



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALINNE ÉLIDA GONÇALVES ALVES TABOSA

**OBTENÇÃO DE SISTEMA PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA DE EFAVIRENZ A
PARTIR DE INOVADORES EXCIPIENTES ORGANOMETÁLICOS: METAL
ORGANIC FRAMEWORK (MOF's)**

Recife

2020

ALINNE ÉLIDA GONÇALVES ALVES TABOSA

**OBTENÇÃO DE SISTEMA PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA DE EFAVIRENZ A
PARTIR DE INOVADORES EXCIPIENTES ORGANOMETÁLICOS: METAL
ORGANIC FRAMEWORK (MOF's)**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

T114o Tabosa, Alinne Élide Gonçalves Alves.
Obtenção de sistema para liberação prolongada de efavirenz a partir de inovadores excipientes organometálicos: *metal organic framework* (MOF's) / Alinne Élide Gonçalves Alves Tabosa. – 2020.
152 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Efavirenz. 2. HIV. 3. Compostos organometálicos. 4. Dissolução. 5. Liberação controlada de fármacos. I. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2021-049)

ALINNE ÉLIDA GONÇALVES ALVES TABOSA

**OBTENÇÃO DE SISTEMA PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA DE EFAVIRENZ A
PARTIR DE INOVADORES EXCIPIENTES ORGANOMETÁLICOS: METAL
ORGANIC FRAMEWORK (MOF's)**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 13 / 11 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Orientador e Presidente da Banca)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Prof. Dr. Rodolfo Hideki Vicente Nishimura (Examinador Externo)
Universidade Federal Vale do São Francisco-UNIVASF

Prof. Dr. Danilo Augusto Ferreira Fontes (Examinador Externo)
Centro Acadêmico da Vitória - UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Salvana Priscylla Manso Costa (Examinadora Externa)
Faculdade Irecê-FAI

Dedico esse trabalho aos meus pais Juarez Alves da Silva e Sandra Maria Gonçalves Alves, e
ao meu filho amado Gabriel Benício Alves Tabosa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu bom **Deus**, por ter me dado força, paciência e sabedoria durante todos os momentos desta jornada. Obrigada Senhor, por ter permitido com que eu esteja conquistando mais essa vitória e objetivo de vida.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Pedro Rolim**, por ter me acolhido no LTM e me ajudado na realização deste trabalho, através da oportunidade e ensinamentos científicos oferecidos. Tenho muito orgulho de ser sua orientanda e levarei por toda vida seu exemplo de humildade, esforço e sabedoria.

A minha família, em especial pais **Juarez e Sandra**, irmãos **Maike e Wesley** e meu esposo **Gláucio** pelo amor e por estarem sempre me apoiando nas minhas decisões e dando força para que eu suportasse quando o cansaço e desespero teimavam em aparecer, em especial nessa reta final me auxiliando nos cuidados com meu filho para que eu pudesse estar ausente. Ao meu filho **Gabriel**, após seu nascimento me senti muito mais estimulada para alcançar meus objetivos, não foram fáceis essas viagens diárias e abdicção de muitos momentos em família, mas vocês fizeram tudo se tornar mais leve. Amo vocês!

As meninas do grupo de pesquisa MOF's: **Aline Silva** e **Natália Millena**, pela disponibilidades de estar sempre me ajudando quando necessitava de um suporte nos experimentos, principalmente quando fiquei afastada por conta da licença maternidade, obrigada pelo incentivo e positividade nos momentos de angústia. Vocês foram essenciais!

À família LTM por me ajudarem bastante quando eu não sabia o que fazer com meus experimentos dando errado e por tornarem o laboratório um ambiente tão familiar, dentre eles **Marcelo Montenegro** pela realização do tão sonhado docking molecular.

Ao **NCQMC, Departamento de Física, Departamento de Química, Departamento de Genética** e ao **CETENE**, por ter disponibilizado equipamentos e realizado as mais diversas análises. Em especial ao professor **Severino Júnior**, pelo apoio e auxílio na síntese de MOF's. E a **Marcelo Montenegro** pela realização do tão sonhado docking molecular

A **FACEPE** pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo, me proporcionando dedicação ao projeto.

E, finalmente, a todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O Efavirenz (EFZ) é um fármaco da classe dos Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (ITRNN), extensamente utilizado na terapia anti-HIV. Entretanto, o EFZ é classificado como classe II, segundo Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade. Um dos grandes problemas deste fármaco são os tratamentos prolongados, bem como a alta incidência de reações adversas. Parte destes problemas pode ser reduzidos com associação do fármaco a uma estrutura que modifique a liberação do mesmo, modulando-a e prolongando a sua dissolução. Assim, esse trabalho objetivou obter e caracterizar sistemas contendo EFZ e uma estrutura organometálica - *Metal Organic Framework* (MOF) chamada *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF-8), a fim de ser utilizada nos estudos de pré-formulação de forma farmacêutica de liberação prolongada para a terapia anti-HIV. Os sistemas foram obtidos após agitação do fármaco e da ZIF-8 em diferentes solventes (etanol e metanol) para que fosse escolhido o melhor método, seguindo a obtenção com a secagem. Quanto às caracterizações, estas foram realizadas por meio de diferentes técnicas analíticas (espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível, análise térmica, espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier, difratometria de raios-X, microscopia eletrônica de varredura, análise de tamanho de partícula, área superficial e tamanho e volume de poros) para garantir a obtenção do sistema, prosseguindo com os ensaios de dissolução que evidenciaram o comportamento de liberação do EFZ em diferentes pH's quando associado aos materiais organometálicos. Os perfis de dissolução foram analisados por meio da área sob a curva (AUC) e ajuste de seus resultados quanto aos modelos cinéticos. Por meio dos métodos desenvolvidos a obtenção realizada com o etanol como solvente conseguiu um valor de 15% de incorporação do fármaco à ZIF-8, enquanto a obtenção em metanol atingiu 27%. Através das análises térmicas, dos espectros de FT-IR, difratogramas de DR-X e demais análises realizadas ficou comprovada a obtenção do sistema EFZ:ZIF-8 por meio da adsorção do fármaco ao material organometálico. Com o estudo de dissolução, verificou-se que o sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) conseguiu uma melhor modulação na liberação do fármaco de acordo com o pH utilizado, onde em pH 1,2 o sistema liberou uma grande quantidade de fármaco em um curto intervalo de tempo, atingindo 90% de liberação em 2h, em pH 4,5 a liberação de 95% do fármaco aconteceu em 24h, já em pH 6,8 houve uma liberação gradual atingindo uma porcentagem de 85% em 48h. O presente trabalho trouxe informações relevantes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada que utilize o EFZ como insumo farmacêutico ativo.

Palavras-chave: Efavirenz. HIV. Compostos Organometálicos. Dissolução. Liberação Controlada de Fármacos.

ABSTRACT

Efavirenz (EFZ) is a drug of the class of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs), widely used in anti-HIV therapy. However, EFZ is classified as Class II, according to the Biopharmaceutical Classification System, presenting low solubility and high permeability. Among the problems with this drug are: long term treatment and the high incidence of adverse reactions. Many of these problems can be reduced associating the drug with a structure that modulates its release. Thus, this study aimed to obtain and characterize the EFZ systems with a Metal Organic Framework (MOF) called *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF-8), to be used in pre-formulation studies of extended release dosage form, as an anti-HIV therapy. The systems were obtained after stirring the drug and ZIF-8 in different solvents (water and acetone), followed by drying, in order to choose the best method of obtaining. The characterizations were performed using different techniques (absorption spectroscopy in the ultraviolet region, thermal analysis, absorption spectroscopy in the infrared with Fourier transform, x-ray diffractometry, scanning electron microscopy, particle size, surface area analysis and size and pore volume) to ensure the achievement of the system. Then they were carried out dissolution tests, which showed the EFZ release behavior at different pH's when associated with organometallic materials. The dissolution profiles were analyzed by area under the curve (AUC), dissolution efficiency (DE%) and release kinetic models. The obtaining realized with ethanol as the solvent reach a value of 15% of drug incorporation on ZIF-8 and it was determined as the standard obtaining method. Thermal analysis, FTIR, XRD and other analyses corroborate the results that confirms the formation of EFZ:ZIF-8 system, even though by adsorption of the drug to the organometallic material. With dissolution study it the EFZ: ZIF-8 Ethanol (1:1) system achieved a better modulation in drug release according to the pH used. At pH 1.2 the system released a large amount of drug in a short period of time, up to 90% release in 2 hours. At pH 4.5 the release of 95% of the drug occurred in 24h, already at pH 6.8 there was a gradual release reaching a percentage of 85% in 48h. This study brought relevant information for the development of extended-release dosage forms using the EFZ as an active pharmaceutical ingredient.

Keywords: Efavirenz. HIV. Organometallic Compounds. Dissolution. Drug Release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de replicação do HIV.....	31
Figura 2 - Estrutura química do EFZ.	36
Figura 3 - Demonstração do perfil de dissolução de formulações de liberação convencional e prolongada.....	42
Figura 4 - Variação na concentração do fármaco com o tempo. (a) método convencional de multidosagem e (b) sistema de liberação controlada. Letra A se refere à administração do fármaco.....	44
Figura 5 - Três exemplos de redes zeólitas: a) Contendo um sistema de canais bidimensionais; b) Contendo cavidades; c) Contendo um sistema de canais unidimensionais.	46
Figura 6 - Zeólitas a) Projeção ao longo do eixo-c mostrando 7 canais; b) Projeção ao longo do eixo-c mostrando células unitárias em forma de poliedro; c) Secção mostrando as diferentes posições catiônicas; d) Visão de anéis formando canais ao longo do eixo c; e) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de cristais de zeólita... ..	47
Figura 7 - Representação esquemática que mostra a construção da MOF.....	48
Figura 8 - Demonstração das várias áreas que utilizam MOF's.....	49
Figura 9 - Construção computacionalmente plotada das MOFs: (a) MOF-5 cúbica, (b) UiO-66 tetraédrico ou octaédrico, (c) HKUST-1, (d) MIL-101 tetraédrico ou octaédrico.....	50
Figura 10 - Estrutura da ZIF-8.....	51

Figura 11 - Estrutura cristalográfica da ZIF-8, ilustrando o sítio de coordenação do íon Zn^{+2} (NC = número de coordenação) e estrutura ilustrando a cavidade da ZIF-8.....	52
Figura 12 - Síntese da ZIF-8, onde a mesma é composta por nitrato de zinco e 2-metilimidazolato..	52
Figura 13 - Estrutura da ZIF-8 em 1 (A), 2 (B) e 3 dimensões (C). Estrutura supramolecular da mesma molécula, destacando os empacotamentos Π - Π (poliedros cinzas) e as ligações de hidrogênio (região ampliada) (D).....	53
Figura 14 - Desenho esquemático para comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura.....	57
Figura 15 - Compartimento do DSC, onde: (1) cadinho com amostra, (2) cadinho referência, (3) forno DSC, (4) aquecimento, (5) sensor; curva DSC típica.....	59
Figura 16 - Diagrama de um equipamento de termogravimetria genérico.....	61
Figura 17 - Fluxograma geral para obtenção dos Sistemas EFZ:ZIF-8.....	69
Figura 18 - Varredura do espectro de absorção na região do UV-Vis do EFZ e da ZIF-8 em etanol (A) e metanol (B).....	82
Figura 19 – Curvas de incorporação do EFZ à rede da ZIF-8 em etanol (preto) e em metanol (vermelho).....	84
Figura 20 - Curvas de incorporação e valor de eficiência de incorporação (EI%) dos Sistemas EFZ:ZIF-8 Etanol nas proporções molares 1:3 e 3:1 mol/mol.....	85
Figura 21 – Curvas de incorporação e valor de eficiência de incorporação (EI%) dos Sistemas EFZ:ZIF-8 Metanol nas proporções molares 1:1 e 1:3 mol/mol.....	86

Figura 22 - Aspecto Macroscópico: A) EFZ; B) ZIF-8; C) Sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) mol/mol; D) Sistema EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1) mol/mol.....	87
Figura 23 – Espectros de infravermelho do EFZ, ZIF-8, Misturas Físicas e Sistemas EFZ:ZIF-8.....	89
Figura 24 – Difractogramas de raios-X do EFZ, ZIF-8, Misturas Físicas e Sistemas EFZ:ZIF-8.....	91
Figura 25 – Curvas TG do EFZ, da ZIF-8, das Misturas Físicas e dos Sistemas EFZ:ZIF-8 obtidos em etanol e em metanol.....	95
Figura 26 - Curvas DSC do EFZ, da ZIF-8, das Misturas Físicas e dos Sistemas EFZ:ZIF-8 obtidos em etanol e metanol.....	97
Figura 27 – Microscopia Eletrônica de Varredura A) EFZ; B) ZIF-8; C) MF 1:1; D) MF 3:1; E) Sistema EFZ:ZIF-8 Etanol 1:1 e F) Sistema EFZ:ZIF-8 Metanol 3:1.....	99
Figura 28 – a) Gráfico de tamanho de partícula por granulometria à laser do EFZ e b) da ZIF-8.....	100
Figura 29 – Microespécies majoritárias do Efavirenz em função do pH.....	102
Figura 30 – Soluções de <i>docking</i> molecular mais favoráveis entre a ZIF-8 e as microespécies do Efavirenz, destaque para o anel metilimidazol que interage por meio de interações do tipo “empilhamento em T” (laranja).....	103
Figura 31 – Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade referente ao método Alves (2010) com etanol.....	105
Figura 32 – Gráfico dos resíduos da linearidade por meio do cálculo de regressão linear referente ao método Alves (2010) com etanol.....	105

Figura 33 – Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade referente ao método ajustado (com HCl 1M) com etanol.....	106
Figura 34 – Gráfico dos resíduos da linearidade por meio do cálculo de regressão linear referente ao método ajustado com etanol.....	107
Figura 35 – Paralelismo entre as retas das curvas com etanol no efeito matriz.....	108
Figura 36 – Espectro de absorção na região do UV-Vis do parâmetro de seletividade referente ao método com etanol: A) Alves (2010) e B) Ajustado.....	111
Figura 37 – Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade referente ao método Alves (2010) com metanol.....	112
Figura 38 – Gráfico dos resíduos da linearidade por meio do cálculo de regressão linear referente ao método Alves (2010) com metanol.....	113
Figura 39 – Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade referente ao método ajustado (com HCl 1M) com metanol.....	113
Figura 40 – Gráfico dos resíduos da linearidade por meio do cálculo de regressão linear referente ao método ajustado com metanol.....	114
Figura 41 – Paralelismo entre as retas das curvas com metanol no efeito matriz.....	115
Figura 42 – Espectro de absorção na região do UV-Vis do parâmetro de seletividade referente ao método com metanol: A) Alves (2010) e B) Ajustado.....	118
Figura 43 – Perfil de dissolução do EFZ, MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 em pH 1,2.....	121
Figura 44 – Perfil de dissolução do EFZ, MFs e Sistema EFZ:ZIF-8 em pH 4,5.....	122
Figura 45 – Perfil de dissolução do EFZ, MFs e Sistema EFZ:ZIF-8 em pH 6,8.....	123

Figura 46 – Perfil de dissolução do Sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) em pH 1,2, 4,5 e 6,8..... 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelos matemáticos de cinética usados na avaliação do perfil de dissolução.....	80
Tabela 2 – Cálculo do espaçamento basal dos picos de reflexão 011, 002 e 112 da ZIF-8, Misturas Físicas e Sistemas obtidos em etanol e em metanol.....	92
Tabela 3 – Resultados da análise granulométrica e da área superficial, tamanho e volume de poros do EFZ e da ZIF-8.....	101
Tabela 4 – Solubilidade do efavirenz (mg/mL) em diferentes meios.....	104
Tabela 5 – Resultados da robustez do método com etanol por meio da variação intencional de pH com HCl 1M.....	108
Tabela 6 – Resultados da repetibilidade do método com etanol.....	109
Tabela 7 – Resultados da exatidão do método com etanol.....	110
Tabela 8 – Resultados da robustez do método com metanol por meio da variação intencional de pH com HCl 1M.....	115
Tabela 9 – Resultados da repetibilidade do método com metanol.....	116
Tabela 10 – Resultados da exatidão do método com metanol.....	117
Tabela 11 – Doseamento do EFZ por espectrofotometria.....	119
Tabela 12 – Valores médios de AUC do EFZ, MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 em pH 1,2.....	125
Tabela 13 – Valores médios de AUC do EFZ, MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 em pH 4,5.....	126
Tabela 14 – Valores médios de AUC do EFZ, MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 em pH 6,8.....	127

Tabela 15 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando Sistemas EFZ:ZIF-8 em diferentes pH's.....128

Tabela 16 – Constantes e coeficientes de liberação obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando Sistemas EFZ:ZIF-8 em diferentes pH's.....128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARV	Antirretroviral
ATR	Reflectância Total Atenuada
AUC	Área sob a Curva
AZT	Zidovudina
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
BET	Brunauer- Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
CL	do inglês <i>Clearence</i>
C _{máx}	Concentração Máxima
CMD	Concentração Média Determinada
DFC	Dose Fixa Combinada
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio Padrão
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DPR	Desvio Padrão Relativo
DR-X	Difratometria de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Diferencial
EFZ	Efavirenz
EI	Eficiência de Incorporação
EMA	Agência Medicinal Européia (do inglês <i>European Medicines Agency</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FF	Forma Farmacêutica
FFSO	Forma Farmacêutica Sólida Oral

FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GP	Glicoproteína
HAART	Terapia anti-retroviral de alta eficácia (do inglês <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus T-Linfotrófico Humano (do inglês <i>Human T-Lymphotropic Virus</i>)
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IP	Inibidores de Protease
ITR	Inibidores da Transcriptase Reversa
ITRNs	Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos
ITRNNs	Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Nucleosídeos
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LAV	Vírus Associado à Linfadenopatia (do inglês <i>International Lymphadenopathy Associated Virus</i>)
Log	Logarítimo
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
LTR	Repetições Terminais Longas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Mistura Física
MIL	Materiais do Instituto Lavoisier
MMM	Membrana de Matriz Mista
MOF	Estrutura Organometálica (do inglês <i>Metal Organic Framework</i>)
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucléico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)

RPM	Rotações por Minuto
TAR	Tratamento Antirretroviral
TCD4+	Linfócito TCD4+
TG	Termogravimetria
TGI	Trato Gastrointestinal
TR	Transcriptase Reversa
UNAIDS	Programa das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (do inglês United Nations Programme on HIV/AIDS)
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância (do inglês <i>United Nations Children's Fund</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
ZIF-8	Estrutura Imidazolato-Zinco (do inglês <i>Zeolitic Imidazolate Framework</i>)
3D	3 Dimensões

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ml	Mililitro
mg	Miligramma
®	Marca Registrada
US\$	Dólares
min	Minuto
g	Gramma
Å	Angstrom
>	Maior que
<	Menor que
≤	Menor ou igual que
Si	Silício
Al	Alumínio
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
nm	Nanômetro
g/cm ³	Gramma por centímetros cúbicos
m ² /g	Metros quadrados por grama
µm	Micrômetro
Zn	Zinco
mg/mL	Miligramma por mililitro
mm ³	Milimetro cúbico
±	Mais ou menos
cm ⁻¹	Centímetro elevado a menos 1
θ	Theta
cm	Centímetro
C	Carbono
F	Flúor
N	Nitrogênio
Co	Cobalto
H	Hidrogênio

M	Molar
N	Normal
λ	Lambda
g/mol	Gramas por mol
mL	Mililitro
h	Hora
m	Massa
V/V	Volume/Volume
C_{Corr}	Correção da concentração
C_n	Concentração no ponto de coleta n
V_t	Volume total inicial
V_s	Volume das coletas
Σ	Somatório
C_i	Concentrações das amostras nos pontos anteriores a n
t	Tempo
R^2	Coefficiente de determinação
R^2_{Ajustado}	Coefficiente de determinação ajustado
p	Número de parâmetros do modelo
Q_t	Quantidade de fármaco liberado no tempo t
Q_0	Quantidade inicial de fármaco em solução
Q_{∞}	Quantidade de fármaco dissolvido no tempo total
M_t	Quantidade de fármaco dissolvido no tempo t
M_{∞}	Quantidade de fármaco dissolvido quando a forma farmacêutica se desintegra completamente
K	Constante
$^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$	Graus Celsius por minuto
d	Diâmetro
$\text{sen}\theta$	Seno do ângulo Theta
n	Coefficiente de liberação
$^{\circ}$	Graus
L/h	Litro por hora
$\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
ΔH	Variação de entalpia

mJ	Milijoule
J	Joule
mol/mol	Mol por mol
min.µL/mL	Minuto por microlitro por mililitro
Cr	Cromo
Fe	Ferro
kV	Kilovolt
Na	Sódio
Cl	Cloro
P	Fósforo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	28
3	REFERENCIAL TEÓRICO	29
3.1	SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA-AIDS	29
3.2	EFAVIRENZ.....	35
3.3	EXCIPIENTES.....	39
3.4	LIBERAÇÃO PROLONGADA	42
3.5	MATERIAIS POROSOS.....	45
3.6	METAL ORGANIC FRAMEWORK (MOF)	47
3.7	ZEOLITIC IMIDAZOLATE FRAMEWORK (ZIF-8).....	51
3.8	CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS FARMACÊUTICOS.....	54
3.9	ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO.....	64
4	MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1	MATERIAL	67
4.2	MÉTODOS	67
4.2.1	Varredura por Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível(UV Vis)	67
4.2.2	Obtenção dos Sistemas EFZ:ZIF-8	67
4.2.3	Caracterização do Efavirenz, ZIF-8, Misturas Físicas e Sistemas	69
4.2.3.1	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	69
4.2.3.2	Difratometria de Raios-X (DR-X)	69
4.2.3.3	Termogravimetria (TG)	70
4.2.3.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	70
4.2.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	71
4.2.3.6	Tamanho de partícula por granulometria a laser, análise de área superficial e tamanho e volume de poros.....	71
4.2.3.7	Estudo de Modelagem Molecular.....	71
4.2.4	Revalidação dos métodos analíticos para quantificação do EFZ presente nos sistemas e MFs por meio da espectrofotometria no UV-Vis	72

4.2.4.1	Equipamentos.....	73
4.2.4.2	Revalidação do método analítico	73
4.2.4.2.1	Linearidade.....	73
4.2.4.2.2	Efeito Matriz.....	74
4.2.4.2.3	Robustez.....	74
4.2.4.2.4	Precisão (Repetibilidade).....	75
4.2.4.2.5	Exatidão.....	76
4.2.4.2.6	Seletividade.....	77
4.2.5	Doseamento do EFZ nos sistemas e MFs.....	77
4.2.6	Ensaio de solubilidade do Efavirenz.....	78
4.2.7	Estudos de liberação in vitro das MFs e sistemas EFZ:ZIF-8 obtido em etanol e metanol.....	78
4.2.7.1	Estudo dos perfis de dissolução in vitro	78
4.2.7.2	Tratamento de dados.....	79
4.2.7.3	Modelos cinéticos.....	80
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1	VARREDURA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA - VISÍVEL (UV-Vis).....	81
5.2	OBTENÇÃO DOS SISTEMAS EFZ:ZIF-8.....	83
5.2.1	Avaliação da incorporação do fármaco na ZIF-8.....	83
5.2.2	Aspecto Macroscópico	86
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO EFAVIRENZ, ZIF-8, MISTURAS FÍSICAS E SISTEMAS.....	87
5.3.1	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	87
5.3.2	Difratometria de Raios-X (DR-X)	89
5.3.3	Termogravimetria (TG)	92
5.3.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	95
5.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	98
5.3.6	Tamanho de partícula por granulometria a laser, análise de área superficial e tamanho e volume de poros.....	100
5.3.7	Estudo de Modelagem Molecular.....	101

5.4	ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS MFs E SISTEMAS EFZ-ZIF-8 OBTIDO EM ETANOL E METANOL.....	103
5.4.1	Ensaio de solubilidade do Efavirenz	103
5.4.2	Revalidação dos métodos analíticos para quantificação do EFZ presente nos sistemas e MFs por meio da espectrofotometria no UV-Vis.....	104
5.4.2.1	Revalidação do método analítico com etanol	104
5.4.2.1.1	Linearidade.....	104
5.4.2.1.2	Efeito Matriz.....	107
5.4.2.1.3	Robustez.....	108
5.4.2.1.4	Precisão (Repetibilidade).....	109
5.4.2.1.5	Exatidão.....	109
5.4.2.1.6	Seletividade.....	110
5.4.2.2	Revalidação do método analítico com metanol.....	111
5.4.2.2.1	Linearidade.....	112
5.4.2.2.2	Efeito Matriz.....	114
5.4.2.2.3	Robustez.....	115
5.4.2.2.4	Precisão (Repetibilidade).....	116
5.4.2.2.5	Exatidão.....	116
5.4.2.2.6	Seletividade.....	117
5.4.3	Doseamento por UV-Visível do EFZ nos Sistemas e Misturas Físicas	118
5.4.4	Estudo dos perfis de dissolução <i>in vitro</i>	119
5.4.4.1	Tratamento de dados.....	119
5.4.4.2	Modelos cinéticos.....	127
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
6.1	PERSPECTIVAS.....	132
	REFERÊNCIAS.....	133
	APÊNDICE A – CURVAS TG E DTA DA ZIF-8.....	148
	APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL ACEITO PELA REVISTA CURRENT HIV RESEARCH, INTITULADO: “PROLONGED RELEASE OF ANTI RETROVIRAL EFAVIRENZ FROM SYSTEM USING ZIF-8 AS CARRIER”.....	149
	ANEXO A - CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CONTROLE DE QUALIDADE DO EFAVIRENZ.....	150

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (do inglês AIDS) continua sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial, nos últimos 30 anos, foi constatado que já houve mais de 60 milhões de pessoas infectadas e 20 milhões de mortes por infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês HIV), sendo que, dois terços desta população residem na África Subsaariana, onde o acesso à terapia antirretroviral é bastante limitado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O arsenal terapêutico antirretroviral é composto atualmente por 23 fármacos licenciados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso clínico. Com efeitos benéficos indiscutíveis, o Efavirenz (EFZ) é um fármaco da classe dos Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (ITRNN), participante da terapia anti-retroviral de alta eficácia (HAART) e extensamente utilizado na terapia anti-HIV. Entretanto, o EFZ é classificado como classe II, segundo Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade. Isto é de extrema importância no que tange problemas de absorção no trato gastrointestinal e conseqüentemente, reduzida biodisponibilidade (BASTOS et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2017).

A dose recomendada de EFZ para adultos é de 600 mg uma vez ao dia, já para pacientes com idade entre três e dezessete anos, a dose dependerá do peso corporal. Entretanto, o EFZ não pode ser administrado como monoterapia, devendo ser associado a outros ITRNN's, o que pode dificultar a adesão do tratamento pelo paciente devido ao número de medicamentos ou a frequência com a qual estes são administrados (HARI et al., 2016).

A formulação já existente no mercado é a de liberação convencional, onde são desenvolvidas para liberar o fármaco rapidamente após a administração, no entanto, a descontinuação do tratamento ocorre em até 20% dos pacientes em uma terapia diária devido principalmente aos sintomas neuro-psiquiátricos centrais, tonturas, confusão e sonhos anormais. Em contrapartida, formulações de liberação modificada são concebidas para modular a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução, no caso de liberação prolongada os excipientes são destinados especificamente a modular a liberação do princípio ativo nos fluidos digestivos. O desenvolvimento de produtos farmacêuticos de liberação prolongada tem sido de grande interesse, tanto para formulações de novos fármacos como para o desenvolvimento de produtos contendo fármacos já utilizados na terapêutica. Os

benefícios dos efeitos terapêuticos de uma FFSO de liberação prolongada planejada corretamente são: melhora da eficácia, redução dos efeitos adversos, melhor desempenho, maior comodidade e aumento da adesão do paciente ao tratamento (CARBINATTO, 2014; NART, 2015).

Neste contexto, os excipientes farmacêuticos possibilitam, entre outras funções, melhorar a disponibilidade biológica do fármaco e modificar sua liberação. O tradicional conceito de excipiente, como sendo simples adjuvante e veículo, química e farmacologicamente inerte, vem se tornando obsoleto. Atualmente, os excipientes são considerados constituintes essenciais da formulação, capazes de garantir o bom desempenho do medicamento e otimizar o alcance e manutenção do efeito terapêutico (ELDER; KUENTZ; HOLM, 2016).

A partir dos entraves apresentados pelo EFZ, faz-se necessário o desenvolvimento de novos excipientes farmacêuticos capazes de incrementar a solubilidade em água de fármacos pouco solúveis, protegê-los físico-quimicamente e modificar sua liberação para melhor adesão do paciente e diminuição de efeitos tóxicos. Diversos excipientes com capacidade para controlar a liberação de fármacos têm sido descritos, entre eles, as redes organometálicas de coordenação, do inglês *Metal Organic Framework* (MOF), obtidas a partir de compostos híbridos. Os materiais inorgânicos apresentam propriedades promissoras para serem utilizados como carregadores, tais como boa biodisponibilidade, baixa toxicidade, alta biocompatibilidade, alta capacidade de inserção de espécies iônicas, possibilidade de funcionalização da superfície, aumento da estabilidade das espécies inseridas e promoção de sua liberação sustentada (KOTZABASAKI et al., 2017).

Pertencente a um subgrupo de MOF's, têm-se *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF-8), um imidazolato zeolítico que possui diversidade estrutural e estabilidade excepcional. São materiais que apresentam propriedades estruturais atraentes e grande potencial de armazenamento de produtos químicos, encapsulação e liberação controlada, além de apresentar outra característica muito importante, a baixa toxicidade (AMARANTE et al., 2016).

Logo, o desenvolvimento de sistemas EFZ:ZIF-8 utilizando excipientes que possibilitem a liberação prolongada permite melhor controle da cinética de liberação do fármaco de seu respectivo carreador. Nesse aspecto, é possível estabelecer níveis plasmáticos

terapêuticos constantes por tempo prolongado, com menores efeitos tóxicos e melhora na adesão do paciente ao tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver sistemas de liberação prolongada à base de efavirenz, contendo os inovadores excipientes organometálicos MOF's como moduladores de liberação do fármaco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método *ex situ* para obtenção dos sistemas EFZ:ZIF-8;
- Obter a partir de um planejamento experimental misturas físicas (MF) e sistemas EFZ:ZIF-8 em diferentes proporções;
- Caracterizar o EFZ, ZIF-8, MF e sistemas por meio de diversas técnicas analíticas;
- Revalidar metodologia por UV-Visível para doseamento do fármaco nos sistemas EFZ:MOF;
- Obter *docking* molecular para avaliar a afinidade entre o EFZ e a ZIF-8;
- Realizar estudo de dissolução *in vitro* do EFZ, dos sistemas EFZ:ZIF-8 e de suas respectivas MFs nas condições *sink*, a fim de observar o perfil de liberação do fármaco.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA - AIDS

A AIDS foi reconhecida em meados de 1980, nos EUA, a partir da identificação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais e moradores de San Francisco, que apresentaram “Sarcoma de Kaposi”, pneumonia por *Pneumocystis jirovesi* e comprometimento do sistema imune, os quais sabemos hoje, são características típicas da AIDS. Sendo esta uma doença emergente, grave, causada pelo vírus do HIV, retrovírus adquirido principalmente por via sexual (sexo desprotegido), sanguínea e por meio de objetos perfuro-cortantes contaminados, uma outra maneira é a vertical (mãe para filho durante a gestação, parto ou aleitamento). O vírus do HIV se reproduz no corpo humano nos linfócitos TCD4+, tornando o corpo vulnerável à infecção por doenças oportunistas, surgindo assim, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, chamada de AIDS ou SIDA. Destaca-se entre as enfermidades infecciosas emergentes pela grande magnitude e extensão dos danos causados às populações e, desde a sua origem, cada uma de suas características e repercussões tem sido exhaustivamente discutida pela comunidade científica e pela sociedade em geral (COSTA et al., 2015; LIMA; CECILIO; BONAFÉ, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

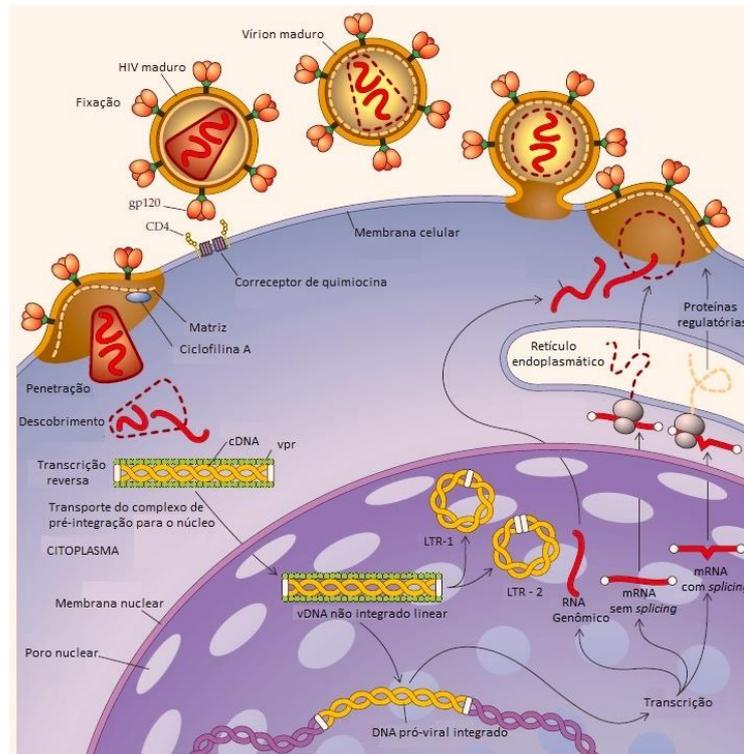
A versão símia do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) provavelmente foi transmitida do seu hospedeiro natural, o chimpanzé, para o homem do início ao meio dos anos do século XX. Essa propagação do vírus foi inicialmente lenta e focal, mas tornou-se explosiva devido à rápida urbanização na era pós-colonial. Pouco depois de conquistar uma posse mais profunda nas cidades africanas, o HIV rapidamente se espalhou pelo mundo, aparecendo em indivíduos em risco na maioria das regiões em meados dos anos 70. Após se infectar pelo vírus, uma pessoa pode permanecer durante anos com o mesmo no organismo, sem apresentar nenhum sintoma. Nesse caso, dizemos que a pessoa é portadora do HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em 1983, o HIV-1 foi isolado de pacientes com AIDS pelos pesquisadores Luc Montaigner, na França, e Robert Gallo, nos EUA, recebendo os nomes de LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus* ou Vírus Associado à Linfadenopatia) e HTLV-III

(*Human T-Lymphotropic Virus* ou Vírus T-Linfotrófico Humano tipo III) respectivamente nos dois países. Em 1986, foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovírus, com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2. Nesse mesmo ano, um comitê internacional recomendou o termo HIV para denominá-lo, reconhecendo-o como capaz de infectar seres humanos (HERTOG e SAWYER, 2015).

O ciclo do HIV (Figura 1) inicia-se na corrente sanguínea, onde glicoproteínas virais (gp120) atinge alguns tipos de células, especialmente os linfócitos T, que são essenciais para a capacidade do organismo de montar uma resposta imunológica contra vírus e bactérias, uma pessoa saudável tem entre 500 e 1500 células CD4 por mm³ de sangue, já a pessoa infectada apresenta um número abaixo de 200. As proteínas de envelope prendem-se a dois receptores na superfície das células e a interação entre eles promove a fusão da membrana do vírus com a célula hospedeira, após a fusão do envelope viral à membrana plasmática da célula-alvo, o nucleocapsídeo é descoberto, e isto é facilitado pela presença da ciclofilina A. O material genético do vírus deixa a membrana viral e as proteínas de envelope, dentro da célula, a proteína central libera ácido ribonucleico (ARN, do inglês “RNA”) e enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e proteases) para o citoplasma da célula hospedeira, em seguida, ocorre a transcrição do RNA em ácido desoxirribonucleico (ADN, do inglês “DNA”) com uma posterior ligação entre o código genético do HIV com o DNA da célula hospedeira, que entra no núcleo como complexo de pré-integração contendo proteína vpr e integrase, somente o vDNA linear é capaz de se integrar ao acaso ao cromossomo hospedeiro. Outras formas de fragmentos de vDNA linear parcialmente transcritos, além do vDNA epissomal circular de repetições terminais longas (LTR) 1 e 2 são incapazes de integração. A transcrição do molde de DNA pró-viral gera RNA viral genômico, enquanto o splicing alternativo do RNA mensageiro (mRNA) cria espécies de mRNA viral de splicing codificadoras de proteínas virais acessórias e espécies de mRNA viral sem splicing codificadoras de poliproteínas estruturais virais. Todos os transcritos são exportados para o citoplasma, onde o processamento e a montagem começam a ocorrer junto ao retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os polipeptídeos virais, protease, RNA viral e outros constituintes do core viral ficam condensados em áreas da membrana plasmática que já possuem acúmulos de proteínas do envelope viral (gp120/gp41). Ocorre, então, o brotamento dos vírions e o core do nucleocapsídeo do vírion imaturo sobre maturação proteolítica adicional no meio extracelular (COSTA et al., 2015; HERTOG e SAWYER, 2015).

Figura 1 – Ciclo de replicação do HIV.



Fonte: HOFFMANN e GALLANT, 2007.

A infecção pelo HIV pode ser dividida em algumas fases clínicas, porém o curso da infecção varia muito de pessoa para pessoa:

Infecção aguda

A infecção aguda, que geralmente dura de 2 a 8 semanas, também chamada de síndrome da infecção retroviral aguda ou infecção primária, ocorre em cerca de 50% a 90% dos pacientes, seu diagnóstico é pouco realizado devido ao baixo índice de suspeita, sendo, em sua maioria, retrospectivo. O tempo entre a exposição e os sintomas é de cinco a 30 dias e a história natural da infecção aguda caracteriza-se tanto por viremia elevada, como por resposta imune intensa, durante o pico de viremia, ocorre diminuição rápida dos linfócitos T CD4 +, que posteriormente aumentam, mas geralmente não retornam aos níveis prévios à infecção. Observa-se, também, aumento do número absoluto de linfócitos T CD8+ circulantes, com a inversão da relação CD4+/CD8+, que se torna menor que um. Este aumento de células T CD8+, provavelmente, reflete uma resposta T citotóxica potente, que é detectada antes do

aparecimento de anticorpos neutralizantes. Existem evidências de que a imunidade celular desempenha papel fundamental no controle da viremia na infecção primária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os sintomas aparecem durante o pico da viremia e da atividade imunológica, as manifestações clínicas podem variar, desde quadro gripal até *uma síndrome mononucleose-like*. Além de sintomas de infecção viral, como febre, adenopatia, faringite, mialgia, artralgia, *rash* cutâneo maculopapular eritematoso, ulcerações mucocutâneas envolvendo mucosa oral, esôfago e genitália, hiporexia, adinamia, cefaléia, fotofobia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, náuseas e vômitos; os pacientes podem apresentar candidíase oral, neuropatia periférica, meningoencefalite asséptica e síndrome de Guillain-Barré. Os achados laboratoriais inespecíficos são transitórios, e incluem: linfopenia seguida de linfocitose, presença de linfócitos atípicos, plaquetopenia e elevação sérica das enzimas hepáticas. Os sintomas duram, em média, 14 dias, sendo o quadro clínico autolimitado. A ocorrência da síndrome de infecção retroviral aguda clinicamente importante ou a persistência dos sintomas por mais de 14 dias parecem estar relacionadas com a evolução mais rápida para AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Após a resolução da fase aguda, ocorre a estabilização da viremia em níveis variáveis (*set points*), definidos pela velocidade da replicação e clareamento viral. O *set point* é fator prognóstico de evolução da doença. A queda da contagem de linfócitos T CD4+, de 30 a 90 células por ano, está diretamente relacionada à velocidade da replicação viral e progressão para a AIDS (JANSEN; BAARLE; MIEDEMA, 2006).

Fase assintomática

Na infecção precoce pelo HIV, também conhecida como fase assintomática, o estado clínico básico é mínimo ou inexistente, caracterizada por um esgotamento lento e gradual dos linfócitos T CD4, mas a taxa de declínio varia substancialmente entre os indivíduos, essa fase pode durar de 8 a 10 anos, dependendo de cada caso. Alguns pacientes podem apresentar uma linfadenopatia generalizada persistente, "flutuante" e indolor. Portanto, a abordagem clínica nestes indivíduos no início de seu seguimento prende-se a uma história clínica prévia, investigando condições de base como hipertensão arterial sistêmica, diabetes, DPOC, doenças hepáticas, renais, pulmonares, intestinais, doenças sexualmente transmissíveis, tuberculose e

outras doenças endêmicas, doenças psiquiátricas, uso prévio ou atual de medicamentos, enfim, situações que podem complicar ou serem agravantes em alguma fase de desenvolvimento da doença pelo HIV. A história familiar, hábitos de vida, como também uma avaliação do perfil emocional e psicossocial do paciente, seu nível de entendimento e orientação sobre a doença são extremamente importantes. No que diz respeito à avaliação laboratorial nesta fase, uma ampla variedade de alterações podem estar presentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; TOULOUMI e HATZAKIS, 2000).

Fase sintomática inicial

Sudorese noturna é queixa bastante comum e tipicamente inespecífica entre os pacientes com infecção sintomática inicial pelo HIV, pode ser recorrente e pode ou não vir acompanhada de febre. Nessa situação deve ser considerada a possibilidade de infecção oportunista, particularmente tuberculose, lançando-se mão de investigação clínica e laboratorial específicas. Fadiga também é freqüente manifestação da infecção sintomática inicial pelo HIV e pode ser referida como mais intensa no final de tarde e após atividade física excessiva, fadiga progressiva e debilitante deve alertar para a presença de infecção oportunista, devendo ser sempre pesquisada.

Emagrecimento é um dos mais comuns entre os sintomas gerais associados com infecção pelo HIV, sendo referido em 95-100% dos pacientes com doença em progressão, geralmente encontra-se associado a outras condições como anorexia. A associação com diarreia aquosa o faz mais intenso, consistindo em manifestação freqüente da infecção pelo HIV desde sua fase inicial. Determinar a causa da diarreia pode ser difícil e o exame das fezes para agentes específicos se faz necessário, na infecção precoce pelo HIV, patógenos entéricos mais comuns devem ser suspeitos: *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Campylobacter sp*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, adenovírus, rotavírus. Agentes como *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*, geralmente reconhecidos em fase mais avançada da doença causada pelo HIV, podem apresentar-se como expressão clínica autolimitada, principalmente com a elevação da contagem de células T CD4+ obtida com o início do tratamento antiretroviral.

Quando a identificação torna-se difícil ou falha, provas terapêuticas empíricas podem ser lançadas, baseando-se nas características epidemiológicas e clínicas do quadro. A gengivite e outras doenças periodontais podem manifestar-se de forma leve ou agressiva em

pacientes com infecção pelo HIV, sendo a evolução rapidamente progressiva, observada em estágios mais avançados da doença, levando a um processo necrotizante acompanhado de dor, perda de tecidos moles periodontais, exposição e seqüestro ósseo (COSTA et al., 2015).

Segundo relatórios mais recentes da UNAIDS, cerca de 37,9 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com a síndrome até o final de 2018, um incremento de mais de 1 milhão de pessoas quando comparado com o último estudo. Na América Latina estima-se que 100.000 pessoas adquiriram HIV, um aumento de 7% comparado aos estudos de 2010. A elevação foi induzida pelos aumentos que ocorreram no Chile (34%), Bolívia (22%) e Brasil (21%). Nos quais 40% das novas infecções foram entre homens gays ou homens que tiveram sexo com outro homem. Entretanto, o balanço anual de mortes por doenças associadas a AIDS na América Latina teve um declínio de 14% entre 2010 e 2018, estimando-se que 35.000 pessoas tenham perdido a vida devido a doenças associadas com a AIDS (UNAIDS, 2019).

Nos últimos dois anos, o número de pessoas que vivem com o HIV em terapia anti-retroviral aumentou em cerca de um terço, atingindo 17,0 milhões de pessoas – 2 milhões a mais do que os 15 milhões até 2015 fixados pela Assembleia Geral das Nações Unidas. Desde a primeira meta de tratamento que foi estabelecida em 2003, as mortes relacionadas com a AIDS diminuíram em 43%. Na região mais afetada do mundo, África Oriental e Austrália, o número de pessoas em tratamento mais do que duplicou desde 2010, atingindo cerca de 10,3 milhões de pessoas, as mortes relacionadas com a AIDS na região diminuíram 36% desde 2010 (UNAIDS, 2016).

O tratamento antirretroviral (TAR) teve início em 1987 com a aprovação da zidovudina (AZT) pela vigilância sanitária americana, mas apenas em meados de 1992 foi que o governo federal autorizou a distribuição gratuita deste medicamento no Brasil permitindo reduzir em 50% a mortalidade por AIDS no país e aumentou em 80% o tratamento para as doenças oportunistas, o que reflete melhor qualidade de vida das pessoas que vivem com HIV/AIDS. Desde então, outros fármacos foram liberados para uso e classificados de acordo com o tipo de enzima que eles podem inibir durante a replicação do vírus. Os clássicos são os inibidores da transcriptase reversa (ITR) inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos (ITRNs), inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeos (ITRNNs) e inibidores de protease (IP).

A transcriptase reversa (TR) é muito importante no ciclo do HIV, atuando na recodificação do material genético do vírus, convertendo-o de RNA para DNA, as principais classes de medicamentos que bloqueiam a ação viral neste estágio são os ITRNs e os

ITRNNs. Os nucleosídeos, por ação enzimática, sofrem trifosforilação, transformando-se em metabólitos, que são os reais inibidores da TR, como os nucleotídeos apresentam em sua estrutura um grupo fosfato, eles necessitam apenas de duas fosforilações para impedir a transcrição do RNA em DNA. Os ITRNNs são inibidores não competitivos, que se ligam a um sítio alostérico da enzima, provocando a restrição da mobilidade e flexibilidade do sítio ativo responsável pela formação da dupla hélice de DNA e, então levando a uma drástica redução na eficiência da enzima. Os inibidores da protease agem no último estágio da formação do HIV, impedindo a ação da enzima protease que é fundamental para a clivagem das cadeias protéicas produzidas pela célula infectada em proteínas virais estruturais e enzimas que formarão cada partícula do HIV (COSTA et al., 2015).

O aumento na sobrevida e uma melhora na qualidade de vida dos portadores do HIV foi atingida por meio do TAR. No entanto, a prática da monoterapia funcional, que consiste na administração de apenas um medicamento, resultou no aparecimento de resistências. Desde então, recomenda-se o emprego da terapia combinada onde o tratamento anti-retroviral é realizado com associação de duas ou mais drogas da mesma classe farmacológica (p ex. dois análogos nucleosídeos), ou de classes diferentes (p ex. dois análogos nucleosídeos e um inibidor de protease). Estudos multicêntricos demonstraram aumento na atividade anti-retroviral (elevação de linfócitos T-CD4+ e redução nos títulos plasmáticos de RNA-HIV) quando há associação de drogas, particularmente redução da replicação viral por potencializar efeito terapêutico ou por sinergismo de ação em sítios diferentes do ciclo de replicação viral, outros estudos evidenciaram redução na emergência de cepas multirresistentes. As associações podem ser feitas pelo uso de coquetéis (diferentes medicamentos ingeridos simultaneamente) ou de formulações em dose fixa combinada (DFC) (COSTA et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

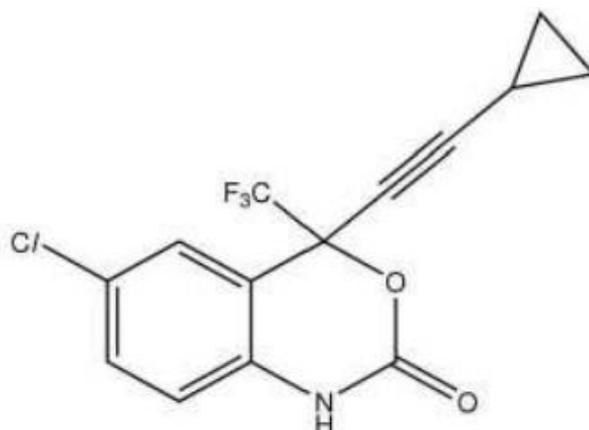
3.2 EFAVIRENZ

Os fármacos anti-retrovirais são classificados pelo ciclo de vida viral que inibem e, em alguns casos, pela sua estrutura química. Embora muitas drogas possam ter como alvo uma única enzima, essas drogas têm perfis de efeitos colaterais únicos, interações medicamentosas e potência modificada. Por essas razões, a maioria dos formulários permite acesso a todos os medicamentos, mas essa prática pode mudar uma vez que os medicamentos genéricos se

tornam disponíveis e as diferenças de custo entre as opções terapêuticas se tornam mais substanciais. O desenvolvimento de fármacos anti-retrovirais foi acelerado por testes laboratoriais precisos, reprodutíveis e baratos. Em contraste com a maioria das doenças que necessitam de reduções na mortalidade ou nas taxas de eventos clínicos para estabelecer a eficácia do tratamento, a maioria dos fármacos anti-retrovirais receberam aprovação acelerada com base nas reduções nas concentrações da carga viral no plasma (VOLBERDING e DEEKS, 2010).

Dentre os fármacos utilizados na terapia antirretroviral, têm-se o efavirenz (EFZ) (Figura 2) (*4S*)-6-cloro-4-(2-ciclopropiletinil)-4-(trifluorometil)-1,4-dihidro-2*H*-3,1-benzoxazin-2-ona fármaco recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para pacientes infectados com HIV, pertence a classe anti-retroviral de inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNT), permitindo que este entre e chegue ao núcleo da célula infectada, assumindo o controle dos mecanismos de replicação, sendo assim um potente fármaco anti-HIV. Por estas razões e o fato de um menor risco de concentração sub-terapêutica em relação a nevirapina ou inibidores de protease (IPs), o EFZ é uma das drogas mais úteis contra o vírus da imunodeficiência humana, nas infecções do tipo 1 (HIV-1) em adultos e crianças, além de ser um componente chave das combinações de tratamento freqüentemente prescritas para a infecção. No entanto, a descontinuação do tratamento ocorre em até 20% dos pacientes em uma terapia diária baseada em EFV devido principalmente aos sintomas neuro-psiquiátricos centrais, tonturas, confusão e sonhos anormais (BASTOS et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2017; CUMMINS et al., 2015; MARQUES et al., 2017).

Figura 2 – Estrutura química do EFZ.



Fonte: MADHAVI et al., 2011.

O EFV foi desenvolvido utilizando a abordagem do bioisoterismo com base na estrutura da quinazolina L-608,788, esta ferramenta parte de uma modificação molecular do protótipo com o objetivo de otimização, alterando os fragmentos moleculares que exibem as mesmas propriedades físico-químicas. Este fármaco contém na sua estrutura um carbono quiral que confere atividade óptica de configuração *S*, já a atividade biológica está relacionada ao enantiômero levógiro, é descrito como um sólido branco ou ligeiramente amarelo com ponto de fusão de 139 e 141 °C e pKa de 10,2, classifica-se como Classe II (baixa solubilidade em água, alta permeabilidade intestinal) de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), mostrando má absorção gastrointestinal devido à solubilidade inadequada do fármaco em fluidos gastrointestinais, além disso, a biodisponibilidade oral desta droga está entre 40% e 45%. O Efavirenz é metabolizado via citocromo hepático P450 e é tanto um substrato como um indutor das isoformas 2B6 e 3A4 do sistema citocromo, a atividade variável deste resulta na variabilidade interpaciente na depuração do fármaco, na eficácia e na toxicidade. Até a data, a gama de concentrações plasmáticas recomendadas de EFV às 12 h após a dosagem é proposta para ser 1-4 mg/L (BASTOS et al., 2016; FANDARUFF et al., 2015; MANOSUTHI et al., 2014; MARQUES et al., 2017).

Como é pouco solúvel em água, a dose necessária para a atividade terapêutica é alta e, portanto, recomendada como 600 mg uma vez por dia. A janela terapêutica proposta para este fármaco em indivíduos portadores do HIV é de 1 µg/mL (concentração mínima eficaz) e de 4µg/mL (concentração máxima tolerada) e a concentração plasmática máxima (C_{máx}) encontrada no plasma humano após administração oral de 600mg é de 12,9±3,7µM, equivalente a 4,07±1,17 µg/mL. O tempo para concentração plasmática máxima é de 3-5 horas e o estado de equilíbrio é alcançado entre 6 e 10 dias. A eliminação do EFZ é caracterizada pela meia vida e possui um *clearance* (CL), após administração oral, de 9,4 L/h (HARI et al., 2016).

Esse fármaco apresenta-se na forma cristalina, descrito com pelo menos 5 diferentes polimorfos por Radesca et al (1999) pela patente WO 99/6445, onde esse polimorfismo é comprovado por meio de ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X. O polimorfo 1 é caracterizado por ser o mais estável termodinamicamente, apresentando faixa de fusão entre 138° e 140 °C, por essa característica deve ser o comumente utilizado nas formulações para uma garantia de maior estabilidade do produto farmacêutico (BEDOR, 2011). Segundo Chada et al., 2012, foram divulgadas mais algumas patentes e

publicações, posterior a este relatório do ano de 1999, que descreveram os métodos para a preparação de novas modificações utilizando diferentes solventes e anti-solventes. Porém, segundo os autores, os aspectos termodinâmicos de vários polimorfos não foram levados em consideração, além disso, a transformação de uma forma polimórfica para outra não foi relatada, havendo, desta forma, várias lacunas que precisam ser preenchidas para completa caracterização destes polimorfos.

O EFZ foi descoberto pelos pesquisadores da Merck, desenvolvido em conjunto com a DuPont e sua comercialização liberada pelo FDA em setembro de 1998, tinha o custo de tratamento de aproximadamente U\$ 10,95 (dez dólares e noventa e cinco centavos) por dia. Em 4 de maio de 2007, o Presidente da República assinou o decreto 6 108/2007, que oficializou o licenciamento compulsório do efavirenz para uso público não-comercial, sendo no Brasil o primeiro decreto de licenciamento compulsório de um medicamento antirretroviral, o processo teve início em 24 de abril de 2007, com a publicação da portaria 886/2007, que declarou o medicamento de interesse público, devido ao seu custo-efetividade para o tratamento da AIDS (BÉTHUNE, 2010).

Após a declaração de interesse público, o laboratório Merck Sharp & Dohme teve um prazo de 7 dias para se pronunciar, depois de várias negociações, que vinham se estendendo desde novembro de 2006, por meio de reuniões, correspondências e teleconferências, o laboratório ofereceu redução de 30% sobre o preço de US\$ 1,59 por comprimido de 600 mg, levando o valor unitário do produto a US\$ 1,11. A proposta do Brasil era de que o laboratório praticasse o mesmo preço pago pela Tailândia — US\$ 0,65 por comprimido —, 136% menor do que o valor na época pago pelo Brasil. Para cada país, os laboratórios farmacêuticos estabelecem um preço de mercado, justificado pelo poder aquisitivo e as riquezas de cada nação. A redução de 30% oferecida pela Merck foi considerada insatisfatória pelo governo brasileiro, que recebeu propostas de laboratórios internacionais oferecendo a versão genérica do medicamento por US\$ 0,45. O licenciamento compulsório permitiu que o Ministério da Saúde importasse versões genéricas de laboratórios pré-qualificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), essa concessão previu a importação do medicamento atrelada ao compromisso de que o laboratório exportador repassasse ao Brasil toda a tecnologia para produção nacional pelo laboratório oficial Farmanguinhos (Fundação Osvaldo Cruz). Inicialmente, foram compradas versões genéricas do medicamento produzidas por laboratórios da Índia, dos produtores mundiais que tinham o efavirenz pré-qualificado pela

OMS, duas companhias farmacêuticas indianas foram selecionadas: a Aurobindo e a Ranbaxy. Os primeiros lotes chegaram ao Brasil em julho de 2007, assegurando o abastecimento do antirretroviral. A carga entregue era composta por 3,3 milhões de comprimidos de 600 mg, comprados pelo preço unitário de US\$ 0,46. O segundo lote importado foi de 108 000 cápsulas de 200 mg, adquiridas por US\$ 0,22, cada uma. O processo de aquisição da primeira remessa de efavirenz genérico ficou sob responsabilidade do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), já a aquisição do segundo lote ficou a cargo da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/OMS. Pela legislação, o laboratório detentor da patente recebeu *royalties*, que variavam de 0,5 a 2% do valor de aquisição, o Brasil pagava 1,5% do valor de compra (BÉTHUNE, 2010; RODRIGUES e SOLER, 2009).

A partir de então no Brasil, encontram-se registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as seguintes apresentações farmacêuticas do efavirenz: solução oral de 30 mg.mL⁻¹, cápsulas gelatinosas duras de 50 e 200 mg e comprimidos revestidos de 300 e 600 mg. A dose recomendada de EFZ para adultos é de 600 mg uma vez ao dia, porém em pacientes com idade entre três e dezessete anos, a dose dependerá do peso corporal. Devido ao aparecimento relativamente rápido de cepas resistentes, o EFZ não pode ser administrado em monoterapia e, portanto, no momento da escolha dos novos agentes anti-retrovirais para serem usados em combinação, deve ser levada em consideração a possibilidade de resistência viral cruzada (BRASIL, 2018).

3.3 EXCIPIENTES

Os excipientes são de várias origens: animal (lactose, gelatina, ácido esteárico), vegetal (amidos, açúcares, celulose, arginatos), mineral (fosfato de cálcio, sílica) e sintético (PEGs, Polissorbatos, povidona, etc.). A sua origem e utilização devem ter sua qualidade exigida pela indústria farmacêutica, que precisam, por conseguinte, submetê-los a controles analíticos. Considera-se que mais de mil materiais diferentes são utilizados na indústria farmacêutica para cumprir as suas diversas exigências, tais como diluentes, agentes de volume, desintegrantes, lubrificantes, corantes, edulcorantes, etc. São compostos quimicamente heterogêneos que vão de moléculas simples a misturas complexas de óleos naturais, semi-sintéticos ou sintéticos (ELDER; KUENTZ; HOLM, 2016).

Outra definição de excipientes é "substâncias, diferentes da substância ativa ou da forma farmacêutica acabada, que foram adequadamente avaliadas quanto à segurança e estão incluídas num sistema de administração de fármaco para auxiliar o processamento do sistema de administração durante o seu fabrico, para proteger, apoiar, aumentar a estabilidade, biodisponibilidade ou aceitabilidade do doente, auxiliar na identificação do produto ou melhorar quaisquer outros atributos da segurança e eficácia globais do sistema de administração de fármaco durante a armazenagem ou utilização" Esta definição é mais elaborada e alude a excipientes com um propósito, o que contrasta com a antiga terminologia de "ingredientes inativos" que sugere a propriedade de inércia (THE INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS COUNCIL, 1995).

Muitas vezes no início dos anos 80, havia conhecimento regulamentar mínimo sobre quem fez o princípio ativo ou como ele foi feito. Milhares de produtos tinham licenças de produtos de direito emitidas para medicamentos do Reino Unido já comercializados quando a Lei de Medicamentos entrou em vigor em 1972. A indústria tratava frequentemente as substâncias ativas como mercadorias obtidas por meio de corretores e, embora o comprador devesse ter tido uma especificação, isto pode não ter sido bem conhecida pela autoridade de licenciamento. Não é surpresa, portanto, os reguladores saber ainda menos sobre ‘outros ingredientes’, que são os ‘ingredientes inativos’ como passou a ser chamado (ROBERTSON, 1999).

O tempo não ficou parado, para apoiar os pedidos de autorização de introdução no mercado, foi necessário aumentar a informação sobre os ingredientes ativos. Hoje, exigências da farmacopéia podem ser consideradas insuficientes para fins de licenciamento e exigências extras sobre o controle de substâncias relacionadas, solventes residuais e catalisadores residuais são muitas vezes necessários antes de assessores aceitarem uma especificação. Outras exigências modernas são saber o nome do fabricante, o local de fabricação e detalhes extensos sobre o método de síntese, fermentação, extração, purificação, etc, para cada princípio ativo. Em geral, muito menos informação é exigida sobre excipientes (ELDER; KUENTZ; HOLM, 2016).

O interesse renovado nas formas de liberação modificada e nos novos sistemas terapêuticos, bem como nas novas tecnologias de produção, contribuiu para a investigação de novos materiais dotados de propriedades tecnológicas específicas e do seu desenvolvimento como excipientes funcionais. Todos estes fatores e mais mudaram o conceito tradicional de

um excipiente para o mais atualizado do agente funcional, isto é, aquele que pode cumprir várias funções dentro da formulação farmacêutica. Contribuíram igualmente para centrar a atenção dos tecnólogos farmacêuticos na qualidade do excipiente, o que também contribuiu para a eficácia e segurança da utilização do medicamento, juntamente com os princípios ativos. Os excipientes frequentemente influenciam positivamente a estabilidade do produto acabado, a demonstração da eficácia do conservante antimicrobiano e o ensaio específico do teor de conservante são requisitos regulamentares bem conhecidos. Os antioxidantes podem estabilizar os ingredientes ativos. Os co-solventes podem manter a biodisponibilidade evitando a cristalização em parenterais ou sendo intensificadores de penetração em produtos tópicos. A quantidade de excipiente utilizada na forma farmacêutica pode muitas vezes ser significativamente mais elevada do que as substâncias ativas, e existem algumas orientações sobre níveis apropriados em diferentes formulações. Como excipientes são componentes importantes de todas as formulações farmacêuticas, é crucial para o cientista farmacêutico compreender os diferentes tipos/graus de excipientes que estão disponíveis. Isto é mais importante para reconhecer se um novo excipiente será necessário dentro da formulação e como estes podem se comportar (ELDER; KUENTZ; HOLM, 2016).

Hoje numa forma farmacêutica moderna, adequada para ser administrada entericamente, parentericamente e topicamente, deve-se lembrar de garantir a estabilidade e precisão da dose, melhorando as características organolépticas e a adesão do paciente. A tecnologia farmacêutica moderna requer também a verificação do estado físico do excipiente, que é tão importante tanto na fase de fabrico como para controlar a libertação do princípio ativo, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade e conseqüentemente a eficácia e tolerabilidade do medicamento (ELDER; KUENTZ; HOLM, 2016).

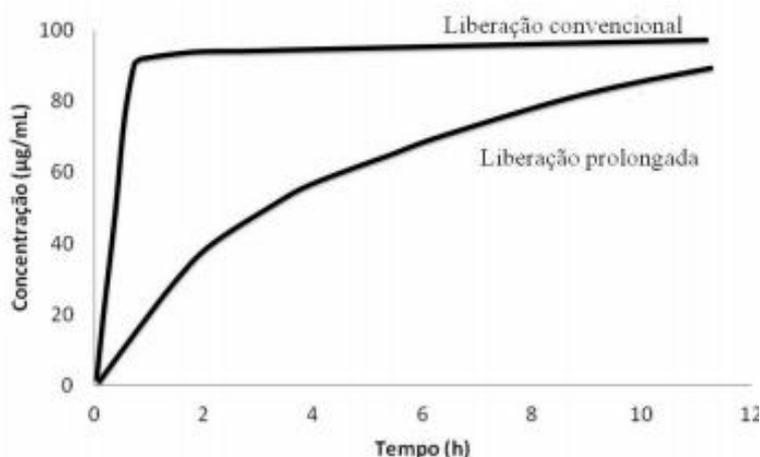
3.4 LIBERAÇÃO PROLONGADA

Todo insumo farmacêutico ativo (IFA) precisa de um sistema de entrega para levá-lo ao local de ação após a administração ao paciente. Também é definido como uma formulação ou dispositivos que permitem a introdução de substâncias terapêuticas no corpo e melhoram sua eficácia e segurança ao controlar a taxa, o tempo e o local de libertação de drogas no organismo. Este processo inclui a administração de produto terapêutico, libertação do ativo deste produto e o subsequente transporte dos ingredientes ativos através das membranas

biológicas para o local de ação. A administração por via oral das formulações, historicamente, se tornou preferencial devido à facilidade de adesão do paciente ao tratamento, por isso é frequentemente utilizada, essa via apresenta vantagens como facilidade de administração, maior segurança, comodidade e economia, entretanto possui algumas limitações, como a variabilidade do tempo de passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), o efeito de primeira passagem no fígado, a absorção limitada na porção inferior do TGI, dentre outras (AHMED, 2015; NART, 2015).

As Formas Farmacêuticas Sólidas Orais (FFSO) podem ser classificadas, de acordo com o tipo de liberação do fármaco, podendo ser de liberação convencional ou modificada. As formulações de liberação convencional são desenvolvidas para liberar o fármaco rapidamente após a administração sendo empregados excipientes que favorecem os processos de liberação e dissolução do fármaco. Em contrapartida, as FFSO de liberação modificada são concebidas para modular a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução, no caso de liberação prolongada os excipientes são destinados especificamente a modular a liberação do princípio ativo nos fluidos digestivos (Figura 3) (NART, 2015).

Figura 3 – Demonstração do perfil de dissolução de formulações de liberação convencional e prolongada.



Fonte: NART, 2015.

A definição do *Food and Drug Administration* (FDA) é um pouco diferente, sendo considerada uma forma de liberação prolongada aquela que permite uma redução da frequência de dosagem, sem especificar o tamanho desta redução. Neste contexto, é

importante notar que os termos “liberação controlada”, “liberação estendida” (tradução literal um tanto estranho da terminologia inglesa “extended”) e “liberação sustentada” são sinônimos de “liberação prolongada”. A Legislação Canadense e a Farmacopéia Britânica definem “Modified-Release” da mesma forma que a Farmacopéia Americana, porém não fazem distinção entre os dois grupos supracitados (“Delayed” e “Extended” “- Release Dosage Forms”) (NOËL et al., 2004).

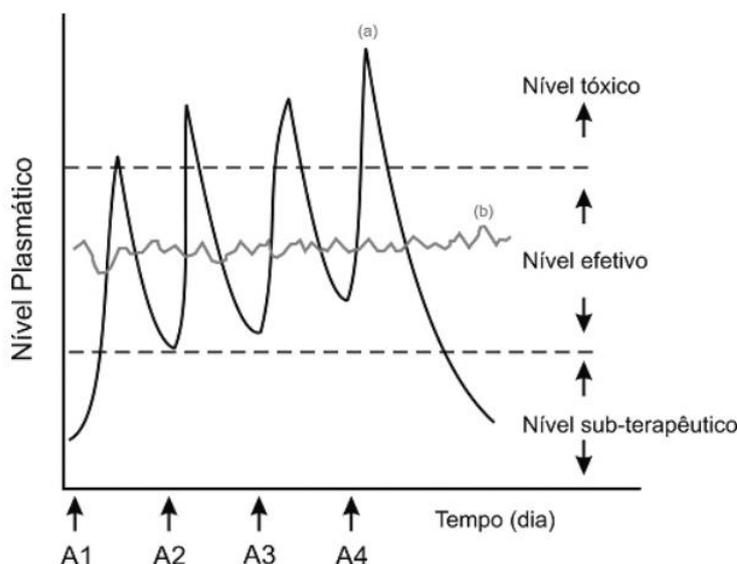
As formas farmacêuticas de liberação prolongada são desenvolvidas para modelar a absorção ou alterar o local de liberação. O desenvolvimento de produtos farmacêuticos de liberação prolongada tem sido de grande interesse, tanto para formulações de novos fármacos como para o desenvolvimento de produtos contendo fármacos já utilizados na terapêutica. Os benefícios dos efeitos terapêuticos de uma FFSO de liberação prolongada planejada corretamente são: melhora da eficácia, redução dos efeitos adversos, melhor desempenho, maior comodidade e aumento da adesão do paciente ao tratamento. A liberação do fármaco a partir de uma forma farmacêutica de liberação modificada é controlada por vários mecanismos como a difusão, erosão ou pressão osmótica, sendo dependente do sistema utilizado na formulação e dos polímeros selecionados para o seu desenvolvimento. A seleção do método mais adequado depende de fatores como: custo, perfil de liberação desejado e propriedades do fármaco.

A terminologia utilizada para designar os medicamentos de liberação controlada é bastante ambígua e controversa e a literatura apresenta uma variedade de expressões para descrever esses sistemas, tais como: liberação retardada, repetida, prolongada, sustentada, controlada e modificada. Os medicamentos de liberação sustentada promovem uma liberação inicial de fármaco, suficiente para disponibilizar a dose terapêutica e a manutenção da concentração plasmática do fármaco constante durante um tempo maior que o medicamento convencional, representando uma situação ideal (liberação de ordem zero). Os medicamentos com ação prolongada são aqueles a partir dos quais a concentração plasmática eficaz é obtida e mantida durante muito tempo; para que ocorra este efeito é necessária à incorporação de uma quantidade maior de fármaco em relação à forma farmacêutica convencional. Medicamentos com liberação repetida do fármaco são aqueles que apresentam uma dose individual, que é liberada regularmente logo após a administração, e uma segunda ou até terceira doses que são subsequentemente liberadas, obtendo-se uma curva de concentração plasmática semelhante às resultantes de doses consecutivas de medicamentos convencionais.

Medicamentos de liberação retardada são aqueles em que o início da liberação apresenta um tempo de latência maior em relação ao da forma farmacêutica convencional correspondente. (CARBINATTO, 2010).

O estudo sobre sistemas de liberação controlada está em constante crescimento, pois visa melhorar e prolongar o controle da administração de fármaco. Sistemas de administração convencionais, como spray, injeção e pílulas, apresentam um aumento na concentração do fármaco, logo após a administração do mesmo, atingem um pico máximo de dosagem no sangue e depois declinam, conforme o tempo de ação do medicamento. A liberação controlada de fármaco tem como objetivo principal o maior aproveitamento do princípio ativo, diminuindo o aparecimento de doses tóxicas e subterapêuticas, utilização de menor quantidade do princípio ativo, resultando em menor custo, maior intervalo na administração, direcionamento do princípio ativo para seu alvo específico (Figura 4) (AHMED, 2015; MOREIRA, 2013; RODRIGUES, 2012).

Figura 4 – Variação na concentração do fármaco com o tempo. (a) método convencional de multidosagem e (b) sistema de liberação controlada. Letra A se refere à administração do fármaco.



Fonte: LYRA, 2007.

A liberação controlada implica uma associação química ou física dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados, tenham capacidade de

conduzir o fármaco até o sítio específico de atuação, com a taxa de liberação controlada. Materiais de natureza lipídica, inorgânica, orgânico-metálica e polimérica têm sido utilizados como suportes para essa liberação controlada. Estes sistemas de liberação podem ser classificados de acordo com vários critérios, como classe de material utilizado, tipo de agente terapêutico incorporado, estado físico, via de administração, forma como o fármaco se encontra imobilizado no sistema e a natureza do mecanismo que controla a liberação deste (MOREIRA, 2013).

O desenvolvimento de um sistema de liberação controlada eficaz é um empreendimento complexo, pois envolve o conhecimento e integração de uma série de aspectos de natureza diversa, tais como as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco; a via de administração e as consequentes barreiras fisiológicas e bioquímicas impostas à absorção do fármaco; as propriedades do material/materials base do sistema, biocompatibilidade, comportamento *in vivo*, interações com o fármaco entre outras tecnologias (MOREIRA, 2013).

3.5 MATERIAIS POROSOS

O grande interesse científico nos materiais porosos deve-se a sua ampla aplicabilidade nos setores da saúde e tecnologia tais como: separações químicas, troca iônica, sensores, carreadores de fármaco, entre outros. Esses materiais são divididos em três classes, sendo eles denominados materiais porosos inorgânicos, materiais à base de carbono e polímeros de coordenação (WANG, 2018).

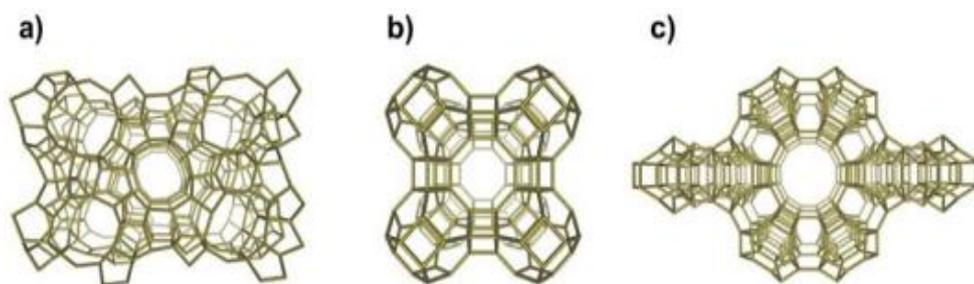
Materiais porosos são classificados segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) baseados em seus tamanhos de poros, d : microporosos para $d < 20 \text{ \AA}$, mesoporosos para $20 \text{ \AA} \leq d \leq 500 \text{ \AA}$, e macroporosos para $d > 500 \text{ \AA}$. Recentemente há referências a materiais nanoporosos para estruturas que tem poros entre 10 – 100 Å de diâmetro (LUO, 2018).

Até metade dos anos 90, havia basicamente dois tipos de materiais porosos, chamados, inorgânicos e materiais baseados em carbono. No caso dos sólidos inorgânicos podemos citar as zeólitas, as quais pertencem à classe dos aluminossilicatos microporosos, estruturalmente bem definidos, sendo usados essencialmente como catalisadores ácidos na isomerização, alquilação e quebra de hidrocarbonetos na indústria de petróleo, na fabricação de detergentes

e mais recentemente foram propostos como carreadores de fármacos (FELICZAK-GUZIK, 2018).

As zeólitas consistem em estruturas 3D cristalinas (Figura 5). Suas redes, construídas a partir de tetraedros com os átomos silício ou alumínio nos centros e os de oxigênio em cada vértice, TO_4 (T=Al, Si) define túneis interconectados ou cavidades (FELICZAK-GUZIK, 2018; TAO et al., 2006).

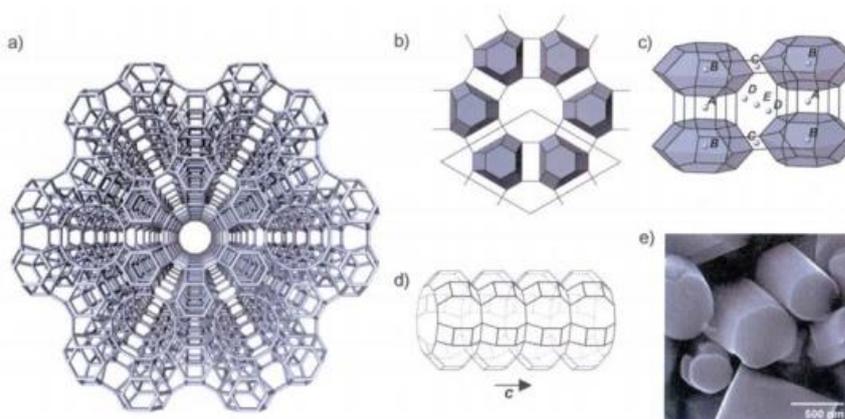
Figura 5 - Três exemplos de redes zeólitas: a) Contendo um sistema de canais bidimensionais; b) Contendo cavidades; c) Contendo um sistema de canais unidimensionais.



Fonte: CUNHA, 2009.

Esses aluminossilicatos são geralmente sintetizados por via hidrotermal sob meio alcalino, a temperatura entre cerca de 80° e 200° C e são termicamente estáveis. Entretanto, o grande inconveniente das zeólitas é que a pequena dimensão dos canais (inferior a 0,8 nm) e cavidades (geralmente $<1,5$ nm) impõe limitações de tamanho e forma das moléculas hóspedes (Figura 6) (SOUSA, 2018).

Figura 6 - Zeólitas a) Projeção ao longo do eixo-c mostrando 7 canais; b) Projeção ao longo do eixo-c mostrando células unitárias em forma de poliedro; c) Secção mostrando as diferentes posições catiônicas; d) Visão de anéis formando canais ao longo do eixo c; e) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de cristais de zeólita.



Fonte: CUNHA, 2009.

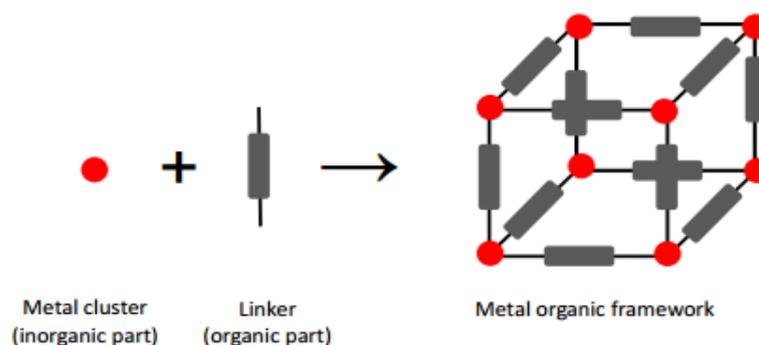
Alguns esforços foram dedicados ao desenvolvimento de zeólitas com poros grandes ($>1,5$ nm), mas os aumentos foram modestos. Além disso, estes novos materiais não são muito eficazes na incorporação de moléculas grandes impossibilitando, desta maneira, o design e a síntese de novas zeólitas que possam ser utilizadas como carreadores de uma grande variedade de fármacos. Em contrapartida, as redes de coordenação podem ser idealizadas e sintetizadas com diferentes tamanhos de poros objetivando incorporar diferentes fármacos obtendo-se assim um carreador multifuncional (KARAVASILI, 2017).

3.6 METAL ORGANIC FRAMEWORK (MOF)

Metal Organic Frameworks (MOF's) são uma classe de materiais cristalinos, um critério importante para o estabelecimento preciso de relações entre estrutura e propriedades, e híbridos altamente porosos compostos por nós de metal ou óxido de metal conectados fortemente por ligantes orgânicos (Figura 7), oferecendo assim propriedades químicas únicas com uma porosidade interna permanente, esses ligantes permitem um grande número de possíveis estruturas, com diferentes funcionalidades químicas. Os materiais orgânicos (tais

como carboxilatos, imidazolatos, ou fosfonatos) na estrutura híbrida da MOF proporcionam biocompatibilidade e a capacidade de uma grande quantidade de absorção de fármacos, enquanto que os grupos inorgânicos podem ser otimizadores para liberação controlada. Essas estruturas adsorventes de baixa densidade ($0,2-1\text{g/cm}^3$) tem sido submetidas a investigação intensa sobre a sua utilização em processos de catálise, magnetismo, luminescência, sensores, como material de armazenamento e entrega de fármacos e no armazenamento de gás, estas propriedades e utilidades da MOF dependem da sua forma e tamanho de poro, das superfícies internas e externas, e dos grupos funcionais (KANG et al., 2014; LEE; WU; LI, 2012; LEI et al., 2014).

Figura 7 - Representação esquemática que mostra a construção da MOF.

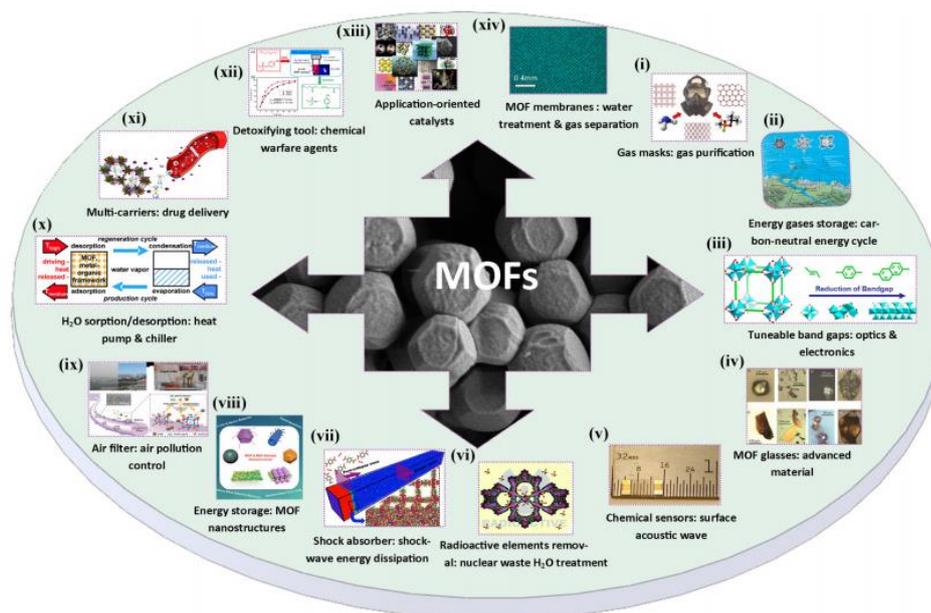


Fonte: SHAHID, 2015.

Emergindo como uma nova classe de materiais porosos, foram investigados intensamente mais de duas décadas e continuam a receber considerável interesse, o campo dos materiais organometálicos mostrou um enorme crescimento nos últimos 15 anos. Esta classe de materiais recebeu atenção generalizada devido à diversa gama de ligantes e íons metálicos que podem ser usados, e o fato de que os produtos de sua montagem podem ser cristalizados e totalmente caracterizados. Esses materiais têm porosidade excepcionalmente alta, poro uniforme, porém de tamanho ajustável e propriedades bem definidas, incluindo áreas de superfície altas e tamanhos de poros grandes para encapsulamento de drogas, biodegradabilidade intrínseca e funcionalidade versátil para enxerto pós-sintético de moléculas de fármacos. Como uma nova classe de materiais sólidos porosos, a exploração de seus desempenhos em aplicações de separação e purificação atrai o intenso interesse de

pesquisadores em áreas como química, farmacêutica, engenharia química e ciência de materiais (Figura 8). Além disso, as MOF's tendem a possuir as estruturas de cristal ordenadas que podem ser determinados por difrações de raios-X de um único cristal, o que é propício para suas elucidações estrutura-estrutura de propriedade e otimizações funcionais (KOTZABASAKI et al., 2017).

Figura 8 - Demonstração das várias áreas que utilizam MOF's.



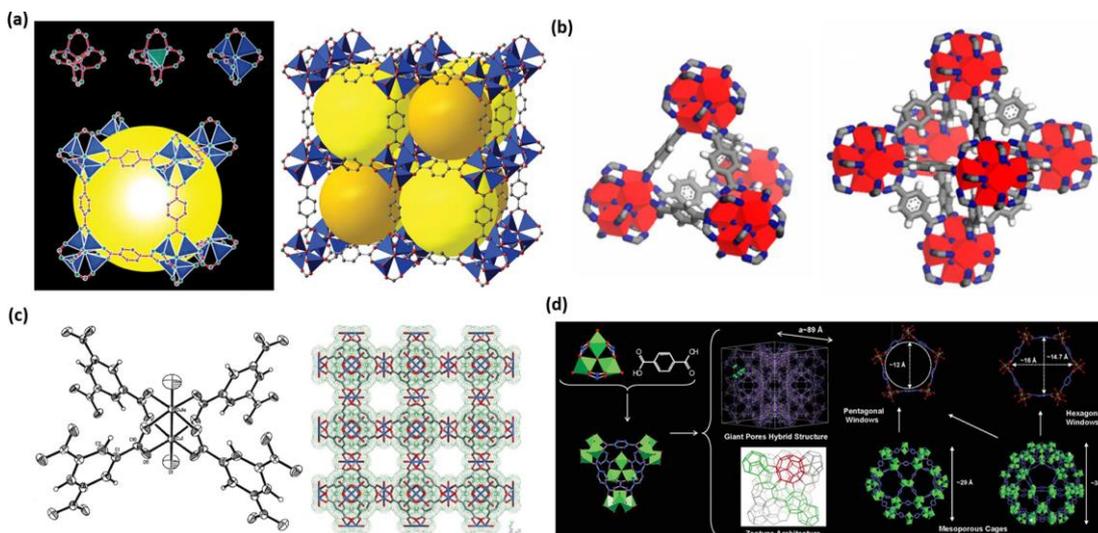
Fonte: KOTZABASAKI et al., 2017.

O desempenho de uma membrana influencia significativamente a eficiência de separação, e devido a este desempenho, as MOF's são bastante atrativas como material inovador e promissor. Existem dois tipos principais de materiais de membrana com base nas MOF's para separação, um é policristalino de área grande, suportado por substratos porosos ou independentes, o outro tipo mistura espécies para formar uma membrana de matriz mista híbrida (MMM). Em comparação com outros materiais porosos convencionais, tais como zeólitos ou carbono poroso, as MOF's têm tamanho, forma e tamanho de poro variável e, portanto, uma maior variedade de aplicações químicas (HAN; SHI; CHENG, 2017; QIU; XUE; ZHU, 2014).

Uma vez que o protótipo da MOF-5 com composição química de $Zn_4O(BDC)_3$ [onde BDC = 1,4-benzenodicarboxilato] foi relatado, inúmeros esforços de pesquisa foram

direcionados para a descoberta de novos tipos de MOF's e, até à data, mais de 20.000 tipos diferentes foram sintetizadas. As propriedades estruturais de várias MOF's típicas como MOF-5, UiO-66 [3], HKUST-1 e MIL-101 foram estudados extensivamente, como mostrado na Figura 9, devido ao fato de serem sólidos altamente ordenados, teoricamente, a maioria delas geralmente são relatadas como tendo formas e estruturas perfeitas. Por exemplo, os cristais MOF-5 na Figura 9a mostram a estrutura cúbica tridimensional com nós Zn_4O em cada canto de um cubo coordenado por seis íons de tereftalato, o que os faz parecer perfeitas (REN et al., 2017).

Figura 9 – Construção computacionalmente plotada das MOFs: (a) MOF-5 cúbica, (b) UiO-66 tetraédrico ou octaédrico, (c)HKUST-1, (d) MIL-101 tetraédrico ou octaédrico.



Fonte: REN et al., 2017.

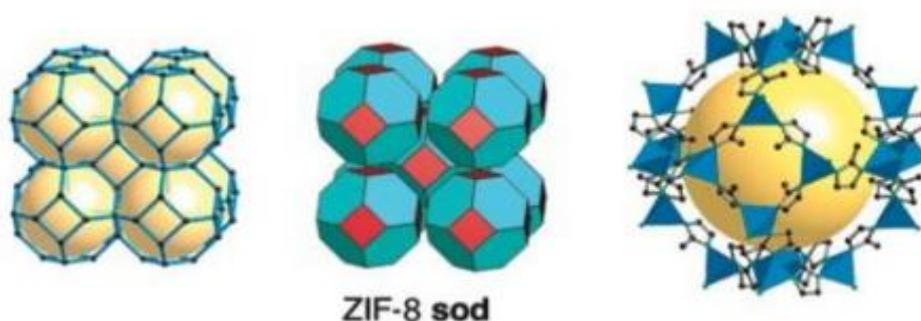
Um dos trabalhos iniciais tratou de incorporar o fármaco ibuprofeno, na intenção de estudar a interação do mesmo com diferentes MOF's, Horcajada e colaboradores (2006), estudaram MOF's de cromo, a MIL-100 e a MIL-101, nesse trabalho foi observado que houve diferença na adsorção do referido fármaco, devido a diferença nos tamanhos dos poros, resultado da presença de ligantes diferentes nas redes. Nos trabalhos seguintes, foram utilizadas mais duas MOF's, MIL-53 (Cr) e MIL-53 (Fe) para adsorção e liberação controlada *in vitro* do ibuprofeno. Os resultados obtidos indicaram que a quantidade de fármaco inserida

na rede foi a mesma, indicando que o metal utilizado em cada rede híbrida não influenciou a adsorção do fármaco, já que as duas MOF's são formadas pelo mesmo ligante, variando apenas o metal (ALVES, 2013).

3.7 ZEOLITIC IMIDAZOLATE FRAMEWORKS (ZIF)

Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIF's) (Figura 10) é uma subfamília das MOF's que tem adquirido interesse principalmente por combinar as vantagens das redes metalorgânicas (alta porosidade e grande área de superfície, baixa densidade, centros de metal de transição, ligantes adaptáveis) com a elevada estabilidade térmica e química das zeólitas. Por exemplo, ZIF-8 foi suspensa em água fervente e vários solventes orgânicos durante 7 dias e ainda manteve a sua cristalinidade total. A ZIF-8 também pode suportar até 550 °C em N₂, enquanto a estrutura cúbica permanentemente porosa da MOF-5 se decompõe a 450 °C em N₂, ZIF's têm porosidade permanente de tipo zeólito e tamanho de poro uniforme. Durante muitos anos, a indústria vem usando zeólitas devido à sua robustez em condições extremas. A semelhança de zeólitos e ZIF's tem sido útil na compreensão dos fundamentos destas, pois muitos dos princípios podem se sobrepor com o da química da zeólita e, eventualmente, serão úteis na implementação de ZIF's para aplicações industriais (AMARANTE et al., 2016).

Figura 10 – Estrutura da ZIF-8.

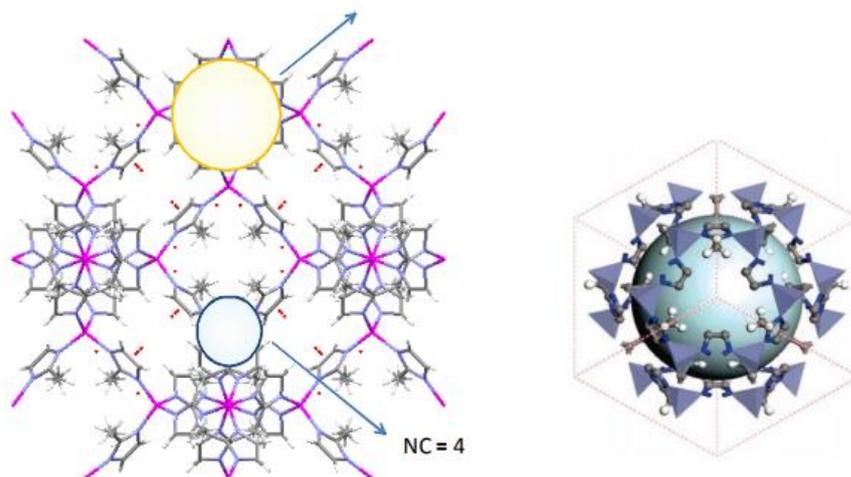


Fonte:LESTARI, 2012.

A ZIF-8 é um dos materiais mais representativos da subfamília ZIF, em sua estrutura, átomos de zinco (Zn) e de cobalto (Co) são ligados a de átomos de nitrogênio por meio de íons imidazolatos, para formar estruturas neutras e fornecer poros ajustáveis. Este material

exibe uma elevada área de superfície de 1400 m²/g e diâmetros de poros relativamente elevado, de cerca de 11 Å (Figura 11) (AMARANTE et al., 2016).

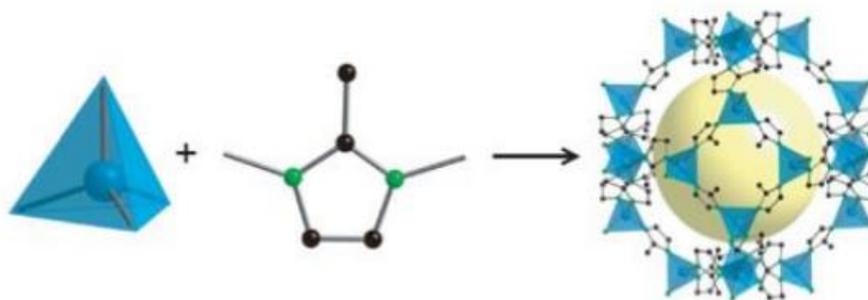
Figura 11 – Estrutura cristalográfica da ZIF-8, ilustrando o sítio de coordenação do íon Zn⁺² (NC = número de coordenação) e estrutura ilustrando a cavidade da ZIF-8.



Fonte: ALVES 2013.

Numa síntese típica da ZIF-8, dissolve-se nitrato de zinco [Zn(NO₃)₂·6H₂O] em metanol e agita-se vigorosamente. Uma solução de 2-metilimidazol [C₄H₆N₂] e metanol são preparados simultaneamente, adicionados a primeira solução, e agitada por várias vezes (Figura 12), o produto resultante lava-se e centrifuga a 3000 rpm. Porém, o rendimento é bastante pequeno.

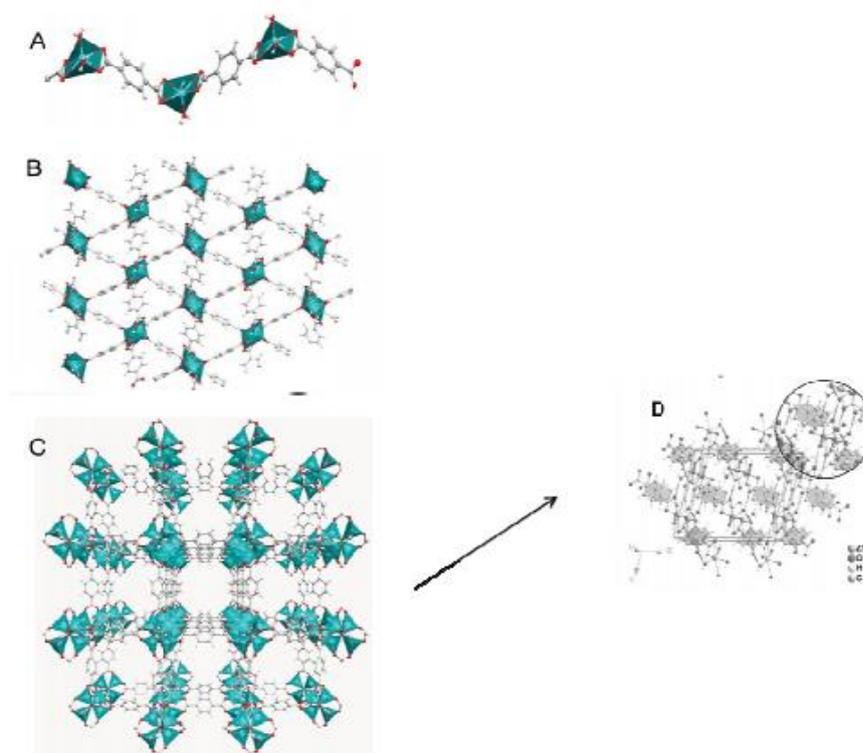
Figura 12 – Síntese da ZIF-8, onde a mesma é composta por nitrato de zinco e 2-metilimidazolato.



Fonte:TATARKO, 2015.

Daí têm-se um material lamelar com uma organização em camadas bem definidas, podendo ser desenvolvida sob a forma 1, 2 ou 3D, conforme esquematiza a Figura 13. De acordo com o trabalho de Alves (2013) foi sintetizada a forma 1D, tendo como intuito utilizá-la para adsorção de fármacos. O trabalho pioneiro nesta área estudou a incorporação do fármaco antitumoral 6-mercaptopurina, em diferentes proporções, os sistemas foram testados em ensaios antitumorais *in vitro* e *in vivo*, e apresentaram atividade de inibição do crescimento tumoral, bem como foi realizada a avaliação histológica dos órgãos dos animais, não sendo observadas alterações histológicas graves. Mais recentemente, foi realizado um estudo utilizando a técnica de *docking* molecular para prever a interação de um conjunto de fármacos relevantes com a MOF $[Zn(BDC)(H_2O)_2]^n$, neste estudo, esta técnica corroborou para melhores conclusões dos resultados experimentais (RODRIGUES et al., 2012).

Figura 13 – Estrutura da ZIF-8 em 1 (A), 2 (B) e 3 dimensões (C). Estrutura supramolecular da mesma molécula, destacando os empacotamentos Π - Π (poliedros cinzas) e as ligações de hidrogênio (região ampliada) (D).



Fonte: ALVES, 2013.

Apesar das pesquisas já realizadas, existe ainda uma necessidade de utilizar a ZIF-8 de uma forma mais eficaz e inovadora, impondo mais credibilidade como um veículo eficiente de fármacos ou substâncias bioativas.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS FARMACÊUTICOS

3.8.1 Difração de Raios-X (DRX)

É fundamental conhecer a estrutura cristalina e a microestrutura de um material para poder entender suas propriedades. O termo estrutura cristalina envolve o arranjo dos átomos, enquanto que o termo microestrutura engloba desde os constituintes estruturais tais como composição presente, fases, quantidades, inclusões até contornos de grãos, trincas, vazios, maclas, etc. Uma das técnicas de análise estrutural e microestrutural mais empregada para identificar os diferentes materiais é a difração de raios – X. Durante a última metade do século XX, o método da difração de raios-X tornou-se um dos mais apropriados e disseminados para a identificação e quantificação de minerais em materiais policristalinos naturais e industriais. Devido à simplicidade de preparação e operação da técnica e a possibilidade de recuperação de informação de múltiplas naturezas, o método de difração de raios-X vem aumentando grandemente o seu campo de atuação e com isso a sua importância como técnica analítica (TEIXEIRA, 2014).

O espalhamento e a conseqüente difração de raios-X é um processo que pode ser analisado em diferentes níveis, no mais básico deles, há o espalhamento de raios-X por um elétron. Esse espalhamento pode ser coerente ou incoerente, no espalhamento coerente, a onda espalhada tem direção definida, mesma fase e mesma energia em relação à onda incidente, trata-se de uma colisão elástica. No espalhamento incoerente, a onda espalhada não tem direção definida, ela não mantém a fase nem a energia (é o chamado Efeito Compton), a colisão é inelástica, e a energia referente à diferença entre a onda incidente e a onda espalhada traduz-se em ganho de temperatura (vibração do átomo). Quando duas ondas em fase incidem no átomo, pode acontecer a interferência entre raios a nível atômico. Observa-se que para que haja uma interferência construtiva das ondas espalhadas, é necessário que seja obedecida a condição: $\lambda = 2d \sin\theta$ (onde θ é o ângulo de incidência). Essa equação é conhecida como a Lei de Bragg. É importante frisar que ela deve ser aplicada a nível atômico, pois só assim ela

poderá ser novamente aplicada a nível de planos cristalinos. É interessante também notar que, determinar como um átomo irá difratar um feixe de raios-X é um processo probabilístico (TEIXEIRA, 2014).

3.8.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, essa radiação eletromagnética é composta de um vetor campo elétrico e um vetor campo magnético, mutuamente ortogonal, que se propagam em uma dada direção, apresentando a dualidade onda-partícula, onde a natureza ondulatória manifesta-se por meio da interferência, dispersão, polarização e coerência da radiação eletromagnética. A natureza corpuscular manifesta-se por meio do efeito Compton e do efeito fotoelétrico (CALVO et al, 2018).

Define-se espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) como a medida da absorção, por parte de compostos químicos analisados, de uma radiação eletromagnética em que o comprimento de onda se situa na faixa de 10^{-4} a 10^{-2} cm, sendo este espectro único para cada substância com exceção aos isômeros ópticos que em solução apresentam espectros idênticos (LÓPEZ-LORENTE e MIZAIKOF, 2016).

A região espectro magnética correspondente ao infravermelho causam alterações no estado de energia vibracional da molécula. As transições vibracionais são associadas a mudanças na rotação dos átomos sobre ligações químicas, que por sua vez, podem ser formadas por diferentes combinações entre átomos ou números de elétrons compartilhados. Mudanças estruturais e ausência de estrutura cristalina podem levar a mudanças nas ligações entre grupos funcionais que podem ser detectados por espectroscopia de infravermelho. Consequentemente, cada pico num espectro de infravermelho corresponde a um grupo funcional particular, eventos como desaparecimento, surgimento ou deslocamento de bandas características fornecem indicativos de interações entre o fármaco e outras substâncias (MAGALHÃES, 2014).

No setor farmacêutico, a espectroscopia de infravermelho é usada em inúmeras aplicações, como identificação de fármacos, caracterização de grupos funcionais típicos de determinado material, avaliação da pureza, estudos de compatibilidade, cristalinidade e discriminação de polimorfos e para avaliar se as condições experimentais foram

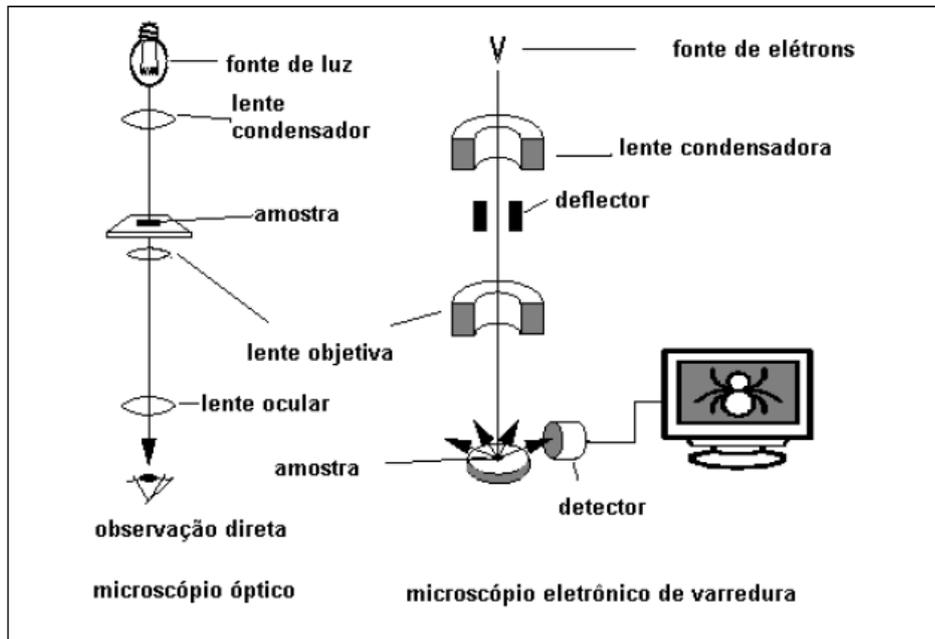
adequadamente estabelecidas, uma vez que o polimorfismo pode ser a causa de diferenças no desempenho de formulações farmacêuticas (AMORIM; KLIER; ANGELIS, 2013).

3.8.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. A forma mais antiga e usual é a lupa seguida do microscópio óptico, que ilumina o objeto com luz visível ou luz ultravioleta. O limite máximo de resolução dos microscópios ópticos é estabelecido pelos efeitos de difração devido ao comprimento de onda da radiação incidente. Os microscópios ópticos convencionais ficam, então, limitados a um aumento máximo de 2000 vezes, porque acima deste valor, detalhes menores são imperceptíveis. Para aumentar a resolução pode-se utilizar uma radiação com comprimento de onda menor que a luz visível como fonte de iluminação do objeto. Além disso, a profundidade de campo é inversamente proporcional aos aumentos, sendo necessário, então, um polimento perfeito da superfície a ser observada, o que às vezes é incompatível com a observação desejada (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (Figura 14).

Figura 14 - Desenho esquemático para comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007.

De Broglie, em 1925, mostrou o dualismo onda-partícula e, por conseguinte, que o comprimento de onda de um elétron é função de sua energia. A energia pode ser comunicada a uma nova partícula carregada por meio de um campo elétrico acelerador. Assim, sob uma voltagem suficientemente grande, por exemplo, 50 10 kV, elétrons de comprimento de onda extremamente curto ($\lambda=0,005\text{\AA}$) e, portanto, de poder de resolução potencialmente alto como uma fonte de iluminação, podem ser produzidos. Além disto, devido às suas cargas, os elétrons podem ser focalizados por campos eletrostáticos ou eletromagnéticos e, então, são capazes de formar imagens. Eles possuem, portanto, as características essenciais necessárias a um microscópio de alta resolução. Como resultado tem-se que os aparelhos modernos permitem aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas.

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia, sendo um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de

características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas, valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (GOMES; TIRONI; MARTINEZ, 2017).

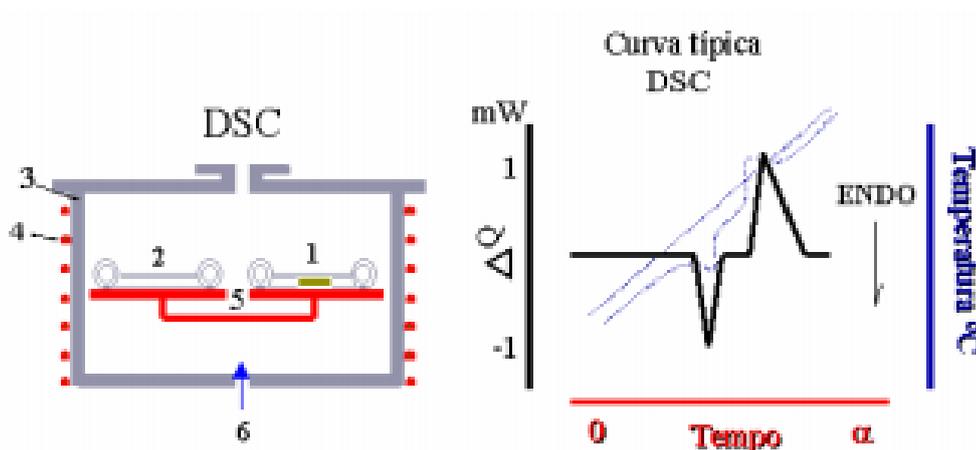
O princípio de um microscópio eletrônico de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra e o sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo, em seguida, é focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas com um spot menor que 4 nm. O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo (GOMES; TIRONI; MARTINEZ, 2017).

A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra, dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados (STOLF, 2015).

3.8.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica termoanalítica na qual as variações de entalpia da amostra são monitoradas em relação a um material de referência termicamente inerte enquanto ambas são submetidas a uma programação controlada de temperatura (Figura 15). Essa técnica é derivada da análise térmica diferencial (DTA), por isso, são consideradas técnicas semelhantes e complementares, pois permitem avaliar as variações entálpicas que ocorrem com uma dada substância durante um processo de aquecimento ou resfriamento. A palavra “diferencial” enfatiza as medidas que envolvem tanto a própria substância como o material de referência (termicamente estável) (DENARI e CAVALHEIRO, 2012).

Figura 15 – Compartimento do DSC, onde: (1) cadinho com amostra, (2) cadinho referência, (3) forno DSC, (4) aquecimento, (5) sensor; curva DSC típica.



Fonte: PEREIRA, 2013.

De acordo com o método de medição utilizado, há duas modalidades: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor. No DSC de fluxo de calor, a amostra e a referência são colocadas em cápsulas idênticas, que se alojam em um disco termoelétrico e são aquecidas por uma mesma fonte de calor. A transferência de calor que ocorre do disco para as cápsulas é controlada por meio de termopares conectados ao disco. A variação da temperatura, em um dado momento, é proporcional a variação da entalpia, à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo calórico. No DSC de compensação de potência um calorímetro mede diretamente a energia envolvida nos eventos térmicos e a amostra e a referência sofre resfriamento ou

aquecimento em fornos idênticos, mas separados, em condições sempre isotérmicas. Quando a amostra sofre alteração na temperatura (evento endotérmico ou exotérmico) os termopares detectam esta diferença entre ela e a referência e o equipamento, automaticamente, modifica a potência de entrada de um dos fornos de modo a igualar a temperatura de ambos (PEREIRA, 2013).

Essa técnica é bastante utilizada na prática farmacêutica, devido a sua habilidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância, mostrando-se como um instrumento analítico importante na caracterização de interações no estado sólido entre fármacos e materiais transportadores. A formação de complexos pode ser identificada nos perfis de DSC, pelo desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e variações relevantes na entalpia do fármaco puro e complexado. Desde que o método seja quantitativo, o grau de cristalinidade também pode ser calculado para sistemas em que o fármaco seja em parte amorfo e em parte cristalino, entretanto, cristalinidade abaixo de 2% geralmente não pode ser detectada por DSC (POMPEU; PERARO-NASCIMENTO; ASSUNÇÃO, 2013).

Os principais fenômenos químicos observados nas curvas DSC são: quimiossorção, dessolvatação, desidratação, decomposição, degradação oxidativa, oxidação em atmosfera gasosa, reações de oxirredução, reações de estado sólido, polimerização, reações catalíticas, entre outras. Contudo, deve-se ressaltar que, nesta técnica, a temperatura de operação da célula não excede 725°C (STORPIRTIS et al., 2011).

3.8.5 Termogravimetria (TG)

Segundo Ionashiro (2004) foram muitos anos de pesquisa em tentativas para se chegar a um conhecimento detalhado sobre as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, a fim de se poder estabelecer a faixa de temperatura em que se começa a decompor, bem como para se seguir o andamento de reações de desidratação, oxidação decomposição entre outros, surgindo assim a termogravimetria.

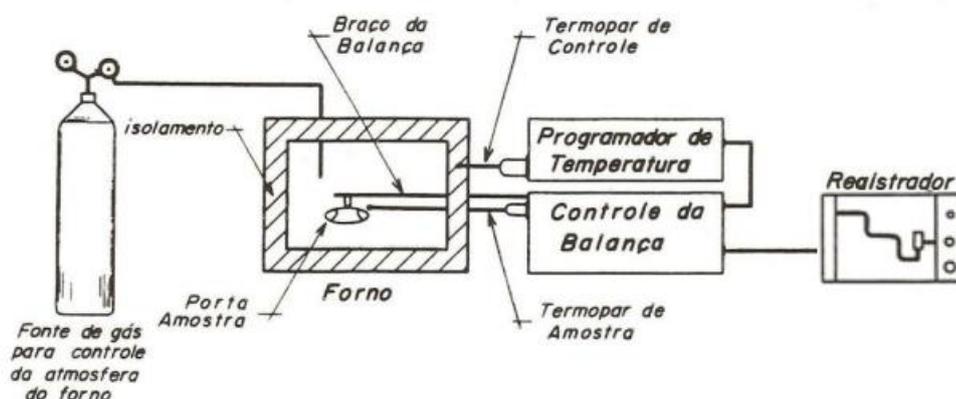
A análise térmica se constitui de um conjunto de técnicas, cada uma com a habilidade de acompanhar uma propriedade física específica. Nesse âmbito, a termogravimetria (TG) acompanha a variação da massa da amostra, em função da programação de temperatura. É a técnica termoanalítica que acompanha a perda e/ou ganho de massa da amostra em função do

tempo ou temperatura. Os métodos termogravimétricos podem ser classificados como: dinâmico (ou não-isotérmico) em que a perda de massa é registrada continuamente à medida que a temperatura aumenta a uma razão constante ou linear; Isotérmico, quando a variação de massa da amostra é registrada em função do tempo mantendo-se a temperatura constante; e quase-isotérmico, no momento em que a amostra começa a perder massa a temperatura é mantida constante até que a massa se estabilize, quando isso ocorre, o aquecimento é retomado, este procedimento pode se repetir em cada etapa da decomposição térmica (DENARI e CAVALHEIRO, 2012; PEREIRA, 2013).

Outro dado importante obtido por meio da curva TG é a curva termogravimétrica derivada (DTG). A DTG expressa a derivada primeira da variação de massa (m) em relação ao tempo, sendo registrada em função do tempo ou temperatura. Na curva DTG são obtidos picos cujas áreas são proporcionais a variação de massa da amostra, apresentando informações mais facilmente visualizadas (como eventos sobrepostos) que em uma curva TG (WAGNER, 2017).

Pode-se dizer que o equipamento (Figura 16) da análise termogravimétrica é composto basicamente pela termobalança, sendo esse um instrumento que permite a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura, ou seja, à medida que ela é aquecida ou resfriada. Os principais componentes de uma termobalança são: balança registradora, forno, suporte de amostra e sensor de temperatura, programador de temperatura do forno, sistema registrador e controle da atmosfera do forno.

Figura 16 – Diagrama de um equipamento de termogravimetria genérico.



Fonte: PEREIRA, 2013.

Alguns fatores podem influenciar o aspecto das curvas TG, estes podem ser instrumentais e/ou ligados a características da amostra. Dentre os fatores instrumentais, tem-se a razão de aquecimento do forno, atmosfera do forno, geometria do suporte de amostra e do forno. Já os fatores relacionados as características da amostra são: tamanho de partículas; quantidade de amostra; solubilidade dos gases liberados na própria amostra; calor de reação; compactação da amostra; natureza da amostra e condutividade térmica da amostra (WAGNER, 2017).

Para fins farmacêuticos, o uso da termogravimetria é descrito na caracterização, onde utiliza-se para determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação (POMPEU; PERARO-NASCIMENTO; ASSUNÇÃO, 2013).

3.8.6 Espectroscopia de absorção na região do UV-Visível (UV-Vis)

A espectrofotometria é um processo de medida que envolve a quantificação da energia (via monitoração do comprimento de onda e da intensidade) absorvida de uma fonte de radiação incidente para a promoção de elétrons de elementos em seu estado fundamental. O comprimento de onda e a absorção podem ser monitorados e registrados na forma de um espectro. Em análises químicas de rotina uma substância é determinada usando-se luz monocromática dirigida através da amostra. A quantidade de luz absorvida quando um feixe de radiação monocromática atravessa o meio absorvente depende da concentração, do coeficiente de absorção molar da espécie absorvente e do percurso óptico da radiação. O comprimento de onda é selecionado para que somente um dos solutos componentes a solução seja fortemente absorvido e a concentração do soluto é calculada pela luz absorvida e comparada com a absorbância de uma solução-padrão (CHAGAS; CORRÊA; ALMEIDA, 2014).

O equipamento que faz passar o feixe de luz através da solução é chamado de espectrofotômetro UV-Vis, esse mede a intensidade de luz que foi absorvida por essa solução usando uma rede de difração, o aparelho separa a luz em feixes com diferentes comprimentos de onda. Esta técnica é reconhecida pelas vantagens relacionadas ao seu uso, sendo utilizada principalmente no controle de qualidade na indústria farmacêutica, que exige rapidez e confiabilidade nos resultados. Além disso, possui baixo custo operacional, sendo de fácil

utilização e produz resultados de interpretação bastante simples (ALVES et al., 2010; MACHADO, 2013).

3.8.7 Modelagem Molecular (Docking)

As técnicas de modelagem molecular (docking molecular) fornecem estimativas da energia livre de ligação entre a proteína e o ligante, antes mesmo que esses sejam sintetizados. Os custos computacionais com esses estudos são bem menores, se comparados aos gastos laboratoriais despendidos ao sintetizar e testar farmacologicamente várias substâncias. Esta importante ferramenta tem sido usada para filtrar compostos que não servem para serem designados como alvo, e desenhar os possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o sítio ativo do receptor (RODRIGUES et al., 2012).

A partir da modelagem molecular, são obtidas diferentes conformações espaciais do ligante, possibilitando ao analista identificar qual dentre estas é a mais provável na interação ligante alvo. A partir de cada conformação espacial, são obtidas energias livres de ligação (entre ligante e alvo), onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN, 2004).

O preparo das estruturas químicas a serem testadas, compreende uma das partes mais importantes nas propostas de novos ligantes, pois as moléculas devem ser projetadas com cuidado, mantendo disposições parecidas dos átomos da molécula primária. Através de varredura conformacional e alinhamento tridimensional com o ligante original podem ser propostas moléculas melhoradas (GOODARZI; FREITAS; FERREIRA, 2009).

3.8.8 Solubilidade

A solubilidade de qualquer substância pode ser definida como a quantidade desta que foi dissolvida quando for atingido o equilíbrio entre a solução e o excesso (substância não dissolvida) a uma dada temperatura e pressão (PINTO; CABRAL; SOUSA, 2014).

Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), um fármaco é considerado altamente solúvel quando a quantidade da maior dosagem disponível no mercado é solúvel em

250 mL ou menos de meio aquoso em uma faixa de pH específico. De acordo com o FDA, o perfil de solubilidade do fármaco deve ser determinado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ em meios aquosos com pH na faixa de 1-7,5; já para ANVISA, a OMS e a agência reguladora européia, a European Medicines Agency (EMA), a faixa de pH no qual o experimento deve ser realizado é de 1,2-6,8 (FDA, 2000; WOLRD HEALTH ORGANIZATION, 2000; BRASIL, 2016).

Um número suficiente de condições de pH devem ser avaliadas para definir com precisão o perfil de solubilidade em uma faixa de pH. O estudo deve ser realizado em triplicata em cada condição de pH para prever a solubilidade exata do fármaco em análise e as soluções tampão descritas em farmacopéias são consideradas apropriadas para o uso nos estudos. Outros métodos além do *shake flask* também podem ser usados, desde que adequadamente justificados, quanto a degradação do fármaco, quando observada em função da composição do tampão e/ou do pH, esse fato deve ser levado em consideração. A concentração do fármaco nos tampões selecionados e nas diversas condições de pH deve ser determinada por meio de método analítico bem desenvolvido e validado (FDA, 2000; PINTO; CABRAL; SOUSA, 2014).

3.9 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

Para que um fármaco possa exercer sua atividade ele depende, dentre outros fatores, da concentração que atingirá no fluido biológico que banha o tecido e seu receptor alvo. Esta concentração depende da dose administrada, da quantidade absorvida, da distribuição no local, da velocidade e quantidade eliminada do corpo. Ela é determinada inicialmente pela desintegração, dissolução e solubilização do ativo veiculado em uma forma farmacêutica qualquer, e posteriormente, pelo seu transporte pelos líquidos corporais através das barreiras das membranas biológicas, fuga à distribuição generalizada para áreas indesejáveis, resistência ao ataque metabólico, penetração em concentração adequada nos locais de ação e interação de modo específico, provocando uma alteração da função celular (FERRAZ, 2017).

As formas farmacêuticas (FF) sólidas de uso oral são as que apresentam maiores problemas quando se trata de biodisponibilidade, pois, são oriundas de processos que envolvem etapas diversificadas de produção e geralmente apresentam formulações complexas. Estes fatores muitas vezes afetam a velocidade de dissolução do fármaco prejudicando diretamente sua biodisponibilidade (SILVA, 2013).

A dissolução é quando o fármaco se torna disponível para ser absorvido pelo organismo, logo, para que um fármaco possa atuar quando administrado por via oral, ele terá antes que se dissolver nos sucos gastrintestinais; sendo assim, após a administração por via oral de uma FF sólida ocorre o processo de desintegração, onde o fármaco é liberado da sua FF e passa a se apresentar em partículas menores, seguido por uma etapa de desagregação, onde ocorre a redução das partículas e, por fim, a dissolução, que é a solubilização do fármaco no meio. A taxa de dissolução pode ser o fator de limitação de sua absorção, principalmente se tiver baixa solubilidade em água. O ensaio de dissolução *in vitro* mede a velocidade e a extensão de liberação do ativo no meio avaliado (FERRAZ, 2017).

Esse estudo constitui um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacêuticas das FF sólidas de uso oral, fornecendo informações úteis durante o ciclo de vida do medicamento, tanto para a pesquisa e desenvolvimento quanto para a produção e controle da qualidade. Durante a fase de produção e controle da qualidade permite-se detectar desvios de fabricação, uniformidade do produto e reprodutibilidade lote a lote. Esse estudo avalia também a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de $37^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$, após determinado período de tempo, utilizando-se equipamento com dispositivo para promover agitação do meio de forma constante e suave, a uma dada velocidade de agitação, sendo que qualquer forma de vibração inclusive fontes externas devem ser eliminadas para não causar interferência na hidrodinâmica do sistema. Para formulações de liberação imediata a porcentagem dissolvida de fármaco é determinada, normalmente, após um único tempo de coleta. A avaliação da porcentagem dissolvida em vários tempos de coleta (perfil de dissolução) é, no entanto, mais conclusiva em relação à coleta em um único ponto (TOMASI, 2013).

Os estudos para determinar as taxas de dissolução *in vitro* na maioria das vezes são conduzidas em condições *sink*. Onde normalmente é obtido com a utilização de grande volume de meio de dissolução. Isso porque, *in vivo*, estabelece-se um equilíbrio entre as membranas gastrointestinais em pouco tempo, sem efeitos da diminuição do gradiente de concentração na cinética de dissolução, caracterizando uma velocidade de dissolução constante. Para obter tal condição *in vitro*, além do uso de um grande recipiente, emprega-se grande volume de meio, de modo que a concentração de meio não atinja mais do que 20 a 30% de sua solubilidade máxima. Mantendo constante o volume empregado, tem-se a

condição *sink*, onde a concentração do fármaco aumenta linearmente com o passar do tempo, sem influência do gradiente de concentração (BRONW et al., 2014).

Na indústria farmacêutica, o teste de dissolução torna-se cada vez mais importante no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, pois, permite prever o comportamento de liberação do princípio ativo, e também é uma ferramenta muito útil no controle de qualidade de produtos, pois, testes como identificação, pureza, teor e estabilidade são insuficientes para assegurar a eficácia clínica do medicamento, dentre outras aplicações (SKRIPNIK, 2015).

A dissolução de fármacos pode ser definida por 2 etapas: liberação do fármaco, a partir da sua forma farmacêutica, e o transporte do mesmo para o seio do meio e dissolução; para o desenvolvimento de uma metodologia de dissolução deve-se atentar para alguns parâmetros como a característica e volume do meio de dissolução, pH, velocidade de agitação e utilização de equipamento específico, e tanto o método, quanto o aparelho utilizado devem ser validados para se obter uma quantificação confiável. A grande atenção dispensada à cinética de dissolução de formas farmacêuticas sólidas deve-se, principalmente, à relação deste fenômeno com a biodisponibilidade de fármacos no organismo, principalmente para aqueles pertencentes à classe II do sistema de classificação biofarmacêutica, ou seja, os que possuem baixa solubilidade em água e alta permeabilidade, de modo que a absorção é limitada pela velocidade de dissolução (SKRIPNIK, 2015).

Para avaliar o mecanismo de liberação do fármaco, os dados experimentais são ajustados a modelos cinéticos. A equação do modelo de ordem zero tem base na liberação lenta do fármaco a partir de formas farmacêuticas que não desagregam. A equação do modelo de primeira ordem descreve a liberação do fármaco de um sistema onde a taxa de liberação é dependente da concentração, podendo descrever a dissolução de fármacos solúveis em uma matriz porosa. A equação do modelo de Higuchi descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo. A equação dos modelos de Peppas-Sahlin e Korsmeyer-Peppas confirmam a liberação controlada fármaco, uma vez que estes modelos se adequam a esse tipo de liberação, as constantes K_1 e K_2 do modelo de Peppas-Sahlin representam, respectivamente, a influência da difusão e do relaxamento do carreador na liberação do fármaco (GIL, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O insumo farmacêutico ativo (EFZ) foi doado pela indústria brasileira Cristália, apresentando teor de 100,00% (lote 0482/15), enquanto o material organometálico ZIF-8 foi sintetizado pelo Laboratório de Terras Raras - UFPE.

Os solventes utilizados para a preparação do sistema EFZ:ZIF-8, bem como suas respectivas procedência, fórmulas químicas e grau de pureza foram: Álcool Etílico Absoluto (ALPHATEC® CH₃CH₂OH – 99,8%) e Álcool Metílico (QUÍMICA MODERNA® CH₃OH – 99,8%).

Para o preparo dos meios do ensaio de solubilidade e dissolução, utilizaram-se cloreto de potássio (FMAIA® KCl – 99%), ácido clorídrico (ALPHATEC® HCl – 37%), ácido cítrico (QUÍMICA MODERNA® C₆H₈O₇ – 99,5%), fosfato de sódio dibásico heptahidratado (VETEC® Na₂HPO₄·7H₂O – 98%), acetato de sódio (F.MAIA® CH₃COONa·3H₂O – 99%) e lauril sulfato de sódio (DINÂMICA® C₁₂H₂₅NaO₄S – 90%).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Varredura por Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Para a obtenção da varredura de 190 a 1000 nm por espectrofotometria na região UV utilizou-se espectrofotômetro ultravioleta da marca SHIMADZU® UV-2401 PC e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm.

4.2.2 Obtenção dos sistemas EFZ:ZIF-8

O método de obtenção utilizado no presente trabalho teve como base os trabalhos de Horcajada e colaboradores (2006), que promovem a incorporação/adsorção do fármaco depois da ZIF-8 já sintetizada. Este método é denominado *ex situ*. O procedimento realizado para a

produção de sistemas utilizou diferentes proporções molares de EFZ:ZIF-8 (1:3, 1:1 e 3:1) visando uma melhor obtenção quando variando a quantidade dos mesmos, tendo como base as massas moleculares do EFZ e da ZIF-8 – 315,60 e 229,61 g.mol⁻¹, respectivamente.

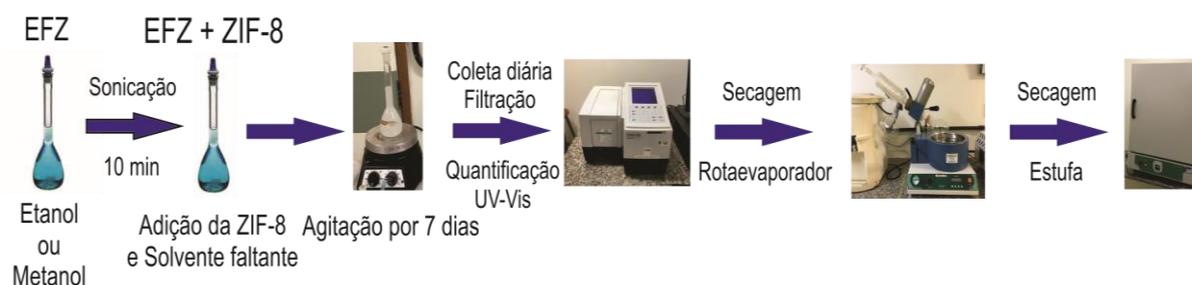
Inicialmente o fármaco foi solubilizado em solventes diferentes para que se pudesse obter sistemas com percentual de incorporação diferentes. Etanol e metanol foram dispostos em balões de 100 mL, obtendo concentrações iniciais de 500 µg.mL⁻¹ do fármaco. A solução de EFZ foi sonicada por 10 minutos em sonificador Limp Sonic[®], a fim de garantir a completa solubilização do mesmo. Em seguida, a ZIF-8 foi adicionada à solução de EFZ e o volume do balão foi completado com respectivo solvente, submetendo a mistura à agitação intermitente em Agitador Magnético MA089 Marconi[®] com auxílio de barra magnética por até sete dias. Diariamente, o sobrenadante foi coletado (0,2 mL, seguido de reposição do solvente) e filtrado em filtro de seringa (Chromafil®Xtra, com 0,20 µm de tamanho de poro) para posterior quantificação em espectroscopia por absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) com auxílio de curvas de calibração previamente realizadas para a construção de curvas de incorporação do EFZ à rede da ZIF-8.

A utilização de diferentes solventes em diferentes proporções de fármaco e ZIF-8 visou a otimização da máxima eficiência de incorporação (EI%) do fármaco nos sistemas, calculada por meio da Equação 1.

$$\%EI = 100 - \frac{100 \times [EFZ_{\text{real}}]}{[EFZ_{\text{teórica}}]} \quad (\text{Equação 1})$$

Em seguida, procedeu-se a secagem do material foi realizada por pressão reduzida usando um evaporador rotativo da marca Marconi[®] MA-120 com temperatura a 50 °C para remoção do excesso de solvente, seguindo para estufa de secagem (Ethik[®] 402/3N) onde foi utilizada a mesma temperatura até completa evaporação (em torno de 2 horas para o rotaevaporador e de 3 horas para secagem na estufa). A Figura 17 sumariza o processo de produção dos sistemas EFZ:ZIF-8.

Figura 17 – Fluxograma geral para obtenção dos Sistemas EFZ:ZIF-8.



Fonte: Autoria Própria.

Todo esse procedimento se deu em triplicata com o sistema hermeticamente fechado, a fim de reduzir a volatilização do solvente.

4.2.3 Caracterização do Efavirenz, ZIF-8, Misturas Físicas e Sistemas

As técnicas descritas a seguir foram utilizadas para avaliar as propriedades físico-químicas dos materiais obtidos a fim de corroborar a formação dos sistemas. Para fins comparativos foram obtidas Misturas Físicas (MF) na proporção molar 1:1 e 3:1 (mol/mol) mediante simples agitação do efavirenz e da ZIF-8 por 5 minutos em frascos de penicilina.

4.2.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho do EFZ, ZIF-8, MFs e sistemas foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer[®] (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR. Os resultados foram obtidos por meio de varreduras de 4000 a 550 cm^{-1} .

4.2.3.2 Difratometria de Raios-X (DRX)

A análise de DRX foi realizada em difratômetro SmartLab da Rigaku®, equipado com ânodo de cobre utilizando step de 0,01 grau com tempo de aquisição por step de 1 segundo, na faixa do ângulo 2θ de $3^\circ - 45^\circ$.

Por se tratar de um material lamelar, o cálculo do espaçamento basal é uma ótima ferramenta para comprovar a formação dos sistemas. O espaço entre as lamelas pode mudar com o aporte do fármaco, tanto devido a forma física, como a presença de cargas elétricas (XIONG et al., 2015).

O cálculo do espaçamento basal foi realizado por meio da equação de Bragg:

$$2.d.\text{sen } \theta = n.\lambda \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: d - espaçamento basal; $\text{sen } \Theta$ - seno do ângulo theta; n – constante; e λ - comprimento de onda do cobre.

4.2.3.3 Termogravimetria (TG)

As curvas TG foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo DTG 60-H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo a massa da amostra cerca de 5 mg ($\pm 0,05$) para todas as amostras, as amostras foram acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 30 a 600°C na razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Antes dos ensaios, a termobalança foi verificada com oxalato de zinco (COSTA, 2016).

4.2.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curvas de DSC foram obtidas utilizando Calorímetro Shimadzu® DSC-60 interligado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 25- 250°C . As amostras foram colocadas em porta-amostra de alumina hermeticamente fechada com massa de 2 mg ($\pm 0,2$) para todas as amostras. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia (COSTA, 2016).

4.2.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram preparada sobre dupla fita de carbono contida em suporte (*stub*) de cobre e metalizada sob vácuo com a deposição de uma fina camada de ouro. As análises de MEV foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura da TESCAN®, modelo Mira 3, com filamento de tungstênio e com acoplamento para dispersão de energia (EDS) (FERRAZ, 2017).

4.2.3.6 Tamanho de partícula por granulometria a laser, análise de área superficial e tamanho e volume de poros

O EFZ e ZIF-8 foram dispersos em 10 mL água e, posteriormente, foram submetidos à sonicção durante 10 segundos. Para a análise da distribuição granulométrica, um analisador da distribuição de partícula Microtac® S3500 acoplado ao acessório USVR- Ultra Small Volume Recirculator foi utilizado, com o tempo de medição de 30 segundos, e um fluxo de 35%.

A área de superfície foi calculada com base no método Brunauer- Emmett-Teller (BET) e a distribuição dos tamanhos e volumes do poro foi derivada do método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Foi utilizado analisador de área superficial ASAP2440 Micrometrics®, e *software* para determinação BET. Aproximadamente 200 mg das amostras de EFZ e ZIF-8 foram degaísificadas por 48 horas a 110 °C para remoção de qualquer material adsorvido na superfície do material. A adsorção física progressiva de nitrogênio no material foi feita a 77K, com posterior dessorção.

4.2.3.7 Estudo de Modelagem Molecular

As coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica da ZIF-8 foram obtidas a partir do Banco de Dados Estrutural de Cambridge (CSD) (GROOM et al., 2016), com número de identificação 602542 (PARK et al., 2006). As cargas parciais foram atribuídas aos átomos da ZIF-8 por meio de cálculos de teoria funcional de densidade, obtidas por Rana (RANA et al., 2011). Para representar a molécula Efavirenz foram criados diferentes modelos, com o objetivo de avaliar a influência do pH no processo de adsorção a superfície da ZIF-8. O

software MarvinSketch (“MarvinSketch”, 2017) foi utilizado para identificar as microespécies majoritárias em função do pH, ou seja, o estado de protonação em maior quantidade nas diferentes faixas de pH. As coordenadas dos modelos do Efavirenz, assim como as cargas parciais, foram obtidas a partir da aplicação do método semiempírico de química quântica PM6 (STEWART, 2007), que faz parte do *software* MOPAC (STEWART, 2016).

Para a realização do estudo de *docking* molecular, foi utilizado o programa AutoDock4 (MORRIS et al., 1998), com o objetivo de avaliar a afinidade entre o Efavirenz e a ZIF-8. O modelo molecular utilizado para representar a superfície da ZIF-8 foi tratado como rígido, uma vez que estas estruturas cristalinas apresentam flexibilidade limitada (ROUSELL; YAGHI, 2005). Por outro lado, os modelos para tratar os diferentes estados de protonação do Efavirenz foram tratados como flexíveis.

O algoritmo genético lamarckiano foi utilizado para realizar a busca conformacional. Cada conformação amostrada foi avaliada e ranqueada de acordo com uma função de energia empírica (HUEY et al., 2007). Os *grid maps* foram definidos como uma caixa reticulada com $126 \times 126 \times 126$ pontos de dimensão e espaçamento de $0,14 \text{ \AA}$. Foram criados dois diferentes mapas com as caixas centradas em dois pontos distintos, (25,5; 42,478; 40,725) e (33,982; 33,982; 43,519), a fim de amostrar toda a estrutura do ZIF-8 e aumentar a precisão das estimativas das energias de interação.

Os parâmetros utilizados durante a busca conformacional foram: população inicial com 150 indivíduos aleatórios (conformações), um número máximo de $2,5 \times 10^6$ avaliações de energia, um número máximo de 27.000 gerações e taxas de mutação e crossover de 0,02 e 0,8, respectivamente. O número de indivíduos superiores a sobreviver até a próxima geração ajustado no valor 1 (GA_ELITISM = 1). Um máximo de 300 interações por busca local foram permitidas, sendo 0,06 a probabilidade de realizar a busca local.

4.2.4 Revalidação dos métodos analíticos para quantificação do EFZ presente nos sistemas e MFs por meio da espectrofotometria no UV-VIS

O método foi desenvolvido e validado por Alves (2010) e a revalidação foi procedida de acordo com a RDC 166 de 24 de julho de 2017, onde foram contempladas as avaliações dos

seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, repetibilidade, robustez, exatidão e seletividade.

4.2.4.1 Equipamentos

Foram utilizados no processo de revalidação: Balança analítica (Bioprecisa®-FA2104N), Ultrassom (Limp Sonic®-LS-3D-2-X), Espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu® UV 1240 PC).

4.2.4.2 Revalidação do método analítico

O propósito da revalidação do método se dá devido a uma pequena alteração na preparação da amostra. O método desenvolvido por Alves (2010) requer apenas diluição do EFZ em álcool etílico absoluto ou metanol, já o método desenvolvido para o sistema EFZ:ZIF-8 requer a adição de ácido clorídrico para evitar a turbidez deixada pela ZIF-8 em suspensão, fazendo com que a mesma se dissolva.

4.2.4.2.1 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Foi realizada regressão linear de duas curvas, uma obtendo etanol e outra metanol, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios.

Preparo das soluções mãe:

Método de Alves (2010)

Foram preparadas três soluções mãe para cada solvente, metanol e etanol, com concentração de 500 µg/mL de EFZ.

Método de Alves (2010) com adição de ácido clorídrico (método ajustado)

Realizou-se o mesmo método de Alves (2010), adicionando-se nas soluções contendo etanol 2 mL de HCl 1M e nas soluções contendo metanol 1,25 mL (o critério de escolha da quantidade do ácido foi a turbidez), e sonicando por 10 minutos.

Os ensaios foram realizados utilizando cinco níveis de concentrações diferentes de cada solução mãe: 8, 9, 10, 11 e 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.2.4.2.2 Efeito Matriz

O efeito matriz tem como finalidade investigar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz da amostra.

Preparo das soluções mãe:

Método de Alves (2010)

Foram realizadas curvas da mesma forma que no método de linearidade, utilizando os mesmos níveis de concentração 8, 9, 10, 11 e 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Método de Alves (2010) com adição de ácido clorídrico (método ajustado)

Foram preparadas três soluções mãe para cada solvente, metanol e etanol, posteriormente adicionado 36mg de ZIF-8, seguido da adição de 2 mL de HCl 1M nos balões contendo etanol e 1,25 mL nos balões contendo metanol, tendo como critério de escolha da quantidade do ácido a turbidez da solução, em seguida a mesma foi sonicada por 10 min.

4.2.4.2.3 Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Na espectrofotometria, o parâmetro robustez pode ser averiguado pela variação de pH da solução, diferentes lotes ou fabricantes (BRASIL, 2017). A robustez do método proposto foi verificada por meio da variação de pH devido a adição de HCl 1M.

Preparo das soluções mãe:

Método de Alves (2010)

Foram preparadas três soluções mãe para cada solvente, etanol e metanol, com concentração de 500 µg/mL de EFZ, apresentando um valor de pH de 6,6 e 7,6 respectivamente.

Método de Alves (2010) com adição de ácido clorídrico (método ajustado)

Foi realizado o mesmo método de Alves (2010), sonificado por 10 minutos e com adição de 2 mL HCl 1M nas soluções contendo etanol e 1,25 mL nas soluções com metanol, apresentando valor de pH de 1,2 e 0,72.

As concentrações de EFZ utilizadas para as soluções filhas foram: 8, 10 e 12 µg.mL⁻¹, representando um ponto baixo, médio e alto da curva.

Os resultados da robustez foram expressos por meio da relação entre a concentração média, determinada experimentalmente e pela concentração teórica correspondente, dada pela Equação 3:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.2.4.2.4 Precisão (Repetibilidade)

A precisão é um parâmetro que avalia a proximidade dos resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas de acordo com o método analítico a ser validado. O teste de precisão pode ser expresso a partir avaliação dos critérios de repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (BRASIL, 2017).

Método de Alves (2010) com adição de ácido clorídrico (método ajustado)

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade, visando avaliar a concordância entre os resultados sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. O método foi verificado a partir da preparação de duas soluções mãe com concentração de 500µg/mL de EFZ tanto em etanol como metanol, sendo adicionado 2 e 1,25 mL de HCl 1M respectivamente (o critério de escolha da quantidade do ácido foi a turbidez da solução), onde seis réplicas da concentração correspondente a concentração de trabalho (10 µg.mL⁻¹) de cada solução no intervalo linear foram preparadas individualmente.

A repetibilidade foi alcançada por meio da análise do desvio padrão relativo (DPR) entre as determinações quantitativas realizadas seguindo a Equação 4:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, DP corresponde ao desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

4.2.4.2.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Devendo ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível (ALVES, 2010).

Preparo das soluções mãe:

Método de Alves (2010)

Foram preparadas três soluções mãe para cada solvente, metanol e etanol, com concentração de 500 µg/mL de EFZ.

Método de Alves (2010) com adição de ácido clorídrico (método ajustado)

Foi realizado o mesmo método de Alves (2010), sonificado por 10 minutos e com adição de 2 mL HCl 1M nas soluções contendo etanol e 1,25 mL nas soluções com metanol, sendo o critério de escolha da quantidade do ácido a turbidez da solução.

As concentrações de EFZ utilizadas para as soluções filhas foram: 8, 10 e 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, representando um ponto baixo, médio e alto da curva.

Os resultados da exatidão foram expressos por meio da equação de recuperação (equação 3), cuja mesma se dar por meio da relação entre a concentração média, determinada experimentalmente e pela concentração teórica correspondente.

4.2.4.2.6 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

Esse parâmetro foi analisado a partir de uma leitura comparativa por varredura no espectrofotômetro UV-Vis (190 nm – 1000 nm), entre soluções formadas pela ZIF (36mg) em etanol e metanol (com e sem HCl 1M) e solução mãe, contendo apenas o EFZ em etanol e metanol, também com (método ajustado) e sem (método de Alves) adição de HCl 1M.

4.2.5 Doseamento por UV-Visível do EFZ nos Sistemas e Misturas Físicas

Para quantificação do EFZ contido nas MFs e nos sistemas, foram produzidas soluções com ambos, onde a concentração final foi 20,64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 12,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em etanol e metanol com HCl 1M, respectivamente.

A presença do ácido se faz necessária para que a turbidez gerada pela insolubilidade da ZIF-8 em solvente orgânico (necessário para a solubilização do fármaco a ser quantificado) seja cessada e para que o fármaco contido no interior da ZIF-8 seja liberado pela quebra da mesma e assim se torne possível à leitura do EFZ no espectrofotômetro. Uma curva de

calibração do fármaco foi utilizada no intervalo de 8 a 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para quantificação do mesmo, partindo de uma solução-mãe de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contendo etanol ou metanol e HCl 1M (método revalidado), tendo as alíquotas seus volumes completados com uma solução etanol:água (60:40 v/v) (ALVES, 2010).

4.2.6 Ensaio de Solubilidade do EFZ

O ensaio de solubilidade foi realizado a fim de definir as condições *sink*, dado importante para a realização do ensaio de dissolução *in vitro*.

Excesso de EFZ (aproximadamente 30 mg) foi previamente pesado e adicionado a béqueres com 10 mL dos meios Ácido Clorídrico 0,2M (pH 1,2), Tampão Acetato 2N (pH 4,5), e Tampão Fosfato de Sódio 0,05M (pH 6,8), todos estes adicionados de lauril sulfato de sódio (LSS) a 1,0%. Sendo posteriormente submetidos à agitação constante (aproximadamente 50 rpm) em Banho-Maria DUBNOFF 304-D[®], por 24h à 25°C, com as amostras hermeticamente fechadas devido a evaporação. Ao final do tempo as amostras foram retiradas e centrifugadas a 3500 rpm por 30 minutos, onde o sobrenadante foi filtrado utilizando membranas de 0,45 μm e submetido à leitura por espectroscopia UV-Vis (Espectrofotômetro Shimadzu[®] UV 1240 PC) a fim de quantificar a concentração máxima dissolvida, visando evidenciar a concentração de saturação do EFZ nos respectivos meios (PINTO; CABRAL; SOUSA, 2014).

4.2.7 Estudos de liberação *in vitro* das MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 obtidos em etanol e metanol

4.2.7.1 Estudo dos perfis de dissolução *in vitro*

Os ensaios de dissolução foram realizados a fim de definir os sistemas que melhor apresentasse perfil de liberação modificada. Meios de dissolução em diferentes pHs (1,2, 4,5 e 6,8) foram utilizados para mensurar essa liberação, uma vez que a ZIF-8 tem comportamento diferente nos variados pHs. Os ensaios foram feitos sob temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, utilizando

500 mL de ácido clorídrico (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e tampão fosfato (pH 6,8) como meios de dissolução, aparato 2 (pá) e velocidade de rotação 100 rpm, utilizando dissolutor Varian® VK 7010 (PINTO; CABRAL; SOUSA, 2014; USP 34-NF 29, 2011).

Foram pesadas em balança Shimadzu® do modelo AUX 220 quantidades de amostras que apresentavam o equivalente a 31,12 mg (pH 1,2), 134,81 mg (pH 4,5) e 115,75 mg (pH 6,8) de EFZ, significando que se completamente dissolvidas em um volume de 500 mL, apresentariam concentrações abaixo do ponto de saturação, estabelecendo dessa maneira a condição sink, com 8x menos fármaco do que seria necessário para saturar os meios de acordo com o estudo de solubilidade.

Em intervalos de tempo predefinidos de 0,08, 0,25, 0,5, 0,76, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 24 e 48h ou até que houvesse uma liberação do fármaco superior a 80%, três mL das amostras foram coletadas, filtradas em filtro de membrana 0,20 µm e, quando preciso diluídas, para quantificação do teor de EFZ por espectroscopia no UV-Vis mini a 247 nm (Modelo 1240, Shimadzu®). Foi efetuada a reposição do meio de dissolução com o mesmo volume de cada alíquota retirada. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata (PINTO; CABRAL; SOUSA, 2014; USP 34-NF 29, 2011).

Os perfis de dissolução foram avaliados e comparados utilizando o parâmetro de área sob a curva (AUC) e percentagem de fármaco dissolvido por tempo de coleta.

4.2.7.2 Tratamento de dados

Os dados de dissolução foram corrigidos quanto à perda de volume e fármaco durante as coletas, de acordo com cálculo similar ao encontrado na literatura (ARONSON, 1993; SINGH; KAUR; SINGH, 1997). A Equação 5 representa a correção da concentração (C_{corr}) em teste de dissolução em que há reposição.

$$C_{corr} = C_n + \frac{V_S}{V_t} \sum_{i=1}^{n-1} C_i \quad (\text{Equação 5})$$

Na equação, C_n é a concentração no ponto de coleta n, V_t é o volume total inicial, V_S é o volume das coletas e C_i é a concentração das amostras nos pontos anteriores a n.

O cálculo de área sob a curva (AUC) foi realizado com auxílio do *software* Origin® 8 da Origin Lab Solutions e Microsoft Excel® 2007.

4.2.7.3 Modelos cinéticos

Os resultados do perfil de dissolução também foram analisados quanto ao ajuste a modelos cinéticos. A equação de regressão da reta foi determinada para linhas de tendência dos gráficos correspondentes, seguindo as fórmulas gerais (Tabela 1).

A escolha do modelo matemático foi realizada a partir do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}), o último é calculado pela Equação 6, quanto mais próximo de 1 o valor numérico de R^2_{ajustado} melhor a amostra se ajusta ao modelo (ZHANG et al., 2010).

$$R^2_{\text{ajustado}} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \times (1 - R^2) \quad (\text{Equação 6})$$

Onde n é o número de pontos da amostra, p é o número de parâmetros do modelo e R^2 é o coeficiente de determinação.

Os cálculos foram realizados utilizando o *software* Microsoft Excel® 2007 e o *add-in* DDSolver® (ZHANG et al., 2010).

Tabela 1 – Modelos matemáticos de cinética usados na avaliação do perfil de dissolução.

Modelo	Equação*	Gráficos plotados
Ordem zero	$Q_0 = Q_t + K_0.t$	Q_0 versus t
Primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1.t$	$\log Q_t$ versus t
Higuchi	$Q_t = K_H.t^{1/2}$	Q_t versus $t^{1/2}$
Peppas-Sahlin	$M_t/M_\infty = K_1.t^m + K_2.t^{2m}$	M_t/M_∞ versus t^m
Korsmeyer-Peppas	$M_t/M_\infty = K.t^n$	M_t/M_∞ versus t

* Q_t - quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_0 – quantidade inicial de fármaco em solução; Q_∞ - quantidade de fármaco dissolvida no tempo total; M_t – quantidade de fármaco dissolvido no tempo t ; M_∞ - quantidade total de fármaco dissolvido quando a forma farmacêutica se desintegra por completo; K_0 , K_1 , K_2 , K_H , constantes características de cada modelo; t – tempo. Fonte: Adaptado de SANTOS, 2011.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

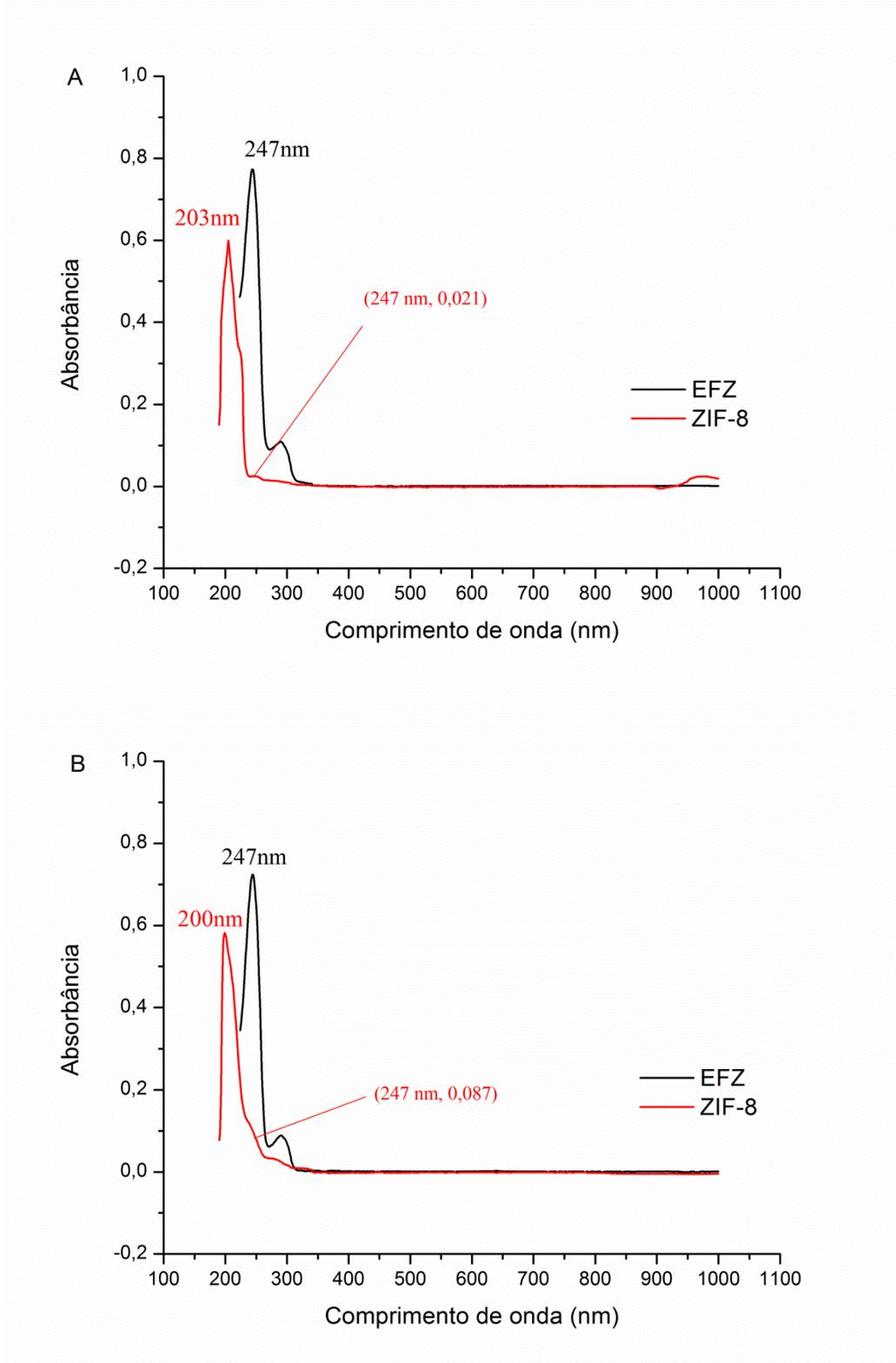
5.1 VARREDURA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-Vis)

Por meio da espectroscopia por absorção na região do UV-Vis foi possível determinar o comprimento de onda de leitura a ser utilizado para a quantificação da incorporação do EFZ. Com base na varredura (190-1000 nm) (Figura 18), a solução de EFZ ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obteve máxima absorção em 247 nm como visto por Alves e colaboradores (2010), enquanto a ZIF-8 se mostrou semelhante ao trabalho de Kaur e colaboradores (2017), elevada absorção em 203 nm.

A fim de provar que a ZIF-8 não iria interferir na seletividade do método de quantificação do EFZ incorporado ou adsorvido ao material organometálico, 3,6 mg de ZIF-8 foi suspensa em 10 mL dos solventes (etanol e metanol) utilizados para obtenção dos sistemas, seguido de filtração (poro do filtro: $0,22 \mu\text{m}$) e quantificação por meio de UV-Vis.

Embora a ZIF-8 também apresente pico de absorção na região do UV-Vis, a mesma não absorve no mesmo comprimento de onda do EFZ, em 247 nm a ZIF-8 apresenta um valor de apenas 0,021 e 0,087 de absorbância nos solventes etanol e metanol, respectivamente.

Figura 18 – Varredura do espectro de absorção na região do UV-Vis do EFZ e da ZIF-8 em etanol (A) e metanol (B).



Fonte: Autoria própria.

5.2 OBTENÇÃO DOS SISTEMAS EFZ:ZIF-8

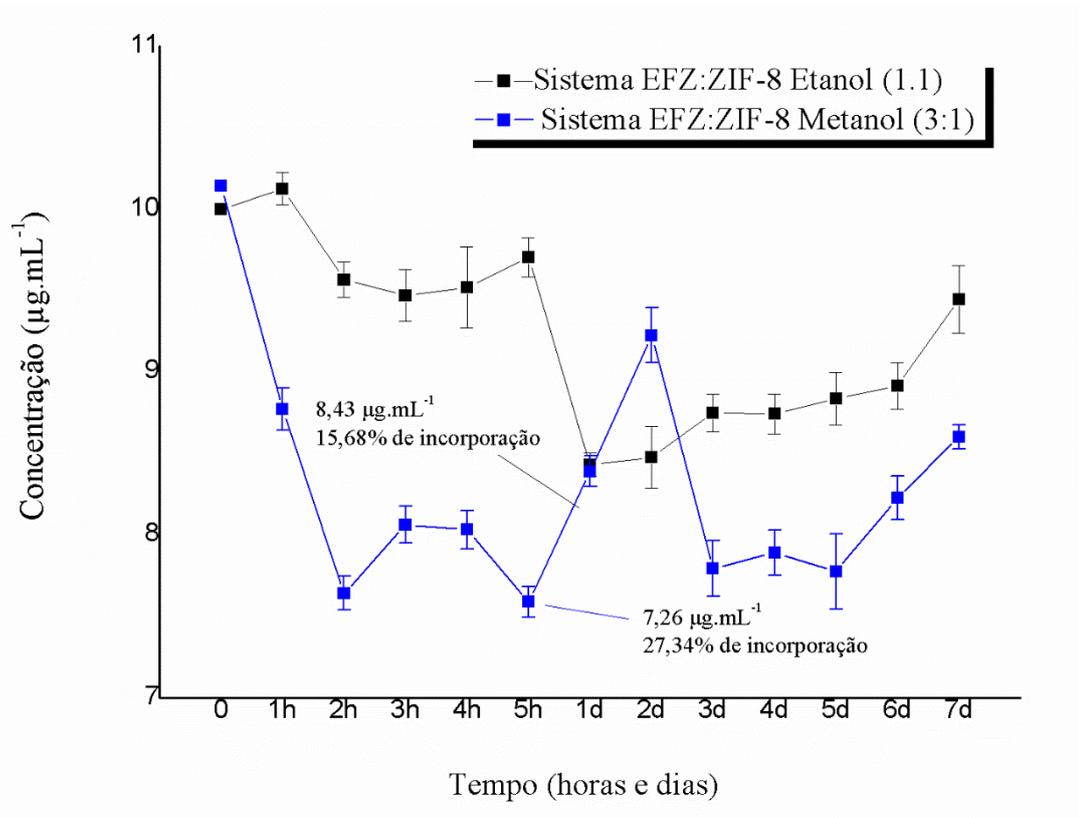
Seguido da obtenção pelo método descrito no item 4.2.2 os sistemas foram analisados.

5.2.1 Avaliação da incorporação do fármaco na ZIF-8

Foi possível construir curvas de calibração diárias, tomando como base o método desenvolvido por Alves e colaboradores (2010), possibilitando o cálculo da incorporação aparente do EFZ à rede da ZIF-8. O experimento visou o decaimento da concentração do fármaco, justificada pela sua incorporação à malha da ZIF-8. Tal decaimento foi avaliado diariamente e a porcentagem de EFZ incorporado foi mensurada subtraindo o valor da concentração real utilizada no experimento pela concentração dissolvida encontrada, representadas em termo de porcentagem, conforme descrito pela equação 1 de EI%.

A partir das curvas (Figura 19) de incorporação foi visto que, passado um dia de agitação, o valor de EI% do EFZ à ZIF-8 foi 15 (quinze) % para o sistema em solvente etanol, numa proporção de 1:1 (EFZ:ZIF-8). Em contrapartida, o sistema obtido em metanol na proporção de 3:1 apresentou menor ponto de concentração nas 5 primeiras horas, totalizando, aproximadamente, 27% de incorporação, isso pode ser explicado pela diferença de polaridade dos solventes, onde o metanol com maior polaridade, pode solubilizar o fármaco de maneira mais eficaz, facilitando assim a obtenção do sistema. Resultados de incorporação a ZIF-8 semelhantes foram relatados por Li e colaboradores (2015), conseguindo carregamento de 22,5% de 5-fluorouracil.

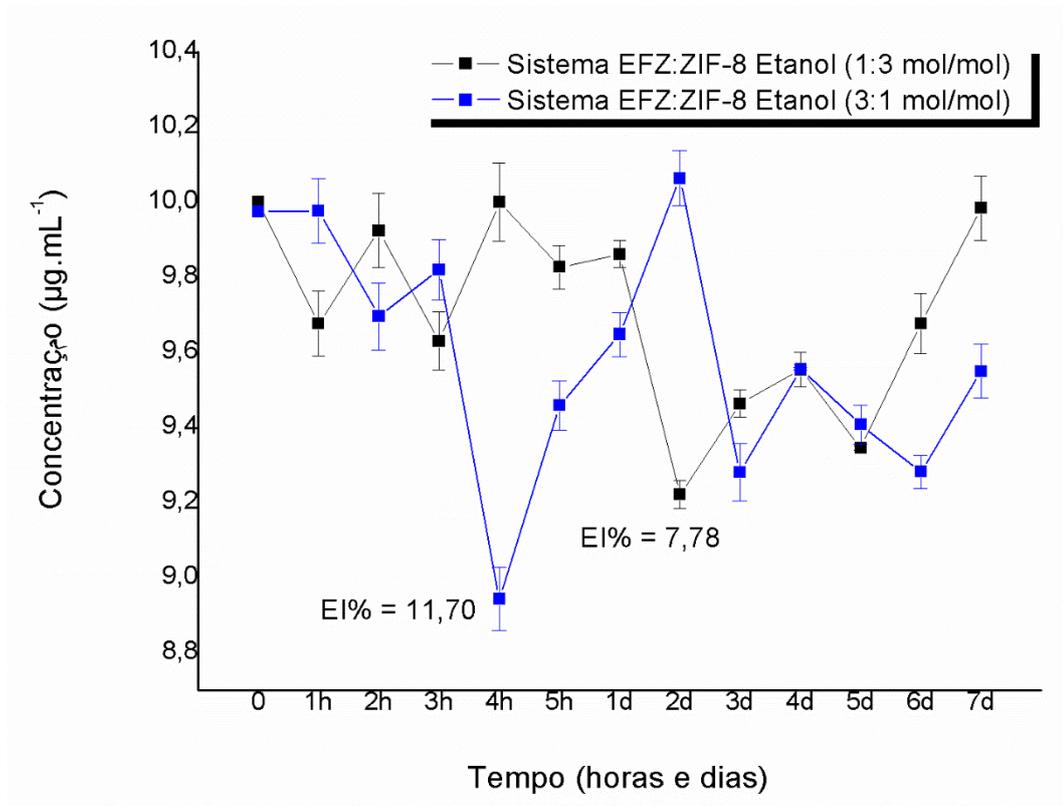
Figura 19 – Curvas de incorporação do EFZ à rede da ZIF-8 em etanol (preto) e em metanol (vermelho).



Fonte: Autoria própria.

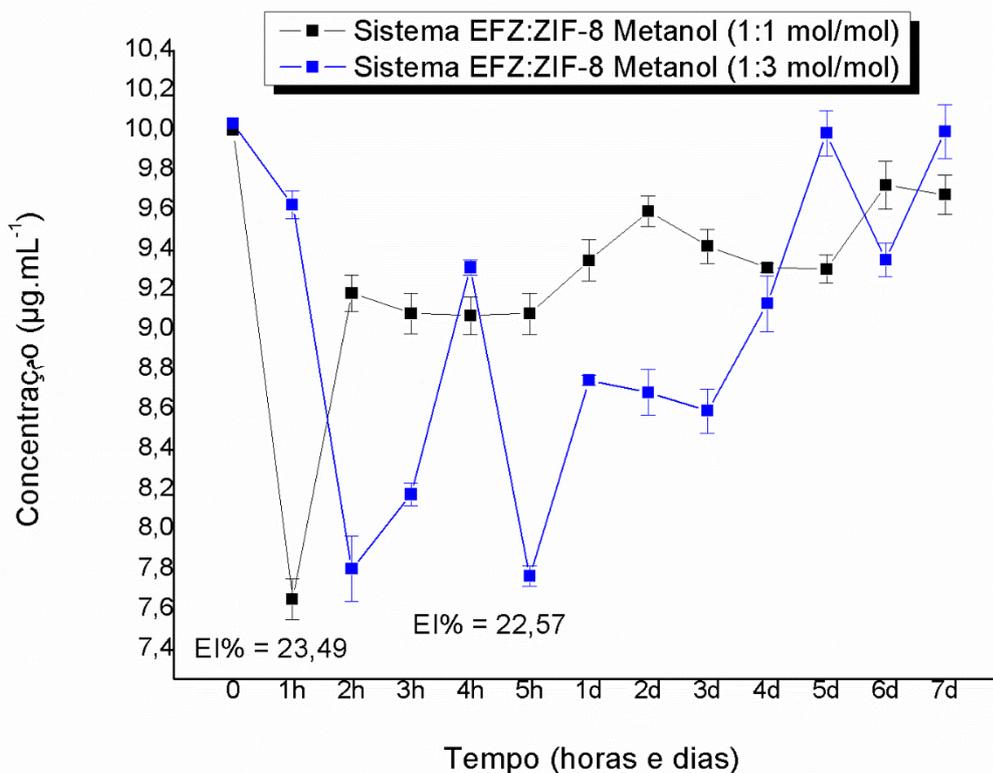
Visando otimizar o método de obtenção dos sistemas utilizando etanol e metanol, foram avaliadas diferentes proporções molares de EFZ:ZIF-8 (1:3, 1:1 e 3:1 mol/mol) a fim de identificar a que apresentasse maior eficiência de incorporação. Contudo, os valores de EI% foram todos abaixo do apresentado pela proporção molar de 1:1 em etanol e 3:1 em metanol, conforme observado nas Figuras 20 e 21.

Figura 20 – Curvas de incorporação e valor de eficiência de incorporação (EI%) dos Sistemas EFZ:ZIF-8 Etanol nas proporções molares 1:3 e 3:1 mol/mol.



Fonte: Autoria própria

Figura 21 – Curvas de incorporação e valor de eficiência de incorporação (EI%) dos Sistemas EFZ:ZIF-8 Metanol nas proporções molares 1:1 e 1:3 mol/mol.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, os sistemas obtidos em etanol na proporção molar 1:1 e metanol 3:1 foram os selecionados para dar continuidade ao trabalho, uma vez que apresentaram maiores EI% que as demais proporções. Estes sistemas foram, então, denominados EFZ:ZIF-8, sendo estes o objetivo de estudo das técnicas de caracterização. Em alguns casos, as misturas físicas (MFs) foram utilizadas para fins comparativos.

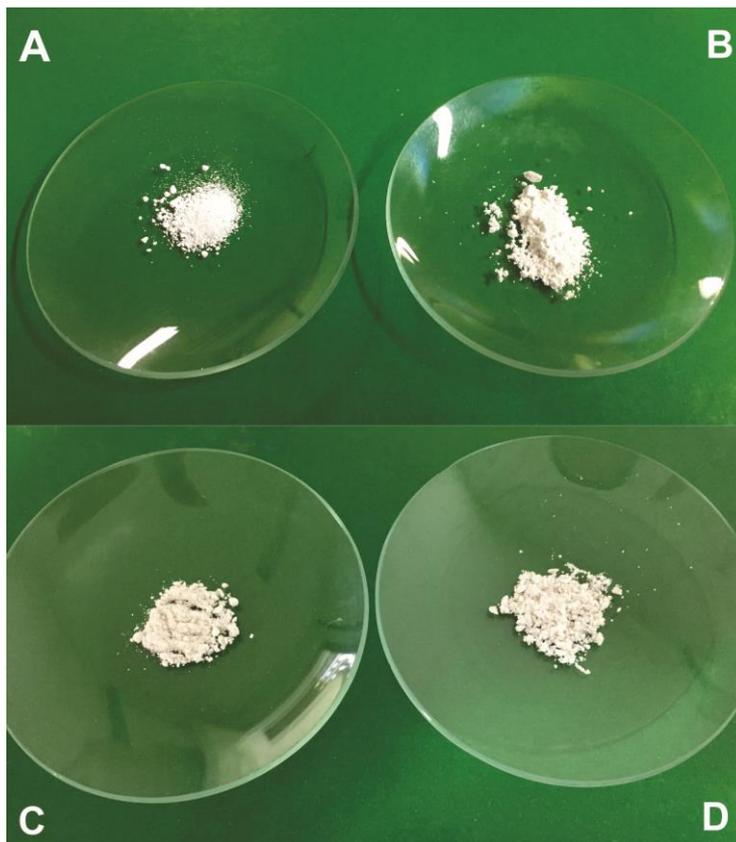
Os experimentos – realizados em triplicata – demonstraram baixíssimo desvio padrão dos pontos isolados, evidenciando a confiabilidade dos resultados. Em adição a este fato, foi padronizada a obtenção do sistema EFZ:ZIF-8 em etanol (1:1) mediante agitação por 1 dia e em metanol por 5 horas.

5.2.2 Aspecto macroscópico

Em ambos os sistemas obtidos (EFZ:ZIF-8 Etanol 1:1 e Metanol 3:1) não foram observadas mudança de coloração (Figura 22 C e D). Em relação à morfologia macroscópica

do pó, os sistemas apresentaram características semelhantes a ZIF-8 (Figura 22 B), adquirindo uma estrutura de pó com aspecto grumoso, enquanto o fármaco se apresenta com aspecto de pó fino (Figura 22 A).

Figura 22 – Aspecto Macroscópico: A) EFZ; B) ZIF-8; C) Sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) mol/mol; D) Sistema EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1) mol/mol.



Fonte: Autoria própria.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO EFAVIRENZ, ZIF-8, MISTURAS FÍSICAS E SISTEMAS

5.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de infravermelho tem sido bastante utilizada para investigar possíveis interações entre fármaco e carreador nos sistemas, já que é capaz de detectar diferenças sutis na energia vibracional entre estado amorfo e cristalino. Estudo destas interações, principalmente ligações de hidrogênio, é de extrema importância, uma vez que estão

relacionadas com a estabilidade dos sistemas e com a compatibilidade entre o fármaco e o material utilizado (SHAH et al., 2013; TEJA et al., 2013).

No espectro de absorção do EFZ (Figura 23) as bandas referentes aos possíveis grupos doadores e aceptores de hidrogênio do EFZ podem ser observadas: deformação axial de N-H em 3313 cm^{-1} (1), além das bandas em 1743 cm^{-1} (3) e 1240 cm^{-1} (5), característicos da função carbamato presente na estrutura do fármaco e que seriam referentes à deformação axial da ligação C=O e C(C=O)-O, respectivamente. Adicionalmente, as seguintes bandas típicas também foram visualizadas: estiramento $\text{C}\equiv\text{C}$ (2249 cm^{-1}) (2), estiramento axial C-F (1183 cm^{-1}) e deformação angular de C-H em grupamentos cíclicos tensionados (1494 cm^{-1}) (4), evidenciando a presença do radical ciclopropil na molécula do EFZ, dados estes que se assemelham com os observados por Gomes (2014).

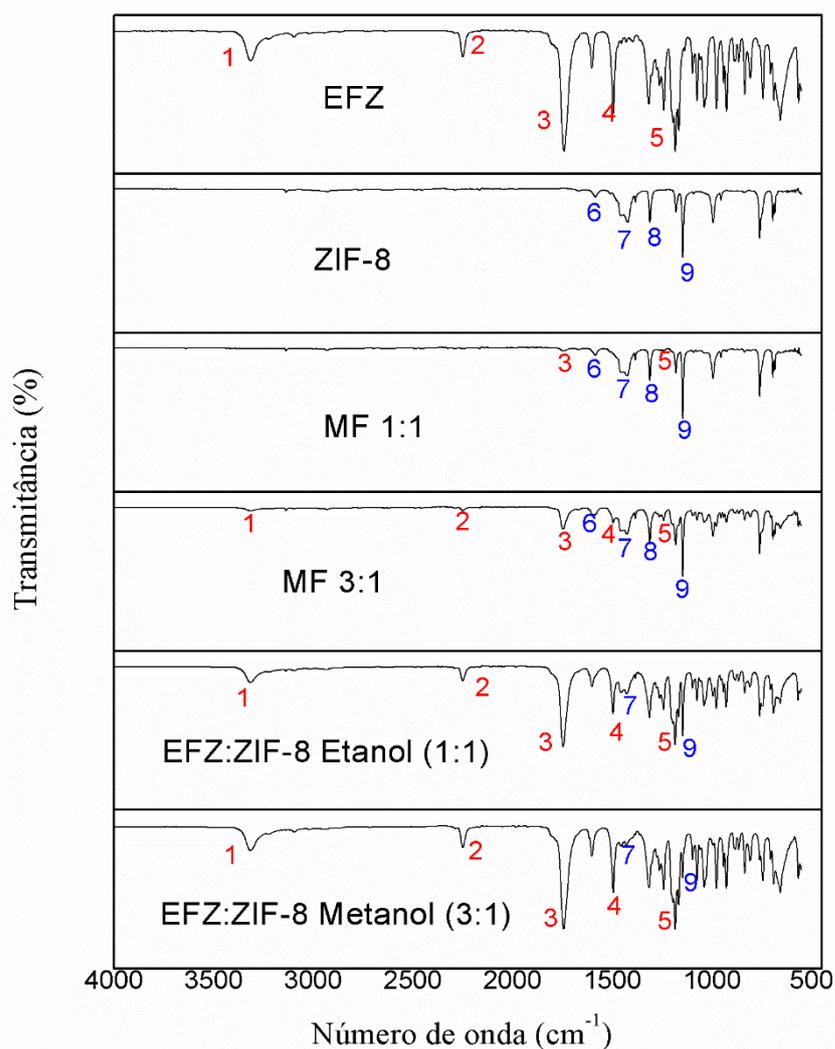
O espectro de absorção no infravermelho da ZIF-8 evidenciou bandas características do composto (Figura 23), comprovando que os dados de sua identificação espectroscópica são similares aos já descritos na literatura para o carreador (ALVES, 2013; AMARANTE, 2016). Constatamos em 3132 e 2936 cm^{-1} discreto estiramento Csp²-H e Csp³-H referentes ao anel imidazol e ao grupo metila, respectivamente. Em 1670 cm^{-1} (6) é observada a banda do estiramento de C=C. Enquanto que as bandas de absorção C-N são observadas na região de 1100 a 1400 cm^{-1} (7-9). Finalizando, não foi possível observar o modo de estiramento Zn-N pois o mesmo ocorre entre 450 e 400 cm^{-1} e as análises só foram possíveis em equipamentos que trabalhavam com comprimentos até 550 cm^{-1} .

No espectro das MFs (Figura 23) é possível notar a presença de bandas características do EFZ e ZIF-8, mesmo quando as do fármaco sofrem significativa redução de intensidade. Diante disso, pressupõe-se um determinado grau de interações entre o fármaco e a ZIF-8 quando estes são unidos apenas por uma mistura física (FERRAZ, 2017).

Analisando os sistemas EFZ:ZIF-8 obtidos em metanol e etanol (Figura 23), algumas bandas do EFZ e da ZIF-8 isolados não são bem evidenciados, devido a sobreposição das mesmas. Entretanto, foi possível sugerir a presença do fármaco em questão, evidenciando, em 3313 cm^{-1} (1), 1743 cm^{-1} (3) e 1183 cm^{-1} , a deformação axial da ligação N-H, C=O e o estiramento axial C-F respectivamente. A redução da intensidade das bandas foi observada em ambos os sistemas quando comparados com o fármaco isolado, tendo o sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) uma evidência maior dessa redução. Adicionalmente, houve diminuição da intensidade da banda de absorção referente ao grupamento C-N da ZIF-8 (1400 e 1302 cm^{-1}) (7 e 9), isto confirma que a mesma interage de maneira efetiva com o EFZ (ALVES, 2013).

Assim, ao comparar os espectros de infravermelho dos sistemas, das MFs e das substâncias isoladas, observou-se que tanto os sistemas como as misturas físicas apresentaram as principais bandas do fármaco em menor intensidade, indicando, desta forma, indícios de interação entre o EFZ e a ZIF-8.

Figura 23 – Espectros de infravermelho do EFZ, ZIF-8, Misturas Físicas e Sistemas EFZ:ZIF-8.



Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Difractometria de Raios-X (DRX)

A DRX é uma técnica considerada de suma importância no campo farmacêutico e, no que diz respeito a obtenção de sistemas, é amplamente utilizada para estudar e caracterizar a

cristalinidade ou o processo de amorfização dos fármacos utilizados (BAIRD e TAYLOR, 2012). Os difratogramas dos compostos isolados e de suas respectivas MF e sistemas encontram-se representados na Figura 24.

O perfil de difração do EFZ apresenta pico principal a 2θ em torno de $6,13^\circ$, além de outros picos secundários em $14,18^\circ$, $16,91^\circ$, $21,26^\circ$ e $24,93^\circ$, evidenciando o seu caráter cristalino. O trabalho de Gomes (2014) descreve picos de intensidade bastante similares para o EFZ, revelando a autenticidade do insumo farmacêutico ativo adquirido.

A DR-X da ZIF-8 também determinou a característica cristalina da molécula, devido a presença de picos bastante intensos ($7,29^\circ$) e outros de média intensidade ($10,34^\circ$ e $12,66^\circ$), como visto no trabalho de Hu (2016). Os picos $7,29^\circ$, $10,34^\circ$ e $12,66^\circ$, referentes a um cubo de corpo-centrado, correspondem às reflexões 011, 002 e 112. Tais dados foram utilizados para o cálculo do espaçamento basal, a fim de estabelecer um valor de referência para caracterizar a inserção da molécula de EFZ na ZIF-8. Estes resultados estão de acordo com trabalhos recentes (PAPPORELLO; MIRÓ; ZAMARO, 2015; PARK et al., 2006).

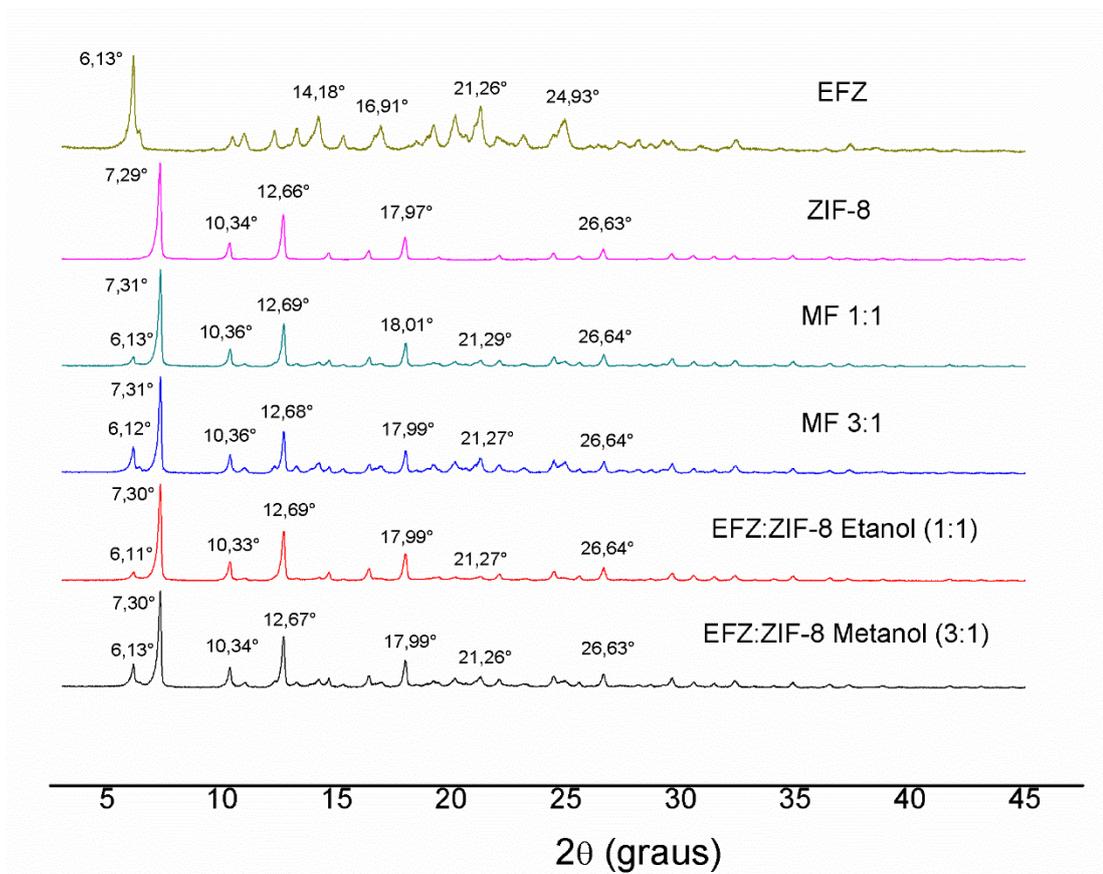
As MFs entre EFZ e ZIF-8 nas proporções 1:1 e 3:1 (mol/mol) evidenciaram um somatório dos perfis de ambos os componentes isolados, apresentando seus picos característicos. Entretanto, o comportamento cristalino da ZIF-8 demonstrou-se mais evidente devido ao intenso pico em $7,31^\circ$. Em relação ao fármaco isolado menor intensidade foi vista na MF 1:1, principalmente nos picos $6,13^\circ$ e $21,29^\circ$ e na MF 3:1 $6,12^\circ$ e $21,27^\circ$, sendo estes ligeiramente mais intensos que a MF 1:1.

O sistema EFZ:ZIF-8 Etanol 1:1 apresentou perfil muito semelhante ao da MF 1:1. Entretanto, os picos característicos da ZIF-8 são mais intensos que os do EFZ. Isto sugere que boa parte do EFZ está incorporado ou adsorvido à ZIF-8, o que confirma a formação do sistema, uma vez que para este sistema o valor da eficiência de incorporação foi 15,68%.

O sistema EFZ:ZIF-8 Metanol 3:1 (Figura 24) apresentou comportamento cristalino, resultando em somatório dos perfis difratométricos das substâncias isoladas. Também semelhante a MF 3:1, o sistema apresentou os picos com uma intensidade inferior, quando comparados com os perfis de DR-X isolados, porém maior quando relacionados ao sistema EFZ:ZIF-8 Etanol 1:1 e sua mistura física.

Apesar da análise de DR-X não evidenciar amorfização da substância, a mesma demonstrou discreta redução na intensidade dos picos, o que determina alteração na natureza cristalina da amostra, corroborando assim a formação do sistema. Para elucidar este fato, outras técnicas de caracterização foram realizadas.

Figura 24 – Difratomogramas de raios-X do EFZ, ZIF-8, Misturas Físicas e Sistemas EFZ:ZIF-8.



Fonte: Autoria própria.

Por se tratar de um material lamelar, o cálculo do espaçamento basal pode ser uma ótima ferramenta para comprovar a formação dos sistemas. O espaço entre as lamelas pode mudar com o aporte do fármaco, ora de forma física, ora com presença de cargas elétricas e está intimamente ligado à liberação modificada de fármacos (XIONG et al., 2015). O espaçamento basal (d) pode ser definido pela equação de Bragg (Equação 2).

Os valores do espaçamento basal foram utilizados como parâmetro para identificar a inserção do fármaco à molécula da ZIF-8. Quando os valores são maiores que o basal indicam que o fármaco foi inserido à molécula e, por isso, dilatam os espaços entre as lamelas. Entretanto, foi verificado quando se compara os picos de reflexão característicos da cristalinidade da ZIF-8 isolada (011, 002 e 112) (HE et al., 2014) e as demais amostras (Tabela 2), que os valores obtidos foram bem próximos (XIONG et al., 2015). O fato não exclui a formação do sistema, mas é sugestivo de uma adsorção do fármaco à superfície da ZIF-8, caracterizando uma interação física.

Tabela 2 – Cálculo do espaçamento basal dos picos de reflexão 011, 002 e 112 da ZIF-8, Misturas Físicas e Sistemas obtidos em etanol e em metanol.

Amostra	Pico ($^{\circ}2\theta$)	Reflexão	Espaçamento Basal (Å)
ZIF-8	7,29	011	12,13
	10,34	002	8,55
	12,66	112	6,99
MF 1:1	7,31	011	12,09
	10,36	002	8,53
	12,69	112	6,97
MF 3:1	7,31	011	12,09
	10,36	002	8,53
	12,68	112	6,98
Sistema Etanol (1:1)	7,30	011	12,11
	10,33	002	8,56
	12,69	112	6,98
Sistema Metanol (3:1)	7,30	011	12,11
	10,34	002	8,55
	12,67	112	6,99

Fonte: Autoria própria.

5.3.3 Termogravimetria (TG)

O uso da análise termogravimétrica foi indispensável na elucidação da degradação do EFZ frente à temperatura e na corroboração da formação do sistema. A comparação dos resultados de TG e DSC, obtidos em condições semelhantes, pode ser de grande valia para a interpretação dos processos térmicos. As curvas TG obtidas para todos os materiais citados até então estão demonstradas na Figura 25.

A curva TG do EFZ entre 20-110,86 °C evidenciou uma perda de massa de 1,04%, referente ao teor de água presente na amostra seguida pela degradação térmica do fármaco isolado em apenas um único evento térmico (195,45-289,18 °C) (DTGpico=260,94 °C). Com perda de massa de 76,30%. Resultado similar foi obtido por Gomes (2014), onde também foi identificado apenas um único evento entre 200 e 300 °C.

Na curva TG da ZIF-8, a porção orgânica demonstrou a boa estabilidade térmica da molécula. Primeiramente, na faixa de temperatura entre 30 e 125 °C foi possível evidenciar uma perda de massa de até 1,86%. Este valor pode estar relacionado à perda de moléculas de água presentes nas cavidades ou na superfície da ZIF-8 como descreve Chowdhuri e colaboradores (2017). Até 461,60 °C, há perda de apenas 3% da massa inicial, o que evidencia a alta estabilidade térmica da ZIF-8, este valor também pode indicar a saída de moléculas de água ligadas coordenadamente à rede da ZIF-8. No intervalo de 503,44-560,88 °C foi possível observar uma perda de massa significativa – melhor evidenciada pela curva DTG – de 13,69%, relativa a degradação da porção orgânica da molécula, o imidazolato. A partir de então, a amostra apresenta decaimento lento, de baixa resolução, sem picos aparentes provavelmente referentes a decomposição térmica da porção inorgânica da ZIF-8, até a formação de óxido de zinco. Estes resultados estão em consonância com trabalhos anteriores de pesquisadores importantes na área (FANG et al., 2015; GADIPELLI e GUO, 2015; VASCONCELOS et al., 2012).

Na análise da MF 1:1 o primeiro evento com perda de massa de 44,71% é semelhante ao de decomposição térmica do EFZ, uma vez que, aconteceu praticamente na mesma faixa do fármaco isolado. O segundo evento que ocorreu no intervalo entre 495,72-530,98 °C com perda de massa 3,42% parece está relacionado com uma antecipação da degradação térmica referente à do imidazolato quando comparado com a curva da ZIF-8 isolada. Em seguida, foi observado o decaimento da curva TG que segundo Schejn e colaboradores (2014) pode está relacionado a decomposição térmica da porção inorgânica da ZIF-8 até formação de óxido de zinco.

Na curva TG da MF 3:1 observou-se inicialmente uma perda de massa de 45,36%, onde também não se obteve nenhuma alteração na temperatura da degradação térmica quando comparado com o fármaco isolado. Quanto a ZIF-8, o evento de degradação térmica referente à degradação do imidazolato não foi observado, podendo-se apenas por meio da curva DTA determinar uma perda de massa próximo a 1,6%. Evidenciando que a interação física entre fármaco e ZIF-8 nas MFs altera o comportamento térmico da porção orgânica quando comparada ao material isolado.

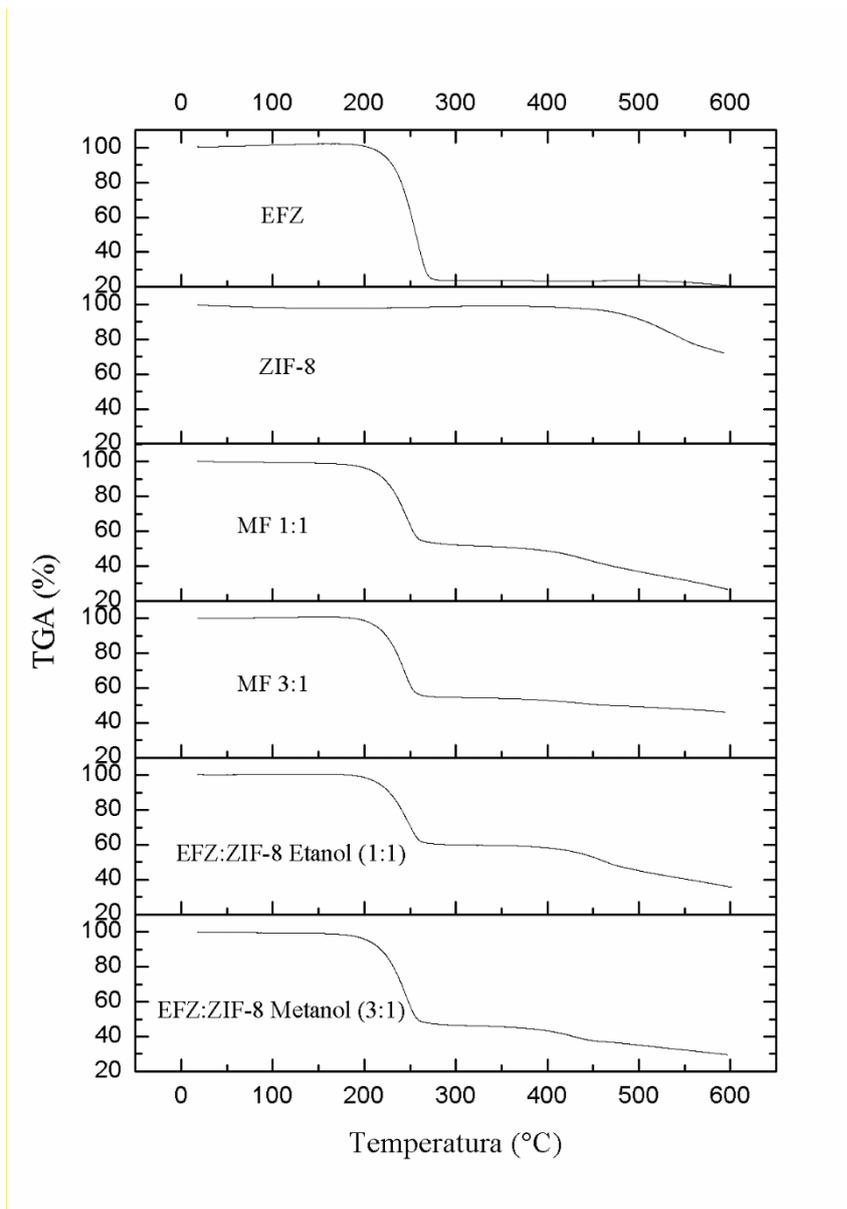
A curva TG do sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) não se mostrou diferente das misturas físicas quando considerada a temperatura de degradação referente ao fármaco isolado, obtendo neste evento uma perda de massa de 39,16%. Em relação a degradação da porção orgânica da ZIF-8, essa aconteceu em um intervalo de temperatura ligeiramente antecipado

entre 487,17-549,82 °C, onde foi observado uma perda de massa de 6,19%, isso sugere que há alguma interação entre o EFZ e o carreador. Posteriormente foi analisada a perda de massa referente à decomposição térmica da ZIF-8 à óxido de zinco (FERRAZ, 2017).

A análise do sistema EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1), mostrou certa consonância com os resultados anteriores, provenientes da temperatura de degradação do fármaco, sendo a quantidade de massa perdida correspondente a 50,41%. Foi também observada uma leve antecipação da degradação térmica da ZIF-8 em relação ao material isolado (474,82-568,74 °C) assim como no sistema com etanol e perda de 5,14% da massa. Como resultado da última perda, tem-se óxido de zinco residual (ZnO) (FERRAZ, 2017).

Tanto as MFs como os sistemas apresentaram perda de massa relacionada ao fármaco na mesma faixa de temperatura que o mesmo. Em relação a ZIF-8 a perda de massa referente a porção orgânica (imidazolato) da ZIF foi vista numa faixa de temperatura de degradação antecipada.

Figura 25 – Curvas TG do EFZ, da ZIF-8, das Místuras Físicas e dos Sistemas EFZ:ZIF-8 obtidos em etanol e em metanol.



Fonte: Autoria própria.

5.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Neste estudo, DSC foi utilizada para analisar e comprovar os resultados do DR-X quanto a forma do fármaco (amorfa ou cristalina) nas MFs e sistemas com ZIF-8, bem como para verificar o comportamento térmico do EFZ quando associado ao carreador. As curvas de DSC dos compostos isolados (EFZ e ZIF-8), de suas respectivas MFs e sistemas, encontram-se representados na Figura 26.

O comportamento térmico do EFZ pôde ser evidenciado por meio de um pico endotérmico bem intenso e definido na faixa de temperatura entre 135,46 – 141,08 °C (T_{pico} = 137,78 °C) (ΔH = 101,66 mJ), característico do processo de fusão da sua estrutura cristalina. Resultados semelhantes foram descritos por Costa (2016).

A curva DSC da ZIF-8 (Figura 26) demonstrou a ausência de picos na faixa de temperatura utilizada, característica inerente a natureza da molécula. Por se tratar de uma molécula híbrida orgânica-inorgânica, os eventos de degradação da ZIF-8 foram analisados por meio da curva DTA (Apêndice A), que possibilitou o aquecimento da amostra até 600 °C. Nesta, foi possível observar dois eventos endotérmicos referentes à transição de fase: o primeiro entre 535,69-576,25 °C; e o segundo, após 578°C. Estes valores e respectivas perdas de massa estão descritas na discussão da curva TG da ZIF-8. Estando em consonância com trabalhos anteriores de pesquisadores importantes na área (FERRAZ, 2017; ORDÓÑEZ et al., 2010).

Na mistura física 1:1 pôde-se observar que o evento endotérmico referente ao pico de fusão do EFZ esteve presente (T_{pico} = 138,36 °C; ΔH = 47,66 mJ) não apresentando nenhuma antecipação, a curva também evidenciou uma redução na intensidade do pico de fusão. Este fenômeno é característico de materiais poliméricos, tais como: PEG, PVP, HPMC; que possibilitam o incremento da solubilidade do material, uma vez que há necessidade de uma menor quantidade de energia para solubilizar o fármaco. Tal comportamento já foi amplamente discutido por trabalhos anteriores do grupo (COSTA et al., 2013; LIMA et al., 2011).

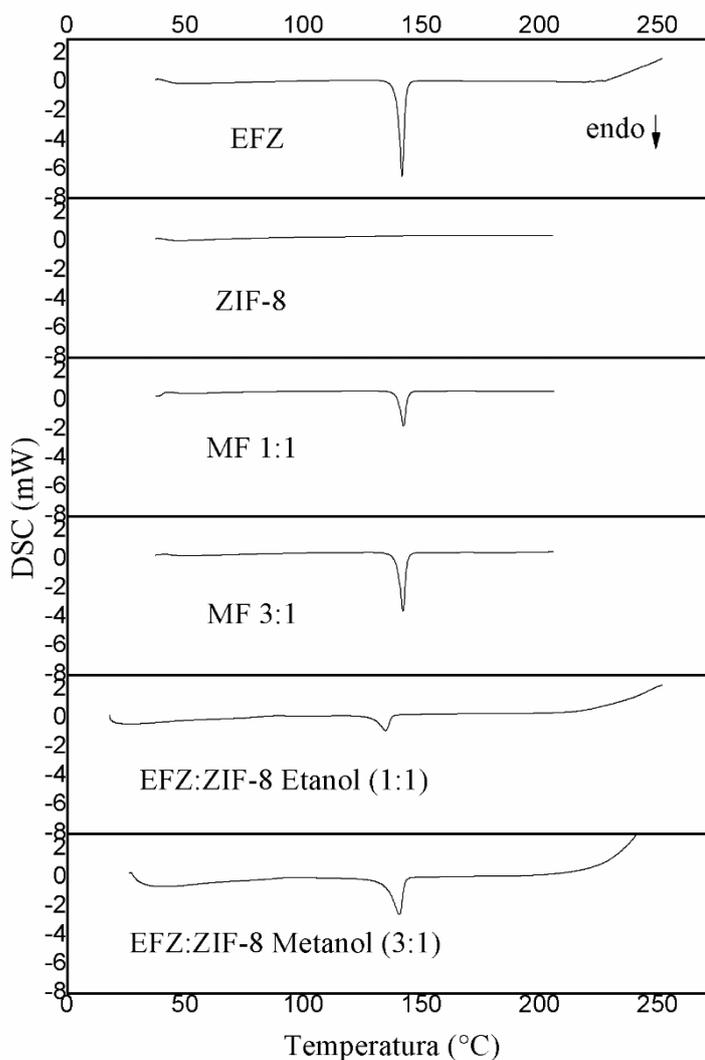
Assim como na MF anterior, a partir da curva DSC da MF 3:1 (Figura 26) foi possível observar que o evento referente a fusão do fármaco ocorre na mesma faixa de temperatura, além da redução na intensidade do pico quando comparado ao fármaco isolado, porém maior em relação a MF EFZ:ZIF-8 1:1. Dessa forma, fica claro que a simples mistura física promove a formação de uma interação fármaco-excipiente, mesmo sem ocasionar a formação propriamente dita do sistema.

A curva DSC do sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) (Figura 26) demonstrou leve antecipação do evento de fusão (129,98-137,26 °C; ΔH = 33,60 mJ) (T_{pico} = 134,75 °C). Esta variação na temperatura de fusão entre o fármaco isolado e o sistema – de aproximadamente 2% – é descrita por muitos autores como uma faixa aceitável da compatibilidade entre componentes de uma mesma formulação (COSTA et al., 2013; DE MELO et al., 2015). Logo, este comportamento pode identificar que o sistema obtido em etanol é, de fato, mais eficiente no que tange a incorporação do fármaco.

Quanto ao sistema EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1) (Figura 26), no evento de fusão referente ao fármaco componente do sistema foi observado uma discreta antecipação na faixa de temperatura (130,16-138,03 °C; $\Delta H= 79,46$ mJ) ($T_{pico}=135,55$ °C), porém esta variação não chega a atingir 2%.

O deslocamento do máximo pico de temperatura de fusão para temperaturas inferiores e o alargamento do pico de fusão como foi visto nas curvas de ambos os sistemas pode indicar a redução no tamanho dos cristalitos e, conseqüentemente, uma melhor solvatação dos mesmos pelo solvente (FERRAZ, 2017).

Figura 26 – Curvas DSC do EFZ, da ZIF-8, das Misturas Físicas e dos Sistemas EFZ:ZIF-8 obtidos em etanol e metanol.



Fonte: Autoria própria.

5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por MEV possui uma grande importância na área farmacêutica já que pode ser utilizada para o conhecimento detalhado da microestrutura dos produtos isolados e seus binários que, desta forma, permite realizar uma correlação entre a estrutura morfológica e o tamanho das partículas com os resultados obtidos por meio das demais análises realizadas na investigação da formação dos sistemas. As eletromicrografias dos produtos isolados, MFs e seus sistemas estão ilustrados na Figura 27.

O MEV do fármaco demonstrou o aspecto cristalino irregular do EFZ, com formato ortorrômbico (Figura 27.A), os resultados estão em consonância com trabalhos prévios do grupo (COSTA, 2016).

A partir das fotomicrografias, observa-se a ZIF-8, também cristalina, demonstrando um aspecto rômboico dodecaédrico uniforme (quase esférico) (Figura 27.B), bastante diminuto, com partículas aglomeradas estando em consonância com os estudos de Ferraz (2017).

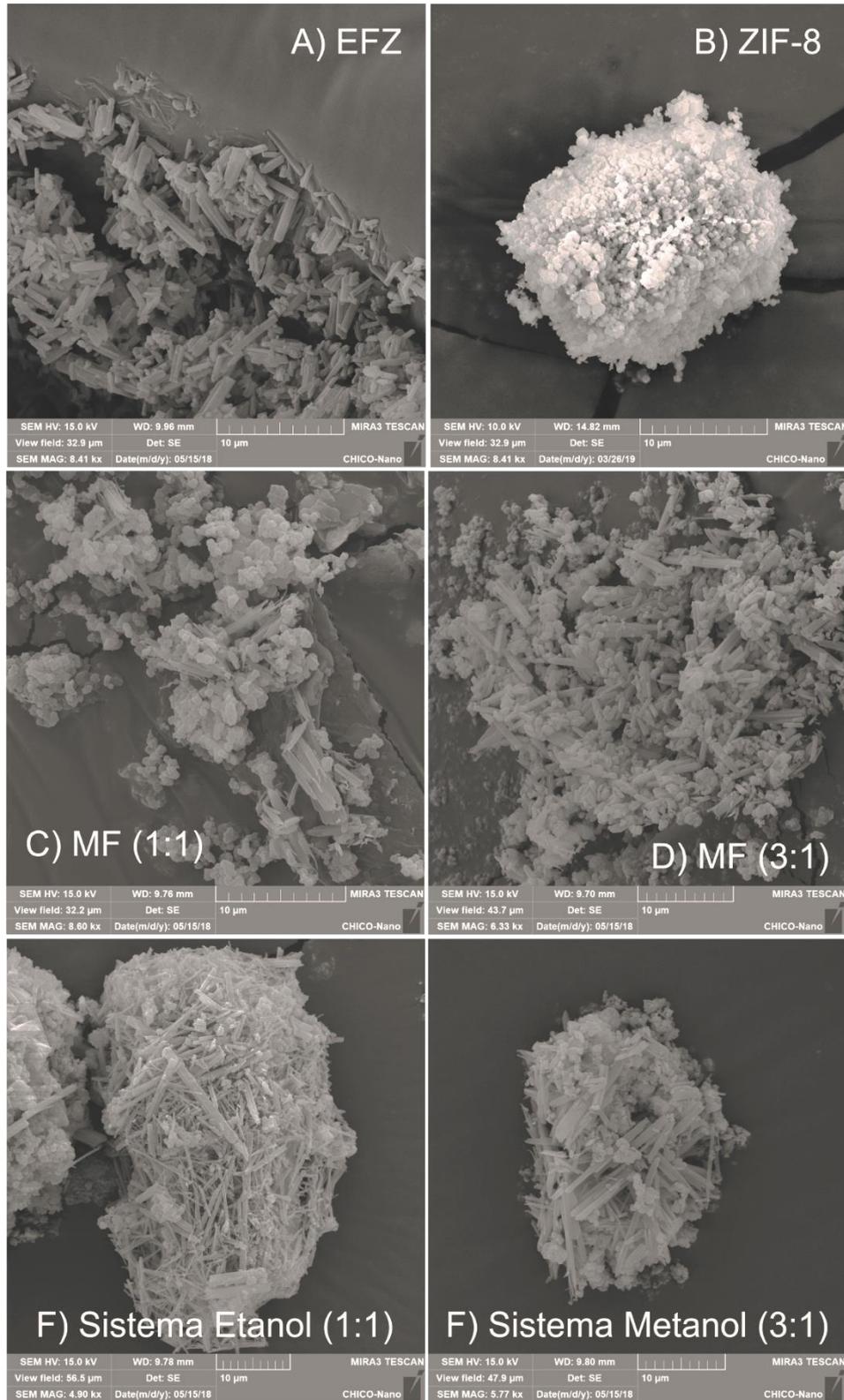
A MF 1:1 confirmou a adsorção física entre o fármaco e o excipiente. É possível observar a deposição dos cristais esféricos da ZIF-8 sobre a superfície dos irregulares cristais de EFZ, tendo alguns cristais apresentado alteração em sua morfologia (Figura 27.C).

Nas eletromicrografias das MF 3:1 (Figura 27.D), a estrutura cristalina do EFZ foi claramente detectável, apresentando-se de maneira envolvida pela ZIF-8, o qual permaneceu com a mesma morfologia, indicando, desta forma, que não houve qualquer alteração quanto a cristalinidade das substâncias e conseqüentemente formação de sistema.

Em contrapartida, os sistemas EFZ:ZIF-8 oriundos do método de obtenção com solvente etanol e metanol, evidenciaram alteração da morfologia dos irregulares cristais de EFZ (Figura 27.E-F). Sendo então sugestivo de interação entre as substâncias que não uma simples adsorção física. Quanto a alteração no tamanho dos cristais, essa não foi detectada.

Portanto, embora essa técnica não seja conclusiva para avaliar a existência da formação de sistemas, pode ser útil para provar a homogeneidade dos mesmos.

Figura 27 – Microscopia Eletrônica de Varredura A) EFZ; B) ZIF-8; C) MF 1:1; D) MF 3:1; E) Sistema EFZ:ZIF-8 Etanol 1:1 e F) Sistema EFZ:ZIF-8 Metanol 3:1.



Fonte: Autoria própria.

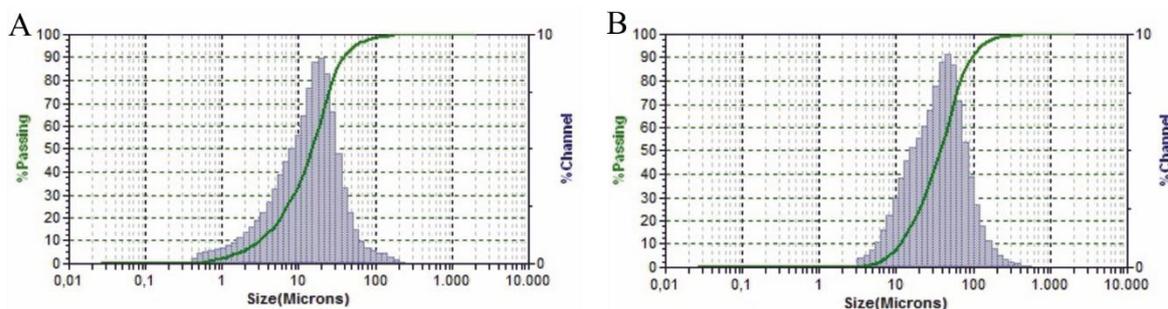
5.3.6 Tamanho de partícula por granulometria à laser e análise de área superficial, tamanho e volume de poros

Parâmetro de extrema importância no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, a área da superfície está intimamente relacionado com o tamanho da partícula e é diretamente ligada às velocidades de dissolução e absorção do fármaco.

Os gráficos da distribuição granulométrica das amostras de EFZ e ZIF-8 estão representados pelas Figuras 28.a-b. Os cristais de EFZ apresentaram tamanho de partícula entre 3 a 52 μm , com tamanho médio de partícula de 19 μm . Ainda foi elucidada um valor de área superficial (Tabela 3) de $4,24 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Estes resultados são semelhantes a outros trabalhos com o fármaco (FANDARUFF, 2016).

A ZIF-8 apresentou cristais de tamanho variando entre 11 e 125 μm , com tamanho médio de partícula de 48 μm , com valor de área superficial de $1160,07 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Estes valores demonstram a capacidade da ZIF-8 em ser utilizada como carreador e apresentam-se em consonância com trabalhos importantes da área (HU et al., 2016).

Figura 28 – a) Gráfico de tamanho de partícula por granulometria à laser do EFZ e b) da ZIF-8.



Fonte: Autoria Própria.

As curvas de adsorção e dessorção indicam o tipo de porosidade do insumo farmacêutico ativo. O EFZ apresentou diâmetro médio de poro $54,64 \text{ \AA}$, sendo um indicativo da presença de mesoporos (poros de uma largura interior de 20 e 500 \AA). A ZIF-8 também demonstrou a presença de mesoporos ($83,72 \text{ \AA}$) (WEBB e ORR, 1997). Trabalhos recentes mostram a consonância destes resultados (HU et al., 2016; PARK, 2006). Contudo, Fang e Colaboradores (2015) evidenciaram, por meio de isotermas de adsorção/dessorção de N_2 , a presença de microporos na ZIF-8, devido ao rápido aumento do volume de adsorção em baixa pressão relativa, sendo os mesoporos mais predominantes.

As MFs 1:1 e 3:1 (mol/mol) e sistemas EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) e Metanol (3:1) apresentaram, respectivamente, diâmetros de poro 40,35Å, 55,95Å, 49,00Å e 84,06 Å mantendo a natureza de mesoporos, com volume de poros diminuído quando comparados a ZIF-8. Esses resultados evidenciam o êxito na obtenção do sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) e uma real interação das substâncias nas MF, pois a redução no tamanho de poro destes em relação a ZIF-8 isolada sugere a presença das molécula de EFZ dispostas na rede de coordenação, interagindo com a ZIF-8 e diminuindo assim o seu tamanho de poro que, de 83,72 Å passou a ser 49,00 Å no sistema etanol e 40,35 Å e 55,95 Å nas MFs 1:1 e 3:1, respectivamente (BIDONE et al., 2009; CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008). Os dados acima mencionados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados da análise granulométrica e da área superficial, tamanho e volume de poros do EFZ e da ZIF-8.

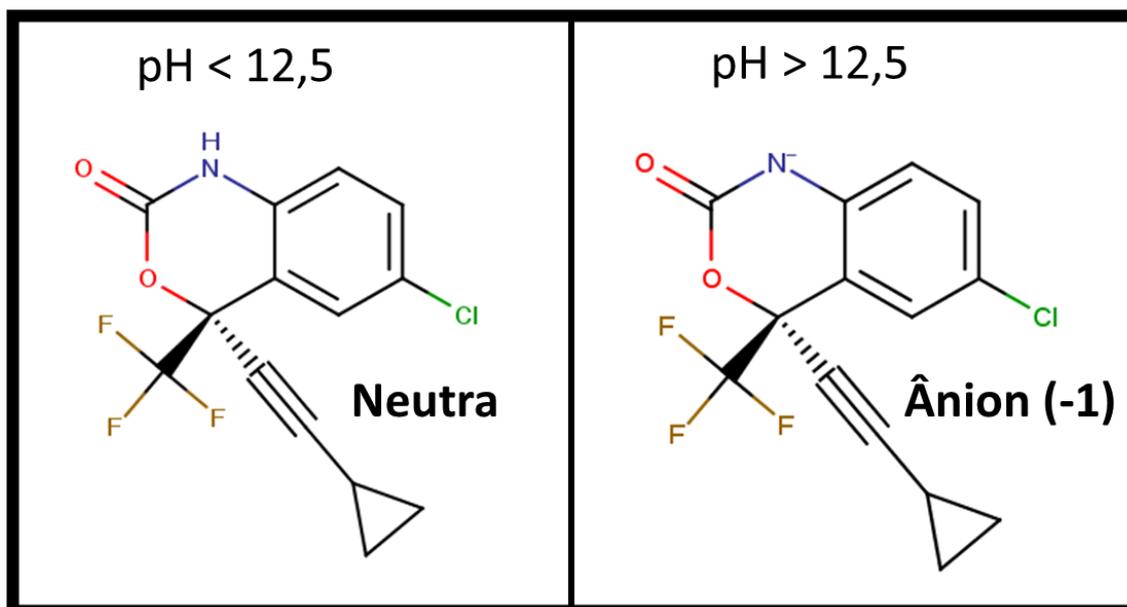
Amostra	Área de Superfície (método BET) (m ² .g ⁻¹)	Volume de Poro (método BJH) (cm ³ .g ⁻¹)	Tamanho de Poro (método BJH) (Å)
EFZ	4,24	0,01	54,64
ZIF-8	1160,07	0,09	83,72
MF 1:1	-	0,02	40,35
MF 3:1	-	0,01	55,95
EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1)	-	0,03	49,00
EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1)	-	0,04	84,06

Fonte: Autoria Própria.

5.3.7 Estudo de Modelagem Molecular

O *software* MarvinSketch identificou 2 microespécies do fármaco Efavirenz considerando uma faixa de pH entre 0 e 14. Para valores de pH inferiores a 12,5 a microespécie neutra é a mais abundante, já para valores acima de 12,5 a microespécie aniônica se torna majoritária. À medida que ocorre o incremento do pH, o equilíbrio é deslocado para a formação da base conjugada do grupo benzoxazin-2-ona. Desta forma, a microespécie majoritária em valores de pH acima de 12,5, apresenta carga formal -1. As estruturas das duas microespécies identificadas podem ser visualizadas na Figura 29.

Figura 29 – Microespécies majoritárias do Efavirenz em função do pH.

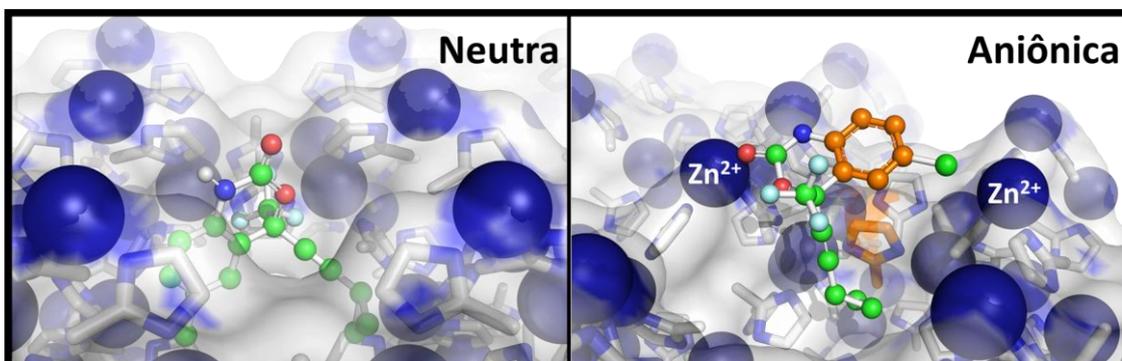


Fonte: Autoria Própria.

Para cada microespécie foram realizados 300 cálculos de *docking*, agrupados em *clusters* com variação de RMS (*root mean square*) menor que 1,0 Å entre as estruturas, totalizando 600 cálculos de *docking*. A solução de *docking* mais favorável para cada microespécie foi definida como sendo a melhor solução dentro do *cluster* de menor energia e maior representatividade. A Figura 30 mostra as melhores soluções de *docking* para as duas microespécies analisadas. Para a microespécie neutra a solução mais favorável apresentou energia no valor de $-1,85 \text{ kcal.mol}^{-1}$, enquanto a solução para a microespécie aniônica apresentou energia no valor de $-2,19 \text{ kcal.mol}^{-1}$. A microespécie neutra foi acomodada dentro da cavidade da ZIF-8, principalmente por interações hidrofóbicas. Já a microespécie aniônica, apresenta a porção ciclopropil dentro da cavidade e a porção benzoxazin-2-ona posicionada na superfície, devido as interações eletrostáticas entre os cátions Zn^{2+} da ZIF-8 e a carbonila e o átomo de cloro do Efavirenz. Ainda é possível observar uma interação do tipo “empilhamento em T” entre os elétrons π do anel benzênico do Efavirenz e do anel metilimidazol da ZIF-8, destacados em laranja na Figura 30.

Desta forma, os resultados de *docking* sugerem a ocorrência da incorporação do Efavirenz na cavidade da ZIF-8 dentro da faixa de pH avaliada, corroborando com os resultados das caracterizações que também indicam a obtenção do sistema EFZ:ZIF-8.

Figura 30 – Soluções de *docking* molecular mais favoráveis entre a ZIF-8 e as microespécies do Efavirenz, destaque para o anel metilimidazol que interage por meio de interações do tipo “empilhamento em T” (laranja).



Fonte: Autoria Própria.

5.4 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS MFs E SISTEMAS EFZ:ZIF-8 OBTIDO EM ETANOL E METANOL

5.4.1 Ensaio de Solubilidade do EFZ

A solubilidade dos fármacos é uma propriedade que influencia diferentes aspectos relativos à biodisponibilidade, pois apenas o fármaco dissolvido é capaz de ser absorvido. Auxilia também na escolha do solvente mais adequado para utilizações analíticas. No presente trabalho, o ensaio de solubilidade foi realizado a fim de identificar a condição *sink* para satisfazer as normas preconizadas pela Farmacopéia Brasileira para execução do ensaio de dissolução *in vitro*.

A Tabela 4 mostra a solubilidade do efavirenz nos diferentes meios avaliados, ácido clorídrico com pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato de sódio pH 6,8, todos com presença do surfactante LSS. Os resultados encontrados nesse trabalho são semelhantes aos obtidos por Pinto e colaboradores (2014), onde o maior valor de solubilidade observado foi de 2,12 mg/mL em tampão acetato pH 4,5, enquanto que o menor valor foi em ácido clorídrico pH 1,2 com solubilidade 0,49 mg/mL.

Tabela 4 – Solubilidade do efavirenz (mg/mL) em diferentes meios.

Meios	Solubilidade (mg/mL)
Ácido Clorídrico pH 1,2 + 1,0% LSS	0.4985
Tampão Acetato de Sódio pH 4,5 + 1,0% LSS	2.1267
Tampão Fosfato de Sódio pH 6,8 + 1,0% LSS	1.8520

Fonte: A autoria própria.

5.4.2 Revalidação dos métodos analíticos para quantificação do EFZ presente nos sistemas e MFs por meio da espectrofotometria no UV-VIS

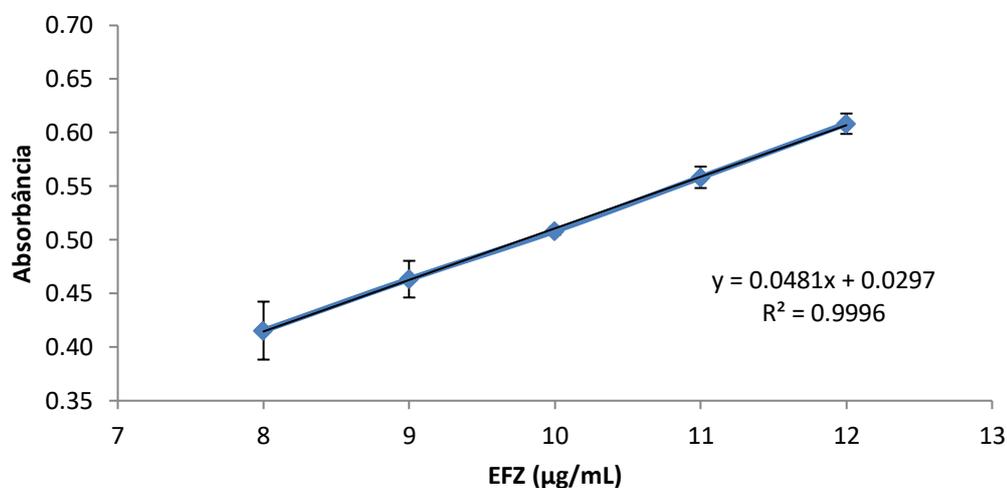
5.4.2.1 Revalidação do Método Analítico com Etanol

5.4.2.1.1 Linearidade

As linearidades das curvas dos ensaios sem e com HCl foram comprovadas nas concentrações propostas por meio da análise de regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados.

No ensaio sem HCl (Método de Alves), foi possível determinar o valor de coeficiente de correlação $r = 0,99980$ e o coeficiente de determinação $r^2 = 0,99960$, como mostra a Figura 31. O valor de r^2 indica que 99,96% da variação total relacionado à média são explicadas pela regressão. A obtenção desses resultados confirma que há uma correlação linear entre a absorbância e a concentração das amostras, uma vez que os parâmetros encontram-se dentro dos limites preconizados pela ANVISA, superiores as 0,99.

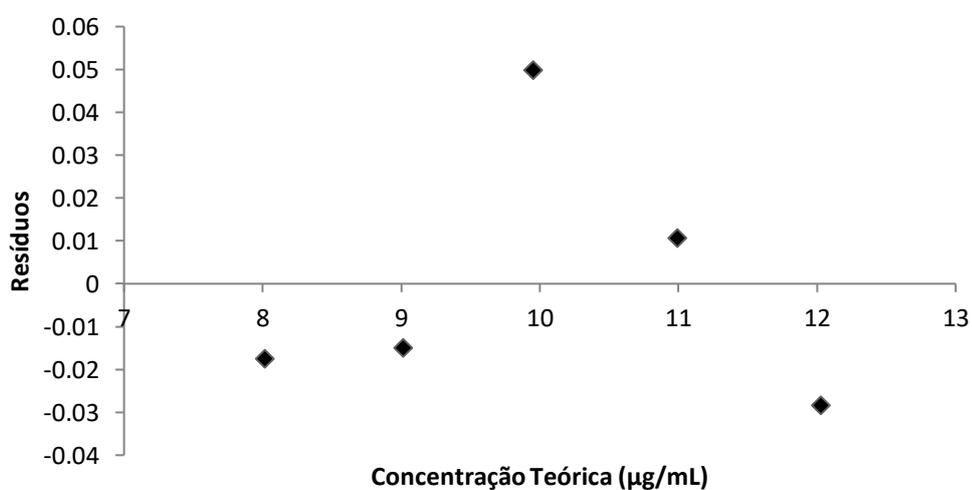
Figura 31 – Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade referente ao método Alves (2010) com etanol.



Fonte: Autoria própria.

O cálculo dos resíduos da linearidade do método Alves (2010) foi obtido por meio da regressão linear, onde demonstra os valores estimados e os dados observados. Os resíduos distribuíram-se em torno do zero, mostrando que a dispersão é aleatória e sem tendência, indicativo de um bom resultado, como mostrado na Figura 32.

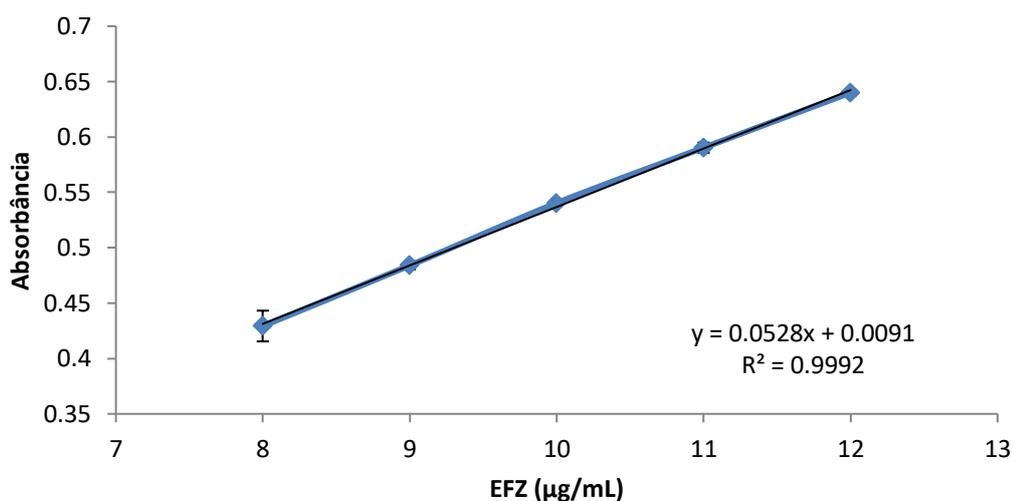
Figura 32 – Gráfico dos resíduos da linearidade por meio do cálculo de regressão linear referente ao método Alves (2010) com etanol.



Fonte: Autoria própria.

No método ajustado, contendo HCl 1M, foi possível determinar o coeficiente de correlação $r = 0,99960$ e o coeficiente de determinação $r^2 = 0,99920$, confirmando que há uma correlação linear entre a absorbância e a concentração das amostras, como mostrado na Figura 33.

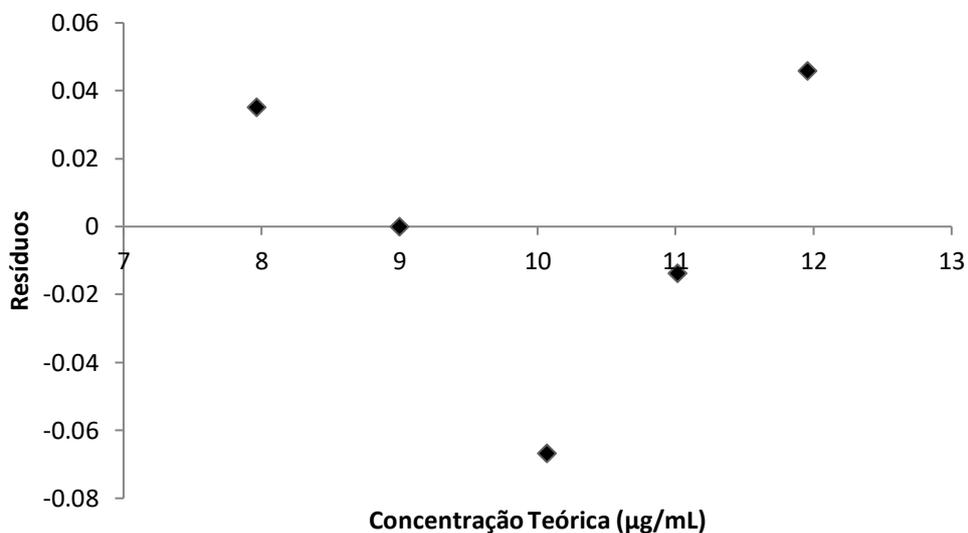
Figura 33 – Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade referente ao método ajustado (com HCl 1M) com etanol.



Fonte: Autoria própria.

O cálculo de resíduos da linearidade do método ajustado também apresentou resultados satisfatórios, visto que, os resíduos foram distribuídos em torno do zero, representando uma dispersão aleatória e sem tendência, como mostrado na Figura 34.

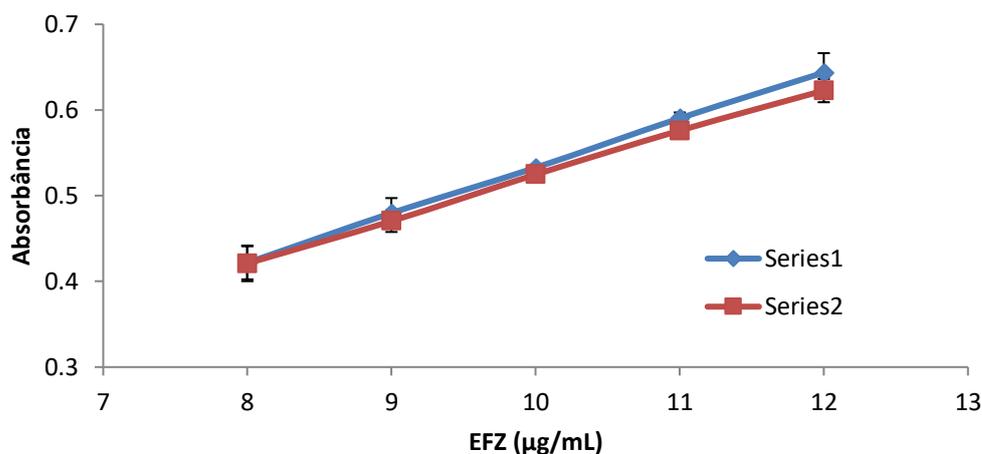
Figura 34 – Gráfico dos resíduos da linearidade por meio do cálculo de regressão linear referente ao método ajustado com etanol.



Fonte: Autoria própria.

5.4.2.1.2 Efeito Matriz

Por meio do resultado das inclinações do método de Alves (2010) e do método ajustado (com HCl 1M e ZIF-8) pôde-se obter o resultado do efeito matriz, onde foi obtido um valor próximo de 1 (1,089718), resultado este, considerado satisfatório em relação ao paralelismo das retas das duas curvas, indicando ausência de interferência dos constituintes da matriz. Ou seja, satisfeita as premissas e confirmada a linearidade do analito em matriz. Na Figura 35 pode-se observar o paralelismo entre as retas das duas curvas.

Figura 35 – Paralelismo entre as retas das curvas com etanol no efeito matriz.

Fonte: Autoria própria.

5.4.2.1.3 Robustez

A robustez foi dada por meio da análise em diferentes concentrações do fármaco (concentração baixa, média e alta da curva) sem e com adição de HCl. Os resultados da robustez foram expressos pela Equação 3 e podem ser verificados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da robustez do método com etanol por meio da variação intencional de pH com HCl 1M.

Robustez					
Método	[] Teórica de EFZ (µg/mL⁻¹)	[] Calculada de EFZ (Média)	DP	DPR (Média)	% de Recuperação
Método Alves (2010)	8	8,377	0,003	0,706	104,7212
Método Alves (2010)	10	10,435	0,018	3,520	104,3590
Método Alves (2010)	12	12,438	0,018	2,940	103,6556
Método Ajustado	8	8,173	0,005	1,290	102,1701
Método Ajustado	10	10,294	0,005	1,028	102,9482
Método Ajustado	12	12,365	0,006	0,918	103,0461

Fonte: Autoria própria.

De acordo com o artigo 61 da RDC 166/17 da ANVISA, os resultados da robustez devem apresentar capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Como visto nos DPR das amostras contendo HCl, todas possuem baixa variabilidade intrínseca. Foi possível observar um pequeno aumento no percentual de recuperação do analito nas amostras de concentrações mais baixas (8 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pois estas tornam-se mais susceptíveis a variações devido a sensibilidade do método. Dessa maneira, o método encontra-se com um % de recuperação próximo de 100% nas amostras em geral, não inviabilizando a revalidação do método, visto que a RDC 166 não determina valores para os resultados, mas sim uma justificativa para os mesmos. Vale ressaltar que o método mostrou-se linear, como demonstrado anteriormente.

5.4.2.1.4 Precisão (Repetibilidade)

A repetibilidade foi realizada apenas com o método contendo HCl, em sextuplicata e os resultados encontram-se expostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da repetibilidade do método com etanol.

Repetibilidade									
Amostras	1	2	3	4	5	6	Média	DP	DPR (%)
Absorbância	0,496	0,520	0,533	0,542	0,530	0,551	0,5286	0,0191	3,6279

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados expostos na Tabela 5 pode-se concluir que o método apresenta uma boa repetibilidade visto que produz um resultado com baixo valor de DPR.

5.4.2.1.5 Exatidão

A exatidão foi realizada por meio da análise que contemplou o intervalo linear do método analítico utilizando diferentes concentrações do fármaco (concentração baixa, média e alta da curva) sem e com adição de HCl. Os resultados da exatidão foram expressos pela Equação 3, podendo ser analisados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da exatidão do método com etanol.

Método	Exatidão				
	[] Teórica de EFZ ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	[] Calculada de EFZ (Média)	DP	DPR (Média)	% de Recuperação
Método Alves (2010)	8	8,204	0,004	1,113	102,5554
Método Alves (2010)	10	10,338	0,010	2,052	103,3888
Método Alves (2010)	12	12,237	0,003	0,612	101,9808
Método Ajustado	8	8,148	0,001	0,347	101,8545
Método Ajustado	10	10,174	0,001	0,279	101,7487
Método Ajustado	12	12,264	0,007	1,163	102,2043

Fonte: Autoria própria.

O método ajustado mostrou-se exato, pois quando comparado com a concentração teórica os resultados obtidos se mostraram próximos do valor de concentração conhecido. Como pede a RDC 166/17 da ANVISA o método encontra-se com DPR baixo e um % de recuperação próximo de 100% nas amostras em geral, corroborando com o que foi exposto anteriormente.

5.4.2.1.6 Seletividade

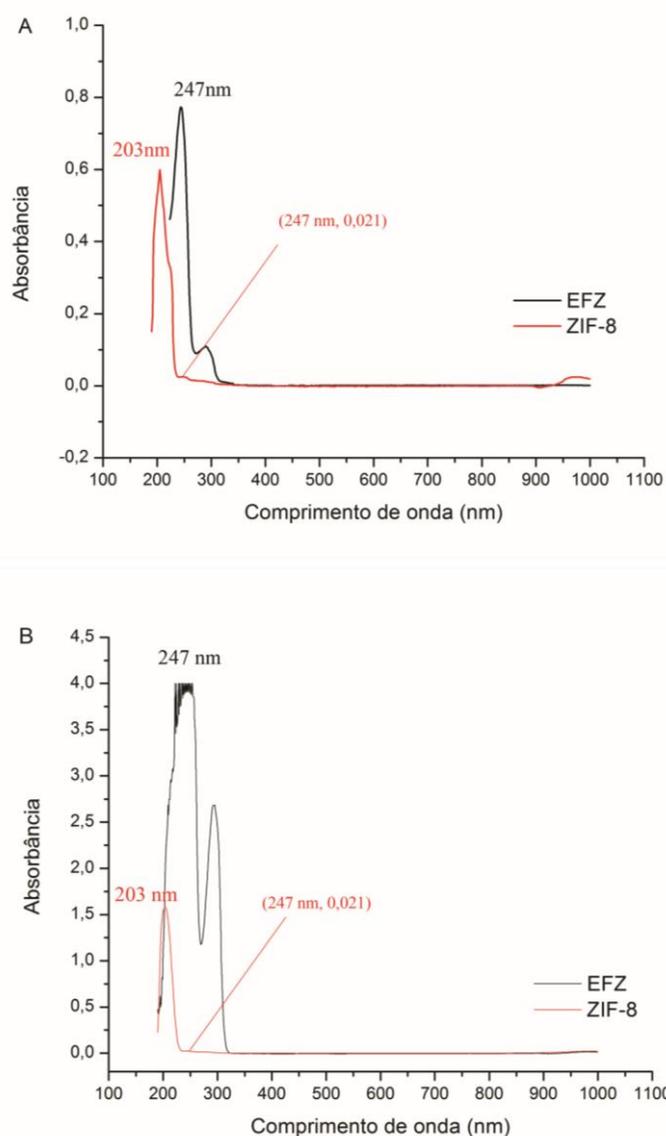
Com o objetivo de avaliar se o método é seletivo para a substância química de referência caracterizada, foram obtidos os espectros de absorção na região do ultravioleta visível (UV-Vis), por varredura, do EFZ e da ZIF-8, tanto para o método de Alves (2010) (Figura 36.A), quanto para o método ajustado com etanol (Figura 36.B).

A verificação da seletividade para a revalidação de um método espectrofotométrico é demonstrada a partir da realização de ensaios que permitem observar, comparativamente, se a utilização do método ajustado interfere no comprimento de onda para leitura do analito e se o método continua sendo seletivo apenas para o fármaco, não havendo interferência da matriz.

Baseado na Figura 36, os espectros do UV-Vis refletem que o uso do HCl no método ajustado quando comparado ao método de Alves (2010) não interfere no comprimento de

onda utilizado para leitura do fármaco (247 nm), não sendo observado também a sobreposição dos picos correspondentes ao EFZ e a ZIF-8. O que demonstra que a leitura da matriz não ocorre no mesmo ponto em que há máxima absorção do EFZ. Sendo justificado pelo uso do HCl, que promove a desorganização na estrutura da matriz. Não interferindo, portanto, de forma quantitativa na leitura do fármaco.

Figura 36 – Espectro de absorção na região do UV-Vis do parâmetro de seletividade referente ao método com etanol: A) Alves (2010) e B) Ajustado.



Fonte: Autoria própria.

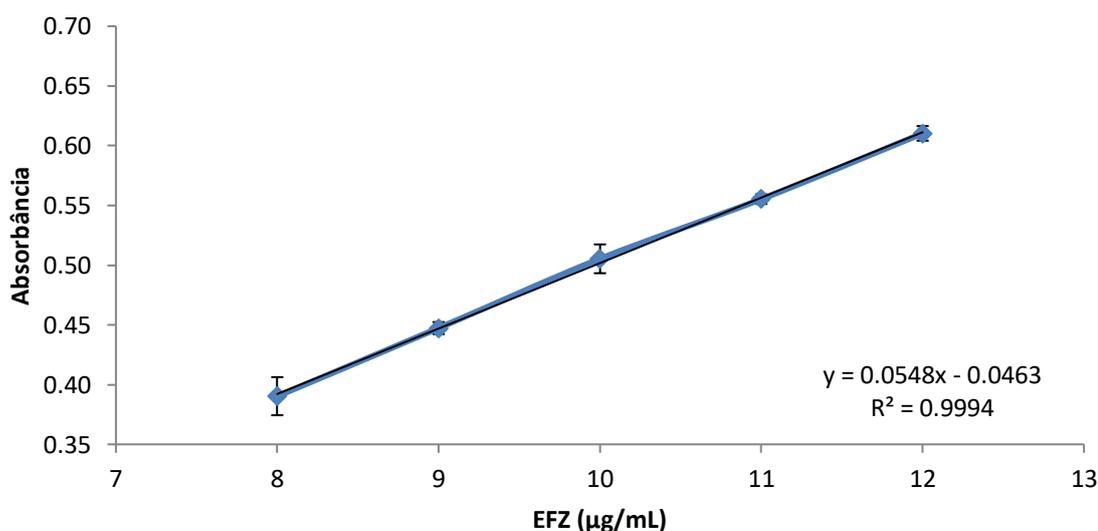
5.4.2.2 Revalidação do Método Analítico com Metanol

5.4.2.2.1 Linearidade

As linearidades das curvas dos ensaios sem e com HCl foram comprovadas nas concentrações propostas por meio da análise de regressão linear do método dos mínimos quadrados.

No ensaio sem HCl (Método de Alves), foi possível determinar o valor de coeficiente de correlação $r = 0,99968$ e o coeficiente de determinação $r^2 = 0,99940$, como mostra a Figura 37. O valor de r^2 indica que 99,94% da variação total relacionado à média são explicadas pela regressão. A obtenção desses resultados confirma que há uma correlação linear entre a absorbância e a concentração das amostras, uma vez que os parâmetros encontram-se dentro dos limites preconizados pela ANVISA, superiores as 0,99.

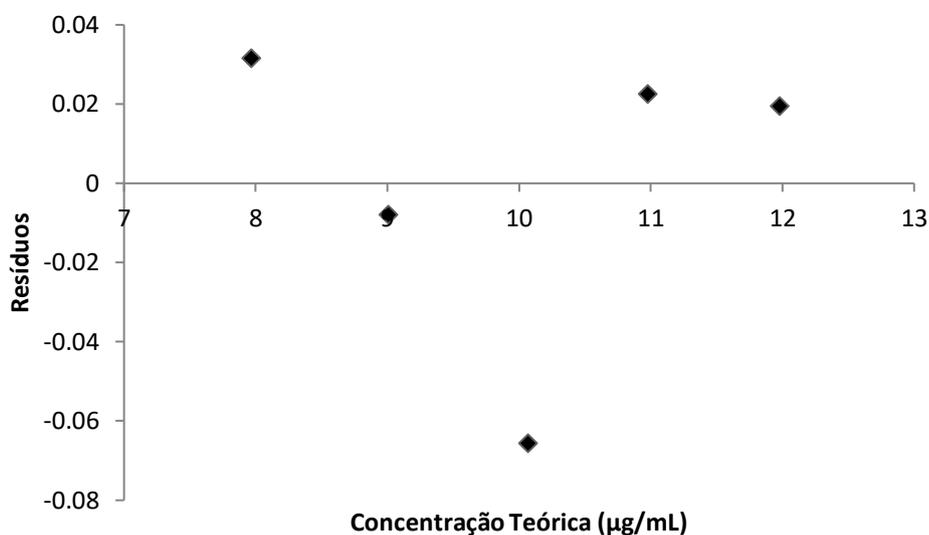
Figura 37 – Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade referente ao método Alves (2010) com metanol.



Fonte: Autoria própria.

O cálculo dos resíduos da linearidade do método Alves (2010) foi obtido por meio da regressão linear, onde demonstra os valores estimados e os dados observados. Os resíduos distribuíram-se em torno do zero, mostrando que a dispersão é aleatória e sem tendência, indicativo de um bom resultado, como mostrado na Figura 38.

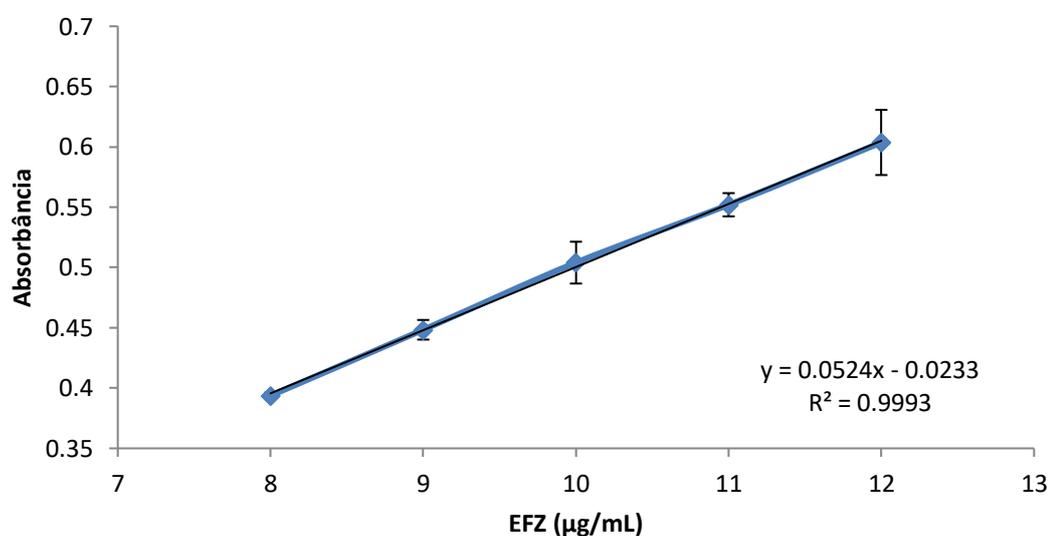
Figura 38 – Gráfico dos resíduos da linearidade por meio do cálculo de regressão linear referente ao método Alves (2010) com metanol.



Fonte: Autoria própria.

No método ajustado, contendo HCl 1M, foi possível determinar o coeficiente de correlação $r = 0,99963$ e o coeficiente de determinação $r^2 = 0,99930$, confirmando que há uma correlação linear entre a absorbância e a concentração das amostras, como mostrado na Figura 39.

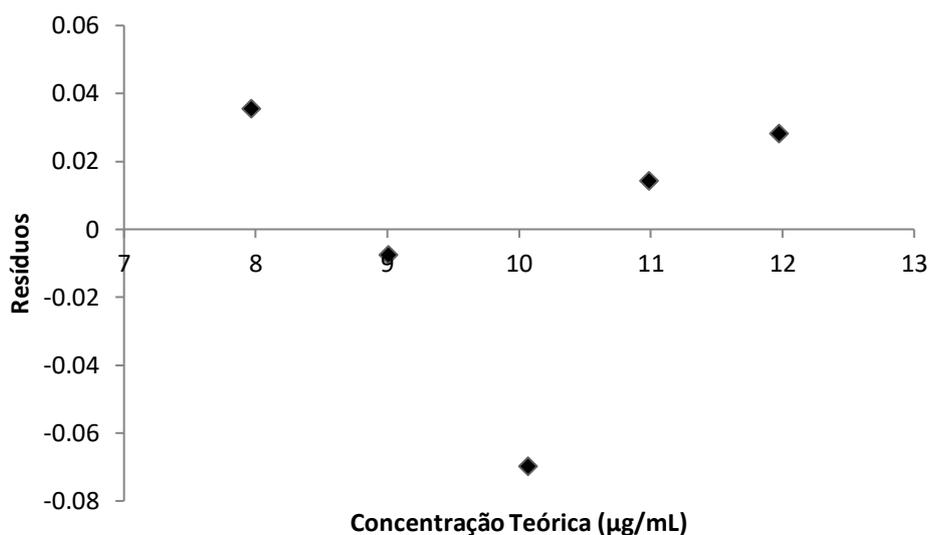
Figura 39 – Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade referente ao método ajustado (com HCl 1M) com metanol.



Fonte: Autoria própria.

O cálculo de resíduos da linearidade do método ajustado também apresentou resultados satisfatórios, visto que, os resíduos foram distribuídos em torno do zero, representando uma dispersão aleatória e sem tendência, como mostrado na Figura 40.

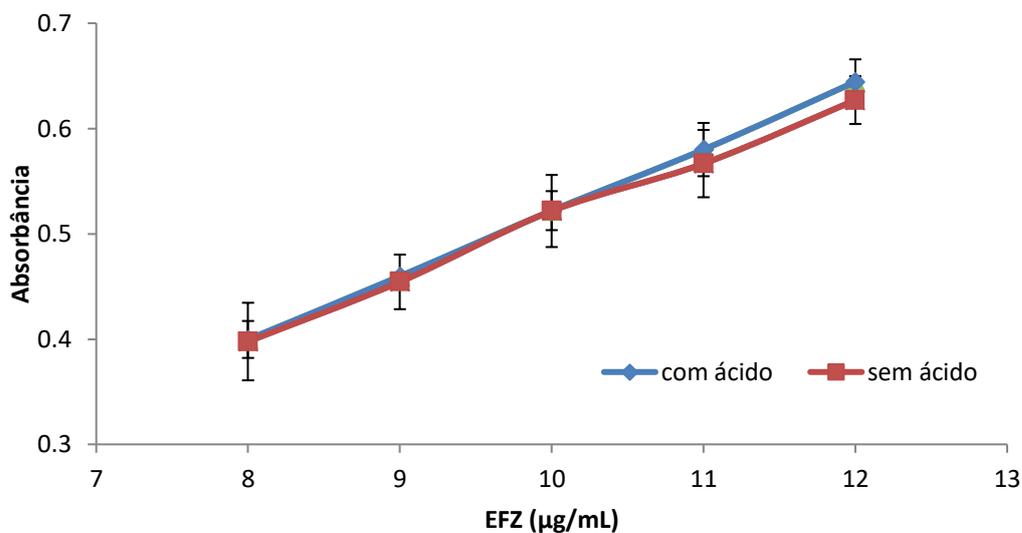
Figura 40 – Gráfico dos resíduos da linearidade por meio do cálculo de regressão linear referente ao método ajustado com metanol.



Fonte: Autoria própria.

5.4.2.2.2 Efeito Matriz

Por meio do resultado das inclinações do método de Alves (2010) e do método ajustado (com HCl 1M e ZIF-8) pôde-se obter o resultado do efeito matriz, onde foi obtido um valor próximo de 1 (1,067717), resultado este, considerado satisfatório em relação ao paralelismo das retas das duas curvas, indicando ausência de interferência dos constituintes da matriz. Ou seja, satisfeita as premissas e confirmada à linearidade do analito em matriz. Na Figura 41 pode-se observar o paralelismo entre as retas das duas curvas.

Figura 41 – Paralelismo entre as retas das curvas com metanol no efeito matriz.

Fonte: Autoria própria.

5.4.2.2.3 Robustez

A robustez foi dada por meio da análise em diferentes concentrações do fármaco (concentração baixa, média e alta da curva) sem e com adição de HCl. Os resultados da robustez foram expressos pela Equação 3 e podem ser verificados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da robustez do método com metanol por meio da variação intencional de pH com HCl 1M.

Robustez					
Método	[] Teórica de EFZ (µg/mL⁻¹)	[] Calculada de EFZ (Média)	DP	DPR (Média)	% de Recuperação
Método Alves (2010)	8	8,077	0,007	1,893	100,9656
Método Alves (2010)	10	10,236	0,008	1,741	102,3662
Método Alves (2010)	12	12,365	0,005	0,900	103,0464
Método Ajustado	8	8,084	0,006	0,519	101,0576
Método Ajustado	10	10,209	0,015	0,881	102,0929
Método Ajustado	12	12,302	0,013	1,290	102,518

Fonte: Autoria própria.

De acordo com o artigo 61 da RDC 166/17 da ANVISA, os resultados da robustez devem apresentar capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Como visto nos DPR das amostras contendo HCl, estas possuem baixa variabilidade intrínseca. Em ambos os métodos encontra-se um % de recuperação próximo de 100% nas amostras em geral, viabilizando a revalidação do método, visto que a RDC 166 não determina valores para os resultados. Vale ressaltar que o método mostrou-se linear, como demonstrado anteriormente.

5.4.2.2.4 Precisão (Repetibilidade)

A repetibilidade foi realizada apenas com o método contendo HCl, em sextuplicata e os resultados encontram-se expostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da repetibilidade do método com metanol.

Repetibilidade									
Amostras	1	2	3	4	5	6	Média	DP	DPR
									(%)
Absorbância	0,506	0,517	0,499	0,535	0,541	0,560	0,5263	0,0231	4,3915

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados expostos na Tabela 8 pode-se concluir que o método apresenta uma boa repetibilidade visto que produz um resultado com baixo valor de DPR.

5.4.2.2.5 Exatidão

A exatidão foi realizada por meio da análise que contemplou o intervalo linear do método analítico utilizando diferentes concentrações do fármaco (concentração baixa, média e alta da curva) sem e com adição de HCl. Os resultados da exatidão foram expressos pela Equação 3, podendo ser analisados na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados da exatidão do método com metanol.

Método	Exatidão				
	[] Teórica de EFZ ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	[] Calculada de EFZ (Média)	DP	DPR (Média)	% de Recuperação
Método Alves (2010)	8	8,113	0,004	1,238	101,4218
Método Alves (2010)	10	10,145	0,005	0,113	101,4538
Método Alves (2010)	12	12,201	0,002	0,404	101,6778
Método Ajustado	8	8,078	0,002	0,500	100,9781
Método Ajustado	10	10,107	0,003	0,603	101,0751
Método Ajustado	12	12,219	0,005	0,902	101,8289

Fonte: Autoria própria.

Quando comparado com a concentração teórica os resultados obtidos se mostraram próximos do valor de concentração conhecido, assim como valores de DPR baixo e um % de recuperação próximo a 100%. Sendo assim, de acordo com a RDC 166/17 da ANVISA o método define-se como exato, corroborando com todos os parâmetros realizados anteriormente.

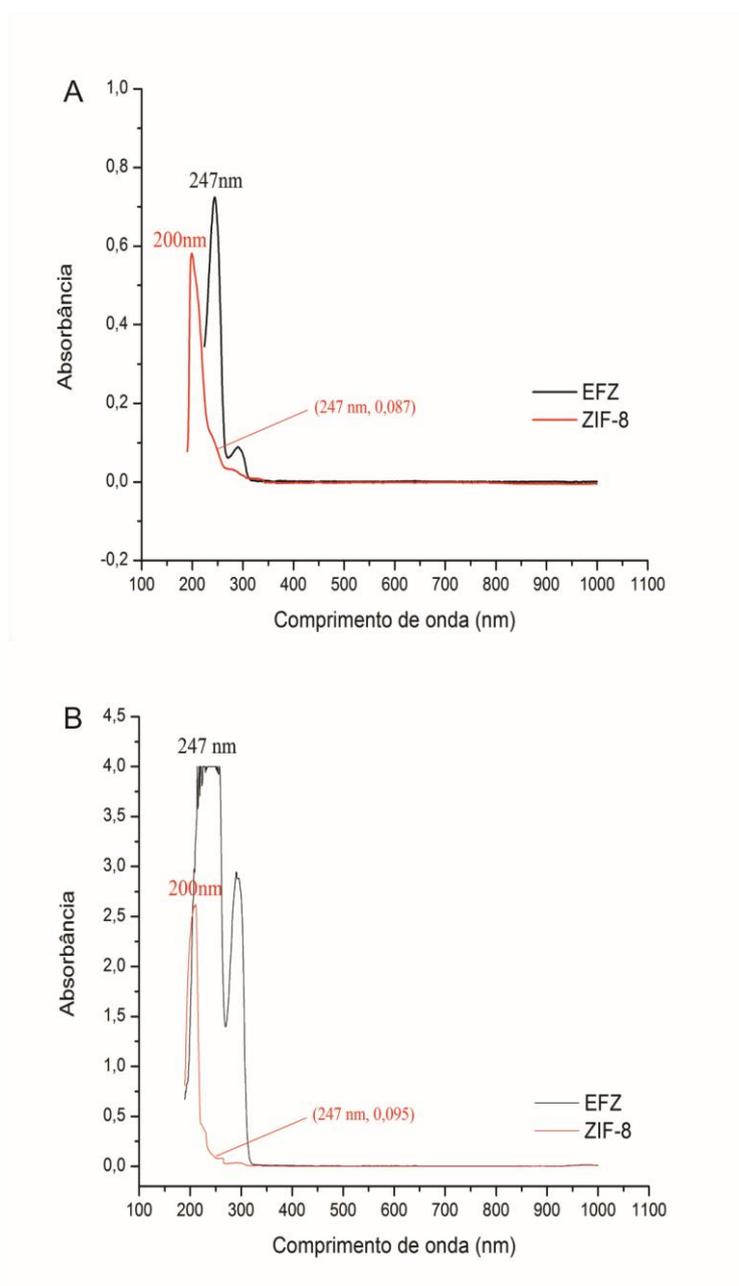
5.4.2.2.6 Seletividade

Com o objetivo de avaliar se o método é seletivo para a substância química de referência caracterizada, foram obtidos os espectros de absorção na região do ultravioleta visível (UV-Vis), por varredura, do EFZ e da ZIF-8, tanto para o método de Alves (2010) (Figura 42.A), quanto para o método ajustado com metanol (Figura 42.B).

De acordo com a Figura 42, os espectros do UV-Vis assim como na seletividade utilizando etanol mostram que o uso do HCl no método ajustado quando comparado ao método de Alves (2010) não interfere no comprimento de onda utilizado para leitura do fármaco (247 nm), não sendo observado também a sobreposição dos picos correspondentes ao EFZ e a ZIF-8. O que demonstra que a leitura da matriz não ocorre no mesmo ponto em que

há máxima absorção do EFZ. Não interferindo, portanto, de forma quantitativa na leitura do fármaco.

Figura 42 – Espectro de absorção na região do UV-Vis do parâmetro de seletividade referente ao método com metanol: A) Alves (2010) e B) Ajustado.



Fonte: Autoria própria.

5.4.3 Doseamento por UV-Visível do EFZ nos Sistemas e Misturas Físicas

Com base nos dados de concentrações obtidos por meio da curva analítica proposta, pôde-se dosear o percentual de EFZ que de fato estava contido nos sistemas e misturas físicas. Tomando por base as concentrações teóricas do IFA a partir do que foi inserido no ato da obtenção dos sistemas e misturas físicas, os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 – Doseamento do EFZ por espectrofotometria.

Amostra	Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Calculada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% de EFZ nos sistemas
MF 1:1	12	11,778	85,59
MF 3:1	10	8,860	69,22
EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1)	12	11,835	57,34
EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1)	10	8,975	70,11

Fonte: Autoria própria.

O doseamento revelou a concentração exata do fármaco contido nos diferentes sistemas e MFs, possibilitando assim o andamento dos estudos de dissolução, por meio da pesagem do material com a quantidade de EFZ conhecida.

5.4.4 Estudo dos perfis de dissolução *in vitro*

Estão descritos a seguir os resultados obtidos e sua discussão no que tange os perfis de dissolução do EFZ, MFs e Sistemas.

5.4.4.1 Tratamento de dados

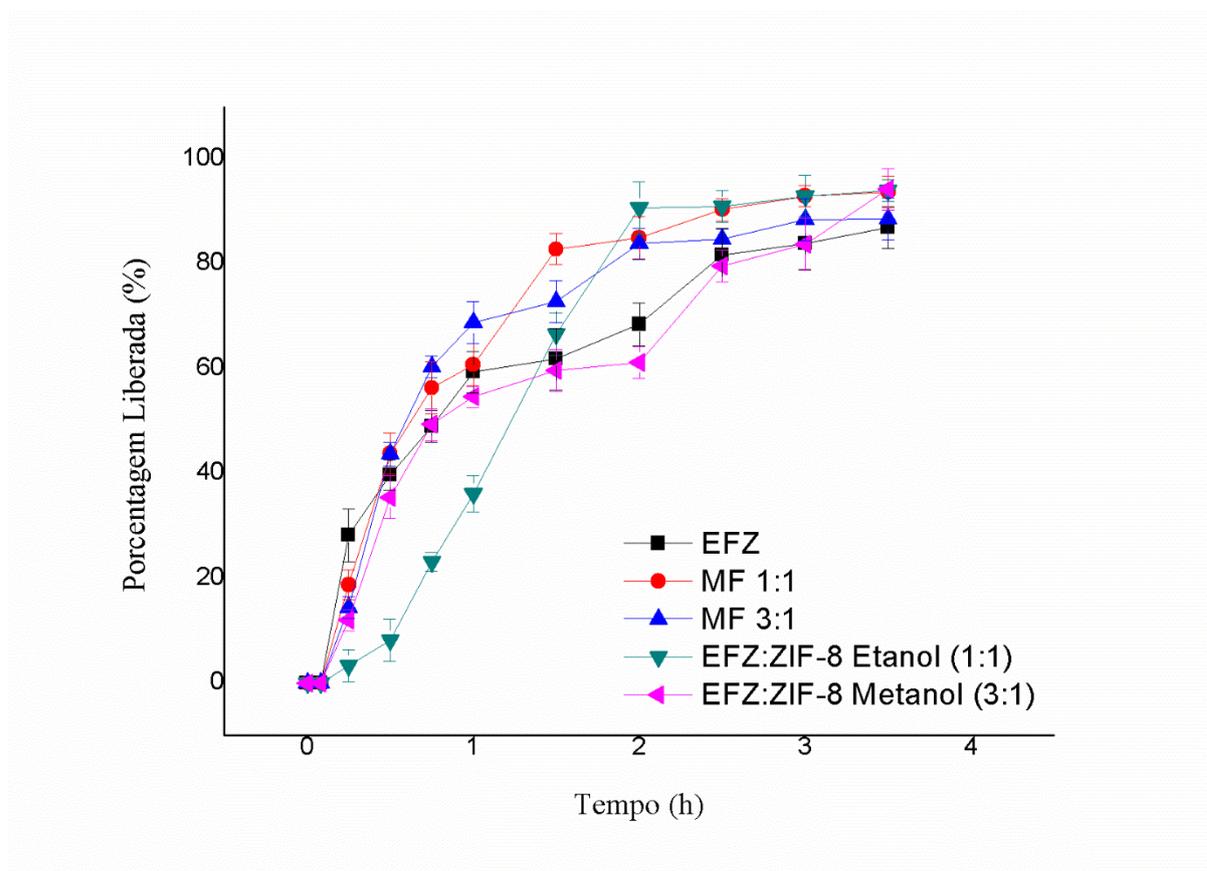
Os estudos de dissolução são uma importante ferramenta de controle de qualidade nas várias etapas dos processos de desenvolvimento de fármacos. Estes estudos são realizados geralmente em condições *sink*, que preconiza a utilização de um volume do meio de

dissolução com no mínimo três vezes o volume de saturação (GRADY et al., 2018; TOMASI, 2013).

Nesse estudo, as amostras foram avaliadas em diferentes pHs visando identificar o comportamento de liberação do EFZ pela ZIF-8, devido a característica da ZIF-8 ser rompida em pHs ácidos. Os perfis de dissolução do EFZ isolado, das MFs e dos sistemas EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) e EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1), sob condições *sink* estão exibidos nas Figuras 43 (pH 1,2), 44 (pH 4,5) e 45 (pH 6,8). A Figura 46 exibe a comparação dos perfis de dissolução do sistema obtido em etanol nos diferentes pH's.

A Figura 43 demonstra que em pH 1,2 o EFZ isolado possui baixa porcentagem de fármaco liberado quando comparado com as misturas físicas, enquanto estas atingem uma liberação em torno de 85% em 2 horas, o efavirenz libera apenas 65%. O sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) apresentou liberação do fármaco lenta até 1h de ensaio, após esse período o fármaco é liberado rapidamente atingindo em 2 horas uma porcentagem de 90%. Diferente do sistema EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1) que apresentou comportamento bastante semelhante ao fármaco isolado até as 3h, demonstrando uma liberação maior que a do efavirenz em 3,5h (93%). Segundo Zhuang e colaboradores (2014), este resultado é proveniente da dissociação das redes de coordenações da ZIF-8 em pH ácido, fazendo com que a rede se desintegre e o fármaco seja liberado rapidamente, por isso o comportamento semelhante entre as amostras.

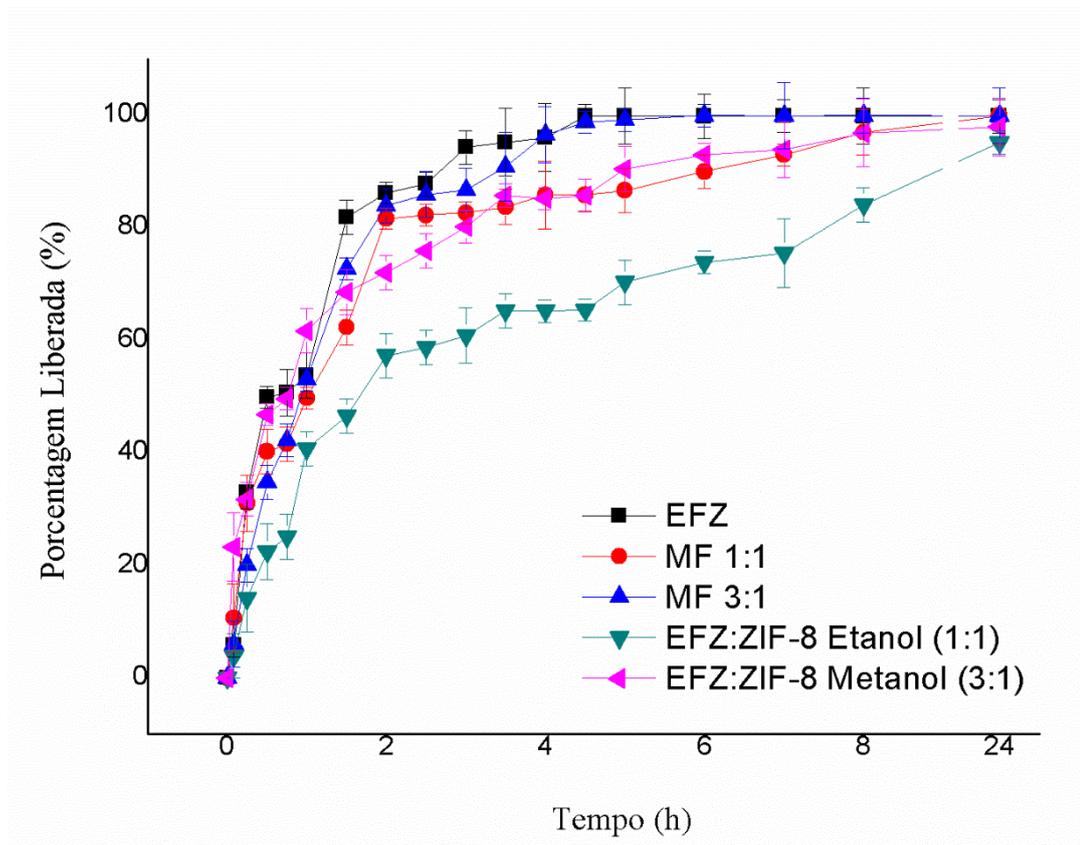
Figura 43 – Perfil de dissolução do EFZ, MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 em pH 1,2.



Fonte: Autoria própria.

Em pH 4,5 (Figura 44), o EFZ mostrou rápida liberação em efeito *burst* na primeira hora de dissolução, chegando a aproximadamente 55% de fármaco liberado e 85% em 2h. A MF 3:1 se comportou de maneira semelhante ao EFZ isolado. Em paralelo, MF 1:1 e o sistema EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1) apresentam perfis parecidos entre si. Estes demonstram que na primeira hora de dissolução, a porcentagem liberada é praticamente a mesma para o EFZ isolado. A partir daí as amostras apresentam liberação gradual a medida que o tempo aumentava. Em relação ao sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1), este mostrou discreta diferença das demais amostras, onde em 1h de ensaio 40% do fármaco já havia dissolvido, entre duas e oito horas foi que o sistema conseguiu modular um pouco a liberação, chegando a 84% em 8h, enquanto as demais amostras haviam liberado em torno de 97% do EFZ, assim como em pH 1,2 essa rápida liberação é decorrente da dissociação da rede organometálica.

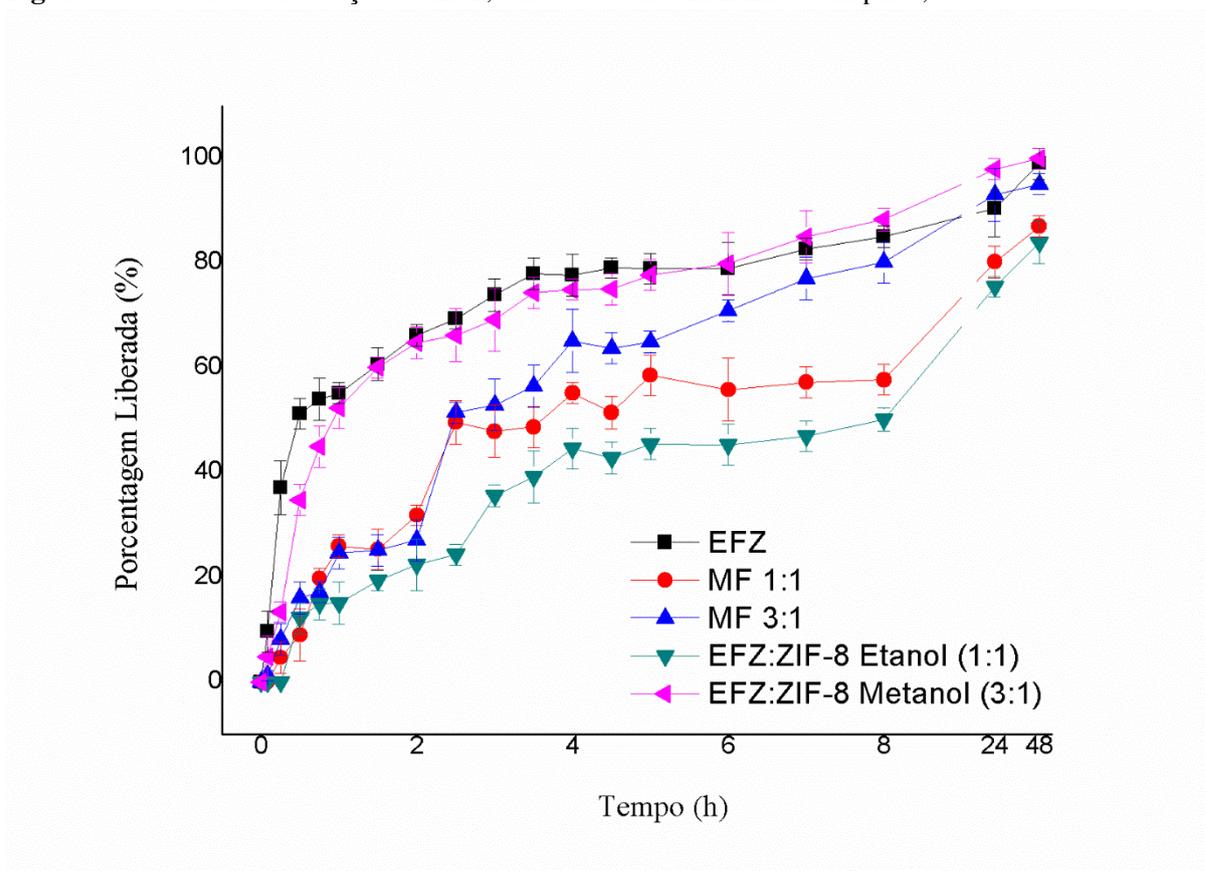
Figura 44 – Perfil de dissolução do EFZ, MFs e Sistema EFZ:ZIF-8 em pH 4,5.



Fonte: Autoria própria.

Em paralelo, nos resultados contidos na Figura 45 verifica-se que em meio com pH 6,8 o sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) atingiu porcentagens de liberação inferior ao EFZ isolado, conseguindo liberar o fármaco de maneira gradual durante o tempo analisado. Nos primeiros 30 minutos de dissolução é possível identificar que o EFZ isolado já começa a obter uma alta taxa de liberação (50%), esse comportamento é explicado pela alta solubilidade do mesmo nesse meio, sendo o comportamento do sistema EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1) bastante semelhante ao fármaco isolado, confirmando assim a fraca adsorção do EFZ a ZIF-8. Nestes resultados também foi visto que as MFs se comportaram com uma liberação gradual a medida que o tempo aumentava. Entretanto, o sistema obtido com solvente etanol modulou a liberação do fármaco de uma maneira mais equilibrada, sem expressivas oscilações de concentração onde, em 8 horas atingiu o ponto de liberação de cerca de 50%, enquanto a maior parte das amostras já haviam liberado 80% ou mais do EFZ, confirmando a obtenção de uma liberação lenta do fármaco a partir do sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) em pH 6,8, resultados semelhantes, porém, com diferentes fármacos carregados, foram evidenciados por Sun e colaboradores (2012).

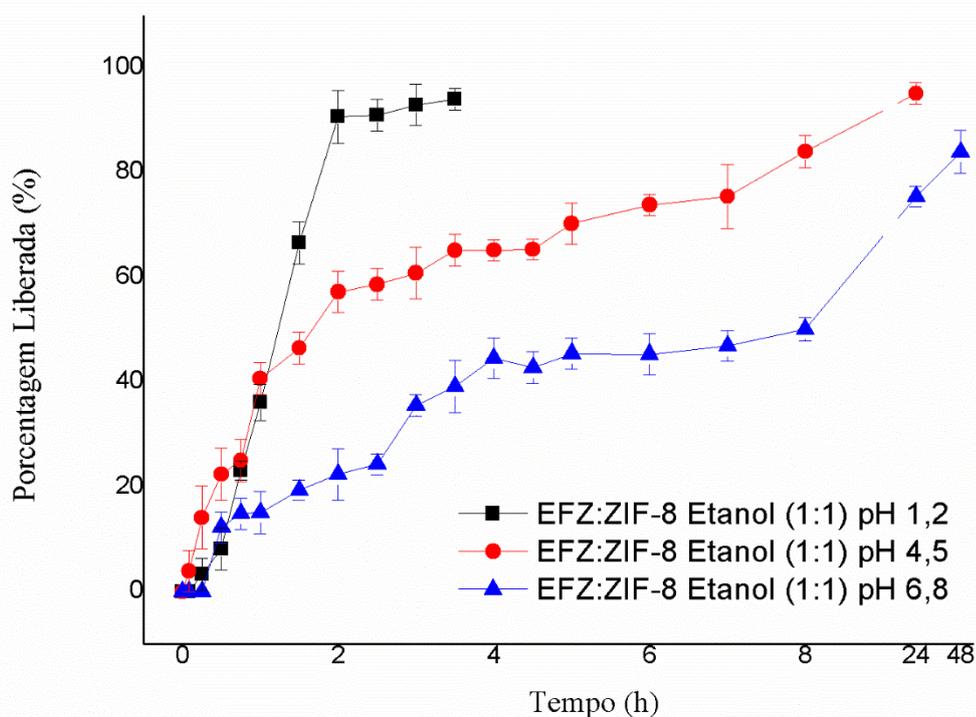
Figura 45 – Perfil de dissolução do EFZ, MFs e Sistema EFZ:ZIF-8 em pH 6,8.



Fonte: Autoria própria.

Sendo assim, ficou claro o melhor desempenho do sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1), os resultados da Figura 46 demonstram que em pH 1,2 a estrutura da ZIF-8 referente ao sistema etanol se rompe rapidamente liberando uma grande quantidade de fármaco em um curto intervalo de tempo. Já em meio com pH 4,5 e 6,8, a liberação de EFZ do sistema etanol se dá de forma controlada, aumentando gradualmente de acordo com os intervalos de tempo, porém em pH 4,5 liberou-se uma porcentagem maior de fármaco enquanto em pH 6,8 o sistema consegue segurar e liberar por mais tempo o EFZ, liberando 85% em 48h confirmando assim a obtenção de um sistema promissor para liberação prolongada, sendo este o obtido em etanol na proporção de 1:1.

Figura 46 – Perfil de dissolução do Sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) em pH 1,2, 4,5 e 6,8.



Fonte: Autoria própria.

Os valores da área sob a curva (AUC) foram calculados e, assim, suas respectivas médias estão representadas nas Tabelas 12, 13 e 14.

De acordo com a Tabela 12 pôde-se verificar que tanto os sistemas quanto as MFs apresentaram valores de AUC ligeiramente baixos quando em comparação com o EFZ isolado nos primeiros 45 minutos. Em seguida, as MFs tiveram os valores próximos ao do fármaco, devido rápida liberação do mesmo, enquanto os sistemas se mantiveram com valores abaixo, sendo que os valores do sistema obtido em metanol permaneceram muito próximos ao EFZ isolado, enquanto o sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) mostrou diferença mais expressiva, porém, mesmo apresentando essa diferença a liberação do fármaco se deu em um curto intervalo de tempo, corroborando com a baixa modulação nesse meio.

Tabela 12 – Valores médios de AUC do EFZ, MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 em pH 1,2.

Tempo (horas)	AUC (min.µL/mL) em pH 1,2				
	EFZ	MF 1:1	MF 3:1	Sistema	Sistema
				EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1)	EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1)
0,08333	0	0	0	0	0
0,25	2,35	1,56	1,20	0,28	1,00
0,5	10,83	9,39	8,63	1,72	6,94
0,75	21,93	21,92	21,81	5,64	17,56
1	35,48	36,57	37,97	13,06	30,57
2	98,40	114,48	112,61	78,11	89,40
3	177,39	204,20	198,09	169,55	165,49

Fonte: Autoria própria.

Os resultados contidos na Tabela 13 demonstram que a AUC do sistema EFZ:ZIF-8 metanol em pH 4,5 foi superior ao do EFZ isolado até a primeira hora, após esse tempo demonstrou valores semelhantes as MFs, com resultados abaixo do fármaco isolado mas próximos do mesmo. Além disso, comparando as MFs, sistema metanol e EFZ com o sistema etanol, foi possível observar que os valores deste último sistema são expressivamente abaixo dos demais, o que corrobora os resultados do perfil de dissolução.

Tabela 13 – Valores médios de AUC do EFZ, MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 em pH 4,5.

Tempo (horas)	AUC (min.µL/mL) em pH 4,5				
	EFZ	MF 1:1	MF 3:1	Sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1)	Sistema EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1)
0,08333	0,24	0,44	0,24	0,16	0,97
0,25	3,47	3,92	2,42	1,68	5,56
0,5	13,84	12,83	9,27	6,26	15,38
0,75	26,41	23,05	18,91	12,20	27,44
1	39,48	34,46	30,82	20,44	41,36
2	115,43	98,47	101,44	68,23	109,11
3	204,45	180,67	187,08	127,14	185,14
4	299,63	264,67	278,35	191,27	269,38
5	398,65	350,71	376,62	257,88	356,19
6	498,65	439,04	476,12	330,00	447,93
7	598,65	530,53	576,12	404,71	541,43
8	698,65	625,53	676,12	484,52	636,93
24	2298,65	2201,53	2276,12	1918,77	2196,93

Fonte: Autoria própria.

Paralelamente, verificou-se que em pH 6,8 (Tabela 14), todas as amostras obtiveram valores de AUC inferiores ao EFZ isolado independente do tempo, evidenciando a modulação da liberação do fármaco. Ainda que mostre resultados satisfatórios de liberação em todas as amostras, o sistema etanol continua apresentado valores bastante reduzidos, confirmando um prolongamento da liberação do EFZ mais intenso para este sistema.

Tabela 14 – Valores médios de AUC do EFZ, MFs e Sistemas EFZ:ZIF-8 em pH 6,8.

Tempo (horas)	AUC (min.µL/mL) em pH 6,8				Sistema	Sistema
	EFZ	MF 1:1	MF 3:1	EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1)	EFZ:ZIF-8 Metanol (3:1)	
0,08333	0,40	0	0,05	0	0,20	
0,25	4,30	0,39	0,84	0	1,73	
0,5	15,36	2,11	3,88	1,53	7,76	
0,75	28,52	5,72	8,05	4,94	17,74	
1	42,17	11,45	13,29	8,70	29,91	
2	102,91	38,58	38,85	27,78	89,27	
3	172,66	83,39	84,61	54,48	155,92	
4	249,59	133,52	142,41	94,15	229,16	
5	328,32	187,72	206,84	138,08	304,87	
6	407,34	244,97	274,81	183,52	383,69	
7	488,17	301,54	348,83	229,69	466,15	
8	572,06	359,05	427,49	278,28	552,86	
24	2030,30	1463,21	1813,13	1284,37	2043,88	
48	4384,50	3470,40	4069,13	3199,11	4419,88	

Fonte: Autoria própria.

5.4.4.2 Modelos cinéticos

Os modelos cinéticos foram aplicados ao sistema que se mostrou promissor para uma liberação prolongada, sendo os resultados corroborados nos ensaios anteriores - EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1), estes modelos testados tiveram números de parâmetros diferentes, o que pode aumentar o valor de R^2 devido a sobreajustes que ocorrem. Enquanto o $R^2_{ajustado}$ tende a diminuir esse sobreajuste sendo, portanto, o coeficiente utilizado para a escolha do melhor modelo (ZHANG et al., 2010).

Para a dissolução em pH 1,2 (Tabela 15) os melhores modelos cinéticos para o sistema foram: Korsmeyer-Peppas > Peppas-Sahlin > Higuchi > Primeira Ordem > Ordem zero. No pH 4,5 seguiu a ordem: Peppas-Sahlin > Higuchi > Primeira Ordem > Ordem zero > Korsmeyer-Peppas. Já em pH 6,8 o sistema obedeceu aos modelos cinéticos na seguinte ordem: Peppas-Sahlin > Higuchi > Korsmeyer-Peppas > Primeira Ordem > Ordem zero.

Tabela 15 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando Sistemas EFZ:ZIF-8 em diferentes pH's.

Modelos	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
	R^2	$R^2_{ajustado}$	R^2	$R^2_{ajustado}$	R^2	$R^2_{ajustado}$
Ordem zero	0,8935	0,8722	0,9554	0,9465	0,8595	0,8314
Primeira ordem	0,9373	0,9248	0,9780	0,9636	0,8973	0,8768
Higuchi	0,9402	0,9282	0,9747	0,9696	0,9518	0,9422
Korsmeyer-Peppas	0,9867	0,9834	0,9315	0,9144	0,9460	0,9325
Peppas-Sahlin	0,9715	0,9525	0,9785	0,9742	0,9718	0,9530

Fonte: Autoria própria.

Os modelos de Peppas-Sahlin e Korsmeyer-Peppas foram, então, os escolhidos segundo o $R^2_{ajustado}$, confirmando mais uma vez a liberação controlada desse sistema, como visto também no trabalho utilizando o antichagásico benznidazol de Ferraz (2017), uma vez que estes modelos se adequam a esse tipo de liberação, as constantes K_1 e K_2 (Tabela 16) do modelo de Peppas-Sahlin representam, respectivamente, a influência da difusão e do relaxamento do carreador na liberação do fármaco. Os valores maiores encontrados para pH 1,2 e 4,5 foram o de K_1 significando a maior influência e atuação da difusão, enquanto em pH 6,8 o valor maior foi o de K_2 indicando a liberação do fármaco pelo relaxamento da rede, por isso o prolongamento da liberação nesse meio (PEPPAS e SAHLIN, 1989).

Tabela 16 – Constantes e coeficientes de liberação obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando Sistemas EFZ:ZIF-8 em diferentes pH's .

Modelos	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
	K_1	K_2	K_1	K_2	K_1	K_2
Peppas-Sahlin	1,7735	-1,1610	0,0064	0,0002	1,2402	4,4212
	n		n		n	
Korsmeyer-Peppas	1,72		0,60		0,50	

Fonte: Autoria própria.

O outro modelo escolhido e que é utilizado para corroborar e complementar os resultados obtidos por Peppas-Sahlin é o de Korsmeyer-Peppas onde calcula-se o n (coeficiente de liberação) por meio de sua equação, utilizando-o para interpretar e descrever a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte de

fármaco que obedece as leis de Fick ou transporte Fickiano, e outro em consequência dos fenômenos de inchamento/relaxamento. Nas condições de dissolução estudadas, o n (obtido da equação de regressão linear) está acima de 1 em pH 1,2 (Tabela 16), classificando-se como caso II de transporte, onde a taxa de difusão é superior a de relaxamento, em pH 4,5 está entre 0,5 e 1 ocorrendo quando os tempos da difusão e da taxa de relaxamento das cadeias são comparáveis, já em pH 6,8 o valor de n é igual a 0,5 onde a taxa de difusão é bem mais lenta que a de relaxamento, o que confirma os resultados obtidos pelo modelo de Peppas-Sahlin (COELHO, 2007; KORSMEYER et al., 1983).

Observando os resultados obtidos pode-se evidenciar que o fármaco é liberado ligeiramente em ambiente acidificado devido a rápida difusão e a dissociação da rede de coordenação. Em contrapartida, em pH mais elevado (pH 6,8) é possível observar uma menor liberação, visto que a mesma nesse ambiente é mais lenta, onde o fármaco é liberado aos poucos por relaxamento (respiração) da rede organometálica. Consequentemente, a incorporação do EFZ à ZIF-8 pode, de fato, prolongar a liberação do fármaco, aumentando a duração da ação e reduzindo a incidência de efeitos colaterais sistêmicos do mesmo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude de todos os argumentos demonstrados no presente trabalho, foi possível inferir que por meio de um método de obtenção *ex situ* variando proporções molares, tempos de agitação e solventes de solubilização, foi possível selecionar e obter sistemas EFZ:ZIF-8 com boa porcentagem de incorporação, tendo o sistema obtido com solvente etanol na proporção de 1:1 EI%=15% e o sistema obtido em metanol na proporção de 3:1 EI%=27%;

O método de quantificação do EFZ, revalidado de acordo com a RDC 166 de 2017 da ANVISA demonstrou-se linear, preciso, exato, robusto e seletivo para os parâmetros avaliados. Além disso, comprovado também pelo efeito matriz, a metodologia se mostrou adequada para substituir o método já validado, pois não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos quando com a adição do ácido.

Por meio da técnica de DRX observou-se que os sistemas e MFs tiveram significativa redução de cristalinidade, devido a intensa redução do pico principal e ausência dos demais picos relacionados ao fármaco, principalmente no sistema obtido em etanol, corroborando com a formação do sistema;

Na análise da microscopia eletrônica de varredura, foi visualizada ainda a cristalinidade, entretanto, com algumas alterações, e a interação física de adsorção entre o fármaco e a ZIF-8 foi evidenciada;

Ainda foi possível por meio das análises de TG e DSC avaliar a influência que a ZIF-8 exerce no comportamento térmico do EFZ, caracterizadas pelo seu comportamento térmico. Embora tenha sido notada uma discreta antecipação no evento de fusão dos sistemas quando comparados com o fármaco isolado, não houve alterações na temperatura de degradação dos mesmos, além do que, os sistemas apresentaram picos de fusão reduzidos quando comparados com suas misturas físicas e EFZ isolado, onde os picos de fusão estiveram presentes de maneira intensa;

Com o docking molecular foi possível corroborar os resultados obtidos nas caracterizações, onde realmente houve a obtenção dos sistemas por meio da incorporação do fármaco a rede organometálica da ZIF-8;

O ensaio de dissolução *in vitro*, sob condições sink demonstrou que, em pH ácido, a estrutura da ZIF-8 se rompe rapidamente liberando uma grande quantidade de fármaco em um curto intervalo de tempo. Já em meio com pH 6,8, a liberação de EFZ do sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1) ocorreu de forma controlada, aumentando gradualmente de acordo com os intervalos de tempo, liberando 85% do fármaco em 48h no pH 6,8. Além de uma liberação

prolongada, por meio do controle dessa liberação diminuição das reações adversas causadas pelo fármaco e uma maior adesão do paciente ao tratamento pode ser alcançada.

Por meio do ajuste dos perfis de dissolução a alguns modelos cinéticos, foi possível confirmar o comportamento dos sistemas nos diferentes pH's onde o modelo que melhor se adequou foi o de Peppas-Sahlin e Korsmeyer-Peppas, modelos aos quais estão associados a liberação modificada de fármacos, por meio da difusão e relaxamento, neste caso das redes organometálicas. Fica notório que, então, teve-se a obtenção de um sistema promissor para uma liberação prolongada do fármaco, possibilitando o desenvolvimento de um medicamento inovador para AIDS.

6.1 PERSPECTIVAS

- Realizar ensaio de biodisponibilidade para que se possa identificar se houve uma melhora da mesma após obtenção do sistema;
- Desenvolver formulação farmacêutica a partir do sistema EFZ:ZIF-8 Etanol (1:1), seguido dos controles de qualidade pertinentes;
- Realizar estudos de estabilidade convencional de acordo com a RDC n°318 de 2019 da ANVISA.

REFERÊNCIAS

AHMED, K. **Lamellar silicates containing aluminum applied for removal of dyes, pesticide and metals, including controlled drug release**. 2015. 144f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de Campinas, Campinas, 2015.

ALVES, A. I. et al. Revalidação do método titulométrico para determinação do ácido ascórbico. **Revista Ceres Viçosa**, v. 61, n. 2, p. 155-161, 2014.

ALVES, I. B. V. **Metal-Organic Frameworks (MOFs): alternativa inteligente para carreamento de fármacos anti-inflamatório e antineoplásico**. 2013. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências de Materiais) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

ALVES, L. D. S. et al. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-VIS. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

ALVES, L. D. S. **Desenvolvimento de dispersões sólidas binárias visando o incremento da solubilidade aquosa do antirretroviral efavirenz**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

AMARANTE, S. F. Síntese e Caracterização de redes metalorgânicas, ZIF-8 e ZIF-67. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, p. 1-9, 2016.

AMORIM, S. R.; KLIER, A. H.; ANGELIS, L. H. Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectrofotometria no infravermelho. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 03, p. 234-242, 2013.

ARONSON, H. Correction factor for dissolution profile calculations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p. 1190, 1993.

BAIRD, J. A.; TAYLOR, L. S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 5, p. 396–421, 2012.

BASTOS, M. M. et al. Efavirenz a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of first-generation: Approaches based on its medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 455-465, 2016.

BEDOR, D. C. G. **Avaliação Biofarmacotécnica do Efavirenz um fármaco classe II (SCB)**. 2011. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

BÉTHUNE, M. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989–2009). **Antiviral Research**, v. 85, p. 75–90, 2010.

BIDONE, J. et al. Preparation and characterization of ibuprofen-loaded microspheres consisting of poly(3-hydroxybutyrate) and methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly (D,Llactide) blends or poly(3-hydroxybutyrate) and gelatin composites for controlled drug release. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 588–593, 2009.

BLACHNIK, R.; SIETHOFF, C. Thermoanalytical and X-ray study of some alkylammonium tetrachlorozincates. **Thermochimica Acta**, v. 278, p. 39-47, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente transmissíveis e AIDS. **Aids: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento**. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA – IN nº 4, DE 3 DE AGOSTO DE 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) e da outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2011**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 18 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Cuidado integral as pessoas que vivem com HIV pela atenção básica, manual para equipe multiprofissional**. Brasília, DF, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução N° 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 18 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de medicamentos de Referência**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15/02/2018.

BROWN, C. K. et al. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, v. 1, p. 56–65, 2004.

CALVO, N.L. et al. Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 538-564, 2018.

CARBINATTO, F. M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. 2010. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CARMIGNAN, F.; BIDONE, J.; LEMOS-SENNA, E. Emprego dos polihidroxicanoatos em sistemas de liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 131-143, 2008.

CAVALCANTE, G. I. T. et al. HIV antiretroviral drug Efavirenz induces anxiety-like and depression-like behavior in rats: evaluation of neurotransmitter alterations in the striatum. **European Journal of Pharmacology**, v. 799, p. 7-15, 2017.

CETENE. Disponível em:< <http://www.cetene.gov.br/wp-content/uploads/2015/09/INFORMA%C3%87%C3%95ES-SOBRE-EQUIPAMENTOS.pdf>>. Acessado em: 17 de setembro de 2017.

CHADHA, R. et al. Effect of hydrophilic polymer on complexing efficiency of cyclodextrins towards efavirenz-characterization and thermodynamic parameters. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 72, p. 275-287, 2012.

CHAGAS, J. O.; CORRÊA, S.; ALMEIDA, A. M. Uso de sistema ternário homogêneo de solventes e espectrofotometria UV-VIS no desenvolvimento de método para a determinação de cobre em amostras de açúcar. **Conexão ci.: r. cient.**, v. 9, n. 1, p. 59-73, 2014.

CHOWDHURI, Angshuman Ray et al. Synthesis of multifunctional upconversion NMOFs for targeted antitumor drug delivery and imaging in triple negative breast cancer cells. **Chemical Engineering Journal**, v. 319, p. 200-211, 2017.

COSTA, A. K. C da. **Revalidação de método analítico para psoraleno e bergapteno, em HPLC-PDA, aplicado a amostras microdialisadas.** 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

COSTA, C. C. P. et al. O Efavirenz: Relação Estrutura-Atividade e Métodos de Síntese. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1347-1370, 2015.

COSTA, S. P. M. et al. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**, v. 562, p. 29–34, 2013.

COSTA, S. P. S. **Obtenção de sistemas poliméricos microparticulados para o aumento da velocidade de dissolução do efavirenz na terapia anti-HIV.** 2016. 152 f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

CUMMINS, N. W. et al. Investigation of Efavirenz Discontinuation in Multi-ethnic Populations of HIV-positive Individuals by Genetic Analysis. **Ebiomedicine**, v. 2, p. 706-712, 2015.

CUNHA, D. P da. **Redes de Coordenação: Novos Sistemas Carreadores de Fármacos.** 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

DE BROGLIE, L. Sur la fréquence propre de l'électron. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris**, v. 180, p. 498-500, 1925.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostra**. Rio Grande do Sul: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DE MELO, C. M. et al. A compatibility study of the prototype epiisopiloturine and pharmaceutical excipients aiming at the attainment of solid pharmaceutical forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, p. 689–697, 2015.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análises térmicas**. São Carlos, 2012. 40 p.

ELDER, D. P.; KUENTZ, M.; HOLM, R. Pharmaceutical excipients — quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 88-99, 2016.

FANDARUFF, C. et al. Correlation between microstructure and bioequivalence in Anti-HIV Drug Efavirenz. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 91, p. 52-58, 2016.

FANG, M. et al. ZIF-8/PDMS mixed matrix membranes for propane/nitrogen mixture separation: Experimental result and permeation model validation. **Journal of Membrane Science**, v. 474, p. 103–113, 2015.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system**. Rockville: 2000. 13p.

FELICZAK-GUZYK, A. Hierarchical zeolites: synthesis and catalytic properties. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 259, p. 33-45, 2018.

FERRAZ, L. R. M. **Desenvolvimento e avaliação da liberação in vitro de Drug Delivery System pH-dependente à base de benznidazol e ZIF-8 visando a obtenção de uma terapia alternativa para a doença de Chagas**. 2017. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

GADIPELLI, S; GUO, Zheng Xiao. Tuning of ZIF-Derived Carbon with High Activity, Nitrogen Functionality, and Yield – A Case for Superior CO₂ Capture. *Chemsuschem*, v. 8, p. 2123-2132, 2015.

GIL, V. S. B. **Sistema de Liberação Controlada Baseado em Vesículas de poli(estireno-b-óxido de etileno) Carregadas com Adapaleno Inseridas em Filmes Poliméricos**. 2017. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

GOMES, D. S.; TIRONI, S. M. T.; MARTINEZ, A. C. **Uso da microscopia eletrônica de varredura na medicina veterinária**. 2017. Trabalho apresentado no II simpósio de produção sustentável e saúde animal, Paraná, 2017.

GOMES, T. A. **Obtenção e caracterização de dispersões dólidas para o incremento da solubilidade do Efavirenz na terapia anti-HIV**. 2014. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

GRADY, H. Industry's View on Using Quality Control, Biorelevant and Clinically Relevant Dissolution Tests for Pharmaceutical Development, Registration and Commercialization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 107, p. 34-41, 2018.

GROOM, C. R. et al. The Cambridge structural database. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, v. 72, n. 2, p. 171–179, 2016.

HAN, Z.; SHI, W.; CHANG, P. Synthetic strategies for chiral metal-organic frameworks. *Chinese Chemical Letters*, v. 29, n. 6, p. 819-822, 2017.

HARI, B. N. V. et al. Engineered polymeric nanoparticles of Efavirenz: Dissolution enhancement through particle size reduction. *Chemical Engineering Science*, v. 155, p. 366-375, 2016.

HE, L. et al. Carbon nanodots@zeolitic imidazolate framework-8 nanoparticles for simultaneous pH-responsive drug delivery and fluorescence imaging. *Cryst. Eng. Comm.*, v. 16, n. 16, p. 3259, 2014.

HERTOG, S.; SAWYER, C. Mortality and the HIV/AIDS Epidemic. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**, v. 2, p. 834-843, 2015.

HOFFMANN, C. J.; GALLANT, J. E. HIV and AIDS. **ACP Medicine**, p. 1-33, 2007.

HORCAJADA, P. et al. Metal-Organic frameworks as Efficient Materials of drug Delivery. **Angewandte Chemie**, v. 118, p. 6120–6124, 2006.

HU, X. et al. One-step synthesis of nanostructured mesoporous ZIF-8/silica composites. **Microporous and mesoporous materials**, v. 219, p. 311-316, 2016.

HUEY, R. et al. Software News and Update A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. 2007.

IONASHIRO, M. **Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**. Araraquara: GIZ Editora, 2004. 96 p.

JANSEN, C. A.; BAARLE, D.; MIEDEMA, F. HIV-specific CD4⁺ T cells and viremia: who's in control. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 120-124, 2006.

KAUR, H. et al. Synthesis and characterization of ZIF-8 nanoparticles for controlled release of 6-mercaptopurine drug. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 106-117, 2017.

KANG, L. et al. Investigating metal-organic framework as a new pseudo-capacitive material for supercapacitors. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, p. 957-961, 2014.

KARAVASILI, C. et al. Comparison of different zeolite framework types as carriers for the oral delivery of the poorly soluble drug indomethacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, p. 76-87, 2017.

KOTZABASAKI, M. et al. OH-functionalization strategy in Metal-Organic Frameworks for drug delivery. **Chemical Physics Letters**, v. 685, p. 114-118, 2017.

LEE, J. Y.; WU, H.; LI, J. An investigation of structural and hydrogen adsorption properties of microporous metal organic framework (MMOF) materials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 10473-10478, 2012.

LEI, J. et al. Design and sensing applications of metal–organic framework composites. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 58, p. 71-78, 2014.

LESTARI, G. **Hydrothermal synthesis of zeolitic imidazolate frameworks-8 (ZIF-8) crystals with controllable size and morphology**. 2012. 64f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia) – Universidade da Arábia Saudita, Thuwal, 2012.

LI, Q. et al. A new (4,8) – connected topological MOF as potential drug delivery. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 55, p. 8-10, 2015.

LIMA, Á. A. N. et al. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benzimidazole solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2443–2451, 2011.

LIMA, B. A. S.; CECILIO, J. F. L.; BONAFÉ, S. M. AIDS: Uma visão geral. In: VIII ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 2013, Maringá. **Anais Eletrônico**. Paraná: Centro Universitário CESUMAR, 2013.

LÓPEZ-LORENTE, A. I.; MIZAIKOF, B. Recent advances on the characterization of nanoparticles using infrared spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 97–106, 2016.

LUO, X. et al. Microwave synthesis of hierarchical porous materials with various structures by controllable desilication and recrystallization. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 262, p. 148-153, 2018.

LYRA, M. A.S. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, p. 784-793, 2007.

MACHADO, C. C. **Validação de metodologia analítica de matéria-prima de meloxicam por espectrofotometria UV-VIS**. 2013. 34f. Monografia (Graduação em Tecnologia em Processos Químicos) – Universidade Federal Tecnológica do Paraná, Paraná, 2013.

MADHAVI, B. B. et al. Dissolution enhancement of efavirenz by solid dispersion and PEGylation techniques. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 1, n. 1, p. 29-34, 2011.

MAGALHÃES, D. F. **Aplicação da espectrofotometria de infravermelho próximo na monitorização de processos farmacêuticos**. 2014. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

MANOSUTHI, W. et al. CYP2B6 haplotype and biological factors responsible for hepatotoxicity in HIV-infected patients receiving efavirenz-based antiretroviral therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 292-296, 2014.

MARQUES, M. M. et al. New solid forms of efavirenz: Synthesis, vibrational spectroscopy and quantum chemical calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1137, p. 476-484, 2017.

MOREIRA, J. R. L. **A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama**. 2013. 33 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

NART, V. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas multiparticulados na forma de mini comprimidos de liberação prolongada visando a administração simultânea dos fármacos captopril e cloridrato de metformina**. 2015. 127 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

NOËL, F. et al. Estudos de bioequivalência para formas de liberação modificada. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 64-66, 2004.

ORDOÑEZ, M. J. C. et al. Molecular sieving realized with ZIF-8/Matrimid® mixed-matrix membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 361, n. 1-2, p. 28-37, 2010.

PAPPORELLO, R. L.; MIRÓ, E. E.; ZAMARO, J. M. Secondary growth of ZIF-8 films on to copper-based foils. Insight into surface interactions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 211, p. 64-72, 2015.

PARK, K. S. et al. Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 27, p. 10186-10191, 2006.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, p. 169–172, 1989.

PEREIRA, T. M. M. **Caracterização térmica (TG/DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual) de hormônios bioidênticos (estriol e estradiol)**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

PINTO, E. C.; CABRAL, L. M.; SOUSA, V. P. Development of a Discriminative Intrinsic Dissolution Method for Efavirenz. **Dissolution Technologies**, 2014.

POMPEU, A. G.; PERARO-NASCIMENTO, A.; ASSUNÇÃO, L. M. D. Comportamento térmico do fármaco e do medicamento contendo cetoprofeno. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v. 2, n. 1, p. 31-37, 2013.

QIU, S.; XUE, M.; ZHU, G. Metal–organic framework membranes: from synthesis to separation application. **Royal Society of Chemistry**, v. 43, p. 6116-6140, 2014.

RADESCA, L.; MAURIN, M.B.; RABEL, S.R.; MOORE, J.R. **Crystalline Efavirenz**. WO 99/64405. Déposito: 10 jun. 1999. Concessão: 16 dez. 1999.

RANA, M. K. et al. Estimation of partial charges in small zeolite imidazolate frameworks from density functional theory calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 6, p. 1575–1582, 2011.

REN, J. et al. Structural defects in metal–organic frameworks (MOFs): Formation, detection and control towards practices of interests. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 349, p. 169-197, 2017.

ROBERTSON, M. I. Regulatory issues with excipients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 273-276, 1999.

RODRIGUES, N. O. L. **Estudo da liberação controlada de fármacos por hidrogéis de PVA/Atapulgita**. 2012. 44 f. Monografia (Graduação em Engenharia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

RODRIGUES, W.C.V.; SOLER, O. Licença compulsória do efavirenz no Brasil em 2007: contextualização. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n. 6, p. 553-559, 2009.

RODRIGUES, M. O. et al. Organic metal structures for drug delivery and environmental remediation: a molecular anchoring approach. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 112, p. 3346-3355, 2012.

ROUSELL, J. L. C.; YAGHI, O. M. Strategies for hydrogen storage in metal-organic frameworks. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 30, p. 4670–4679, 2005.

SANTOS, F. L. A. **Desenvolvimento de comprimido de liberação prolongada de benznidazol**. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SCHEJN, A. et al. Controlling ZIF-8 nano- and microcrystal formation and reactivity through zinc salt variations. **Cryst Eng Comm**, v. 16, p. 4493-4500, 2014.

SHAH, S. et al. Melt extrusion with poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 233-252, 2013.

SHAHID, S. **Polymer-metal organic frameworks (MOFs) mixed matrix membranes for gas separation applications**. 2015. 198 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade de Twente, Enschede, 2015.

SILVA, A. F. A. **Validação de métodos analíticos para controle de qualidade de um medicamento, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Lisboa, 2016.

SILVA, J. A. **Dissolução de comprimidos: estudo comparativo de apresentações genéricas contendo diazepam**. 2013. 53 f. Monografia (Especialização em Tecnologias Industriais Farmacêuticas) – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2013.

SILVA, J. S. et al. Utilização de argilas fibrosas e tubulares para a liberação modificada de fármacos: uma revisão. **Revista Matéria**, v. 21, n. 1, p. 204-212, 2016.

SINGH, B.; KAUR, T.; SINGH, S. Correction of raw dissolution data for loss of drug and volume during sampling. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 4, p.196-199, 1997.

SKRIPNIK, K. K. S. **Investigação e comparação de perfis de dissolução de comprimidos de liberação modificada contendo fármacos com diferentes classificações biofarmacêuticas utilizando diferentes aparatos de dissolução**. 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SOUSA, L. V. et al. Preparation of zeolite P by desilication and recrystallization of zeolites ZSM-22 and ZSM-35. **Materials Letters**, v. 217, p. 259-262, 2018.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of molecular modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173–213, 2007.

STEWART, J. J. P. **MOPAC2016**, Colorado Springs, CO, USA, 2016. Disponível em: <<http://openmopac.net>>

STOLF, D. O. Imagem elementar no microscópio eletrônico de varredura. **Revista Científica tecnológica**, v. 3, n. 2, p. 129-142, 2015.

STORPIRTIS, S. et al. **Ciências Farmacêuticas - Biofarmacotécnica**. Estado: Guanabara Koogan, 2011. 321 p.

SUN, C. et al. Zeolitic imidazolate framework-8 as efficient pH-sensitive drug delivery vehicle. **Dalton Trans.**, v. 41, p. 6906-6909, 2012.

TAO, Y. et al. Mesopore-modified zeolites: preparation, characterization, and applications. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 896-910, 2006.

TATARKO JR, J. **The production, properties and applications of the zinc imidazolate, ZIF-8**. 2015. 168 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de Louisville, 2015.

TEJA, S. B. et al. Drug-excipient behavior in polymeric amorphous solid dispersions. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 4, n. 3, p. 70-94, 2013.

TEXEIRA, C. E. **Sobre a teoria de difração de raios-x em estruturas tridimensionais**. 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas) – Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

The International Pharmaceutical Excipients Council, 1995. Good Manufacturing Practices Guide for Bulk Pharmaceutical Excipients. Wayne, New Jersey, p. 103.

TOMASI, J. W. **Avaliação do perfil de dissolução de um medicamento genérico bioisento**. 2013. 29 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2013.

TOULOUMI, G.; HATZAKIS, A. Natural History of HIV-1 Infection. **Clinics in Dermatology**, v. 18, p. 389-399, 2000.

UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Global AIDS Update. **UNAIDS**, p. 1-13, 2016.

UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Global AIDS UPDATE. **UNAIDS**, [S. l.], v. 1, p. 1–316, 2019.

USP 34. **United States Pharmacopeia and National Formulary** (USP 34-NF 29). [s.l: s.n.]
VASCONCELOS, I. B. et al. Cytotoxicity and slow release of the anti-cancer drug doxorubicin from ZIF-8. **RSC Advances**, v. 2, n. 25, p. 9437, 2012.

VOLBERDING, P. A.; DEEKS, S. G. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. **Lancet**, v. 376, p. 49-62, 2010.

WAGNER, Matthias. **Thermal Analysis in Practice**. Munich: Editora Hanser Publications, 2017. 352 p. ISBN 1569906432

WANG, L. et al. Determination of faujasite-type zeolite thermal conductivity from measurements on porous composites by laser flash method. **Materials Letters**, v. 221, p. 322-325, 2018.

WEBB, P.A.; ORR, C. **Analytical Methods in Fine Particle Technology**. USA: Micromeritics, 1997. 301 p.

WHO. World Health Organization. **Multisource (generic) pharmaceutical products : Guidelines on registration requirements to establish interchangeability**. In : WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Fortirth Report. Geneva, World Health Organization. WHO Technical Report Series, n. 937, Annex 7 : p. 347-390, 2000.

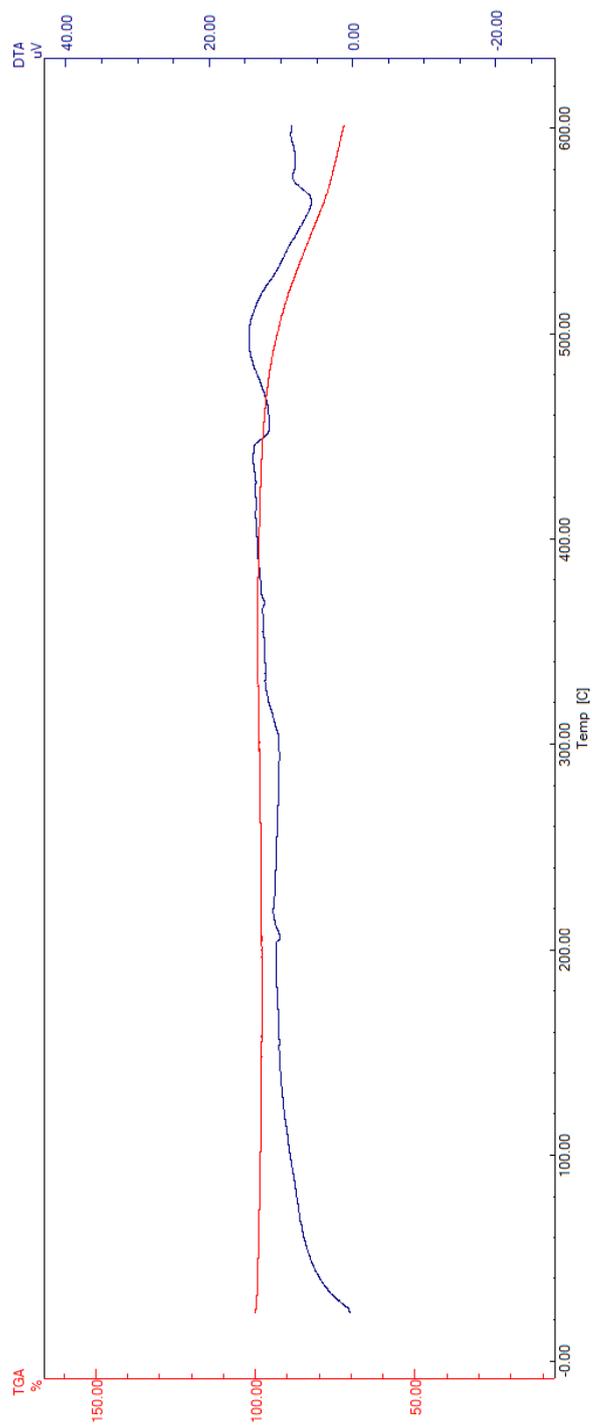
XIONG, P. et al. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Materials design and control synthesis of the layered double hydroxide with the desired basal spacing. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 144, p. 11–16, 2015.

ZHANG, Y. et al. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug

dissolution profiles. **The AAPS journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

ZHUANG, J. et al. Optimized metal-organic-framework nanospheres for drug delivery: Evaluation of small-molecule encapsulation. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, p. 2812–2819, 2014.

APÊNDICE A – CURVAS TG E DTA DA ZIF-8.



APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL ACEITO PELA REVISTA CURRENT HIV RESEARCH, INTITULADO: “PROLONGED RELEASE OF ANTI-RETROVIRAL EFAVIRENZ FROM SYSTEM USING ZIF-8 AS CARRIER”.



Current HIV Research

The International Journal for Rapidly Evolving Research and Original Research in HIV/AIDS

Purchase PDF

Research Article

Prolonged Release of Anti-Retroviral Efavirenz From System Using ZIF-8 as Carrier

(E-pub Ahead of Print)

Author(s): Alinne Élide Gonçalves Alves Tabosa , Aline Silva Ferreira* , Natália Millena da Silva , Débora Dolores Souza da Silva Nascimento , Leslie Raphael de Moura Ferraz , José Yago Rodrigues Silva , Severino Alves Junior , Rosali Maria Ferreira da Silva , Larissa Araújo Rolim , Pedro Jose Rolim-Neto 

Journal Name: Current HIV Research

DOI : 10.2174/1570162X18666200804130734

ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CONTROLE DE QUALIDADE DO EFAVIRENZ.

CRISTALIA PRODS.QUIMS.FARMACEUTICOS LTDA
ROD ITAPIRA LINDOIA S/N, KM 14 Itapira-SP

CERTIFICADO DE ANALISE

N.: 669.702

PRODUTO: EFAVIRENZ MICRONIZADO

Codigo: 10.0394

Nro. RDP: 0

Lote: 0482/15

VALIDO ATE: 09/2017

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
ASPECTO	PO CRISTALINO BRANCO, QUASE BRANCO OU LEVEMENTE ROSADO, INODORO (INTERNA)	PO CRISTALINO BRANCO
SOLUBILIDADE	PRATICAMENTE INSOLUVEL EM AGUA, SOLUVEL EM METANOL E DICLOROMETANO (FB)	DE ACORDO
FAIXA DE FUSAO	ENTRE 136°C E 141°C (FB)	137-140 °C
PODER ROTATORIO ESPECIFICO	ENTRE -86° E -98°, CALCULADO EM RELACAO A BASE DESSECADA (FB)	97 ° (-)
DENSIDADE APARENTE	ENTRE 0,11 g/mL E 0,20 g/mL (INTERNA)	0,18 g/mL
DENSIDADE BATIDA	MAXIMO 0,25 g/mL (INTERNA)	0,23 g/mL
TAMANHO DE PARTICULA	D 0,9: MENOR QUE 20 µm D 0,5: MENOR QUE 6 µm (INTERNA)	10 µm 4 µm
IDENTIFICACAO	ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCAO NO INFRAVERMELHO: O ESPECTRO DE ABSORCAO NO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA CORRESPONDE AO DO PADRAO	POSITIVO
	ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCAO NO ULTRAVIOLETA: O ESPECTRO DE ABSORCAO NO ULTRAVIOLETA DA AMOSTRA EXIBE MAXIMOS EM 206 nm, 247 nm E 293 nm, IDENTICOS AOS OBSERVADOS NO DO PADRAO	POSITIVO
	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA: O TEMPO DE RETENCAO DO PICO PRINCIPAL DA SOLUCAO AMOSTRA CORRESPONDE AO DO PICO PRINCIPAL DO PADRAO (FB)	POSITIVO
	DSC: A AMOSTRA APRESENTA UM PICO DE FUSAO EM CERCA DE 140°C (INTERNA)	POSITIVO
AGUA	MAXIMO 0,5% (FB)	0,1 %
CINZAS SULFATADAS	MAXIMO 0,2% (FB)	0,1 %
METAIS PESADOS	MAXIMO 0,002% (20 ppm) (FB)	< 20 ppm
PERDA POR DESSECACAO	MAXIMO 1,0% (FB)	0,2 %
EXCESSO ENANTIOMERICO	MINIMO 99,0% (INTERNA)	100,0%

CRISTALIA PRODS.QUIMS.FARMACEUTICOS LTDA
 ROD ITAPIRA LINDOIA S/N, KM 14 Itapira-SP

CERTIFICADO DE ANALISE

N.: 669.702		
PRODUTO: EFAVIRENZ MICRONIZADO		
Codigo: 10.0394	Nro. RDP: 0	Lote: 0482/15
VALIDO ATE: 09/2017		
TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
SUBSTANCIAS RELACIONADAS	IMPUREZA B (TRANS-ALQUENO): MAXIMO 0,1% IMPUREZA INDIVIDUAL: MAXIMO 0,1% IMPUREZA TOTAL: MAXIMO 0,5% (INTERNA)	0,0 % 0,0 % 0,1 %
SOLVENTES RESIDUAIS	CICLO-HEXANO: MAXIMO 3880 ppm ETER ETIL-TERC-BUTILICO (ETBE): MAXIMO 1000 ppm (INTERNA) ISOPROPANOL: MAXIMO 5000 ppm (USP/ ICH Q3C)	350 ppm 10 ppm < 5000 ppm
TEOR DE EFAVIRENZ	ENTRE 98,0% E 102,0% CALCULADO EM RELACAO A SUBSTANCIA DESSECADA (FB)	100,0 %

APROVADO [x]

REPROVADO []

OBSERVACOES:

Data: 16/01/2017

Sabrina
 Responsável Contr.Qualidade