Figura 4 - Número de publicações em relação aos países baseados em sistemas de liberação contendo benznidazol, utilizando a base de dados Scopus.



Fonte: Base de artigos Scopus.

2.4 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

O reposicionamento de fármacos é o processo de descobrir, validar e comercializar medicamentos previamente aprovados para outras indicações. O campo de reposicionamento de medicamentos está crescendo rapidamente, devido à promessa de reduzir custos e agilizar os cronogramas de aprovação (BROWN; PATEL, 2017).

Este método pode ser usado como uma abordagem para encurtar o caminho da pesquisa e desenvolvimento, pois a farmacocinética e a farmacodinâmica dos fármacos já estão bem estabelecidas. Isso os torna aceitáveis para as autoridades de saúde reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA). Portanto, quando um novo uso terapêutico é identificado para uma molécula conhecida, pode progredir rapidamente para ensaios clínicos, encurtando o tempo de validação experimental, e com mais probabilidade de sucesso no mercado

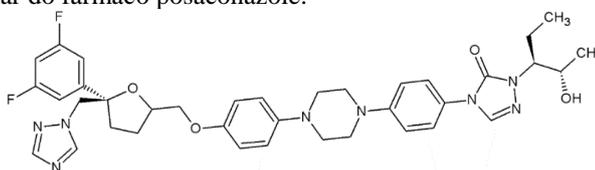
farmacêutico do que a síntese de novos ativos. Como exemplo bem sucedido de reposicionamento de fármacos, o ativo sildenafil, inicialmente concebido para o tratamento da hipertensão e da doença isquêmica do coração, foi posteriormente aprovado para o tratamento da disfunção erétil (PALOS et al., 2017).

Uma possível alternativa de reposicionamento para a terapia antichagásica é o fármaco antifúngico posaconazol (POS). Esse é um potente inibidor da biossíntese do ergosterol que é essencial para a construção da parede celular do parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, mostrando significativa atividade antiparasitária *in vitro* e *in vivo* (FRANCISCO et al., 2015; MORILLA; ROMERO, 2015).(MORILLA; ROMERO, 2015).

2.5 POSACONAZOL

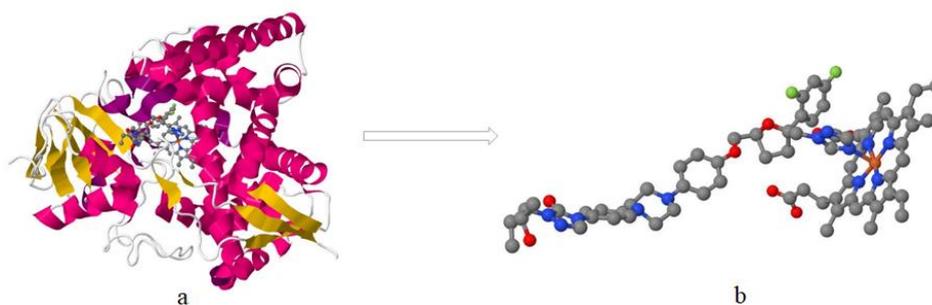
O fármaco POS (massa molecular 700,8 g/mol), Figura 5, é um potente antifúngico da classe dos triazóis, análogo ao itraconazol, possui amplo espectro de ação. Sua ação se dá pela inibição da enzima esterol 14 α -desmetilase (citocromo P51 ou CYP 51), Figura 6a, por interagir principalmente com o grupo heme da proteína, Figura 6b. Tal citocromo é responsável pela manutenção da membrana celular dos fungos, possuindo atividade antifúngica contra espécies de *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Coccidiomyces* spp., *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Histoplasma* spp. e *Cryptococcus* spp (HENS et al., 2016; LEUNG; POULAKOS; MACHIN, 2015). Comparado a azóis mais antigos (fluconazol, itraconazol e voriconazol), o POS tem um perfil de segurança mais favorável, com menos efeitos adversos associados (MOORE; HEALY; KRAFT, 2015).

Figura 5 - Estrutura molecular do fármaco posaconazole.



Fonte: Acervo próprio.

Figura 6 - Fármaco POS acoplado à CYP 51 (a) e ligado ao grupo heme do citocromo (b).



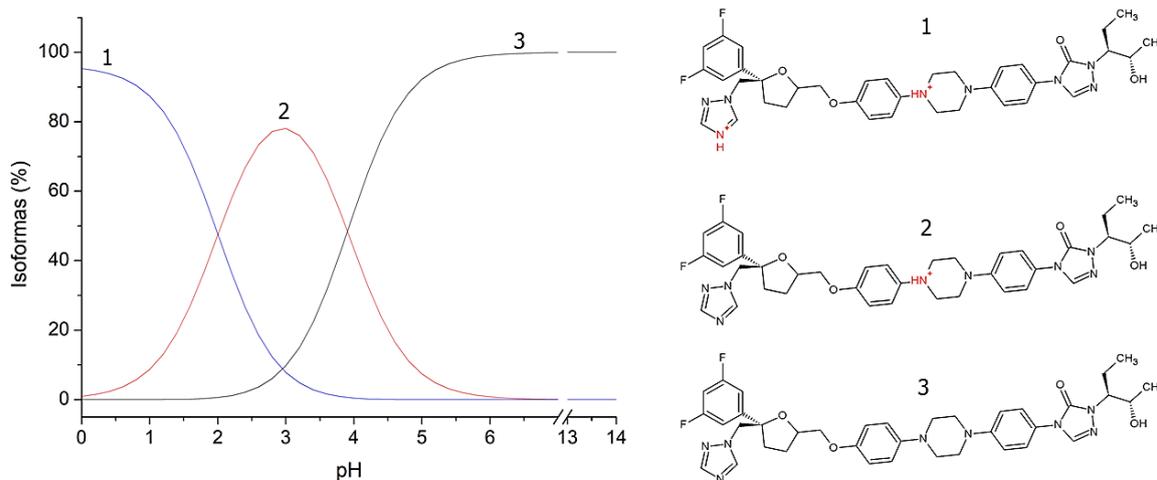
Fonte: Adaptado de LEPESHEVA et al. (2010), PDB ID 3K1O.

Além de sua atividade antifúngica, pesquisas comprovam também a atividade do POS contra *Trypanosoma cruzi*, com excelente atividade em modelos animais (FRANCISCO et al., 2015). Tal fármaco é considerado um bom candidato para o tratamento de formas amastigotas intracelulares das formas T. Cruzi devido ao seu mecanismo de ação e seu perfil farmacocinético favorável. Assim, o fármaco possui promissora atividade na fase crônica do parasita, na qual não existe tratamento satisfatório disponível. Além disso, a associação de POS pode produzir ação sinérgica com o BNZ para promoção de uma combinação terapêutica com maior ação anti-chagásica. Isto porque, o POS é metabolizado no fígado pelas enzimas CYP 3A4, se ligando com mais afinidade a elas do que o BNZ, inibindo a metabolização deste, permitindo que sua concentração permaneça por mais tempo no organismo (DA SILVA et al., 2012; DINIZ et al., 2013).

Terapias combinadas para o tratamento da doença de Chagas têm sido cada vez mais defendidas como uma forma de melhorar a eficácia e a tolerância do tratamento. O consenso tem crescido a favor do uso de esquemas combinados para doenças infecciosas nos últimos anos por várias razões. A combinação de drogas de diferentes classes químicas poderia reduzir as doses dos medicamentos e/ou a duração do tratamento, resultando em menos efeitos colaterais. Essa estratégia também pode reduzir os custos gerais, oferecendo uma opção mais econômica. Por fim, a terapia combinada poderia melhorar a eficácia do tratamento de infecções agudas por T. cruzi, com risco de vida, em humanos, como as de pacientes chagásicos, congênitos ou reativos da doença de Chagas (MARTINS et al., 2015).

No mercado, o POS existe na forma de suspensão oral (Noxafil®) com a dosagem de 40 mg/mL, o qual deve ser tomada junto a alimentação para maximizar a absorção sistêmica pois o fármaco alcança maiores concentrações no pH ácido devido às suas propriedades fracamente básicas (pKa 3,6 e 4,6), apresentando a sua forma de maior ionização (FULE; AMIN, 2014), Figura 7.

Figura 7 - Principais formas de ionização do POS de acordo com o pH, obtido por predição teórica. Forma com dois pontos de ionização (1); forma com um ponto de ionização (2); e forma não ionizada (3).



Fonte: Marvin Scketch 16.11.7.

Apesar da elevada potencia, a alta lipossulubilidade ($\text{Log } P > 3$; solubilidade $< 1 \mu\text{g/mL}$ em água) é um entrave para a absorção do POS. Ele é classificado como Classe II (Sistema de Classificação Biofarmacêutica), indicando reduzida solubilidade e elevada permeabilidade (MOORE; HEALY; KRAFT, 2015). Desta forma, há a necessidade do incremento de solubilidade do POS a fim de melhorar a dissolução em solução aquosas e, conseqüentemente, a biodisponibilidade deste.

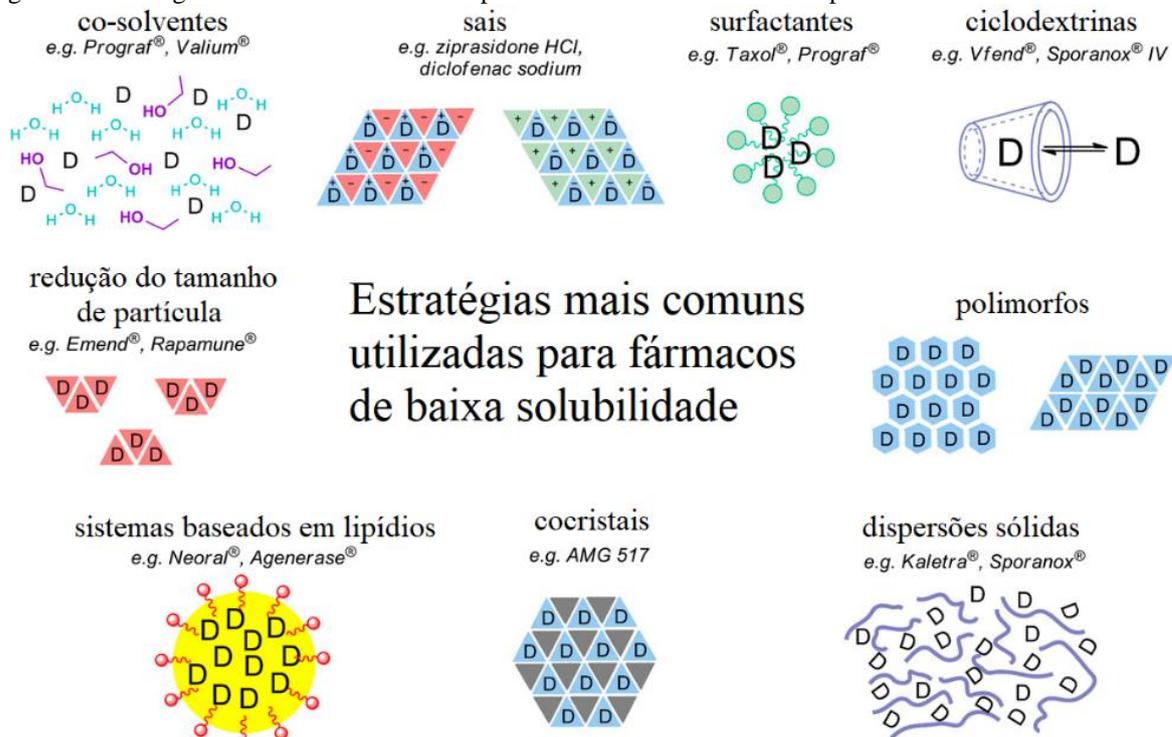
2.6 ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO DE SOLUBILIDADE

Entre numerosos desafios das formulações farmacêuticas, o mais importante está relacionado ao incremento de solubilidade dos fármacos hidrofóbicos, os quais correspondem a 40% de novos ativos farmacêuticos. Fármacos fracamente solúveis em água, com uma absorção lenta do fármaco, conduzem a uma biodisponibilidade inadequada e variável e à toxicidade mucosal gastrointestinal, quando administrados por via oral (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; VIMALSON et al., 2016).

Muitas estratégias têm sido empregadas a fim de aumentar a biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade correspondendo a um dos aspectos mais desafiadores do processo de desenvolvimento de medicamentos, especialmente para sistemas de liberação oral de fármacos. Para isso, diversas técnicas são utilizadas para tal finalidade, as quais variam de acordo com as propriedades do fármaco em estudo, natureza dos excipientes e da natureza da

forma farmacêutica pretendida, (SAREEN; JOSEPH; MATHEW, 2012; WILLIAMS et al., 2013), Figura 8.

Figura 8 - Estratégias mais comuns utilizados para o carregamento de fármacos para o incremento da solubilidade.



Fonte: Adaptado de WILLIAMS et al. (2013).

As técnicas de incremento da solubilidade aquosa podem ser categorizadas em modificações físicas, químicas, entre outras técnicas. Dentre elas estão a redução de tamanho (nanoemulsões, nanocristais,...), alterações no hábito cristalino (polimorfos, cocristais, misturas eutéticas, amorfização), ionização de fármacos, complexação de ciclodextrinas, pró-fármaco, etc, Figura 8.

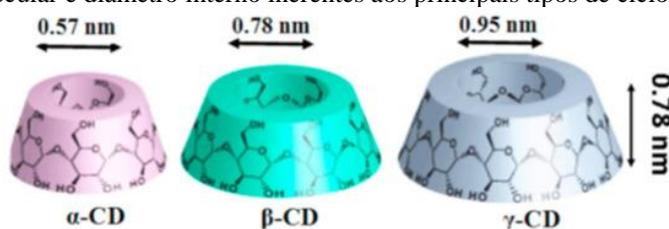
2.7 CICLODEXTRINA (CD)

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos constituídos de seis, sete ou oito unidades de (α -1,4) -D-glicopiranosose, dando origem a α -, β - (mais utilizada) e γ - ciclodextrina, respectivamente, Figura 9. São considerados excipientes farmacêuticos que podem solubilizar fármacos pouco solúveis através da formação de complexos droga-ciclodextrina solúvel em água. Isso porque sua cavidade interna possui característica lipofílica na qual o fármaco pode ser inserido sem haver, no entanto, o surgimento ou a quebra de ligações covalentes, o que facilita a dissociação do complexo de inclusão em solução aquosa, proporcional à força de

interação entre os componentes. Além disso, possui favorável toxicidade em comparação com outros excipientes farmacêuticos, tais como surfactantes, alguns polímeros solúveis em água e solventes orgânicos, sendo listadas na FDA (*Food and Drug Administration*) como seguras (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

Por apresentar um baixo coeficiente de partição octanol/água (Log P aproximadamente entre -3 e 0) e grande número de doadores e aceptores de hidrogênio, a CD não é capaz de permear através de membranas biológicas, não sendo absorvida pelo trato gastrointestinal (SHERJE et al., 2017).

Figura 9 - Estrutura molecular e diâmetro interno inerentes aos principais tipos de ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado Narayanan e colaboradores (2018).

A encapsulação molecular apresenta sucesso ao alterar propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de muitos fármacos, tais como irritação, volatilização, estabilidade, solubilidade e dissolução, conduzindo ao melhoramento das formulações bem como a biodisponibilidade das mesmas. Isso reflete o considerável aumento de medicamentos disponíveis no mercado utilizando tal excipiente, como é o caso do variconazol (Vfend®), itraconazol (Sporanox®), piroxicam (Brexin®), nimesulida (Nimedex®), entre outros (LIN et al., 2012; LOFTSSON et al., 2005).

As ciclodextrinas podem contribuir no planejamento e na eficácia do carregamento de ativos farmacêuticos, promovendo a dispersão dos fármacos na forma amorfa, não somente através de mecanismos associados a interações inclusivas e não inclusivas, mas também à tendência de supersaturação dos fármacos dissolvidos bem como na estabilização das soluções supersaturadas formadas. Tais propriedades proporcionam vantagens acerca da biodisponibilidade oral dos fármacos lipossolúveis (LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

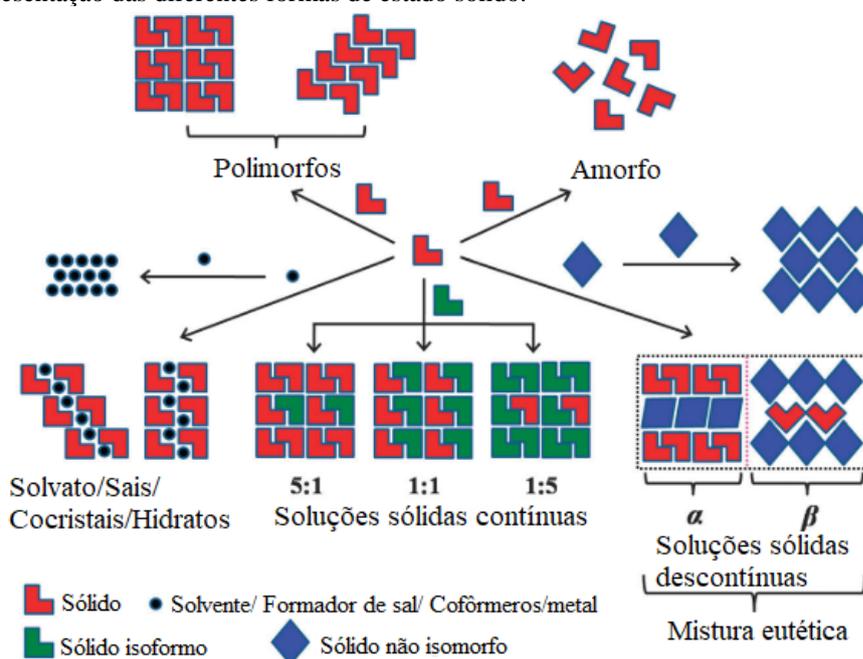
Atualmente, existem várias técnicas para a obtenção dos complexos de inclusão, como: coprecipitação, *slurry*, malaxagem, liofilização, *spray drying*, entre outros. Dentre eles, o mais comum, simples e de baixo custo é a malaxagem (ASTRAY et al., 2009; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

2.8 ENGENHARIA DE CRISTAIS

A química supramolecular definida com “química além da molécula” é uma organização de entidades resultantes da associação de duas ou mais espécies químicas unidas por interações não covalentes. Ela é classificada em duas grandes categorias: engenharia de cristais (em estado sólido) e reconhecimento molecular (em solução). A engenharia de cristais é definida como o entendimento de interações intermoleculares no arranjo cristalino para o desenvolvimento de novos cristais com propriedades físicas e químicas desejadas (GADADE; PEKAMWAR, 2016).

Os cristais podem ser formados por um simples componente, como os fármacos amorfos e polimorfos, ou multicomponentes (estequiométricos ou não), como os sais, cocristais, misturas eutéticas, soluções sólidas, hidratos e solvatos os quais dependem da natureza dos componentes e dos tipos de interação entre eles (CHERUKUVADA; ROW, 2014; DUGGIRALA et al., 2016), Figura 10.

Figura 10 - Representação das diferentes formas de estado sólido.



Fonte: Adaptado de Cherukuvada & Nangia (2014).

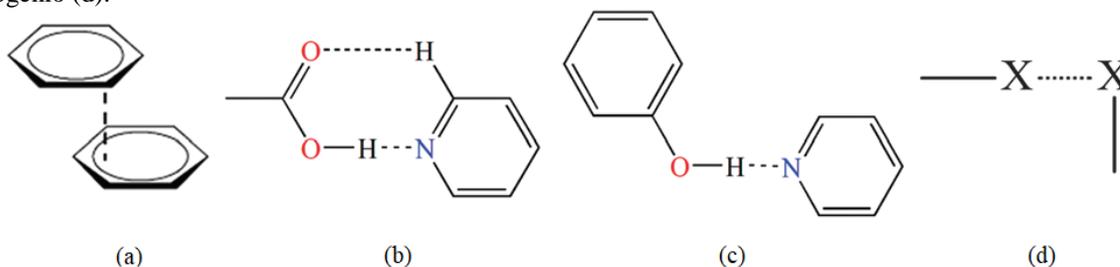
A motivação para criação de novas formas sólidas de moléculas de fármacos é uma consequência da importância destas formas para o desempenho de medicamentos administrados, cujo “coração” é quase sempre um sólido cristalino. É importante notar que os sólidos amorfos também foram desenvolvidos para utilização em produtos farmacêuticos, mas a necessidade de satisfazer as especificações em termos de estabilidade termodinâmica, pureza

e processamento significa que o fármaco cristalino é geralmente preferido. Isto porque propriedades físico-químicas de uma forma cristalina são inerentemente dependentes da composição e do empacotamento das moléculas/íons, assim, exercer o controle sobre tais fatores poderia, por sua vez, levar ao controle das propriedades. É neste contexto que a pesquisa de engenharia de cristais foi iniciada quanto aos cocristais farmacêuticos, com o intuito de melhorar a estabilidade e/ou a solubilidade de substâncias medicamentosas (DUGGIRALA et al., 2016).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA, 2016), cocristais são materiais cristalinos compostos de duas ou mais moléculas diferentes, tipicamente fármaco e formadores de cocristais ou cofôrmers, na mesma rede cristalina. Geralmente, os cofôrmers utilizados são componentes inertes, sem atividade farmacológica, e devem apresentar forma neutra, compatível com o fármaco, para a formação do cocrystal, uma vez que eles devem interagir de forma não iônica. Assim, quando ΔpK_a ($pK_{a(\text{base})} - pK_{a(\text{ácido})}$) ≥ 1 , existirá substancial transferência de prótons resultando na ionização para formação de um sal, ao contrário de cocrystal. Por outro lado, se este resultado for inferior a 1, existirá menor transferência de prótons, com maior probabilidade de formação do cristal desejado.

Além disso, é importante que os fármacos possuam grupos funcionais capazes de interagir com cofôrmers criando *synthons* supramoleculares (Figura 11) que correspondem a arranjos espaciais de interações intermoleculares baseados na complementariedade dos grupos funcionais, sendo classificados como *homosynthons* (entre grupos semelhantes) e *heterosynthons* (entre grupos distintos). Tais *synthons* comumente são formados por interações: de hidrogênio, pi-pi, van der Waals e de halogênio (SHIRVANI et al., 2015)(NONAPPA et al., 2013; SATHISARAN; DALVI, 2018).

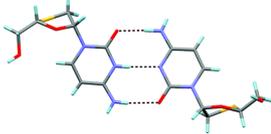
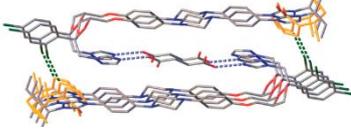
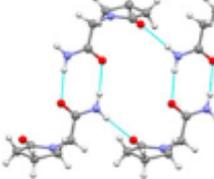
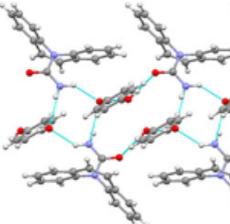
Figura 11 - *Synthons* supramoleculares: interações pi-pi (a), ácido-piridina (b), fenol-piridina (c) e ligação de halogênio (d).



Fonte: Adaptado de Saha & Desiraju(2016).

Quando estas interações se dão pela combinação de forma heteromolecular, diz-se que estas são adesivas, e as de forma homomolecular são coesivas. Se as interações coesivas forem mais fortes do que as adesivas, a cristalização conduzirá para a formação de misturas eutéticas ou soluções sólidas. Isto porque ocorrerá a inclusão do menor componente de forma substitucional ou intersticial no maior componente, sem modificar o perfil cristalino dos materiais. No entanto, se as adesivas forem mais fortes, haverá a provável formação de cocristais com a miscibilidade entre os componentes, modificando o arranjo cristalino destes (CHERUKUVADA; NANGIA, 2014; CHERUKUVADA; ROW, 2014). Exemplos de cocristais estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de estruturas moleculares de cocristais já desenvolvidos.

Cocristais	Estrutura molecular	Referência
Lamivudina:Zidovudina (1:1)		(BHATT et al., 2009)
Itraconazol:ácido succínico (2:1)		(NONAPPA et al., 2013)
Carbamazepina: hidroquinona (1:1)		(AITIPAMULA; CHOW; TAN, 2011)
Piroxicam: hidroquinona (2:1)		

Fonte: Autoria própria.

Para a obtenção dos cocristais, ou cocrystalização, alguns métodos podem ser utilizados, tais como: evaporação de solvente, moagem no estado sólido, moagem assistida por líquido, *slurry*, cristalização por fusão, cristalização por spray, fluido supercrítico, entre outros. Dentre eles, a moagem assistida por líquido (*liquid assisted grinding* - LAG) é a mais utilizada por ser considerada o método mais eficiente para a formação de cocristais. A técnica envolve a adição

de pequena quantidade de solvente aos sólidos secos, antes do início da moagem, e deve persistir ao longo do processo (KARIMI-JAFARI et al., 2018).

Diante disso, como os cocristais são uma nova forma cristalina, eles possuem vantagens regulatórias práticas particulares que têm uma base científica sólida. A combinação e ligações químicas fármaco-cofôrmere de forma estequiométrica, distinguindo-os da mistura física simples, satisfaz os requisitos de novidade. Além disso, as melhorias na solubilidade, velocidade de dissolução, biodisponibilidade e estabilidade do fármaco, oferecem evidências efetivas de utilidade e aplicação industrial de cocristais (GADADE; PEKAMWAR, 2016).

2.9 DESEMPENHO DE DISSOLUÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

É importante não confundir solubilidade e dissolução. A solubilidade corresponde a um parâmetro termodinâmico em que a entropia e a entalpia são fatores importantes para se determinar a espontaneidade do processo, em que as interações entre soluto-solvente é mais forte que soluto-soluto, até a mistura alcançar o estado de equilíbrio dinâmico. A velocidade com que isso ocorre se refere ao fenômeno cinético conhecido como dissolução. Ambos os fatores são importantes para o efeito terapêutico esperado, uma vez que o fármaco precisa estar em solução para ser absorvido (BABU; NANGIA, 2011).

Embora tenham sido desenvolvidas muitas opções inovadoras para o carregamento de fármacos de baixa solubilidade, novos e confiáveis testes *in vitro* como predição da dissolução *in vivo*, a precipitação e/ou absorção do fármaco a partir destas formulações necessitam de desenvolvimento adicional. A dissolução tradicional usando o equipamento de pá ou cesto é normalmente utilizada para avaliar a qualidade do produto e prever mudanças na liberação do fármaco que podem afetar o desempenho *in vivo* dos produtos orais, mas não mudou radicalmente desde a década de 1970. As limitações da abordagem tradicional da dissolução são de particular relevância para drogas de baixa solubilidade com suas propriedades biofarmacêuticas desafiadoras (KOSTEWICZ et al., 2014).

Uma estratégia atrativa para melhorar a biodisponibilidade oral é a utilização de uma formulação que cria supersaturação no ambiente gastrointestinal. Se as concentrações do fármaco forem mantidas muitas vezes superiores à solubilidade termodinâmica durante um período de tempo suficiente, pode esperar-se uma absorção e permeação melhorada. Aliado a isso, existe a necessidade reduzida de incorporar grandes quantidades de excipientes que

melhoram a solubilidade, o que pode resultar num perfil de toxicidade mais baixo do veículo (MELLAERTS et al., 2008).

De acordo com Beverage e colaboradores (2013), a avaliação *in vitro* da supersaturação envolve essencialmente a indução da supersaturação no meio de interesse e a avaliação das concentrações do fármaco em solução em função do tempo (C_t). Neste caso, a concentração do fármaco pode ser expressa em relação à solubilidade ou concentração de equilíbrio ou saturação (C_s) como o grau de supersaturação (DS) ou o índice de supersaturação (σ), expressa a seguir na Eq. (1):

$$DS = \frac{C_t}{C_s} \quad (1)$$

A quantificação da supersaturação permite identificar a extensão da saturação (DS <1: subsaturada, DS = 1: saturada, DS > 1: supersaturada) como uma medida da tendência termodinâmica para a precipitação. Além disso, a inclusão de excipientes farmacêuticos, tais como polímeros, surfactantes e ciclodextrinas, que retardam a precipitação pode estabilizar a supersaturação *in vitro*. A potencial capacidade de inibição da precipitação de um excipiente pode ser expressa como o fator de ganho de excipiente, representando o aumento na AUC da curva da dissolução na condição supersaturada alcançado com a sua inclusão (BEVERNAGE et al., 2011, 2013).

Os ensaios de dissolução *in vitro*, em que se objetiva avaliar o desempenho das formulações em desenvolvimento antes de realizar os estudos em animais, devem ser desempenhados em condição supersaturada ou não-sink, a qual permite a visualização dos eventos de supersaturação, nucleação e cristalização do fármaco em solução, além de ser uma simulação do sistema fisiológico mais adequada do que a condição subsaturada ou sink (concentração do fármaco mantida, pelo menos, três a cinco vezes menor que a sua solubilidade) devido ao pequeno volume encontrado no trato gastrointestinal. O cálculo do *Sink Index* (SI) leva em consideração a concentração de saturação do fármaco no meio de dissolução (C_s), o volume a ser utilizado no meio de dissolução (V) e a dose do fármaco presente na formulação a ser testada, representada na Eq. (2). Para a obtenção de uma condição sink, o SI deve ser maior que 10, equivalente ao número de vezes acima da solubilidade de equilíbrio (SUN; JU; LEE, 2012).

$$SI = \frac{C_s \times V}{\text{dose}} \quad (2)$$

3. DESENVOLVIMENTO: MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ARTIGO 1: INFLUÊNCIA DA CICLODEXTRINA NA ESTABILIDADE, LIBERAÇÃO E ATIVIDADE DO POSACONAZOL: MELHORANDO A UTILIDADE DO FÁRMACO

3.1.1 Introdução

As aplicações farmacêuticas de ciclodextrinas (CD) naturais (α -, β - e γ -) e seus derivados têm sido utilizadas para aumentar a solubilidade, melhorar as propriedades organolépticas, aumentar a permeação e estabilidade dos fármacos, resultando em maior vida útil do produto e biodisponibilidade dos fármacos. Em comparação a outros excipientes, os CDs apresentam biocompatibilidade além de serem capazes de reduzir a toxicidade de vários medicamentos (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; VYAS; SARAF; SARAF, 2008).

Em alguns casos, um aumento na estabilidade química é também observado após a adição de CDs a formulações de fármacos, conforme descrito por Pourmokhtar e Jacobson (2005), os quais relataram aumento da meia-vida do sulfametoxazol e trimetoprima quando os mesmos foram submetidos a estresse oxidativo em presença da CD. No entanto, Hong, Shah, Mcgonagle (2011) realizaram estudo comparativo sobre os efeitos de vários derivados β -CD sobre a degradação oxidativa da ziprasidona evidenciando como o comprimento da cadeia lateral e a tendência à doação de elétrons podem afetar o efeito catalítico da complexação fármaco-CD, na seguinte ordem de degradação : CEbCD> SBEbCD> HPbCD> RMbCD> β -CD .

O fármaco posaconazol (POS) é um potente antifúngico da classe dos triazóis, análogo ao itraconazol, possui amplo espectro de ação. Sua ação se dá pela inibição da enzima esterol 14α -desmetilase (citocromo P51 ou CYP 51) que é responsável pela manutenção da membrana celular dos fungos, possuindo atividade antifúngica contra espécies de *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Coccidiomyces* spp., *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Histoplasma* spp. e *Cryptococcus* spp (HENS et al., 2016; LEUNG; POULAKOS; MACHIN, 2015), além de pesquisas comprovarem sua atividade contra *Trypanosoma cruzi* (FRANCISCO et al., 2015). Mas apesar de sua potencia, a alta lipossulubilidade (Log P>5) é um entrave para a absorção do fármaco. Desta forma, há a necessidade do incremento de solubilidade do POS a fim de melhorar a dissolução e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade (TANG et al., 2016).

Uma estratégia atrativa para melhorar a biodisponibilidade oral é o uso de uma formulação que crie supersaturação no ambiente gastrointestinal. Se as concentrações da droga forem mantidas muitas vezes maiores do que a solubilidade termodinâmica por tempo

suficiente, pode-se esperar absorção e permeação melhoradas. Além disso, existe uma necessidade reduzida de incorporar uma grande quantidade de excipientes que melhoram a solubilidade (MELLAERTS et al., 2008).

Os testes de dissolução *in vitro*, quando realizados antes dos estudos em animais, devem ser realizados em condições supersaturadas, que permitem a visualização dos eventos de supersaturação, nucleação e cristalização do fármaco em solução. Além disso, tais condições promovem melhor simulação do sistema fisiológico do que a condição não saturada devido ao pequeno volume encontrado no trato gastrointestinal (SUN; JU; LEE, 2012).

Baseado no exposto, este trabalho objetivou o desenvolvimento do complexo de inclusão de β -CD e POS avaliando a influência do β -CD nas propriedades dos fármacos. O desempenho da POS foi analisado em relação à degradação cinética assistida por simulação computacional, taxa de dissolução em condições saturadas e supersaturadas, bem como atividade antifúngica *in vitro*.

3.1.2 Material e métodos

3.1.2.1 *Material*

O fármaco posaconazole (POS) foi adquirido da Vanguard® e o benznidazol (BNZ) foi fornecido pelo Laboratório Farmacêutico Pernambucano (LAFEPE, Brasil). Os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico. A água foi purificada por sistema Milli-Q Plus (Millipore®), e valor de resistividade de 18.2 M Ω .cm a 25°C.

3.1.2.2 *Obtenção dos complexos*

Primeiramente, foi estabelecido a proporção da 2:1 (mol:mol) para β -CD, como estabelecidos por diagrama de solubilidade anteriormente realizado por Tang e colaboradores (2016). A mistura física foi preparada como referência e ambos os componentes misturados utilizando vortex (Marconi®) durante 20 min (SOARES-SOBRINHO et al., 2012). O complexo foi obtido por meio da técnica de malaxagem em que foi utilizado uma mistura hidroalcoólica de etanol:água (3:1, v:v) utilizando grau e pistilo durante 45 min, mantendo-se a consistência de pasta. Em seguida, as amostras foram secadas a 30°C por 24 h. (RIBEIRO et al., 2008).

3.1.2.3 Caracterização

β -CD, POS, MF e MX foram analisados utilizando técnicas analíticas. A estrutura cristalina dos materiais foram avaliados por difração de raio-X (DRX) utilizando equipamento LabX - XRD 600 (Shimadzu®) com corrente de 30 mA, voltagem de 40 kV e radiação $\text{CuK}\alpha$. A análise foi realizada com 2θ na faixa de 5 a 50° na razão de 2°/min.

Possíveis interações entre β -CD e POS foram avaliados por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando equipamento Spectrum (PerkinElmer®, Model 1600) com reflectância total atenuada (ATR). Estabeleceu-se a faixa de análise de 650 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} com 16 scans.

O comportamento térmico das amostras foram avaliados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) utilizando equipamento SDT Q600 V20.9 (TA instruments®). Cada amostra (aproximadamente 5 mg) foi inserida em panada de alumínio, posteriormente selada, sob atmosfera de nitrogênio (100 mL/min) na razão de 10°C/min. A calibração foi devidamente realizada utilizando oxalato de cálcio mono-hidratado. Os dados foram analisados por cristalinidade relativa do fármaco (RDC) e eficiência de inclusão (EI), como descrito por LI; XU (2010). O RDC para MF e MX foram estimados por meio da razão entre a entalpia do ponto de fusão da amostra (ΔH_{sam}) e do fármaco puro (ΔH_{d}), de acordo com a eq. (1):

$$RDC (\%) = \frac{\Delta H_{\text{sam}}}{\Delta H_{\text{d}}} \times 100\% \quad (1)$$

O EI do POS foi ainda estimado diretamente pela eq. (2):

$$IE (\%) = \frac{\Delta H_{\text{d}} - \Delta H_{\text{sam}}}{\Delta H_{\text{d}}} \times 100\% = (1 - RDC) \times 100\% \quad (2)$$

A morfologia superficial das amostras foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em equipamento FEI (QUANTA FEG 250®). As amostras foram inseridas em fitas de carbono e cobertas por camada de ouro durante 15 min. Fotomicrografias foram capturadas a 5 kV com a magnitude de 2500 vezes. Tamanho de partículas foram obtidos com auxílio do programa ImageJ.

3.1.2.4 Ensaio de estabilidade

Para avaliar a estabilidade do POS na ausência ou presença de CD, realizou-se a degradação oxidativa do fármaco. Esta condição foi selecionada devido a grande susceptibilidade do fármaco (YANG et al., 2016). Inicialmente, 1 mg fármaco foi solubilizado em 10 mL metanol, completando-se o volume de 25 ml com peróxido de hidrogênio a 3%. MX, com massa de POS correspondente, foi misturado a 10 mL de água purificada e completada para 25 mL com a solução de peróxido de hidrogênio 3%. Alíquotas foram reiradas nos tempos: 0, 30, 60, 120, 240, 480, 690, 840 e 1500 min.

O percentual de POS foi mensurado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detectos de fotiodo (CLAE-DAD) e coluna Discovery® C₈ (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel foi composta por de metanol (grau HPLC):água purificada (75:25) com velocidade de fluxo de 1 mL/min. As análise foi realizada sob comprimento de onda de 260 nm (GARCIA; COSTA; MENDEZ, 2012).

A degradação foi analisada utilizando a média dos perfis de decaimento do fármaco por meio da cinética de zero, primeira e segunda ordem, exibido na Tabela 1, a fim de determinar a coeficiente de determinação (R²).

Tabela 1 - Ordens cinéticas utilizadas para a análise do perfil de degradação do POS.

Ordem cinética	Fórmula	t _{1/2}	t _{90%}
Zero	$C = C_0 - k.t$	$C_0 / 2k$	$(0,1 \times C_0) / k$
Primeira	$\log C = \log C_0 - k.t$	$0,693 / k$	$0,16 / k$
Segunda	$1/C = 1/ C_0 + k.t$	$1/ C_0 \times k$	$1/ C_0 \times k$

Legenda: C (concentração final), C₀ (concentração inicial), k (constante de reação), t (tempo), t_{1/2} (tempo de meia-vida), t_{90%} (tempo de vida útil).

Fonte: Sinko (2008).

3.1.2.5 Dinâmica molecular

Para observar as interações químicas entre POS e β-CD cálculos computacionais foram realizados através do programa GAUSSIAN 09 (FRISCH et al., 2016) e GROMACS 53A6 As estruturas de POS e β-CD foram obtidas do *Automated Topology Builder* (ATB) e os sistemas construídos de acordo com os parâmetros experimentais. Foram construídos dois sistemas, um em presença e outro na ausência de β-CD. O tempo total de simulação para todos os sistemas

foi de 100 ns, a 298 K e 1 bar de pressão. Os resultados foram avaliados em termos de estrutura e interações de pontes de hidrogênio

3.1.2.6 Solubilidade de equilíbrio

Para determinação da solubilidade máxima dos complexos, solubilizou-se 55 mg de β -CD em 5 mL de tampão fosfato pH $6,8 \pm 0,5$ e, posteriormente, adicionou-se POS em excesso. Esse sistema foi agitado a 200 rpm por meio de uma incubadora shaker SL 222 (Solab®) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 dias, de acordo com FIGUEIRÊDO et al. (2017) e adaptações. O sobrenadante foi centrifugado a 3500 rpm por 3 min e, em seguida, mensurado em espectrofotometria UV-Vis a 260 nm (Varian Cary® 50).

3.1.2.7 Ensaio de liberação

Os perfis de liberação foram obtidos por experimentos de dissolução condições de saturação e supersaturação. O ensaio de liberação na primeira condição foi realizado em dissolutor VK 7000 (VARIAN®) equipado com aparato 2 (pá), sob agitação de 100 rpm a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. 2 mg da massa corresponde de POS foi utilizado em todas as amostras e inseridos em cubas contendo 400 mL de tampão fosfato pH $6,8 \pm 0,5$. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 120 min e analisadas a 255 nm por meio de espectrofotômetro UV-Vis.

A supersaturação foi previamente estabelecida pelo *Sink index* (SI) expresso na Eq. (3):

$$SI = \frac{C_s \times V_s}{dose} \quad (3)$$

onde C_{eq} corresponde à solubilidade de equilíbrio (seção 2.6) do fármaco cristalino no meio de dissolução, V é o volume do meio e *dose* está relacionada à quantidade do fármaco no amostra (SUN; LEE, 2015). O SI foi mantido em 0,03 e a dose ajustada de acordo com C_{eq} do POS (FIGUEIRÊDO et al., 2017). O volume de tampão fosfato pH $6,8 \pm 0,5$ utilizado foi de 10 mL, sob agitação de 100 rpm a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ em agitador magnético (Fisioton®). A massa correspondente a 18 mg de POS foi utilizada e alíquotas foram retiradas nos tempos de 3, 10, 18, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 1080 e 1440 min e, posteriormente, centrifugadas a 3500 rpm por

3 min. 30 µL do sobrenadante foi diluído em 570 µL de meio e detectado a 255 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

Baseado na área sob a curva (ASC) dos perfis de liberação, na condição de supersaturação, foi possível estabelecer o fator de supersaturação (FS), o qual representa a proporção do aumento desta ASC em comparação à área de saturação (BEVERNAGE et al., 2013), representada pela seguinte Eq. (4):

$$SF = (\text{área supersaturada} + \text{área saturada}) / \text{área saturada} \quad (4)$$

3.1.2.8 Viabilidade antifúngica

A metodologia foi realizada de acordo com as orientações do Clinical and Laboratory Standards Institute (M27-A2 e M38-A) (NCCLS/CLSI, 2002a, 2002b). Para preparação dos inóculos, as culturas dos fungos *Aspergillus niger* (cepa URM 6795), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida tropicalis* (URM 4262) foram preparadas 24h antes. Uma colônia de cada uma das culturas foi removida e transferida para um tubo contendo 10 mL de NaCl a 0,85%. A densidade óptica foi analisada a fim de ajustar a turbidez para a escala de McFarland (1 a 5 x 10⁶) utilizando espectrofotômetro UV-Vis em um comprimento de 530 nm, turbidez deve ser aproximadamente 0,1 para todas as cepas. Subsequentemente, as diluições de 1:50 e depois 1:20 (apenas para as espécies de *Candida*) foram realizadas com o meio de cultura.

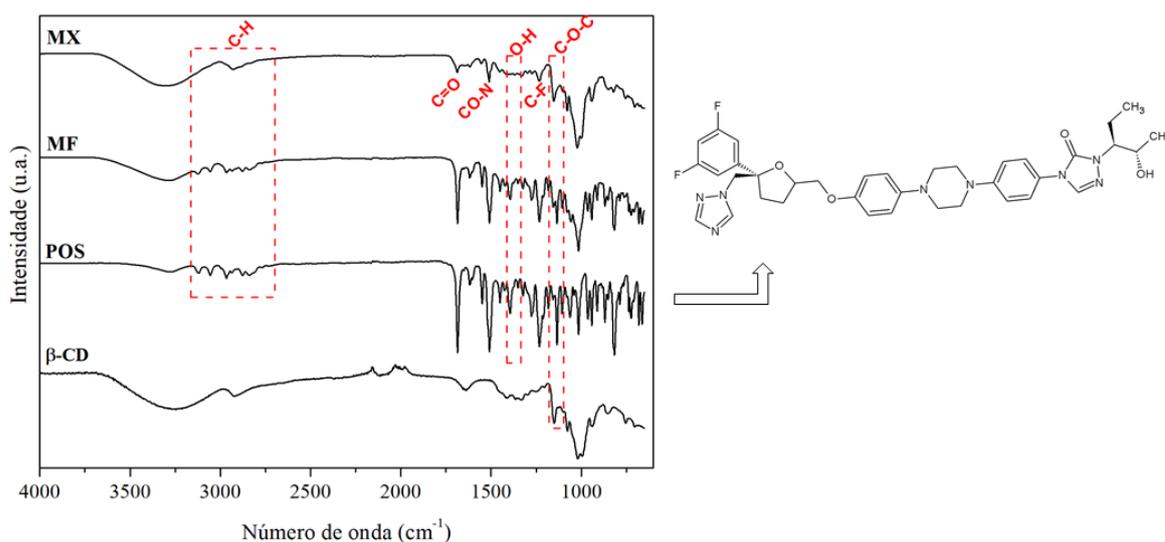
Com o intuito de analisar a influência da supersaturação na atividade antifúngica, o teste de difusão em disco foi realizado concomitantemente ao ensaio de dissolução na condição de supersaturação. Os inóculos ajustados para a escala de McFarland, anteriormente citado, foram semeados em placas de Petri contendo agar Muller Hinton (Kasvi®) por meio de swab estéril. Os discos foram então impregnados com 20 µL da alíquotas referentes aos tempos de coleta (3, 30, 60 e 120 min) e, posteriormente, inseridos na superfície do ágar semeado com as culturas estabelecidas.

3.1.3 Resultados e Discussão

Na Figura 1, foram evidenciados os espectros obtidos por meio do FTIR a fim de analisar as interações químicas existentes no material. Embora MF e MX estivessem em proporções equimolares, eles apresentaram diferentes intensidades quanto ao estiramento do

grupo carbonil (C=O) em 1685 cm^{-1} , inerente à molécula de POS (FIGUEIRÊDO et al., 2017). Em MX, tal banda reduziu em cerca de 71,3% e 79,3% em relação a MF e POS, respectivamente (RIBEIRO et al., 2008). Isso sugere que a inserção do molécula do fármaco no interior da β -CD.

Figura 1 - Espectros dos materiais β -CD, POS, MF e MX obtidos por FTIR.



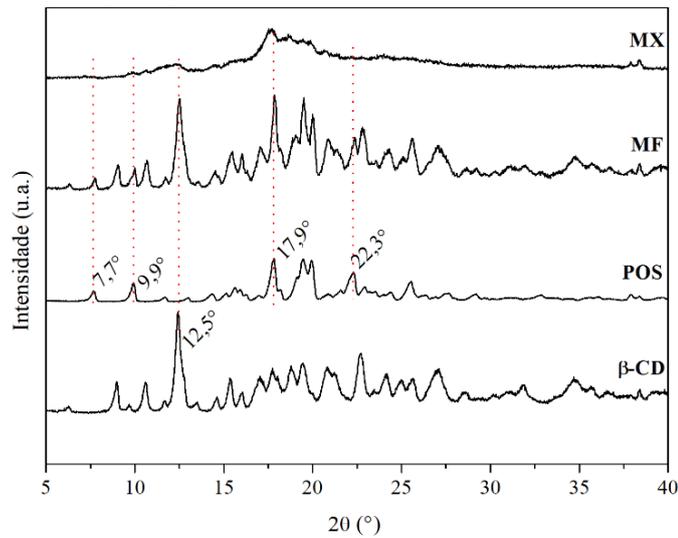
Fonte: Autoria própria.

Em MX, a redução da intensidade (Figura 1) foi ainda visualizada em 1230 e 1509 cm^{-1} referente às deformações axiais de C-F e CO-N nas extremidades da molécula, mais prováveis de interação com a ciclodextrina. Além disso, as bandas em 1130 cm^{-1} , referente a deformação axial assimétrica de C-O-C, em 1395 cm^{-1} , relacionada a deformação angular de O-H, e entre 3000 e 3100 cm^{-1} , referente a deformação axial de C-H, desapareceram sugerindo a inclusão destas regiões no interior da β -CD.

Em adição, devido às possíveis interações, MX apresentou a amorfização de sua estrutura antes cristalina, como evidenciado pelos difratogramas na Figura 2, ocorrendo a captura e a distribuição da energia infravermelha entre os grupos químicos vizinhos (FIGUEIRÊDO et al., 2017). Tal fenômeno promove o alargamento das bandas deste material em relação à MF.

Para a análise específica da cristalinidade das amostras, na Figura 2, o difratograma do POS foi composto de múltiplos picos cristalinos característicos em $7,7^\circ$, $9,9^\circ$, $17,8^\circ$, $19,4^\circ$ e 20° . β -CD também apresentou característica cristalina com pico principal em $12,5^\circ$.

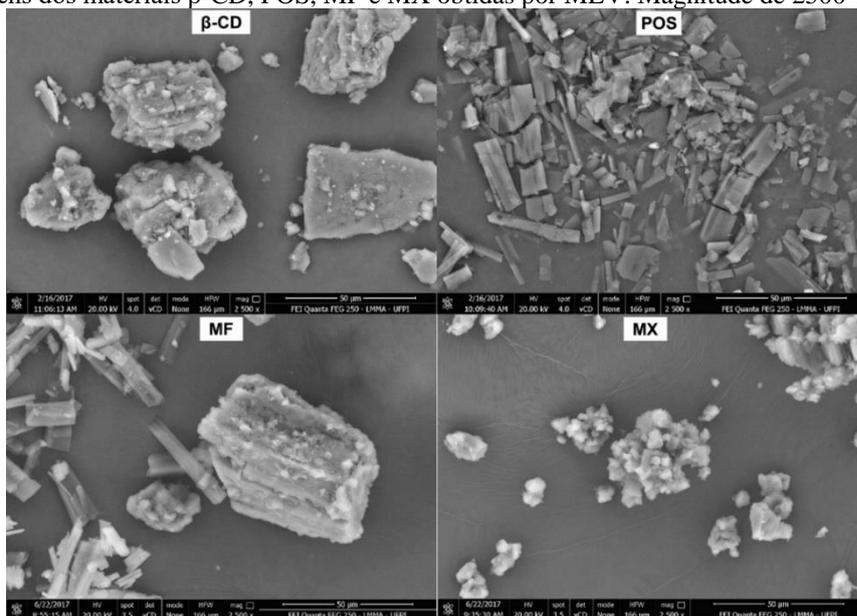
Figura 2 - Difratogramas do β -CD, POS, MF e MX.



Fonte: Autoria própria.

Ao analisar a amostra MF, Fig. 2, nota-se picos inerentes à β -CD e ao POS refletindo a superposição das características cristalinas de ambos. Já para MX foi observado o desaparecimento dos picos de difração inerentes aos materiais de partida, evidenciando a amorfização do complexo devido a dispersão do POS no estado molecular com a β -CD, indicando a possível formação do sistema complexo (PATEL; RAJPUT, 2009). Esse fato corrobora com as imagens obtidas por microscopia (Figura 3) onde foi possível visualizar a morfologia superficial dos materiais.

Figura 3 - Imagens dos materiais β -CD, POS, MF e MX obtidas por MEV. Magnitude de 2500 vezes.

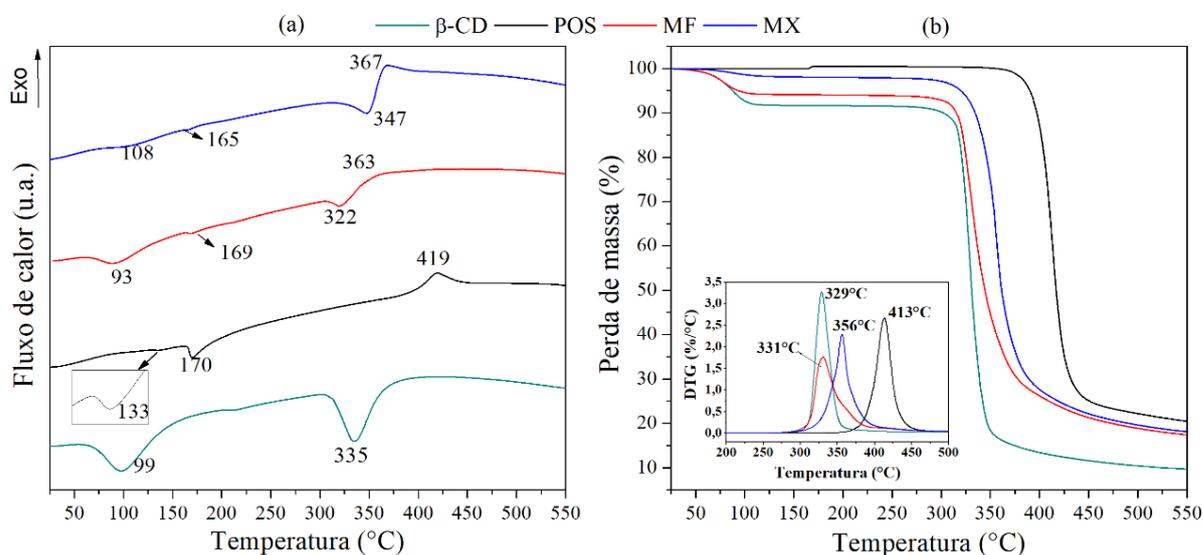


Fonte: Autoria própria.

Na Figura 3, evidencia-se a superfície irregular da β -CD em blocos em contraste com a do fármaco que se apresentou como cristais afilados e bem definidos, com tamanhos médio de 14,8 e 10,6 μm , respectivamente. Na imagem referente a MF nota-se a presença das características superficiais bem definidas tanto de β -CD como de POS, corroborando com as análises anteriores. Já em MX, houve a completa distinção das morfologias apresentados pelos componentes isolados adquirindo característica uniforme, áspera e amorfa, além de expressiva redução do tamanho de partícula para 7,4 μm , em média.

Os dados de análise térmica foram gerados por meio de DSC, TG e DTG dos materiais, expostos na Figura 4. Nos dados de DSC do POS, observou-se a presença de dois eventos, fig. 4(a). O primeiro foi de característica endotérmica, o qual ocorreu entre 163 e 203 $^{\circ}\text{C}$ (máx. 170 $^{\circ}\text{C}$), correspondente à fusão do fármaco com entalpia de 20,3 J. O segundo aconteceu entre 372 e 456 $^{\circ}\text{C}$ (máx. 419 $^{\circ}\text{C}$) e foi de característica exotérmico inerente à decomposição do POS (FULE; AMIN, 2014). O fármaco apresentou ainda um evento endotérmico discreto em 133 $^{\circ}\text{C}$ relacionado à fase de transição nemática (cristal líquido) que ocorre comumente na família dos triazóis (ADRJANOWICZ et al., 2013).

Figura 4 - Dados de DSC (a), TG e DTG (b) dos materiais.



Fonte: Autoria própria.

Quanto ao DSC do β -CD, Figura 4(a), foram observados dois eventos correspondentes, um à perda de água (máx. 98 $^{\circ}\text{C}$) e outro à decomposição do oligossacarídeo (máx. 335 $^{\circ}\text{C}$) (PATEL; RAJPUT, 2009).

Em relação a MF, Figura 4(a), observou-se que inicialmente houve um evento referente à perda de moléculas de água, provavelmente, originárias da β -CD. Outro evento de característica endotérmica, com máximo 169 °C, foi relacionado ao ponto de fusão do POS. Desta forma, observa-se que o perfil do DSC da MF apresentou eventos iniciais semelhantes aos materiais de partida.

Em MX, Figura 4(a), o primeiro evento envolveu menor energia em relação à MF devido a inferior perda de água, sugerindo a interação entre β -CD e POS, o qual foi inserido em espaços antes ocupados por moléculas de água. Além disso, o segundo evento ocorreu entre 157 e 176 °C evidenciando a antecipação evento de fusão comparado ao do POS isolado. Tal fenômeno confirma a hipótese de interação entre os materiais.

Baseado na entalpia gerada pelos eventos de fusão dos materiais, foi possível mensurar a cristalinidade pelo cálculo do RDC, Eq. (1), para o qual foram admitidas as entalpias 20,3, 7,8 e 2,3 para POS, MF e MX, respectivamente. Para MX, o RDC calculado foi de 11,3% quando relacionado ao fármaco. Ao comparar com MF, o RDC de MX foi de 29,6 %, evidenciando a redução significativa da cristalinidade do complexo formado, que indica a amorfização do fármaco ocasionada pela dispersão deste na ciclodextrina.

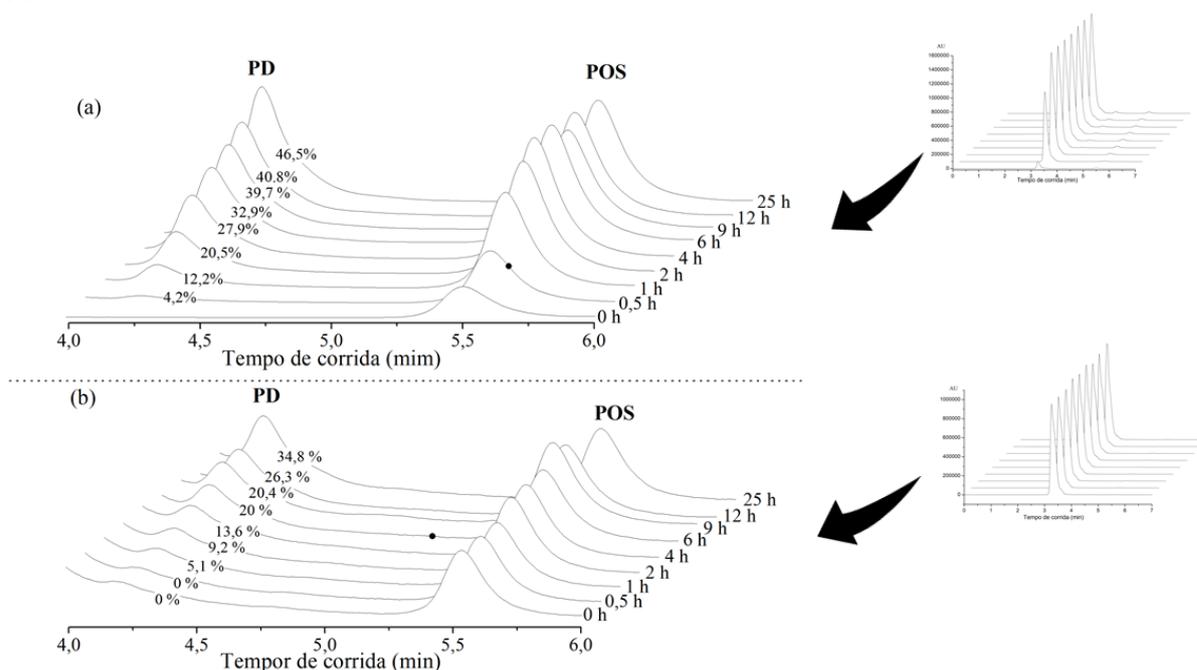
Além disso, pode-se inferir a eficiência de inclusão dos materiais, foi utilizada a Eq. (2) por meio dos dados obtidos pelo DSC. Considerando como o pico de POS apresentado em MF como 100%, por se tratar da simples mistura entre os componentes, determinou-se EI% de MX, o qual indicou 70,4% de POS encapsulado no interior da ciclodextrina evidenciando um método de obtenção eficiente.

Sobre a decomposição dos materiais, MF apresentou similaridade com a β -CD, ambos com temperatura inicial em 290 °C, com a perda de massa de 74,2 e 78,7 %, respectivamente, visualizadas na análise de TG, Figura 4(b). Na curva DTG foi possível observar um “ombro” após o início do fenômeno em questão, referente ao POS, evidenciando a heterogeneidade do material.

Quanto a decomposição de MX, Figura 4(a), observou-se que o evento teve início em torno de 304 °C, superior ao apresentado por MF, com perda de massa de 88 %. Tal deslocamento foi visualizado, ainda, pela curva DTG, na qual a temperatura máxima foi em 356 °C evidenciado por um pico homogêneo, sugerindo a dispersão dos materiais promovida pela uniformidade ao sistema, Figura 4(b). Esse fato indica o incremento da estabilidade térmica, relacionada à β -CD, ao contrário do visualizado em MF.

A fim de avaliar a estabilidade do fármaco na presença e na ausência de β -CD, as amostras submetidas a estresse oxidativo tiveram os cromatogramas expostos na Figura 5. Foi notável a redução da proporção de produto de degradação (PD) em MX, Figura 5(b), no tempo de retenção de 4,4 min, evidenciando o aumento da estabilidade oxidativa do POS na presença de β -CD.

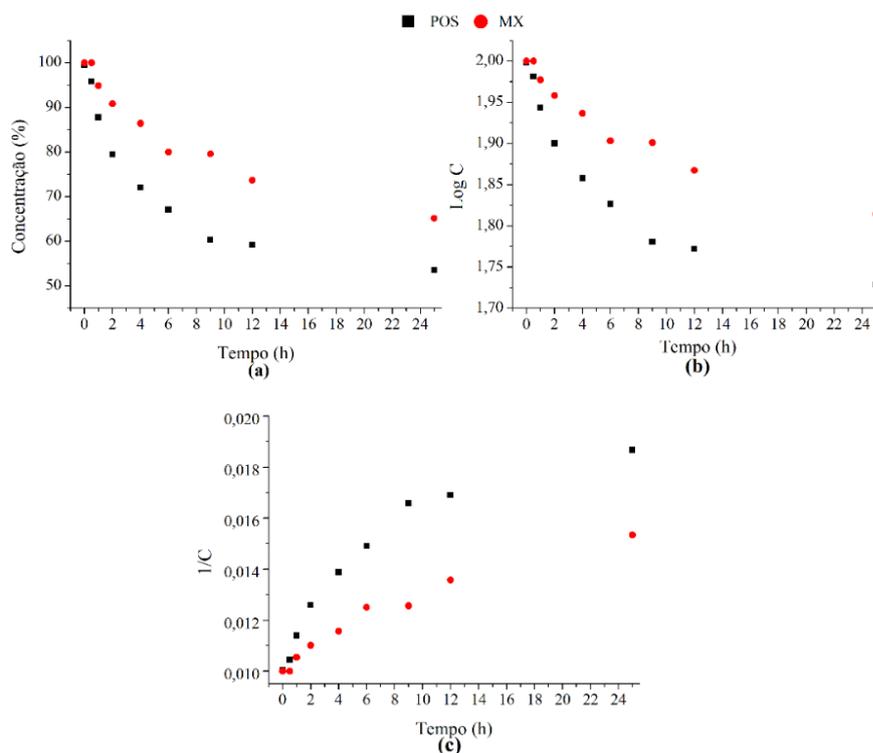
Figura 5 - Cromatogramas do POS (a) e MX (b) bem como o fármaco degradado após ensaio de degradação oxidativa.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, foi possível realizar o estudo cinético da degradação oxidativa do POS quanto aos modelos de zero, primeira e segunda ordem (Figura 6). De acordo com Hong; Shah; Mcgonagle (2011), a complexação com ciclodextrinas mimetizam a ação de enzimas pela ligação e bloqueio da molécula em uma posição conformacional específica facilitando a interação de moléculas hospedeiras e a cavidade da CD, afetando o efeito catalítico do peróxido hidrogênio.

Figura 6 - Cinética de degradação na ausência e na presença de β -CD sob condições de estresse oxidativo avaliados por zero (a), primeira (b) e segunda (c) ordem.



Fonte: Autoria própria.

No estudo de degradação cinética foi observado que ambos os materiais apresentaram maior relação com a segunda ordem de reação (Tabela 2). Este fato está em acordo com pesquisa realizada por Tang e colaboradores (2016) a qual evidenciou o equilíbrio dinâmico tendendo à cinética de segunda ordem para a formação e dissociação dos complexos com a formação de complexos β -CD:POS (2:1) em alta concentração de CD. Assim, a ordem de degradação está correlacionada com a dissociação do fármaco propiciando sua degradação.

Tabela 2 - Parâmetros obtidos a partir das cinéticas de reação aplicadas à degradação do POS.

Ordem cinética		Parâmetros			
		R ²	k (%/h)	t _{1/2} (h)	t _{90%} (h)
Zero	POS	0,686	1,72	28,94	5,71
	CD/POS (MX)	0,854	1,39	35,81	7,19
Primeira	POS	0,750	0,01	69,3	16
	CD/POS (MX)	0,896	0,007	99	22,86
Segunda	POS	0,811	3,44 x 10 ⁻⁴	29,20	3,22
	CD/POS (MX)	0,931	2,15 x 10 ⁻⁴	46,51	5,17

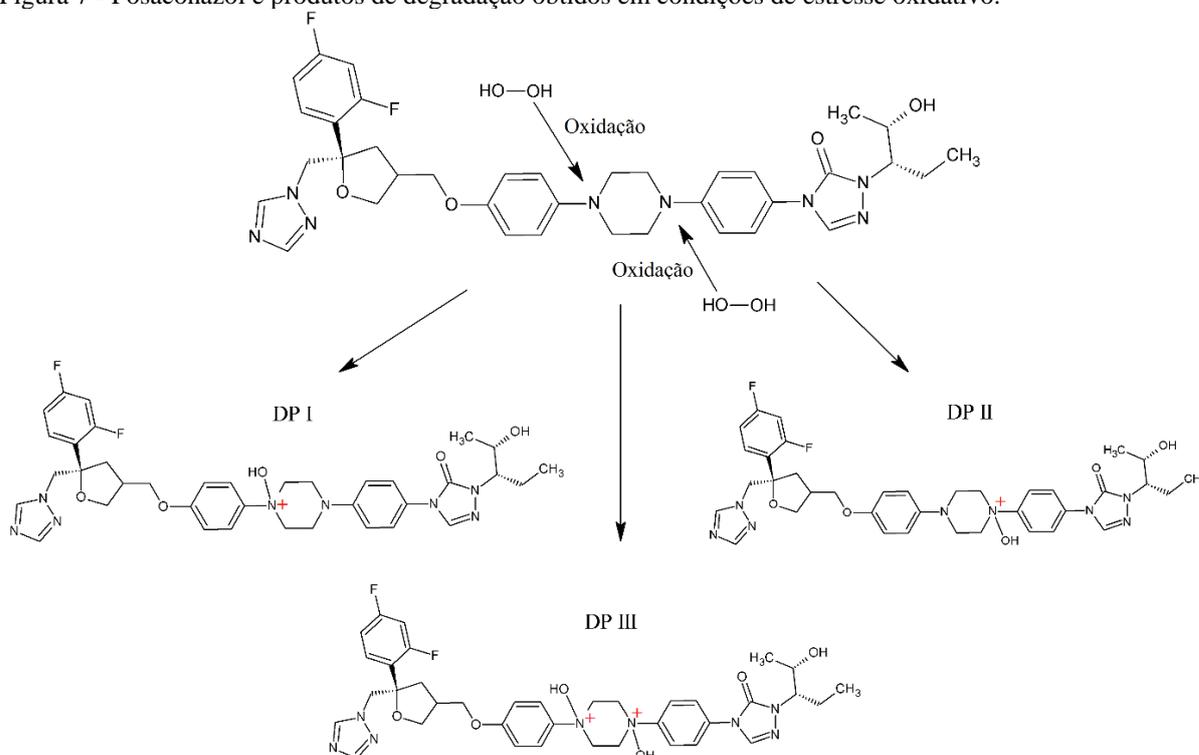
Fonte: Autoria própria.

Entretanto, na presença de β -CD foi capaz de aumentar a estabilidade do POS em condição de estresse oxidativo mensurado pelo incremento no t_{1/2} (29,2 para 46,61 h) e no t_{90%}

(3,22 para 5,17 h) e pela redução na velocidade de reação ($3,44 \times 10^{-4}$ para $2,15 \times 10^{-4}$ %/h), Tabela 2. Como reportado por Popielec & Loftsson (2017), na maioria dos casos $k_{\text{fármaco}}$ é maior que $k_{\text{CD:fármaco}}$, assim, a complexação com CD estabiliza o fármaco, aumentando o $t_{90\%}$ do produto.

De acordo com Yang e colaboradores (2016), POS gera três produtos de degradação (PD) quando submetido ao estresse oxidativo (PD I, PD II e PD III) os quais se referem a inserção de átomos de oxigênio no anel piperazínico, localizado no meio da molécula de POS, Figura 7. Devido ao aumento da estabilidade do POS em presença de β -CD, sugere-se que a complexação com CD em ambas as extremidades promovem a proteção do fármaco reduzindo a disponibilidade de sítios ativos para o ataque do peróxido de hidrogênio.

Figura 7 - Posaconazol e produtos de degradação obtidos em condições de estresse oxidativo.

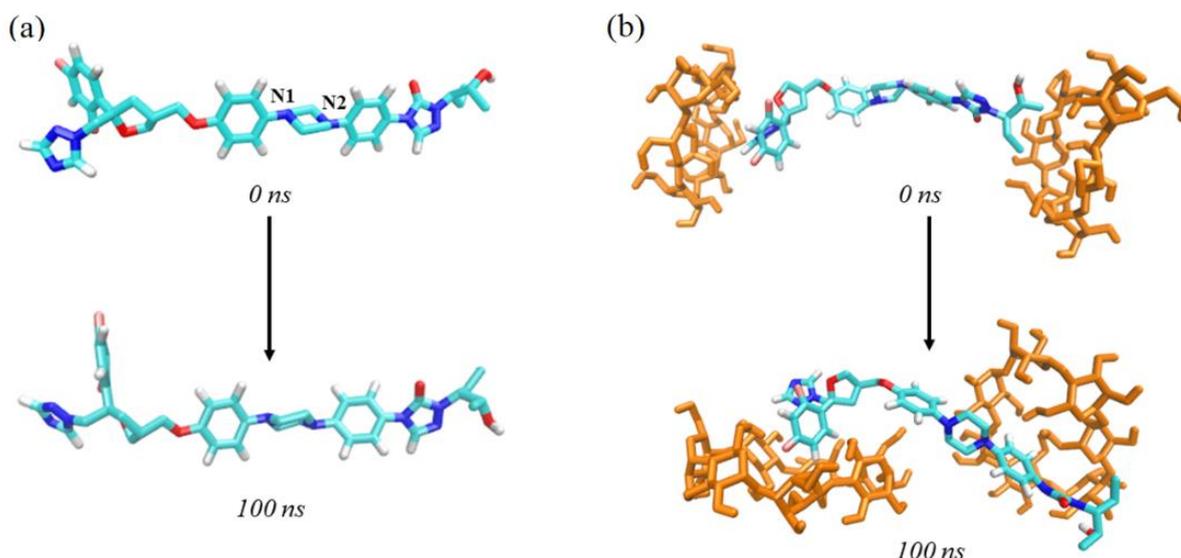


Fonte: Adaptado de Yang et al. (2016).

Para maior entendimento de como esse processo ocorre, a análise da degradação utilizando abordagens de simulação computacional foi realizada. Nesta análise, foi visualizado que POS mantém uma forma linear na ausência de β -CD (Fig. 8a). Entretanto, o complexo de inclusão formado conduziu a mudanças conformacionais gerando uma estrutura flexionada, Figura 8(b). Este é um comportamento natural uma vez que as estruturas moleculares tendem a manter um estado de menor energia a fim de favorecer as interações entre as moléculas (Pal et

al., 2016). Neste contexto, o POS adaptou sua geometria em função da complexação com β -CD.

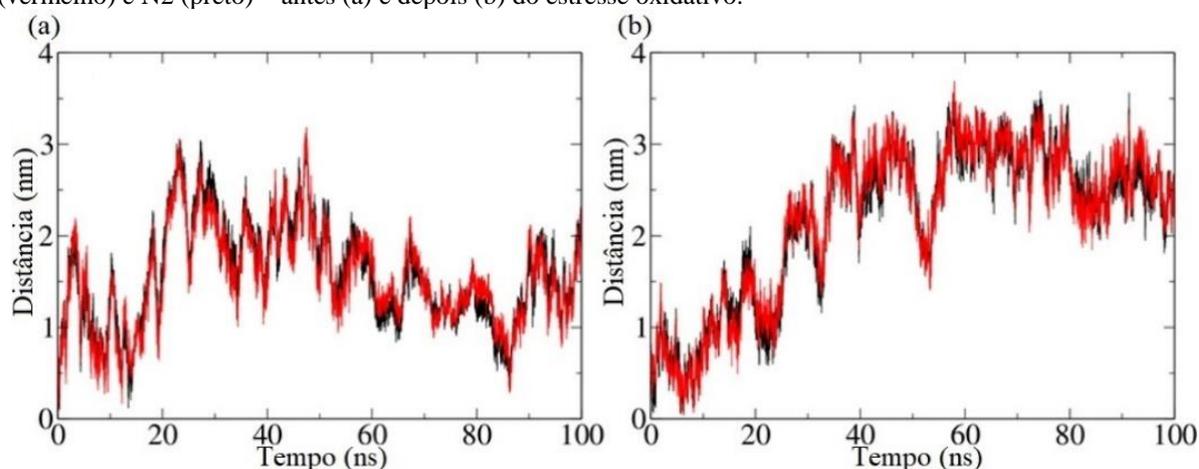
Figura 8 - Conformações inicial (0 ns) e final (100 ns) baseadas na simulação computacional do POS isolado (a) e complexado (b) com β -CD. Peróxido de hidrogênio e moléculas de água foram ocultadas.



Fonte Autoria própria.

Através da simulação, pode-se ainda observar que o β -CD atua como um agente protetor do fármaco mantendo-o complexado ao longo do tempo. Assim, observa-se o aumento expressivo da distância média entre as moléculas de peróxido de hidrogênio e os átomos de nitrogênio do anel piperazínico (identificados na Fig. 8a) do fármaco complexado. A distância final média para o complexo de inclusão é de 2,5 nm, Figura 9(a) apresentando maior espaçamento em relação ao fármaco isolado (1,5 nm), Figura 9(b).

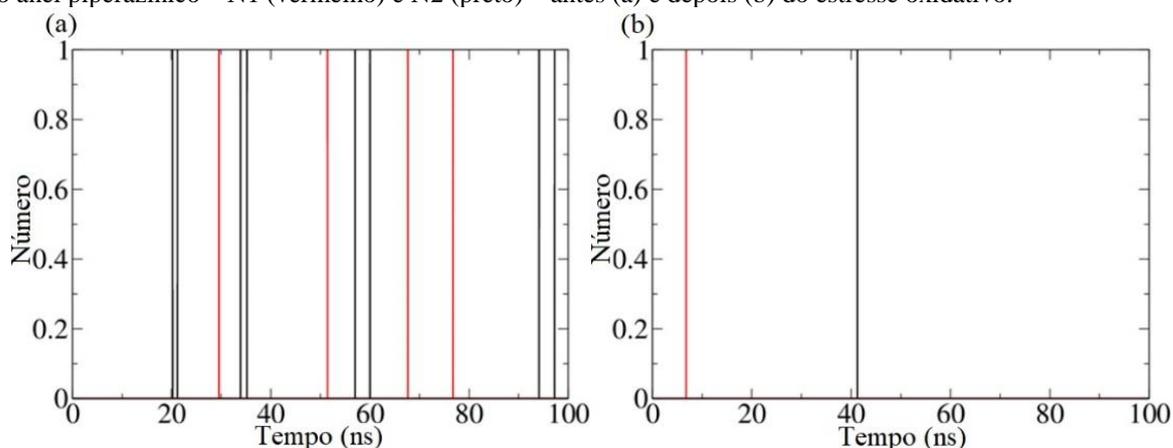
Figura 9 - Distância entre moléculas de peróxido de hidrogênio e átomos de nitrogênio do anel piperazínico – N1 (vermelho) e N2 (preto) – antes (a) e depois (b) do estresse oxidativo.



Fonte: Autoria própria.

Em relação ao número de ligações de hidrogênio (Figura 10), o N1 é capaz de captar maior número de ligações comparado ao N2 ao longo do tempo de análise, realizando, cada um, oito e quatro ligações, respectivamente, Figura 10(a). No entanto, na presença do complexo de inclusão, Figura 10(b), este número é notavelmente reduzido para apenas um em ambos os nitrogênios, evidenciando a menor viabilidade de interação com o peróxido, dificultando a formação de produtos de degradação.

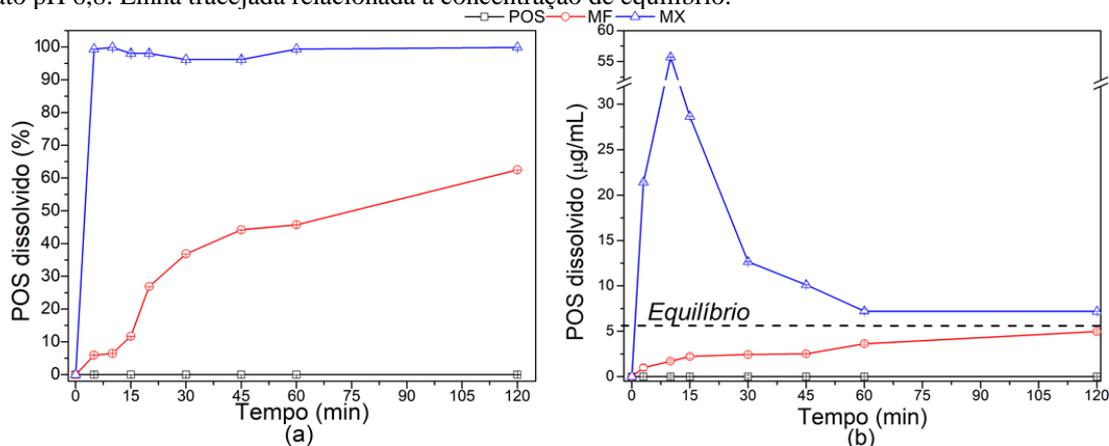
Figura 10 - Número de ligações de hidrogênio entre moléculas de peróxido de hidrogênio e átomos de nitrogênio do anel piperazínico – N1 (vermelho) e N2 (preto) – antes (a) e depois (b) do estresse oxidativo.



Fonte: Autoria própria.

Para avaliar o desempenho do fármaco, o ensaio de liberação foi conduzido em condições de saturação e supersaturação, como visualizado na Figura 11.

Figura 11 - Perfil de liberação do fármaco utilizando as condições de saturação (a) e supersaturação (b) em tampão fosfato pH 6,8. Linha tracejada relacionada a concentração de equilíbrio.



Fonte: Autoria própria.

Na liberação utilizando a condição saturada, Figura 11(a), MF demonstrou o aumento gradual da porcentagem de POS devido a interação com β -CD solubilizado no meio de

dissolução, alcançando 60% de liberação em 120 min. Já em MX, POS foi rapidamente dissolvido devido a prévia formação do complexo, alcançando 100 % de dissolução nos primeiros 5 min. Isto evidencia que o complexo aumentou a velocidade de dissolução do fármaco comparado ao POS isolado e à MF.

Entretanto, o uso da condição saturada facilita a dissolução dos materiais no meio, uma vez que há volume suficiente para a máxima solubilização do fármaco. Quando essa capacidade de solubilização é reduzida, o fármaco no estado amorfo alcançará facilmente a supersaturação ao contrário da forma cristalina, permitindo, assim, a melhor discriminação entre eles. Além disso, de acordo com Hens e colaboradores (2016) e Van Speybroeck e colaboradores (2009), a condição saturada, ou abaixo da saturação, não correlaciona satisfatoriamente com a liberação *in vivo* causada por bases fracas, como é o caso do POS ($pK_a = 3,6$ e $4,6$). Fármacos com essa característica podem supersaturar em fluidos intestinais depois da transferência gástrica, baseada no gradiente de solubilidade entre o estômago (fármaco mais solúvel) e intestino delgado (menor solubilidade). Assim, se a concentração do fármaco se mantiver mais elevada do que a solubilidade termodinâmica, maior absorção pode ser esperada.

Na Figura 11(b), observou-se que em MX, POS foi capaz de alcançar a supersaturação com máximo em cerca de $55 \mu\text{g/mL}$ (10 min) comparado ao MF. Esse apresentou aumento gradual da concentração, semelhante ao representado na Figura 11(a). A presença do fármaco amorfo em MX conduziu ao rápido início de supersaturação resultando na liberação imediata do POS. Posteriormente, a concentração de POS declinou rapidamente até alcançar o equilíbrio em 60 min, o qual está relacionado ao equilíbrio dinâmico entre o fármaco livre e complexado com a β -CD (mecanismo de associação-dissociação). Tal comportamento foi explicado por Sun & Lee (2015), os quais reportaram que a solubilidade de fármacos pouco solúveis é melhorada pela rápida dissolução do carreador e do fármaco amorfo resultando na alta velocidade de supersaturação deste no meio de dissolução, seguido do rápido declínio da concentração devido a nucleação, com o aumento da partícula, e precipitação desencadeada pelo acúmulo do fármaco supersaturado.

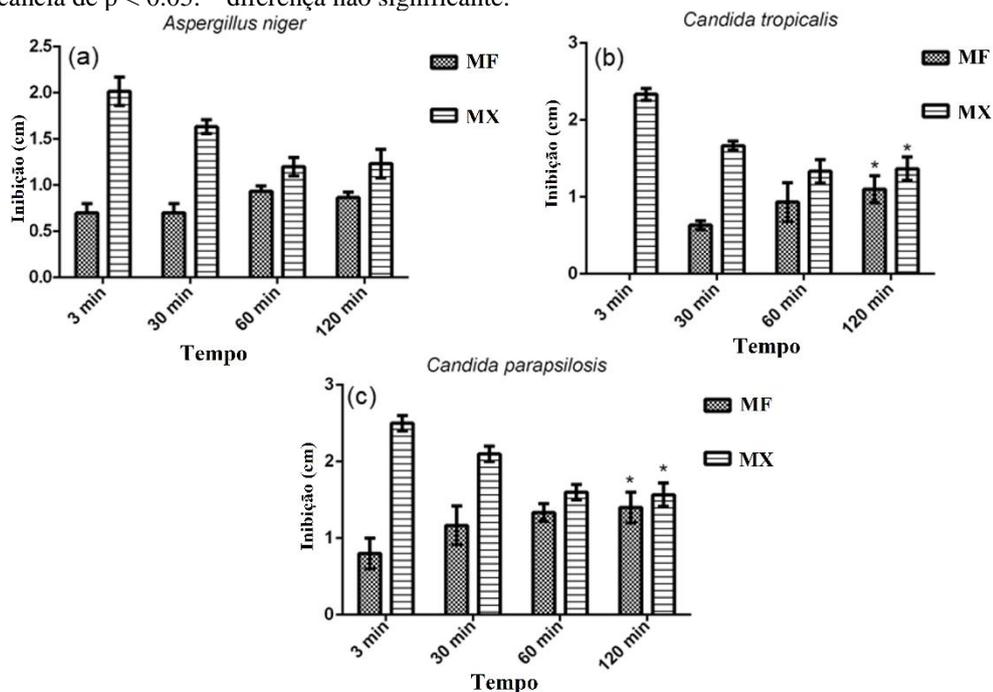
Além disso, a presença de β -CD é capaz de promover um ambiente altamente substituído após a rápida dissolução do veículo, especialmente em altas taxas de dose-solubilidade. Isso inevitavelmente leva a um grau de recristalização manifestado por uma queda acentuada na concentração dos fármacos dissolvidos, resultando em uma diminuição no grau de supersaturação (SUN; JU; LEE, 2012).

A fim de quantificar a superação alcançada, a área sob a curva (ASC) do fármaco em MX foi calculada com o intuito de estabelecer o fator de supersaturação, reportado pela Eq. (4). Assim, a rápida dissolução do POS conduziu a uma ASC de 2019,8 min.µg/mL com FS de 2,3, o que quer dizer que a quantidade de fármaco solubilizado na área supersaturada, durante o tempo de dissolução, foi superior ao dobro do proporcionado em condição saturada. Baseado nisso, sugere-se a maior disponibilidade do fármaco para absorção pelo organismo.

A fim de observar o impacto da supersaturação na atividade do fármaco, ensaio antifúngico *in vitro* foi realizado concomitantemente à dissolução, Figura 12. O método de disco de difusão foi selecionado pela simplicidade, baixo custo e fácil interpretação dos resultados (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

O teste de disco difusão foi realizado por meio de alíquotas da dissolução coletadas nos tempos: 3, 30, 60 e 120 min para POS, MF e MX. POS não foi retratado devido à ausência do halo de inibição, consequência da baixa solubilidade do fármaco no meio de dissolução. Em MF, as concentrações utilizadas foram em média: 1,0, 2,4, 3,6 e 5,0 µg/mL, as quais promoveram o aumento gradual da atividade antifúngica, corroborando com os ensaios de dissolução.

Figura 12 - Atividade antifúngica do POS presente nos materiais MF e MX pelo teste de disco difusão associado a liberação do fármaco POS utilizando as espécies: *Aspergillus niger* (a), *Candida tropicalis* (b) e *Candida parapsilosis* (c). Para análise estatística utilizou-se two-way ANOVA, Bonferroni como *post teste* adotando o nível de significância de $p < 0.05$. * diferença não significativa.



Fonte: Autoria própria.

Quanto a MX, as concentrações utilizadas foram, em média: 21,4, 12,6, 7,2 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$. Uma vez que o sistema foi capaz de incrementar a solubilidade do POS, o mesmo promoveu um halo de inibição maior seguido da redução deste devido ao alcance da concentração de equilíbrio após 60 min, corroborando os dados de dissolução na condição supersaturada.

Baseado nisso, observa-se a formação do complexo de inclusão em MX o qual resultou no aumento significativo, não somente da estabilidade oxidativa do fármaco, mas também da solubilidade que foi de fundamental importância para a eficiência da atividade antifúngica.

3.1.4 Conclusão

O complexo de inclusão formado a partir de β -ciclodextrina e posaconazol demonstrou características notáveis para o futuro medicamento. Tais observações foram possíveis devido à abordagem completa realizada neste trabalho. Evidenciou-se a expressiva diminuição da taxa de reação e aumento da meia-vida e tempo de vida útil da POS em quase duas vezes. Isto foi melhor visualizado pela simulação computacional que demonstrou a proteção do local de ataque oxidativo na presença de β -CD. Ainda assim, comprovou-se o aumento da aparente solubilidade e taxa de dissolução na condição supersaturada que foi capaz de aumentar em mais de 10 vezes a concentração de equilíbrio do fármaco. Esse perfil permitiu que grande quantidade de fármaco estivesse disponível para atividade antifúngica, principalmente na primeira hora. Assim, o complexo de inclusão formado tem características promissoras, uma vez que aumenta a estabilidade, a solubilidade e a taxa de dissolução mantendo a eficácia antifúngica do posaconazol.

REFERÊNCIAS

ADRJANOWICZ, K. et al. Molecular dynamics of the supercooled pharmaceutical agent posaconazole studied via differential scanning calorimetry and dielectric and mechanical spectroscopies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 3934–3945, 2013.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BEVERNAGE, J. et al. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 25–35, 2013.

FIGUEIRÊDO, C. B. M. et al. Enhancement of dissolution rate through eutectic mixture and solid solution of posaconazole and benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 525, n. 1, p. 32–42, 2017.

FRANCISCO, A. F. et al. Limited ability of posaconazole to cure both acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infections revealed by highly sensitive in vivo imaging. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4653–4661, 2015.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09, Revision A.02**, 2016.

FULE, R.; AMIN, P. Hot Melt Extruded Amorphous Solid Dispersion of Posaconazole with Improved Bioavailability: Investigating Drug-Polymer Miscibility with Advanced Characterisation. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

GARCIA, C. V.; COSTA, G. R.; MENDEZ, A. S. L. Sci Pharm Stability-Indicating HPLC Method for Posaconazole Bulk Assay. **Scientia Pharmaceutica**, n. 80, p. 317–327, 2012.

GONÇALVES, M. L. C. M. et al. Use of phyllosilicate clay mineral to increase solubility olanzapine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, 2017.

HENS, B. et al. Supersaturation and Precipitation of Posaconazole Upon Entry in the Upper Small Intestine in Humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2677–2684, 2016.

HONG, J.; SHAH, J. C.; MCGONAGLE, M. D. Effect of Cyclodextrin Derivation and Amorphous State of Complex on Accelerated Degradation of Ziprasidone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2703–2716, 2011.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, 2018.

LEUNG, S.; POULAKOS, M. N.; MACHIN, J. Posaconazole: An Update of Its Clinical Use. **Pharmacy**, n. 3, p. 210–268, 2015.

LI, N.; XU, L. Thermal analysis of β -cyclodextrin/Berberine chloride inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 499, n. 1–2, p. 166–170, 2010.

MELLAERTS, R. et al. Ordered mesoporous silica induces pH-independent supersaturation of the basic low solubility compound itraconazole resulting in enhanced transepithelial transport. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1–2, p. 169–179, 2008.

NCCLS/CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica : Norma Aprovada – Segunda Edição..** v. 22, 2012.

NCCLS/CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada.** v. 22, 2012.

PATEL, S. G.; RAJPUT, S. J. Enhancement of Oral Bioavailability of Cilostazol by Forming its Inclusion Complexes. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 660–669, 2009.

POPIELEC, A.; LOFTSSON, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 532–542, 2017.

POURMOKHTAR, M.; JACOBSON, G. A. Enhanced stability of sulfamethoxazole and trimethoprim against oxidation using hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Pharmazie**, v. 60, n. 11, p. 837–839, 2005.

RIBEIRO, A. et al. Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- β -Cyclodextrin. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9, n. 4, p. 1102–1109, 2008.

SINKO, P.J. **Físico-Farmácia e Ciências Farmacêuticas**. 5ªed. Porto Alegre. Artmed, 2008.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benzimidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 323–330, 2012.

SUN, D. D.; JU, T. C. R.; LEE, P. I. Enhanced kinetic solubility profiles of indomethacin amorphous solid dispersions in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 149–158, 2012.

SUN, D. D.; LEE, P. I. Probing the mechanisms of drug release from amorphous solid dispersions in medium-soluble and medium-insoluble carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 211, p. 85–93, 2015.

TANG, P. et al. Characterization and In Vitro Evaluation of the Complexes of Posaconazole with β - and 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 1, p. 104–114, 2016.

VAN SPEYBROECK, M. et al. Ordered Mesoporous Silica Material SBA-15: A Broad-Spectrum Formulation Platform for Poorly Soluble Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 8, p. 2648–2658, 2009.

VYAS, A.; SARAF, S.; SARAF, S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, n. 1–2, p. 23–42, 2008.

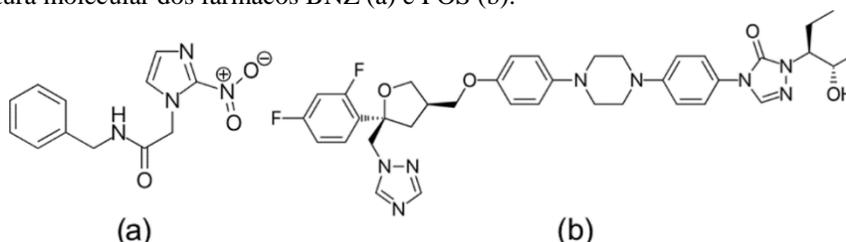
YANG, Y. et al. Stability-indicating HPLC method development and structural elucidation of novel degradation products in posaconazole injection by LC–TOF/MS, LC–MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 165–177, 2016.

3.2 ARTIGO 2: QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE BENZNIDAZOL E POSACONAZOL POR CLAE-DAD UTILIZANDO FERRAMENTA DE *QUALITY BY DESIGN*

3.2.1 Introdução

A Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) lançou nos últimos anos uma plataforma de pesquisa e desenvolvimento para estimular pesquisas acerca do tratamento da doença de Chagas. Tal plataforma objetivou a redução de custo e o encorajamento do reposicionamento de fármacos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) como uma proposta à substituição ou ao auxílio ao tratamento com benznidazol (BNZ), fármaco de primeira escolha a mais de 50 anos, Figura 1(a). Uma possível alternativa a esta proposta foi o fármaco antifúngico posaconazole (POS), Figura 1(b), que é um potente inibidor da biossíntese do ergosterol o qual é essencial para a construção da parede celular do parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas (MORILLA; ROMERO, 2015).

Figura 1 - Estrutura molecular dos fármacos BNZ (a) e POS (b).



Fonte: Autoria própria.

Para o desenvolvimento de formas farmacêuticas envolvendo os fármacos BNZ e POS, é conveniente o desenvolvimento de métodos de quantificação simultânea contendo ambos os fármacos. Os fármacos são encontrados nas mais diversas formas farmacêuticas, contendo um ou mais ativos, as quais, em sua maioria, são analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), uma vez que tal análise possui várias vantagens associadas, como: velocidade, alta sensibilidade e resolução, especificidade, exatidão, precisão, fácil automação, além de possuir colunas reutilizáveis (TALAVIYA; MAJMUDAR, 2014).

A qualidade dos métodos desenvolvidos em CLAE foi se tornando cada vez maior com a utilização de ferramentas de *quality by design* (QbD). O uso de tais ferramentas é importante pois conduzem à verificação da robustez no início da fase de desenvolvimento do método garantindo o desempenho do mesmo ao longo da vida útil do produto. A compreensão científica

adquirida durante este processo pode ser usada para criar elementos de controle e para gerenciar os riscos identificados. Uma forma de aplicação de QbD é o desenho estatístico de experimentos (DOE) que ajuda a entender os efeitos de possíveis combinações multidimensionais e interações de variáveis sobre a qualidade final do produto ou método (BHATT; RANE, 2011; SHIVHARE; MCCREATH, 2010).

Algumas pesquisas científicas descrevem o desenvolvimento de métodos utilizando CLAE acoplado a detector de fosfodióxido (CLAE-DAD) para quantificar BNZ e POS separadamente, como evidenciado na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos de quantificação dos fármacos BNZ ou POS por CLAE-DAD.

Autores	Coluna	Fase móvel	Eluição
Posaconazol			
(CÁCERES et al., 2016)	Eclipse XDB C ₁₈ , 150 × 4,6 mm, 5 μm	Acetonitrila: água (70:30)	Isocrático
(HAMDY; BELAL, 2014)	Zorbax SB-C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm)	Acetonitrila: 15 mM ortofosfato de di-hidrogenio de potássio (30:70 a 80:20)	Gradiente
	Kinetex-C ₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.3 μm)	Acetonitrila: 15 mM ortofosfato de di-hidrogenio de potássio (45:55)	Isocrático
(ZHANG et al., 2013)	Phenomenex Gemini C ₆ -phenyl (4.6 × 150 mm, 5 μm)	Tampão fosfato 0.01 M, pH 3,5, e acetonitrila	Gradiente
(GARCIA; COSTA; MENDEZ, 2012)	Shim-pack C ₈ (250 × 4.6 mm; 5 μm)	Metanol : água (75:25)	Isocrático
(CENDEJAS-BUENO et al., 2011)	Sunfire C ₁₈ (4.6 × 150 mm, 5 μm)	Acetonitrila: água (60: 0)	Isocrático
(KAHLE et al., 2009)	ReproSil-Pur Basic C ₁₈ (150 mm x 2 mm, 5 μm)	0.09 M fosfato de amônio monobásico:acetonitrila (50:50) (pH 5.3)	Isocrático
(GORDIEN et al., 2009)	Phenomenex Gemini C ₆ -Phenyl (4.6 × 150 mm, 5.0 μm)	Tampão fosfato 10 mM ajustado para 7 com ácido ortofosfórico concentrado (fase A), e misturado com acetonitrila (fase B)	Gradiente
(CHHUN et al., 2007)	Plus Satisfaction C ₈ (250 mm × 3 mm, 5 μm)	Tampão fosfato de sódio (0.04 M, pH 6.0): acetonitrila : água (45:52,5:2,5)	Isocrático
Benznidazol			
(MARSÓN et al., 2013)	Lichrospher-100 C ₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 5 μm)	Água:acetonitrila (80:20)	Isocrático
(MOREIRA et al., 2012)	Phenomenex Gemini-NX C ₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 4 μm)	Acetonitrila: água (60:40)	Isocrático
(GUERRERO et al., 2011)	Kromasil C ₁₈ (250 x 4.0 mm, 5 μm)	Água:acetonitrila (60:40)	Isocrático
(SILVA et al., 2007)	Lichrospher C ₁₈ (125 mm x 4,0 mm, 5 μm)	Acetonitrila: água (50:50)	Isocrático

Fonte: Autoria propria.

A maioria dos métodos desenvolvidos (Tabela 1) utilizaram acetonitrila (ACN) como componente da fase móvel, no entanto, Garcia, Costa e Mendez (2012), comprovaram que a estabilidade do fármaco POS pode ser afetada na presença deste modificador orgânico.

Com base nisso, esta pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento, otimização e validação de um novo método utilizando CLAE-DAD para a quantificação simultânea de BNZ e POS por meio de ferramentas de desenho experimental.

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 *Material*

O fármaco posaconazole (98 %) foi adquirido da Vanguard® e o benznidazol (99,3%) foi fornecido pelo Laboratório Farmacêutico Pernambucano (LAFEPE). O solvente metanol de grau utilizado foi de grau HPLC (JTBaker®). Peróxido de hidrogênio (Alphatec®), ácido acético glacial (Dinâmica®) e acetato de sódio triidratado (Sigma-Aldrich®) foram de grau analítico. A água foi purificada por sistema Milli-Q Plus (Millipore®), e valor de resistividade de 18.2 MΩ.cm a 25°C.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado para o desenvolvimento do método foi da Shimadzu® Prominence, equipado com bomba LC-20AT, unidade degaseificadora DGU-20A5R, autoamostra SIL-20A, detector de raio fotodiodo SPD-M20A PDA (Shimadzu®, Kyoto, Japan). O programa LC Solution foi utilizado para controlar o equipamento e calcular os dados e respostas obtidos.

O método por CLAE foi conduzido por meio de Coluna C₈ (Discovery®) com tamanho de partícula de 5 µm, diâmetro interno de 4,6 mm e comprimento de 250 mm. No início do desenvolvimento, utilizou-se a coluna C₁₈ (Zorbax®), com as mesmas especificações da coluna C₈, no entanto, devido à sua elevada apolaridade, o tempo de retenção do POS foi superior a 60 min (dados não mostrados).

Para filtrar e degaseificar o tampão acetado, utilizou-se a membrana de filtração de celulose (Millipore®) com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm, com auxílio de bomba à vácuo. As amostras foram filtradas a partir de filtros de seringa (Millipore®) de 0,22 µm de porosidade. As fases móveis e as amostras foram sonicadas por 10 min em Ultracleaner 800 (Unique®) antes das análises.

3.2.2.1 *Preparação do tampão para a fase móvel*

50 mM de solução de tampão acetato foi preparado, a partir de uma quantidade pré-calculada de trihidrato de acetato de sódio em 1000 mL de água purificada, e o pH ajustado utilizando ácido acético glacial. O tampão acetato foi filtrado através de filtro de 0,45 µm com o auxílio de bomba de vácuo. Posteriormente, a fase móvel foi desgaseificada por sonicação durante 30 minutos.

3.2.2.3 *Planejamento experimental*

Para selecionar as condições cromatográficas a serem utilizadas, foram eleitos três fatores importantes para o desempenho do método analítico adequado e, posteriormente, realizou-se a otimização do mesmo. Com a ajuda de um planejamento fatorial completo, pode-se analisar o efeito de todos os fatores independentes e a interação entre eles por meio de variações simultâneas. Três variáveis independentes [concentração de metanol (MeOH) na fase móvel (X_1 , % v / v), taxa de fluxo (X_2 , mL.min⁻¹) e pH do tampão de fase móvel (X_3)] foram selecionados para o modelo quadrático Fatorial Completo com três níveis (3^3), totalizando 27 corridas experimentais (Tabela 2). O efeito das variáveis nas respostas [tempo de retenção de BNZ (Y_1 , min), tempo de retenção de POS (Y_2 , min), resolução BNZ (Y_3) e resolução POS (Y_4)] foram avaliados quanto a significância dos fatores por meio de análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%. Foram utilizadas estatísticas de múltipla regressão para a construção de perfis de desejabilidade a fim de encontrar a melhor condição para o sistema cromatográfico. As análises foram conduzidas em ordem aleatória e os dados foram analisados usando o software StatSoft Statistica 12.0.

A menor diferença entre o nível -1 e o +1 em relação ao MeOH% é justificada pela ausência da retenção do fármaco BNZ na coluna cromatográfica quando a porcentagem de metanol é igual ou superior a 72%, com consequente descarte no volume morto (dados não mostrados).

Tabela 2 - Variáveis e níveis considerados para otimização do sistema cromatográfico.

Fatores		Níveis		
		Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (1)
Fatores Independentes	X ₁	65	68	71
	X ₂	0,8	1,0	1,2
	X ₃	2,5	3,5	4,5
Respostas	Y ₁	Menor possível		
	Y ₂	Menor possível		
	Y ₃	Maior possível (>2,0)		
	Y ₄	Maior possível (>2,0)		

Fonte: Autoria própria.

3.2.2.4 Validação

O método com as melhores condições foi validado de acordo com as recomendações internacionais para validação de métodos analíticos (FDA, 2015; ICH, 1996). Os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Este método envolve uma preparação simples e um processo de detecção estável.

3.2.2.4.1 Especificidade

Para demonstrar a especificidade do método, o fármaco POS foi submetido a condições aceleradas de degradação oxidativa mediante a adição de solução de peróxido de hidrogênio (3%) a um balão volumétrico de 25 mL contendo 10 mL de uma solução de POS a 100 µg/mL em metanol. Em seguida, esta solução foi diluída em conjunto uma alíquota de 1000 µg/mL de solução de BNZ para obter uma concentração final de 20 µg/mL de ambos os fármacos.

3.2.2.4.2 Adequabilidade do sistema

A adequação do sistema é utilizada para verificar se o sistema cromatográfico é adequado para a análise pretendida (USP 39, 2016). Para a adequação do sistema foram injetadas, no equipamento CLAE-DAD, soluções autênticas de POS a 20 µg/mL em

quintuplicata. A partir disso, avaliou-se os seguintes critérios de aceitação: área do pico, fator de cauda e o número de pratos teóricos.

3.2.2.4.3 Linearidade

As soluções-estoque de POS e BNZ na concentração de 1000 µg/mL foram preparadas em metanol, isoladamente. Estas soluções foram diluídas, de forma combinada, utilizando a mistura metanol:água (70:30) como diluente, obtendo-se as seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 30 e 50 µg/mL. Essa faixa foi estabelecida para abranger concentrações mais baixas até mais altas, com o objetivo de analisar simultaneamente BNZ e POS em sistemas de liberação de fármacos a serem desenvolvidos. Três réplicas autênticas das diluições foram injetadas e analisadas. A regressão linear e o coeficiente de determinação (r^2) foram determinados a partir da equação da reta traçada no gráfico entre a área do pico e a concentração.

3.2.2.4.4 Exatidão e Precisão

A exatidão foi determinada a partir da razão percentual da concentração medida ((média da concentração medida)/(concentração conhecida) x 100%). Utilizou-se três diferentes concentrações (10, 20 e 30 µg / mL) para ambos os fármacos em associação comparado aos padrões isolados, resultando em 9 determinações. Este processo foi realizado em triplicata. Os parâmetros de precisão foram baseados em repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia) para cada fármaco. Para ambos os experimentos, preparou-se seis soluções autênticas na concentração de 20 µg/mL. A área do pico foi mensurada e o percentual de desvio padrão relativo (%DPR) foi calculado.

3.2.2.4.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados pelo método sigma (σ). A fórmula para o cálculo do limite de detecção (LD) utilizado foi $LD = 3.3\sigma/IC$, onde σ é o menor valor de desvio padrão em resposta e IC é a inclinação da curva de calibração. Da mesma forma, o limite de quantificação (LQ) também foi calculado a partir da resposta de POS e BNZ. A fórmula para o cálculo da LQ utilizada foi $LQ = 10\sigma/IC$, utilizando as mesmas variáveis do limite de detecção.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Planejamento experimental

Os resultados das amostras experimentais estão listados na Tabela 3. Todas as condições de análise foram capazes de reter e separar os analitos. Os tempos de retenção (T_R) variaram de 2,98 a 4,73 para BNZ e 4,79 a 18,32 para POS. Os valores de resolução (R_s) variaram de 1,55 a 3,22 para BNZ e de 9,64 a 29,38 para POS.

Tabela 3 - Lote de corridas e resultados utilizando planejamento experimental fatorial completo.

Corridas ^a	Códigos dos fatores			Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	R _s (BNZ)	T _R (BNZ)	R _s (POS)	T _R (POS)
1	-1	-1	-1	1,76	4,46	15,45	9,96
2	-1	-1	0	2,16	4,73	27,72	17,82
3	-1	-1	1	3,22	4,72	29,38	18,32
4	-1	0	-1	2,15	3,6	16,27	7,8
5	-1	0	0	3,07	3,86	26,7	14,71
6	-1	0	1	2,57	3,74	26,44	13,97
7	-1	1	-1	2,13	3,12	14,97	6,96
8	-1	1	0	2,67	3,29	24,37	12,24
9	-1	1	1	2,64	3,18	25,51	12,5
10	0	-1	-1	2,2	4,46	13,52	8,24
11	0	-1	0	2,62	4,7	23,22	12,98
12	0	-1	1	3,05	4,69	24,17	12,97
13	0	0	-1	2,27	3,59	13,44	6,55
14	0	0	0	2,52	3,72	20,75	10,15
15	0	0	1	2,53	3,66	21,49	9,8
16	0	1	-1	1,62	2,99	11,77	5,57
17	0	1	0	2,5	3,22	20,04	8,75
18	0	1	1	2,25	3,05	18,81	8,29
19	1	-1	-1	1,97	4,45	11,98	7,39
20	1	-1	0	2,37	4,49	16,66	9,36
21	1	-1	1	2,72	4,55	18,69	9,73
22	1	0	-1	1,69	3,36	10,39	5,64
23	1	0	0	2,19	3,62	15,84	7,61
24	1	0	1	2,61	3,66	17,93	7,86
25	1	1	-1	1,55	2,98	9,64	4,79
26	1	1	0	2,44	3,19	16,31	6,79
27	1	1	1	2,19	3,03	15,86	6,51

Legenda: Experimentos realizados efetivamente de forma randomizada (^a).

Fonte: Autoria própria.

Os efeitos lineares e quadráticos de fatores independentes (entre -1 e 1 níveis) nas respostas foram analisados utilizando ANOVA fatorial (nível de confiança de 95%) como meio de estimar as principais variáveis de influência no desempenho cromatográfico (Tabela 4). Observou-se que a porcentagem de MeOH na fase móvel (X_1) desempenhou um papel importante na redução dos T_R de BNZ e, principalmente, de POS, para a qual a concentração de MeOH em fase móvel foi o fator mais significativo.

Tabela 4 - Média estimada dos efeitos a partir da influência de cada fator independente e suas interações de segunda ordem nas respostas obtidas a partir da análise dos resultados a partir do planejamento fatorial completo. Fatores de influência ($p > 0,05$) estão em negrito.

Fatores	Efeitos estimados			
	T_R (BNZ)	T_R (POS)	R_s (BNZ)	R_s (POS)
(X_1) MeOH (% v/v) (L)	-0,15189	-5,40000	-0,293333	-8,16778
(X_1) MeOH (% v/v) (Q)	0,00739	-0,74178	0,056667	-0,31611
(X_2) velocidade de fluxo (min.mL^{-1}) (L)	-1,46633	-3,81844	-0,231111	-2,61222
(X_2) velocidade de fluxo (min.mL^{-1}) (Q)	-0,20428	-0,61078	0,063333	0,02389
(X_3) pH do tampão da fase móvel (L)	0,14078	4,11667	0,715556	8,98333
(X_3) pH do tampão da fase móvel (Q)	0,13072	2,10989	0,220000	3,75056
X_1 (L) \times X_2 (L)	0,00450	1,00167	-0,196667	0,36333
X_1 (L) \times X_2 (Q)	-0,02608	0,20750	-0,105000	-0,18667
X_1 (Q) \times X_2 (L)	-0,04775	-0,03017	-0,201667	-0,61333
X_1 (Q) \times X_2 (Q)	0,00696	-0,01742	0,002500	-0,03917
X_1 (L) \times X_3 (L)	-0,00117	-2,29833	-0,013333	-2,36167
X_1 (L) \times X_3 (Q)	-0,03108	-1,20250	-0,005000	-1,36917
X_1 (Q) \times X_3 (L)	-0,01558	-0,41250	-0,101667	-0,30250
X_1 (Q) \times X_3 (Q)	0,00696	-0,03892	0,005000	0,28958
X_2 (L) \times X_3 (L)	-0,06950	-0,90833	-0,213333	-1,24833
X_2 (L) \times X_3 (Q)	0,04475	-0,23017	0,288333	0,23917
X_2 (Q) \times X_3 (L)	0,02192	-0,17750	-0,136667	-0,29750
X_2 (Q) \times X_3 (Q)	0,00071	0,08258	0,052500	-0,23542

Legenda: efeitos lineares (L); efeitos quadráticos (Q).

Fonte: Autoria própria.

Como esperado, os níveis mais altos de taxa de fluxo (X_2) também foram capazes de reduzir significativamente os T_R . Já o pH do tampão da fase móvel (X_3), afetou negativamente

os T_R , os quais foram aumentados em níveis de pH mais elevados. Além disso, uma interação de segunda ordem foi identificada na resposta de T_R de POS, em que os valores superiores do pH do tampão limitaram os benefícios da taxa de fluxo e da concentração de MeOH ($X_1 \times X_3$ e $X_2 \times X_3$).

Em relação ao fator de resposta de R_s , o pH do tampão foi a variável mais importante, pois níveis mais elevados de pH promoveram o aumento da distância entre os picos de POS e BNZ e deste em relação ao volume morto do cromatograma. Apesar da concentração de MeOH na fase móvel ter reduzido os T_R dos fármacos, ele também reduziu R_s dos picos. As interações de segunda ordem entre o pH do tampão e a concentração de MeOH quanto a resposta da R_s do POS também foram verificadas, indicando que, mesmo quando se trabalha com níveis mais altos de concentração de MeOH, o R_s mostrou-se reduzido pelo aumento do pH do tampão na fase móvel.

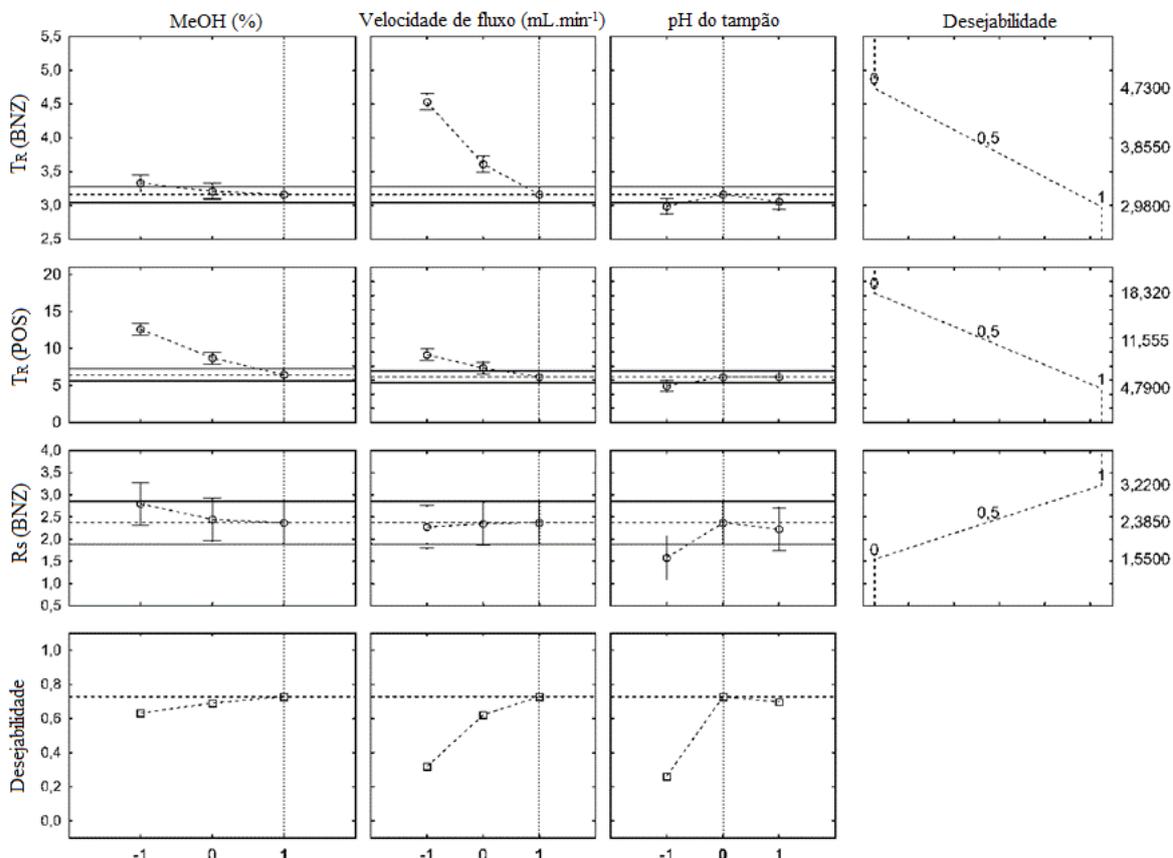
Uma vez que para o POS, os resultados de R_s estavam acima do mínimo desejado de 2,0, o fator de resposta da R_s deste fármaco foi removido de investigações adicionais, uma vez que todas as condições cromatográficas foram consideradas satisfatórias (POOLE, 2003).

3.2.3.1.1 Otimização do método através da função de desejabilidade

A fim de obter a melhor condição cromatográfica para o método, um estudo de desejabilidade foi conduzido de forma a consolidar o planejamento experimental. Os perfis dos valores previstos com as faixas dos níveis testados (-1, 0, 1) foram construídos com o objetivo de que o tempo total de corrida fosse tão baixo quanto possível e a R_s do BNZ fosse o mais alto possível (Figura 2).

Os valores de desejabilidade foram estabelecidos como 0, 0,5 e 1, onde 0 corresponde ao valor menos desejado e 1 ao melhor resultado obtido a partir do planejamento experimental. A função rastreou a maior desejabilidade (0,73) utilizando a taxa de fluxo máxima (1,2 mL.min⁻¹), concentração máxima de MeOH na fase móvel (71%) e nível médio do pH do tampão de fase móvel (3,5).

Figura 2 - Perfis para valores previstos e desejáveis. As barras indicam o intervalo de confiança (nível de confiança de 95%). A linha tracejada vertical indica a melhor condição encontrada que se adapta à função desejabilidade para todas as variáveis independentes.



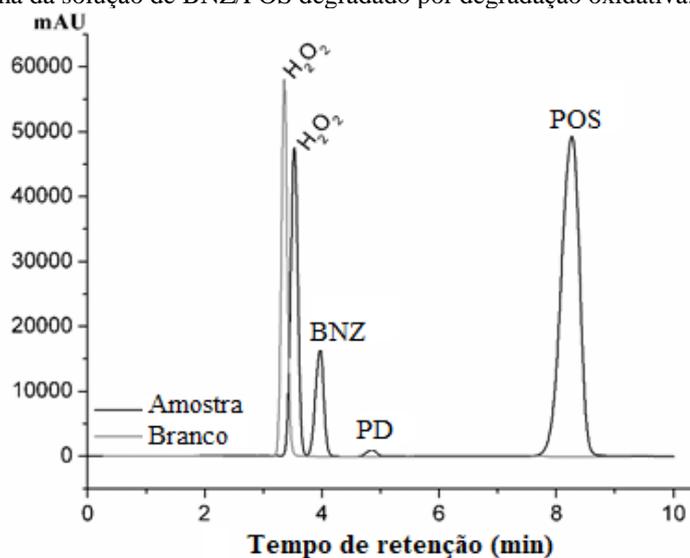
Fonte: Autoria própria.

3.2.3.2 Validação

3.2.3.2.1 Especificidade

A análise de especificidade está representada na Figura 3, a qual relaciona o cromatograma referente à solução contendo BNZ combinado ao produto de degradação (PD) do POS obtido por hidrólise oxidativa, o qual evidenciou picos separados de peróxido de hidrogênio, BNZ, PD e POS com resolução de 1,8, 3,1 e 7,1, respectivamente. Tais dados evidenciaram que a especificidade do método foi capaz de diferenciar estruturas similares, como o POS e seus PDs, o qual apresentou T_R de 4,4 minutos. Os PDs foram melhor identificados por meio de espectrometria de massa como evidenciado por Yang et al. (2016).

Figura 3 - Cromatograma da solução de BNZ/POS degradado por degradação oxidativa.



Fonte: Autoria própria.

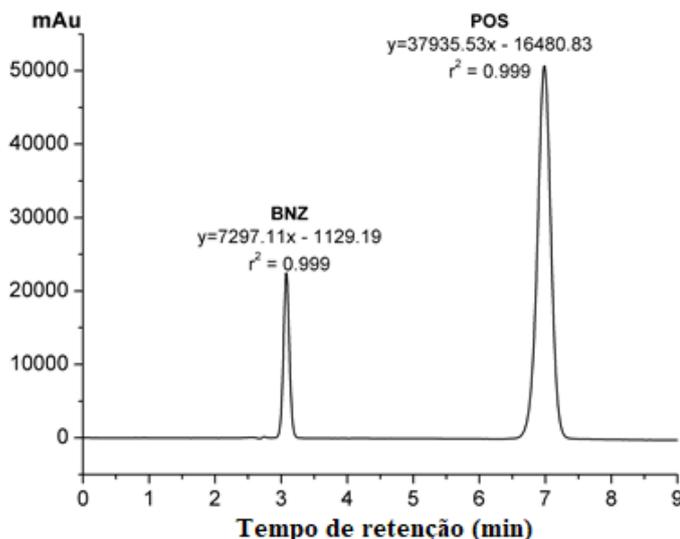
3.2.3.2.2 Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi avaliada e foram calculados a área do pico, o fator de cauda e o número de pratos teóricos dos picos, com resultados expresso em porcentagem de desvio padrão relativo (% DPR): 0,48, 0,33 e 0,58%, respectivamente. De acordo com a ICH (1996), tais análises devem conferir valores inferiores a 2%, o que evidenciou a boa resolutividade dos dados bem como a adequabilidade do sistema CLAE-DAD à análise proposta.

3.2.3.2.3 Linearidade

A curva de calibração padrão sobre a faixa de concentração das soluções de BNZ/POS de 5 a 50 µg/mL, forneceu coeficiente de determinação (r^2) de 0,999 para ambos os fármacos, o qual é um valor aceitável, de acordo com a ICH (1996), Figura 4. A partir da regressão linear das concentrações em relação ao sinal analítico obtido, encontrou-se as seguintes equações das retas: $y = 7297x - 1129$ e $y = 37935x - 16480$ para BNZ e POS, respectivamente. Assim, observou-se que as concentrações das soluções apresentaram correlação linear com as áreas dos picos. Tais dados são fundamentais para análise e identificação dos fármacos em sistemas desenvolvidos com ambos os fármacos.

Figura 4 - Cromatograma do método utilizado para a validação combinado com a equação da reta obtido por regressão linear.



Fonte: Autoria própria.

3.2.3.2.4 Exatidão e Precisão

A exatidão apresentou recuperação aceitável para POS e BNZ variando de 98,2 a 101,5 % e 98,1 a 101,0%, respectivamente. Em relação à precisão do novo método de validação, analisou-se % DPR dos resultados de precisão intra-dia e inter-dia, evidenciando variação de 1,60 e 1,42 % para BNZ e 1,69 e 1,64% para POS, respectivamente. Para tais análises, o valor de % DPR inerentes todas as amostras analisadas foi inferior a 2% (ICH, 1996), indicando uma ótima exatidão e precisão do procedimento analítico.

3.2.3.2.5 Limite de detecção e de quantificação

As menores concentrações em que o analito pode ser detectado e quantificado satisfatoriamente foram estimadas a partir do método sigma. Sobre o BNZ, este apresentou 0,92 e 2,80 $\mu\text{g/mL}$, e o POS apresentou 1,29 e 3,91 $\mu\text{g/mL}$ para os limites de detecção e qualificação, respectivamente. Desta forma, esse método foi capaz de detectar ambos os fármacos, mesmo em baixas concentrações.

3.2.4 Discussão

O planejamento experimental foi uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento e otimização do método de quantificação simultânea de BNZ/POS. O uso do modelo quadrático

fatorial completo foi capaz de identificar as influências existentes entre os fatores independentes, facilitando a observação do ponto ótimo das análises. O método otimizado foi obtido utilizando a fase móvel MeOH: tampão de acetato (pH 3,5) (71:29) sob fluxo de 1,2 mL.min⁻¹.

A taxa de fluxo e a proporção de MeOH, afetaram de forma significativa o T_R do BNZ, pois devido à baixa lipofilicidade ($\text{Log } P < 0,9$) do fármaco, o mesmo é facilmente arrastado com o aumento da porcentagem da fase orgânica. Já em relação à alteração do pH do tampão, reduzida influência foi observada. Isso ocorre porque o BNZ possui pK_a próximo a 12 (obtido pelo MarvinSketch 16.11.7), o qual está fora da faixa de pH avaliado, conseqüentemente, as alterações realizadas não conduziram à ionização do fármaco, permanecendo, o mesmo, inalterado em relação aos parâmetros avaliados. Esse fato explica a baixa variabilidade no T_R do BNZ no planejamento experimental, uma vez que o fármaco não ionizado pode ser retido por interações hidrofóbicas.

Já para T_R do POS, observou-se uma influencia sinérgica entre a proporção de MeOH e o pH do tampão, que contribuiu majoritariamente para a escolha do método. O POS é uma molécula altamente lipofílica [$\text{Log } P > 3$ contra $< 0,9$ (BNZ)] e níveis mais altos de modificadores orgânicos, como a proporção de MeOH na composição da fase móvel, foram capazes de aumentar a eficiência cromatográfica para separar POS em tempos de retenção mais curtos, inferiores a 10 minutos. MeOH, bem como acetonitrila, tem sido amplamente aplicado em sistemas cromatográficos tanto para POS (HAMDY; BELAL, 2014; ROCHAT et al., 2010) como para BNZ (SILVA et al., 2007), mas para o primeiro o uso de acetonitrila compromete a estabilidade (GARCIA; COSTA; MENDEZ, 2012).

Outro importante variável para o T_R do POS, foi o pH do tampão utilizado. De acordo com Engelhardt et al., (2005), o pH deve ter pelo menos 2 unidades de diferença em relação ao pK_a do soluto, o qual estará na forma ionizada, uma vez que o grau de ionização depende do pK_a do composto e do pH da fase móvel, o último sendo ajustado adequadamente ao valor desejado. A forma ionizada pode prejudicar a retenção de fármacos por grupos hidrofóbicos presentes na coluna cromatográfica utilizada. No entanto, com a adição de metanol, tanto o pH da fase móvel hidroorgânica como o pK_a do analito irão modificar e, portanto, também o grau de ionização do analito. Para os fármacos básicos, como POS, o aumento da fração de metanol leva ao aumento do pH da fase móvel (para aproximadamente 6,0) e à diminuição do grau de ionização (LEUNG; POULAKOS; MACHIN, 2015; SUBIRATS; BOSCH, 2007). Pelo fato deste fármaco possuir pK_a de 3,6 e 4,6, ele seria facilmente ionizado ao longo da faixa de pH

utilizado, o que não aconteceu pelo aumento do pH na presença de metanol. Este fato explica a influência do POS ao baixo pH em relação à proporção de MeOH da fase móvel evidenciado pelo planejamento experimental.

Diante do exposto, o melhor conhecimento do método por ferramentas de planejamento experimental foi capaz de selecionar e definir os parâmetros ideais de para posterior validação.

O sistema utilizado foi capaz de responder adequadamente ao método proposto a partir da análise de adequabilidade do sistema, o qual garantiu o bom desempenho para o fornecimento de resultados seguros sobre os parâmetros utilizados para a validação do método. No que diz respeito ao método de validação, este demonstrou ser específico para a quantificação de BNZ e POS, mesmo com a presença de compostos de estruturas similares, como os produtos de degradação do POS, uma vez que os picos dos fármacos apresentaram alta R_s garantindo a separação total de outros, principalmente o peróxido de hidrogênio.

Além disso, observou-se que as concentrações das diluições apresentaram uma correlação linear com a área dos picos cromatográficos dentro do intervalo proposto, bem como reduzidos limites de detecção e quantificação para ambos os fármacos. Tais dados puderam ser obtidos com exatidão e precisão, como determinado por análises intra- e interdia.

Assim, o método apresentado tem grande importância para detectar os fármacos em questão, bem como algumas impurezas em futuros produtos a serem desenvolvidos com ambos. Com base nisso, a quantificação feita de forma simultânea reduzirá o tempo gasto com o processo, o volume de solvente utilizado e, conseqüentemente, o custo total envolvido.

3.2.5 Conclusão

O novo método de quantificação simultânea de BNZ/POS foi desenvolvido e otimizado com o uso da ferramenta estatística usando ANOVA fatorial (95% de nível de confiança). O planejamento experimental teve um papel fundamental para o conhecimento sobre o desenvolvimento do método, bem como os fatores de influência presentes, como o pH do tampão e a proporção da fase orgânica. Isso proporcionou a escolha do melhor método contendo a fase móvel MeOH:tampão de acetato (pH 3,5)(71:29) sob $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o qual possui ótima resolução, reduzido tempo de análise, além de eficiência e especificidade mesmo na presença de produtos de degradação do POS. Desta forma, o método proposto mostrou-se adequado para a quantificação dos fármacos em futuros sistemas de liberação evidenciando uma ótima

alternativa para obter análises mais rápidas e baratas, pois ainda não há um método simultâneo de ambos, POS e BNZ.

REFERÊNCIAS

BHATT, D. A.; RANE, S. I. QbD approach to analytical RP HPLC method development and its validation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 179–187, 2011.

CÁCERES, D. H. et al. Revista Iberoamericana de Micología Estandarización y validación en Colombia de una metodología basada en HPLC para la determinación de la concentración sérica de posaconazol. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 4, p. 230–236, 2016.

CENDEJAS-BUENO, E. et al. HPLC / UV or bioassay : two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 12, p. 1229–1235, 2011.

CHHUN, S. et al. Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 223–228, 2007.

ENGELHARDT, H.; BLAY, C.; SAAR, J. Reversed Phase Chromatography – the Mystery of Surface Silanols. **Chromatographia**, v. 62, p. 19–29, 2005.

FDA. **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry**. 2015

GARCIA, C. V.; COSTA, G. R.; MENDEZ, A. S. L. Sci Pharm Stability-Indicating HPLC Method for Posaconazole Bulk Assay. **Scientia Pharmaceutica**, n. 80, p. 317–327, 2012.

GORDIEN, J. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Simultaneous determination of five systemic azoles in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 932–938, 2009.

GUERRERO, L. et al. A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 1, p. 77–82, 2011.

HAMDY, D. A.; BELAL, T. S. A Comparative Study of Newly Developed HPLC-DAD and UHPLC-UV Assays for the Determination of Posaconazole in Bulk Powder and Suspension Dosage Form. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, 2014.

ICH. **Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures : Methodology**. 1996.

KAHLE, K. et al. Simultaneous Determination of Voriconazole and Posaconazole

Concentrations in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography □. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 3140–3142, 2009.

LEUNG, S.; POULAKOS, M. N.; MACHIN, J. Posaconazole: An Update of Its Clinical Use. **Pharmacy**, n. 3, p. 210–268, 2015.

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

MOREIRA, R. et al. Preclinical Monitoring of Drug Association in Experimental Chemotherapy of Chagas ' Disease by a New HPLC-UV Method. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3344–3348, 2012.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease : an update on therapeutics , prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v. 10, n. 3, p. 465–481, 2015.

POOLE, C. F. **The Essence of Chromatography**. 1. ed. Detroit: Elsevier, 2002.

ROCHAT, B. et al. Ultra-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Sensitive Bioassay Methods for Quantification of Posaconazole Plasma Concentrations after Oral Dosing. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5074–5081, 2010.

SHIVHARE, M.; MCCREATH, G. Practical Considerations for DoE Implementation in Quality By Design. **Bioprocess Technical**, p. 25–30, 2010.

SILVA, A. L. M. et al. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para a doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163–1166, 2007.

SUBIRATS, X.; BOSCH, E. Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography XVII Estimation of the pH variation of aqueous buffers with the change of the methanol fraction of the mobile phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, p. 203–215, 2007.

TALAVIYA, S.; MAJMUDAR, F. Analysis of antifungal agents by RP_HPLC: a review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 12, p. 397–409, 2014. USP 39. Chromatography. In: **United State Pharmacopeia**. Rockville, v. 1, 2017.

YANG, Y. et al. Stability-indicating HPLC method development and structural elucidation of novel degradation products in posaconazole injection by LC–TOF/MS, LC–MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2016.

ZHANG, M. et al. A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Three Triazole Antifungals in Human Plasma. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 484–489, 2013.

3.3 ARTIGO 3: DESENVOLVIMENTO DE NOVOS CRISTAIS POSACONAZOL: BENZNIDAZOL PARA O INCREMENTO DE SOLUBILIDADE E VELOCIDADE DE DISSOLUÇÃO.

3.3.1 Introdução

Engenharia de cristais tem sido utilizada como um método para alteração cristalina de materiais capaz de alterar propriedades físicas dos materiais pela criação de novas formas de estado sólido, tais como solvatos, polimorfos, soluções sólidas, misturas eutéticas e cocristais. A alteração destas propriedades possui grande relevância para a performance de fármacos. Isto inclui a modificação da solubilidade aquosa, da faixa de dissolução e da estabilidade física sem afetar a atividade farmacológica intrínseca da molécula (DELORI et al., 2014; DUGGIRALA et al., 2016).

A principal técnica experimental utilizada para o desenvolvimento de novos cristais é a cocrystalização através do qual moléculas neutras, sólidas a temperatura ambiente, cristalizam juntas em quantidades estequiométricas para formar complexos moleculares através de ligações de hidrogênio, ligações de halogênios e interações pi-pi entre os fármacos e cofôrmers (excipientes). Assim, a formação de cristais utilizando multicomponentes dependem da natureza dos componentes e do tipo de interações intermoleculares (CHERUKUVADA; ROW, 2014; DELORI et al., 2014; PATIL; UJALAMBKAR; MAHADIK, 2017).

O entendimento da hierarquia entre os grupos funcionais na presença de outros é a chave para controlar não somente a estequiometria dos cocristais, mas também controlar sua existência. Coformadores contendo ácidos carboxílicos tem sido amplamente utilizado pra obtenção de cocristais por ser bom acceptor e doador de elétrons, importante para a formação de ligações de hidrogênio (DUGGIRALA et al., 2016; SHEVCHENKO et al., 2013).

Assim, o trabalho visou o desenvolvimento de novos cristais envolvendo os fármacos posaconazol e benznidazol por meio da cocrystalização, utilizando ácidos succínico e fumárico como coformadores, a fim de incrementar a solubilidade e dissolução dos mesmos, alcançando um sistema de coliberação com potencial utilidade para a terapia antichagásica.

3.3.2 Metodologia

3.3.2.1 Cocrystalização

Os cristais contendo POS ($\geq 98\%$ de pureza, Vanguard®, pKa = 3,6 e 4,6) e BNZ (99,3% de pureza, adquirido do LAFEPE, pka = 12) foram obtidos pela técnica de moagem assistida por líquido em que os fármacos foram adicionados a um gral de vidro juntamente com um coformador, ácido fumárico (pka = 3 e 4,5) ou succínico (4,2 e 5,6). Estes ácidos dicarboxílicos foram selecionados pela presença de grupos tanto doadores (-OH) como aceptores (C=O) de prótons. As proporções utilizadas foram de 2:1:2 (mol:mol) de POS, BNZ e ácido, respectivamente. A proporção dos fármacos está em acordo ao estabelecido em estudos anteriores e estão compatíveis com a dosagem estabelecida para terapia anti-chagásica (FIGUEIRÊDO et al., 2017). Posteriormente, o pó foi molhado com metanol (Vetec ®) para a amostra com ácido fumárico ou dimetilformamida (Dinâmica ®) para a amostra com ácido succínico. Os materiais foram submetidos a moagem por 15 min utilizando pistilo de vidro, mantendo-se a consistência de pasta durante todo o processo (SHETE et al., 2015). As amostras foram secas em estufas à vácuo a 40 °C durante 48 horas para evaporação total do solvente.

3.3.2.2 Caracterização dos sistemas

As amostras POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS foram caracterizadas pelas técnicas de FTIR, Microscopia RAMAN, análise térmica (DSC/TG), DRX, MEV e ensaio de dissolução.

Para analisar as interações químicas formadas, a análise por FTIR foi realizada utilizando equipamento Spectrum (PerkinElmer®, Model 1600) com reflectância total atenuada (ATR). Estabeleceu-se a faixa de análise de 650 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} .

Para avaliar a microestrutura das amostras POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS, o pó foi inserido sobre uma lâmina de vidro e examinado através da microscopia Raman Confocal, instrumento WITec alpha300 S, equipado com laser a 532 nm (potência de 100 mW) e lente objetiva de 20x. Com tempo de integração de 0,01 segundo, foram adquiridas imagens 50 x 50 μm (100 x 100 pontos).

Os fármacos POS e BNZ foram mapeados quanto a identificação de bandas vibracionais distintas relativas a determinados grupos funcionais nos seus espectros de Raman. Através destes dados, a organização dos fármacos na microestrutura pôde ser visualizada.

Para a análise das estruturas cristalinas dos materiais, os difratogramas foram obtidos por meio do equipamento LabX - XRD 600 (Shimadzu®) com corrente de 30 mA, voltagem de 40kV e radiação $\text{CuK}\alpha$. As análises foram realizadas com 2θ na faixa de 5 a 50° e varredura de 2°/min.

A morfologia superficial dos materiais foi analisada por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em equipamento FEI (QUANTA FEG 250®). As amostras foram inseridas na superfície de fitas de carbono e metalizadas com camada de ouro durante 15 min. Fotomicrografias foram capturadas a 5 kV com a magnitude de 10000 e 50000 vezes.

Para a avaliação das características térmicas das amostras, as análises de DSC e TG foram realizadas em equipamento SDT Q600 V20.9 (TA instruments®). Cada amostra (aproximadamente 5 mg) foi alocada em panela de alumínio, posteriormente selada, sob atmosfera de nitrogênio (100 mL/min) na razão de 10°C/min. A calibração foi devidamente realizada utilizando oxalato de cálcio mono-hidratado.

Para analisar o perfil de dissolução dos fármacos, as amostras foram submetidas ao ensaio de dissolução em condição sink, em que o volume de saturação é pelo menos três vezes maior que a concentração dos fármacos (USP, 2018). O correspondente a 40 mg de POS e 7,4 mg de BNZ presentes nos cristais foram utilizados para o ensaio. Para isso, utilizou-se o dissolutor VK7000 (Varian ®) e aparato tipo pá, sob agitação de 100 rpm, volume de 450 mL de tampão pH 1,2 (USP 41), a 37°C. Alíquotas de 3 mL foram retiradas nos tempos pré-determinados (5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min), filtradas em filtro de porosidade de 0,45 µm (PVDF) e inseridas em vials de vidro de 1,5 mL. 20 µL das alíquotas foram injetadas CLAE-DAD (coluna Discovery ® C8 250 x 4,6 mm, 5 µm) utilizando como fase móvel MeOH:Tampão acetato pH 3,5 (71:29) em fluxo de 1,2 mL/min e suas concentrações mensuradas a 260 nm (SANTANA et al., 2018).

A fim de comparar a liberação dos cristais e fármacos isolados, a análise das cinéticas de liberação foi realizada utilizando-se as equações de zero ordem e primeira ordem. Além disso, a eficiência de dissolução foi mensurada. As fórmulas utilizadas foram expostas na Tabela 1.

Tabela 1 - Modelos cinéticos utilizados para avaliação da dissolução dos fármacos POS e BNZ.

Modelo cinético	Fórmulas
Zero ordem	$C_t = C_0 + k.t$
Primeira ordem	$C_t = 100. (1 - e^{-k.t})$
Eficiência de dissolução (ED%) (até 240 min)	$ED \% = \frac{\text{Área sob a curva até tempo desejado}}{\text{Área retangular total}} \times 100$

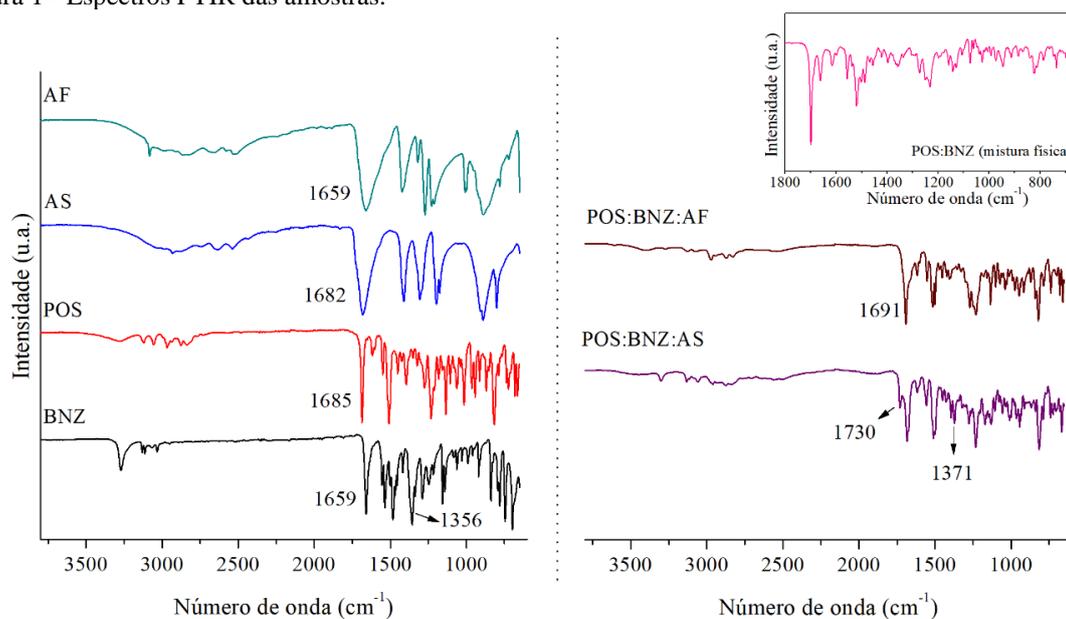
Legenda: C_t é concentração nos tempos selecionados; C_0 é a concentração inicial; k é a constante de liberação; t é o tempo do fármaco dissolvido em solução.

Fonte: SINKO (2008); USP (2018).

3.3.3 Resultados e Discussão

Após a preparação das amostras, os cristais foram avaliados quanto as interações químicas envolvidas na formação dos mesmos, comparando-os aos materiais de partida, por análise do FTIR, Figura 1.

Figura 1 - Espectros FTIR das amostras.



Fonte: Autoria própria.

O espectro FTIR do POS evidencia bandas características de absorção em 1685 e 1509 cm^{-1} as quais estão relacionadas à deformação axial dos grupamentos C=O e CO-N-, respectivamente. As bandas presentes entre 1620 e 1430 cm^{-1} correspondem à deformação axial dos grupos C=N e C=C. Além disso, foi detectado bandas fortes em 1232 e 1135 cm^{-1} referentes aos estiramentos de C-F da arila e C-O, respectivamente. Já em frequências mais elevadas, nota-se a presença da deformação de C-H aromático (PATIL; UJALAMBKAR; MAHADIK, 2017; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

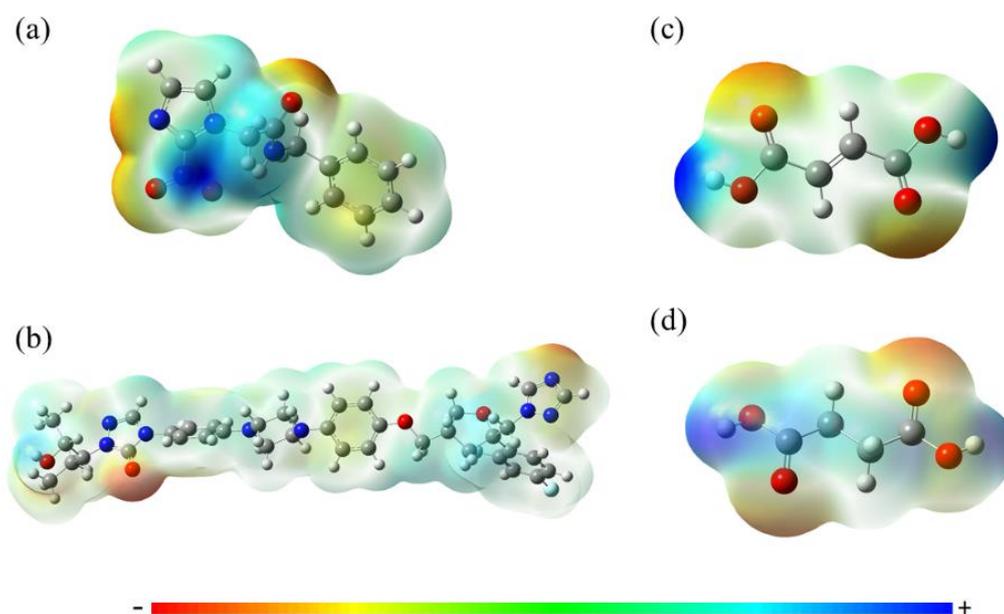
Em relação ao fármaco BNZ, ele apresentou bandas de absorção características em 3271 cm^{-1} referente à deformação axial de N-H entre 3000 e 3130 cm^{-1} devido a deformações axiais simétricas e assimétricas referentes C-H aromático, respectivamente. Em 1659, 1553 e 1157 cm^{-1} , nota-se a presença de deformação axial de C=O, N-H (relacionada amida secundária) e C-O, respectivamente. Bandas de absorção em 1536 e 1356 cm^{-1} foram observadas as quais se referem a deformação axial assimétrica e simétrica do grupo nitro (-NO₂) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; SOARES-SOBRINHO et al., 2012).

Para o espectro FTIR de AS e AF, evidencia-se bandas largas características aos ácidos carboxílicos entre 2500 e 3300 cm^{-1} referente a deformação axial de O-H. AS apresentou bandas em 1682 e 1410 cm^{-1} correspondente à deformação de C=O e C-H alifático, respectivamente. Já AF, apresentou bandas características em 3083 e 1659 cm^{-1} referentes ao estiramento C=C e C=O, respectivamente (PATIL; UJALAMBKAR; MAHADIK, 2017).

No espectro da mistura física, houve somente a sobreposição de picos inerente aos fármacos (Figura 1). Além disso, nesta mistura e em ambos os cristais obtidos (POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS) houve a predominância de bandas vibracionais de POS devido, provavelmente, à maior quantidade deste fármaco em detrimento de BNZ e dos coformadores durante a produção dos cristais.

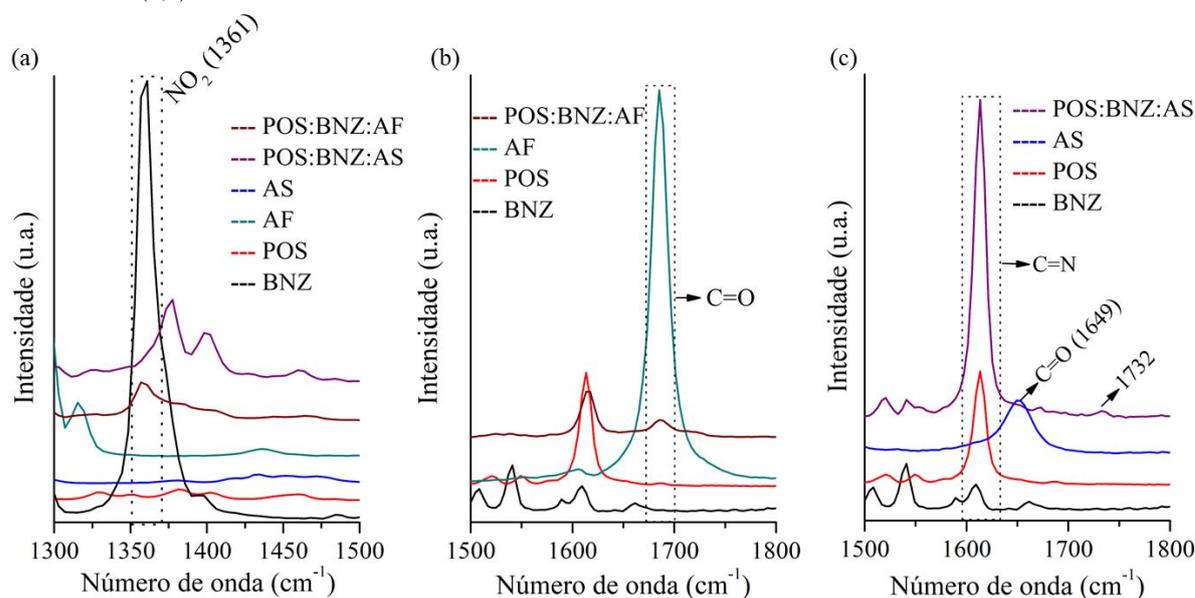
Em relação ao cristal POS:BNZ:AF, nota-se o aparecimento de deformação de C=O em 1691 cm^{-1} , superior às bandas apresentadas pelos materiais isolados, com possível interação entre os componentes. Observa-se ainda que para este cristal a banda intensa em 1356 cm^{-1} referente grupo nitro foi ausente, sugerindo que tal grupamento participou da interação. De acordo com a Figura 2, tal região possui maior caráter eletropositivo, Figura 2(a), podendo interagir com regiões mais eletronegativas das moléculas do ácido, Figura 2 (c) e 2(d), e/ou do POS, Figura 2(b), por atração eletrostática por interação dipolo-dipolo. Tal fato pode ser ainda observado no espectro Raman com uma banda discreta em 1356 cm^{-1} , Figura 3(a).

Figura 2 - Mapa do potencial eletrostático dos fármacos (a)BNZ, (b) POS, (c)AF e (d) AS. As cores representam as densidades de cargas negativas (vermelho) e positivas (azul). Imagens obtidas utilizando o programa Gaussview.



Fonte: Autoria própria.

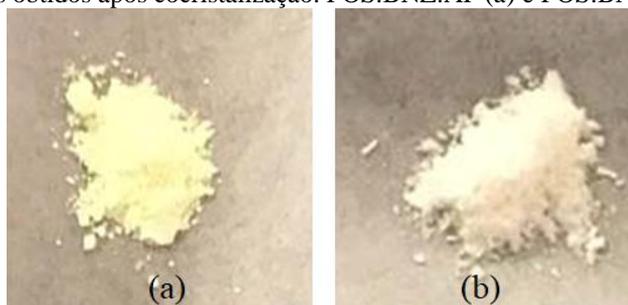
Figura 3 - Espectro Raman das amostras engobando faixas com bandas características aos materiais: 1300-1500 (a) e 1500-1800 (b,c).



Fonte: Autoria própria.

Outro tipo de interação pode ser inferida por meio da coloração do cristal POS:BNZ:AF. Na Figura 4(b), nota-se a modificação da coloração deste cristal em relação aos componentes isolados, de branco para amarelo durante a cocristalização. Comportamento semelhante foi visualizado por Figueirêdo e colaboradores (2017) que demonstrou que tal alteração foi devido a interações pi-pi formadas entre os anéis aromáticos dos fármacos POS e BNZ.

Figura 4 - Imagens dos pós obtidos após cocristalização. POS:BNZ:AF (a) e POS:BNZ:AS (b).



Fonte: Autoria própria.

Em relação ao cristal POS:BNZ:AS, é notável o deslocamento da banda de absorção de C=O para frequências mais elevadas em 1730 cm⁻¹, tal fato pode ser explicado por estudos realizados por Shevchenko e colaboradores (2013) em que a maioria dos ácidos dicarboxílicos, como AF e AS, apresentam ligações intermoleculares encadeadas por ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila vizinhos, para os quais as carbonilas (C=O) atuam como aceptores e

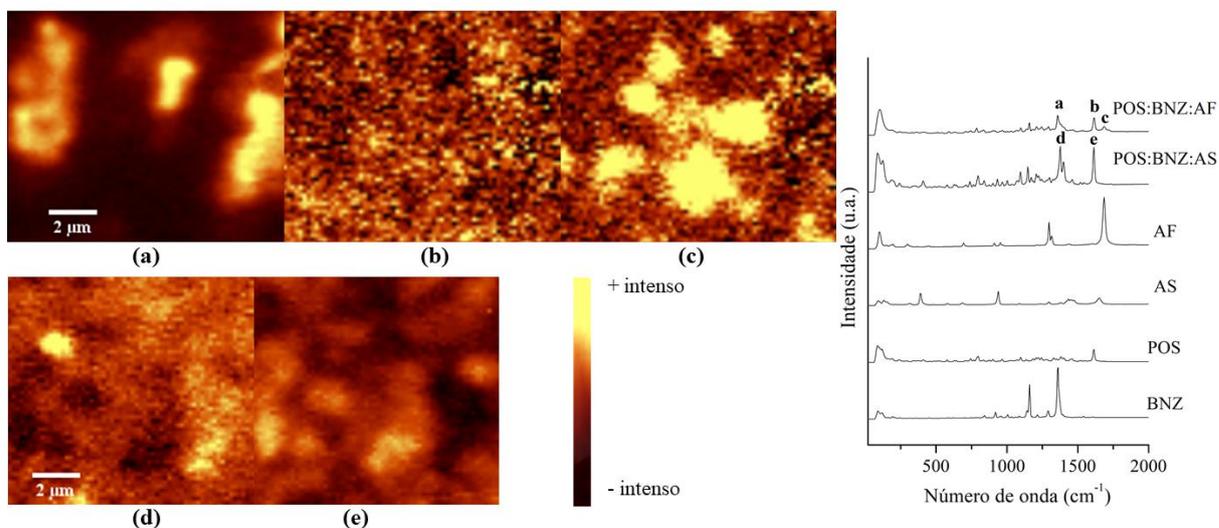
as hidroxilas (-OH) atuam como receptores de elétrons. No entanto, quando há a formação de cocristais, como no caso do itraconazol (análogo do POS) e AS, interações de hidrogênio são estabelecidas entre os grupos -OH e o grupo 1,2,4-triazol do fármaco, deixando o grupo C=O do ácido livre de interações. Desta forma, ocorre o deslocamento do número de onda deste para frequências mais elevadas. Tal fato, pode ainda ser corroborado com a análise do espectro Raman, Figura 3(c), em que carbonila livre do ácido pode ser notada em 1732 cm^{-1} . Além disso, esta interação pode ter impedido a aproximação dos fármacos POS e BNZ para a promoção das interações pi-pi, não havendo a alteração da cor após cocrystalização, Figura 4(a).

Outra banda de carbonila foi apresentada em 1683 cm^{-1} similar ao POS, no entanto a banda de carbonila característica ao BNZ foi ausente, a qual pode ter sido deslocada a regiões de frequências mais elevadas devido a possíveis interações envolvendo tal grupamento. Além disso, observou-se que a banda em 1356 cm^{-1} foi deslocada para 1371 cm^{-1} sugerindo-se uma possível interação eletrostática (dipolo-dipolo) com grupos mais eletronegativos do ácido succínico e do POS, Figura 2(c) e 2(d).

Para observar a disposição de cada componente nos cristais, a microscopia por Raman confocal foi utilizada de acordo com os grupamentos químicos correspondentes (Fig.5). No material POS:BNZ:AF, observa-se áreas concentradas de BNZ em porções da região analisada na frequência de NO_2 , Figura 5(a), ao contrário do POS, o qual está bem distribuído em toda a área analisada, Figura 5(b). Foi possível ainda determinar a distribuição do AF, Figura 5(c) que apresentou maior intensidade, principalmente, nas regiões ao redor do BNZ, mantendo também contato com POS.

Em relação a POS:BNZ:AS, os fármacos BNZ, Figura 5(d) e POS, Figura 5(e) apresentaram boa distribuição ao longo da região analisada, evidenciando a presença de ambos os fármacos localizados de forma semelhante. Este comportamento se diferencia do apresentado por Figueirêdo e colaboradores (2017) que desenvolveu uma mistura eutética contendo BNZ:POS, o qual mostrou microestrutura em formato laminar com alternância dos fármacos, típico desta forma cristalina, que se deve à inclusão do componente minoritário entre o majoritário. Desta forma, sugere-se que o cristal POS:BNZ:AS seja um cocrystal devido a miscibilidade do sistema a nível molecular em estado sólido (SHETE et al., 2015). AS não foi analisado devido a baixa intensidade da C=O característico, Figura 3(c).

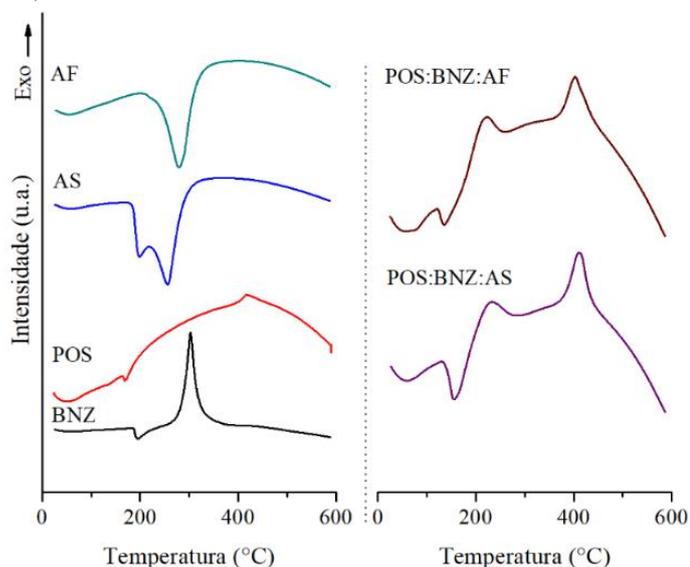
Figura 5. Microscopia Raman confocal das análise de acordo com os picos caracterícos dos materiais obtidos pelo espectro dos cristais POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS. Faixa de frequência utilizadas: 1346-1386 cm^{-1} (a), 1539-1646 cm^{-1} (b), 1666-1712 cm^{-1} (c), 1340-1393 cm^{-1} (d) e 1593-1639 cm^{-1} (e).



Fonte: Autoria própria.

Além disso, as amostras foram analisadas quanto ao perfil térmico, evidenciado na Fig. 6 e Tabela 2. Na análise do DSC, POS apresentou evento de fusão máximo em 170,2 $^{\circ}\text{C}$ (-5,2 J/g) e BNZ em 194,8 $^{\circ}\text{C}$ (-23,6 J/g). Em relação ao AS, dois eventos endotérmicos conectados foram observados, com máxima absorção de energia em 199,0 $^{\circ}\text{C}$ e outro em 256,1 $^{\circ}\text{C}$ referentes aos eventos de fusão e evaporação do ácido. Já o ácido fumárico sofreu sublimação, com início próximo a 200 $^{\circ}\text{C}$ (CAIRES et al., 2010; FIGUEIRÊDO et al., 2017; LOHBECK et al., 2012).

Figura 6. DSC dos fármacos, cofômeros e cristais obtidos.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2. Temperaturas iniciais (T_{inicial}), finais (T_{final}) e a de máxima ($T_{\text{pico máx.}}$) bem como a entalpia envolvida (ΔH) no perfil térmil das amostras.

Amostras	T_{inicial}	T_{final}	$T_{\text{pico máx}}$	ΔH (J/g)
POS	162,4	191,2	170,2	-5,7
BNZ	180,6	236,0	194,8	-23,6
AS	144,1	329,0	199,0/256,1	-309,7
AF	198,3	351,6	280,1	-176,1
POS:BNZ:AF	121,6	170,7	136,7	-7,4
POS:BNZ:AS	129,0	188,8	156,0	-15,6

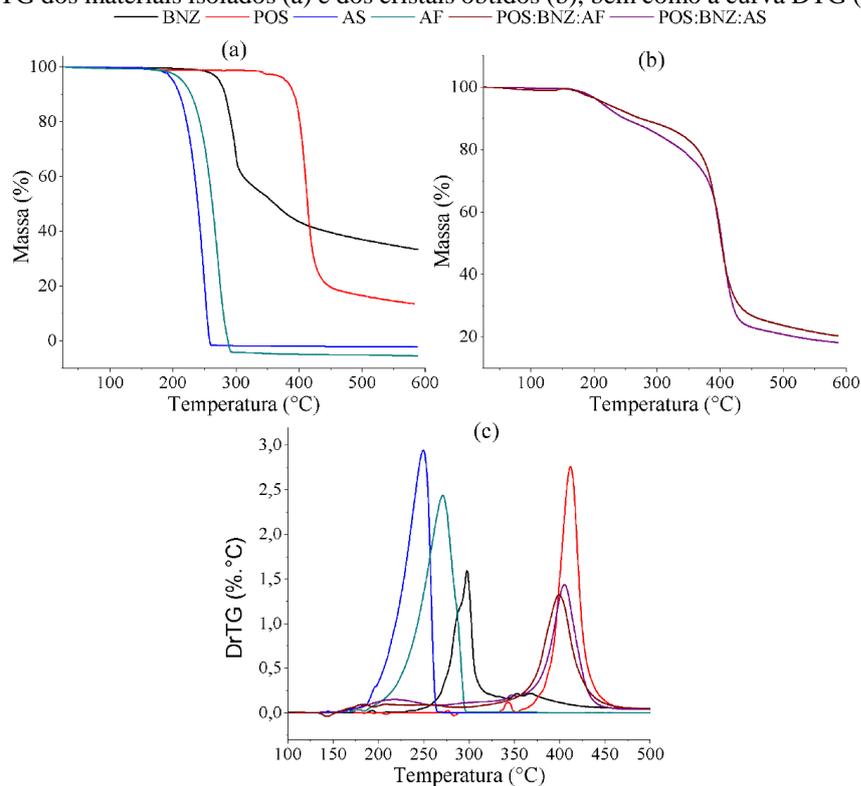
Fonte: Autoria própria.

Em relação às amostras POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS, houve uma antecipação do evento de fusão dos fármacos e coformadores com a unificação dos mesmos (Figura 6). Em POS:BNZ:AF, T_{inicial} foi em 121,6 °C com $T_{\text{pico máx}}$ em 136,7 ° (7,4 J/g) e em POS:BNZ:AS T_{inicial} foi em 129,0 °C com $T_{\text{pico máx}}$ em 156,6 ° (14,6 J/g), Tabela 2. Tal antecipação está relacionada à quebra das interações entre os materiais, uma vez que POS:BNZ:AF foi composto por interações dipolo-dipolo (mais fracas) tendendo a ruptura em temperaturas mais baixas do que as ligações de hidrogênio (mais fortes) apresentadas pelo POS:BNZ:AS, como evidenciado pelas análises de FTIR e RAMAN. Além disso, observa-se que esta característica térmica não foi acompanhada de perda de massa, Figura 7(a), descartando solvatação dos cristais pelos solventes utilizados no processo.

Ao analisar a decomposição dos cristais, nota-se a completa perda dos cofômeros após 200 °C, com início em 140 °C para AS e 149 °C para AF, Figura 7(b), e DTG máximo em 249 e 271 °C, Figura 7(c), respectivamente. Já os fármacos isolados apresentaram início da degradação em 209 °C para BNZ e 312 °C para POS.

Em relação aos cristais, POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS tiveram degradação inicial em 152 °C, em ambos, evidenciando início de perda de massa acima do observado pelos cofômeros isolados. Este primeiro evento foi até 294 e 286 °C com perda de massa de 11,3 e 13,4% para POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS, respectivamente, ocasionada, principalmente pela evaporação dos ácidos, uma vez que os mesmos correspondem a cerca de 12,3 % em massa nos cristais obtidos. O segundo evento da curva TG, para ambos os cristais, foram referentes à completa carbonização da matéria orgânica, no entanto, ao analisar a curva DTG, é notável o aumento da estabilidade térmica do BNZ para temperatura superior a 400 °C, similar ao POS.

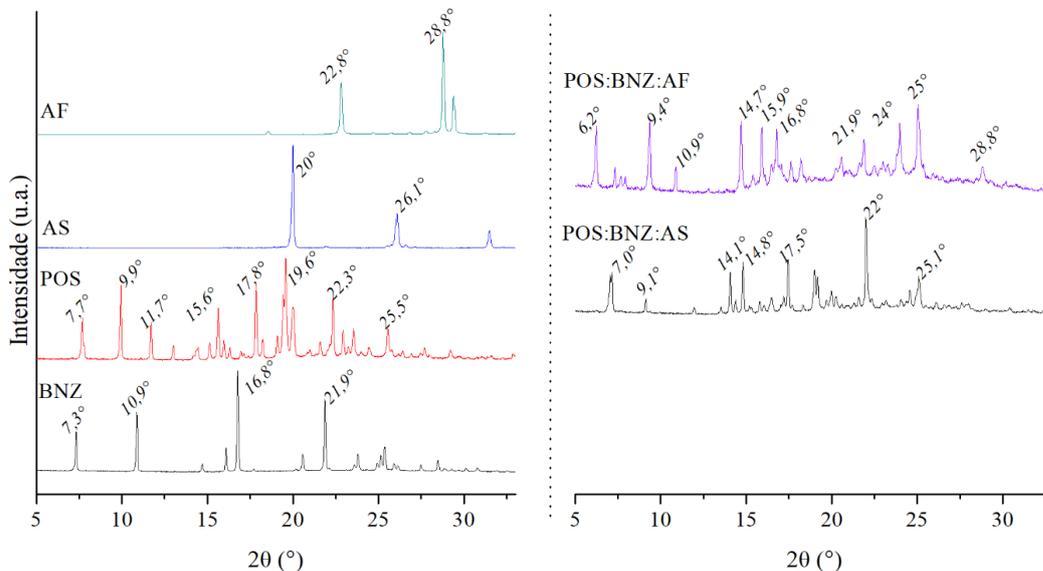
Figura 7 - Curva TG dos materiais isolados (a) e dos cristais obtidos (b), bem como a curva DTG (c) das amostras.



Fonte: Autoria própria.

A cristalinidade dos fármacos e cofêrmers puros e dos cristais obtidos foi analisada por meio da técnica de DRX (Figura 8), rotineiramente empregada para a caracterização de cocristais um vez que estes tendem a apresentar distintos perfis cristalinos em relação aos materiais de partida, ao contrário das misturas eutéticas (CHERUKUVADA, 2016).

Figura 8 - DRX dos materiais utilizados.

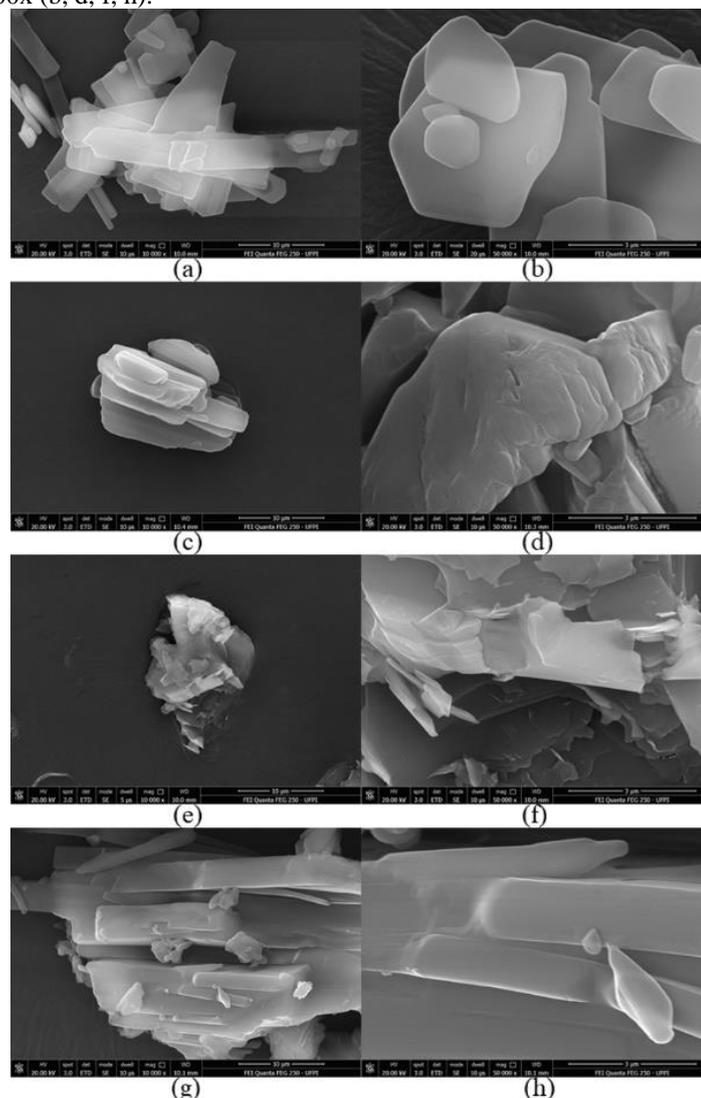


Fonte: Autoria própria.

O fármaco BNZ possui perfil cristalográfico bem definido com picos de elevada intensidade em $7,3^\circ$, $10,9^\circ$, $16,8^\circ$ e $21,9^\circ$ (Figura 7), indicando comportamento cristalino (SOARES-SOBRINHO et al., 2012), comprovada por sua morfologia superficial na forma de cristais regulares, visualizados por imagens obtidas por MEV, Fig. 8c e 8d. POS também apresentou perfil cristalográfico com picos característicos em $7,7^\circ$, $9,9^\circ$, $15,6^\circ$, $17,8^\circ$, $19,6^\circ$ e 22° , (TANG et al., 2016), Figura 8. Tal perfil pode ser ainda visualizado por microscopia, Figura 9(a) e 9(b), cujas imagens apresentam cristais afilados e alongados de morfologia bem definida.

Os cofêmeros AF e AS também apresentaram estrutura cristalina bem definida (Figura 8), no entanto a aquisição das imagens por MEV foi impossibilitada pela fluorescência emitida por eles.

Figura 9 - MEV das amostras POS (a,b), BNZ (c,d), POS:BNZ:AF (e, f) e POS:BNZ:AS (g,h). Magnitude de 10000x (a,c,e,g) e 50000x (b, d, f, h).



Fonte: Autoria própria.

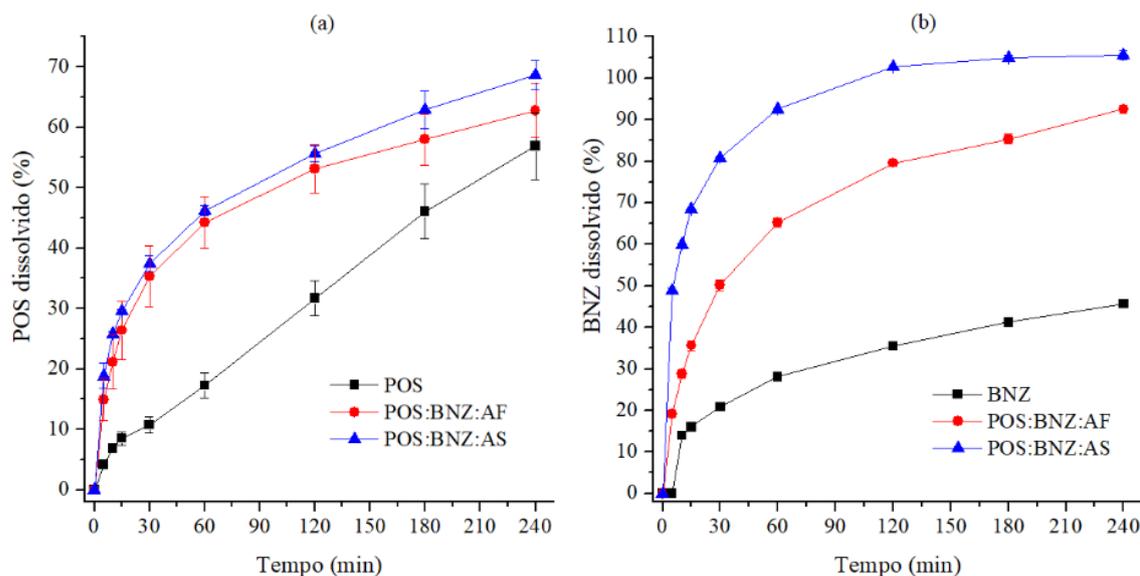
Em relação a POS:BNZ:AF, Figura 8, o perfil cristalográfico mostrou distinção quanto ao materiais de partida com picos intensos em 6,2°, 9,4°, 15,9°, 16,8° e 25°. Tais picos demonstram espessamento entre planos cristalinos, característicos da polimorfo III do POS de atividade antifúngica similar à forma I, mais estável e utilizada comercialmente (ANDREWS; LEONG; SUDHAKAR, 2004). Um pico discreto em 7,7° demonstra que nem todo o fármaco foi convertido à forma III. Observa-se ainda picos inerentes à BNZ em 7,3°, 10,9°, 16,8° e 21,9°, podendo se tratar de uma mistura eutética, como demonstrado claramente por microscopia Raman (Figura 5) e também em análise por MEV na qual notou-se uma microestrutura lamelar, Figura 9(e) e 9(f). Tal perfil é apresentado por muitas misturas eutéticas devido a interações coesivas, incapazes de afetar a estrutura cristalina (CHERUKUVADA; ROW, 2014; FIGUEIRÊDO et al., 2017).

De acordo com Cherukuvada & Nangia (2014), interações fortes predominantemente adesivas (heteromolecular) geram cocristal formando estrutura cristalina única. No entanto, quando interações coesivas (homomolecular) são fortes e interações auxiliares são fracas ou inexistentes, o resultado é a formação de soluções sólidas (componentes de tamanho e estrutura similares) ou mistura eutética (componentes de tamanho e estrutura distintas), com estrutura cristalina similar aos materiais de partida.

Já em POS:BNZ:AS, Figura 8, observa-se a modificação da rede cristalina com perfil distinto ao apresentado pelos materiais de partida, bem como das demais formas polimórficas do POS (ANDREWS; LEONG; SUDHAKAR, 2004). Picos cristalinos presentes em 7,0°, 9,1°, 14,1°, 14,7° e em ângulos 2θ mais elevados foram observados. Isto sugere que tal material seja um cocristal, uma vez que seus componentes interagem prioritariamente por interações adesivas, as quais afetam a rede cristalina. Tal fato pode ser corroborado com a miscibilidade apresentada na microscopia Raman, Figura 5(d) e 5(e), bem como na imagens obtidas por MEV evidenciando estrutura cristalina compacta e uniforme, Figura 9(g) e 9(h).

A maior motivação para o desenvolvimento de novas formas sólidas das moléculas é o aprimoramento das propriedades físico-químicas que são de relevância crítica para a performance das amostras. Isto inclui a solubilidade aquosa, a dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade dos fármacos (DUGGIRALA et al., 2016). Com base nisso, os perfis de dissolução foram avaliados e expostos na Figura 10.

Figura 10 - Perfis de dissolução dos fármacos isolados bem como nas formas cristalinas formadas, separados em POS (a) e BNZ (b). Meio tampão pH 1,2.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 10(a), nota-se que POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS apresentaram perfis de dissolução similares, atingindo cerca de 50% de dissolução do fármaco em 120 min ao contrário do POS isolado, em 240 min. Na Figura 10(b), observa-se que o BNZ apresentou dissolução mais lenta, com aumento gradual atingindo cerca de 40% de fármaco dissolvido em 240 min. Este comportamento foi consideravelmente modificado pelos cristais formados com cerca de 90 % de dissolução em 240 min para POS:BNZ:AF e 100 % dissolução para POS:BNZ:AS em 120 min.

A fim de avaliar a cinética apresentada pelas amostras, a interpretação quantitativa da dissolução foi realizada pelo uso de equações que traduzem matematicamente a curva de dissolução em função dos parâmetros relacionados (COSTA; LOBO, 2001). Na Tabela 3, observa-se que POS apresentou melhor correlação com a cinética de ordem zero, na qual o fármaco é dissolvido de forma lenta em função do tempo a uma velocidade constante ($k=0,224$), independente da concentração (BRUSCHI, 2015). Já BNZ não foi adequado aos modelos propostos.

Em relação a POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS, notou-se a expressiva alteração do tipo de liberação apresentada pelo POS isolado, se distanciando do modelo de ordem zero. Para a dissolução de BNZ, os cristais foram capazes de modificar a cinética se adequando melhor à primeira ordem, principalmente POS:BNZ:AS, a qual está relacionada com a dissolução do fármaco como dependente da concentração deste em solução (BRUSCHI, 2015). Assim, a

constante de dissolução (k) foi de 0,017 e 0,073 para POS:BNZ:AF e POS:BNZ:AS, respectivamente, demonstrando a superioridade da velocidade de dissolução do último em relação ao primeiro.

Tabela 3. Cinética de dissolução dos fármacos POS e BNZ isolados e a partir dos cristais obtidos.

Modelo	Parâmetros	Amostras					
		POS	BNZ	POS:BNZ:AF		POS:BNZ:AS	
				POS	BNZ	POS	BNZ
Zero ordem	R^2	0,992	0,733	0,750	0,767	0,760	0,533
	k	0,224	0,135	0,186	0,288	0,195	0,292
Primeira ordem	R^2	0,988	0,726	0,562	0,910	0,563	0,939
	k	0,003	0,003	0,007	0,017	0,008	0,073
<i>ED (%)</i> (até 240 min)		33,07	31,38	49,05	72,21	52,56	95,18

Fonte: Autoria própria.

Outra forma de avaliação dos perfis de dissolução foi o cálculo da ED% evidenciando o aumento da eficiência da dissolução dos fármacos presentes nos cristais comparado aos componentes isolados. Desta forma, POS:BNZ:AF foi 15,98% e 23,16% mais eficiente para POS e BNZ, respectivamente. Para POS:BNZ:AS, tal aumento foi ainda superior apresentando eficiência de 19,49% e 63,8% comparado a POS e BNZ, respectivamente. Este incremento pode gerar promissoras vantagens quanto a biodisponibilidade do fármaco, bem como o efeito terapêutico almejado.

3.3.4 Conclusão

O presente trabalho evidenciou a formação de cristais eficientes por meio da cocrystalização dos fármacos posaconazol e benznidazol. Assim, foram identificados dois tipos de cristais, mistura eutética (POS:BNZ:AF) e cocrystal (POS:BNZ:AS), por meio de técnicas analíticas capazes de identificar as novas estruturas, as quais demonstraram características distintas às dos componentes individuais. Tais materiais demonstraram o incremento expressivo quanto as propriedades físicas, além da velocidade e eficiência de dissolução, podendo afetar significativamente a biodisponibilidade dos fármacos. Desta forma, o uso da engenharia de cristais é uma estratégia interessante para a obtenção de sistemas combinados dos fármacos BNZ e POS para o incremento na terapia antichagásica.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, D. R.; LEONG, W.; SUDHAKAR, A. **Crystalline Antifungal Polymorph**. EUAUS 6713481 B1, , 2004.
- BRUSCHI, M. L. Mathematical models of drug release. In: **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. 1. ed. Maringá: Elsevier, 2015. p. 63–86.
- CAIRES, C. F. J. et al. Thermal behaviour of succinic acid, sodium succinate and its compounds with some Bivalent transitions metal ions in dynamic N₂ and CO₂ atmospheres. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 73–80, 2010.
- CHERUKUVADA, S. On the issues of resolving a low melting combination as a definite eutectic or an elusive cocrystal: A critical evaluation. **Journal of Chemical Sciences**, v. 128, n. 4, p. 487–499, 2016.
- CHERUKUVADA, S.; NANGIA, A. Eutectics as improved pharmaceutical materials: Design, properties and characterization. **Chemical Communications**, v. 50, n. 8, p. 906–923, 2014.
- CHERUKUVADA, S.; ROW, T. N. Comprehending the formation of eutectics and cocrystals in terms of design and their structural interrelationships. **Crystal Growth and Design**, v. 14, n. 8, p. 4187–4198, 2014.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. L. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.
- DELORI, A. et al. Drug solid solutions – a method for tuning phase transformations. **CrystEngComm**, v. 16, n. 26, p. 5827, 2014.
- DUGGIRALA, N. K. et al. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. **Chem. Commun.**, v. 52, n. 4, p. 640–655, 2016.
- FIGUEIRÊDO, C. B. M. et al. Enhancement of dissolution rate through eutectic mixture and solid solution of posaconazole and benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 525, n. 1, p. 32–42, 2017.
- LOHBECK, K. et al. Maleic and Fumaric Acids. **Encyclopedia of Industrial Chemistry**, v. 22, p. 145–155, 2012.
- PATIL, S.; UJALAMBKAR, V.; MAHADIK, A. Electrospray technology as a probe for cocrystal synthesis: Influence of solvent and cofomer structure. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 217–222, 2017.
- SANTANA, A. C. S. G. V. et al. Simultaneous Quantification of Benznidazole and Posaconazole by HPLC-DAD Using QbD Approach. **Journal of Chromatographic Science**, v. 57, n. 2, p. 156–162, 2018.
- SHETE, A. et al. Cocrystals of itraconazole with amino acids: Screening, synthesis, solid state characterization, in vitro drug release and antifungal activity. **Journal of Drug Delivery**

Science and Technology, v. 28, p. 46–55, 2015.

SHEVCHENKO, A. et al. Diversity in itraconazole cocrystals with aliphatic dicarboxylic acids of varying chain length. **Crystal Growth and Design**, v. 13, n. 11, p. 4877–4884, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Espectrometria no Infravermelho. In: **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benzimidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 323–330, 2012.

TANG, P. et al. Posaconazole/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Improving dissolution while maintaining antifungal activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 16–23, 2016.

USP. Dissolution. In: **United States Pharmacopeia and National Formulary USP 41–NF 36**. 41. ed. ROCKVILLE, 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou sistemas farmacêuticos posaconazol e posaconazol:benznidazol.

Os sistemas baseados em posaconazol: β -ciclodextrina foi capaz de incrementar a solubilidade, a estabilidade oxidativa e a velocidade de dissolução afetando a atividade *in vitro* do fármaco. Isto indica a eficiência do complexo como futuro medicamento.

Além disso, foi desenvolvido um novo método de quantificação simultânea para os fármacos em estudo, facilitando a quantificação dos mesmos em futuras formulações farmacêuticas desenvolvidas.

Em adição, a engenharia de cristais foi de suma importância para o desenvolvimento de cristais POS:BNZ, indicando a obtenção dos novos cristais classificados: um como mistura eutética e outro como cocrystal. Apesar de somente este último apresentar modificação no perfil cristalográfico, ambos apresentaram excelente eficiência de dissolução em comparação com os fármacos isolados.

Diante disso, esta pesquisa foi capaz de desenvolver sistemas bem definidos com potencial atividade tripanocida, a fim de gerar um tratamento efetivo tanto na fase aguda como na fase crônica da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- AERTS, C. et al. Are public-private partnerships the solution to tackle neglected tropical diseases? A systematic review of the literature. **Health Policy**, v. 121, n. 7, p. 745–754, 2017.
- AITIPAMULA, S.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Structural, spectroscopic and thermal analysis of cocrystals of carbamazepine and piracetam with hydroquinone. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 41, n. 11, p. 1604–1611, 2011.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews**, v. 3, n. August, 2004.
- ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631–1640, 2009.
- BABU, N. J.; NANGIA, A. Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 2662–2679, 2011.
- BERMUDEZ, J. et al. Acta Tropica Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- BEVERNAGE, J. et al. Excipient-mediated supersaturation stabilization in human intestinal fluids. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 564–570, 2011.
- BEVERNAGE, J. et al. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 25–35, 2013.
- BHATT, P. M. et al. Co-Crystals of the Anti-HIV Drugs Lamivudine and Zidovudine. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 2, p. 951–957, 2009.
- BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers ☆. v. 59, p. 645–666, 2007.
- BROWN, A. S.; PATEL, C. J. A standard database for drug repositioning. **Scientific Data**, v. 4, p. 1–7, 2017.
- CAZZULO, J. J. Proteinases of Trypanosoma Cruzi : Potential Targets for the Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, p. 1261–1271, 2002.
- CDC. **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 30 ago. 2018.
- CHERUKUVADA, S.; NANGIA, A. Eutectics as improved pharmaceutical materials: Design, properties and characterization. **Chemical Communications**, v. 50, n. 8, p. 906–923, 2014.
- CHERUKUVADA, S.; ROW, T. N. Comprehending the formation of eutectics and cocrystals in terms of design and their structural interrelationships. **Crystal Growth and Design**, v. 14, n. 8, p. 4187–4198, 2014.

DA SILVA, R. M. et al. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3344–3348, 2012.

DAVANÇO, M. G. et al. Benznidazole Extended-Release tablets for improved treatment of chagas disease: Preclinical pharmacokinetic study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2492–2498, 2016.

DINIZ, L. DE F. et al. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

DNDI. **Uma nova esperança para pacientes negligenciados**. Disponível em: <https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2014/11/DNDi_Brochure_Portuguese.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2018.

DNDI. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://www.dndi.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

DUGGIRALA, N. K. et al. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. **Chem. Commun.**, v. 52, n. 4, p. 640–655, 2016.

FDA. **Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals: Guidance for Industry**. 2016.

FDA, F. AND D. A. FDA approves first U.S. treatment for Chagas disease. **Press releases**, 2017.

FRANCISCO, A. F. et al. Limited ability of posaconazole to cure both acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infections revealed by highly sensitive in vivo imaging. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4653–4661, 2015.

FULE, R.; AMIN, P. Hot Melt Extruded Amorphous Solid Dispersion of Posaconazole with Improved Bioavailability: Investigating Drug-Polymer Miscibility with Advanced Characterisation. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

GADADE, D. D.; PEKAMWAR, S. S. Pharmaceutical cocrystals: Regulatory and strategic aspects, design and development. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 4, p. 479–494, 2016.

GASPAR, L. et al. Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Sir2 related protein 1 as potential drugs against Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–30, 2018.

HENS, B. et al. Supersaturation and Precipitation of Posaconazole Upon Entry in the Upper Small Intestine in Humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2677–2684, 2016.

KAISER, M. et al. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs : A Starting Point toward Drug Repositioning. p. 1–16, 2015.

KARIMI-JAFARI, M. et al. Creating Cocrystals: A review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications. **Crystal Growth and Design**, v. 18, p. 6370–6387, 2018.

KOSTEWICZ, E. S. et al. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 342–366, 2014.

LEONARDI, D.; SALOMON, C. J. Unexpected Performance of Physical Mixtures over Solid Dispersions on the Dissolution Behavior of Benznidazole from Tablets. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 1016–1023, 2012.

LEPECHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting Trypanosoma cruzi Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 65–87, 2011.

LEPESHEVA, G. I. et al. Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen Trypanosoma cruzi. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25582–25590, 2010.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 11, n. 16, p. 2060–2071, 2011.

LEUNG, S.; POULAKOS, M. N.; MACHIN, J. Posaconazole: An Update of Its Clinical Use. **Pharmacy**, n. 3, p. 210–268, 2015.

LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 67–76, 2010.

LIMA, A. A. N. et al. The Use of Solid Dispersion Systems in Hydrophilic Carriers to Increase Benznidazole Solubility. **Pharmaceutical Technology**, v. 100, n. 6, p. 2443–2451, 2011.

LIN, H. et al. Mechanical grinding effect on thermodynamics and inclusion efficiency of loratadine – cyclodextrin inclusion complex formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 512–517, 2012.

LOFTSSON, T. et al. Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, p. 335–351, 2005.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019–3032, 2012.

MARTINS, T. A. F. et al. Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-Trypanosoma cruzi activity in experimental Chagas disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015.

MELLAERTS, R. et al. Ordered mesoporous silica induces pH-independent supersaturation of the basic low solubility compound itraconazole resulting in enhanced transepithelial transport. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1–2, p. 169–179, 2008.

MOORE, J. N.; HEALY, J. R.; KRAFT, W. K. Pharmacologic and clinical evaluation of posaconazole. *v. 8, n. 3, p. 321–334, 2015.*

MORAES, C. B.; FRANCO, C. H. Novel drug discovery for Chagas disease. **Expert Opinion on Drug Discovery** ISSN:, p. 447–455, 2016.

MORILLA, M. J. et al. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: Increasing drug delivery to liver is not enough. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 311–318, 2004.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease : an update on therapeutics , prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v. 10, n. 3, p. 465–481, 2015.

NONAPPA, M. L. et al. Evidence of Weak Halogen Bonding : New Insights on Itraconazole and its Succinic Acid Cocrystal. **Crystal Growth & Design**, v. 12, p. 346–351, 2013.

PALOS, I. et al. Repositioning FDA drugs as potential cruzain inhibitors from *Trypanosoma cruzi*: Virtual screening, in vitro and in vivo studies. **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.

PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): A systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. 371–379, 2013.

RAMIREZ, J. C. et al. First external quality assurance program for bloodstream Real-Time PCR monitoring of treatment response in clinical trials of Chagas disease. **Plos One**, p. 1–15, 2017.

SAHA, S.; DESIRAJU, G. R. Using structural modularity in cocrystals to engineer properties: Elasticity. **Chemical Communications**, v. 52, n. 49, p. 7676–7679, 2016.

SALOMON, C. J. First Century of Chagas' Disease: An Overview on Novel Approaches to Nifurtimox and Benznidazole Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 888–894, 2012.

SAREEN, S.; JOSEPH, L.; MATHEW, G. Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 12, 2012.

SATHISARAN, I.; DALVI, S. V. Engineering cocrystals of poorlywater-soluble drugs to enhance dissolution in aqueous medium. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, 2018.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, n. 100 mL, p. 1–10, 2012.

SHERJE, A. P. et al. Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, n. 1, p. 37–49, 2017.

SHIRVANI, M. et al. Sorption of Pb(II) on palygorskite and sepiolite in the presence of amino acids: Equilibria and kinetics. **Geoderma**, v. 249–250, p. 21–27, 2015.

SILVA, J. J. N. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no

desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benzimidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 323–330, 2012.

SUN, D. D.; JU, T. C. R.; LEE, P. I. Enhanced kinetic solubility profiles of indomethacin amorphous solid dispersions in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 149–158, 2012.

VIMALSON, D. C. et al. Techniques to Enhance Solubility of Hydrophobic Drugs: An Overview. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1–5, 2016.

WHO. **World Health Organization -Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 6 out. 2017a.

WHO. **World Health Organization - Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 6 out. 2017b.

WILLIAMS, H. D. et al. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 315–499, 2013.

**APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHIC SCIENCE.**

**Simultaneous quantification of benznidazole and posaconazole by HPLC-DAD using
QbD approach**

Ana Cristina Sousa Gramoza Vilarinho Santana^{a*}, Lucas José de Alencar Danda^a, Livio Cesar Cunha Nunes^b, Jose Lamartine Soares Sobrinho^a

^a Department of Pharmaceutical Sciences Federal University of Pernambuco, PE 50740-52, Brazil

^b Department of Pharmacy, Federal University of Piaui, PI 64049-550, Brazil.

*Corresponding author. E-mail address: anacristinagramoza@outlook.com

Abstract

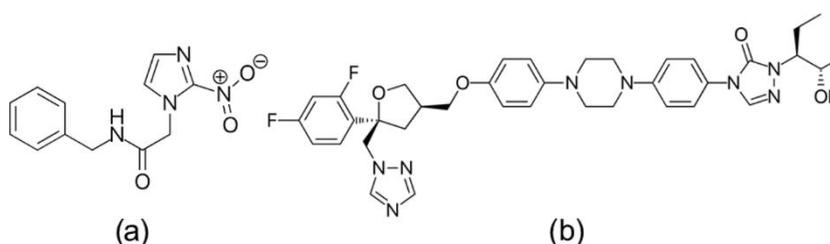
Objective: to develop an analytical method to simultaneous quantification of benznidazole (BNZ) and posaconazole (POS) by HPLC-DAD using design of experiments. Methods: percentages of organic phase, buffer pH and flow rates of mobile phase were selected as independent variables by Full Factorial design (3^3), totaling 27 experiments. Significant factors were evaluated using factorial ANOVA with 95% confidence level. Method optimization was performed using desirability profiles, considering BNZ/POS chromatographic resolution and peak areas. Further, the method was evaluated regarding its suitability and properly validated according to international compendiums using the parameters: specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification. Results: the optimized method was achieved using Discovery® C8 column (250mm x 4.6mm; 5 μ m particle size), methanol/acetate buffer (pH 3.5)(71:29) and detection at 260 nm. Retention times were 3.6 and 7.6 min for BNZ and POS, respectively, with good suitability of system and it was specific and linear ($r^2 > 0.99$) for both drugs, proving the efficiency of the method even in the presence of degradation products of POS. Conclusion: this new method is a great alternative to perform reliable, faster and cheaper analysis since the simultaneous quantification of the association BZN/POS is not reported yet in the literature.

Keywords: Quality by design. Design of experiments. Simultaneous analysis. Posaconazole. Benznidazole.

1 Introduction

The Drug for Neglected Disease initiative (DNDi) launched in the last years a platform of research and development to Chagas' disease which aimed a cost reduction and encouraged drugs repositioning approved by Food and Drugs Administration (FDA) as a proposal for substitution or adjuvant to treatment with BNZ, first choice drug for over 50 years, Figure 1(a). A possible alternative was the antifungal drug posaconazole (POS), Figure 1(b), a potent inhibitor of ergosterol biosynthesis, important to cell wall construction of *T. cruzi* (1).

Figure 1 Chemical structures of drugs benznidazole (a) and posaconazole (b)



For the development of future dosage forms with drugs BNZ and POS, it is convenient the use of simultaneous quantification method with both. Most of the drugs in single or multicomponent dosage forms can be analyzed by HPLC method due to its associated advantages as speed, greater sensitivity, improved resolution, specificity, accuracy, precision, reusable columns and ease of automation in this method (2).

The performance HPLC methods have become increasingly important in a quality by design (QbD) environment. Under the QbD approach for HPLC methods, robustness and ruggedness should be verified early in the method development stage to ensure method performance over the lifetime of the product. The scientific understanding gained during the method development process can be used to devise method control elements and to manage the

identified risks. A powerful tool of the QbD concept is the use design of experiments (DOE) which helps to understand the effects of possible multidimensional effects and interactions of various parameters on the final product or method quality (3,4).

In scientific literature, some authors have described the development of methodologies using HPLC coupled to diode array detector (DAD) to quantify POS and BNZ, separately, as evidenced in Table I. Most of them use acetonitrile (ACN) as a mobile phase component, however, POS stability is affected in the presence of this organic modifier (5).

Table I Methods of quantification of BNZ and POS by HPLC-UV or DAD.

Author	Column	Mobile phase	Elution mode
<i>Posaconazole</i>			
(Cáceres et al., 2016)	Eclipse XDB C ₁₈ , 150 × 4,6 mm, 5 μm	Acetonitrile:water (70:30)	Isocratic
(Hamdy and Belal, 2014)	Zorbax SB-C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm)	Acetonitrile:15 mM potassium dihydrogen orthophosphate (30:70 to 80:20)	Gradient
	Kinetex-C ₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.3 μm)	Acetonitrile: 15 mM potassium dihydrogen orthophosphate (45:55)	Isocratic
(Zhang et al., 2013)	Phenomenex Gemini C ₆ -phenyl (4.6 x 150 mm, 5 μm)	0.01 M phosphate buffer, pH 3.5, and acetonitrile	Gradient
(Garcia et al., 2012)	Shim-pack C ₈ (250 × 4.6 mm; 5 μm)	Methanol-water (75:25; v/v)	Isocratic
(Cendejas-Bueno et al., 2011)	Sunfire C ₁₈ (4.6 × 150 mm, 5 μm)	acetonitrile:water (60 : 40)	Isocratic
(Kahle et al., 2009)	ReproSil-Pur Basic C ₁₈ column (150 mm x 2 mm, 5 μm)	0.09 M aqueous ammonium phosphate monobasic:acetonitrile (50%:50%, vol/vol) (pH 5.3)	Isocratic
(Gordien et al., 2009)	Phenomenex Gemini C ₆ -Phenyl (4.6 × 150 mm, 5.0 μm)	10 mM phosphate buffer adjusted to pH 7 with concentrated orthophosphoric acid (phase A), and mixed with acetonitrile (phase B)	Gradient
(Chhun et al., 2007)	Plus Satisfaction C ₈ column (250 mm × 3 mm, 5 μm)	sodium potassium phosphate buffer (0.04 M, pH 6.0):acetonitrile:ultrapure water (45:52.5:2.5, v/v/v)	Isocratic
<i>Benznidazole</i>			
(Marsón et al., 2013)	Lichrospher-100 RP18 C ₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 5 μm)	water/acetonitrile (80:20 v/v).	Isocratic

(Moreira et al., 2012)	Phenomenex Gemini-NX C ₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 4 μm)	Acetonitrile: water (60:40, vol/vol)	Isocratic
(Guerrero et al., 2011)	Kromasil C ₁₈ (250 x 4.0 mm, 5 μm)	water:acetonitrile (60:40)	Isocratic
(Silva et al., 2007)	Lichrospher C ₁₈ column (125 mm x 4,0 mm, 5 μm)	Acetonitrile:water (50:50)	Isocratic

Based on this, this research aimed the development, optimization and validation of a new HPLC-DAD method for simultaneous determination of BNZ and POS using a design of experiments (DOE) approach.

2 Experimental

2.1 Instrumentation and Reagents

Posaconazole (purity of 100%) was purchased from Vanguard® and benznidazole (purity of 99,3 %) was provided by Laboratório Farmacêutico Pernambucano - LAFEPE® (Recife, Brazil). HPLC-grade methanol was purchased from JTBaker® (USA). Hydrogen peroxide (Alphatec®, Brazil), glacial acetic acid (Dinâmica®, Brazil) and sodium acetate trihydrate (Sigma-Aldrich®, USA) used were analytical grade. Water was purified in a Milli-Q Plus system (Millipore®, USA), and its resistivity was 18.2 MΩ cm at 25°C.

A Shimadzu Prominence Liquid Chromatograph, equipped with a LC-20AT pump, DGU-20A5R degassing unit, SIL-20A auto sampler, SPD-M20A PDA (photodiode array) detector (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used for method development, optimization and validation. LC Solution system software was used to control the equipment and to calculate data and responses from the LC system.

The HPLC method was conducted using a C₈ column (Discovery®) with 5µm particle size, 4.6 mm internal diameter and 250 mm length. Preliminary tests with a C₁₈ column provided a retention time of PCZ about 60 min (data not show).

A Millipore filter of cellulose nitrate, gridded with pore size of 0.45 µm and 47 mm diameter was employed to filter and degas the acetate buffer, also sonicated in an ultrasonic bath Ultracleaner 800 (Unique®) for 30 minutes. The samples were filtered using syringe filter (Millipore®) with pore size of 0.22 µm and sonicated for 10 minutes before analyses.

2.2 Methods

2.2.1 Preparation of buffer for mobile phase

50 mM acetate buffer solution was prepared by diluting a pre-calculated amount of sodium acetate trihydrate in 1000 mL purified water and pH was adjusted with glacial acetic acid to 2.5, 3.5 and 4.5. The buffer was filtered through a 0.22 µm pore size filter with the aid of a vacuum pump. After this, the mobile phase was degassed for 30 minutes.

2.2.2 Experimental design

Important factors impacting chromatographic performance were studied for method evaluation and optimization. Three independent variables [methanol (MeOH) concentration in mobile phase (X_1 , % v/v), flow rate (X_2 , mL.min⁻¹) and mobile phase buffer pH (X_3)] were elected for a quadratic Full Factorial Design (FFD) model with three levels (3^3), totaling 27 experimental runs (Table II). The effect of variables on responses [BNZ retention time (Y_1 , min), POS retention time (Y_2 , min), BNZ resolution (Y_3) and POS resolution (Y_4)] was assessed by evaluating the significant factors using factorial ANOVA with 95% confidence level. Multiple regression statistics was utilized for constructing desirability profiles in order to find

the best condition for chromatographic system. Experiments were conducted in random order and data were analyzed using StatSoft Statistica 12.0 software.

Table II Variables and levels considered for the optimization of chromatographic system

		Codes	Factors	Levels		
				Low (-1)	Medium (0)	High (1)
Independent Factors	X₁		MeOH (% v/v)	65	68	71
	X₂		Flow rate (mL.min ⁻¹)	0.8	1	1.2
	X₃		Mobile phase buffer pH	2.5	3.5	4.5
Responses	Y₁		BNZ retention time (min)	Shortest possible		
	Y₂		POS retention time (min)	Shortest possible		
	Y₃		BNZ resolution	Highest possible (>2.0)		
	Y₄		POS resolution	Highest possible (>2.0)		

The short difference between level -1 and +1 in relation to MeOH % is justified based on previous studies, where it was observed that percentages above 72% MeOH, BZN appeared at the void volume (data not showed).

2.2.3 Method validation

The best condition was validated according to the international recommendations for analytical method validation (17,18). The method was validated for following parameters: linearity, specificity, accuracy, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). This method involves an easy sample preparation and a stable detection process. Thus, no internal standard was used.

2.2.3.1 Specificity

To demonstrate the specificity of the method, the POS was submitted to accelerated oxidative degradation conditions by the addition of hydrogen peroxide solution (3%) to 25 ml volumetric flask containing 10 mL of a 100 µg/mL POS solution in methanol. This solution was then mixed up with a 1000 µg/mL BNZ solution to obtain a final concentration of 20 µg/mL for both drugs.

2.2.3.2 System suitability

The system suitability tests are used to verify if the chromatographic system is adequate for the intended analysis (19). For system suitability assessment a POS solution (20 µg/mL) was injected five times for HPLC analysis. From these replicate injections, the acceptance criteria for peak area, tailing factor and number of theoretical plates were evaluated.

2.2.3.3 Linearity

The POS and BNZ stock solution were prepared at concentration of 1000 µg/mL each one in methanol. For the linearity, stock solutions were diluted with methanol to obtain the solutions whose concentrations were: 5, 10, 15, 20, 30 and 50 µg/mL. This range was established to encompass from lower to higher concentrations aiming to analyze simultaneously POS and BNZ both in drug delivery systems to be developed in future as well as in release profile analysis. Three authentic replicates were injected and analyzed. The linear regression and correlation coefficient were found out from the equation of the line traced in the graph between peak area and concentration.

2.2.3.4 Accuracy and Precision

Accuracy was determined from the percentage ratio of measured nominal concentration $((\text{mean of measured concentration})/(\text{nominal concentration}) \times 100\%)$. It was used three

different concentration (10, 20 and 30 $\mu\text{g/mL}$) for both drugs in association compared to isolated standards, resulting in 9 determinations. This process has been performed in triplicated. The precision parameters were based in repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) for each drug. For both experiments it were prepared six authentic replicates at the concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$. The repeatability was performed in a single day, while the intermediate precision was performed by repeating the six concentrations on two different days. The peak area was measured and percent relative standard deviation (% RSD) was calculated.

2.2.3.5 Limit of detection and quantification

The limits of detection and quantification were estimated by sigma method. The formula for the calculation of limit of detection (LOD) used was $\text{LOD} = 3.3\sigma/\text{SP}$, where σ is the minutest standard deviation value in response and SP is the slope of the calibration curve. Similarly, the limit of quantitation (LOQ) was also calculated from the response of POS and BNZ. The formula for the calculation of LOQ used was $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{SP}$, where σ is the residual standard deviation value in response and SP is the slope of the response.

3 Results

3.1 Experimental design

Results obtained from experimental samples are listed in Table III. All analyses conditions were able to retain and separate the analytes. Retention times (RT) varied from 2.98 to 4.73 for BNZ and 4.79 to 23.04 for POS. This result was decreased with the increasing of flux and proportion of MeOH for both drugs, while the buffer pH affected only POS. In relation to resolution (R_s) values there was a variation from 1.55 to 3.22 for BNZ and 9.64 to 29.38 for POS.

Table III Batch runs and results obtained from the full factorial experimental design.

Run ^a	Coded Factors			Responses			
	X ₁	X ₂	X ₃	RT	RT	Rs	Rs
				(BNZ)	(POS)	(BNZ)	(POS)
1	-1	-1	-1	1.76	4.46	15.45	9.96
2	-1	-1	0	2.16	4.73	27.72	17.82
3	-1	-1	1	3.22	4.72	29.38	18.32
4	-1	0	-1	2.15	3.6	16.27	7.8
5	-1	0	0	3.07	3.86	26.7	14.71
6	-1	0	1	2.57	3.74	26.44	13.97
7	-1	1	-1	2.13	3.12	14.97	6.96
8	-1	1	0	2.67	3.29	24.37	12.24
9	-1	1	1	2.64	3.18	25.51	12.5
10	0	-1	-1	2.2	4.46	13.52	8.24
11	0	-1	0	2.62	4.7	23.22	12.98
12	0	-1	1	3.05	4.69	24.17	12.97
13	0	0	-1	2.27	3.59	13.44	6.55
14	0	0	0	2.52	3.72	20.75	10.15
15	0	0	1	2.53	3.66	21.49	9.8
16	0	1	-1	1.62	2.99	11.77	5.57
17	0	1	0	2.5	3.22	20.04	8.754
18	0	1	1	2.25	3.05	18.81	8.29
19	1	-1	-1	1.97	4.45	11.98	7.39
20	1	-1	0	2.37	4.49	16.66	9.36
21	1	-1	1	2.72	4.55	18.69	9.73
22	1	0	-1	1.69	3.36	10.39	5.64
23	1	0	0	2.19	3.62	15.84	7.61
24	1	0	1	2.61	3.66	17.93	7.86
25	1	1	-1	1.55	2.98	9.64	4.79
26	1	1	0	2.44	3.19	16.31	6.79
27	1	1	1	2.19	3.03	15.86	6.51

^a Experiments were effectively conducted at random

Linear and quadratic effects of independent factors (between -1 and +1 levels) on responses were studied using factorial ANOVA (95% confidence level) as a means of estimating major influencing variables on chromatographic performance (Table IV). It was observed that the percent of MeOH in mobile phase (X₁) played an important role on reducing both BNZ and POS RT, especially for POS RT, in which mobile phase MeOH concentration was the most significant factor.

Table IV Average effects estimated from the influence of each independent factor and its second order interactions on responses obtained from the analysis of the full factorial design results. Influencing factors ($p > 0,05$) are in bold.

Factors	Effect estimates			
	RT (BNZ)	RT (POS)	Rs (BNZ)	Rs (POS)
(X ₁) MeOH (% v/v) (L)	-0,15189	-5,40000	-0,293333	-8,16778
(X ₁) MeOH (% v/v) (Q)	0,00739	-0,74178	0,056667	-0,31611
(X ₂) Flow rate (min.mL ⁻¹) (L)	-1,46633	-3,81844	-0,231111	-2,61222
(X ₂) Flow rate (min.mL ⁻¹) (Q)	-0,20428	-0,61078	0,063333	0,02389
(X ₃) Mobile phase buffer pH (L)	0,14078	4,11667	0,715556	8,98333
(X ₃) Mobile phase buffer pH (Q)	0,13072	2,10989	0,220000	3,75056
X ₁ (L) × X ₂ (L)	0,00450	1,00167	-0,196667	0,36333
X ₁ (L) × X ₂ (Q)	-0,02608	0,20750	-0,105000	-0,18667
X ₁ (Q) × X ₂ (L)	-0,04775	-0,03017	-0,201667	-0,61333
X ₁ (Q) × X ₂ (Q)	0,00696	-0,01742	0,002500	-0,03917
X ₁ (L) × X ₃ (L)	-0,00117	-2,29833	-0,013333	-2,36167
X ₁ (L) × X ₃ (Q)	-0,03108	-1,20250	-0,005000	-1,36917
X ₁ (Q) × X ₃ (L)	-0,01558	-0,41250	-0,101667	-0,30250
X ₁ (Q) × X ₃ (Q)	0,00696	-0,03892	0,005000	0,28958
X ₂ (L) × X ₃ (L)	-0,06950	-0,90833	-0,213333	-1,24833
X ₂ (L) × X ₃ (Q)	0,04475	-0,23017	0,288333	0,23917
X ₂ (Q) × X ₃ (L)	0,02192	-0,17750	-0,136667	-0,29750
X ₂ (Q) × X ₃ (Q)	0,00071	0,08258	0,052500	-0,23542

As expected, higher levels of flow rate (X₂) were also able to significantly reduce retention times, whereas mobile phase buffer pH (X₃) negatively affected RT, where RT results were increased with higher pH levels. Additionally, a second order interaction was identified

on POS RT response, in which superior values of mobile phase buffer pH limited the benefits of both flow rate and MeOH concentration ($X_1 \times X_3$ and $X_2 \times X_3$).

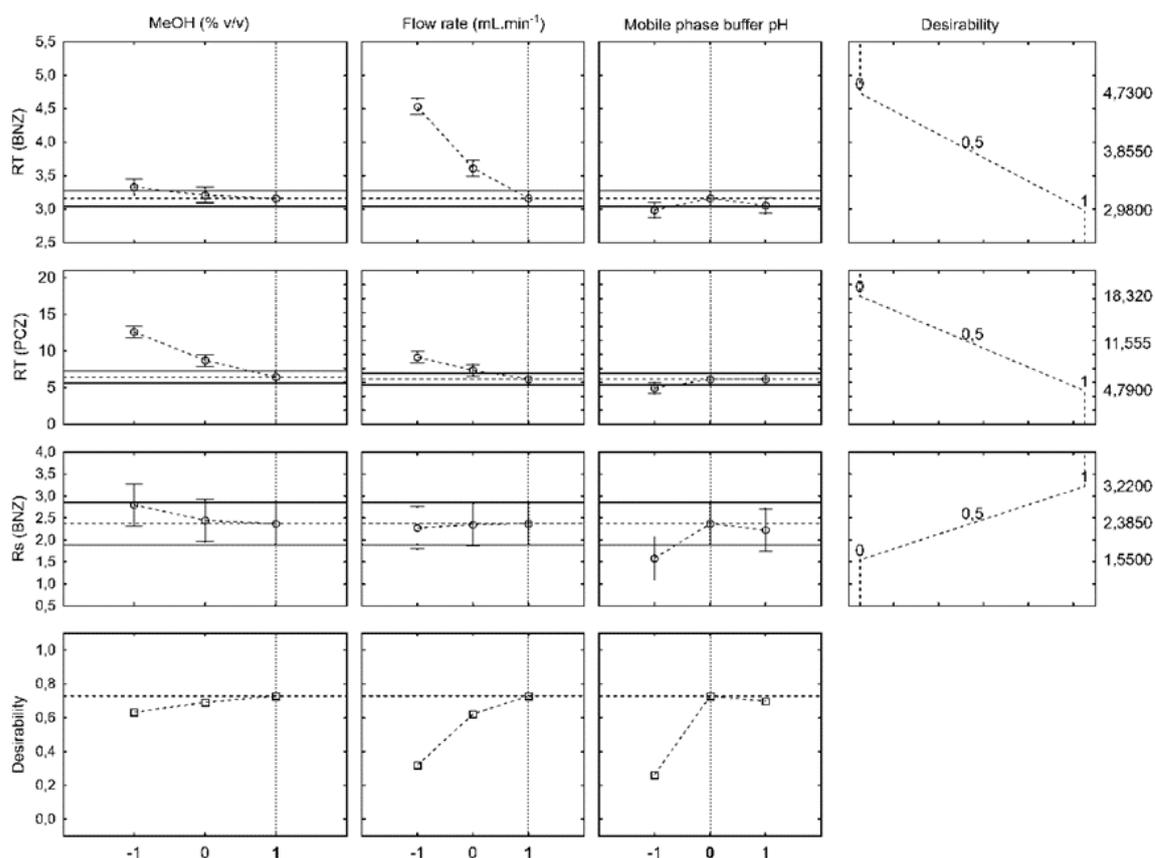
Regarding Rs response factor, mobile phase buffer pH was the most important affecting variable, with higher levels of pH increasing the distance between peaks from POS to BNZ and from BNZ to dead volume in chromatogram. Considering MeOH concentration in mobile phase has reduced RT, on the other hand, it has also reduced Rs of peaks. Second order interactions between mobile phase buffer pH and MeOH concentration on POS Rs were also verified, indicating that even when working with higher levels of MeOH concentration, Rs was diminished by the increase of buffer pH on mobile phase.

Since POS, Rs results were all above the desired minimum of 2.0, POS Rs response factor was removed from further investigations, once all chromatographic conditions were considered satisfactory (20).

3.1.1 Method optimization through desirability function

In order to choose the best chromatographic condition for the method, a desirability study was conducted as a form of consolidating the experimental design. Profiles of predicted values with plots of the tested levels (-1, 0, 1) were constructed aiming RT to be as low as possible and BNZ Rs to be as high as possible (Figure 2).

Figure 2 Profiles for predicted values and desirability. Bars indicate confidence interval (95% confidence level). Vertical dashed line indicates the best condition found that fits desirability function for all independent variables.



The desirability values were established as 0, 0.5 and 1, where 0 would be the least desired value and 1 the best result obtained from the experimental design. The function traced the highest desirability (0.73) as being with maximum flow rate (1.2 mL.min⁻¹), maximum MeOH concentration on mobile phase (71%) and medium level of mobile phase buffer pH (3.5).

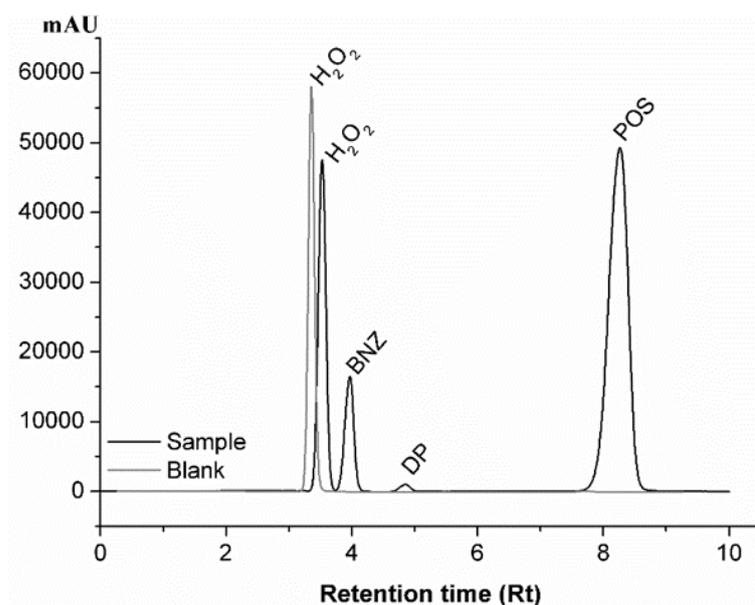
3.2 Validation method

3.2.1 Specificity

The specificity analysis is represented in Figure 3 which is related to the chromatogram of solution containing BNZ and degradation product (DP) of POS by oxidative hydrolysis

evidencing the separated peaks of hydrogen peroxide, BNZ, degraded product and POS with resolution of 1.8, 3.1 and 7.1, respectively. This data showed the specificity of method which was able to discriminate substances with similar structures as POS and its DP, which presented RT of 4.4 min. This one is better identified using the mass spectrometry as evidenced by Yang et al. (21).

Figure 3 Chromatogram of BNZ/degraded POS solution by oxidative degradation.



3.2.2 System suitability

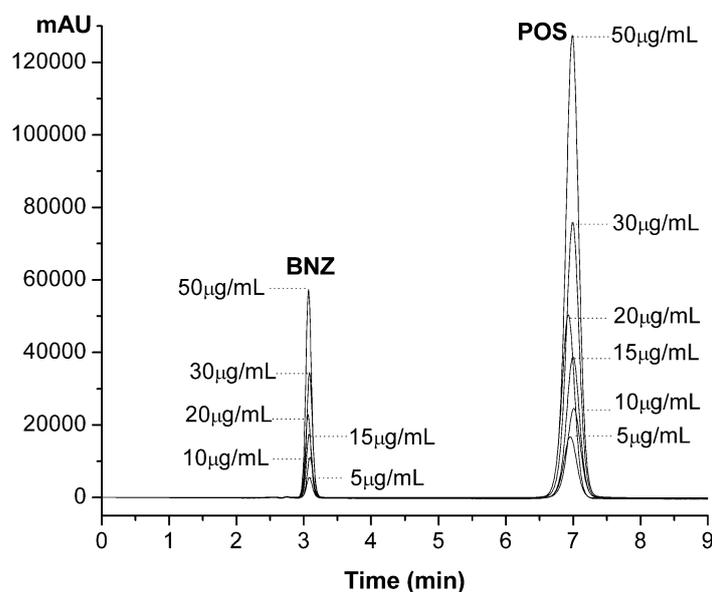
System suitability was evaluated and its results related to peak area, tailing factor and number of theoretical plate expressed by percent relative standard (% RSD) with values of 0.48, 0.33 and 0.58 %, respectively. According USP 40 (8), this value should be less 2 %, evidencing good resolution of data as well as system suitability HPLC-DAD for proposed analysis.

3.2.3 Linearity

The standard calibration curve over the BNZ/POS concentration range 5 to 50 $\mu\text{g/mL}$ provide a coefficient of determination (r^2) of 0.999 for both drug which is an acceptable value,

Figure 4, according USP 40 (8). The linear regression from the above given concentration range were $y = 7297x - 1129$ and $y = 37935x - 16480$ to BNZ and POS, respectively. Thereby it is observed that solution concentrations were correlated with peak areas obtained. Such data are fundamental for future analysis to simultaneous quantification BNZ and POS in association.

Figure 4 Overlapping of chromatograms obtained from linearity of BNZ/POS validation method by HPLC-DAD.



3.2.4 Accuracy and Precision

Accuracy presented acceptable values for BNZ and POS ranging between 98.2% to 101.5% and 98.1 to 101.0%, respectively. Precision of new validation method was evaluated by % RSD of peak area of intra-day and inter-day precision results evidencing 1.60 and 1.42 % to BNZ and 1.69 and 1.64 % to POS, respectively. For both analysis, % RSD value to all concentrations were less than 2 % (19), indicating a good accuracy and precision of the analytical procedure.

3.2.5 Limit of detection and limit of quantification

The lowest concentration at which analyte can be detected and quantified with acceptable was estimated from sigma method. About the BNZ, this one presented 0.92 and 2.80 $\mu\text{g/mL}$ and POS presented 1.29 and 3.91 $\mu\text{g/mL}$ to limit of detection and limit of qualification, respectively. So, this method was able to detect these drugs even at low dosages.

4 Discussion

Design of experiments was a fundamental tool for the development and optimization of the method to simultaneous quantification of BNZ/POS. The use of full quadratic FFD model was able to identify the influences between independent factors facilitating observation the optimum point to analysis. The optimized method was obtained using MeOH:acetate buffer (pH 3.5) (71:29) as mobile phase under $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ which had considerable influence of parameters analyzed. The flow rate and MeOH % had great importance to RT due to its low lipophilicity ($\text{Log } P < 0.9$) promoting the weak retention of BNZ in column, so the high proportion of organic modifier was able to easily drag the drug. In relation to variable pH buffer, no influence was detected. Once BNZ has pKa next to 12 (obtained by MarvinSketch 16.11.7), out of pH range analyzed, the variations made to the buffer did not promote the drug ionization. This fact explains the low variability in the BNZ retention in experimental design since the drug unionized is more easily retained by hydrophobic interactions than ionized drug.

Concerning RT of POS, it was observed a synergic effect between MeOH % and buffer pH which influenced considerably in the choosing of the method. POS is a highly lipophilic molecule [$\text{Log } P > 3$] and higher levels of organic modifiers in mobile phase composition were able to increase chromatographic efficiency for POS separation in shorter retention times, less than 10 minutes. MeOH, as well as acetonitrile, has been widely applied in chromatographic

systems for the separation of both POS (7,22) and BNZ (16), but for POS, the use of acetonitrile jeopardizes its stability.

Other important variable was pH of mobile phase. According to Engelhardt et al., (14), the pH should be at least 2 units apart in relation to pKa of solute in which will be in ionic form. This form can compromise the drugs retention by hydrophobic groups presents inside chromatographic column. However, when methanol is added both pH of hydroorganic mobile phase as pKa of analyte are modified and hence also the ionization degree of the analyte. For basic drugs, as POS, the increasing of methanol fraction leads to rise pH of mobile phase to about pH 6.0, decreasing the ionization degree (24,25). Therefore the POS with a pKa in 3.6 and 4.6 would have its RT affect along the pH range used which only happened at the most acid pH due to influence of methanol. This fact explains the elevate influence of variables pH and mobile phase evidenced by experimental design.

Then, the better knowledge of method by experimental planning tools allowed to select and define the critical parameters that may have influence on the method for posterior validation.

The system used was able to respond properly to the proposed method regarding system suitability analysis which ensured the good performance to provision of safe results about parameters analyzed to validation method.

Concerning validation method, this one demonstrated be specific to quantification of BNZ and POS even with the presence of compound of similar structures, as the degradation products of POS, since the drug peaks presented great Rs ensuring the total separation of others, mainly hydrogen peroxide.

Moreover, it is observed that dilution concentration showed a linear correlation with the chromatographic peak area inside proposed range as well as reduced detection and

quantification limits to both drugs. The data were obtained with precision as determined by intra- and inter-day analysis.

So, the presented method has great importance to detected drugs in question as well as some impurities in future products to be developed with both drugs. Based on this, the quantification done of simultaneous form will reduce the time spend with process, the volume of solvent used and, consequently, the total cost involved.

5 Conclusion

The new method of simultaneous quantification of BNZ/POS was successful developed and optimized by the statistical tool DOE using factorial ANOVA (95% confidence level). The experimental design had an important role to deepen the knowledge about method development as well as the influence critical factors as the buffer pH and MeOH%. This proportioned the choose of best method using mobile phase MeOH:acetate buffer (pH 3.5) (71:29) under 1.2 mL.min⁻¹ which showed to have a great resolution with short RT for both drugs; in addition to be efficient and specific even in presence of similar compounds as the degradation products of POS, according to validation performed. The proposed method was found to be suitable for quantification of drugs in futures delivery systems evidencing a great alternative to obtain faster and cheaper analysis since there are still no method of simultaneous of both, POS and BNZ.

Acknowledgements

LITE-UFPI (Piauí, BRASIL) and development organization FACEPE (Pernambuco, Brazil).

Reference

1. Morilla, M. J., Romero, E. L.; Nanomedicines against Chagas disease : an update on therapeutics , prophylaxis and diagnosis; *Nanomedicine*, (2015); 10(3):465–81.

2. Talaviya, S., Majmudar, F.; Analysis of antifungal agents by RP_HPLC: a review; *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, (2014); 3(12):397–409.
3. Bhatt, D. A., Rane, S. I.; QbD approach to analytical RP HPLC method development and its validation; *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, (2011); 3(1):179–87.
4. Shivhare, M., McCreath, G.; Practical Considerations for DoE Implementation in Quality By Design; *Bioprocess Technology*, (2010); 25–30.
5. Garcia, C. V., Costa, G. R., Mendez, A. S. L.; Sci Pharm Stability-Indicating HPLC Method for Posaconazole Bulk Assay; *Scientia Pharmaceutica*, (2012); (80):317–27.
6. Cáceres, D. H., David, J., Granada, S. D., Cano, L.E., Naranjo, T.W.; Estandarización y validación en Colombia de una metodología basada en HPLC para la determinación de la concentración sérica de posaconazol; *Revista Iberoamericana de Micología*, (2016); 33(4):230–6.
7. Hamdy, D. A., Belal, T. S.; A Comparative Study of Newly Developed HPLC-DAD and UHPLC-UV Assays for the Determination of Posaconazole in Bulk Powder and Suspension Dosage Form; *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, (2014); 1-7.
8. Zhang, M., Moore, G. A., Barclay, M. L., Begg, E. J.; A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Three Triazole Antifungals in Human Plasma; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2013); 57(1):484–489.
9. Cendejas-Bueno, E., Forastiero, A., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A.; HPLC / UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clinical Microbiology and Infection*, (2011);18(12):1229–35.
10. Kahle, K., Langmann, P., Schirmer, D., Lenker, U., Keller, D., Helle, A., Klinker, H.,

- Heinz, W.; Simultaneous Determination of Voriconazole and Posaconazole Concentrations in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2009); 53(7):3140–2.
11. Gordien, J., Pigneux, A., Vigouroux, S., Tabrizi, R., Accoceberry, I., Bernadou, J., Rouaul, A., Saux, M., Breilh, D.; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Simultaneous determination of five systemic azoles in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2009); 50:932–8.
 12. Chhun, S., Rey, E., Tran, A., Lortholary, O., Jullien, V.; Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection; *Journal of Chromatography B*, (2007); 852:223–8.
 13. Marsón, M. E., Dana, D. D., Altcheh, J., García-Bournissen, F., Mastrantonio, G.; Development of UV / HPLC Methods for Quantitative Analysis of Benznidazole in Human Plasma and Urine for Application in Pediatric Clinical Studies; *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, (2013); 27(2013):384–90.
 14. Moreira, R., Oliveira, T., Silva, M., Souza, J., Lana, M.; Preclinical Monitoring of Drug Association in Experimental Chemotherapy of Chagas ' Disease by a New HPLC-UV Method; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2012); 56(6):3344–8.
 15. Guerrero, L., Pinazo, M. J., Posada, E., Gascon, J., Ribas, J., Soy, D.; A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease; *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, (2011);49(1):77–82.
 16. Silva, A. L. M., Soares Sobrinho, J. L., Rolim Neto, P. J., Silva, R. M. F., Medeiros, F. P. M., Lima, L. G.; Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos

- de benznidazol para a doença de Chagas; *Quimica Nova*, (2007); 30(5):1163–6.
17. FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics:. In Guidance for Industry, (2015). p. 18.
 18. ICH. Q2B Validation of Analytical Procedures : Methodology. In Guidance for Industry, (1996), p. 15.
 19. United States Pharmacopoeia 40. USP Convention Inc., Rockville, MD (2017).
 20. Poole, C. F. The Essence of Chromatography. Elsevier Science, Detroit, (2003), p. 925.
 21. Yang, Y., Zhu, X., Zhang, F., Li, W., Wu, Y., Ding, L.; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Stability-indicating HPLC method development and structural elucidation of novel degradation products in posaconazole injection by LC – TOF / MS , LC – MS / MS and NMR; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2016); 125:165–77.
 22. Rochat, B., Pascual, A., Sanglard, D., Decosterd, L. A., Bille, J., Marchetti, O.; Ultra-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Sensitive Bioassay Methods for Quantification of Posaconazole Plasma Concentrations after Oral Dosing; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2010); 54(12):5074–81.
 23. Engelhardt, H., Blay, C., Saar, J.; Reversed Phase Chromatography – the Mystery of Surface Silanols; *Chromatographia*, (2005); 62:19–29.
 24. Subirats, X., Bosch, E.; Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography XVII Estimation of the pH variation of aqueous buffers with the change of the methanol fraction of the mobile phase. *Journal of Chromatography A*, (2007); 1138:203–15.
 25. Leung, S., Poulakos, M. N., Machin, J.; Posaconazole: An Update of Its Clinical Use; *Pharmacy*, (2015);(3):210–68.

**APÊNCICE B - TRABALHO APRESENTADO NO XII CONGRESSO NORTE
NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO (CONNEPI).**

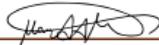


CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA DE CHAGAS: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**, de autoria de **0: ANA CRISTINA SOUSA GRAMOZA VILARINHO SANTANA -> 1: JABSON HERBER PROFIRO DE OLIVEIRA -> 2: JOSE LAMARTINE SOARES SOBRINHO** foi apresentado na modalidade **PÔSTER**, durante o XII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação (CONNEPI), realizado entre os dias 27 e 30 de novembro de 2018, no Centro de Convenções de Pernambuco.

Recife, 16 de Janeiro de 2019

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <https://hermes.ifpe.edu.br/> pelo código 703b4bb4-0b6d-494c-a355-45921ed0372d


Mário Antonio Alves Monteiro
Presidente da Comissão Organizadora do XII CONNEPI


Luciana Cavalcanti de Azevedo
Vice-Presidente da Comissão Organizadora do XII CONNEPI

REALIZAÇÃO

 INSTITUTO FEDERAL
Pernambuco

 INSTITUTO FEDERAL
Ceará