



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ESTUDO DA ESTRUTURA CRISTALINA E PROPRIEDADES
DE DISSOLUÇÃO DE FASES SÓLIDAS DE EFAVIRENZ E
SAQUINAVIR, VISANDO A BIORRELEVÂNCIA E SEU
IMPACTO NO TRATAMENTO DO HIV/ AIDS**

Cinira Fandaruff

**Florianópolis
2016**

**ESTUDO DA ESTRUTURA CRISTALINA E PROPRIEDADES
DE DISSOLUÇÃO DE FASES SÓLIDAS DE EFAVIRENZ E
SAQUINAVIR, VISANDO A BIORRELEVÂNCIA E SEU
IMPACTO NO TRATAMENTO DO HIV/ AIDS**

por

Cinira Fandaruff

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Lucia Cuffini.

Florianópolis
2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar sempre, e pelas almas de luz com as quais me fez encontrar, conviver, ser feliz e aprender!

Aos meus pais João e Rita. Eles estiveram sempre comigo. São exemplos de trabalho, dignidade, caráter e honestidade. Eu sou grata!

Ao meu irmão querido! Ele e a Juliana nos deram o maior presente que um irmão pode dar ao outro! A nossa doce e amada Laura!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Segatto pela oportunidade única. Por acreditar que eu poderia fazer um bom trabalho! Obrigada pela orientação, compreensão, amizade e apoio!

À minha orientadora Profa. Dra. Silvia Cuffini por me acompanhar sempre e acreditar em mim! Sou grata pela orientação, amizade e parceria!

Ao Prof. Dr. Helvécio Rocha por acreditar no meu trabalho mesmo eu estando distante. Obrigada pela orientação nos trabalhos, pela dedicação, pela confiança!

À Juliana (Ju) minha irmã de alma! Embora você não esteja aqui para viver esse momento tão feliz comigo, tua presença é sempre sentida!

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade pela convivência e pela oportunidade de aprendizagem! Cada pessoa é única e ensina algo!

À Andrea, uma grande companheira de pesquisa e tão querida amiga!

Aos professores Dr. Carlos E. M. de Campos do Laboratório de Difração de raios X pelo método do Pó; Dr. Adailton J. Bortoluzzi do Laboratório de Química; à equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

À Universidade Federal de Santa Catarina, PGFAR e professores que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

À FIOCRUZ e ao Laboratório Cristália pelo fornecimento dos Insumos Farmacêuticos Ativos.

À CAPES pelo provimento da bolsa de Doutorado no Brasil e no exterior.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare innanzitutto Prof. Dr. Fabrizia Grepioni e Prof. Dr. Dario Braga. Vi sono grata per avermi aiutata a realizzare questo sogno! Mi avete aperto la porta di vostro laboratorio e mi avete aiutato a imparare la Cristallografia e tante cose! Grazie anche alle persone dell' azienda PolyCrystalLine! Grazie per l'opportunità di essere lì!

Grazie Mille a te, Laura! Con la sua intelligenza e dolcezza mi hai insegnato la Cristallografia. Sei stata sempre un' amica carina, sempre attenta, preoccupata per me! Grazie a te e Ale, per avermi portata nella meravigliosa ed indimenticabile Toscana!

A te, Simone, mio caro amico! Grazie per il pranzo sempre insieme! Con affetto mi hai fatto conoscere innumerevoli e deliziosi ristoranti e posti a Bologna! Anche a tua moglie Piera, per avermi ricevuta con gioia nella vostra casa.

A te Floriana, amica mia! Grazie per avermi corretta nel tuo modo divertente! Grazie per avermi aiutata quando avevo bisogno! Ai amici Saverio, Francesco e Monica! A Prof. Dr. Lucia Maini! Ognuno con il suo modo particolare mi ha fatto più felice! Sono grata a voi!

Adi! Grazie per la tua gioia! Sono fortunata di averti incontrato prima di andare via! La tua felicità è contagiosa!

A te Letizia, la migliore e più carina insegnante d'italiano che potessi mai sognare! Grazie per la tua amicizia e gioia! Grazie a te Susy, con la tua dolcezza e allegria mi hai fatto sorridere di più! Grazie a voi, Adele, Virna e Enxhi, siete state sempre molto gentili con me! Grazie alle Suore, ho un bel ricordo di ognuna! Grazie a te Camila, è stata una fortuna conoscere tante posti belli in Italia nella tua amichevole compagnia!

Anton! Tanti ringraziamenti a te! *"...la musica è una barca, attraverso cui ho fatto il viaggio che mi mancava da fare..."*. Mi hai fatto realizzare il più bel viaggio! La mia anima è ancora più soddisfatta! Grazie tanti!

"Porque cada um, independente das habilidades que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do cotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer."

José Saramago.

RESUMO

As propriedades do estado sólido dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) devem ser compreendidas porque estão diretamente relacionadas ao desempenho dos fármacos. Fármacos pouco solúveis apresentam limitações na biodisponibilidade devido à baixa solubilidade e velocidade de dissolução. Segundo a Organização Mundial da Saúde aproximadamente 40% dos medicamentos administrados por via oral pertencem às Classes II e IV (baixa solubilidade; alta e baixa permeabilidade, respectivamente) do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, e, portanto, podem apresentar problemas de biodisponibilidade. O efavirenz (EFV) e o mesilato de saquinavir (SQVM) pertencem a estas classes, são utilizados no tratamento de primeira linha de pacientes portadores do HIV, são fornecidos pelo SUS e por isso são fármacos de interesse da indústria nacional. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a estrutura cristalina, as características do estado sólido e as propriedades de dissolução de fases sólidas de EFV e saquinavir (SQV) visando a biorrelevância e o impacto destes fármacos no tratamento do HIV/AIDS. Para o EFV, uma forma polimórfica (polimorfo II) dezesseis vezes mais solúvel e termodinamicamente mais estável que a utilizada pela indústria, foi obtida. A caracterização de IFAs de EFV, associada aos resultados do teste de bioequivalência, possibilitou a correlação dos resultados obtidos pelo perfil de dissolução e eficiência de dissolução (DE), com a medida de tamanho de domínio cristalino. Tamanhos de domínio cristalino inferiores a 100 nm forneceram os melhores valores de DE. É provável que exista um tamanho de domínio cristalino “crítico”, associado a determinado tamanho de partícula, que assegure a bioequivalência dos IFAs. O SQVM cristaliza no sistema monoclinico e grupo espacial $P2_1$. O estudo do perfil de dissolução, associado à turbidimetria, e à avaliação estrutural do cocrystal de SQMV e lauril sulfato de sódio (LSS) obtido, comprovaram ser este surfactante, inapropriado para a avaliação das propriedades de dissolução do fármaco devido à recristalização do SQVM neste meio. Através da avaliação estrutural do cocrystal, e com o objetivo de explorar as possibilidades de troca de ânion para o SQVM, três novas formas de SQV foram obtidas com a aplicação da Engenharia de Cristais. Todas foram classificadas como isomorfos do SQVM. A forma de cloridrato, com 38% de fármaco dissolvido em 90 minutos, poderia ser utilizada como alternativa ao mesilato (43%).

Palavras-chave: efavirenz; mesilato de saquinavir; polimorfismo; tamanho de cristalita; engenharia de cristais; biorrelevância.

ABSTRACT

The solid state property of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) should be understood because they are directly related to the performance of drugs. Poorly soluble drugs present limitations in bioavailability due to lower solubility and dissolution rate. According to World Health Organization nearly 40% of orally administered drugs belong to Class II (poorly soluble, high permeable) and Class IV (poorly soluble, poorly permeable) in the Biopharmaceutical Classification System and, therefore, they may present problems of bioavailability. Efavirenz (EFV) and saquinavir mesylate (SQVM) are drugs which belong to Class II and IV respectively. They are used in the first-line treatment of HIV patients, they are provided by the Public Health System (SUS-Brazil) and thus, they are interesting drugs to national companies. For so, the aim of this work was to evaluate the crystalline structure, the solid state characteristics and the dissolution properties of EFV and SQVM solid phases targeting the biorelevance and the impact of these drugs in the HIV/ AIDS treatment. A polymorphic form of EFV (polymorph II), sixteen times more soluble and thermodynamically more stable than polymorph I (used by industry to formulate), was obtained. The characterization of EFV APIs, correlated with the results from bioequivalence test, allowed the correlation between data from dissolution tests and dissolution efficiency (DE) with the crystalline domain size measures. Crystalline domain size below 100 nm provided the best values of DE. Probably there is a critical crystalline domain size associated with particular particle size, which ensure the bioequivalence of APIs. Concerning the SQVM, it crystallized in the monoclinic system and space group $P2_1$. The dissolution profile study, associated with both, turbidimetry and structural analysis of the cocrystal of SQVM and sodium lauryl sulphate (SLS) obtained, confirmed that this surfactant is unsuitable for the evaluation of dissolution properties of this drug. The SQVM recrystallized in that medium. Based on the structural analysis of cocrystal and aiming to explore the possibility of anion-exchange for SQVM, three new forms of SQV were obtained by applying the Crystal Engineering. All the three forms were classified as being isomorphous of SQVM. The hydrochloride form which presented 38% of drug dissolved in 90 minutes could be used as an alternative to mesylate (43%).

Keywords: efavirenz; saquinavir mesylate; polymorphism; crystalline domain; crystal engineering; biorelevance.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Ciclo de replicação do HIV e local de ação dos medicamentos antirretrovirais	38
Figura 2: Estrutura química do EFV	46
Figura 3: Estrutura química do SQV e do SQVM.....	47
Figura 4: Representação da cela unitária.....	49
Figura 5: Esquema representativo de possíveis formas sólidas	51
Figura 6: Representação da microestrutura cristalina (cristalita ou domínio cristalino), da partícula e do tamanho de partícula	56

Capítulo 2

Figura 7: Imagens obtidas por SEM para os polimorfos I e II de EFV	75
Figura 8: Comparação entre os padrões de difração de raios X (método do pó) experimentais e calculados para os polimorfos I e II de EFV	76
Figura 9: <i>Synthon A</i> e <i>Synthon C</i> reportados por Mahapatra e colaboradores. O polimorfo I de EFV possui o <i>Synthon A</i> enquanto os polimorfos II e III apresentam o <i>Synthon C</i>	77
Figura 10: Curvas de DSC e TG dos polimorfos I e II de EFV, obtidas em atmosfera de N ₂ (50 mL/ min) e razão de aquecimento de 10°C/ min	78
Figura 11: Comportamento de fusão do polimorfo II de EFV através de HSM. O polimorfo II é estável até 100°C. Apresenta uma transição sólido-sólido a 105°C, e funde a 139°C	78
Figura 12: Avaliação do polimorfo II de EFV através da técnica de XRPD com aquecimento. A amostra foi aquecida a partir de 25 até 134°C e resfriada à temperatura inicial. A seta indica a direção na qual as medidas foram realizadas	79
Figura 13: (A) Espectros de absorção Raman e infravermelho para os polimorfos I e II de EFV. (B) Detalhes de algumas regiões espectrais. As linhas preta e cinza representam os polimorfos I e II, respectivamente	81

Figura 14: Espectros de ¹³ C CP/ MAS e NQS do polimorfo I (a, b) e polimorfo II (c, d) de EFV.....	83
Figura 15: Diagrama de energia livre <i>versus</i> temperatura experimentalmente obtido para os polimorfos I e II de EFV.....	86
Figura 16: Perfil do teste de dissolução intrínseca obtido para os polimorfos I e II de EFV. A condição <i>sink</i> foi assegurada para a avaliação de ambos os polimorfos e por isso os tempos de análise são de 240 e 90 minutos para o polimorfo I e II, respectivamente	88
Figura 17: (A) Perfil de dissolução por dispersão das matérias-primas de EFV em LSS 0,25% <i>versus</i> tempo. (B) Eficiência de dissolução (DE) de seis lotes de EFV. Lote 1 aprovado no teste de bioequivalência e lote 5 reprovado.....	90
Figura 18: (A) XRPD (a), DSC e TG (b) e FT-IR (c) do polimorfo I de EFV. (B) Micrografias obtidas por SEM para o polimorfo I de EFV (lotes 1, 2, 3, 4, 5 e 6).....	91
Figura 19: Eficiência de dissolução (DE) <i>versus</i> tamanho de partícula para seis lotes de EFV. O lote 1 foi aprovado no teste de bioequivalência enquanto o lote 5 foi reprovado. (A) DE <i>versus</i> tamanho médio de partícula d[4, 3]. (B) DE <i>versus</i> tamanho médio de partícula d[3, 2].....	95
Figura 20: (A) Definição esquemática de partícula, <i>cluster</i> e tamanho de domínio cristalino (cristalita). (B) Exemplo da análise dos dados de XRPD por WPPM para o lote 5 de EFV: dados (círculo), modelo (linha) e as diferenças ou resíduo (linha verde abaixo).....	97
Figura 21: Distribuição de tamanho de domínio cristalino para seis lotes de EFV	98
Figura 22: Eficiência de dissolução (DE) <i>versus</i> tamanho de domínio cristalino (<D> (nm))	99
Figura 23: Representação em 3D da relação entre tamanho médio de domínio cristalino, tamanho médio de partícula e eficiência de dissolução (DE).....	100
Figura 24: (A) Gráfico da taxa de dissolução intrínseca (IDR) para polimorfo I (seis lotes) e II de EFV. (B) Representação microestrutural referente a diferentes tamanhos de domínio cristalino e IDR para seis lotes	

de polimorfo I. O lote 1 (cor verde) foi aprovado nos ensaios de bioequivalência enquanto o lote 5 (vermelho) foi reprovado 101

Figura 25: Taxa de dissolução intrínseca (IDR) *versus* tamanho de domínio cristalino ($\langle D \rangle_s$) de seis lotes (1-6). Lote 1 (cor verde) aprovado nos testes de bioequivalência e lote 5 (cor vermelha) reprovado 104

Capítulo 3

Figura 26: Esquema representativo de uma placa de Elisa utilizada na avaliação da turbidez..... 114

Figura 27: Representação ORTEP da molécula de SQVM mostrando o conteúdo presente na unidade assimétrica. Os elipsoides são apresentados em nível de probabilidade de 50% 118

Figura 28: *Synthons* intermoleculares saquinavir-mesilato em complexo supremolecular multicomponente ao longo do eixo b..... 120

Figura 29: Padrão de difração de raios X utilizando o método de pó para a amostra de SQVM. O padrão de difração do monocristal foi calculado a partir da informação obtida a 173 K. O padrão de difração pelo método do pó foi obtido experimentalmente à temperatura ambiente para a matéria-prima 121

Figura 30: Curvas de DSC, TGA e DrTGA (derivada da TGA) do SQVM obtidas em atmosfera de N₂ (50 mL/ min) e razão de aquecimento de 10 °C/min 122

Figura 31: (A) Espectro de infravermelho (topo) e de Raman (abaixo) do SQVM. (B) Detalhes do espectro de infravermelho evidenciando o estiramento amida N–H..... 123

Figura 32: SEM da matéria-prima de SQVM..... 124

Figura 33: (A) Perfil de dissolução da matéria-prima de SQVM e (B) turbidimetria do SQVM em meio de LSS 0,25% 126

Figura 34: Representação da molécula de SQVM e da molécula do cocrystal obtido (SQVM SLS) mostrando o conteúdo presente na unidade assimétrica. (A Figura foi obtida através do software Olex2)..... 128

Figura 35: (A) Imagens dos monocristais de SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI obtidas com microscópio óptico à temperatura ambiente e (B)

representação gráfica do conteúdo da unidade assimétrica para o SQVM e suas formas isomorfas (átomos de H omitidos para melhor visualização) 132

Figura 36: Representação *ball-and-stick* das interações por pontes de hidrogênio entre os íons mesilato, cloreto, brometo e iodeto, o cátion saquinavir e as moléculas de água no SQVM (a), SQVCl (b), SQVBr (c) e SQVI (d)..... 133

Figura 37: Comparação dos padrões de difração de raios X utilizando o método de pó, obtidos à temperatura ambiente para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI..... 135

Figura 38: Medidas de DSC para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI. Os eventos de fusão e a perda das moléculas de água para os sais estão representados 136

Figura 39: Curvas termogravimétricas confirmando que SQVCl, SQVBr e SQVI contêm três, duas e uma molécula de água, respectivamente, e que todos os sais decompõem em temperatura subsequente à fusão..... 138

Figura 40: Microscopia Hot-Stage em cristais de SQVCl, SQVBr e SQVI.....139

Figura 41: Difração de raios X utilizando o método de pó com temperatura variável para o SQVCl. Comportamento análogo foi observado para SQVBr e SQVI. Os processos de aquecimento e resfriamento foram conduzidos à razão de 5 °C/min 140

Figura 42: Perfil de dissolução em água para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI 142

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Classificação dos sistemas cristalinos segundo as medidas dos eixos e ângulos da cela unitária..... 50

Capítulo 2

Tabela 2: Denominações e características cristalográficas encontradas na literatura para polimorfos, cocristais e solvatos de EFV 62

Tabela 3: Valores de precisão intermediária (precisão inter-dia) e de repetibilidade (intra-dia) para o EFV, expressos como média e desvio padrão relativo (RSD).....72

Tabela 4: Valores de concentração teórica, concentração experimental e percentual de recuperação na avaliação da exatidão para o EFV 73

Tabela 5: Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade do EFV em solução, expressos em concentração de fármaco em solução e percentual. Comparou-se a concentração no tempo zero com as concentrações nos tempos de 6 e 24 horas, este à temperatura ambiente e sob refrigeração 73

Tabela 6: Atribuição de Sinais para os polimorfos I e II de EFV..... 82

Tabela 7: Equação da reta e r^2 obtidos por análise de regressão linear na avaliação dos testes de dissolução intrínseca dos polimorfos I e II de EFV 88

Tabela 8: Análise de tamanho de domínio cristalino (D) e tamanho de partícula dos seis lotes de EFV e seus correspondentes valores de eficiência de dissolução (DE) 93

Tabela 9: Valores de taxa de dissolução intrínseca (IDR) para amostras de EFV pertencentes aos polimorfos I e II. Informações sobre microestrutura ($\langle D \rangle_s$) e tamanho de partícula ($d[4, 3]$, Span) para diferentes lotes de EFV de mesma forma polimórfica..... 103

Capítulo 3

Tabela 10: Informações Cristalográficas e de refinamento obtidas para o SQVM.....119

Tabela 11: Geometria das ligações de hidrogênio para o SQVM	119
Tabela 12: Informações cristalográficas e de refinamento obtidas para o cocristal SQVMSLS	129
Tabela 13: Informações cristalográficas e de refinamento obtidas para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI.....	131
Tabela 14: Ponto de Fusão, coeficiente de empacotamento (c.e) e volume acessível para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI antes e após a remoção virtual de ânions e moléculas de água	137
Tabela 15: Medidas da solubilidade em água para o SQVM e suas formas isomorfas após 12 e 24 horas	141
Tabela 16: Medidas da concentração máxima (3 horas) para o SQVM e suas formas.....	142

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1

Quadro 1: Resumo das classes de medicamentos antirretrovirais 39

Quadro 2: Classificação dos fármacos conforme solubilidade e permeabilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....43

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCS – Sistema de Classificação Biofarmacêutica
CCDC – *The Cambridge Crystallographic Data Centre*
CMC – Concentração Micelar Crítica
DDAHV – Departamento de DST/ AIDS/ Hepatites Virais
DE – Eficiência de Dissolução
DIVE – Diretoria de Vigilância Epidemiológica
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial
DST – Doença Sexualmente Transmissível
EFV – Efavirenz
EMA – *European Medicines Agency*
FAPESC – Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina
FDA – *Food and Drugs Administration*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FT-IR – Espectroscopia com Transformada de Fourier
g/mol – Gramas por mol
HAART – Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
HIV-2 – Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2
HPC – Hidroxipropil celulose
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPMC – Hidroxipropil metil celulose
HSM – Microscopia Hot-stage
HV – Hepatites Virais
ICH – *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*
IDR – Taxa de Dissolução Intrínseca
IFA – Insumo Farmacêutico Ativo
IVIVC – Correlação *in vivo-in vitro*
LAFEPE – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LaSiFA – Laboratório de Sistemas Farmacêuticos Avançados
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
LSS – Lauril Sulfato de Sódio
ml – Mililitro

MS – Ministério da Saúde
MSD – Merck Sharp & Dohme
MVDI – Método de Velocidade de Dissolução Intrínseca
nm – Nanômetro
NNRTI – Inibidor de Transcriptase Reversa não-Análogo de Nucleosídeo
NRTI – Inibidor de Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo
PI – Inibidor de Protease
RE – Resolução Específica
RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
rpm – Rotações por minuto
RS – Espectroscopia de Raman
RSD – Desvio Padrão Relativo
SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura
SES/SC – Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina
SQV – Saquinavir
SQVBr – Brometo de Saquinavir
SQVCl – Cloreto de Saquinavir
SQVI – Iodeto de Saquinavir
SQVM – Mesilato de Saquinavir
ss-NMR – Ressonância Magnética Nuclear em Sólidos
SUS – Sistema Único de Saúde
TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão
TG – Termogravimetria
UNAIDS – Programa Conjunto das Nações Unidas
USP – *United States Pharmacopeia*
UV-VIS – Ultravioleta Visível
µg – Micrograma
µl – Microlitro
VDI – Velocidade de Dissolução Intrínseca
XRSCD – Difração de raios X de Monocristal
XRPD – Difração de raios X pelo Método de Pó

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	29
1.1.1 OBJETIVO GERAL	29
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA.....	31
1.1 HIV/ AIDS	33
1.2 Situação da AIDS em Santa Catarina, no Brasil e no mundo.....	33
1.3 Curso Clínico da Doença.....	37
1.4 Tratamento	38
1.5 Fármacos de Baixa Solubilidade e Classificação Biofarmacêutica	42
1.6 Características Farmacêuticas: Efavirenz (EFV) e Saquinavir (SQV) ..	44
1.7 Sólidos Cristalinos	48
1.8 Estado Sólido, Química Supramolecular e Engenharia de Cristais	52
1.9 Microestrutura	55
CAPÍTULO II – EFAVIRENZ	59
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODO.....	64
2.1 Material	64
2.2 Métodos.....	65
2.2.1 Processo de Obtenção de um polimorfo de EFV	65
2.2.2 Técnicas de Caracterização do Estado Sólido	65
2.2.2.1 Radiação Síncrotron	65
2.2.2.2 Difração de raios X utilizando o método do Pó (XRPD)	65
2.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	66
2.2.2.4 Espectroscopia Raman (RS).....	66
2.2.2.5 Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)	67
2.2.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	67
2.2.2.7 Termogravimetria (TG).....	67
2.2.2.8 Microscopia Hot-Stage (HSM)	68
2.2.2.9 Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido	68
2.2.2.10 Distribuição de Tamanho de Partícula	69
2.2.3 Técnicas de Caracterização das Propriedades de Dissolução	69
2.2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	69
2.2.3.2 Dissolução por Dispersão	69
2.2.3.3 Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação quantitativa de EFV no teste de dissolução intrínseca	70
2.2.3.4 Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI).....	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1 Caracterização Físico-química dos Polimorfos I e II de EFV	74
3.2 Caracterização Físico-química de Lotes de EFV (Polimorfo I) e Correlação entre Microestrutura e Bioequivalência	88

CAPÍTULO III – SAQUINAVIR	107
1 INTRODUÇÃO	109
2 MATERIAL E MÉTODO	110
2.1 Material	110
2.2 Métodos Relacionados à Obtenção e Caracterização do SQVM.....	110
2.2.1 Processo de Obtenção do Monocristal de SQVM	110
2.2.2 Processo de Obtenção do Cocrystal de SQVMSLS	111
2.2.3 Caracterização do Estado Sólido do SQVM.....	111
2.2.3.1 Difração de Raios X de Monocristal (XRSCD)	111
2.2.3.2 Difração de raios X utilizando o método de Pó (XRPD).....	112
2.2.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TG)	112
2.2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	112
2.2.3.5 Espectroscopia Raman (RS)	113
2.2.3.6 Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR).....	113
2.2.3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	113
2.2.3.8 Dissolução por Dispersão	113
2.2.3.9 Turbidez	114
2.3 Métodos Relacionados à Obtenção e Caracterização de Novas Formas de SQV	115
2.3.1 Processo de Obtenção de Novas Formas de SQV	115
2.3.2 Caracterização do Estado Sólido das Novas Formas de SQV	115
2.3.2.1 Difração de Raios X de Monocristal (XRSCD)	115
2.3.2.2 Difração de raios X utilizando o método de Pó (XRPD).....	116
2.3.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	116
2.3.2.4 Termogravimetria (TG)	116
2.3.2.5 Microscopia Hot-Stage (HSM).....	116
2.3.2.6 Dissolução por dispersão e Avaliação da solubilidade	117
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.1 Caracterização Estrutural e do Estado Sólido e Avaliação das Propriedades de Dissolução do SQVM	117
3.2 Caracterização Estrutural do cocrystal SQVMSLS para a compreensão das Propriedades de Dissolução do SQVM.....	127
3.3 Caracterização Físico-Química e Estrutural do SQVM e suas Novas Formas	130
CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO GERAL.....	145
CONCLUSÕES.....	155
PERSPECTIVAS	159
REFERÊNCIAS	163
APÊNDICE A	191
APÊNDICE B	195
APÊNDICE C	199
APÊNDICE D	203

INTRODUÇÃO

No cenário mundial, o Brasil é destaque com relação ao tratamento e à assistência aos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os medicamentos antirretrovirais surgiram na década de 1980 e desde 1996 o país fornece gratuitamente o “coquetel” anti-Aids (WIGG, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012) aos pacientes cadastrados no Programa Nacional de DST e AIDS (PN DST/ AIDS). Hoje, 97% dos brasileiros diagnosticados como portadores do HIV recebem o tratamento, ação que vem contribuindo para a redução da mortalidade, melhoria da qualidade de vida e sobrevivência desses pacientes. O mesmo Programa apoia a busca por tecnologias que reduzam custos e melhorem a efetividade dos medicamentos.

De modo a cumprir objetivos da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART) como suprimir a carga viral abaixo dos limites de detecção e restabelecer a função imune através do aumento no número de células T CD4+ (CHEN; HOY; LEWIN, 2007), é notável a necessidade de melhorar propriedades como biodisponibilidade, citotoxicidade e intervalo de dose dos medicamentos utilizados na terapia (NOWACEK et al., 2011). Portanto, melhorar a solubilidade e incrementar as propriedades de dissolução é questão essencial para a biodisponibilidade adequada destes medicamentos.

O antirretroviral efavirenz (EFV) pertence à classe dos inibidores de transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeo (NNRTI) e compõe a HAART no tratamento do vírus tipo 1 da imunodeficiência humana (ESTÉ; CIHLAR, 2010; PERONI et al., 2011). Foi aprovado *pele Food and Drug Administration* (FDA) em setembro de 1998 e é indicado sempre em combinação com outros fármacos no tratamento de primeira linha em adultos e crianças (CHIAPPETTA et al., 2010). Protegido por patente até 2012, em maio de 2007 foi declarado ser de utilidade pública pelo presidente Luiz Inácio Lula da Silva. A partir de então o Laboratório Nacional Farmanguinhos – Fundação Oswaldo Cruz – (FIOCRUZ) (ELIAS, 2009) e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) passaram a fabricar o medicamento, distribuindo-o na rede pública de saúde.

O mesilato de saquinavir (SQVM) foi o primeiro inibidor de protease (PI) aprovado pelo FDA em dezembro de 1995 (JAIN et al., 2007). Em novembro de 1997 foi novamente aprovado, desta vez como saquinavir (SQV), mas retirado do mercado em 2006. A inclusão do SQVM na HAART tem melhorado significativamente os resultados

clínicos em pacientes com AIDS (PATHAK et al., 2010). O SQVM pertence à Classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), ou seja, apresenta baixa solubilidade aquosa, baixa permeabilidade (AMIDON et al., 1995; LIDENBERG et al., 2004; BELOQUI et al., 2013) e conseqüentemente baixa biodisponibilidade (< 4%) (PATHAK et al., 2010).

EFV e SQVM são importantes fármacos envolvidos em uma questão de saúde pública mundial, pertencem às Classes II e IV do BCS e compõem a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2014). Dessa maneira é de interesse da indústria nacional e das políticas de saúde, a obtenção de sistemas capazes de aumentar a biodisponibilidade, possibilitar o desenvolvimento de novas formulações e futuramente permitir a sua avaliação com relação à diminuição da dosagem. Portanto, a avaliação estrutural e o conhecimento das propriedades do estado sólido e de dissolução de ambos os fármacos são de fundamental importância.

A engenharia de cristais, através de processos de cristalização, oferece várias possibilidades para a melhoria das propriedades de solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis (DATA; GRANT, 2004; BLAGDEN et al., 2007). A obtenção de cocrystal e polimorfos, além da influência das condições de cristalização no hábito cristalino e morfologia das partículas, são algumas dentre as várias possibilidades (BLAGDEN et al., 2007). Outra questão importante no melhoramento das propriedades do estado sólido e avaliação dos fármacos puros seria a busca pelas matérias-primas com as melhores características físico-químicas. A micronização, tão comumente empregada, implica em modificação física como forma de promover redução do tamanho das partículas e aumento da área superficial (VOGT; KUNATH; DRESSMAN, 2008; FERRAZ, 2009; PANKAJ et al., 2011; BRANHAM; MOYO; GOVENDER, 2012) e consiste em um processo de alta energia. Os insumos obtidos por esse processo não podem ser caracterizados apenas pela distribuição do tamanho de partícula, a caracterização microestrutural (tamanho de cristalita e *microstrain*) é necessária (POURGHARAMANI et al., 2008).

Este trabalho contempla, com relação ao EFV, a obtenção e a caracterização de uma forma polimórfica mais estável e solúvel, e sua comparação com o polimorfo atualmente utilizado pela indústria. Além disso, traz a caracterização do estado sólido de seis lotes deste fármaco, sendo um deles aprovado no teste de bioequivalência. Vale ressaltar que para o EFV há a necessidade de estudos de bioequivalência para a

produção de medicamentos genéricos como forma de assegurar a sua eficácia terapêutica. Tais estudos foram conduzidos por Bedor e colaboradores e por Honório e colaboradores (BEDOR et al., 2011; HONÓRIO et al., 2013), e estão de acordo com o estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 1999) e em conformidade com as recomendações internacionais para estudos de bioequivalência. Um medicamento genérico é considerado bioequivalente, se a velocidade e a extensão de absorção não demonstrar diferença significativa em relação ao medicamento de referência, quando administrado na mesma dose molar da molécula ativa e nas mesmas condições experimentais (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007).

A avaliação microestrutural, tão difundida nas Ciências dos Materiais, onde a correlação entre microestrutura e desempenho dos materiais como cerâmica e ligas metálicas tem sido reconhecida, é inovadora nas Ciências Farmacêuticas. Tal investigação é primeiramente realizada neste trabalho, e prova ser um dos mais importantes parâmetros a influenciar diretamente as propriedades de dissolução dos Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs). Através das medidas de tamanho de domínio cristalino foi possível estabelecer uma relação direta entre esta propriedade e a taxa de dissolução intrínseca. Além disso, pode-se concluir que o controle dos parâmetros de microestrutura pode garantir o desempenho do fármaco em termos de bioequivalência e biodisponibilidade.

O SQVM foi caracterizado com relação às propriedades do estado sólido, o monocrystal foi obtido e a sua estrutura não conhecida até então, foi resolvida e depositada. O comportamento anômalo do perfil de dissolução obtido para o SQVM em lauril sulfato de sódio (LSS) 0,25% foi investigado e justificado através da turbidimetria e da análise estrutural do cocrystal SQVMSLS obtido. Além disso, a aplicação da engenharia de cristais permitiu a obtenção de novas formas de SQV com a produção de monocristais e a resolução de três novas estruturas. As propriedades do estado sólido foram investigadas para todas as formas obtidas.

Neste contexto a tese foi organizada e está apresentada na forma de capítulos. A revisão bibliográfica está apresentada no capítulo I. O capítulo II refere-se ao EFV. Apresenta a obtenção e caracterização de uma forma polimórfica do fármaco frente ao polimorfo utilizado pela indústria atualmente para formular. Segue com o estudo da biorrelevância das propriedades do estado sólido através da análise da microestrutura, questão inovadora nas Ciências Farmacêuticas. Finaliza com a demonstração de um método de velocidade de dissolução

intrínseca (MVDI) capaz de diferenciar além de polimorfos, tamanhos de domínio cristalino para este fármaco. Nesta avaliação, o MVDI foi capaz de diferenciar a amostra aprovada no teste de bioequivalência daquela não aprovada. O capítulo III é dedicado ao SQVM e nele constam: a caracterização no estado sólido do fármaco, a resolução da estrutura do monocristal obtido e a compreensão do comportamento anômalo do perfil de dissolução para este fármaco. Além disso, a engenharia de cristais é utilizada para a obtenção de novas formas de SQV. A discussão geral é apresentada no Capítulo IV. Como apêndices constam os artigos publicados e um submetido para publicação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estrutura cristalina, as características no estado sólido e as propriedades de dissolução de fases sólidas de EFV e SQV visando a biorrelevância e o impacto destes fármacos no tratamento do HIV/AIDS.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter polimorfo(s) de EFV e caracterizá-lo(s) através de técnicas termoanalíticas (DSC/ TG), espectroscópicas (Raman – RS e Infravermelho – FT-IR), de microscopia (SEM), de difração de raios X pelo método do pó (XRPD), ressonância magnética nuclear em sólidos (ss-NMR) e velocidade de dissolução intrínseca (VDI). Além disso, classificar como monotrópica ou enantiotrópica a relação termodinâmica entre o(s) mesmo(s).
- Otimizar e validar um método para quantificação de EFV no teste de dissolução intrínseca com emprego da cromatografia líquida de alta eficiência.
- Caracterizar IFAs de EFV através de SEM, XRPD, radiação síncrotron, software PM2K, distribuição de tamanho de partícula, perfil de dissolução, eficiência de dissolução (DE) e VDI.
- Avaliar a biorrelevância das propriedades do estado sólido de EFV através da relação entre tamanho de domínio cristalino, distribuição de tamanho de partícula, DE e VDI para os IFAs deste fármaco e correlacionar estes resultados com os obtidos nos ensaios *in vivo* (bioequivalência).
- Obter o monocristal de SQVM e refinar sua estrutura.
- Caracterizar o IFA SQVM por meio de DSC/ TG, SEM, RS, FT-IR, XRPD.
- Realizar o perfil de dissolução e explicar o comportamento anômalo observado para o SQVM a partir da avaliação estrutural.

- Obter, através da engenharia de cristais, novas formas de SQV.
- Caracterizar as novas formas de SQV obtidas, através das técnicas de caracterização do estado sólido e da avaliação cristalográfica dos monocristais produzidos.

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HIV/ AIDS

A AIDS, síndrome da imunodeficiência humana foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos em 1981 (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008). A infecção pelo vírus HIV e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), referida como HIV/AIDS, constituem uma doença infecciosa de grande desafio para a saúde pública mundial (OJEWOLE et al., 2008).

O HIV-1 é o agente etiológico das infecções em todo o mundo, enquanto o HIV-2 é mais prevalente no oeste da África (OJEWOLE et al., 2008; WIGG, 2008). O retrovírus HIV-2 também causa a doença, mas apresenta-se menos virulento, transmissível e prevalente que o HIV-1 (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008; WIGG, 2008; OJEWOLE et al., 2008).

Na infecção o sistema imunológico é superativado na tentativa de eliminar as novas partículas virais produzidas, mas os vírus conseguem destruir as células que normalmente seriam capazes de eliminá-los. Isso leva à liberação de citocinas e à expressão de correceptores para o HIV na superfície de linfócitos com aumento da população viral até que o sistema imunológico do indivíduo comece a apresentar manifestações de imunodeficiência (WIGG, 2008).

Quando isso acontece infecções oportunistas por *Pneumocystis carinii* e *Mycobacterium tuberculosis*, cânceres (STODDART; REYES, 2006; ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008) e demência (STODDART; REYES, 2006) podem ocorrer, e sem tratamento, a infecção pelo HIV-1 é fatal no período entre 5 a 10 anos (STODDART; REYES, 2006).

1.2 Situação da AIDS em Santa Catarina, no Brasil e no mundo

De acordo com os últimos dados da *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS) de 2015 sobre HIV/AIDS, até 2014 existiam no mundo 36,9 milhões de pessoas portadoras de HIV. No ano de 2000 menos de 1% dos portadores de HIV em países de baixa e média renda tinham acesso à terapia antirretroviral. De 2000 a 2014 o número de pessoas com acesso à terapia aumentou em 40%, o que fez com que o número de óbitos por doenças relacionadas à AIDS apresentasse redução de 42% desde 2004 (UNAIDS, 2015 (a)). Segundo a UNAIDS, o número de óbitos por doenças relacionadas à AIDS, apresentou redução de 2,0 milhões em 2005 para 1,2 milhões em 2014, e ainda mais significativa foi a queda no número de óbitos por tuberculose em pacientes portadores do vírus, 32% de redução desde 2004 (UNAIDS, 2015 (b)). A significativa redução no número de óbitos em

países de baixa e média renda desde 1995 deve-se à introdução de terapia antirretroviral e ao progresso no acesso ao tratamento (UNAIDS, 2011). Depois da introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), a AIDS passou a ser considerada uma doença crônica, que se tratada de maneira adequada, diminui consideravelmente a probabilidade de adoecimento e morte. Além disso, estudos recentes evidenciaram que o tratamento não só é eficaz para o controle da doença e melhoria da qualidade de vida, mas também para a diminuição da transmissão do vírus. De acordo com o último Boletim Epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde (dados referentes aos casos de infecção pelo HIV notificados até 30/06/2015), nos últimos dez anos, observou-se uma queda de 5,0% no coeficiente de mortalidade de AIDS no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). No entanto, essa redução não foi observada em todas as regiões do país. As regiões Sul e Sudeste apresentaram redução de 10,6 e 19,7%, respectivamente. Nas regiões Norte e Nordeste, observou-se, no mesmo período, um aumento de 58,6 e 34,3% desse índice. A UNAIDS relata ainda, um avanço significativo nos casos relacionados à transmissão entre mãe e bebê, o que pode ocorrer durante a gravidez, parto ou amamentação. Para estes casos, os números mostram que em média 73% das gestantes portadoras do HIV tiveram acesso à terapia antirretroviral e em alguns países, esse percentual foi de 79%. Assim, entre os anos de 2000 e 2014 o número de novas infecções por HIV em crianças foi reduzido em 58% (UNAIDS, 2015 (b)).

Em Santa Catarina, segundo dados da Vigilância Epidemiológica, de 1984 a dezembro de 2014 foram notificados 37.704 casos de AIDS (DIVE, 2014(a)). Segundo dados da Vigilância Epidemiológica de 2013, o estado ocupa a terceira posição com relação à taxa de detecção do vírus no cenário nacional, atrás apenas dos estados do Rio Grande do Sul e Amazonas. É também o terceiro estado em número de óbitos, com o Rio Grande do Sul e o estado do Rio de Janeiro ocupando o primeiro e segundo lugar, respectivamente (DIVE, 2014(b)). Com relação ao número de crianças infectadas, oitenta e três casos foram notificados no ano de 1998 (DIVE, 2011), contra treze casos em 2013 (DIVE, 2014(a)). A melhor assistência ao pré-natal, parto e puerpério poderá contribuir de forma ainda mais efetiva para a eliminação dos casos evitáveis de transmissão vertical do vírus no Estado e reduzir para 2% a taxa de transmissão (DIVE, 2011). Segundo dados da Gerência de Vigilância das DST/ HIV/ AIDS/ HV de 2013 essa taxa é de 3,2%, portanto, superior ao valor estabelecido como adequado quando da utilização das medidas profiláticas. Dessa maneira,

faz-se necessário conhecer os fatores que influenciam na redução desse indicador e adequá-los (DIVE, 2013). Também em Santa Catarina, observam-se taxas de mortalidade superiores às do Brasil. O número de óbitos vem aumentando a cada ano, 29% dos óbitos ocorrem no grupo etário de 25 a 34 anos e 25% entre 35 e 44 anos (DIVE, 2014(b)).

No Brasil, embora estabilizada, a epidemia ainda apresenta desafios. Nos primeiros quinze anos a epidemia (1980 – 1995), concentrou-se nas capitais do Sul, Sudeste e em alguns municípios de São Paulo. No período de 1995 a 2004, verificou-se expansão da concentração dos casos nas capitais da região Nordeste, Centro-Oeste e duas capitais do Norte. Entre os anos de 2005 e junho de 2015, observou-se uma expansão para todo o território nacional, com aproximadamente 410 mil casos registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). O relatório divulgado em novembro de 2011 pelo Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/ AIDS (UNAIDS) apontou o modelo brasileiro de prevenção do HIV e assistência como sendo um dos melhores do mundo. Os medicamentos antirretrovirais surgiram na década de 1980 e desde 1996 o Brasil distribui gratuitamente o “coquetel” anti AIDS (WIGG, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012) aos pacientes devidamente cadastrados no Programa Nacional de DST e AIDS (PN DST/ AIDS). Hoje o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece tratamento antirretroviral a 97% dos brasileiros diagnosticados como portadores do HIV, e a adoção dessa política social tem levado à redução da mortalidade, melhoria da qualidade e sobrevida dos pacientes em tratamento. Além disso, as taxas de hospitalização foram reduzidas, o que gerou uma economia de mais de US\$ 2 bilhões até 2006 (SANTOS, 2010). Assim, a política brasileira de tratamento antirretroviral tem sido apontada como modelo para outros países. Além da questão social o Programa apoia ações governamentais mais sustentáveis, dentre as quais a busca por tecnologias alternativas que reduzam custos e melhorem a efetividade dos medicamentos.

Uma importante estratégia do governo é assegurar o acesso dos antirretrovirais aos pacientes portadores do HIV em face da dependência do mercado brasileiro aos fornecedores internacionais de IFAs (BRASIL, 2005). De acordo com Santos, 2010, foram gastos em 2008, cerca de R\$ 836 milhões (US\$ 456 milhões) na aquisição de antirretrovirais para o atendimento de 190 mil pacientes. O problema é que, com o amadurecimento do Programa, os gastos com a compra de antirretrovirais patenteados passaram a representar um peso crescente no orçamento. Parte do aumento dos gastos nos últimos anos também está relacionada ao próprio sucesso do Programa, principalmente devido à

expansão da cobertura e à sobrevivência dos pacientes. Portanto, há uma necessidade constante de diminuir os custos de produção nacional de tais medicamentos modificando as formas farmacêuticas existentes, buscando tecnologias mais eficazes com um custo de produção mais barato, além de continuar incentivando a produção nacional de novos medicamentos. Em 2005, dos 19 medicamentos utilizados no “coquetel” contra a AIDS, 9 já eram produzidos por laboratórios nacionais, no entanto, a importação dos 10 restantes representava 72% dos gastos do programa. Portanto, o alto custo dos antirretrovirais patenteados era uma ameaça à viabilidade do programa brasileiro. Assim, em maio de 2007 o presidente Luiz Inácio Lula da Silva declarou de utilidade pública um medicamento protegido por patente até 2012, o antirretroviral efavirenz (EFV), até então produzido pela multinacional Merck Sharp & Dohme (MSD). A partir de então o laboratório nacional Farmanguinhos (FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz) passou a fabricar o medicamento, distribuindo-o na rede pública de saúde (ELIAS, 2009). O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) também produz o medicamento.

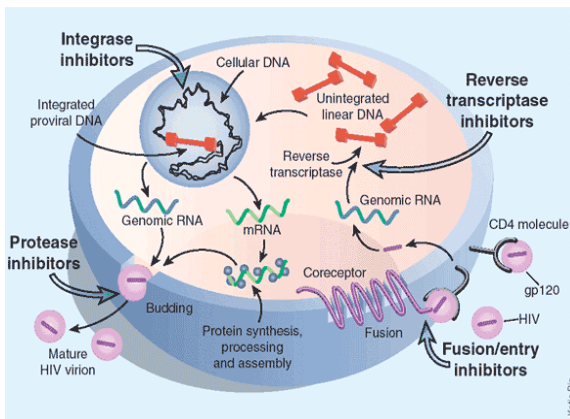
A produção de EFV, assim como de outros antirretrovirais por laboratórios nacionais, reduz a dependência brasileira do mercado farmacêutico mundial com o fortalecimento da base de produção nacional (Pharmacia Brasileira, 2008). Exemplo prático para o aprimoramento tecnológico consiste no emprego de alternativas com vistas a modular a dissolução de fármacos pouco solúveis. Tais objetivos são alcançados, por exemplo, através do lançamento de Editais como o PPSUS 2009, sob o título: “Desenvolvimento de Estratégias Farmacocinéticas para Melhoria das Características Biofarmacêuticas do Saquinavir, um Inibidor de Protease do HIV, e Avaliação da sua Absorção Intestinal *in Vitro* e da sua Biodisponibilidade *in Vivo*”. Tal projeto é fruto da parceria governamental entre a Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina – FAPESC, o Ministério da Saúde - MS, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/MCT e a Secretaria de Estado da Saúde - SES/SC. O objetivo é solucionar os problemas relacionados à absorção do fármaco em questão, melhorar a adesão ao tratamento, diminuir custos de produção e contribuir para o aprimoramento e conhecimento científico na área de assistência às pessoas vivendo com HIV/AIDS.

1.3 Curso Clínico da Doença

A compreensão do ciclo de vida do HIV é necessária porque as estratégias utilizadas para o tratamento têm como alvo várias etapas do ciclo (Figura 1). Uma glicoproteína externa presente na superfície do vírus – a gp 120 – liga-se a proteínas receptoras CD4 presentes na superfície de linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e micróglia do cérebro possibilitando a entrada do vírus nestas células. A gp 160 é composta de duas subunidades – gp 120 e gp 41. A ligação do vírus ao CD4 ocorre devido à subunidade gp 120 (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008). Além de ser um passo fundamental para a entrada do vírus nas células, a ligação da glicoproteína gp 120 ao receptor CD4 também interfere com as vias intracelulares de transdução de sinal e promove a apoptose das células TCD4+ (WIGG, 2008). O receptor CD4 sofre uma alteração conformacional e a glicoproteína gp 120 liga-se também a um segundo receptor ou correceptor que é representado por algumas moléculas receptoras para quimiocinas (em especial CCR5 e CXCR4) (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008; WIGG, 2008). O correceptor CCR5 presente na superfície das células promove a ligação de vírus que apresentam tropismo para macrófagos, monócitos e células dendríticas. Esses vírus são transmitidos preferencialmente por mucosas e via endovenosa. CXCR4 é correceptor para vírus que apresentam tropismo por células T, os quais são detectados em estágios tardios da doença, normalmente (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008; WIGG, 2008; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). O domínio fusogênico da gp 41 e do correceptor CXCR4 promove a fusão com a internalização do material genético viral e das enzimas necessárias à replicação (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). Após internalização, a proteína viral que reveste o ácido nucleico (capsídeo) é perdida e o processo de replicação tem início (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). A fita simples de RNA precisa ser transcrita a DNA. A transcriptase reversa é responsável por essa tarefa (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008; WIGG, 2008). É relatado pela literatura que muitos erros ocorrem durante o processo de transcrição, gerando defeitos no DNA, fato que contribui para a manutenção do vírus, permitindo que “engane” o sistema imunológico, dificultando o desenvolvimento de uma vacina e promovendo resistência aos antirretrovirais disponíveis (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008). Após a transcrição, a dupla fita de DNA migra para o núcleo e é integrada ao cromossoma da célula do hospedeiro pela integrase (ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008; WIGG, 2008; KINDT;

GOLDSBY; OSBORNE, 2008). A integrase incorpora o DNA do vírus ao material genético do hospedeiro. A expressão dos genes virais resulta na transcrição do RNA a partir do DNA do vírus e na tradução das proteínas virais, Tat, Nef, Ver, Vpu, Vif e Vpr, responsáveis por aumentar a replicação e inibir a imunidade inata (SOUZA; ALMEIDA, 2003; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008; WIGG, 2008; ANDERSON; KAKUDA; FLETCHER, 2008). Estas proteínas são produzidas como precursoras de poliproteínas; com o RNA viral permanecem na superfície celular e são incorporadas às partículas virais que “brotam” na membrana celular. As poliproteínas são processadas a proteínas e enzimas estruturais funcionais e então as partículas virais estão na forma ativa, prontas para infectar novas células (SOUZA; ALMEIDA, 2003; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008; WIGG, 2008).

Figura 1. Ciclo de replicação do HIV e local de ação dos medicamentos antirretrovirais (Fonte: adaptação de www.biology.arizona.edu).



1.4 Tratamento

Os medicamentos antirretrovirais surgiram na década de 1980 e desde 1996 o Brasil distribui gratuitamente o “coquetel” anti AIDS (WIGG, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016 (a)). De acordo com dados do Ministério da Saúde, em dezembro de 2014, 404 mil pacientes estavam em tratamento com os 22 medicamentos antirretrovirais distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Deste total, 11 antirretrovirais são produzidos no país atualmente: atazanavir,

didanosina, efavirenz, estavudina, lamivudina, nevirapina, saquinavir, tenofovir, zidovudina e as associações zidovudina e lamivudina e tenofovir e lamivudina (Ministério da Saúde, 2016 (b)). O Ministério da Saúde divide em cinco classes os 22 antirretrovirais (Quadro 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016 (a)) e de acordo com o GUIA para Uso de Antirretrovirais em Adultos e Crianças Infectados pelo HIV-1 de 2011, são mais de 20 os medicamentos classificados em seis grupos, sendo que os antagonistas de CCR5 não constam na classificação brasileira (NIH, 2011).

Quadro 1 – Resumo das classes de medicamentos antirretrovirais (adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016 (a)).

MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS	
Classe	Medicamentos
Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (NRTI)	abacavir, didanosina, estavudina, lamivudina, tenofovir, zidovudina e a combinação lamivudina/zidovudina lamivudina/ tenofovir
Inibidores de Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos (NNRTI)	efavirenz, etravirina, nevirapina
Inibidores de Protease (PI)	atazanavir, darunavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, fosamprenavir, tipranavir e saquinavir
Inibidores de Fusão	enfuvirtida
Inibidores de Integrase	raltegravir

De acordo com dados do Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais (DDAHV) do Ministério da Saúde, após a introdução da terapia antirretroviral e entre os anos de 2001 e 2012, o número de óbitos diminuiu em aproximadamente 13% no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os Inibidores de Transcriptase Reversa não Análogos de Nucleosídeos (NNRTIs) atuam inibindo a Transcriptase Reversa, mas não requerem fosforilação intracelular (CHEN; HOY; LEWIN, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016 (a)). Efavirenz, nevirapina e etravirina são os NNRTIs utilizados no Brasil, sendo este último, disponibilizado no final de 2010 para os casos de resistência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). No Brasil, o EFV é o medicamento de escolha em relação à nevirapina por apresentar elevada potência de supressão viral, eficácia a longo prazo e menor risco de efeitos adversos (WIGG, 2008). Um estudo de revisão dos NNRTIs dos últimos 20 anos classificou os NNRTIs como de Primeira Geração – nevirapina, efavirenz e delavirdina e *Next generation* – etravirina, rilpivirina, lersivirina, RDEA806, IDX899, e relatou ser a etravirina o primeiro NNRTI a demonstrar eficácia terapêutica em pacientes resistentes aos demais NNRTIs (BÉTHUNE, 2010).

Os Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (NRTIs) são os antirretrovirais mais prescritos. Atuam inibindo a transcriptase reversa do HIV e evitam a formação do DNA viral (CHEN; HOY; LEWIN, 2007). Zidovudina, lamivudina, abacavir, didanosina, estavudina e o tenofovir são os antirretrovirais pertencentes a esta classe no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016 (a)). Outros estudos citam como pertencentes a esta classe a zalcitabina (CIHLAR; RAY, 2010) e a emtricitabina (CHEN; HOY; LEWIN, 2007; CIHLAR; RAY, 2010).

Inibidores de Protease (PIs) impedem a ação da enzima protease e, conseqüentemente, a produção de novos vírus (CHEN; HOY; LEWIN, 2007). São pertencentes a esta classe: saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, fosamprenavir, lopinavir, atazanavir e darunavir (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016 (a)). Um estudo de revisão sobre os 15 anos dos inibidores de protease inclui nesta classe outro antirretroviral, o tripanavir, e classifica os quatro primeiros fármacos citados anteriormente como pertencentes à primeira geração de inibidores de protease e os cinco últimos como pertencentes à segunda geração (WENSING; MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010).

Inibidores de Fusão são responsáveis por impedir a entrada do vírus na célula, os inibidores de fusão pertencem a um grupo de

inibidores de entrada (TILTON; DOMS, 2010). Enfuvirtida é o antirretroviral representante desta classe, não apresenta biodisponibilidade oral e por isso é administrado por injeção subcutânea; não é licenciado para tratamento de pacientes *naive*¹ (CHEN; HOY; LEWIN, 2007).

Os inibidores da Integrase são uma nova classe de antirretrovirais, inibem irreversivelmente a integração do DNA do vírus ao genoma do hospedeiro, e, portanto, a replicação viral e a sua capacidade de infectar novas células (CHEN; HOY; LEWIN, 2007). O raltegravir, único representante até o momento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016 (a); CHEN; HOY; LEWIN, 2007), é fornecido no SUS atualmente (ABIA, 2015).

O tratamento do HIV/AIDS teve início com a zidovudina há 25 anos e evoluiu para a HAART (ESTÉ; CIHLAR, 2010). Na HAART, pelo menos três antirretrovirais são utilizados, dois NRTI's e um NNRTI ou dois NRTI's e um PI mais ritonavir (CHEN; HOY; LEWIN, 2007). Os benefícios sem precedentes resultantes da HAART têm sido descritos tanto em nível individual como epidemiológico, e modificado a história da doença, possibilitando aos pacientes infectados pelo HIV-1 viverem mais e com melhor qualidade de vida. A HAART tem como objetivos suprimir a carga viral abaixo dos limites de detecção e restabelecer a função imune através do aumento no número de células T CD4+ (CHEN; HOY; LEWIN, 2007; MORENO et al., 2010; ESTÉ; CIHLAR, 2010).

Embora tantos benefícios tenham sido relatados, inúmeras questões ainda precisam ser melhoradas no intuito de garantir maior adesão do paciente à terapia, simplificar o tratamento, diminuir a resistência e os efeitos adversos (AMIJI; VYAS; SHAH, 2006; ESTÉ; CIHLAR, 2010; MORENO et al., 2010). Com o aumento da expectativa de vida dos pacientes, os antirretrovirais passaram a ser utilizados por longos períodos, favorecendo o surgimento de resistência e potencial toxicidade. Doenças crônicas, como as alterações cardiovasculares, renais e hepáticas, apresentam etiologia mal definida e provavelmente resultam de vários fatores, destacando-se a toxicidade relacionada à terapia antirretroviral (MORENO et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Em sua maioria, os antirretrovirais sofrem extenso metabolismo de primeira passagem e, portanto, baixa e variável biodisponibilidade. Para alguns destes medicamentos a meia-vida é curta, por isso a

¹ *naive*: pacientes que não receberam tratamento anteriormente.

necessidade de administração frequente e maior chance de não adesão ao tratamento. Para outros antirretrovirais, a dificuldade em atingir concentrações adequadas no sítio de ação e/ou a baixa biodisponibilidade exigem doses extremamente altas, o que facilita a ocorrência de efeitos indesejáveis. Associado a estas características, vários dos agentes anti-HIV apresentam problemas físico-químicos, como baixa solubilidade aquosa, por isso a necessidade de estratégias que superem estas limitações (OJEWOLE et al., 2008; AMIJI; VYAS; SHAH, 2006).

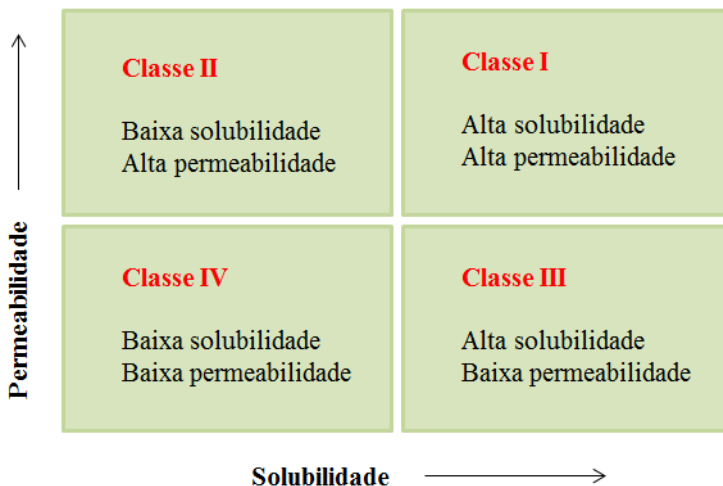
1.5 Fármacos de Baixa Solubilidade e Classificação Biofarmacêutica

Embora a solubilidade dos fármacos seja fator essencial para a efetividade dos medicamentos a serem desenvolvidos, independentemente da via de administração (KOCBECK; BAUMGARTNER; KRISTL, 2006), a via oral continua sendo a mais popular e econômica (LIU; WANG; HU, 2009).

Fármacos que apresentam baixa solubilidade aquosa associada à baixa permeabilidade apresentam baixa biodisponibilidade quando administrados pela via oral, porque a absorção é uma etapa limitante do processo (MARTINEZ; AMIDON, 2002) e, para que possam ser adequadamente absorvidos, os fármacos precisam ser primeiramente dissolvidos no sítio de absorção (LIU; WANG; HU, 2009; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007).

De acordo com a relação das propriedades de permeabilidade e solubilidade, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), proposto por Amidon e colaboradores, organiza os fármacos em quatro classes (Quadro 2) (AMIDON et al., 1995; TSUME et al., 2014; WILLIAMS et al., 2013).

Quadro 2. Classificação dos fármacos conforme solubilidade e permeabilidade de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.



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

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 40% dos medicamentos administrados por via oral pertencem às Classes II ou IV do BCS e, portanto, apresentam problemas de biodisponibilidade. Do total de novas entidades químicas em desenvolvimento na indústria farmacêutica, aproximadamente 70% apresenta baixa solubilidade aquosa (KAWABATA et al., 2011; GOMES et al., 2015).

Atualmente, a tecnologia farmacêutica fornece inúmeras estratégias para aumentar a taxa de dissolução e promover melhoria da biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis. Uma maior dissolução dos fármacos é obtida pelo aumento da solubilidade de acordo com a equação de Noyes-Whitney:

$$\frac{dC}{dt} = kS (c_s - c_t), \quad (\text{Equação 1})$$

onde dC/dt é a velocidade de dissolução, k é a constante de velocidade de dissolução, S , a área superficial do sólido, c_s , a solubilidade de

saturação do composto no meio de dissolução, c_1 a concentração do fármaco no meio (LEUNER; DRESSMAN, 2000, ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007).

O aumento da solubilidade dos fármacos de Classe II e IV assegura melhoria da biodisponibilidade, possível redução da dose com redução dos efeitos colaterais e melhor adesão dos pacientes à terapia (SAVJANI et al., 2012).

A redução do tamanho de partícula do sólido com consequente aumento da área superficial e a otimização das propriedades de molhagem da superfície do composto pela adição de baixas concentrações de surfactantes são algumas das possibilidades (LEUNER; DRESSMAN, 2000; JAEGHERE et al., 2000). Cita-se ainda a formação de dispersões ou soluções sólidas, a formulação em óleos ou emulsões e a complexação com agentes solubilizantes como as ciclodextrinas (JAEGHERE et al., 2000). Também, a melhoria de dissolução para os fármacos pouco solúveis em água, pela comoagem (*cogriding*) com surfactantes foi relatada já em 1998 por Otsuka, Ofusa e Matsuda, assim como por da Costa (2011) para o próprio EFV. A literatura relata ainda a comoagem com polímeros como HPMC e/ou HPC (SUGIMOTO et al, 1998; OTSUKA; OFUSA; MATSUDA, 1998; VOGT; KUNATH; DRESSMAN, 2008). A técnica de *spray-drying* é outro método de obtenção de partículas de tamanho reduzido, permite o controle de propriedades como tamanho e morfologia e resulta em aumento na solubilidade do fármaco quando do coprocessamento deste com determinados excipientes e/ou surfactantes e secagem por esta técnica (SOLLOHUB; CAL, 2010). Um relato importante da aplicação dessa técnica (*cospray drying*) para aumento da solubilidade aquosa e biodisponibilidade consiste no estudo realizado com o fármaco de baixa solubilidade aquosa, a griseofulvina (WONG; KELLAWAY; MURDAN, 2006), além de da Costa (2011) também com o EFV. Além das possibilidades citadas, destaca-se aqui, a modificação das propriedades do estado sólido dos fármacos de Classe II e IV através da Engenharia de Cristais.

1.6 Características Farmacêuticas: Efavirenz (EFV) e Saquinavir (SQV)

O EFV, comercializado sob os nomes de Sustiva[®] (FDA, 2010) ou Stocrin[®] (BRASIL, 2001), pelos laboratórios Bistol-Myers Squibb e Merck Sharp & Dohme (MSD), respectivamente, é um inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (NNRTI) usado como parte da HAART (CHIAPPETTA et al., 2010). Encontra-se na

apresentação de cápsulas de 200 mg, comprimidos revestidos de 600 mg e solução oral de 30 mg/mL (MSD, 2010). Foi aprovado pelo FDA em setembro de 1998 (FDA, 2010), sendo indicado sempre em combinação com outros fármacos e usado no tratamento de primeira linha em adultos e crianças (CHIAPPETTA et al., 2010).

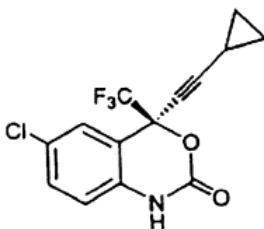
Apresenta biodisponibilidade oral entre 40 – 45% e sua variabilidade intra e inter-individual é de 55 – 58% e 19 – 24%, respectivamente (CHIAPPETTA et al., 2011). Encontra-se altamente ligado às proteínas plasmáticas, predominantemente albumina, e é absorvido no intestino (PERONI et al., 2011). O metabolismo ocorre no fígado através do sistema Citocromo P450. A meia-vida é de 52 a 76 horas após a ingestão de única dose, possibilitando administração única diária. Aproximadamente 14 a 34% da dose são eliminados na urina e entre 16 a 41% são eliminados nas fezes (LACY et al., 2005).

Não deve ser utilizado como monoterapia e nem deve ser administrado a gestantes. A dose infantil é calculada pelo peso e a dose para adultos é de 600 mg uma vez ao dia. Pode ser administrado com ou sem alimentos e antes de dormir como medida preventiva dos efeitos adversos sobre o sistema nervoso central, como dificuldade de concentração, tontura e sonolência (MSD, 2010).

O EFV apresenta pelo menos cinco diferentes polimorfos conforme descrito através da patente WO 99/64405 (BEDOR, 2011). A Forma 1, relatada por Mahapatra e colaboradores é a comumente utilizada para formulação devido à maior estabilidade (MAHAPATRA et al., 2010). Outras duas formas polimórficas foram relatadas, por Cuffini e colaboradores (CUFFINI et al., 2009) e outras duas por Ravikumar e Sridhar (RAVIKUMAR; SRIDHAR, 2009).

O EFV (Figura 2) é um sólido cristalino lipofílico com massa molar de 315,68 g/mol, solubilidade em meio aquoso de 9,0 µg/mL (SATHIGARI et al., 2009) e pKa = 10,2 (RABEL et al., 2001). Pertence à Classe II do BCS, ou seja, é pouco hidrossolúvel e altamente permeável (AMIDON et al., 1995). A taxa de dissolução intrínseca é inferior a 0,1 mg.cm⁻².min⁻¹ e pode ser um fator limitante para a absorção oral do medicamento.

Figura 2. Estrutura química do EFV. (Fonte: adaptação de SATHIGARI et al., 2009).



Efavirenz

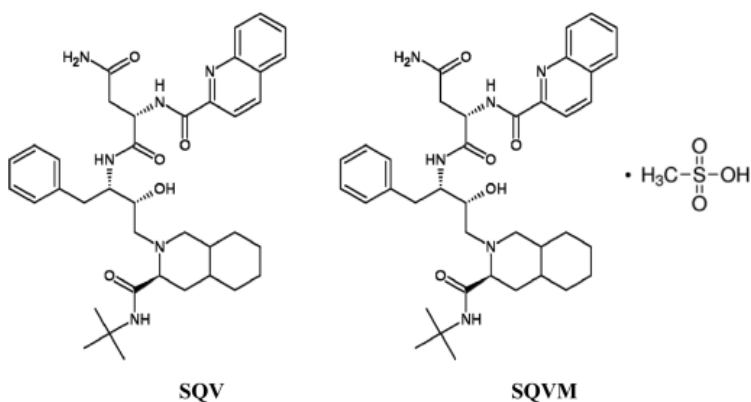
O primeiro inibidor de protease (PI), aprovado em dezembro de 1995 pelo FDA foi o mesilato de saquinavir (SQVM) (JAIN et al., 2007). Comercializado pelo laboratório Roche sob o nome de Invirase[®], foi aprovado na forma de cápsulas duras de 200 mg e comprimidos revestidos de 500 mg. Em novembro de 1997 foi aprovado novamente, dessa vez, como saquinavir (SQV), na forma de cápsulas moles de 200 mg e comercializado como Fortovase[®] pelo mesmo laboratório farmacêutico. Essa nova forma farmacêutica apresentou biodisponibilidade três vezes superior (ALSENZ; STEFFEN; ALEX, 1998; STRICKLEY, 2004; AIDSinfo, 1997). Porém, em fevereiro de 2006 o Fortovase[®] foi retirado do mercado por motivos relacionados à redução da demanda (AIDSinfo, 2005). A partir de então o Invirase[®] passou a ser associado ao ritonavir (CAMERON, 1999; YOULE, 2007). O ritonavir – potente inibidor do citocromo CYP3A e da glicoproteína P – favorece o aumento da biodisponibilidade do SQVM – excelente substrato do citocromo P450 (CYP)3A4 e da mesma glicoproteína. Dessa forma, cinco cápsulas de SQVM de 200 mg são administradas juntamente com o ritonavir duas vezes ao dia (PATHAK et al.; 2010).

Sabe-se que o SQV e o SQVM (Figura 3) não são bioequivalentes e, portanto, não são intercambiáveis. O SQV é pertencente à primeira geração de PIs (WENSING; MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010) e sua inclusão na HAART tem melhorado significativamente os resultados clínicos em pacientes com AIDS (PATHAK et al., 2010). O SQVM – forma ácida do fármaco, pertence à Classe IV do BCS, ou seja, apresenta baixa solubilidade aquosa, baixa permeabilidade (AMIDON et al., 1995; LIDENBERG et al., 2004;

BELOQUI et al., 2013) e conseqüentemente baixa biodisponibilidade (< 4%) (PATHAK et al., 2010). É um sólido cristalino com massa molar de 767,0 g/ mol, solubilidade aquosa de 73 µg/ mL em pH 6,5 e 36 µg/ mL em pH 7,4, respectivamente, e valores de pKa de 7,0 e 5,5 (BRANHAM et al., 2012). Apresenta-se altamente ligado às proteínas plasmáticas (98%), possui meia-vida de 9 – 15 horas e devido à incompleta absorção e aos efeitos do metabolismo de primeira passagem, necessita ser administrado três vezes ao dia de forma a manter níveis terapêuticos adequados (ROY et al., 2013). É absorvido no intestino (JAIN et al., 2007). A biodisponibilidade pode ser aumentada com a ingestão de alimentos de alto valor calórico, e o recomendado é que seja administrado duas horas após uma refeição completa (PISCITELLI et al., 2004).

O SQV apresenta polimorfismo e, de acordo com a patente da *Hetero Research Foundation* (WO 2010095142 A2), três diferentes formas polimórficas cristalinas (Forma I, II e III) e uma forma amorfa foram confirmadas (PARTHSARADHI et al., 2010). Os polimorfos diferem em termos de estabilidade, propriedades físicas, espectrais e métodos de obtenção.

Figura 3. Estrutura química do SQV (Fonte: adaptação de HEINZ et al., 2007) e do SQVM (Fonte: adaptação de BRANHAM et al., 2012).



EFV e SQV são fármacos envolvidos em uma questão de saúde pública mundial e pertencem às Classes II e IV do BCS. O Brasil é

referência no tratamento de pacientes com HIV/ AIDS em todo o mundo e vem buscando sua independência na produção de alguns dos antirretrovirais que compõem o “coquetel”. Para estes fármacos, o desenvolvimento de sistemas incrementadores de dissolução é extremamente atraente em termos tecnológicos. A melhoria da dissolução pode resultar em aumento da biodisponibilidade e como consequência, a possibilidade de diminuição da dosagem. Isto poderia reduzir, por sua vez, os efeitos colaterais. A obtenção de uma forma polimórfica mais solúvel e estável, a aplicação da engenharia de cristais na obtenção de novas formas e a compreensão do mecanismo de cristalização, além do controle das condições de cristalização no hábito cristalino e morfologia das partículas são algumas possibilidades (BLAGDEN et al., 2007). O desenvolvimento de novas formulações à base de EFV e SQV, com diferentes modificações cristalinas e que sejam de fácil escalonamento industrial, pode ser de grande interesse para a indústria farmacêutica.

1.7 Sólidos Cristalinos

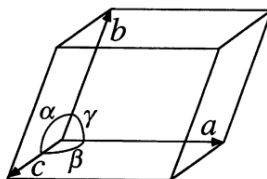
Os sólidos farmacêuticos são classificados como cristalinos ou amorfos. O estado cristalino apresenta ordem tridimensional de longo alcance e repetibilidade do arranjo das moléculas em três dimensões. Nesse estado, as moléculas encontram-se distribuídas de maneira ordenada no espaço e suas interações com moléculas vizinhas são repetidas regularmente (VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; DATA; GRANT, 2004).

Quando esse arranjo molecular é perfeito e se repete de modo contínuo, ao longo das extremidades de uma partícula, tem-se um monocristal (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; BRITAIN; BYRN; LEE, 2009). Quando variáveis como temperatura e taxa de resfriamento, dentre outras envolvidas no processo de cristalização, não permitem esse arranjo periódico dos átomos, ocorre a divisão do volume sólido em vários grãos monocristalinos, formando-se então, estruturas policristalinas (CALLISTER; RETHWISCH, 2007).

É a diferença na periodicidade de longo alcance das moléculas a causa das diferentes propriedades físicas e químicas observadas entre sólidos amorfos e cristalinos (VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; DATA; GRANT, 2004). A periodicidade observada em um cristal só é possível via simetria translacional, característica fundamental do estado cristalino. Outros elementos de simetria, além do translacional, podem estar presentes. São elementos como rotação, inversões e reflexões. Estes elementos relacionam os átomos e as moléculas entre si

compondo um arranjo periódico e bem estruturado. A estrutura geométrica básica (menor unidade geométrica) que contém toda a informação estrutural e de simetria e que, repetida no espaço, gera a rede cristalina, constitui a chamada cela unitária (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; BRITAIN; BYRN; LEE, 2009; VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; CULLITY, 1978). Os cristais são gerados pela repetição de uma determinada cela unitária em três dimensões. De maneira simplificada, pode-se pensar na cela unitária como uma caixa e no cristal como uma projeção tridimensional de várias destas caixas. Todo esse conjunto constitui a rede cristalina (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999). A cela unitária é definida pelos vetores de translação a , b e c e pelos ângulos α , β e γ e possui um volume definido V , no qual estão contidos os átomos e moléculas necessários para a constituição do cristal (Figura 4).

Figura 4. Representação da cela unitária (Fonte: adaptação de WASEDA et al., 2011).



A estrutura de um cristal pode ser atribuída a um dos 7 sistemas cristalinos (Tabela 1), a uma das 14 redes de Bravais e a um dos 230 grupos espaciais (VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; BRITAIN; BYRN; LEE, 2009; DATA; GRANT, 2004).

Tabela 1 – Classificação dos sistemas cristalinos segundo as medidas dos eixos e ângulos da cela unitária.

Sistema	Eixos	Ângulos
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Romboédrico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
Triclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

Fonte: Adaptado de Cullity, 1978.

Nos sólidos cristalinos, os átomos encontram-se ordenados em planos separados por distâncias interplanares. Estas distâncias possuem a mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X e por isso quando um feixe de raios X incide em um cristal interagindo com os elétrons dos átomos presentes, origina o fenômeno de difração de raios X (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; CUFFINI; PITALUGA, TOMBARI, 2009). Obtendo-se o monocristal, os parâmetros de cela unitária inicialmente descritos podem ser determinados através do ensaio de difração de monocristal. A difração de raios X pelo método de pó é utilizada mais rotineiramente na indústria farmacêutica, uma vez que esta recebe seus insumos na forma de pós (CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009).

Os raios X são difratados pelos cristais porque são ondas eletromagnéticas com comprimento de onda de mesma ordem das distâncias interatômicas (Å). O fenômeno de difração está relacionado com a distância que separa os planos em um cristal, obedecendo a Lei de Bragg (Equação 2). Quando um cristal constituído de planos atômicos sucessivos sofre a incidência de raios X, estes são difratados gerando um ângulo característico (CULLITY, 1978).

$$n \lambda = 2 d \sin\theta, \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

d = a distância entre os planos do cristal

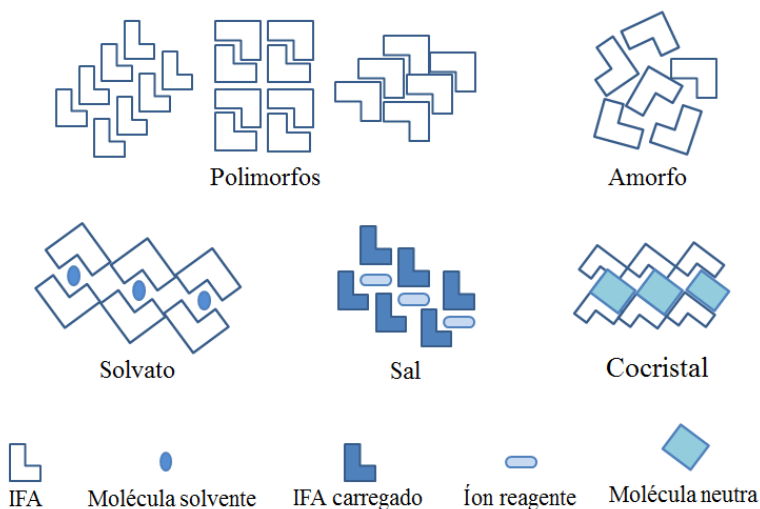
θ = o ângulo de difração dos raios X

λ = o comprimento de onda dos raios X

n = o número de comprimentos de onda utilizados.

A difração de raios X permite a determinação da estrutura cristalina. As posições angulares das reflexões fornecem o tamanho e a geometria da cela unitária, as intensidades relativas desses picos estão associadas ao arranjo dos átomos dentro da cela unitária (CALLISTER; RETHWISCH, 2007). Com relação à apresentação dos fármacos no estado sólido, os sólidos cristalinos multicomponentes (os que contêm mais de uma substância) podem existir como solvatos, sais e cocrystalais (Figura 5). Todos esses compostos podem apresentar polimorfos (CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009; HORST; CAINS, 2008; NANGIA, 2008).

Figura 5. Esquema representativo de possíveis formas sólidas (Adaptação: PRADO, 2012).



Solvatos são sólidos que apresentam moléculas de solvente em sua composição cristalina. Os sais são sólidos iônicos ou eletrovalentes, ou seja, são compostos nos quais, parte ou a totalidade dos hidrogênios ácidos são substituídos por um metal ou um radical que atua como um metal (BERNSTEIN, 2005; AAKERÖY; FASULO; DESPER, 2007). Os cocristais são sólidos cristalinos compostos por duas ou mais moléculas na mesma rede cristalina (AITIPAMULA et al., 2012). Na busca por inovações em fármacos que apresentam baixa solubilidade aquosa, a obtenção de sais e cocristais são frequentes (BERNSTEIN, 2011; WEYNA et al., 2012). E quando grupos ionizáveis estão presentes, a formação de sal é o método mais comumente empregado para a melhoria da solubilidade destes insumos farmacêuticos (KUMAR; AMIN, BANSAL, 2007). É o grau de transferência de próton em um *synthon* ligado a hidrogênio o que determina se um sólido é um cocrystal ou um sal (BRITAIN, 2012). O termo *synthon*, refere-se a unidades estruturais envolvidas em interações intermoleculares que se repetem entre as moléculas e contribuem para a sua estruturação tridimensional (DESIRAJU, 1995).

Os cocristais com frequência apresentam propriedades físicas e químicas melhores em comparação ao fármaco puro e a associação favorável de diferentes entidades químicas sólidas gera efeitos positivos com relação a questões de solubilidade, taxa de dissolução e estabilidade química (SHAN; ZAWOROTKO, 2008; BRAGA et al., 2010; ELDER et al., 2012). Vários estudos têm apresentado a formação de cocristais como estratégia para a área de desenvolvimento tecnológico farmacêutico. Estas novas formas sólidas podem modificar as propriedades físicas e químicas sem afetar seu comportamento farmacológico (SEKHON, 2009).

1.8 Estado Sólido, Química Supramolecular e Engenharia de Cristais

A química do estado sólido é uma área dirigida a aplicar e adaptar princípios físico-químicos a IFAs. As propriedades do estado sólido relacionadas à estrutura cristalina (polimorfos), estabilidade e termodinâmica dos polimorfos, hábito cristalino e tamanho das partículas, possuem importante impacto na solubilidade e estabilidade química dos fármacos (HUANG; TONG, 2004). Estudos recentes estimam que 80 a 90% dos compostos orgânicos podem existir como formas polimórficas, ou seja, apresentarem-se em diferentes formas cristalinas (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

A cristalização é a técnica experimental utilizada para a obtenção destas possíveis diferentes formas sólidas (AALTONEN et al., 2009). E as diferentes condições utilizadas nos métodos de cristalização modificam significativamente as propriedades de estado sólido dos produtos obtidos. As formas físicas possíveis de serem obtidas são materiais cristalinos (polimorfos, solvatos, cocristais) e amorfos, que levam a modificações nas propriedades físico-químicas como ponto de fusão, higroscopicidade e solubilidade, além de impactarem na estabilidade (física e química), nas propriedades mecânicas e na taxa de dissolução com consequências na biodisponibilidade do fármaco (HUANG; TONG, 2004; DATTA; GRANT, 2004; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

A fim de se encontrar novas formas sólidas ou fármacos modificados que apresentem melhoras nas características (estabilidade, processabilidade e dissolução) para o desenvolvimento de formas farmacêuticas inovadoras, um estudo aprofundado da química do estado sólido é necessário. A escolha da forma sólida mais apropriada para formular é, com frequência, um compromisso entre as propriedades físicas, químicas, farmacêuticas e biofarmacêuticas. A forma sólida deve ser monitorada não somente durante o estágio de pré-formulação, mas durante o escalonamento e produção, de modo a detectar o aparecimento de polimorfo (s) e/ou outras modificações críticas para a ação terapêutica. Tal questão é particularmente importante nos fármacos de baixa solubilidade aquosa como os pertencentes às Classes II e IV do BCS. Nestes casos, a solubilidade e/ou a taxa de dissolução são dependentes da forma sólida e, portanto, afetam a biodisponibilidade (AALTONEN et al., 2009).

Para abordar esses desafios na obtenção e estudo de fármacos modificados, a química supramolecular resulta em uma ferramenta muito valiosa já que é o ramo da química que estuda os arranjos moleculares resultantes da associação de duas ou mais espécies químicas, as quais são mantidas juntas por interações intermoleculares (REINHOUDT, 2013). A avaliação destas ligações em solução consiste no denominado reconhecimento molecular, enquanto que o seu estudo no estado sólido recebe o nome de engenharia de cristais (DATA; GRANT, 2004; DESIRAJU, 2007; BLAGDEN et al., 2007; REINHOUDT, 2013).

A engenharia de cristais, através de processos de cristalização, oferece várias possibilidades para a melhoria das propriedades de solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis (DATA; GRANT, 2004; BLAGDEN et al., 2007). Além disso,

esta área da ciência é de grande importância porque estuda as correlações entre as interações intermoleculares, as estruturas cristalinas e as propriedades do estado sólido, de modo a prever materiais com propriedades desejadas (DATA; GRANT, 2004; DESIRAJU, 2007). Em resumo, a engenharia de cristais permite o desenho racional e a síntese de sólidos cristalinos com arranjos específicos dos constituintes moleculares para a obtenção de uma ou mais propriedades desejadas (DATA; GRANT, 2004; BLAGDEN et al., 2007).

A obtenção de fármacos modificados, como polimorfos, solvatos, hidratos, sais, cocristais, etc, que sejam de fácil escalonamento industrial, pode ser de grande interesse para a indústria farmacêutica. Além disso, o conhecimento da química supramolecular e o controle das condições de cristalização permitem a obtenção de formas modificadas com as propriedades desejadas (BLAGDEN et al., 2007).

A mecanoquímica tem sido aplicada com sucesso na obtenção desses sistemas que possuem por base ligações covalentes e supramoleculares. A obtenção de cocristais por moagem é uma área da síntese mecanoquímica de grande interesse e inovação na química e na indústria farmacêutica atual (FRISČIĆ; JONES, 2009; BRAGA et al., 2010). A investigação das ligações de hidrogênio estabelecidas nos cocristais obtidos a partir da moagem de dois ou mais diferentes componentes sólidos foi introduzida por Etter e colaboradores (ETTER, 1991; ETTER; REUTZEL, 1991). É tema de importante e recente revisão (BRITAIN, 2012) além de modelo de estudo aplicado em vários trabalhos (BRAGA; GREPIONI, 2004; BRAGA et al., 2006; FRISČIĆ; JONES, 2009).

Com relação à aplicabilidade dos cocristais na área farmacêutica, métodos vêm sendo desenvolvidos de modo a possibilitar a obtenção e comercialização em escala industrial. Além disso, um número considerável de trabalhos vem sendo publicado com sistemas de grande interesse para o mercado farmacêutico como os cocristais de EFV, carbamazepina, alprazolam (BRITAIN, 2012) e nevirapina (CAIRA et al., 2012).

Além dos processos de obtenção e escalonamento, toda uma avaliação precisa ser realizada com o intuito de se compreender a natureza das interações das ligações de hidrogênio presentes nos cocristais (BRAGA et al., 2010; BRITAIN, 2012).

Para a caracterização desses sistemas, várias técnicas de caracterização como espectroscopia de Raman (RS), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia por hot-stage (HSM), ressonância magnética nuclear no estado sólido (ss-NMR), difração de

raios X pelo método do pó (XRPD) e difração de raios X de monocristal (XRSCD) são utilizadas (BRAGA et al., 2010; BRITAIN, 2012; STEED, 2013). Além das técnicas anteriormente citadas, vale ressaltar a técnica de dissolução intrínseca, que correlacionada com a dinâmica de dissolução *in vivo*, tem sido empregada para a caracterização de fármacos (YU et al., 2004) e a avaliação de diferentes polimorfos e cristais ocultos obtidos por cristalização (KUMINEK et al., 2013; PAULINO et al., 2013). A ampla série de técnicas analíticas descrita é empregada rotineiramente, de modo a analisar e caracterizar também os IFAs (GIRON, 2002; CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

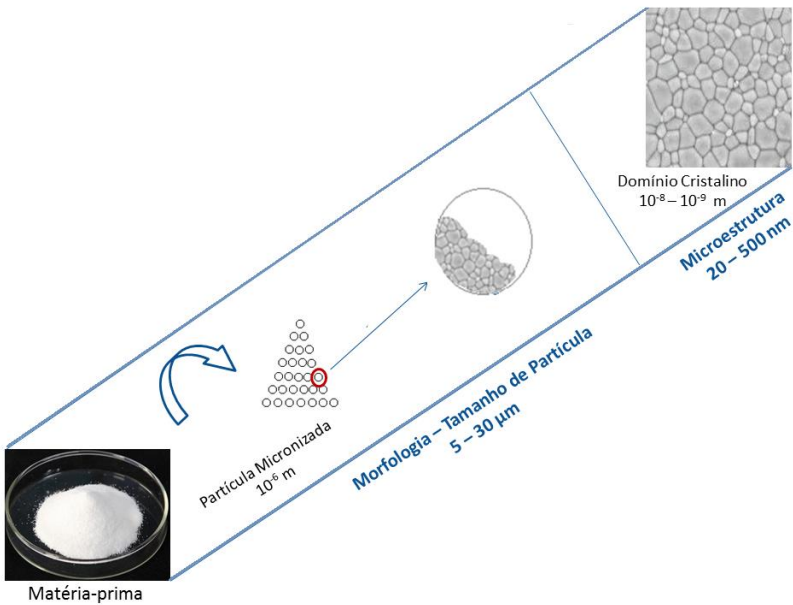
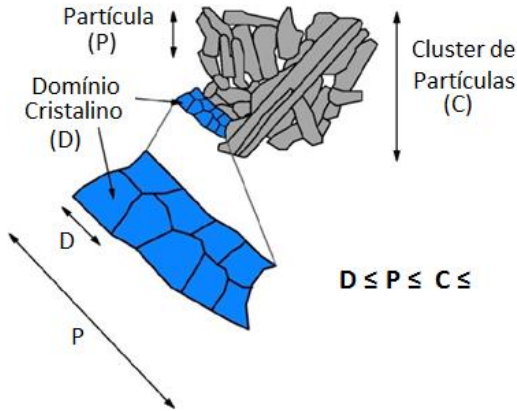
Outra propriedade do estado sólido que necessita de controle e estudo aprofundado na área farmacêutica é a caracterização microestrutural (tamanho de domínio cristalino) dos materiais.

1.9 Microestrutura

O conhecimento da estrutura cristalina de um IFA, associado a outras informações, possibilita explicar possíveis alterações em propriedades como solubilidade/ dissolução e biodisponibilidade, através da observação de diferentes arranjos moleculares da estrutura cristalina de um determinado IFA em relação a outro (BRUNI et al., 2011). Os testes de dissolução são considerados indispensáveis no controle de qualidade de fármacos pertencentes à Classe II e IV do BCS. Para os fármacos de Classe II, a dissolução pode ser a etapa limitante na absorção e a correlação *in vivo-in vitro* (IVIVC) é esperada. A taxa de dissolução intrínseca pode ser melhor correlacionada com a dinâmica de dissolução *in vivo* que a solubilidade e os valores têm sido usados para caracterizar os IFAs, mostrando-se uma ferramenta que auxilia na avaliação e escolha da mais apropriada matéria-prima para formular (CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009).

As alterações no comportamento dos sólidos podem ser diretamente atribuídas ao permanente rearranjo da estrutura cristalina e estrutural das partículas durante processos como a moagem, por exemplo. Os produtos obtidos por meio de processos de alta energia não podem ser caracterizados apenas pela distribuição do tamanho de partícula, a caracterização microestrutural (tamanho de cristalita ou tamanho de domínio cristalino, e *microstrain*) é necessária (POURGHAMRANI et al., 2008). A parte monocristalina dentro da partícula é a definição para o termo cristalita ou domínio cristalino, e pode ser observada na Figura 6.

Figura 6. Representação da microestrutura cristalina (cristalita ou domínio cristalino), da partícula e do tamanho de partícula (Adaptação: FANDARUFF et al., 2015).



A determinação do tamanho da cristalita (ou domínio cristalino) é um dos mais importantes parâmetros que influenciam as propriedades físicas dos materiais (em especial os IFAs micronizados) e a obtenção de materiais nessa escala requer o detalhado controle desse parâmetro (UVAROV; POPOV, 2007). Os efeitos de deformação sofridos pela aplicação de determinada força mecânica (moagem, por exemplo), é o que se denomina *microstrain*. Qualquer "defeito" induzido na amostra provoca deslocamento dos átomos na rede cristalina, o que resulta em alterações na intensidade e/ou no formato das reflexões obtidas por difração de raios X. Os defeitos relacionados ao alargamento das reflexões estão associados primariamente ao menor tamanho de cristalita (ou domínio cristalino) e *microstrain* da rede cristalina (KURLOV; GUSEV, 2007).

Desse modo, o emprego de radiação síncrotron e de softwares como o PM2K, proposto por Scardi e Leoni (SCARDI et al., 2001; LEONI; CONFETE; SCARDI, 2006), possibilitam o completo estudo da microestrutura. A radiação síncrotron consiste na emissão de radiação eletromagnética gerada por aceleração ultrarelativística dos elétrons em uma trajetória curvilínea, o que permite que estas partículas movimentem-se a uma velocidade próxima à velocidade da luz. A radiação é emitida em direção tangencial à trajetória do elétron e abrange uma ampla gama do espectro da região de infravermelho a raios gama passando por raios X (KEMPSON et al., 2005). A emissão de raios X praticamente monocromática e de alta intensidade obtida através do síncrotron permite a medição de padrões de difração de alta resolução e a determinação de parâmetros da célula unitária (estrutura geométrica básica que repetida no espaço gera a rede cristalina) e dos grupos espaciais (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999).

A determinação do tamanho das cristalitas (ou domínios cristalinos) pode ser feita com base na direta observação das partículas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), além da técnica de difração de raios X (UVAROV; POPOV, 2007). Recentemente, progressos têm sido alcançados através da análise do perfil da linha (LPA) obtido por XRPD que fornece profunda compreensão da microestrutura dos pós nanocristalinos, em particular o modelo *Whole Powder Pattern Modelling* (WPPM). Aplicado através do software PM2K, proposto por Scardi e Leoni, esse modelo pode fornecer a completa análise microestrutural de pós finamente divididos com base nos modelos físicos de microestrutura (SCARDI et al., 2001; LEONI; CONFETE; SCARDI, 2006). O poder desse método tem sido mostrado na avaliação da distribuição do tamanho de partícula e nos defeitos da

rede cristalina em metais nanocristalinos obtidos por moinho de bolas (GIUDICE et al., 2005). Outro exemplo é a recente investigação realizada pelo nosso grupo de pesquisa, com relação à avaliação de lotes micronizados de EFV, com diferentes valores para tamanho de domínio cristalino e que apresentaram diferenças significativas nos estudos de dissolução (FANDARUFF et al., 2015).

O processo de micronização é assunto de domínio nas ciências dos materiais, onde a correlação entre microestrutura e desempenho de materiais como cerâmica, metal, e ligas metálicas, tem sido reconhecida (MITEMEIJER, 2010; LI, 2000). No entanto, até este momento nenhum destes conceitos foi devidamente abordado nas ciências farmacêuticas. A avaliação microestrutural é um dos mais importantes parâmetros a influenciar diretamente as propriedades de dissolução dos Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs).

**CAPÍTULO II – EFAVIRENZ
CARACTERIZAÇÃO DE UM POLIMORFO, AVALIAÇÃO DA
BIORRELEVÂNCIA ATRAVÉS DA MICROESTRUTURA E
APLICAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA
COMO FERRAMENTA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE
IFAs**

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento das propriedades do estado sólido é condição essencial para o cumprimento dos regulamentos de produção de novos medicamentos, uma vez que diferentes formas cristalinas, além de outros inúmeros parâmetros do estado sólido, podem influenciar processos e produtos e alterar a biodisponibilidade e a terapêutica. Por isso existe a necessidade de caracterização e investigação das propriedades do estado sólido de qualquer IFA (AALTONEN et al., 2009; CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009).

Análises espectroscópicas, de difração de raios X e análise térmica (GIRON, 2002), assim como medida das taxas de dissolução intrínseca para avaliação das propriedades de dissolução sem interferência dos excipientes (TENHO et al., 2007) são técnicas que, associadas, vêm sendo utilizadas na solução de problemas encontrados pela indústria farmacêutica (GIRON, 2002; NEWMAN; BYRN, 2003; LU; ROHANI, 2009).

Polimorfos, cocristais, solvatos e formas polimórficas anidras têm sido relatados para o EFV (Tabela 2) (MAHAPATRA et al., 2010; RAVIKUMAR et al., 2009; MELO; AMORIM; CIRQUEIRA, 2013; CUFFINI et al., 2009) e, devido à baixa solubilidade em água, diferenças significativas na biodisponibilidade podem ser observadas para as suas várias formas (PEROLD et al., 2012). Entretanto, a investigação a respeito da estabilidade termodinâmica, da melhoria das propriedades de dissolução e dos efeitos de morfologia nos resultados de velocidade de dissolução intrínseca para as formas citadas têm sido muito pouco relatadas. Até mesmo a nomenclatura utilizada para a denominação de tais formas tem sido apresentada de forma confusa. Assim, pela primeira vez, é apresentada a completa revisão da nomenclatura das diversas formas polimórficas do EFV. Todas as denominações existentes para polimorfos, cocristais e solvatos de EFV são apresentadas (Tabela 2) com o objetivo de servir como fonte de pesquisa e esclarecimento.

Tabela 2. Denominações e características cristalográficas encontradas na literatura para polimorfos, cocristais e solvatos de EFV.

Polimorfos	Polimorfo I*	Polimorfo II**	Polimorfo Ia*	Polimorfo III [#]
		Ortorrômbico P ₂ ₁ 2 ₁ 2 250 K	Ortorrômbico P ₂ ₁ 2 ₁ 2 ₁ 294 K	Monoclínico P ₂ ₁ 198 K
Cocristais com 1 [#]		Cocristais com 2 [#]		
Cocristais	Forma II*	Forma IIa*	Forma III*	Forma IV*
	Monoclínico C2 298 K	Monoclínico C2 150 K baixa temperatura	Monoclínico C2 150 K baixa temperatura	Triclínico P1 298 K
Solvatos	Hidratos*		Cloridratos ^{##}	
	Ortorrômbico P ₂ ₁ 2 ₁ 2 ₁ 294 K		Ortorrômbico P ₂ ₁ 2 ₁ 2 ₁ 120 K	

Primeiramente relatados por:

*MAHAPATRA et al., 2010;

**RAVIKUMAR; SRIDHAR, 2009;

[#]MELO; AMORIM; CIRQUEIRA, 2013;

^{##}CUFFINI et al., 2009.

Um dos objetivos desse capítulo consistiu em caracterizar os polimorfos I e II de EFV (este último obtido experimentalmente), determinar a forma mais estável termodinamicamente e investigar as propriedades de dissolução do polimorfo obtido, frente àquele utilizado atualmente pela indústria para formular. Estes resultados encontram-se publicados no *periódico Crystal Growth & Design*, sendo o manuscrito intitulado *Polymorphism of Anti-HIV Drug Efavirenz: Investigations on Thermodynamic and Dissolution Properties* (Apêndice A).

Para fármacos pouco solúveis como o EFV, as características do estado sólido como estrutura cristalina, polimorfismo, distribuição de tamanho de partícula, densidade aparente e fluidez são cuidadosamente monitoradas através dos protocolos de controle das propriedades do

estado sólido. Entretanto, outras propriedades precisam ser investigadas para a compreensão dos resultados dos ensaios *in vitro* – os testes de dissolução – e dos ensaios *in vivo* – os estudos de bioequivalência.

A produção de EFV genérico segue as regulamentações nacionais e internacionais e neste contexto o teste de bioequivalência é a mais importante ferramenta no controle de qualidade para o processo de desenvolvimento e registro do produto de modo a assegurar a sua eficácia terapêutica (EUROPEAN MEDICINE AGENCY, 2010; BRASIL, 1999). Mas, mesmo quando as propriedades do estado sólido foram rigorosamente controladas, assim como a pureza, os resultados de bioequivalência mostraram diferenças significativas entre as amostras administradas a voluntários saudáveis nos estudos de bioequivalência. E este foi o caso para dois lotes de EFV utilizados nos estudos de bioequivalência e avaliados neste trabalho, com um lote aprovado e o outro reprovado (FANDARUFF et al., 2015).

Então, porque em lotes que são micronizados e que cumprem as condições aceitáveis com relação à distribuição de tamanho de partícula, observou-se um lote biodisponível e outro não? E o que esperar dos lotes que se comportam como bioequivalentes, com base no parâmetro de distribuição de tamanho de partícula, e de outras propriedades do estado sólido conhecidas? Informações relevantes podem ser obtidas por meio do estudo detalhado dos processos de micronização, em particular, dos efeitos mecânicos na microestrutura dos IFAs. Na área das Ciências dos Materiais, em classes como cerâmica, metal e aço, a correlação entre a microestrutura e o desempenho dos materiais é comum (MITTEMEIJER, 2010; LI, 2000). No entanto, estes conceitos não têm sido introduzidos e discutidos nas Ciências Farmacêuticas.

Desse modo, o presente capítulo teve como objetivo avaliar a microestrutura do EFV, uma propriedade do estado sólido de considerável relevância para a indústria farmacêutica, de modo a explicar o comportamento do fármaco frente às análises de dissolução e os resultados dos estudos de bioequivalência. Os resultados obtidos nesse estudo encontram-se publicados no periódico *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, intitulado: *Correlation between microstructure and bioequivalence in Anti-HIV Drug Efavirenz* (Apêndice B).

Na busca por resultados que pudessem prever o comportamento de matérias-primas de EFV (em nível laboratorial), com base na sua microestrutura, as propriedades de dissolução dos diferentes lotes do fármaco foram investigadas também, pelo método de velocidade de dissolução intrínseca (MVDI). O teste de dissolução

intrínseca consiste na avaliação da taxa de dissolução de um insumo farmacêutico ativo onde as condições de área superficial, temperatura e agitação são mantidas constantes. Este método é uma ferramenta extremamente útil para a avaliação das propriedades do estado sólido como polimorfismo e estrutura cristalina (BRITAIN, 2009; CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009). É de grande relevância no controle de qualidade de IFAs e está descrito em vários compêndios oficiais como a Farmacopeia Americana (no capítulo geral <1087>) (USP, 2007). O teste é realizado em um dissolutor convencional e o Aparato pode ser o disco rotatório ou o disco estático (CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009). A técnica de dissolução intrínseca evita os efeitos de tamanho de partículas através do processo de compactação da matéria-prima (BRITAIN, 2009). Assim, a avaliação da correlação entre a microestrutura (em termos de tamanho de domínio cristalino) de diferentes lotes de EFV com os valores de taxa de dissolução intrínseca (IDR), a fim de se obter uma profunda compreensão da qualidade de diferentes matérias-primas foi realizada. A análise de dois diferentes polimorfos de EFV comprovou a capacidade do MVDI desenvolvido em diferenciar polimorfos, conforme já estabelecido pela literatura e referenciado anteriormente. Além disso, o MVDI mostrou-se capaz de diferenciar matérias-primas de EFV com diferentes tamanhos de domínio cristalino.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Material

Os IFAs de EFV utilizados neste estudo foram fornecidos por laboratórios públicos brasileiros, o Laboratório Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, LAFEPE. Todas as amostras eram micronizadas e correspondiam ao polimorfo I.

Seis lotes do polimorfo I foram caracterizados através de algumas das técnicas descritas no item 2.2.2 para a avaliação do impacto da microestrutura na bioequivalência do EFV.

O polimorfo II foi recristalizado a partir do polimorfo I conforme descrito no item 2.2.1. Ambos foram caracterizados, comparados e avaliados com relação à estabilidade termodinâmica e à velocidade de dissolução intrínseca.

Solventes e reagentes de grau analítico foram utilizados em todas as análises.

2.2 Métodos

2.2.1 Processo de Obtenção de um polimorfo de EFV

A busca por um polimorfo de EFV teve como base a mesma concentração de trabalho utilizada (20 mg/ mL) por Mahapatra e colaboradores para a obtenção de formas cristalinas de EFV. Metanol foi o solvente utilizado em substituição ao ciclohexano empregado pelos autores (MAHAPATRA et al., 2010). Aproximadamente 1000 mg de EFV (polimorfo I) foi dissolvido em metanol sob agitação. A solução foi transferida para um balão volumétrico, mantida em repouso por 15 minutos e então o volume foi completado com metanol para 50 mL. Transferida para um béquer, a solução foi mantida à temperatura de 4 °C por 7 dias. Os cristais obtidos apresentaram-se na forma de agulhas e foram denominados polimorfo II.

2.2.2 Técnicas de Caracterização do Estado Sólido

2.2.2.1 Radiação Síncrotron

A radiação síncrotron foi utilizada para a análise estrutural e microestrutural. As medidas foram realizadas na linha MCX do Síncrotron Elettra – Síncrotrone de Trieste, na Itália. Seis lotes de EFV foram medidos, em duplicata, em capilares *Kapton*. As informações estruturais foram obtidas com a utilização do software TOPAS® (BRUKER-AXS; CHEARY; COELHO, 1992). Todas as amostras foram identificadas como EFV polimorfo I, com grupo espacial $P2_12_12$ e parâmetros de cela: $a = 16,781$ (Å), $b = 27,258$ (Å) e $c = 9,698$ (Å) (informações coletadas a 250 K) (MAHAPATRA et al., 2010). Esta informação estrutural foi utilizada como modelo inicial no refinamento das informações coletadas a 298 K, obtendo-se, $a = 16,88(1)$ (Å), $b = 27,335(5)$ (Å), $c = 9,765(2)$ (Å), onde o número entre parênteses corresponde ao desvio padrão da distribuição dos valores nos seis lotes.

2.2.2.2 Difração de raios X utilizando o método do Pó (XRPD)

Para o estudo dos polimorfos I e II de EFV, os padrões de difração de raios X pelo método do pó foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Difração de Raios X do Departamento de Física da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os padrões de difração de raios X pelo método do pó foram medidos à temperatura ambiente e à alta temperatura (25 a 134 °C) no estudo dos polimorfos de EFV. As medidas foram realizadas em difratômetro XPERT (Xpert Pro Multi-Purpose Diffractometer, Pan Analytical) operando com 40 kV, corrente de 45 mA e equipado com tubo de raios X com ânodo de cobre, $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). À temperatura ambiente, os difratogramas foram coletados em varredura 2θ entre 5 e 45° para os polimorfos I e II. As etapas de aquecimento foram realizadas em câmara AntonPaar HTK16, entre 4 e 26° e com razão de aquecimento de 10 °C/ min até a temperatura desejada. Utilizou-se passo de 0,008° e tempo de 20 segundos por passo. A coleta da radiação difratada foi feita com um detector linear (tecnologia Real Time Multiple Strip RTMS).

No estudo da avaliação microestrutural dos seis lotes de EFV, os padrões de difração de raios X foram coletados na Università di Trento, na Itália, em equipamento de modelo idêntico ao referenciado anteriormente. À temperatura ambiente, os difratogramas foram coletados em varredura 2θ entre 5 e 30° e passo de 0,033° com tempo de varredura de 45 segundos para cada amostra.

2.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As análises de SEM foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) em microscópio da Philips, modelo XL 30. Duas amostras de EFV (polimorfos I e II), assim como os 6 diferentes lotes do fármaco, foram avaliados com relação à morfologia através da microscopia eletrônica de varredura. Aumentos de 5000 e 100 vezes foram utilizados para a avaliação dos polimorfos I e II, respectivamente, enquanto os 6 lotes micronizados foram analisados em aumento de 3000 vezes. As amostras foram dispersas em fita adesiva dupla face e recobertas com filme de ouro no *stub* porta amostra. A voltagem de aceleração do feixe primário foi de 15 kV.

2.2.2.4 Espectroscopia Raman (RS)

As medidas de Raman foram obtidas no Laboratório de Síntese e Caracterização de nanomateriais (LSCnM) do Departamento de Física da UFSC em equipamento dispersivo Peak Seeker 785 (RAM-PRO-785) com resolução espectral de 6 cm^{-1} . O equipamento operou com laser diodo de 785 nm e potência de 100 mW na fonte. A luz laser foi focalizada sob a amostra através de lente objetiva de 20x e gerou um

campo de análise de aproximadamente 2 μm de diâmetro. As amostras foram analisadas sobre lâminas de vidro. A radiação Raman coletada foi dispersa em uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplada) refrigerada por efeito termo-elétrico. Os espectros foram coletados à temperatura ambiente, intervalo de 180 a 2000 cm^{-1} e tempo de aquisição de 30 segundos.

2.2.2.5 Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos no Laboratório de Química Farmacêutica da UFSC em equipamento Prestige-21 da Shimadzu. As amostras foram misturadas a brometo de potássio (KBr) e analisadas na faixa espectral de 4000 a 600 cm^{-1} para os polimorfos I e II e na faixa de 4000 a 1000 cm^{-1} para a avaliação dos 6 lotes micronizados de EFV.

2.2.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC do EFV foram obtidas no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC em célula DSC-60 (Shimadzu). Foram utilizados cadinhos de alumínio hermeticamente fechados com aproximadamente 2 mg de amostra. Trabalhou-se com atmosfera dinâmica de Nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Um cadinho de alumínio vazio e hermeticamente fechado foi utilizado como referência. O equipamento foi previamente calibrado com índio. Ciclos únicos de aquecimento na faixa de temperatura de 30 a 350 $^{\circ}\text{C}$ foram utilizados para a avaliação dos polimorfos I e II de EFV, enquanto para os 6 lotes micronizados as análises foram feitas entre 25 e 350 $^{\circ}\text{C}$. Os dados obtidos foram processados em software TA-60.

2.2.2.7 Termogravimetria (TG)

As curvas de TG foram obtidas no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC em termobalança modelo TGA-50 (Shimadzu), utilizando-se cadinho de platina aberto. Aproximadamente 4,5 mg de cada amostra, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min), e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ foi avaliada no intervalo de temperatura de 25 a 350 $^{\circ}\text{C}$. Estes parâmetros foram utilizados tanto para a avaliação dos polimorfos I e II quanto para os 6 lotes micronizados do fármaco.

2.2.2.8 Microscopia Hot-Stage (HSM)

Para os polimorfos I e II do EFV as análises de HSM foram realizadas em Laboratório Multiusuário do Departamento de Física da UFSC. Os eventos térmicos foram observados em microscópio Olympus BX50 equipado com Hot-Stage Mettler Toledo FP-82. As amostras colocadas em lâmina de vidro cobertas com lamínula foram submetidas ao intervalo de temperatura de 60 a 139 °C com razão de aquecimento de 5 °C/min.

2.2.2.9 Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido

As análises de ressonância magnética nuclear no estado sólido para os polimorfos I e II de EFV foram realizadas na Universidade Nacional de Córdoba, Argentina.

Os espectros de carbono (^{13}C) de alta resolução foram adquiridos pela técnica de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (CP/MAS) com desacoplamento de prótons durante a aquisição. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente em espectrômetro Bruker Avance II operando a 300,13 MHz para prótons e equipado com sonda MAS de 4 mm. A frequência de operação para prótons e carbonos foi de 300,13 e 75,47 MHz, respectivamente. Adamantano foi utilizado como referência externa para o espectro de carbono (^{13}C) e para alcançar a condição de Hartmann-Hahn nas medidas de polarização cruzada (CP). A taxa de rotação foi de 10 kHz e o número de transientes de 1024 para o polimorfo II e 2048 para o polimorfo I, de modo a obter uma adequada proporção de sinal/ ruído. Os tempos de reciclagem, de contato durante a polarização cruzada (CP) e de aquisição foram de 6s, 2,0 ms e 41 ms respectivamente, para todas as amostras. A sequência SPINAL 64 foi utilizada para desacoplamento durante a aquisição com um campo de prótons H^1_{H} satisfazendo $\omega^1_{\text{H}}/(2\pi) = \gamma_{\text{H}^1_{\text{H}}}/(2\pi) = 78,2$ kHz. O espectro de carbono quaternário foi adquirido por supressão de carbonos não quaternários (NQS). Os campos de rádio-frequência de ^1H e ^{13}C foram removidos durante 40 μs após a polarização cruzada (CP) e antes da aquisição. Esse retardo permitiu o decaimento da magnetização do carbono devido ao acoplamento bipolar $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$, resultando em espectros nos quais CH e CH_2 foram removidos. Este experimento permitiu a identificação dos sinais de carbono quaternário.

2.2.2.10 Distribuição de Tamanho de Partícula

As medidas de distribuição de tamanho de partícula foram realizadas no Laboratório de Estudos do Estado Sólido de Farmanguinhos, Rio de Janeiro. A análise dos 6 lotes micronizados de EFV foi realizada por difração a laser, utilizando-se a via úmida (Malvern Mastersizer 2000, Hydro 2000 SM, Worcestershire, UK). Aproximadamente 10 mg de amostra foi dispersa em 10 mL de solução de polisorbato 80 (0,02% (w/ v)). Um volume de 100 mL de água foi utilizado como meio dispersante e a mistura agitada a 2,000 rpm. Através desta técnica foram obtidos os valores de $d[3, 2]$, $d[4, 3]$ e Span. O valor de $d[3, 2]$ equivale à média da distribuição do tamanho de partículas medida, pela sua superfície. O $d[4, 3]$ é o valor de média da distribuição do tamanho de partículas medida, pelo seu volume. O Span é a medida da largura da distribuição de tamanho de partícula (quanto mais estreita a distribuição menor o valor de Span). Nas análises descritas, empregou-se para o Span a definição de Glover e colaboradores (GLOVER et al., 2008), segundo a qual o valor de Span corresponde à diferença entre o diâmetro das partículas a 10 e a 90% do volume acumulado, $d(0,1)$ e $d(0,9)$ respectivamente, dividido pelo valor de $d(0,5)$, ou seja, $d(0,5)$: $\text{Span} = [d(0,9) - d(0,1) / d(0,5)]$.

2.2.3 Técnicas de Caracterização das Propriedades de Dissolução

2.2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises de HPLC foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC em cromatógrafo Shimadzu LC 10AT equipado com degaseificador DGU-10AL, detector UV-VIS (Shimadzu SPD-10AV) fixado em 252 nm e auto-injetor Rheodyne 7125. Os cromatogramas foram obtidos através do software CLASS-VP (version RV 6.14). De acordo com o *Authorized USP Pending Standard* para o efavirenz, publicado em 2007, utilizou-se coluna C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel acetonitrila: tampão acetato de amônio pH 7,5 (50:50 v/v), fluxo de 1 ml/ min e volume de injeção de 20 μ L (USP's Pending Standards Guideline, 2007).

2.2.3.2 Dissolução por Dispersão

As análises de dissolução por dispersão para os 6 lotes micronizados de EFV, foram realizadas no Laboratório de Controle de

Qualidade da UFSC em dissolutor VARIAN modelo VK 7000. Utilizou-se Aparato 2 (USP), rotação de 75 rpm e temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Para a avaliação de cada amostra 200 mg de fármaco foram adicionados a 300 mL de meio de lauril sulfato de sódio (LSS) 0,25%. Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min com posterior reposição do meio de forma a manter o volume constante. As alíquotas foram analisadas por HPLC conforme descrito no item 2.2.3.1. A DE foi calculada como a área sob a curva de dissolução proposto por Khan e Rhodes (KHAN; RHODES, 1975). A razão entre a área sob a curva de dissolução compreendida entre 0 e 120 min e a área total do retângulo definida pela ordenada (percentual máximo dissolvido) e pela abcissa (120 min) fornece o valor de DE conforme a Equação 3. As áreas sob a curva foram calculadas através do software *GRAPH PAD PRISM INSTAT Program* (San Diego, CA, USA).

$$DE (\%) = ASC_{0-120 \text{ min}} \times 100 / ASC \text{ Total} \quad (\text{Equação 3})$$

A DE foi calculada para comparar o desempenho relativo dos 6 lotes e os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão. Comparações estatísticas foram feitas a partir da regressão linear através do software *GRAPH PAD PRISMA*.

2.2.3.3 Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação quantitativa de EFV no teste de dissolução intrínseca

Devido ao fato de que a validação é um procedimento analítico necessário para o desenvolvimento do trabalho experimental proposto, os resultados da validação serão apresentados nesta seção em conjunto com os métodos, e não na seção Resultados como de costume.

Três matérias-primas de EFV (teor $\geq 99,5\%$) identificadas por A, B e C (polimorfo I) foram utilizadas no desenvolvimento e validação do método para a determinação quantitativa de EFV no teste de dissolução intrínseca. Os reagentes acetonitrila (TediaBrazil[®], lote 1003127), acetato de amônio (Synth[®], lote 56071) e lauril sulfato de sódio (LSS) (Vetec[®], lote 0608025) utilizados eram de grau HPLC. A água ultrapura grau I utilizada foi filtrada através de membrana Millipore[®] 0,22 μm (Milli-Q System, Massachusetts, USA).

Diferentes meios de dissolução em LSS (LSS 0,25, LSS 0,5 e LSS 1,0%) foram preparados, aquecidos em banho ultrasônico a $37^\circ\text{C} \pm 0,5$ e avaliados em triplicata. LSS 0,25% encontra-se no limite da

concentração micelar crítica (CMC) e foi o meio selecionado para as análises. A CMC é a concentração na qual a formação de micelas tem início (ZDZIENNICKA et al., 2012).

O método de velocidade de dissolução intrínseca (MVDI) proposto foi validado de acordo com as especificações da USP 2007, do ICH Q2 (R1) (*International Conference on Harmonization*, 2005) e da ANVISA (RE nº 899 de 2003) (ANVISA, 2003). Os parâmetros analisados foram linearidade, especificidade, precisão, exatidão e estabilidade da amostra em solução, assim como os limites de detecção e quantificação.

✓ Linearidade: determinada pela análise de oito concentrações de EFV na faixa de 0,5 – 25,0 µg/mL, em triplicata e em três dias diferentes. Estas soluções foram preparadas a partir da solução estoque de EFV em fase móvel a 100 µg/mL. As diluições para o preparo das cinco concentrações foram feitas em LSS 0,25%. A linearidade foi avaliada pela análise de regressão linear e pela análise de variância (ANOVA) (Microsoft Office Excel 2007).

✓ Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ): calculados a partir da reta obtida na linearidade. Os LD e LQ correspondem a 3,3 r/S e 10 r/S, respectivamente, onde r é o desvio padrão do intercepto e S é a inclinação da reta obtida (ANVISA, 2003). O valor calculado foi confirmado experimentalmente.

O método mostrou-se linear com coeficiente de correlação de 0,9918 e equação da reta $y = (31892 \pm 1212)x - (14904 \pm 2331)$. Os valores obtidos para os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram 0,24 µg/mL e 0,73 µg/mL, respectivamente.

✓ Especificidade: avaliada em triplicata e em três dias consecutivos, por meio da comparação dos cromatogramas obtidos para a solução estoque diluída em fase móvel e em seguida, em LSS 0,25%, e para a solução de LSS 0,25% utilizada como meio de dissolução durante os ensaios.

O método foi considerado seletivo e específico. Não houve interferência do LSS 0,25% no pico do EFV.

✓ Precisão: determinada pela medida da precisão intermediária e da repetibilidade. Amostras de EFV em LSS 0,25% na concentração de 100,15 µg/mL foram avaliadas em triplicata em diferentes dias para a determinação da precisão intermediária, e seis determinações foram

realizadas para a repetibilidade em um único dia e sob as mesmas condições experimentais. Os resultados foram expressos em percentual de desvio padrão relativo (RSD).

Os resultados obtidos para a repetibilidade e para a precisão intermediária mostraram boa precisão do método e estão de acordo com a normativa estabelecida pela ANVISA 2003 (não são admitidos valores superiores a 5%) (BRASIL, 2003). A Tabela 3 apresenta os resultados expressos como desvio padrão relativo (RSD).

Tabela 3. Valores de precisão intermediária (precisão inter-dia) e de repetibilidade (intra-dia) para o EFV, expressos como média e desvio padrão relativo (RSD).

Precisão	Média ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm s	RSD
Intra-dia n=6	21,7 \pm 0,9	4
Inter-dia n=6	21 \pm 1	5

✓ Exatidão: verificada pelo teste de recuperação de quantidades conhecidas de EFV adicionadas ao meio de dissolução (ICH, 2005). Alíquotas correspondentes a 80, 100 e 120% da concentração teórica de EFV foram transferidas para balões volumétricos de 200 mL e os volumes foram completados com LSS 0,25%. Cada concentração foi avaliada em duplicata. As amostras foram transferidas para o dissolutor utilizando-se Aparato pá, temperatura de $37 \pm 0,5$ °C e rotação de 75 rpm. Após 4 horas de ensaio, alíquotas de 5 mL foram retiradas de cada cuba e analisadas por HPLC. As análises foram feitas em triplicata e em três dias consecutivos.

Os resultados obtidos para a exatidão (Tabela 4) apresentaram-se dentro dos limites especificados para a dissolução (95 – 105%) (USP, 2007) e foram reportados como percentual recuperado \pm desvio padrão. Análises estatísticas não mostraram diferenças entre os valores adicionados e os valores recuperados obtidos experimentalmente.

Tabela 4. Valores de concentração teórica, concentração experimental e percentual de recuperação na avaliação da exatidão para o EFV.

Concentração nível (%)	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
80	16,2 \pm 0,1	16,4 \pm 0,3	102 \pm 2
100	20,1 \pm 0,2	20,0 \pm 0,5	99 \pm 3
120	24,1 \pm 0,1	24,9 \pm 0,2	103,3 \pm 0,4

✓ Estabilidade da amostra em solução: avaliação da estabilidade de soluções de EFV em 200 mL de LSS 0,25% (20 $\mu\text{g/mL}$), 75 rpm, temperatura de 37 \pm 0,5 $^{\circ}\text{C}$ e Aparato 2. O ensaio de dissolução foi realizado por 6 horas nas condições previamente especificadas para a completa dissolução das amostras nas cubas. A partir de então, alíquotas foram retiradas e avaliadas nos tempos de 6 e 24 horas à temperatura ambiente. A alíquota retirada no tempo de 24 horas foi armazenada em geladeira por mais 24 horas. Todas as amostras foram avaliadas por HPLC conforme o teor e o surgimento de produtos de degradação.

O fármaco mostrou-se estável nas condições analisadas. Os resultados de percentual de degradação obtidos para cada tempo avaliado foram comparados à concentração da solução inicial (Tabela 5). Nenhuma evidência de degradação foi observada já que os valores mantiveram-se dentro do intervalo de 98 a 102% conforme estabelecido pela USP para os ensaios de dissolução (USP, 2007).

Tabela 5. Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade do EFV em solução, expressos em concentração de fármaco em solução e percentual. Comparou-se a concentração no tempo zero com as concentrações nos tempos de 6 e 24 horas, este à temperatura ambiente e sob refrigeração.

Tempo	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Fármaco (%)
6 h	19,4	98,06
24 h	19,5	98,05
24 h (Refrigerado)	19,7	98,03

2.2.3.4 Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI)

Os testes de VDI para os polimorfos I e II de EFV foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC. Os polimorfos I e II foram comparados esperando-se demonstrar a capacidade do MVDI de diferenciar polimorfos conforme preconizado pela literatura (CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009; BRITAIN, 2009). Todos os lotes do polimorfo I (lotes 1, 2, 3, 4, 5 e 6) foram avaliados com a intenção de se demonstrar a capacidade do método desenvolvido em diferenciar tamanhos de domínio cristalino. Utilizou-se o Aparato de Woods modificado (Aparato do disco rotatório) com cavidade de 8 mm de diâmetro (área superficial de $0,5 \text{ cm}^2$), de acordo com a USP 32 (USP, 2009). O método para quantificar EFV na determinação da taxa de dissolução intrínseca foi otimizado e validado conforme descrito no item 2.2.3.3. Aproximadamente 100 mg de amostra foi pesada e compactada em prensa Asta[®], aplicando-se uma força de 400 kgf. Este método seguiu especificações da USP30-NF25 1087 de dissolução intrínseca (USP, 2007). Os efeitos de pressão foram controlados por DSC e XRPD de modo a confirmar ausência de transição polimórfica. Os ensaios foram realizados em 200 mL de LSS 0,25% (w/v) aquecido a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Com o objetivo de assegurar condições *sink*, a concentração de saturação foi avaliada até 96 horas. As análises foram feitas utilizando-se o Aparato 2 (USP) com velocidade de rotação de 75 rpm. Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min para o polimorfo I e até 90 min para o polimorfo II com posterior reposição de meio. As amostras foram analisadas por HPLC conforme item 2.2.3.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização Físico-química dos Polimorfos I e II de EFV

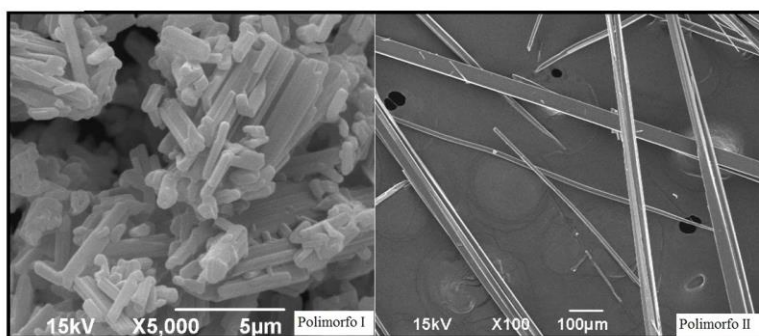
A compreensão da influência causada pelas características do estado sólido em propriedades como solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade, entre inúmeras outras, é hoje primordial para o controle de qualidade e seleção dos IFAs nas etapas de pré-formulação e desenvolvimento de novos produtos (DATTA; GRANT, 2004; TONG; HUANG, 2004; AALTONEN et al., 2009; CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009).

Considerando-se que um dos objetivos deste capítulo foi avaliar as propriedades do polimorfo II de EFV, obtido experimentalmente,

frente ao polimorfo I, utilizado atualmente pela indústria para formular, realizou-se a caracterização físico-química de ambas as formas.

Informações referentes às características de superfície e morfologia podem ser obtidas através da técnica de SEM (VERNON-PARRY, 2000). A Figura 7 apresenta a morfologia dos polimorfos I e II de EFV através de SEM. As imagens foram feitas com ampliação de 100x para o polimorfo II e de 5000x para o polimorfo I. O polimorfo I é a matéria-prima micronizada, enquanto o polimorfo II é a forma recristalizada, e por isso, diferentes ampliações foram utilizadas. Formas regulares com aspecto columnar foram observadas para EFV polimorfo I (USP, 2007), enquanto a imagem do polimorfo II mostrou cristais na forma de agulhas.

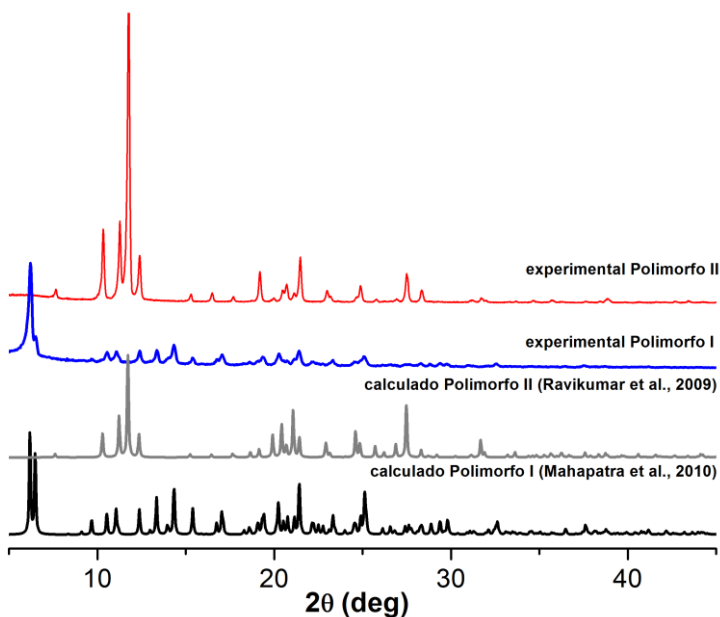
Figura 7. Imagens obtidas por SEM para os polimorfos I e II de EFV.



A XRPD é a técnica “ouro” para a caracterização dos IFAs com relação à determinação da estrutura cristalina e diferenciação de polimorfos. A XRPD fornece a “impressão digital” da amostra, sendo única para cada insumo avaliado (RODRÍGUES-SPONG et al., 2004). Um material sólido cristalino possui os átomos ordenados em planos cristalinos separados por distâncias interplanares de mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Quando o feixe de raios X incide na amostra cristalina, interage com os elétrons dos átomos e dá origem ao fenômeno de difração (DINNEBIER, R. E.; BILLINGE, S. J. L., 2008). A Figura 8 mostra a comparação entre os padrões de difração experimental e calculado para os polimorfos I e II de EFV. A comparação entre o padrão de difração de raios X obtido experimentalmente para o polimorfo I e a estrutura calculada por

Mahapatra e colaboradores (MAHAPATRA et al., 2010) mostrou a mesma estrutura cristalina. Do mesmo modo, a comparação entre a estrutura cristalina do polimorfo II obtido experimentalmente e aquela descrita por Ravikumar e Sridhar (RAVIKUMAR; SRIDHAR, 2009) confirmou estrutura cristalina idêntica.

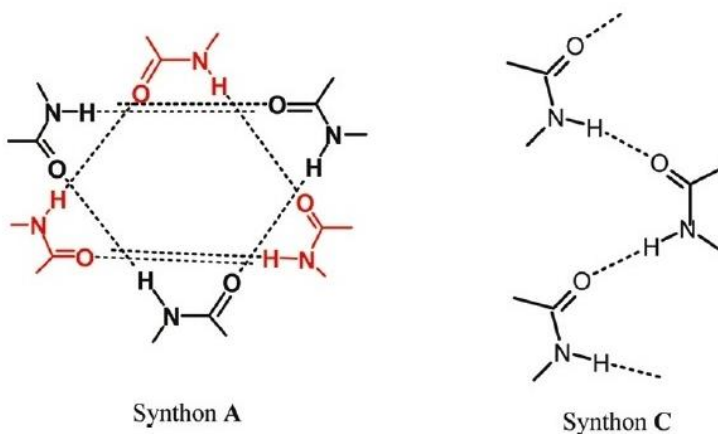
Figura 8. Comparação entre os padrões de difração de raios X (método do pó) experimentais e calculados para os polimorfos I e II de EFV.



As diferenças observadas nas intensidades, entre os difratogramas experimentais e calculados podem ser associadas à orientação preferencial. O polimorfo I cristaliza no grupo espacial $P2_12_12$ com três moléculas na unidade assimétrica (MAHAPATRA et al., 2010). Na estrutura resolvida por Ravikumar e Sridhar (RAVIKUMAR; SRIDHAR, 2009) e nomeada neste trabalho como polimorfo II, as moléculas cristalizam no grupo espacial $P2_12_12_1$. Um terceiro polimorfo reportado por Melo e colaboradores (MELO et al., 2013) (Tabela 2) e nomeado aqui como polimorfo III cristaliza no grupo espacial $C2$. O polimorfo III possui o maior valor para a densidade, $d = 1.501 \text{ g/cm}^3$ (MELO et al., 2013), seguido pelo polimorfo II, $d = 1.486$

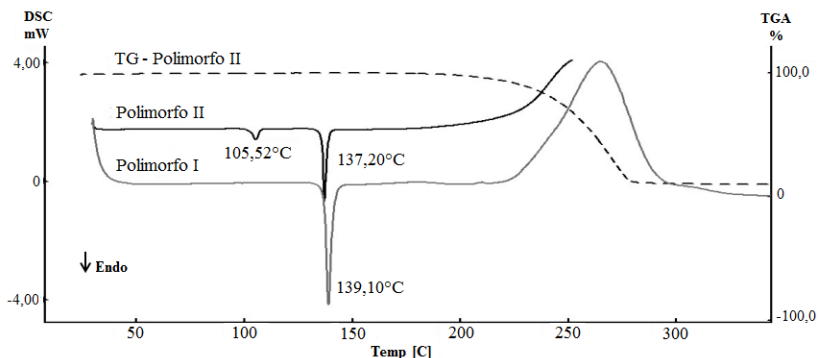
g/ cm³ (RAVIKUMAR; SRIDHAR, 2009), e polimorfo I, $d = 1.395$ g/ cm³ (MAHAPATRA et al., 2010). O polimorfo I contém uma conformação tipo *Synthon A* (MAHAPATRA et al., 2010), enquanto nos polimorfos II e III o *Synthon C* está presente (MELO et al., 2013) (Figura 9). A conformação tipo *Synthon C* justifica a mais alta densidade dos polimorfos II e III, assim como o *Synthon A* explica o notável grau de desordem conformacional no polimorfo I (MAHAPATRA et al., 2010).

Figura 9. *Synthon A* e *Synthon C* reportados por Mahapatra e colaboradores. O polimorfo I de EFV possui o *Synthon A* enquanto os polimorfos II e III apresentam o *Synthon C*.



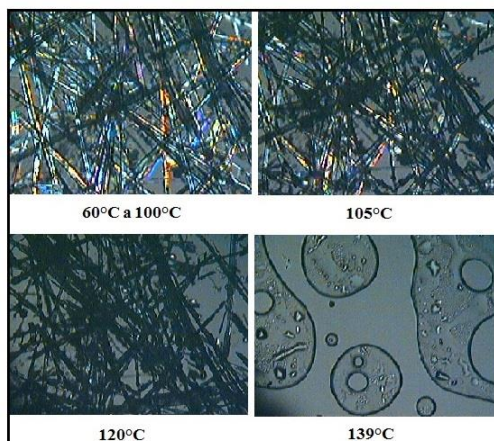
A informação obtida por DSC para o polimorfo I de EFV está de acordo com o preconizado pela literatura, (Figura 10), a qual estabelece ponto de fusão entre 138 – 140 °C (MAHAPATRA et al., 2010). Outras matérias-primas avaliadas em outros estudos apresentaram valores de 138,6 °C (FANDARUFF et al., 2014) e 137 °C (COSTA et al., 2013). Para o polimorfo II, observa-se ponto de fusão em 137,20 °C e, além disso, a presença de uma endoterma em 105,52 °C. A presença desta endoterma sugere que ambos os polimorfos apresentam uma transição sólido-sólido, uma vez que foi demonstrado pela análise termogravimétrica que a amostra não contém qualquer solvente residual e nenhuma perda de massa foi observada.

Figura 10. Curvas de DSC e TG dos polímeros I e II de EFV, obtidas em atmosfera de N_2 (50 mL/ min) e razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.



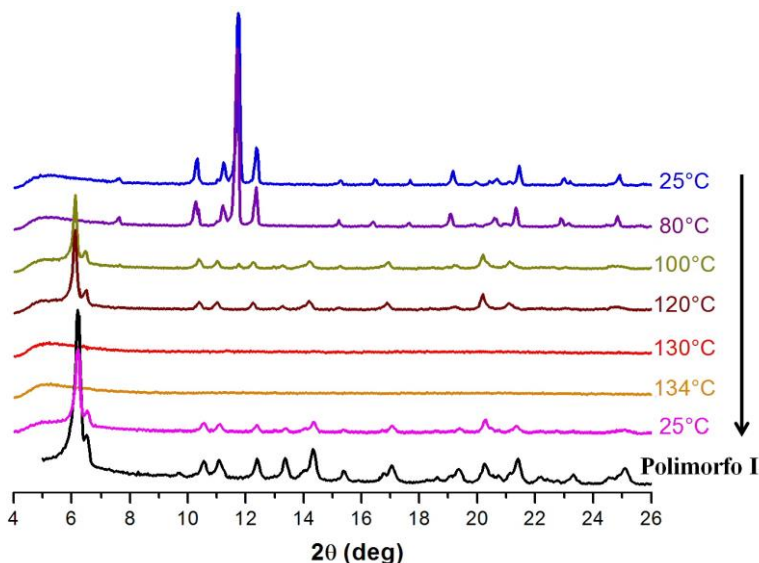
A transição polimórfica foi confirmada com o emprego das técnicas de HSM e difração de raios X com temperatura. O evento de fusão não foi observado para o polimorfo II até $137\text{ }^\circ\text{C}$ com o emprego da técnica de HSM. A observação com luz polarizada confirmou a transição sólido-sólido em temperatura superior a $100\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 11).

Figura 11. Comportamento de fusão do polimorfo II de EFV através da HSM. O polimorfo II é estável até $100\text{ }^\circ\text{C}$. Apresenta uma transição sólido-sólido a $105\text{ }^\circ\text{C}$, e funde a $139\text{ }^\circ\text{C}$.



Outra comprovação da transição polimórfica foi feita com a técnica de XRPD com aquecimento (Figura 12). O polimorfo II foi avaliado no intervalo de temperatura de 25 a 134 °C. Acima da temperatura de 100 °C, a estrutura cristalina corresponde ao polimorfo I, e está de acordo com os resultados obtidos por DSC e as imagens de HSM. As pequenas diferenças observadas entre os valores de temperatura de transição (105 °C no HSM e 100 °C no difratômetro) podem ser justificadas pelo fato de que o primeiro sistema é fechado enquanto o outro é aberto. Estes estudos foram realizados em condições a seco e a transição sólido-sólido ocorreu em 105 °C, porém, se fosse mediada por solvente o valor da temperatura de transição seria outro.

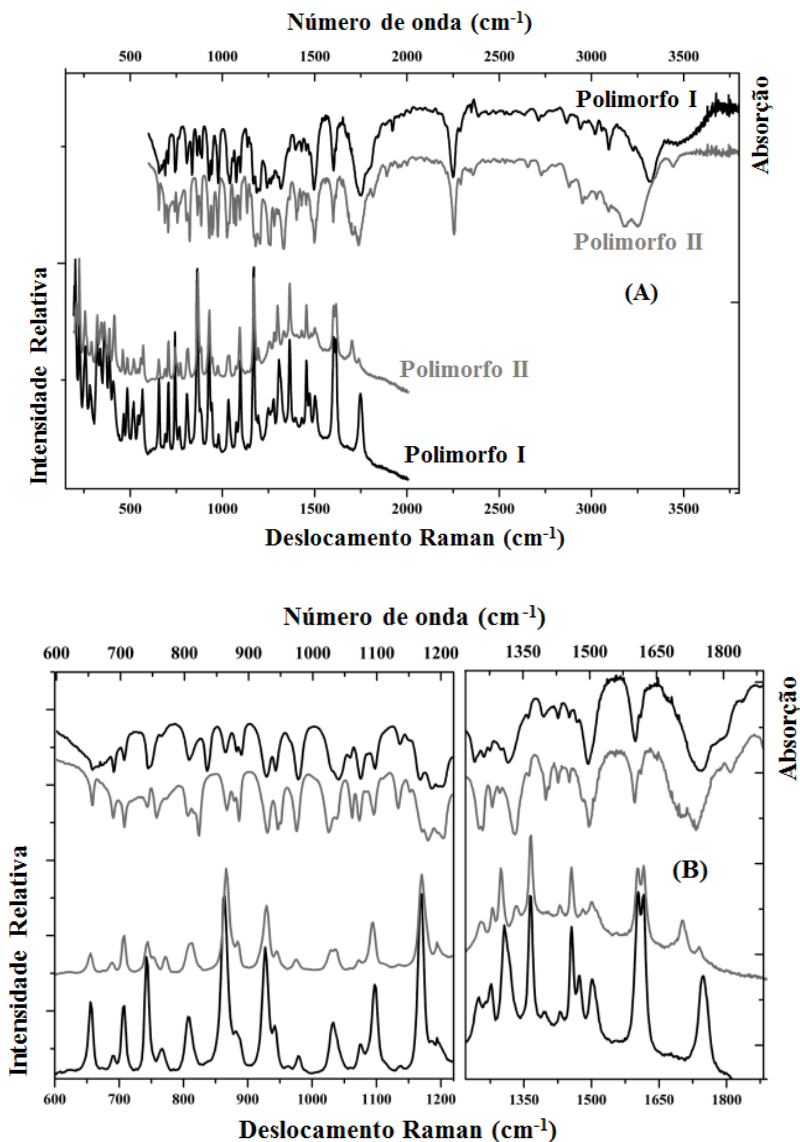
Figura 12. Avaliação do polimorfo II de EFV através da técnica de XRPD com aquecimento. A amostra foi aquecida a partir de 25 até 134 °C e resfriada à temperatura inicial. A seta indica a direção na qual as medidas foram realizadas.



Através das espectroscopias de Raman e infravermelho foi possível comparar as bandas mais importantes observadas com aquelas relatadas na literatura e caracterizar os polimorfos de EFV. A Figura 13 (a) mostra os espectros de Raman e FT-IR obtidos para ambos os polimorfos de EFV. Nesta figura, é nítida a diferença entre os

polimorfos I e II, especialmente entre as regiões de 2800 e 3200 cm^{-1} do espectro de absorção. Na região de 1740 cm^{-1} , ambos os espectros de absorção mostram duas novas reflexões para o polimorfo II. A análise da Figura 13 (b) permite confirmar a diferença entre os espectros de ambos os polimorfos nas regiões de 1650 e 1850 cm^{-1} além das regiões de 1235 e 1350 cm^{-1} e concluir que muitos modos ativos FT-IR são também modos ativos Raman. Além disso, pode-se observar que a intensidade das reflexões no espectro de Raman para o polimorfo II é menor em comparação ao polimorfo I. As principais bandas de absorção observadas pelas técnicas de Raman e FT-IR para o polimorfo I estão de acordo com a literatura (MISHRA; TANDON; AYALA, 2012).

Figura 13. (A) Espectros de absorção Raman e infravermelho para os polimorfos I e II de EFV. (B) Detalhes de algumas regiões espectrais. As linhas preta e cinza representam os polimorfos I e II, respectivamente.



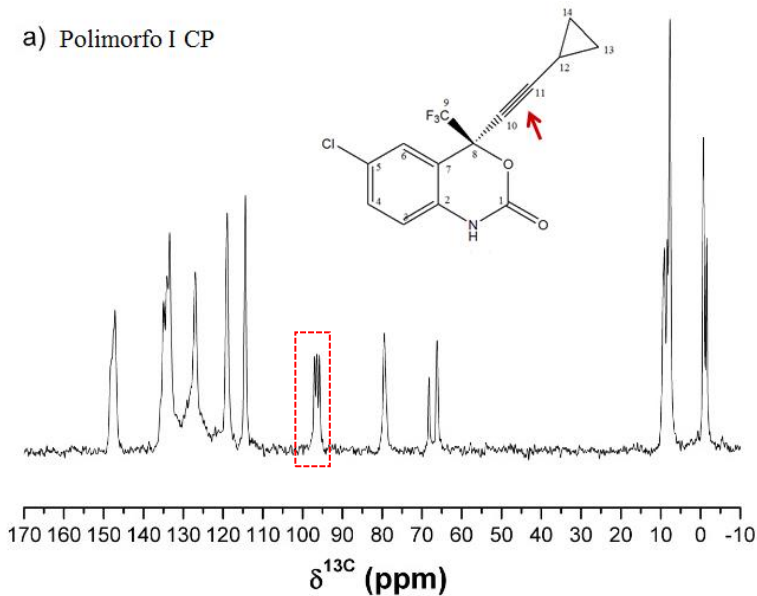
A técnica de RMN no estado sólido foi utilizada para a comparação dos polimorfos. A atribuição dos sinais é apresentada na Tabela 6. A Figura 14 apresenta os espectros de ^{13}C NQS (Supressão Não-Quaternária) para os dois polimorfos. O espectro de carbono do polimorfo I mostra mais de uma ressonância do C na molécula, indicando que há mais de uma molécula na unidade assimétrica. Os três sinais correspondentes ao C-11 são uma clara indicação da presença de três moléculas na unidade assimétrica, e essa informação está de acordo com os dados cristalográficos publicados por Mahapatra e colaboradores (MAHAPATRA et al., 2010). Para o polimorfo II há somente uma ressonância do C na molécula, corroborando os resultados obtidos por Ravikumar e Sridhar (RAVIKUMAR; SRIDHAR, 2009) de que há apenas uma molécula na unidade assimétrica para o polimorfo II. É importante relatar que, nas avaliações de NQS para o polimorfo I, os sinais de carbono referentes ao grupo ciclopropil não foram suprimidos. Pelo espectro NQS, observa-se alta mobilidade do grupo ciclopropil e este resultado está de acordo com o grau de desordem conformacional reportado por Mahapatra para o grupo ciclopropil no polimorfo I.

Tabela 6. Atribuição de sinais para os polimorfos I e II de EFV.

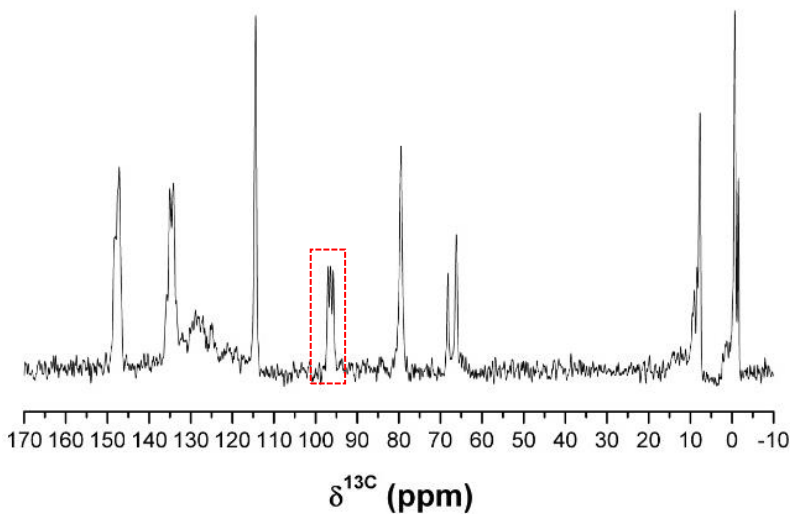
Número do Carbono	Polimorfo I Desvio químico $\delta(\text{ppm})$	Polimorfo II Desvio Químico $\delta(\text{ppm})$
12	-1,5; -0,7	0,1
13; 14	7,7; 8,3; 9,1; 9,4	9,1; 9,7
10	66,2; 68,2	65,2
8	79,4	79,2
11	95,8; 96,4; 97,0	97,1
7	114,4	115,2
9	128,0	127,8
3; 4; 6	119,0; 127,0; 133,4	130,5; 131,0
5	135,0	135,0
2	147,3	149,2
1	148,0; 148,4	150,3

Figura 14. Espectros de ^{13}C CP/ MAS e NQS do polimorfo I (a, b) e polimorfo II (c, d) de EFV.

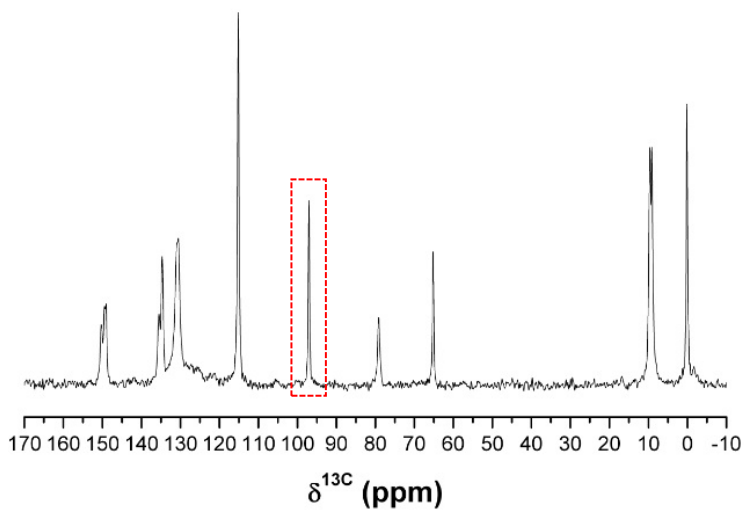
a) Polimorfo I CP



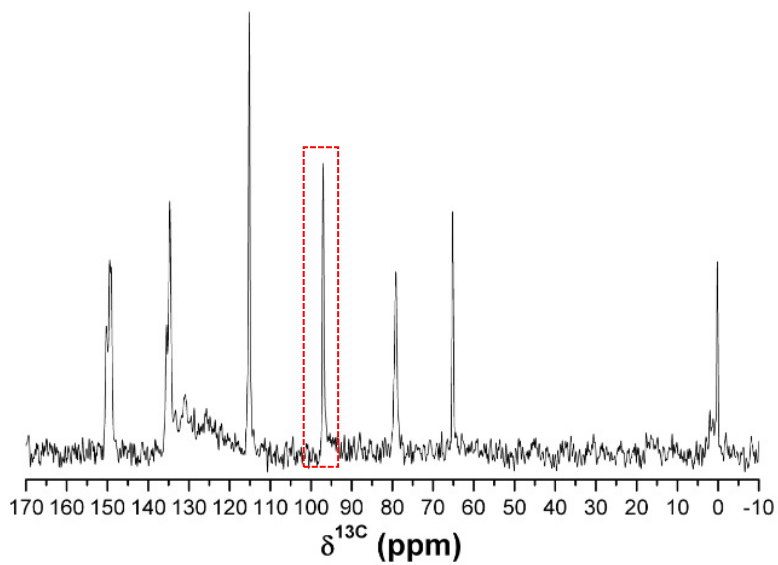
b) Polimorfo I NQS



c) Polimorfo II CP

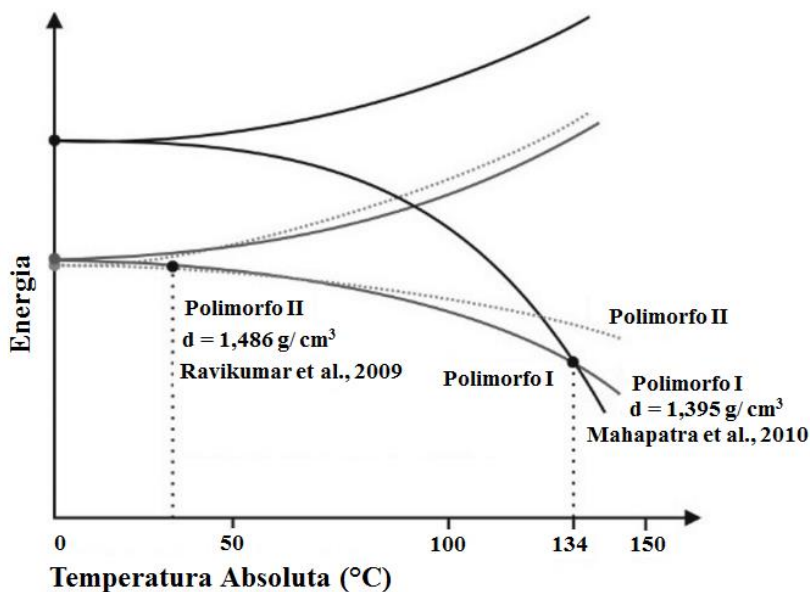


d) Polimorfo II NQS



Na avaliação dos sólidos farmacêuticos a termodinâmica é um dos aspectos de maior relevância. Os diagramas de fase (qualitativos ou quantitativos) são geralmente construídos para expressar a relação termodinâmica entre várias formas sólidas (ZHANG; ZHOU, 2009). O conhecimento a respeito da relação termodinâmica entre polimorfos é de extrema importância para a indústria farmacêutica. Tem por objetivos assegurar que o produto final obtido contenha a forma desejada e impedir qualquer transformação polimórfica durante o tempo de prateleira (LOHANI; GRANT, 2006). De acordo com Brittain (BRITTAN, 2009) e Bernstein (BERNSTEIN, 2002) um sistema enantiotrópico é aquele no qual uma transição no estado sólido pode ser observada na temperatura na qual, ambas as curvas de energia livre se cruzam. Neste ponto, ambas as formas são isoenergéticas. A avaliação dos polimorfos I e II de EFV nas condições a seco, com o emprego das técnicas de HSM, DSC e XRPD com temperatura, confirmou a transição do polimorfo II para o polimorfo I a 105 °C. O polimorfo I, apresentando a menor densidade ($d = 1,395 \text{ g/cm}^3$), é também o menos estável à temperatura ambiente quando comparado ao polimorfo II ($d = 1,486 \text{ g/cm}^3$). Considerando-se que estes resultados foram medidos em condições a seco, a transformação polimórfica pode ocorrer no estado sólido, embora em uma taxa geralmente muito inferior àquela mediada por solvente. Esta transformação foi avaliada por meio da suspensão de quantidades iguais de ambos os polimorfos em uma solução metanol: água. As amostras foram submetidas a várias temperaturas a fim de se determinar uma estreita faixa de temperatura de transição (GU; GRANT, 2001; ZHANG et al., 2002). Os difratogramas de pó das fases sólidas investigadas revelaram que a verdadeira (mediada por solvente) temperatura de transição termodinâmica estava localizada entre 35 e 40 °C para o sistema avaliado. A temperatura de transição termodinâmica consiste em uma estreita faixa de temperatura na qual ocorre a transição de uma forma polimórfica a outra. Esta transição, mediada por solvente, é um processo de equilíbrio, o qual não se modifica com o tempo, por isso termodinâmico, e não cinético (ZHANG; ZHOU, 2009; ZHANG et al., 2002). A partir destas informações o diagrama de energia livre *versus* temperatura foi construído e está apresentado na Figura 15. Portanto, a relação entre os polimorfos I e II de EFV foi classificada como enantiotrópica, com ponto isoenergético entre 35 e 40 °C.

Figura 15. Diagrama de energia livre *versus* temperatura experimentalmente obtido para os polimorfos I e II de EFV.



O EFV, sendo um fármaco de Classe II, apresenta boa correlação entre os resultados *in vivo* e os testes de dissolução. A taxa de dissolução é o aspecto limitante a ser controlado uma vez que determina a absorção do fármaco (DRESSMAN; REPPAS, 2000; ROSSI et al., 2011). O surfactante LSS é indicado pela USP (USP, 2007) e por Marques e colaboradores (MARQUES, 2009) para ser utilizado para estudos de dissolução de fármacos pouco solúveis (USP, 2007; CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009). O EFV é insolúvel em água e, além disso, a água não é considerada um meio de dissolução ideal para fármacos de Classe II como o EFV (USP, 2007). O EFV mostrou-se solúvel em LSS 0,25; 0,5; e 1,0%, porém, os meios de LSS com concentrações superiores a 0,25% não permitiram discriminar os lotes de EFV avaliados. Na concentração de 0,1% de LSS o EFV não pôde ser quantificado. Este surfactante tem como objetivo melhorar a molhabilidade dos fármacos pouco solúveis. E embora altas concentrações de LSS sejam mencionadas por importantes fontes de referência (USP, 2007), a CMC deste surfactante aniônico é alcançada entre 1 e 10 mM (RUDDY et al., 1999), ou seja, entre 0,025 e 0,25%

(m/v) de LSS. Deste modo a busca por um meio de dissolução biorrelevante e com capacidade discriminatória para as amostras de EFV classificou o meio de LSS 0,25% como o ideal. Meios de dissolução contendo baixas concentrações de LSS são mais biorrelevantes além de assegurarem mais efetivamente as condições *sink* (PANIKUMAR et al., 2012; HONÓRIO et al., 2013; PINTO; CABRAL; SOUSA, 2014;). A validação do método de dissolução para a análise da velocidade de dissolução intrínseca está descrita no item 2.2.3.3.

A fim de assegurar condição *sink*, medidas da concentração de saturação foram feitas por um período de 96 horas. Desta forma, a manutenção das condições *sink* durante o teste de VDI para o EFV foi assegurada visto que a solubilidade após o período de equilíbrio de 96 horas foi de $239,75 \pm 0,01$ µg/mL para o polimorfo I e $316,63 \pm 0,02$ µg/mL para o polimorfo II. A concentração do polimorfo I foi de 4,49 µg/mL após 240 minutos de análise e de 29,45 µg/mL após 90 minutos para o polimorfo II. Com a finalidade de garantir condições *sink* para ambos os polimorfos, os períodos de tempo de análise foram diferentes para cada um. Para que o sistema esteja em condição *sink* é necessário que a concentração máxima de fármaco seja inferior a 10% da solubilidade no meio de dissolução avaliado (WASHINGTON, 1990; CHO et al., 2004; USP, 2007).

A Figura 16 mostra o perfil do teste de dissolução intrínseca para o polimorfo I e o polimorfo II. A análise estatística foi realizada aplicando-se a análise de regressão e revelou diferença significativa para o intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$ e $p < 0,1$). Os valores de IDR obtidos pela inclinação da reta no gráfico mg/ cm² versus tempo, mostraram resultados relevantes uma vez que, a IDR do polimorfo II apresentou valor aproximadamente dezesseis vezes superior à IDR do polimorfo I (Tabela 7). Análises das pastilhas por DSC e XRPD antes e após a realização do teste, indicaram que não houve transição de fase mediada por solvente ou pressão. Os valores de IDR obtidos experimentalmente apresentaram-se menores que aqueles reportados por Pinto e colaboradores (PINTO; CABRAL; SOUSA, 2014) e por Deshmukh e colaboradores (DESHMUKH et al., 2011). Estas diferenças podem ser justificadas, devido às altas concentrações de LSS utilizadas por estes autores, em comparação àquela determinada na validação da metodologia do presente trabalho e referenciada no item 2.2.3.3. Altas concentrações de LSS resultam em maiores valores de IDR para o polimorfo I do EFV (BROWN et al., 2004; PINTO; CABRAL; SOUSA, 2014). Os resultados obtidos nos estudos de velocidade de dissolução intrínseca indicam que provavelmente diferentes planos cristalinos estão

expostos para o polimorfo II em comparação ao polimorfo I modificando, portanto, a IDR para aquele polimorfo (DANESH et al., 2001; KUMINEK et al., 2013).

Figura 16. Perfil do teste de dissolução intrínseca obtido para os polimorfos I e II de EFV. A condição *sink* foi assegurada para a avaliação de ambos os polimorfos e por isso os tempos de análise são de 240 e 90 minutos para o polimorfo I e II, respectivamente.

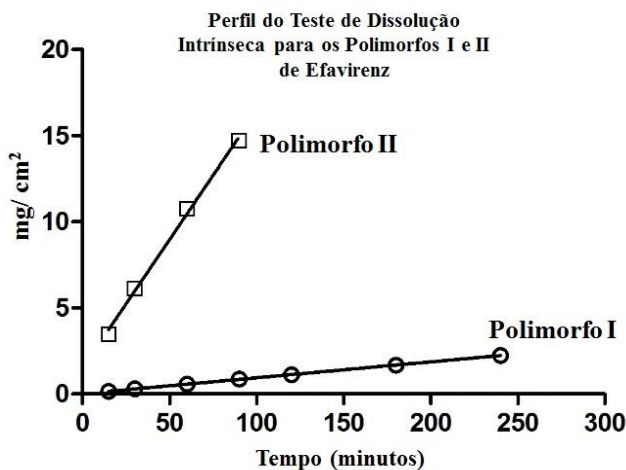


Tabela 7. Equação da reta e r^2 obtidos por análise de regressão linear na avaliação dos testes de dissolução intrínseca dos polimorfos I e II de EFV.

Amostra	Equação da reta	r^2	IDR ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$)
Polimorfo I	$y = 0,0074x + 0,019$	0,9999	0,0074
Polimorfo II	$y = 0,1196x + 1,194$	0,9969	0,1196

3.2 Caracterização Físico-química de Lotes de EFV (Polimorfo I) e Correlação entre Microestrutura e Bioequivalência

Para fármacos pouco solúveis como o EFV, as características do estado sólido, além da distribuição de tamanho de partícula,

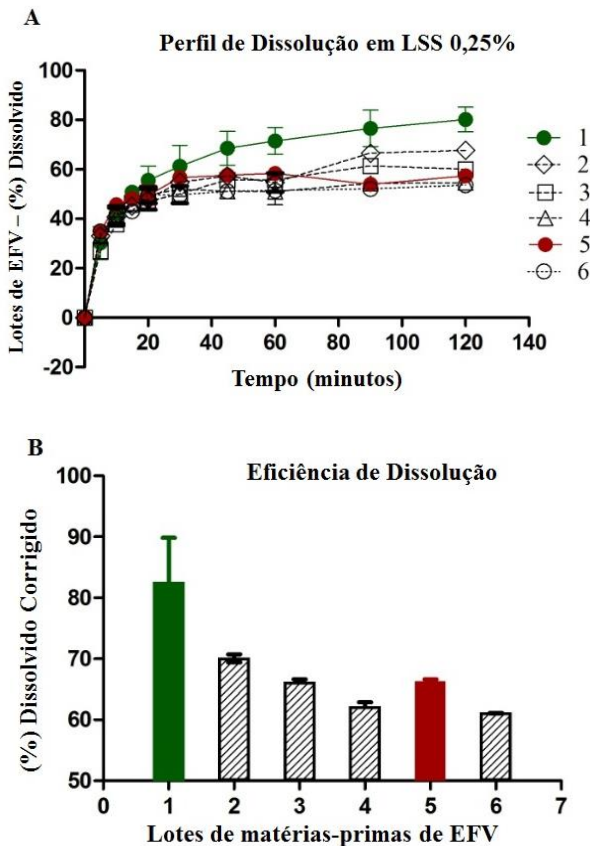
densidade aparente, fluidez e compressibilidade, são cuidadosamente monitoradas através dos protocolos de controle das propriedades do estado sólido. No entanto, tais características não explicam algumas falhas que ocorrem nos ensaios *in vitro* e nos estudos *in vivo*.

O EFV é um fármaco que necessita dos estudos de bioequivalência para a produção e comercialização de medicamentos genéricos. Neste contexto, os estudos de bioequivalência são a mais importante ferramenta no processo de desenvolvimento e registro do produto, de modo a assegurar sua eficácia terapêutica (EUROPEAN MEDICINE AGENCY, 2010; BRASIL, 1999). Estes estudos foram conduzidos por Bedor e colaboradores e por Honório e colaboradores (BEDOR et al., 2011; HONÓRIO et al., 2013), e estão de acordo com o estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 1999) e em conformidade com as recomendações internacionais para estudos de bioequivalência (FANDARUFF et al., 2015). A avaliação de seis lotes de EFV é apresentada nesta subdivisão do capítulo. Todas as matérias-primas analisadas foram aprovadas pelos protocolos de controle do estado sólido; entretanto, das duas amostras testadas em voluntários humanos, (estudos de bioequivalência, teste *in vivo*) uma não foi aprovada. Além dos resultados obtidos no estudo de bioequivalência, os resultados dos testes de dissolução aqui realizados, não apresentaram correlação com as demais propriedades do estado sólido.

Portanto, é importante compreender as discrepâncias tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a fim de garantir a bioequivalência dos medicamentos genéricos e a reprodutibilidade lote a lote.

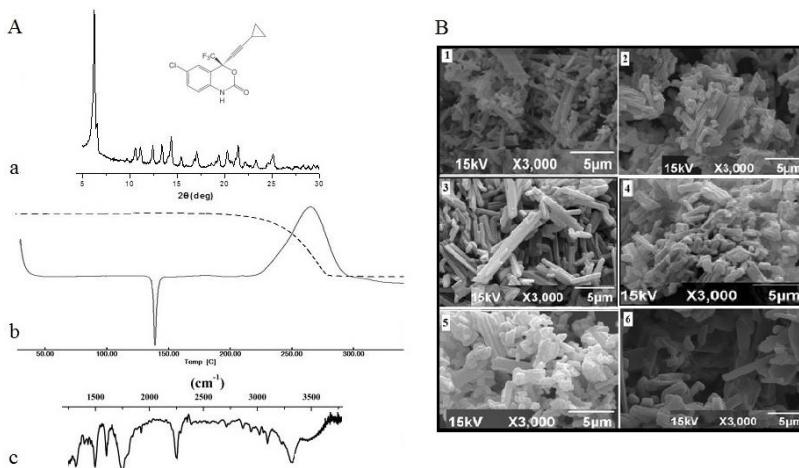
O perfil de dissolução de seis lotes de EFV em LSS 0,25% é mostrado na Figura 17 (A) e as eficiências de dissolução (DEs) estão plotadas na Figura 17 (B). O ensaio de dissolução destaca as diferenças entre os lotes de EFV, com evidência para os lotes 1 e 5. O lote 1 foi aprovado no teste de bioequivalência e mostra o mais alto percentual (~82%) no gráfico de eficiência de dissolução (DE). Para o lote 5, reprovado no teste, esse percentual ficou em torno de 66%.

Figura 17. (A) Perfil de dissolução por dispersão das matérias-primas de EFV em LSS 0,25% *versus* tempo. (B) Eficiência de dissolução (DE) de seis lotes de EFV. Lote 1 aprovado no teste de bioequivalência e lote 5 reprovado.



Com o objetivo de realizar a caracterização do estado sólido, os seis lotes de EFV (polimorfo I), foram avaliados por meio de várias técnicas (XRPD, DSC, TG, FT-IR, SEM) conforme mostram as Figuras 18 (A) e 18 (B). No entanto, os resultados obtidos não evidenciaram qualquer diferença entre as amostras. Além disso, o perfil de impurezas foi avaliado para cada um dos lotes, de acordo com a monografia oficial do EFV (USP-38, 2014) e todas as amostras foram aprovadas com relação ao perfil de impurezas.

Figura 18. (A) XRPD (a), DSC e TG (b), e FT-IR (c) do polimorfo I de EFV. (B) Micrografias obtidas por SEM para o polimorfo I de EFV (lotes 1, 2, 3, 4, 5 e 6).



O comportamento na DE observado é comumente explicado por outros fatores, como morfologia, distribuição de tamanho de partícula e/ou impurezas (TINKE et al., 2005; BLAGDEN; MATAS; GAVAN, 2007; WILLMANN et al., 2010). No entanto, a morfologia não foi a principal causa dos resultados obtidos nos cálculos de DE. As micrografias mostraram que os grãos possuíam formato de hastes, com forma (comprimento e largura) muito similar para todos os lotes (Figura 18 (B)). Alguns autores têm ilustrado a influência das impurezas no crescimento dos cristais e também sobre as propriedades cristalinas das substâncias (KUBOTA, 2001; BURCHAM; JARMER, 2013; BORDAWEKAR et al., 2014). Porém, na avaliação dos lotes de EFV o comportamento observado no teste de dissolução não foi influenciado pelo perfil de impurezas. Um aumento na concentração de impurezas pode ser detectado como uma consequência do processo de micronização (AOKI, 2013). No caso dos seis lotes analisados, as diferenças no processo de micronização para cada amostra não modificaram o perfil de impurezas e, portanto, esse parâmetro não foi considerado a causa do comportamento de dissolução observado.

A distribuição de tamanho de partícula está reportada na Tabela 8. O lote 1 apresenta o menor valor de tamanho médio de partícula. Os valores de $d[4, 3]$ são maiores para os lotes 2 a 6, porém, ainda aceitos no processo de rotina de micronização de fármacos. Espera-se que menores valores de $d[4, 3]$ correspondam a maiores percentuais nos testes de perfil de dissolução e resultados de DE (GLOVER et al., 2008), uma correlação verificada para os lotes 1 e 6, ambos em dois extremos de tamanho de partícula e DE. Entretanto, contrário ao esperado, o lote 2 mostrou maior valor de DE (~70%) que os lotes 3, 4 e 5, todos abaixo de 66% (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de tamanho de domínio cristalino (D) e tamanho de partícula dos seis lotes de EFV e seus correspondentes valores de eficiência de dissolução (DE).

Lotes de EFV	Eficiência de Dissolução (%)	<D> (nm)	SD (nm)	Tamanho Médio Partícula d[4, 3] (µm)	Tamanho Médio Partícula d[3, 2] (µm)	d(0,9) (µm)	d(0,5) (µm)	d(0,1) (µm)	Span
1	82 ± 7	30 ± 3	22	2,6	2,1	5,3	1,9	0,7	2,5
2	70,0 ± 0,7	64 ± 7	41	5,2	2,1	13,2	2,8	1,0	4,3
3	66,1 ± 0,5	95 ± 11	51	4,4	2,3	10,1	3,0	1,1	3,0
4	62,1 ± 0,8	133 ± 22	55	4,4	2,0	9,5	2,5	1,0	3,4
5	66,3 ± 0,3	208 ± 42	74	4,0	2,2	8,2	3,1	1,0	2,3
6	61,1 ± 0,1	282 ± 56	80	8,8	3,4	19,1	6,2	1,4	2,8

Legenda:

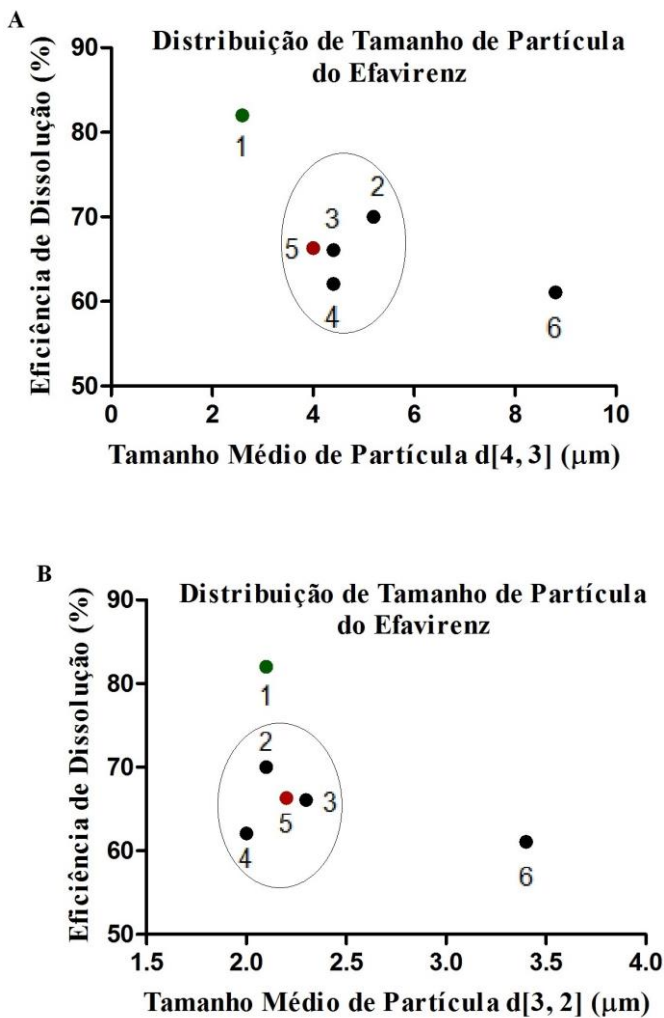
<D>: tamanho médio de domínio cristalino

SD: desvio padrão

É importante destacar que, mesmo sendo o tamanho médio de partícula do lote 1 (bioequivalente) menor que o tamanho médio de partícula do lote 5 (não bioequivalente), o valor de $d[4, 3]$ para este último encontrou-se dentro da faixa aceitável para este parâmetro. Portanto, nem a morfologia, nem as medidas de distribuição de tamanho de partícula puderam justificar as diferenças observadas nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Do ponto de vista farmacêutico, o parâmetro de distribuição de tamanho mais utilizado tradicionalmente para a correlação com resultados de bioequivalência e perfil de dissolução, são aqueles que possuem por base o volume (MOSHARRAF; NYSTRÖM, 1995), por isso, $d[4, 3]$ parece ser o mais adequado (GLOVER et al., 2008). De acordo com cálculos teóricos, $d[4, 3]$, representativo do diâmetro médio com base no volume da partícula, apresenta a melhor correlação com os valores de taxa média de dissolução (TINKE et al., 2005). Ainda com base na análise da Tabela 8, mesmo os valores de $d(0,9)$, $d(0,5)$ e $d(0,1)$ não classificaram os lotes 1 e 5 em dois extremos. Portanto, de acordo com os resultados e as especificações de rotina no controle de IFAs, os seis lotes de EFV seriam aprovados, se apenas a distribuição de tamanho de partículas fosse considerado o principal parâmetro para a análise dos lotes antes do processo de produção. Nas amostras avaliadas, não se observou correlação entre o tamanho médio de partícula, os perfis de dissolução (estudo *in vitro*) e os resultados de bioequivalência (estudos *in vivo*). Ainda com relação à distribuição de tamanho de partículas, Takano e colaboradores propuseram que $d[3, 2]$ poderia estar correlacionado com os resultados de dissolução (TAKANO et al., 2009). Entretanto, no modelo adotado por eles, as partículas são consideradas esféricas, fato que simplifica muito o processo. Além disso, os valores de $d[3, 2]$ e $d(0,5)$ não apresentaram diferenças significativas nas análises conduzidas pelo grupo.

Conforme representado na Figura 19 (A e B), os dados obtidos para os seis lotes de EFV não mostraram correlação entre os valores de DE e $d[4, 3]$ ou $d[3, 2]$.

Figura 19. Eficiência de dissolução (DE) *versus* tamanho de partícula para seis lotes de EFV. O lote 1 foi aprovado no teste de bioequivalência enquanto o lote 5 foi reprovado. (A) DE *versus* tamanho médio de partícula d[4, 3]. (B) DE *versus* tamanho médio de partícula d[3, 2].



Tal observação exigiu a busca de uma nova explicação, a qual poderia ser obtida através da investigação de outras propriedades do estado sólido e/ ou de propriedades mecânicas. Por todas as razões

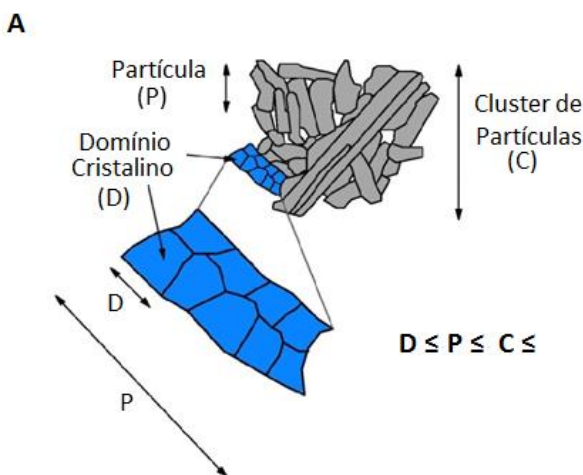
anteriormente citadas, não foi possível compreender e explicar os resultados de DE. Portanto, outro parâmetro não analisado pelas técnicas do estado sólido empregadas, deveria ser avaliado.

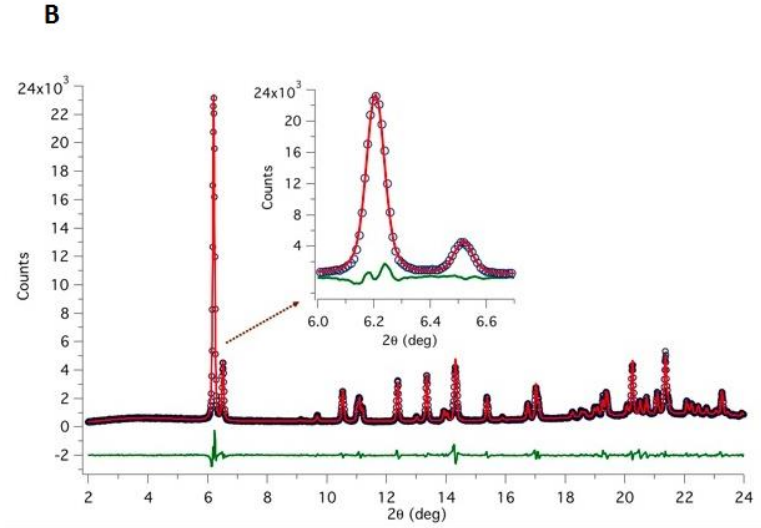
Um estudo mais detalhado dos processos de micronização, principalmente dos efeitos mecânicos na microestrutura dos IFAs foi então realizado. As partículas mostram uma estrutura interna composta de pequenos domínios cristalinos (Figura 20 (A)). Um domínio cristalino é, em termos gerais, uma região em um material policristalino que difrata de forma coerente. A difração é sensível ao tamanho de domínio cristalino ou cristalita (SCARDI, 2008). A dissolução e a biodisponibilidade de matérias-primas e produtos têm sido correlacionadas com várias propriedades físico-químicas como cristalinidade/ amorficidade, polimorfismo, tamanho de partícula, densidade, porosidade, entre inúmeras outras (SHARGEL, 1999; BRITAIN, 2008). Até o momento, o tamanho de domínio cristalino não tem sido correlacionado com as características biofarmacêuticas. Torrado e colaboradores (TORRADO; FRAILE; TORRADO, 1998) têm mencionado a importância do tamanho de cristalita na compreensão dos resultados de dissolução, porém, os resultados apresentados por eles, não consideram qualquer aspecto do tamanho de partículas. Por isso, não é possível distinguir entre tamanho de partícula e cristalita, embora eles justifiquem ser o tamanho de cristalita o motivo do impacto nos resultados. Outros autores têm correlacionado o tamanho de cristalita com as propriedades físicas e mecânicas, principalmente com o processo de compressão (FUKUOKA; MAKITA; YAMAMURA, 1993; RIIPPI; TANNINEN; YLIRUUSI, 2000). Riippi e colaboradores mostraram a influência do estresse mecânico no tamanho de cristalita e, portanto, pode-se supor que a micronização promove o mesmo efeito, uma vez que este processo também produz estresse na matéria-prima (RIIPPI; TANNINEN; YLIRUUSI, 2000). Observa-se que, embora o processo de micronização seja uma boa alternativa para o aumento da biodisponibilidade de fármacos, muito ainda precisa ser estudado. Atualmente, a caracterização do estado sólido tem como objetivos a avaliação de possível amorfização ou desordem induzida pelo processo (FENG; PINAL; CARVAJAL, 2008), as possíveis modificações geradas na superfície das partículas dos fármacos (OLUSANMI et al., 2014) e a garantia da estabilidade até a obtenção do produto (ZHANG et al., 2004). Mas recentemente o tema tamanho de cristalita tem sido mencionado após o processo de micronização (FORNICO et al., 2013). Além disso, a discussão a respeito da correlação entre tamanho de nanopartículas, dissolução e solubilidade tem sido iniciada graças ao

lançamento de medicamentos nanocrystalinos no mercado e ao crescente aumento na pesquisa científica nesta área. Alguns autores afirmam que, de acordo com a equação de Ostwald-Freundlich, a solubilidade de saturação pode ser aumentada se o tamanho de partícula estiver abaixo de 100 nm, devido ao efeito de curvatura da superfície (EERDENBRUGH et al., 2010; BROUGH; WILLIAMS, 2013). Mesmo em trabalhos ainda mais recentes, a correlação ainda tem por base o tamanho da partícula e/ ou do nanocrystal (ZHAI et al., 2014).

Informações relevantes podem ser obtidas por meio do estudo detalhado dos processos de micronização, em particular, dos efeitos mecânicos na microestrutura dos IFAs. A investigação da microestrutura abre um novo e amplo campo na área farmacêutica. A Figura 20 (B) mostra o resultado obtido através do software PM2K, com base no modelo físico de microestrutura, o qual gera expressões teóricas para os perfis de linha.

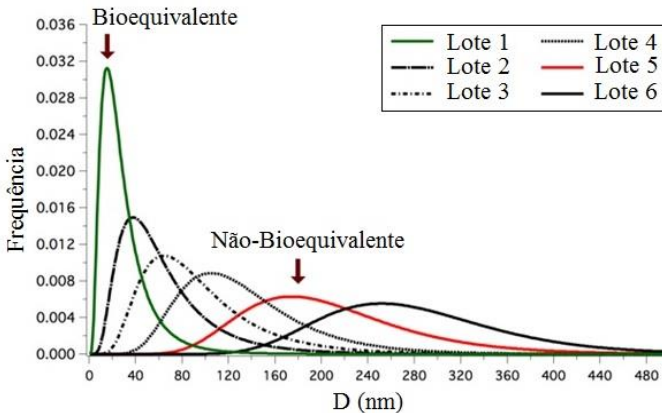
Figura 20. (A) Definição esquemática de partícula, cluster e tamanho de domínio cristalino (cristalita). (B) Exemplo da análise dos dados de XRPD por WPPM para o lote 5 de EFV: dados (círculo), modelo (linha) e as diferenças ou resíduo (linha verde abaixo).





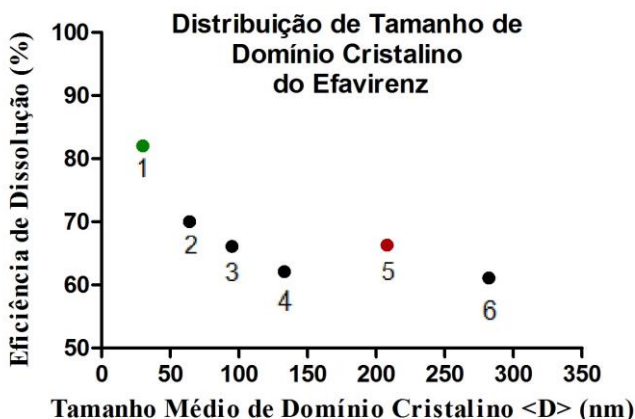
Através desta metodologia, tanto os valores médio de tamanho quanto a distribuição puderam ser determinados. A Figura 21 mostra a distribuição de tamanho de domínio cristalino para todas as amostras analisadas. O tamanho de domínio cristalino abrange uma gama de valores, da ordem de algumas dezenas a centenas de nanômetros.

Figura 21. Distribuição de tamanho de domínio cristalino para seis lotes de EFV.



A fim de se determinar o efeito da microestrutura nos ensaios de dissolução e nos estudos de bioequivalência, a DE foi relacionada com o tamanho médio de domínio cristalino (Figura 22, e Tabela 8) e a correlação mostrou-se bastante clara. Domínios cristalinos maiores (acima de 100 nm aproximadamente) correspondem a menores valores de DE, em oposição aos resultados expostos nas Figuras 19 (A) e 20 (B). A análise destas figuras mostrou ausência de correlação entre DE e tamanhos médios de partícula (tanto $d[4, 3]$ quanto $d[3, 2]$), mesmo para lotes com valores de tamanho de partícula muito similares.

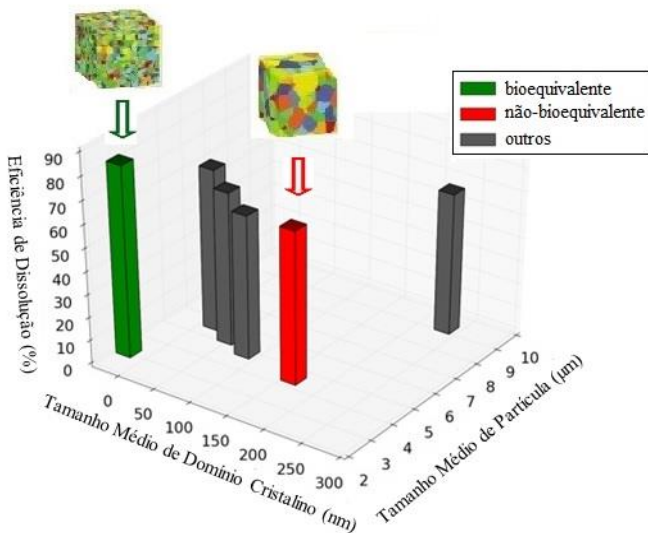
Figura 22. Eficiência de dissolução (DE) *versus* tamanho de domínio cristalino ($\langle D \rangle$ (nm)).



A Figura 23 mostra os resultados em uma representação em 3D da relação entre tamanho médio de partícula, tamanho médio de domínio cristalino e DE. A microestrutura é representada pelos cubos coloridos e o cubo com divisões maiores faz referência aos domínios cristalinos de maior tamanho. Para lotes com distribuição de tamanho de partícula comparáveis (2-5), a DE está claramente relacionada com o tamanho de domínio cristalino (Figuras 22 e 23). A diferença significativa nos ensaios de bioequivalência e nos estudos *in vitro* apresentada pelos lotes 1 e 5 pôde ser explicada. O lote 1, aprovado no teste de bioequivalência, apresentou o menor tamanho de domínio cristalino ($D = 30 \pm 3$ nm), enquanto o lote 5, reprovado no teste, mostrou um tamanho de domínio cristalino quase seis vezes superior ($D = 208 \pm 42$ nm). Estes resultados sugerem que pode haver um tamanho crítico de domínio cristalino e

distribuição de tamanho de partícula que assegure a bioequivalência. Estudos adicionais são necessários para reunir mais evidências e estabelecer a bioequivalência da microestrutura nos compostos farmacêuticos. Além da relevância científica, estes resultados são um alerta de que, não somente o polimorfismo, a distribuição de tamanho de partícula e as características superficiais, mas também a microestrutura pode modificar as propriedades dos compostos farmacêuticos e seus comportamentos de dissolução e biodisponibilidade. Portanto, um conhecimento profundo a respeito da distribuição de tamanho de domínio cristalino deve ser obtido durante o desenvolvimento farmacêutico, de modo a prever se a microestrutura é ou não crítica para o sucesso dos resultados nos ensaios de bioequivalência e biodisponibilidade.

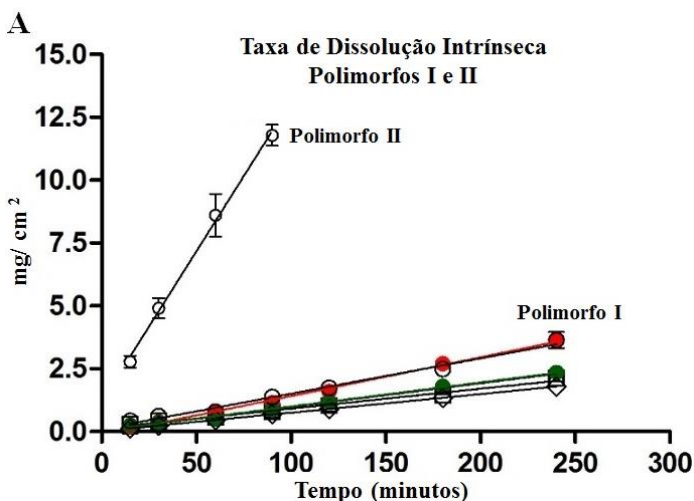
Figura 23. Representação em 3D da relação entre tamanho médio de domínio cristalino, tamanho médio de partícula e eficiência de dissolução (DE).

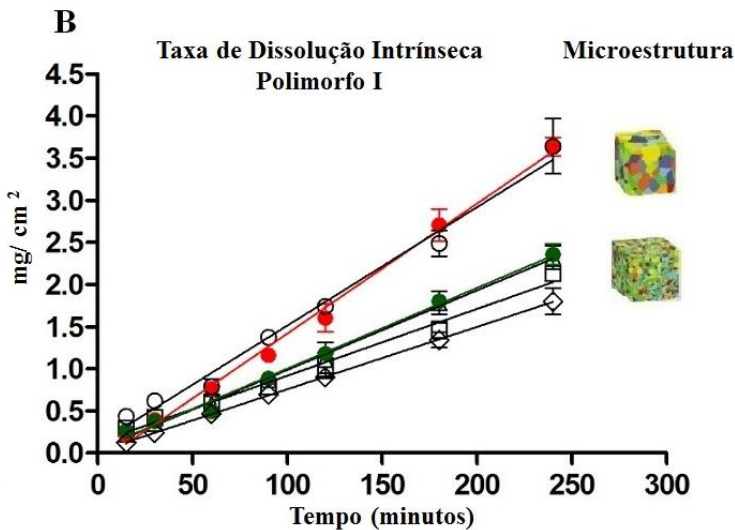


Embora nenhuma correlação tenha sido feita entre as propriedades de dissolução e a microestrutura de fármacos até o momento, o MVDI previamente desenvolvido para a avaliação de polimorfos de EFV (item 2.2.3.3), foi aplicado para tal investigação.

Sabe-se que a IDR correlaciona as propriedades do estado sólido com os impactos a nível biofarmacêutico e permite mostrar se estes parâmetros afetam a dissolução de fármacos (YU et al., 2004; USP, 2007; BRITAIN, 2009). A Figura 24 (A) mostra os perfis de dissolução intrínseca de diferentes lotes de polimorfo I em comparação ao polimorfo II em LSS 0,25%. Como apresentado anteriormente, pode-se observar claramente a capacidade do MVDI em discriminar polimorfos de EFV. A Figura 24 (B) mostra os resultados de IDR para os seis lotes de EFV, todos apresentando a mesma estrutura cristalina do polimorfo I previamente descrito por Mahapatra e colaboradores (MAHAPATRA et al., 2010). Destaca-se na Figura 24 (B), a capacidade da técnica em diferenciar lotes de EFV que apresentam diferentes tamanhos de domínio cristalino.

Figura 24. (A) Gráfico da taxa de dissolução intrínseca (IDR) para polimorfo I (seis lotes) e polimorfo II de EFV. (B) Representação microestrutural referente a diferentes tamanhos de domínio cristalino e IDR para seis lotes de polimorfo I. O lote 1 (cor verde) foi aprovado nos ensaios de bioequivalência enquanto o lote 5 (vermelho) foi reprovado.





Os lotes 1, 2, 3 e 4 de EFV possuem menores valores de tamanho de domínio cristalino enquanto os lotes 5 e 6 apresentam valores maiores (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de taxa de dissolução intrínseca (IDR) para amostras de EFV pertencentes aos polimorfos I e II. Informações sobre microestrutura ($\langle D \rangle_s$) e tamanho de partícula ($d[4, 3]$, Span) para diferentes lotes de EFV de mesma forma polimórfica.

Polimorfismo						
	Polimorfo I			Polimorfo II		
IDR (mg/cm ² /min)	0,011 ± 0,003*			0,120 ± 0,003		

Microestrutura (Polimorfo D)						
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
IDR (mg/cm ² /min)	0,0096 ± 0,0004	0,0074 ± 0,0006	0,0079 ± 0,0003	0,0094 ± 0,0005	0,0154 ± 0,0006	0,0140 ± 0,0009
<D> _s (nm)	30 ± 3	64 ± 7	95 ± 11	133 ± 22	208 ± 42	282 ± 56
D [4, 3] (µm)	2,6	5,2	4,4	4,4	4,0	8,8
Span	2,5	4,3	3,0	3,4	2,3	2,8

*média dos seis lotes

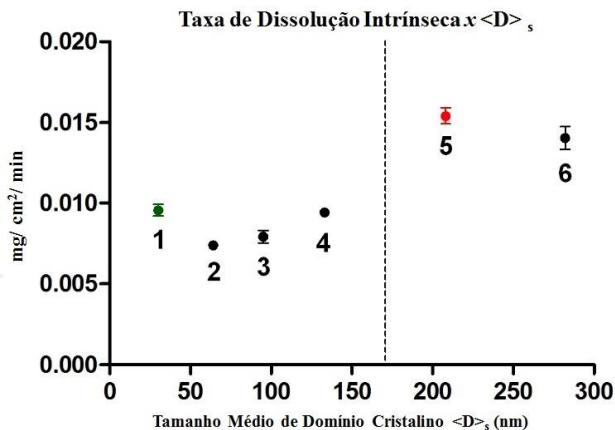
Lêgenda:

IDR: taxa de dissolução intrínseca

<D>: tamanho médio de domínio cristalino

O lote 1 foi o aprovado no estudo de bioequivalência e o lote 5 foi reprovado. Observa-se uma relação direta entre os valores de IDR e o tamanho de domínio cristalino, ou seja, aos menores valores de tamanho de domínio cristalino ($\langle D \rangle_s$), correspondem os menores valores de IDR (Tabela 9). A técnica de VDI revela efeitos relacionados à determinada faixa de tamanho de domínio cristalino (Figura 25).

Figura 25. Taxa de dissolução intrínseca (IDR) *versus* tamanho de domínio cristalino ($\langle D \rangle_s$) de seis lotes (1-6). Lote 1 (cor verde) aprovado nos testes de bioequivalência e lote 5 (cor vermelha) reprovado.



Sabe-se, até o momento, que mudanças de cristalinidade influenciam o comportamento das cargas nos IFAs (KARNER; URBANETZ, 2011). Portanto, a relação entre IDR e tamanho de domínio cristalino pode ser justificada por fatores eletrostáticos e/ ou efeitos superficiais. Deste modo, uma investigação mais específica com relação ao impacto destas propriedades deve ser realizada. Além disso, é importante destacar que estes resultados obtidos são independentes da distribuição de tamanho de partícula, uma vez que cinco lotes de EFV (1-5) possuem praticamente os mesmos valores de distribuição de tamanho de partícula enquanto para o lote 6 este valor é duas vezes maior. Os lotes 5 e 6 apresentam valores muito próximos de IDR (Tabela 9) além de sobreposição das retas (Figura 24 – Lote 5 em vermelho e lote 6 sobreposto). Estes resultados corroboram com a teoria de que a técnica de dissolução intrínseca "apaga" os efeitos de tamanho

de partícula (TENHO et al., 2007; BRITAIN; GRANT, 2009). Deste modo, os resultados mostraram claramente que o MVDI discrimina não somente polimorfos mas também faixas de tamanho de domínio cristalino de matérias-primas de EFV. Mais que isso, a aplicação deste método *in vitro* permitiu discriminar lotes bio e não-bioequivalentes. Portanto, o MVDI desenvolvido é uma excelente ferramenta no controle de qualidade para a seleção da mais apropriada matéria-prima para formular, além de garantir uma melhor reprodutibilidade lote a lote.

CAPÍTULO III – SAQUINAVIR
CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO, AVALIAÇÃO DA
PROPRIEDADE DE DISSOLUÇÃO DO MESILATO DE
SAQUINAVIR E APLICAÇÃO DA ENGENHARIA DE CRISTAIS
PARA A OBTENÇÃO DE NOVAS FORMAS DE SAQUINAVIR

1 INTRODUÇÃO

Prever e sintetizar sólidos modificados que apresentem propriedades biofarmacêuticas desejadas é um dos objetivos da engenharia de cristais, além de objeto de grande interesse para a indústria farmacêutica (BLAGDEN et al., 2007). Quando grupos ionizáveis estão presentes, a formação de sais é o método mais comumente empregado para a melhoria da solubilidade de IFAs de baixa solubilidade aquosa (KUMAR; AMIN; BANSAL, 2007; CHILDS; STAHLY; PARK, 2007). A inclusão de solvente na estrutura cristalina, em especial água, frequentemente acompanha a formação de sais, embora o fenômeno não seja limitado a esta entidade em particular. Sabe-se que aproximadamente um terço dos IFAs formam hidratos cristalinos devido ao tamanho reduzido da molécula de água e a sua capacidade de “ligar” moléculas do fármaco em uma rede cristalina estável (KHANKARI; GRANT, 1995; VIPPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; BRAGA et al., 2012).

O mesilato de saquinavir (SQVM), anti-HIV sugerido como parte da HAART, pertence à Classe IV do BCS e sua baixa solubilidade aquosa está correlacionada com sua biodisponibilidade extremamente reduzida (<4%) (PATHAK et al., 2010; MAHAJAN; PINGALE; AGRANAL, 2013). Portanto, estratégias envolvendo modificações nas formulações e/ ou processos, dentre outros, têm sido propostas para aumentar a sua biodisponibilidade oral. O conhecimento das propriedades do estado sólido e da estrutura cristalina do IFA faz-se necessário para o desenvolvimento de sistemas incrementadores de dissolução, os quais se apresentam como estratégia promissora na busca pelo melhor desempenho terapêutico. Porém, até o momento, poucos são os estudos publicados com este fármaco, e embora algumas informações a respeito do estado sólido estejam disponíveis, a estrutura cristalina foi apenas recentemente reportada (FANDARUFF et al., 2015).

Este capítulo teve por objetivo obter o monocristal de SQVM, resolver sua estrutura e caracterizar este fármaco com relação ao estado sólido. Além disso, investigar o comportamento anômalo observado no perfil de dissolução realizado em meio de LSS, por meio da obtenção de um cocristal de SQVM em LSS (denominado neste trabalho SQVMSLS). Os resultados então obtidos foram submetidos ao *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* com o título de: *Anomalous Dissolution Behavior of Saquinavir Mesylate in Sodium Lauryl Sulphate* (Apêndice D).

Além das propostas mencionadas anteriormente, objetivou-se, ainda, explorar as possibilidades de troca de ânion para o SQVM e investigar as propriedades de dissolução e do estado sólido para este fármaco e as novas formas obtidas, os sais hidratados. Todas as formas foram investigadas e comparadas através do emprego de técnicas de caracterização do estado sólido, além de serem avaliadas estruturalmente através da obtenção de monocristais e resolução das estruturas. Cloreto de saquinavir (SQVCl), brometo de saquinavir (SQVBr) e iodeto de saquinavir (SQVI) foram classificados como formas isomórficas do SQVM. Através da análise estrutural ficou evidente que o grau de hidratação é dependente do tamanho do ânion inserido na estrutura cristalina. É importante destacar que, uma vez que o processo de cristalização é empregado na produção de aproximadamente 70% de todas as formas sólidas obtidas, torna-se essencial conhecer os efeitos do processo de cristalização em IFAs (WOUTERS; QUÉRÉ, 2012), em especial para compostos pertencentes à Classe IV do BCS como o SQVM. Os resultados obtidos nesse estudo encontram-se publicados no periódico *Crystal Growth & Design*, intitulado: *Isomorphous Salts of Anti-HIV Saquinavir Mesylate: Exploring the Effect of Anion-Exchange on Its Solid-State and Dissolution Properties* (Apêndice C).

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Material

O IFA SQVM, micronizado, utilizado no estudo, é sintetizado e foi doado pelo Laboratório Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil.

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Métodos Relacionados à Obtenção e Caracterização do SQVM

2.2.1 Processo de Obtenção do Monocristal de SQVM

Monocristais de SQVM foram obtidos através da técnica de evaporação lenta. Uma solução saturada de SQVM em metanol (obtida com aquecimento até completa solubilização do fármaco) foi mantida à temperatura de 4°C com evaporação restrita por aproximadamente 40 dias (até o momento de visualização de pequenos cristais). Os monocristais de SQVM foram obtidos no Laboratório de Controle de

Qualidade da UFSC e a estrutura foi resolvida em parceria com o Departamento de Química da UFSC.

2.2.2 Processo de Obtenção do Cocrystal de SQVMSLS

O cocrystal de SQVM e LSS (SQVMSLS) foi obtido a partir de uma solução saturada do fármaco em LSS 0,25% pela técnica de evaporação lenta à temperatura ambiente. O cocrystal foi obtido no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia da UFSC.

2.2.3 Caracterização do Estado Sólido do SQVM

2.2.3.1 Difração de Raios X de Monocristal (XRSCD)

As análises cristalográficas foram realizadas em Difratorômetro de monocristal da Bruker (APEX II DUO) no Departamento de Química da UFSC. Utilizou-se fonte de molibdênio acoplada a um monocromador de grafite ($K\alpha = 0,71073 \text{ \AA}$) e temperatura de $173 (\pm 2) \text{ K}$ em sistema *Cryojet* da Oxford. A estrutura foi resolvida por métodos diretos, refinada com a aplicação do método dos mínimos quadrados e utilizando-se matriz completa através dos softwares SIR97 (ALTOMARE et al., 1999) e SHELXL97 (SHELDRICK, 1997), respectivamente. Todos os átomos, com exceção dos hidrogênios, foram refinados com parâmetros de deslocamento anisotrópico. O programa PLATON (SPEK, 2009) foi utilizado para o desenho da figura da estrutura molecular.

Para o cocrystal obtido, as medidas foram realizadas no Laboratório de Difração de raios X da Universidade Federal Fluminense. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente usando radiação $\text{Cu } K\alpha$ produzida por microfones de raios X de um difratômetro Bruker D8 Venture equipado com detector CMOS Photon 100. O software Apex2 foi utilizado para a análise das imagens de difração (integração/redução de dados) (BRUKER, 2015). As estruturas foram resolvidas utilizando-se os métodos diretos, implementado no software ShelXS (SHELDRICK, 2008). O refinamento da estrutura por mínimos quadrados sobre F^2 foi realizado usando o software SheXL-12 (SHELDRICK, 2008).

2.2.3.2 Difração de raios X utilizando o método de Pó (XRPD)

As análises de XRPD para o SQVM foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Difração de Raios X do Departamento de Física da UFSC. As medidas foram realizadas em difratômetro XPERT (Xpert Pro Multi-Purpose Diffractometer, Pan Analytical) operando com 40 kV, corrente de 45 mA e equipado com tubo de raios X com ânodo de cobre, $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente e os difratogramas foram coletados em varredura 2θ entre 5° e 30° .

2.2.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TG)

As análises de DSC para SQVM foram feitas no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC em célula DSC-60 (Shimadzu). Foram utilizados cadinhos de alumínio hermeticamente fechados com aproximadamente 1,2 mg de amostra. Trabalhou-se com atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Um cadinho de alumínio vazio e hermeticamente fechado foi utilizado como referência. O equipamento foi previamente calibrado com índio. Ciclos únicos de aquecimento na faixa de temperatura de 25 a 400°C foram utilizados para a avaliação das amostras. Os dados obtidos foram processados em software TA-60. As curvas de TG foram obtidas no mesmo laboratório em termobalança modelo TGA-50 (Shimadzu), utilizando-se cadinho de platina aberto. Aproximadamente 3,2 mg de cada amostra, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min), e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ foi avaliada no intervalo de temperatura de 25 a 400°C . O equipamento foi previamente calibrado com padrão de oxalato de cálcio.

2.2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As fotomicrografias de SQVM foram realizadas no LCME da UFSC, em microscópio da Philips, modelo XL 30. As amostras foram dispersas em fita adesiva dupla face e recobertas com filme de ouro (350 \AA) no *stub* porta amostra. A voltagem de aceleração do feixe primário foi de 15 kV. As amostras foram analisadas em aumento de 1500 vezes.

2.2.3.5 Espectroscopia Raman (RS)

As medidas de Raman para o SQVM foram obtidas no LSCnM da UFSC em equipamento dispersivo Peak Seeker 785 (RAM-PRO-785) com resolução espectral de 6 cm^{-1} . O equipamento operou com laser diodo de 785 nm e potência de 100 mW na fonte. Os espectros foram coletados à temperatura ambiente, intervalo de 600 a 1800 cm^{-1} e tempo de aquisição de 30 segundos.

2.2.3.6 Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Os espectros de infravermelho do SQVM foram obtidos no Laboratório de Química Farmacêutica da UFSC em equipamento Prestige-21 da Shimadzu. As amostras foram misturadas a brometo de potássio (KBr) e analisadas na faixa espectral de 600 a 3500 cm^{-1} .

2.2.3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises de HPLC foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC em cromatógrafo Shimadzu LC 10AT equipado com degaseificador DGU-10AL, detector UV-VIS (Shimadzu SPD-10AV) fixado em 240 nm e auto-injetor Rheodyne 7125. Os cromatogramas foram obtidos através do software CLASS-VP (version RV 6.14). Utilizou-se coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$), fase móvel acetonitrila: fosfato de potássio di-hidrogenado (60:40 v/v) em pH ajustado com ácido ortofosfórico (pH 3,2; 30 mM). Utilizou-se fluxo de 1 ml/ min e volume de injeção de 20 μL . O método foi previamente desenvolvido e validado de acordo com o ICH Guidelines (CAON et al., 2013). As amostras foram avaliadas em triplicata.

2.2.3.8 Dissolução por Dispersão

As análises de dissolução por dispersão para o SQVM foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC em dissolutor VARIAN modelo VK 7000. Utilizou-se Aparato 2 (USP), rotação de 75 rpm e temperatura de $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. 200 mg de fármaco foram adicionados a 300 mL de meio (LSS 0,25%). Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos tempos de 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min com posterior reposição do meio de forma a manter o volume constante. As alíquotas foram filtradas e analisadas por HPLC conforme descrito no item 2.2.3.7. Os ensaios foram feitos em triplicata.

2.3 Métodos Relacionados à Obtenção e Caracterização de Novas Formas de SQV

2.3.1 Processo de Obtenção de Novas Formas de SQV

Monocristais de cloreto de saquinavir tri-hidratado (SQVCl), brometo de saquinavir di-hidratado (SQVBr) e iodeto de saquinavir mono-hidratado (SQVI) foram obtidos via *anion-exchange* a partir de soluções de SQVM. Quantidades estequiométricas de cloreto de sódio (NaCl), brometo de sódio (NaBr) ou iodeto de potássio (KI), foram adicionadas às soluções de SQVM (0,047 mmol) em 4 mL de propilenoglicol ou metanol, e em seguida, 4 mL de água foram adicionados. As soluções foram aquecidas até completa solubilização. As soluções contendo cloro e bromo foram mantidas à temperatura ambiente, enquanto a solução contendo iodo foi refrigerada lentamente (mantida em isopor), de modo a se obter cristais de tamanho adequado para a análise em difratômetro de monocristal. Monocristais de SQVM foram obtidos conforme relatado no item 2.2.1 para a resolução da estrutura à temperatura ambiente e posterior comparação com as demais formas. Para o SQVM e suas formas, os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Molecular e Cristalografia do Departamento de Química da Universidade de Bolonha, Itália.

2.3.2 Caracterização do Estado Sólido das Novas Formas de SQV

2.3.2.1 Difração de Raios X de Monocristal (XRSCD)

As medidas de difração de raios X de monocristal foram realizadas no Laboratório de Engenharia Molecular e Cristalografia do Departamento de Química da Universidade de Bolonha, Itália. SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI foram medidos à temperatura ambiente em difratômetro da Oxford X'Calibur S CCD, equipado com monocromador de grafite (Mo-K α radiation, $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Todos os átomos não-hidrogênio, com exceção do átomo de iodo no SQVI, foram refinados anisotropicamente. Os átomos de hidrogênio foram posicionados e refinados em suas ligações com os respectivos átomos de carbono, oxigênio ou nitrogênio. Os softwares SHELX97 e PLATON foram usados para a solução das estruturas e refinamento, e para o cálculo do coeficiente de empacotamento e volume livre (acessível), respectivamente. SCHAKAL99 e MERCURY foram empregados para o desenho gráfico das moléculas.

2.3.2.2 Difração de raios X utilizando o método de Pó (XRPD)

Com relação às medidas de SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI à temperatura ambiente, as mesmas foram realizadas em difratômetro XPERT (Xpert Pro Automated Diffractometer, Pan Analytical), equipado com tubo de raios X com ânodo de cobre, $\text{CuK}\alpha$, sem monocromador. As medidas foram realizadas no Laboratório de Engenharia Molecular e Cristalografia do Departamento de Química da Universidade de Bolonha, Itália. Os experimentos foram conduzidos a 40 kV e corrente de 40 mA, e os difratogramas foram coletados em varredura 2θ entre 5 e 40°, passo de 0,011° e tempo de 50 segundos por passo. SQVM e suas formas foram avaliados por difração de raios X pelo método de pó com temperatura variável (30 a 130 °C). Os difratogramas foram obtidos no intervalo 2θ de 5 a 35° e coletados em difratômetro Xpert Pro, Pan Analytical equipado com detector X'Celerator e câmera AntonPaar TTK 450, tubo de raios X com ânodo de cobre, $\text{CuK}\alpha$, sem monocromador.

2.3.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de DSC para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI foram feitas no Laboratório de Análise Térmica da Universidade de Bolonha, Itália, em equipamento DSC 200 F3Maia. Amostras entre 2 e 4 mg foram avaliadas no intervalo de temperatura de 25 a 270 °C, em cadinhos de alumínio abertos, sob atmosfera de Nitrogênio de 50 mL/min, e razão de aquecimento de 10 °C/min.

2.3.2.4 Termogravimetria (TG)

Para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI as medidas foram feitas na Universidade de Bolonha, em termobalança da PerkinElmer TGA7, em atmosfera de nitrogênio de 50 mL/min, razão de aquecimento de 5 °C/min e intervalo de 37 a 500 °C.

2.3.2.5 Microscopia Hot-Stage (HSM)

A avaliação de SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI foi realizada no Laboratório de Engenharia Molecular e Cristalografia do Departamento de Química da Universidade de Bolonha. O dispositivo Linkam TMS94 acoplado à placa de platina LTS350 foi utilizado para a avaliação das amostras. As amostras foram analisadas em microscópio

Olympus com aumento de 100 x e as imagens foram coletadas em software Cell, em câmera Visicam 5.0.

2.3.2.6 Dissolução por dispersão e Avaliação da solubilidade

Para todas as amostras de SQV (SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI) as análises de dissolução por dispersão foram realizadas na indústria PolyCrystalLine, em Bolonha. As concentrações máximas em solução foram medidas adicionando-se um excesso de SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI a 10 mL de água. As amostras foram mantidas sob agitação (agitador Kika[®] placa de agitação magnética Werke) de 300 rpm durante 3, 12 e 24 horas à temperatura ambiente. Após os intervalos de tempo, foram filtradas (0,45 µm), diluídas e analisadas por espectroscopia de UV (UV-VIS Cary 50 Varian) a 240 nm através do software Concentration (Cary 50 WinUV Software V.3). O teste foi realizado em duplicata e as medidas para cada amostra foram feitas em quintuplicata. A curva de calibração foi construída no intervalo de 2,5 a 15,0 µg/mL, plotando-se absorvância *versus* concentração para 5 soluções de SQVM em água. Estas soluções foram preparadas a partir de uma solução-estoque a 500 µg/mL em água. Para o perfil de dissolução utilizou-se o Aparato 2 em dissolutor Hanson's Vision Classic 6. Aproximadamente 50 mg de cada amostra (SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI) foi adicionado a 100 mL de meio (água) sob agitação de 100 rpm e temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 90 min. As amostras foram filtradas, diluídas e analisadas no UV-Vis. Os valores obtidos em Absorvância/ min (através do software anteriormente citado) foram convertidos para Concentração/ min.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização Estrutural e do Estado Sólido e Avaliação das Propriedades de Dissolução do SQVM

O SQVM cristaliza no sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1$, com uma molécula protonada de saquinavir e uma molécula de mesilato na unidade assimétrica (Figura 27 e Tabela 10).

Figura 27. Representação ORTEP da molécula de SQVM mostrando o conteúdo presente na unidade assimétrica. Os elipsoides são apresentados em nível de probabilidade de 50%.

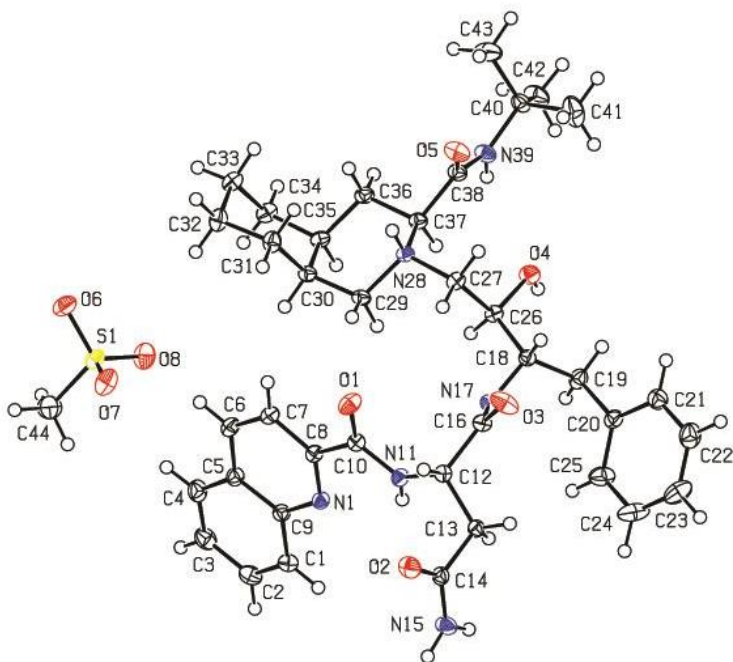


Tabela 10. Informações cristalográficas e de refinamento obtidas para o SQVM.

Fórmula empírica	C ₃₉ H ₅₄ N ₆ O ₈ S	
Peso molecular	766,94	
Sistema Cristalino	Monoclínico	
Grupo Espacial	P2 ₁	
a (Å)	14,6086 (6)	
b (Å)	9,3400 (4)	
c (Å)	15,8074 (7)	
β (°)	114,746(2)°	
V (Å ³)	1958,77(15)	
Z	2	
T (K)	173(2)	
Densidade calculada (g cm ⁻³)	1,300	
Coeficiente Absorção (mm ⁻¹)	0,142	
Reflexões coletadas	101810	
Reflexões independentes	16065	
R _{int}	0,0287	
Goodness-of-fit on F ²	1,003	
Final R índices [I>2σ(I)]	R1 = 0,0287	wR2 = 0,0765
R índices (all data)	R1 = 0,0316	wR2 = 0,0779

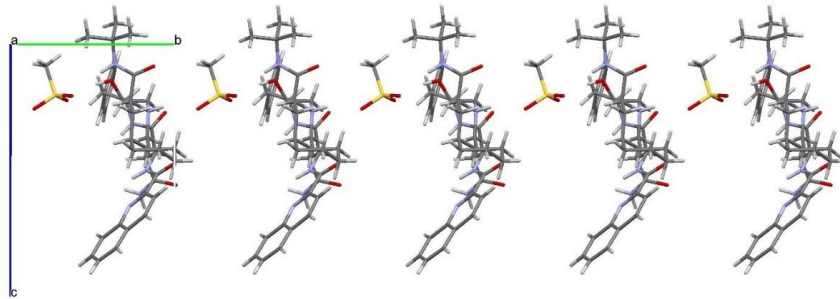
Diferentes ligações de hidrogênio e padrões de conformação dentro das moléculas de SQVM levam a um modo de empacotamento característico ao longo do eixo b (Tabela 11).

Tabela 11. Geometria das ligações de hidrogênio para SQVM.

D-H...A	d(D-H) Å	d(H...A) Å	d(D...A) Å	θ(DHA) deg
O4-H4O...O6 ⁱ	0,821(17)	1,983(16)	2,7808(9)	163,9(14)
N28-H28...O8 ⁱⁱ	0,861(13)	2,084(13)	2,8263(9)	144,0(11)
N39-H39...O7 ⁱ	0,858(15)	2,263(15)	3,1144(10)	171,1(13)
N11-H11...N1	0,849(15)	2,247(13)	2,6617(9)	110,2(11)
N11-H11...O2 ⁱⁱⁱ	0,849(15)	2,601(14)	3,1082(10)	119,6(10)
N17-H17...O2 ⁱⁱⁱ	0,834(15)	2,045(16)	2,8659(9)	167,9(14)
N15-H15A...O6 ^{iv}	0,906(15)	2,304(15)	3,1957(10)	168,0(14)
N15-H15B...O1 ⁱⁱⁱ	0,845(16)	2,078(16)	2,9170(10)	172,1(13)

A interação intramolecular do SQV é formada por uma ligação S5 N–H \cdots N da amida secundária com a amina terciária quinolina próxima (N11–H11 \cdots N1). Além disso, o mesmo grupo amina é também envolvido em uma interação intermolecular entre duas moléculas de SQV (N11–H11 \cdots O2). Deste modo, moléculas de SQV são mantidas juntas na estrutura cristalina seguindo dois padrões básicos: ligações de hidrogênio diretas saquinavir-saquinavir e ligações de hidrogênio indiretas saquinavir-mesilato. Outra ligação de hidrogênio ocorre entre o grupo carbonil quinolina adjacente e a amida primária (N15–H15B \cdots O1). Os arranjos supramoleculares para N–H \cdots O1 e N–H \cdots O2 no interior de moléculas de saquinavir dímero relacionadas são representadas graficamente através dos anéis R 2_2 (14) e R 2_2 (15). Moléculas de SQV de simetria relacionada estão conectadas ainda através de ligações mesilato por interações N–H \cdots O (N15–H15A \cdots O6). Moléculas vizinhas de SQV formam cadeias poliméricas ao longo do eixo b através da interação com mesilato (Figura 28).

Figure 28. *Synthons* intermoleculares saquinavir-mesilato em complexo supramolecular multicomponente ao longo do eixo b.

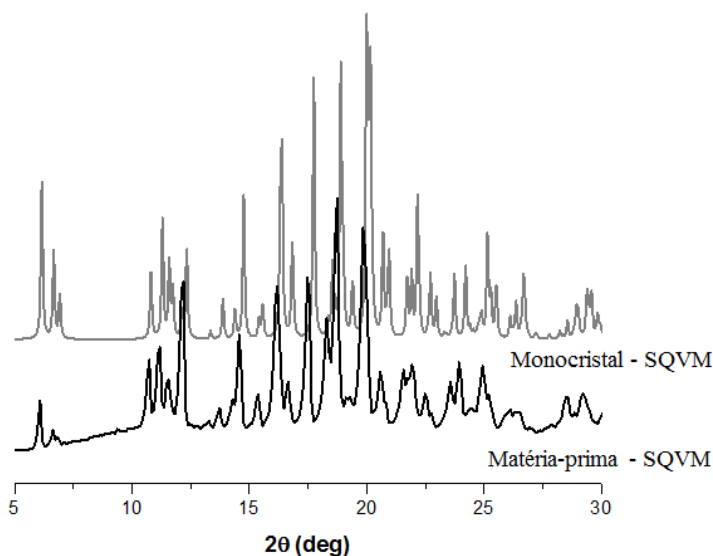


O arranjo saquinavir-mesilato-saquinavir é estabelecido pela interação entre o ânion sulfonato, e toda a cadeia C 2_2 (9) é construída pela associação entre os dímeros enxofre-saquinavir. Neste sistema, o nitrogênio N28 é protonado e o mesilato encontra-se estreitamente próximo interagindo com uma molécula transladada de saquinavir via ligação de hidrogênio (N28–H28 \cdots O8). Os grupos sulfônicos aceptores por sua vez, estão envolvidos na ligação do par saquinavir-mesilato via ligações de hidrogênio O–H \cdots O e N–H \cdots O. Uma porção (S=O) do grupo mesilato forma uma ligação de hidrogênio O–H \cdots O com o hidrogênio

hidroxil ($O4-H40\cdots O6$) e uma segunda porção ($S=O$) forma a ligação $N-H\cdots O$ com a mesma molécula de SQV ($N39-H39\cdots O7$).

As informações cristalográficas obtidas a partir da resolução da estrutura do monocristal foram utilizadas para a avaliação das propriedades da matéria-prima do fármaco. O padrão de difração de raios X da matéria-prima de SQVM e o padrão de difração calculado a partir do monocristal obtido foram comparados (Figura 29).

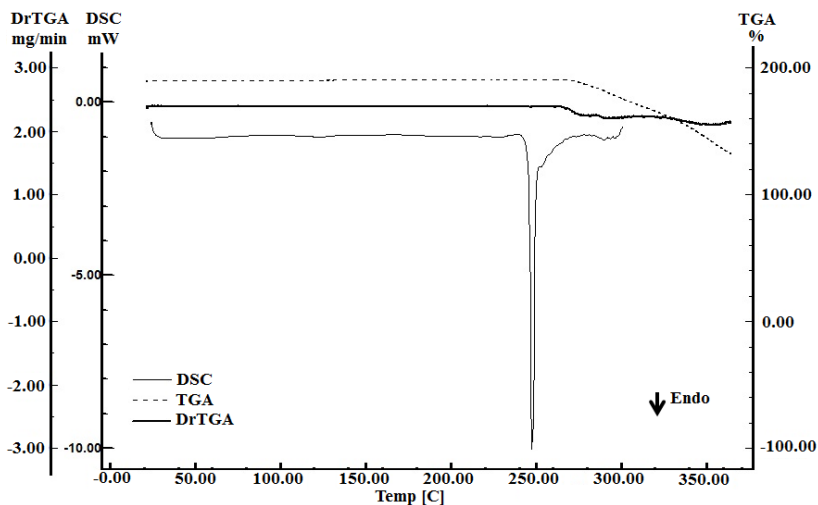
Figura 29. Padrão de difração de raios X utilizando o método de pó para a amostra de SQVM. O padrão de difração do monocristal foi calculado a partir da informação obtida a 173 K. O padrão de difração de pó da matéria-prima foi obtido experimentalmente à temperatura ambiente.



Os padrões de difração indicaram mesma estrutura cristalina, descartando-se a formação de solvatos ou de diferentes polimorfos. Entretanto, a sobreposição dos difratogramas mostrou um deslocamento na região de baixo ângulo para a matéria-prima de SQVM. As diferenças observadas entre as informações obtidas a partir da matéria-prima e a calculada a partir do monocristal foram atribuídas às diferentes temperaturas utilizadas na coleta dos dados (173 K para o monocristal e aproximadamente 298 K para a matéria-prima).

As propriedades do estado sólido da matéria-prima de SQVM foram investigadas através de técnicas espectroscópicas, microscópicas e térmicas além do perfil de dissolução. As análises de DSC e TG mostraram evento de fusão em 247,50 °C (Figura 30). Observou-se um processo de decomposição único imediatamente após a fusão. Além disso, através da análise termogravimétrica comprovou-se ausência de solvente residual na amostra.

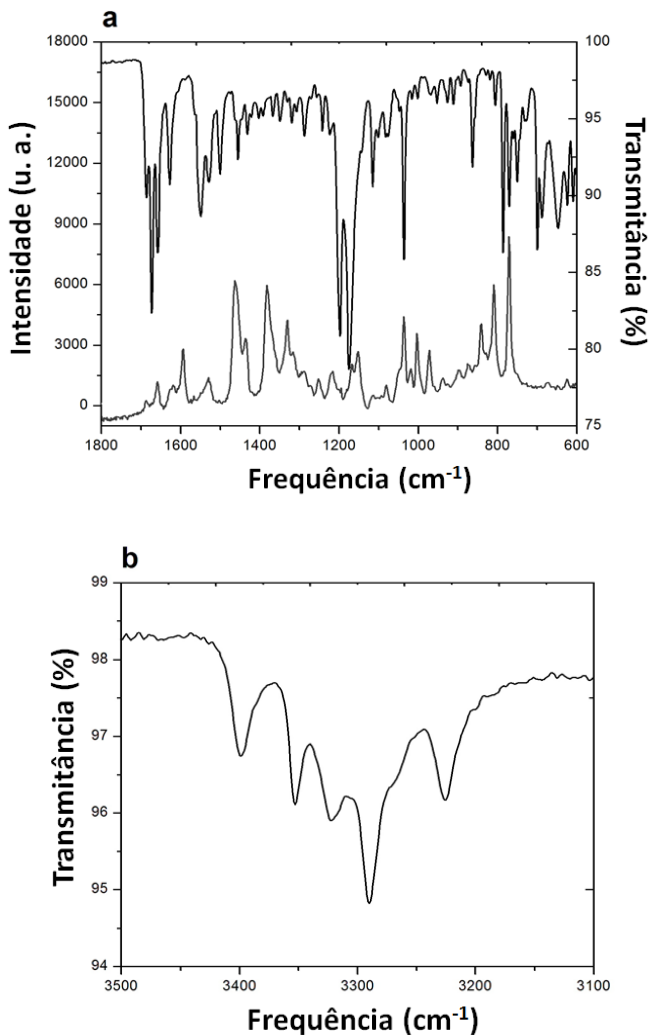
Figura 30. Curvas de DSC, TGA e DrTGA (derivada da TGA) do SQVM obtidas em atmosfera de N₂ (50 mL/ min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



Através das espectroscopias de Raman e FT-IR foi possível comparar as principais bandas observadas para a amostra com aquelas relatadas na literatura e caracterizar a matéria-prima de SQVM (Figura 31(A)). O espectro de infravermelho mostrou bandas S–O de estiramento características em 1197 cm⁻¹, 1174 cm⁻¹ e 1115 cm⁻¹. As bandas de estiramento C–O das amidas foram observadas no intervalo de 1680 – 1620 cm⁻¹ (1685 cm⁻¹, 1672 cm⁻¹, 1657 cm⁻¹ e 1627 cm⁻¹). A flexão amida N–H também foi observada entre 1680 – 1620 cm⁻¹ (1686 cm⁻¹, 1673 cm⁻¹, 1658 cm⁻¹ e 1627 cm⁻¹). O modo de estiramento N–H amida foi observado acima de 3000 cm⁻¹ (3353 cm⁻¹, 3322 cm⁻¹, 3290 cm⁻¹, 3225 cm⁻¹). As bandas de estiramento O–H relativas ao grupamento álcool foram atribuídas em 3399 cm⁻¹, Figura 31 (B). Estes

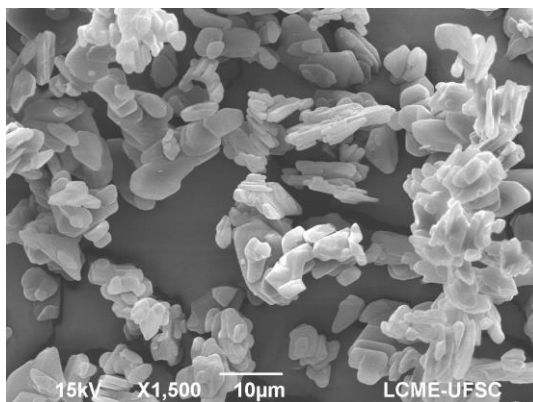
resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Branham e colaboradores (BRANHAM; MOYO; GOVENDER, 2012).

Figura 31. (A) Espectro de infravermelho (topo) e de Raman (abaixo) do SQVM. (B) Detalhes do espectro de infravermelho evidenciando o estiramento amida N-H.



A fotomicrografia da matéria-prima de SQVM mostrou uma distribuição de tamanho de partículas heterogênea e a morfologia revelou partículas aglomeradas, planas e de comprimento e largura semelhantes (Figura 32).

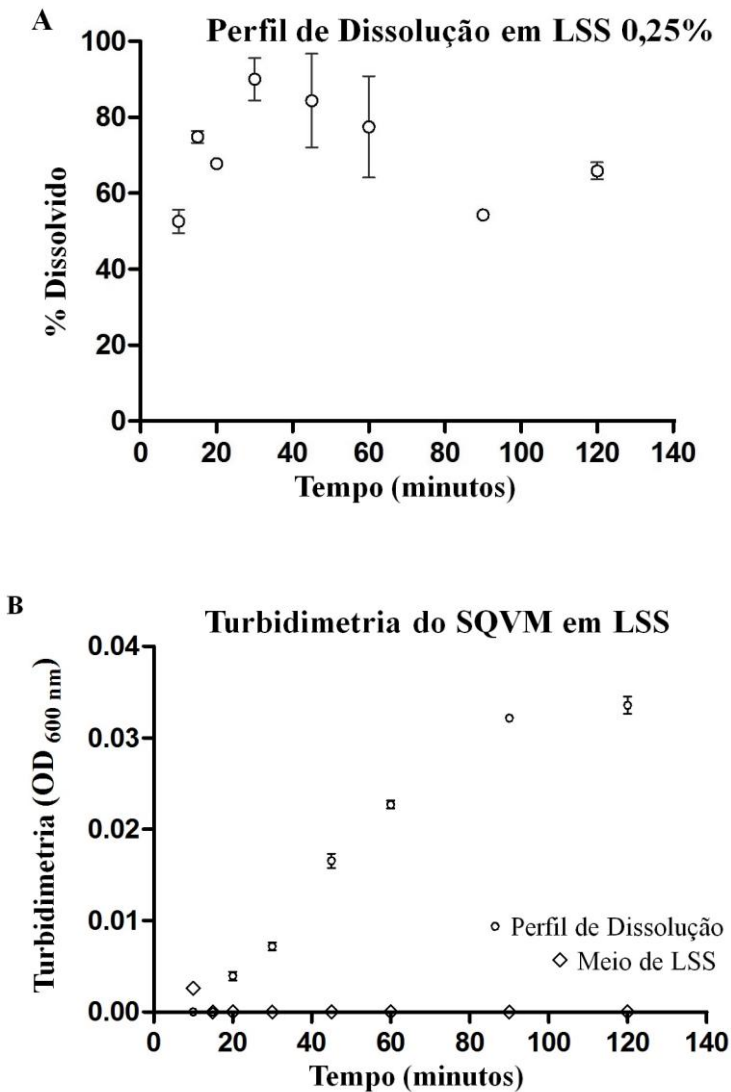
Figura 32. SEM da matéria-prima de SQVM.



A matéria-prima de SQVM é micronizada na tentativa de diminuir a variabilidade interpaciente e melhorar a biodisponibilidade do fármaco. Entretanto, a alta lipofilicidade da amostra pode promover a aglomeração das partículas e consequentemente levar à redução da área de superfície de contato. Este comportamento pode variar durante a análise, motivo do alto desvio padrão observado no perfil de dissolução em meio LSS 0,25% mostrado na Figura 33 (A). O uso de surfactantes no meio de dissolução é um modo muito efetivo de melhorar a molhabilidade e consequentemente a taxa de dissolução, particularmente para fármacos de baixa solubilidade aquosa. Além disso, meios contendo surfactantes simulam os fluídos gastrointestinais, como os sais biliares, o colesterol e os ésteres (CHAKRABORTY et al., 2009; FOTAKI et al., 2013). O LSS é um surfactante aniônico indicado pela USP (USP, 2007) para ser utilizado em fármacos de baixa solubilidade aquosa. Além disso, há relatos de que as condições *sink* são mais facilmente mantidas em meio de LSS (PINTO, CABRAL, SOUSA, 2014; PANIKUMAR et al., 2012; HONÓRIO et al., 2013). Em meios contendo um surfactante aniônico, espera-se que as interações eletrostáticas entre os ânions do LSS e os grupamentos catiônicos do

fármaco causem um decréscimo nas forças de repulsão dos grupos da porção “cabeça” do surfactante levando a um aumento da solubilização (CHAKRABORTY et al., 2009). Entretanto, o resultado obtido no perfil de dissolução do SQVM em meio contendo o surfactante aniônico LSS foi contraditório (Figura 33 (A)), mesmo quando a CMC foi assegurada. A faixa de CMC para o LSS é de 1 a 10 mM (FOTAKI et al., 2013), ou seja, entre 0,025 e 0,25% (m/v). Portanto o mecanismo de interação entre LSS e a molécula de SQVM foi investigado, uma vez que, a capacidade dos surfactantes em solubilizar fármacos envolve fatores como temperatura, força iônica e estrutura química do fármaco e do surfactante (TORCHILIN, 2001; JAIN; RAN; YALKOWSKY, 2004; RANGEL-YAGUI; PESSOA-JR; TAVARES, 2005). Pode-se observar na Figura 33 (A) que o percentual dissolvido em 20 minutos é menor que aquele dissolvido em 15 minutos, além disso, este comportamento se repete nos tempos subsequentes. Após algum tempo em solução, a porção aniônica das moléculas remanescentes de LSS interagem com as espécies catiônicas da molécula de SQV para formar um sal insolúvel ou menos solúvel, o qual precipita resultando no fenômeno de dessolubilização (JAIN; RAN; YALKOWSKY, 2004; CHAKRABORTY et al., 2009; FOTAKI et al., 2013). As medidas de turbidez representativas do comportamento de precipitação do SQVM em meio de LSS são apresentadas na Figura 33 (B). Pode-se observar que o processo de precipitação inicia em 20 minutos. Este resultado está de acordo com os dados obtidos através do perfil de dissolução (Figura 33 (A)), no qual se observa um comportamento anômalo com relação ao percentual de fármaco dissolvido a partir de 20 minutos.

Figura 33. (A) Perfil de dissolução da matéria-prima de SQVM e (B) turbidimetria do SQVM, ambos em meio de LSS 0,25%.



3.2 Caracterização Estrutural do cocrystal SQVMSLS para a compreensão das Propriedades de Dissolução do SQVM

O cocrystal SQVMSLS cristaliza no mesmo grupo espacial que o SQVM, porém, além da molécula de SQV, cristaliza com uma molécula de LSS ligada ao grupamento mesilato (Figura 34 e Tabela 12).

Quando se comparam os parâmetros de rede do SQVM com os parâmetros de rede do cocrystal, observa-se a manutenção dos eixos cristalográficos **a** e **b**. A principal diferença ocorre no eixo **c**, que aumenta de 15,966(5) para 21,1924(14) Å (Tabelas 10 e 12). Desta forma, pode-se constatar que o LSS cristaliza entre as moléculas de mesilato, adaptando-se em uma cavidade formada ao longo do eixo **c**. Na estrutura do cocrystal há pontes de hidrogênio adicionais às observadas na estrutura do SQVM. No SQVMSLS, ocorrem ligações de hidrogênio N-H \cdots O através do nitrogênio 39, além da ligação ao N28 observada para o SQVM.

Figura 34. Representação da molécula de SQVM e da molécula do cocrystal obtido (SQVMSLS) mostrando o conteúdo presente na unidade assimétrica. (A Figura foi obtida através do software Olex2).

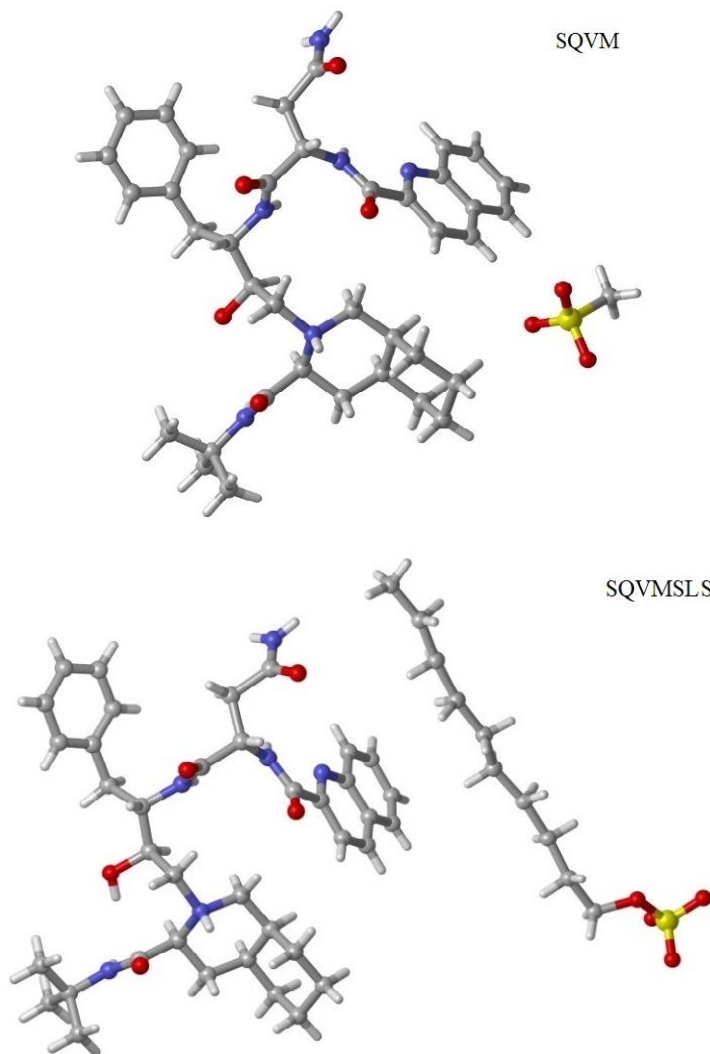


Table 12. Informações cristalográficas e de refinamento obtidas para o co cristal SQVMSLS.

Fórmula empírica	$C_{48}H_{72}N_6O_9S$
Peso molecular	909,17
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	$P2_1$
a (Å)	14,4222(9)
b (Å)	9,2926(6)
c (Å)	21,1924(14)
α (°)	90,00
β (°)	106,742(3)
γ (°)	90,00
V (Å ³)	2719,8(3)
Z	2
T (K)	293(2)
Densidade calculada (g cm ⁻³)	1,110
Coefficiente Absorção (mm ⁻¹)	0,964
Reflexões coletadas	41508
Reflexões independentes	9951
R_{int}	0,0761
<i>Goodness-of-fit</i> on F^2	1,030
Final R índices [$I \geq 2\delta(I)$]	R1 = 0,0642 wR2 = 0,1715
Final R índices [all data]	R1 = 0,0937 wR2 = 0,1962

Além da compreensão com relação ao comportamento de dissolução do SQVM e do alerta com relação ao uso de surfactantes, indicando o meio de LSS como inapropriado para o SQVM, a obtenção do co cristal e sua avaliação estrutural permitiu a busca por novas formas de SQV. A ligação da molécula de LSS ao grupo mesilato indicou a possibilidade de que outros ânions poderiam deslocar o grupamento mesilato ou ligar-se a ele. A partir daí os sais de cloreto de sódio (NaCl), brometo de sódio (NaBr) e iodeto de potássio (KI), comumente utilizados na formulação de medicamentos, foram utilizados com o objetivo de obtenção de novas formas de SQV.

3.3 Caracterização Físico-Química e Estrutural do SQVM e suas Novas Formas

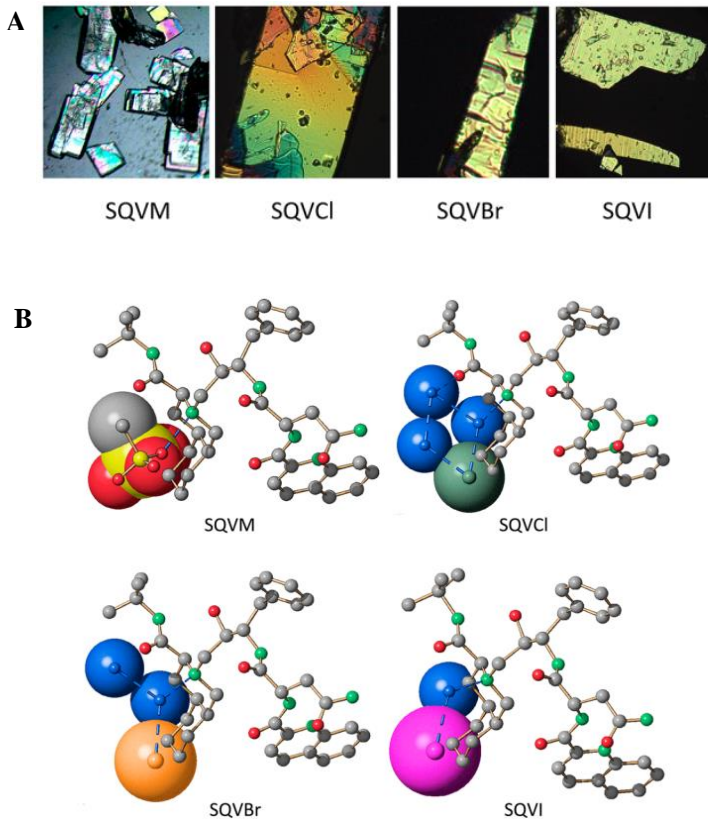
O monocrystal de SQVM foi novamente obtido e a sua estrutura resolvida à temperatura ambiente para a correta comparação com as demais formas cristalizadas. O SQVM cristaliza no sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1$ com uma molécula protonada de saquinavir e um ínon mesilato na unidade assimétrica ($Z' = 1$). SQVCl, SQVBr e SQVI são formas isomorfas do SQVM. Conforme definido pela *International Union of Crystallography* (IUCR) (http://reference.iucr.org/dictionary/Isomorphous_crystals), dois cristais são ditos serem isomorfos se ambos possuírem o mesmo grupo espacial e dimensões de cela unitária. Além disso, se os tipos e as posições dos átomos em ambos forem os mesmos, exceto por uma modificação de um ou mais átomos em uma estrutura com diferentes tipos de átomos em outra (substituição isomorfa), tal como átomos pesados, ou a presença de um ou mais átomos adicionais em uma das estruturas (adição isomorfa).

O SQVCl, SQVBr e o SQVI apresentam estas características, inserindo-se no conceito de formas isomorfas do SQVM. Com a presença de diferentes quantidades de moléculas de água, os sais halogenados apresentam adição isomorfa; possuem três, duas e uma molécula de água respectivamente. O número de moléculas de água diminui à medida que o tamanho do ânion responsável pelo deslocamento do grupo mesilato aumenta (Tabela 13 e Figura 35).

Tabela 13. Informações cristalográficas e de refinamento obtidas para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI.

	SQVM	SQVCl	SQVBr	SQVI
Fórmula	C ₃₉ H ₅₄ N ₆ O ₈ S	C ₃₈ H ₅₁ N ₆ O ₅ Cl·3H ₂ O	C ₃₈ H ₅₁ N ₆ O ₅ Br·2H ₂ O	C ₃₈ H ₅₁ N ₆ O ₅ I·H ₂ O
Peso molecular	766,94	755,29	783,76	814,74
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo Espacial	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> (Å)	14,633 (5)	14,609 (2)	14,3053 (7)	14,3578 (7)
<i>b</i> (Å)	9,370 (5)	9,3400 (5)	9,7478 (4)	9,4796 (4)
<i>c</i> (Å)	15,966 (5)	15,807 (2)	15,847 (1)	15,982 (1)
α (°)	90,00	90,00	90,00	90,00
β (°)	114,871 (5)	114,746 (12)	111,404 (7)	111,131 (7)
γ (°)	90,00	90,00	90,00	90,00
<i>V</i> (Å ³)	1986,1 (1)	1958,8 (4)	2057,3(6)	2029,0 (6)
<i>Z</i>	2	2	2	2
<i>T</i> (K)	293	293	293	293
<i>D</i> _{calc} (g cm ⁻³)	1,283	1,281	1,329	1,334
μ (mm ⁻¹)	0,140	0,156	1,104	0,839
Refl. medidas	15494	10092	10264	17691
Refl. Indep.	7761	7806	6901	8156
Inf. obs. [<i>I</i> >2 σ (<i>I</i>)]	4516	3522	4168	3949
<i>R</i> _{int}	0,0553	0,0444	0,0390	0,0407
<i>R</i> 1 [<i>I</i> >2 σ (<i>I</i>)]	0,0674	0,1008	0,0686	0,0840
w <i>R</i> ₂ (<i>all data</i>)	0,0896	0,1911	0,1305	0,2647

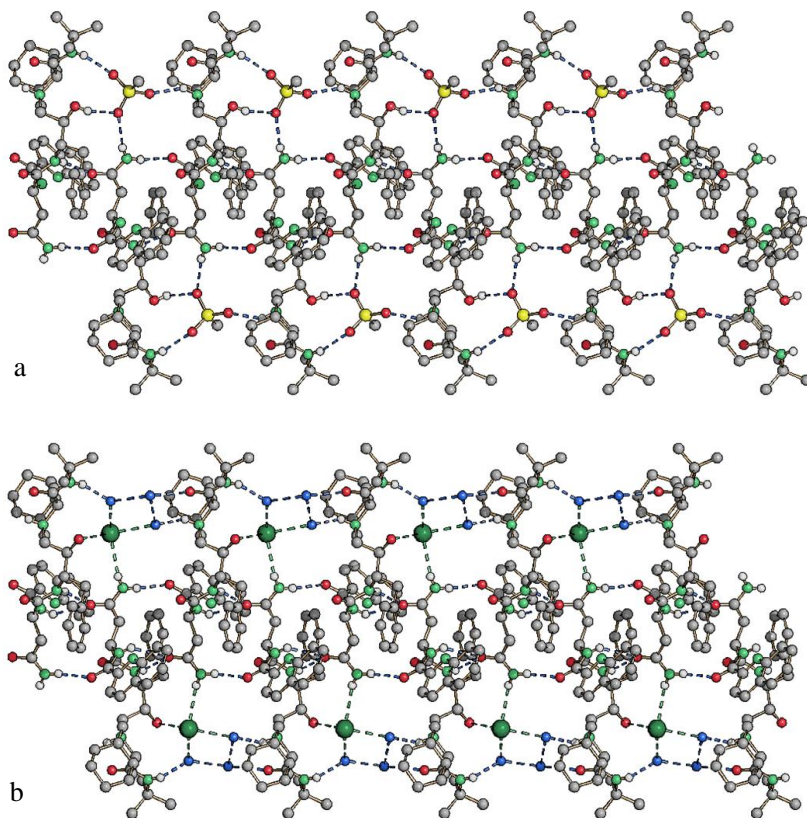
Figura 35. (A) Imagens dos monocristais de SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI obtidas com microscópio óptico à temperatura ambiente e (B) representação gráfica do conteúdo da unidade assimétrica para o SQMV e suas formas isomorfas (átomos de H omitidos para melhor visualização).

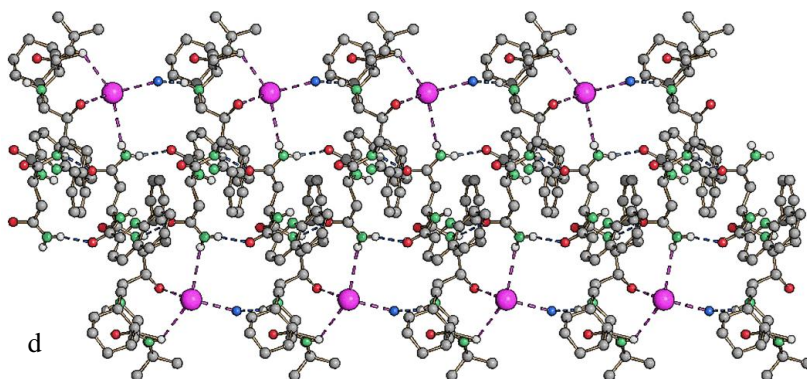
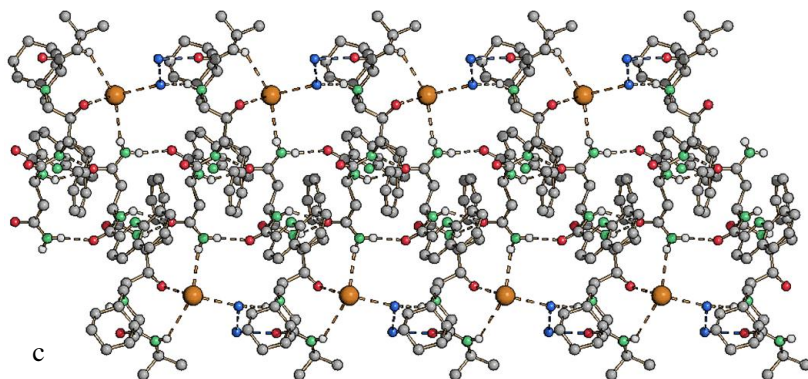


O SQVM e seus sais halogenados cristalizam no sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1$, com uma molécula na unidade assimétrica. No SQVM os ânions mesilato atuam como pontes entre as unidades de saquinavir protonadas originando ligações de hidrogênio que formam cadeias paralelas ao eixo b (Figura 36). Estas cadeias são, por sua vez, conectadas via ligações de hidrogênio N-H \cdots O e formam uma ampla “fita” paralela ao plano ac . Uma vez que SQVCl, SQVBr e SQVI são formas isomorfas ao SQVM, as características de

empacotamento são muito semelhantes para todas as formas, porém, a função de ligação do ânion mesilato é substituída por molécula (s) de água e um ânion halogênio nas estruturas do SQVCl, SQVBr e SQVI. Nestas estruturas, a molécula de água interage diretamente com o grupo NH de uma unidade de SQV e o ânion interage com o grupo OH de um segundo SQV ao longo da cadeia saquinavir-mesilato (Figura 36).

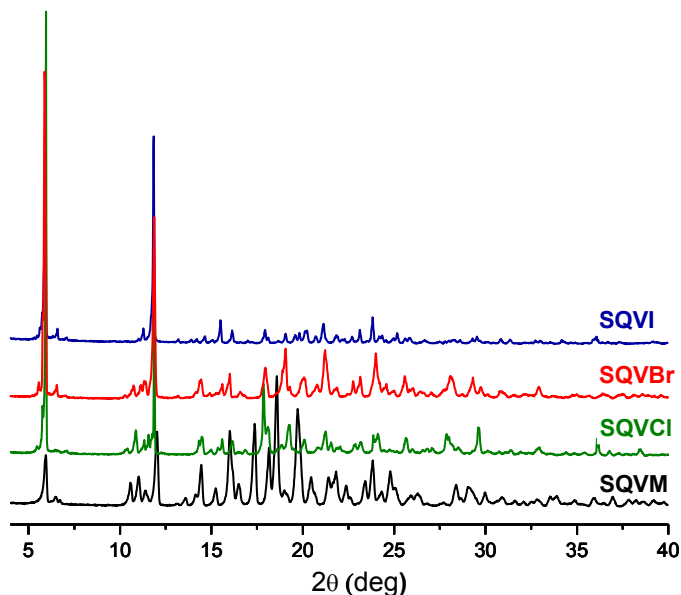
Figura 36. Representação *ball-and-stick* das interações por pontes de hidrogênio entre os íons mesilato, cloreto, brometo e iodeto, o cátion saquinavir e as moléculas de água no SQVM (a), SQVCl (b), SQVBr (c) e SQVI (d).





A diferença no número de moléculas de água e no tamanho e tipo de ânion apresentou um efeito considerável nas dimensões dos eixos das celas (Tabela 13), assim como nas posições das reflexões observadas por XRPD (Figura 37).

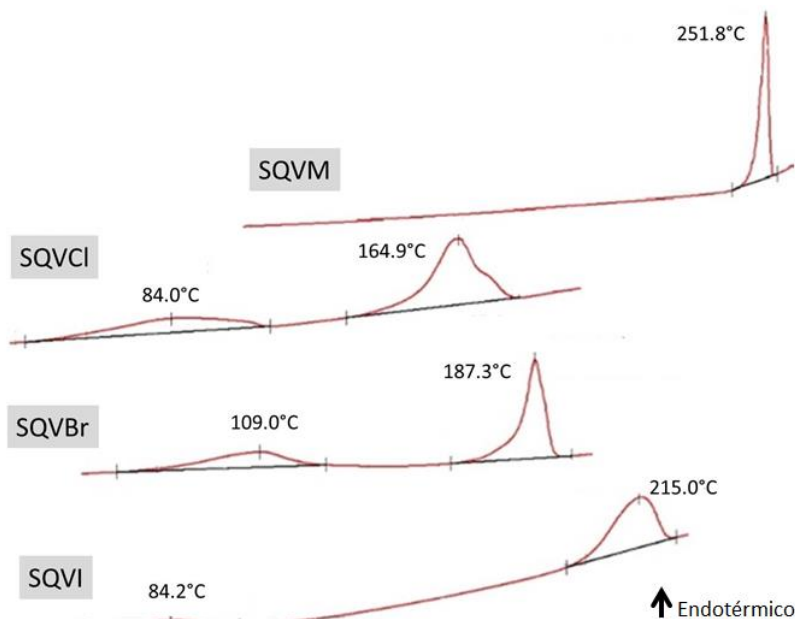
Figura 37. Comparação dos padrões de difração de raios X utilizando o método de pó, obtidos à temperatura ambiente para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI.



Os padrões de difração de raios X utilizando o método de pó mostraram-se similares para o SQVM e as suas formas obtidas, em especial na região de baixo ângulo. Deslocamentos e alterações na intensidade de algumas reflexões específicas, observados nos padrões de difração dos sais halogenados em comparação ao SQVM, foram atribuídos à posição dos diferentes ânions e ao diferente número de moléculas de água presentes em cada espécie.

O comportamento térmico das amostras foi investigado por DSC, TGA e XRPD com temperatura. As medidas de DSC foram realizadas em cadinho aberto. A perda de água, observada como um evento endotérmico (preconizado endotérmico para cima e exotérmico para baixo) na Figura 38 ocorreu em diferentes temperaturas para cada um dos sais hidratados (SQVCl, SQVBr e SQVI).

Figura 38. Medidas de DSC para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI. Os eventos de fusão e a perda das moléculas de água para os sais estão representados.



A Tabela 14 lista o volume acessível (calculado pelo programa Platon (SPEK, 2009)) e seu percentual no volume da cela, calculado com e sem a contribuição dos ânions e das moléculas de água. A remoção virtual dos ânions e das moléculas de água resultou em eficiência de empacotamento e volumes acessíveis similares para os quatro compostos (conforme o esperado, uma vez que são formas isomorfas). Pode-se observar que o mais eficiente empacotamento foi alcançado pelo SQVCl (64,9%) enquanto o empacotamento mais “frouxo” ocorreu no SQVI (63,2%). O fato de que o espaço ocupado pelo íon iodeto e uma molécula de água é menos compactado, reflete a desordem posicional do átomo pesado na estrutura cristalina. Pode-se observar ainda que o SQVI é a forma que apresenta o maior ponto de fusão entre a série dos halogênios (Figura 38 e Tabela 14).

Tabela 14. Ponto de Fusão, coeficiente de empacotamento (c.e.) e volume acessível para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI antes e após a remoção virtual de ânions e moléculas de água.

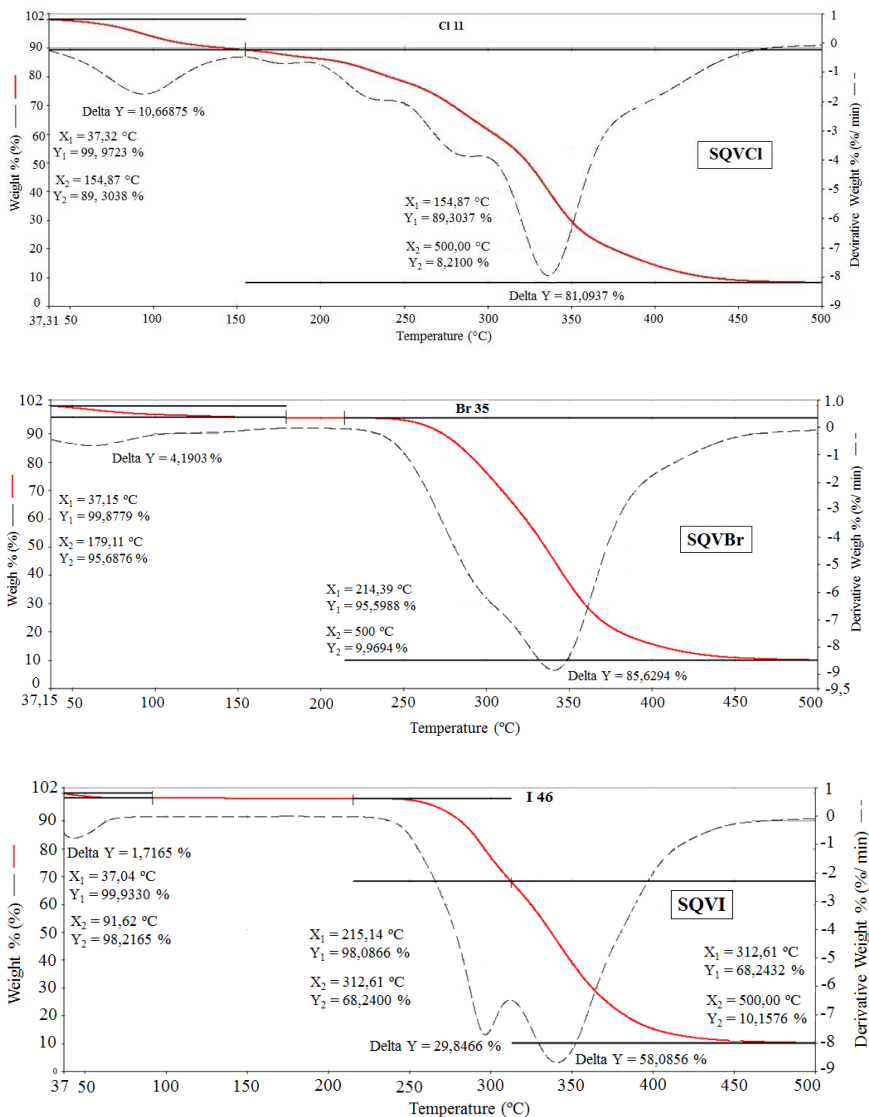
	Ponto Fusão (°C)	c.e.^a %	Volume Acessível (Å³) %		c.e.^a %	Volume Acessível (Å³) %
SQVM	251,79	66,8	25, 1.3	SQV^b	60,6	254, 12.8
SQVCl	164,89	64,9	52, 2.5	SQV^c	58,8	282, 13.7
SQVBr	187,29	63,7	107, 5.2	SQV^d	58,5	301, 14.7
SQVI	214,95	63,2	102, 5.0	SQV^e	59,1	261, 12.9

(a) O coeficiente de empacotamento é avaliado através do programa Platon como o (Volume Molecular) \times (Número de molécula independente na unidade assimétrica) \times 100 / (Volume Cella). Na quinta coluna indica-se a remoção virtual de: (b) mesilato, (c) cloreto e moléculas de água, (d) brometo e moléculas de água, (e) iodeto e molécula de água.

Após a perda da água, observou-se a fusão das formas anidras (Figura 38). Para as três formas as temperaturas de fusão foram inferiores à temperatura de fusão do SQVM. Observou-se ainda que a temperatura de liberação da água a partir da estrutura cristalina foi maior para o SQVBr em comparação ao SQVCl. Mais forte interação foi observada entre as moléculas de água e entre a água e as porções iônicas no SQVBr em comparação ao SQVCl. A mesma relação foi observada entre o SQVI e o SQVBr. O SQVI perde água a uma temperatura inferior à do sal de bromo.

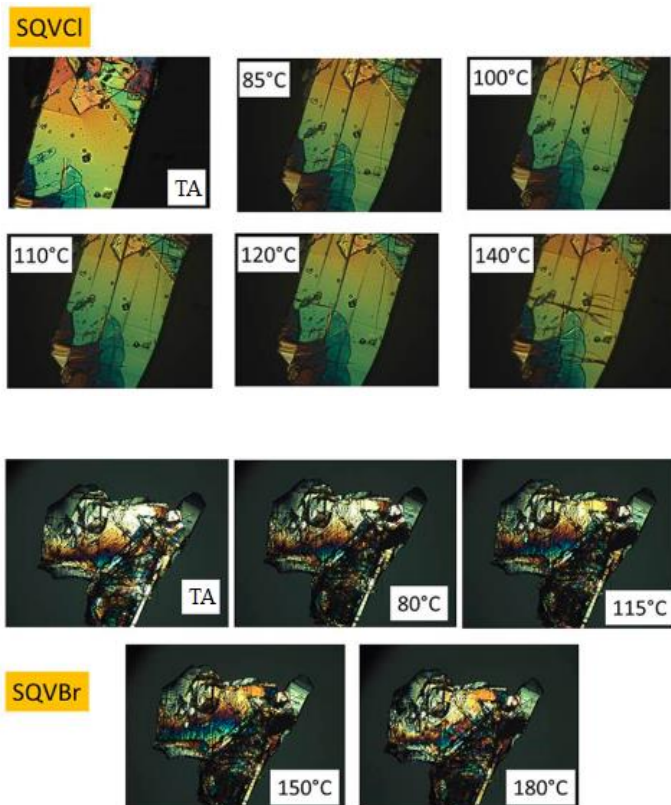
As análises termogravimétricas confirmaram que SQVCl, SQVBr e SQVI contêm três, duas e uma molécula de água respectivamente, e que todas as formas decompõem logo após a fusão (Figura 39).

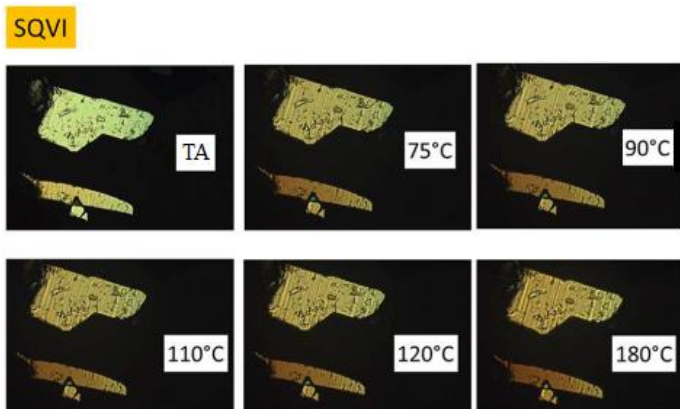
Figura 39. Curvas termogravimétricas confirmando que SQVCl, SQVBr e SQVI contêm três, duas e uma molécula de água, respectivamente, e que todos os sais decompõem em temperatura subsequente à fusão.



A técnica de microscopia Hot-Stage foi empregada para detectar possíveis modificações do hábito cristalino e textura após o aquecimento e consequente liberação de água. Para todas as formas (SQVCl, SQVBr e SQVI) observou-se um leve escurecimento dos cristais acompanhado, em particular para o SQVCl, da formação de linhas escuras, indicativo de estresse e ruptura parcial da superfície dos cristais, conforme apresentado na Figura 40. Entretanto, para todas as amostras, a forma do cristal foi mantida após a perda de água.

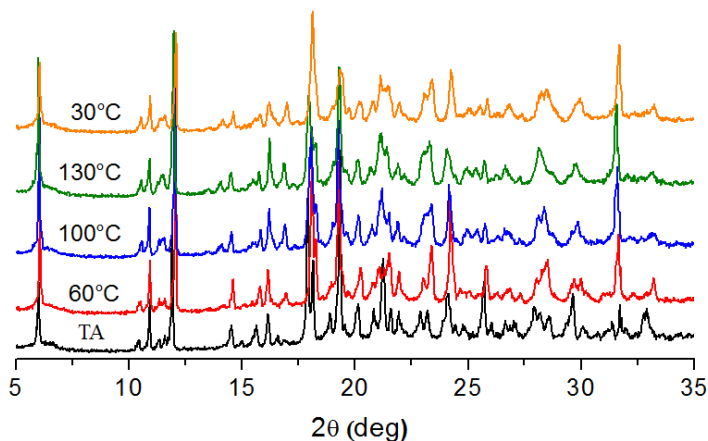
Figura 40. Microscopia Hot-Stage em cristais de SQVCl, SQVBr e SQVI.





As medidas de XRPD com temperatura variável (Figura 41) mostraram que não houve modificação significativa nas estruturas cristalinas durante os processos de aquecimento e resfriamento.

Figura 41. Difração de raios X utilizando o método de pó com temperatura variável para o SQVCl. Comportamento análogo foi observado para SQVBr e SQVI. Os processos de aquecimento e resfriamento foram conduzidos à razão de 5 °C/ min.



As três formas isomorfas apresentaram comportamento idêntico. As estruturas cristalinas permaneceram praticamente intactas

após a perda de água. Pequenos deslocamentos nas posições de algumas reflexões após o aquecimento são devidos às modificações dos parâmetros de cela e às mudanças de composição, referentes à remoção de água. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os padrões de raios X pelo método do pó voltaram a apresentar as suas formas iniciais, embora, com algum grau de amorfização agora evidente.

Para um estudo aprofundado das características do estado sólido comparando as três formas obtidas com o SQVM, utilizado atualmente para formular, estudos de solubilidade e perfil de dissolução em água foram realizados. As solubilidades do SQVM e suas formas obtidas foram medidas inicialmente nos tempos de 12 e 24 horas. Observou-se que, com exceção dos valores obtidos para o SQVBr, as concentrações medidas no tempo de 24 horas mostraram-se inferiores às de 12 horas (Tabela 15).

Tabela 15. Medidas da solubilidade em água para o SQVM e suas formas isomorfas após 12 e 24 horas.

	Solubilidade 12 horas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Solubilidade 24 horas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
SQVM	264 ± 10	151 ± 12
SQVCl	67 ± 3	32 ± 2
SQVBr	102 ± 12	103 ± 8
SQVI	$170 \pm 0,5$	$39 \pm 0,2$

Além da discrepância entre os valores de concentração em 12 e 24 horas para todas as amostras, com exceção daquela contendo bromo, o pó residual filtrado da solução de SQVI após 12 horas em solução, mostrou-se amarelado. A análise desta amostra por XRPD não mostrou qualquer alteração em relação ao difratograma inicialmente obtido na caracterização da mesma. No entanto, por DSC observou-se um decréscimo de $15\text{ }^\circ\text{C}$ na temperatura de fusão, sugestivo de redução da estabilidade térmica e/ou de um processo de degradação química. Uma solução foi preparada com a amostra de SQVI submetida ao teste de solubilidade por 12 horas e recuperada por filtração. Outra solução foi feita com o SQVI sem passar pelo teste. Por espectrofotometria as concentrações de ambas as amostras foram determinadas e a degradação química foi comprovada. Portanto, a avaliação da “solubilidade” foi investigada em um tempo inferior a 12 horas, e por isso, a denominação passou a ser, avaliação da concentração máxima no tempo de 3 horas, e

não mais solubilidade. As soluções saturadas foram mantidas sob agitação por 3 horas, filtradas e avaliadas por UV. As concentrações medidas após 3 horas em solução estão apresentadas na Tabela 16.

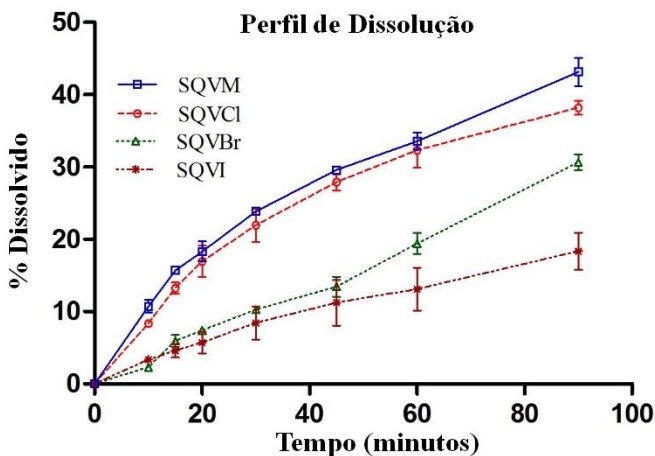
Tabela 16. Medidas da concentração máxima (3 horas) para o SQVM e suas formas.

	Concentração máxima 3 horas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
SQVM	174 ± 12
SQVCl	105 ± 2
SQVBr	107 ± 10
SQVI	$51 \pm 0,3$

A partir dos resultados de solubilidade apresentados nas Tabelas 15 e 16 e da comprovação de degradação do SQVI após 12 horas em solução, a avaliação do perfil de dissolução em água foi realizada em período inferior a 3 horas (tempo de determinação da concentração máxima). Esses resultados alertaram para a necessidade de estudos posteriores com relação à determinação da solubilidade do SQVM.

O perfil de dissolução em água, para o SQVM e seus sais halogenados é mostrado na Figura 42.

Figura 42. Perfil de dissolução em água para SQVM, SQVCl, SQVBr e SQVI.



A análise de regressão confirmou diferença estatística entre as quatro amostras (intervalo de confiança $\alpha = 0,05$; $p < 0,1$). SQVM e SQVCl apresentam perfis muito similares, com 43 e 38% de dissolução em 90 minutos, respectivamente, enquanto para o SQVBr e SQVI estes percentuais foram de 31 e 18%, respectivamente. O SQVI apresentou maior desvio padrão em comparação às demais formas, provavelmente devido à tendência de permanecer na superfície do meio.

O perfil de dissolução permitiu avaliar e comparar o comportamento das formas isomorfas de SQVM em solução e concluir que SQVCl pode ser utilizado como uma alternativa ao sal mesilato para formular. Além disso, a obtenção de cocristais a partir do SQVCl, poderá apresentar resultados ainda mais promissores com relação às propriedades de dissolução. A disponibilidade e comercialização de uma variedade de IFAs na forma de sais de cloreto é bem conhecida, e, recentemente, uma abordagem para a utilização destes IFAs (como sais de cloreto) visando à obtenção de cocristais tem sido relatada. Um exemplo é o observado para o cloridrato de fluoxetina. O cocrystal obtido a partir desta forma do fármaco e do ácido succínico mostrou uma solubilidade aquosa duas vezes superior àquela apresentada pela forma de cloridrato do fármaco (SHAN; ZAWOROTKO, 2008).

CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO GERAL

O controle de qualidade e a seleção dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) nas etapas de pré-formulação e desenvolvimento de novos produtos é primordial para a compreensão da influência causada pelas características do estado sólido em propriedades como solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade, entre inúmeras outras, (GRANT, 2004; TONG; HUANG, 2004; AALTONEN et al., 2009; CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009; DOMINGOS et al., 2015).

As propriedades do estado sólido possuem importante impacto na solubilidade e estabilidade química dos fármacos (HUANG; TONG, 2004), e há estimativas de que 80 a 90% dos compostos orgânicos possam existir como formas polimórficas, ou seja, apresentarem diferentes formas cristalinas (CHIENG et al., 2011). As diferentes formas sólidas de um IFA podem apresentar diferentes propriedades físico-químicas, afetando seu desempenho (AALTONEN et al., 2009).

A engenharia de cristais, através de processos de cristalização, oferece várias possibilidades para a melhoria das propriedades de solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis (DATA; GRANT, 2004; BLAGDEN et al., 2007). A obtenção de polimorfos estáveis, assim como a influência das condições de cristalização no hábito cristalino e morfologia dos cristais, são algumas destas possibilidades (BLAGDEN et al., 2007).

Para o EFV, a caracterização dos polimorfos, a avaliação de estabilidade e a relação termodinâmica entre ambos identificaram o polimorfo II como mais estável e mais solúvel em comparação ao polimorfo I. Além disso, pela primeira vez, classificou-se a relação entre ambos como enantiotrópica. O polimorfo II mostrou-se mais estável que o polimorfo I graças à interação conformacional promovida pelo *Synthon C* (MAHAPATRA et al., 2010), responsável por estabilizar a estrutura cristalina de maior densidade (polimorfo II). Sabe-se que a mais alta densidade corresponde à maior estabilidade termodinâmica (BERNSTEIN, 2002; BRITAIN, 2009). Além de mais estável, esse polimorfo apresentou-se mais solúvel. Para fármacos pertencentes à Classe II do BCS, como o EFV, há uma boa correlação entre os resultados *in vivo* e os testes de dissolução; nestes casos, a taxa de dissolução é o aspecto limitante para a absorção oral do medicamento (DRESSMAN, REPPAS, 2000; ROSSI et al., 2011). A taxa de dissolução intrínseca de um fármaco está correlacionada com a dinâmica de dissolução *in vivo*, pode afetar a eficácia do medicamento e por isso seu estudo é útil na avaliação e seleção da matéria-prima mais apropriada para formular (CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009). Na avaliação através do teste de dissolução intrínseca, o valor da taxa foi

dezesseis vezes maior para o polimorfo II em comparação ao polimorfo I. Diferentes planos cristalinos estão expostos para aquele polimorfo modificando a taxa de dissolução (DANESH et al., 2001; KUMINEK et al., 2013). Tal efeito pode impactar a biodisponibilidade do fármaco.

A forma sólida de um IFA é definida pela estrutura interna do cristal e pelo hábito cristalino, fatores que podem influenciar consideravelmente a biodisponibilidade, segurança e eficácia do medicamento (BLAGDEN et al., 2007; MODI et al., 2013). Especialmente para fármacos pouco solúveis, fatores como polimorfismo e distribuição de tamanho de partícula, entre outros, são cuidadosamente controlados na rotina de produção industrial. Entretanto, outras propriedades do estado sólido devem ser investigadas de modo a se compreender algumas falhas que ocorrem nos ensaios *in vitro* (testes de dissolução) e nos estudos *in vivo* (bioequivalência).

A produção de genéricos apresenta-se como estratégia das políticas de saúde no Brasil para assegurar medicamentos de qualidade para um número crescente de pacientes diagnosticados como portadores do HIV. O teste de bioequivalência é a ferramenta de controle de qualidade mais importante para o processo de desenvolvimento de um produto genérico de modo a assegurar sua eficácia terapêutica (BRASIL, 1999; EUROPEAN, 2010). Porém, mesmo quando fatores críticos (polimorfismo, distribuição de tamanho de partícula) são controlados, diferentes lotes podem apresentar diferenças significativas quando administrados a voluntários saudáveis nos testes de bioequivalência. Este foi o observado com duas matérias-primas de EFV. Seis matérias-primas micronizadas do fármaco foram caracterizadas e os lotes 1 e 5 foram utilizados no estudo de bioequivalência. O lote 1 foi aprovado e o lote 5 reprovado. O lote 1 apresentou 80% de fármaco dissolvido após 120 minutos enquanto para o lote 5, esse percentual foi inferior a 60%. Cálculos de eficiência de dissolução (DE) mostraram valores de 82% para o lote 1 e aproximadamente 66% para o lote 5. Fatores como distribuição de tamanho de partícula e morfologia comumente explicam os diferentes valores de DE (TINKE et al., 2005; BLAGDEN et al., 2007; WILLMANN et al., 2010). Porém, para as amostras estudadas, os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura mostraram morfologia muito semelhante; não foram observadas variações consideráveis entre os lotes. Com relação à distribuição de tamanho de partícula, o lote 1 apresentou o maior valor de DE e o menor valor de distribuição de tamanho de partícula. Espera-se que o menor valor de $d[4, 3]$ corresponda ao maior valor de DE (TINKE et al., 2005).

Entretanto, tal correlação não pôde ser mantida para os demais lotes. Mesmo para o lote 5, reprovado no teste de bioequivalência, o valor de $d[4, 3]$ apresentou-se na faixa aceitável para uma matéria-prima micronizada. Também os valores de $d(0,9)$, $d(0,5)$ e $d(0,1)$ não classificariam os lotes 1 e 5 em dois extremos. Alguns autores ainda consideram mais relevante o valor de $d[3, 2]$ para a correlação com a dissolução (TAKANO et al., 2009). Entretanto, os resultados obtidos neste estudo mostram que não há correlação matemática entre os valores anteriormente mencionados, portanto, a morfologia e as características de tamanho de partícula não explicaram as diferenças *in vitro* nem os resultados *in vivo*. Até o momento, a dissolução e a biodisponibilidade de fármacos e produtos farmacêuticos têm sido correlacionadas com características físico-químicas, como grau de cristalinidade ou amorfização, polimorfismo, tamanho de partícula e porosidade, entre outras (BRITTAIN, 2008). Tamanho de domínio cristalino ou tamanho de cristalita não são termos bem conhecidos na Ciência Farmacêutica. Alguns autores destacam a importância do tamanho de cristalita nos resultados de dissolução, mas não consideram tamanho de partícula (TORRADO et al., 1998). Outros correlacionam tamanhos de cristalita e propriedades mecânicas e físicas, mas sob o aspecto da compressão (FUKUOKA et al., 1993; RIPPI et al., 2000). Assim, este trabalho abre uma importante área de investigação porque mostra a biorrelevância da microestrutura do EFV. A biorrelevância consiste na correlação entre a porcentagem dissolvida do fármaco no estudo *in vitro* (testes de dissolução) e a porcentagem absorvida do fármaco *in vivo* (bioequivalência). Na avaliação realizada para o EFV há a correlação entre tamanho de domínio cristalino e os resultados *in vitro* e *in vivo*. As informações dos padrões de difração de raios X pelo método do pó foram analisadas por *Whole Powder Pattern Modelling* (WPPM). O WPPM fornece parâmetros microestruturais do melhor ajuste para o padrão de difração de raios X experimental, pelo método do pó (SCARDI, LEONI, 2001; SCARDI, LEONI, 2002). Os resultados obtidos evidenciaram a correlação entre tamanho de domínio cristalino e eficiência de dissolução. Os melhores valores de DE foram obtidos para IFAs com tamanhos de domínio cristalino inferiores a 100 nm aproximadamente. É provável que exista um tamanho de domínio cristalino “crítico”, associado a determinado tamanho de partícula, que assegure a bioequivalência. Estudos adicionais são necessários para a profunda compreensão da biorrelevância da microestrutura de compostos farmacêuticos.

O ensaio de velocidade de dissolução intrínseca foi idealizado de forma a evitar o efeito do hábito cristalino e do tamanho de partícula a fim de avaliar as propriedades físicas, como o polimorfismo e o seu efeito na velocidade de dissolução (BRITAIN, 2009). Para a análise das matérias-primas pela técnica de dissolução intrínseca, um método capaz de quantificar o fármaco foi previamente otimizado e validado, seguindo-se o preconizado pela USP 2007, ICH Q2 (R1) (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003). O método farmacopeico disponibilizado para consulta pública pela Farmacopeia Americana (USP) foi o utilizado para as análises por HPLC. A Farmacopeia Brasileira em sua 4ª edição não apresentava o EFV em suas monografias e somente em 2010 a 5ª edição contendo a monografia do EFV foi publicada. É consenso que a técnica de dissolução intrínseca correlaciona as propriedades do estado sólido como polimorfismo, com o impacto em nível biofarmacêutico, e permite avaliar se alguns parâmetros do estado sólido afetam o comportamento dos fármacos (YU et al., 2004; CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009). Entretanto, a correlação entre a microestrutura (tamanho de domínio cristalino) e o desempenho do IFA (com resultados obtidos no teste de bioequivalência) pôde ser realizada através da técnica de dissolução intrínseca, sendo pela primeira vez apresentada. Além da capacidade de diferenciar polimorfos (já mencionado inicialmente), a técnica de dissolução intrínseca mostrou-se capaz de discriminar IFAs de mesma forma polimórfica, porém, de diferentes tamanhos de domínio cristalino. A análise de seis lotes de EFV permitiu concluir que quanto menor o tamanho de domínio cristalino ($\langle D \rangle_s$), menor o valor de taxa de dissolução intrínseca. Além disso, ficou evidente que este resultado é independente do tamanho de partícula, uma vez que três lotes (denominados 3, 4 e 5) possuem valores de tamanho de partícula praticamente idênticos e para outro (lote 6) esse valor é duas vezes maior. Entretanto, os lotes 5 e 6 apresentaram valores de taxa de dissolução muito próximos, corroborando a teoria de que o efeito de tamanho de partícula é “apagado” na avaliação de IFAs através da técnica de dissolução intrínseca (SATHIGARI et al., 2009; CHIAPPETTA et al., 2010). Portanto, o método de dissolução intrínseca, aqui desenvolvido e validado, é uma excelente ferramenta no controle de qualidade para a seleção da mais apropriada matéria-prima de EFV para formular porque permite diferenciar a microestrutura e selecionar o IFA de melhor desempenho.

A investigação de diferentes formas cristalinas é um procedimento padrão essencial no estudo e desenvolvimento de novos medicamentos (AALTONEN et al., 2009) e, uma vez que o processo de

cristalização é empregado na produção de aproximadamente 70% de todas as formas sólidas obtidas, torna-se essencial conhecer os efeitos do processo de cristalização em IFAs (WOUTERS; QUÉRÉ, 2012). Para o mesilato de saquinavir (SQVM), poucos são os estudos publicados e, embora algumas informações a respeito do estado sólido estejam disponíveis, a estrutura cristalina foi primeiramente reportada através deste trabalho. O monocrystal de SQVM foi obtido em metanol através do método de evaporação lenta e sua estrutura foi resolvida. O fármaco cristaliza no sistema monoclinico e grupo espacial $P2_1$ com uma molécula de saquinavir e uma molécula de mesilato na unidade assimétrica. Moléculas de saquinavir são mantidas juntas na estrutura cristalina através de ligações de hidrogênio diretas saquinavir-saquinavir e através de ligações de hidrogênio indiretas saquinavir-mesilato. A sobreposição dos difratogramas obtidos para o monocrystal e para o IFA avaliado comprovou a identidade cristalográfica do SQVM.

A caracterização do IFA e a avaliação das propriedades de dissolução foram investigadas. O fármaco apresentou ponto de fusão em 247,50 °C com decomposição em um processo único logo após o evento de fusão. As análises por SEM mostraram partículas aglomeradas em formato de placas. A matéria-prima de SQVM é micronizada na tentativa de se melhorar a biodisponibilidade deste fármaco, entretanto, a alta lipofilicidade pode ser responsável pela aglomeração das partículas e conseqüente redução da área de superfície de contato, motivo do alto desvio padrão observado na avaliação do perfil de dissolução. Um modo efetivo de se melhorar a molhabilidade dos fármacos é o uso de surfactante no meio de dissolução e por isso, o surfactante aniônico LSS foi utilizado. Além de ser indicado pela USP para fármacos de baixa solubilidade aquosa (USP, 2007), vários são os relatos de que meios contendo LSS asseguram de maneira mais efetiva as condições *sink* (PINTO, CABRAL, SOUSA, 2014; PANIKUMAR et al., 2012; HONÓRIO et al., 2013). Em meios contendo surfactante aniônico as interações eletrostáticas entre os ânions do LSS e os grupamentos catiônicos do fármaco levam a um decréscimo nas forças de repulsão dos grupos da porção “cabeça” do surfactante com conseqüente aumento da solubilização (CHAKRABORTY et al., 2009). Entretanto, o resultado obtido na avaliação do perfil de dissolução do SQVM em LSS 0,25% mostrou-se contrário ao esperado, mesmo no intervalo de CMC (entre 0,025 e 0,25% (m/v) ou 1 e 10 mM) (FOTAKI et al., 2013). A análise revelou em 20 minutos, um percentual de fármaco dissolvido inferior àquele em 15 minutos e este comportamento foi observado em alguns outros intervalos de tempo durante toda a

avaliação. Sabe-se que a capacidade dos surfactantes em solubilizar fármacos envolve fatores como temperatura, força iônica e estrutura química do fármaco e do surfactante (TORCHILIN, 2001; JAIN; RAN; YALKOWSKY, 2004; RANGEL-YAGUI; PESSOA-JR; TAVARES, 2005). Deste modo o mecanismo de interação entre LSS e a molécula de SQVM foi melhor investigado através da avaliação estrutural do cocristal de SQVM e LSS, denominado neste trabalho cocristal SQVMSLS. O cocristal SQVMSLS foi obtido a partir de uma solução saturada do fármaco em LSS 0,25% através da técnica de evaporação lenta à temperatura ambiente. Após algum tempo em solução, a porção aniônica das moléculas remanescentes de LSS interagem com as espécies catiônicas da molécula de SQV para formar um sal insolúvel ou menos solúvel, o qual precipita, resultando no fenômeno de dessolubilização (JAIN; RAN; YALKOWSKY, 2004; CHAKRABORTY et al., 2009; FOTAKI et al., 2013). Foi esta a explicação para o fenômeno observado no perfil de dissolução do SQVM em LSS 0,25%. A avaliação da turbidez, representativa do comportamento de precipitação do SQVM neste meio, corroborou os dados obtidos através do perfil de dissolução. A precipitação avaliada por esta técnica teve início exatamente em 20 minutos. Além disso, através da obtenção do cocristal e da resolução da sua estrutura, foi possível comprovar a recristalização do fármaco neste meio de dissolução. A resolução da estrutura cristalográfica permitiu constatar que o LSS cristaliza entre as moléculas de mesilato, adaptando-se em uma cavidade formada ao longo do eixo **c**. Os eixos cristalográficos **a** e **b** são mantidos, a principal diferença ocorre no eixo **c**, que aumenta de 15.966(5) Å na estrutura do SQVM, para 21.1924(14) Å na estrutura do cocristal. Portanto, além da importância relacionada à avaliação estrutural do fármaco, com perspectivas para a obtenção de novas formas de SQV, este estudo, e em particular, a obtenção do cocristal em LSS, alertou para a utilização dos surfactantes nos meios de dissolução. O LSS não é um surfactante apropriado para meios de dissolução na avaliação do SQVM.

A compreensão das características estruturais, obtida com a resolução da estrutura do cocristal (SQVMSLS) possibilitou a busca por novas formas de SQV. A ligação da molécula de LSS ao grupo mesilato e preenchimento da cela unitária com a molécula de SQV indicou a possibilidade de que outros ânions poderiam deslocar o grupamento mesilato ou ligar-se a ele. Portanto, a partir daí, o objetivo foi explorar as possibilidades de troca de ânion para o SQVM e investigar as

propriedades de dissolução e do estado sólido para as possíveis formas obtidas.

Quantidades estequiométricas de cloreto de sódio (NaCl), brometo de sódio (NaBr) e iodeto de potássio (KI), foram adicionadas às soluções de SQVM em 4 mL de propilenoglicol ou metanol e em seguida 4 mL de água. Cloreto de saquinavir (SQVCl), brometo de saquinavir (SQVBr) e iodeto de saquinavir (SQVI) foram os monocristais obtidos. Todos são formas isomórficas do SQVM e, portanto, com características de empacotamento muito semelhantes a ele, porém, a função de ligação do ânion mesilato foi substituída por uma ou mais moléculas de água e um ânion halogênio nas estruturas do SQVCl, SQVBr e SQVI. Os sais obtidos apresentaram três, duas e uma molécula de água respectivamente e através da análise estrutural ficou evidente que o grau de hidratação é dependente do tamanho do ânion inserido na estrutura cristalina. Os resultados obtidos por análise termogravimétrica corroboraram aqueles por análise estrutural com relação ao número de moléculas de água em cada estrutura. A diferença no grau de hidratação, assim como no tamanho e tipo de ânion, foram responsáveis pelos efeitos observados nas dimensões dos eixos das celas e nas posições das reflexões observadas por XRPD. Por Hot-Stage, foi possível comprovar que, embora submetidas a estresse térmico, com consequente liberação das moléculas de água, as formas dos cristais foram mantidas para todas as amostras após a desidratação. O SQVBr foi a forma que apresentou a mais alta temperatura na liberação da água da estrutura cristalina, devido à mais forte interação entre as moléculas de água e entre a água e as porções iônicas no SQVBr, em comparação ao SQVCl e ao SQVI. Na comparação entre as três formas, pode-se comprovar ainda que o SQVCl (64,9%) apresentou o mais eficiente coeficiente de empacotamento seguido pelo SQVBr (63,7%) e SQVI (63,2%). É o menor valor de coeficiente de empacotamento do SQVI (em comparação às outras duas estruturas) o responsável pela desordem posicional do átomo de iodo na estrutura cristalina. O impacto das características estruturais e do estado sólido de cada forma em comparação ao SQVM foi avaliado no perfil de dissolução. O SQVCl apresenta um perfil de dissolução muito similar ao SQVM, com 38 e 43% de dissolução em 90 minutos, respectivamente, portanto o SQVCl poderia ser utilizado como alternativa ao sal mesilato para formular.

CONCLUSÕES

- Um polimorfo de EFV foi obtido, denominado polimorfo II e caracterizado através de técnicas termoanalíticas (DSC/ TG), espectroscópicas (Raman – RS e Infravermelho – FT-IR), de microscopia (SEM), de difração de raios X pelo método do pó (XRPD), ressonância magnética nuclear em sólidos (ss-NMR) e velocidade de dissolução intrínseca (VDI). O polimorfo II, apresentou-se mais estável e com taxa de dissolução intrínseca aproximadamente dezesseis vezes superior ao polimorfo I. A relação entre ambos os polimorfos foi classificada como enantiotrópica.
- O método para quantificação de EFV no teste de dissolução intrínseca com emprego da cromatografia líquida de alta eficiência, foi otimizado e validado, e o meio selecionado foi LSS 0,25%. O método mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato, robusto e estável. Além de diferenciar polimorfos, o método de dissolução intrínseca validado foi capaz de diferenciar IFAs de EFV com diferentes tamanhos de domínio cristalino. O método diferenciou um lote de EFV aprovado no teste de bioequivalência e outro reprovado no teste e confirmou a importância da técnica no controle de qualidade de IFAs.
- Seis IFAs de EFV foram caracterizados através de SEM, XRPD, Radiação Síncrotron, Software PM2K, Distribuição de Tamanho de Partícula, Perfil de Dissolução e Eficiência de Dissolução (DE). A relação entre Tamanho de Domínio Cristalino, Distribuição de Tamanho de Partícula e DE foi investigada e compreendida. Com relação à VDI, os IFAs com melhores valores de taxa de dissolução intrínseca são os que possuem os menores valores de tamanho de cristalita (ou de domínio cristalino). Sabe-se que mudanças de cristalinidade influenciam o comportamento das cargas nos IFAs. Portanto, a relação entre IDR e tamanho de domínio cristalino pode ser justificada por fatores eletrostáticos e/ ou efeitos superficiais. Deste modo, uma investigação com relação ao impacto destas propriedades deve ser realizada. Provou-se a biorrelevância da microestrutura de IFAs de EFV através da correlação entre tamanho de domínio cristalino, testes de dissolução (ensaios *in vitro*) e ensaios *in vivo* (bioequivalência).
- O monocrystal de SQVM foi obtido e sua estrutura refinada. O SQVM cristaliza no sistema monoclínico, grupo espacial $P2_1$ com uma molécula de saquinavir e uma de mesilato na unidade assimétrica.

- O IFA SQVM foi caracterizado por meio das técnicas de caracterização do estado sólido e apresentou ponto de fusão em 247,5 °C. As análises por SEM mostraram partículas aglomeradas, planas e de comprimento e largura semelhantes. A comparação entre o difratograma calculado, obtido a partir da resolução da estrutura do monocristal, e o difratograma experimental, comprovou a identidade cristalográfica da amostra em estudo. As bandas de FT-IR estão de acordo com as informações previamente publicadas para o fármaco.
- O comportamento anômalo observado no perfil de dissolução do SQVM foi compreendido e explicado por meio da obtenção de um cocristal de SQVM mais LSS (SQVMSLS). A obtenção do cocristal e a resolução da sua estrutura comprovou ser o LSS um meio de dissolução não apropriado para a avaliação do perfil de dissolução do SQVM.
- Através da Engenharia de Cristais três novas formas de SQV foram obtidas. SQVCl, SQVBr e SQVI foram classificados como isomorfos do SQVM e foram obtidos pela técnica de evaporação lenta do solvente.
- Através da obtenção de monocristais, as três novas formas foram avaliadas estruturalmente, suas estruturas foram refinadas, comparadas à estrutura cristalográfica do SQVM e depositadas no Cambridge Structural Database (CSD). Além disso, foram caracterizadas por meio de (DSC/ TG), difração de raios X pelo método do pó (XRPD), difração de raios X pelo método do pó com temperatura variável, microscopia de hot-stage (HSM) e perfil de dissolução.

PERSPECTIVAS

Nas áreas de pesquisa e industrial, há interessantes perspectivas com relação à obtenção de sistemas com melhores propriedades de dissolução para os antirretrovirais EFV e SQVM. Novas formas sólidas (sais, hidratos, cocristais, novas morfologias, polimorfos) mais estáveis e solúveis poderão ser obtidas, em especial para o SQVM, ainda pouco explorado. A triagem de polimorfos e cocristais e a avaliação da influência das condições de cristalização no hábito cristalino e morfologia dos cristais, são possibilidades promissoras. A avaliação e a compreensão das conexões entre as interações intermoleculares, as estruturas cristalinas e as propriedades do estado sólido, através da engenharia de cristais, permitirá o desenho racional e a síntese de sólidos cristalinos com as propriedades desejadas. A obtenção, no futuro próximo, de formulações a partir de sólidos “planejados”, poderá possibilitar um aumento na biodisponibilidade e permitirá uma avaliação com relação à diminuição da dosagem.

Com relação à avaliação microestrutural, comprovou-se que informações relevantes podem ser obtidas por meio do estudo detalhado dos processos de micronização, em particular, dos efeitos mecânicos na microestrutura dos IFAs. A introdução, nas Ciências Farmacêuticas, deste importante conceito, já tão conhecido nas Ciências dos Materiais, abre inúmeras possibilidades de pesquisa para a compreensão do processo de micronização tão comumente aplicado na indústria farmacêutica. Outros estudos estão sendo realizados e os resultados iniciais são promissores. Busca-se reproduzir os resultados anteriormente obtidos e publicados, e validar um software para a avaliação microestrutural do EFV. O objetivo é desenvolver uma metodologia que permita prever, com base nas medidas de tamanho médio de partícula, tamanho de domínio cristalino médio e eficiência ou perfil de dissolução, fármacos que seriam aprovados ou não nos testes de bioequivalência. A compreensão desta relação e o conhecimento e a aplicação de métodos que controlem e identifiquem IFAs que não cumprem com os parâmetros para a aprovação nos testes de bioequivalência implicará em significativa redução de gastos no processo de produção da indústria farmacêutica. O modelo desenvolvido e aperfeiçoado para o EFV poderá ser aplicado a inúmeros outros fármacos pertencentes às Classes II e IV do SCB.

REFERÊNCIAS

AAKERÖY, C.B.; FASULO, M.E.; DESPER, J. Cocrystal or Salt: Does It Really Matter? **Molecular Pharmaceutics**, v. 4(3), p. 317-22, 2007.

AALTONEN, J.; ALLESØ, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V.; GORDON, K.C.; RANTANEN, J. Solid form screening – A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 23-37, 2009.

ABIA, 2015. Associação Brasileira Interdisciplinar de AIDS. Organizações da sociedade civil pressionam por novo medicamento no tratamento da Aids. Disponível em: <<http://abi aids.org.br/organizacaoes-da-sociedade-civil-pressionam-por-novo-medicamento-no-tratamento-da-aids/27307>>. Acesso em: 29/03/2016.

AIDSinfo, 1997. **FDA Approves New Formulation of First Protease Inhibitor Saquinavir**. Disponível em: <<http://aidsinfo.nih.gov/news/393/fda-approves-new-formulation-of-first-protease-inhibitor-saquinavir>>. Acesso em: 30/07/2014.

AIDSinfo, 2005. **Dear Health Care Provider Letter Regarding the Discontinuation of Fortovase**. Disponível em: <http://aidsinfo.nih.gov/news/729/dear-health-care-provider-letter-regarding-the-discontinuation-of-fortovase>. Acesso em: 30/07/2014.

AITIPAMULA S.;; ZAWOROTKO, M.J. Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? **Crystal Growth & Design**, v. 12, p. 2147-2152, 2012.

ALSENZ, J.; STEFFEN, H.; ALEX, R. Active Apical Secretory Efflux of the HIV Protease Inhibitor Saquinavir and Ritonavir in Caco-2 Cell Monolayers. **Pharmaceutical Research**, v. 15(3), p. 423-428, 1998.

ALTOMARE, A.; BURLA, M.C.; CAMALLI, M.; CASCARANO, G. L.; GIACOVAZZO, C.; GUAGLIARDI A.; MOLITERNI, A.G.G.; POLIDORI, G.; SPAGNA, R. SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, p. 115-119, 1999.

AMIDON, G.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the

correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12 (3), p. 413-420, 1995.

AMIJI, M.M.; VYAS, T.K.; SHAH, L.K. Role of nanotechnology in HIV/AIDS treatment: potential to overcome the viral reservoir challenge. **Discovery Medicine**, v. 6 (34), p. 157-162, 2006.

ANDERSON, P.L.; KAKUDA, T.N.; FLETCHER, C.V. Human Immunodeficiency Virus Infection, in: **Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach**. 7 ed., McGraw-Hill: China, 2008, 2065-2084 p.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.J.R. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 8 ed., Artmed: São Paulo, 2007, 775 p.

AOKI, M.; NISHIMURA, H.; MIMURA, A.; KITA, S.; YASUZAWA, T.; TERADA, K. Identification of the degradation products of the steroid sulfatase inhibitor KW-2581 in jet mill-micronized powder. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 102(6), p. 1760-1772, 2013.

BEDOR, D.C.G. Avaliação biofarmacotécnica do Efavirenz um fármaco classe II (SCB). Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Recife, Pernambuco, Brasil, 2011.

BELOQUI, A.; SOLINÍS, M.A.; GASCÓN, A.R.; POZO-RODRÍGUEZ, A. Mechanism of transport of saquinavir-loaded nanostructured lipid carriers across the intestinal barrier. **Journal of Controlled Release**, v. 166, p. 115-123, 2013.

BERNSTEIN, J. Fundamentals. Polymorphism in Molecular Crystals; Oxford University Press: United Kingdom, 2002; pp 29–65.

BERNSTEIN, J. ... And Another Comment on Pseudopolymorphism. **Crystal Growth & Design**, v. 5(5), p. 1661-1662, 2005.

BERNSTEIN, J. Polymorphism – A Perspective. **Crystal Growth & Design**, v. 11(3), p. 632-650, 2011.

BÉTHUNE, MARIE-PIERRE. 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.

BLAGDEN, N.; MATAS, M.; GAVAN, P.T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 59, p. 617-630, 2007.

BORDAWEKAR, S.; KUVADIA, Z.; DANDEKAR, P.; MUKHERJEE, S.; DOHERTY, M. Interesting morphological behavior of organic salt choline fenofibrate: effect of supersaturation and polymeric impurity. **Crystal Growth & Desing**, v. 14(8), p. 3800-3812, 2014.

BRAGA, D.; GREPIONI, F. Reactions Between or Within Molecular Crystals. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 4002-4011, 2004.

BRAGA, D.; GIAFFREDA, S.L.; GREPIONI, F.; PETTERSEN, A.; MAINI, L.; CURZI, M.; POLITO, M. Mechanochemical preparation of molecular and supramolecular organometallic materials and coordination networks. **Dalton Transactions**, v. 10, p. 1249-1263, 2006.

BRAGA, D.; GREPIONI, F.; MAINI, L.; MAZZEO, P.P.; RUBINI, K. Solvent-free preparation of co-crystals of phenazine and acridine with vanillin. **Termochimica Acta**, v. 507-508, p. 1-8, 2010.

BRAGA, D.; GREPIONI, F.; MAINI, L.; CAPUCCI, D.; NANNA, S.; WOUTERS, J.; AERTSC, L.; QEÉRE, L. Combining piracetam and lithium salts: ionic co-crystals and co-drugs? **ChemComm**, v. 48, p. 8219-8221, 2012.

BRASIL. **Resolução n° 391, de 9 de agosto de 1999**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/391_99.htm>. Acesso em: 09/03/2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução – RE 1229 de 14 de agosto de 2001**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15/12/2010.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 18/08/2011.

BRASIL, 2005. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e AIDS. Plano Estratégico do Programa Nacional de DST/ AIDS**. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_estrategico.pdf>. Acesso em: 31/07/2014.

BRANHAM, M.L.; MOYO, T.; GOVENDER, T. Preparation and solid-state characterization of ball milled saquinavir mesylate for solubility enhancement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80(1), p. 194-202, 2012.

BRITTAİN, H.G. Theory and Principles of Polymorphic Systems, in: Polymorphism in Pharmaceutical Solids; Brittain, H. G., Ed.; Informa Healthcare USA: New York, 2009, 1-23 p.

BRITTAİN, H.G.; BYRN, S.R.; LEE, E. Structural Aspects of Polymorphism, in: Polymorphism in Pharmaceutical Solids; Brittain, H. G., Ed.; Informa Healthcare USA: New York, 2009, 185-232 p.

BRITTAİN, H.G. Cocrystal Systems of Pharmaceutical Interest: 2010. **Crystal Growth & Design**, v. 12, p. 1046-1054, 2012.

BROUGH, C.; WILLIAMS, R.O. Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. **International Journal Pharmaceutics**, v. 453, p. 157-166, 2013.

BROUWERS, J.; VERMEIRE, K.; GRAMMEN, C.; SCHOLS, D.; AUGUSTIJNS, P. Early identification of availability issues for poorly water-soluble microbicide candidates in biorelevant media: A case study with saquinavir. **Antiviral Research**, v. 91, p. 217-223, 2011.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R.; SHAHM, P.A. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, december, 2004, p. 56-65, 2004.

BRUKER-AXS, “TOPAS Version 3, Academic”.
<<http://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/x-ray-diffraction/xrd-software/overview/topas.html>> and
<<http://www.topas-academic.net>>.

BRUKER, (2015) APEX-2. BRUKER AXS INC., MADISON, WISCONSIN, USA.

BRUNI, G.; GOZZO, F.; CAPSONI, D.; BINI, M.; MACCHI, P.; SIMONCIC, P.; BERBENNI, V.; MILANESE, C.; GIRELLA, A.; FERRARI, S.; MARINI, A. Thermal, spectroscopic, and *Ab Initio* structural characterization of carprofen polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100 (6), p. 2321-2332, 2011.

BURCHAM, C.L.; JARMER, D.J. Industrial Crystallization of Pharmaceuticals: Capability Requirements to Support an Outsourcing Paradigm. **Pharmaceutical Outsourcing**, v.14(5), p. 1-7, 2012.

BYRN, S.R.; PFEIFFER, R.R.; STOWELL, J.G. Solid-State Chemistry of Drugs. 2 ed. 1999. USA. 574 p.

CAIRA, M.R.; BOURNE, S.A.; SAMSODIEN, H.; ENGEL, E.; LIEBENBERG, W.; STIEGER, N.; AUCAMP, M. Co-crystals of the antiretroviral nevirapine: crystal structures, thermal analysis and dissolution behaviour. **CrystEngComm**, v. 14, p. 2541, 2012.

CALLISTER, W.D.Jr.; RETHWISCH, D.G. Materials Science and Engineering: An Introduction. New York: John Wiley & Sons, 2007. 975 p.

CAMERON, D.W.; JAPOUR, A.J.; XU, Y.; HSU, A.; MELLORS, J.; FARTHING, C.; COHEN, C.; PORETZ, D.; MARKOWITZ, M.; FOLLANSBEE, S.; ANGEL, J.B.; MCMAHON, D.; HO, D.; DEVANARAYAN, V.; RODE, R.; SALGO, M.P.; KEMPF, D.J.; GRANNEMAN, R.; LEONARD, J.M.; SUN, E. Ritonavir and

Saquinavir combination therapy for the treatment of HIV infection. **AIDS**, v. 13(2), p. 213-224, 1999.

CAON, T.; KONIG, R.A.; CRUZ, A.C.C.; CARDOSO, S.G.; CAMPOS, C.E.M.; CUFFINI, S.L.; KOESTER, L.S.; SIMÕES, C.M.O. Development and physicochemical characterization of saquinavir mesylate solid dispersions using Gelucire 44/14 or PEG 4000 as carrier. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p. 1113-1125, 2013.

CHAKRABORTY, S.; SHUKLA, D.; JAIN, A.; BRAHMESHWAR, M.; SINGH, S. Assessment of solubilization characteristics of different surfactants for carvedilol phosphate as a function of pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 335, p. 242-249, 2009.

CHEARY, R.W.; COELHO, A. A fundamental parameters approach to X-ray line-profile fitting. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, p. 109-121, 1992.

CHEN, L.F.; HOY, J.; LEWIN, S.R. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. **New Drugs, Old Drugs**, v. 186(3), p. 146-151, 2007.

CHIAPPETTA, D.A.; HOCHT, C.; TAIRA, C.; SOSNIK, A. Oral pharmacokinetics of the anti-HIV efavirenz encapsulated within polymeric micelles. **Biomaterials**, v. 32, p. 2379-2387, 2011.

CHIAPPETTA, D.A.; LORENZO, C.A.; RICO, A.R.; TABOADA, P.; CONCHEIRO, A.; SOSNIK, A. N-alkylation of poloxamines modulates micellar assembly and encapsulation and release of the antirretroviral efavirenz. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 24-37, 2010.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 618-644, 2011.

CHILDS, S.L.; STAHLY, G.P.; PARK, E. The Salt-Cocrystal Continuum: The Influence of Crystal Structure on Ionization State. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4(3), p. 323-338, 2007.

CHO, Y.W.; LEE, J.; LEE, S.C.; HUH, K.M.; PARK, K. Hydrotropic agents for study of in vitro paclitaxel release from polymeric micelles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 249-257, 2004.

CIHLAR, T.; RAY, A.S. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. **Antiviral Research**, v. 85, p. 39-58, 2010.

CUFFINI, S.L.; HOWIE, R.A.; TIEKINK, E.R.T.; WARDELL, J.L.; WARDELL, S.M.S.V. (S) – 6 – Chloro – 4 – cyclopropylethynyl – 4 – trifluoromethyl – 1 – 1 H - 3,1 – benzoxazin – 2 (4H) – one. **Acta Crystallographica Section E**, v. E65, p. 3170-3171, 2009.

CUFFINI, S.L.; PITALUGA, A.; TOMBARI, D. Polimorfismo em Fármacos, in: **Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica**. 1 ed., Storpirtis, S.; Gonçalves, J. E.; Chiann, C.; Gai, M. N., Eds.; Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro, 2009, 21-31 p.

CULLITY, B.D. Elements of X-Ray Diffraction. 2. ed. Massachusetts: Addison-Wesley, 1978. 555 p.

dA COSTA, M.A. Desenvolvimento e avaliação de sistemas incrementadores de dissolução de efavirenz, 2011. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

DANESH, A.; CONNELL, S.D.; DAVIES, M.C.; ROBERTS, C.J.; TENDLER, S.J.B.; WILLIAMS, P.M.; WILKINS, M.J. An *In Situ* Dissolution Study of Aspirin Crystal Planes (100) and (001) by Atomic Force Microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 18(3), p. 299-303, 2001.

DATTA, S.; GRANT, D.J.W. Crystal Structures of Drugs: Advances in Determination, Prediction and Engineering. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3 (9), p. 42-57, 2004.

DESHMUKH, V.; MULIK, S.; DESHMUKH, T.; KASAT, K. Solubility enhancement of efavirenz hydrochloride by hot melt technique. **Current Pharmaceutical Research**, v. 1(4), p. 320-336, 2011.

DESIRAJU, G.R. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering – A new Organic Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 34, p. 2311-2327, 1995.

DESIRAJU, G.R. Crystal Engineering: A Holistic View. **Angewandte Chemie**, v. 46, p. 8342-8356, 2007.

DINNEBIER, R.E.; BILLINGE, S.J.L. (EDS.). **Powder Diffraction: Theory and Practice**. 1 ed., v. 24, 582 p. RCS Publishing, 2008.

DIVE. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **AIDS: 27 anos de epidemia – Uma história de lutas, avanços, desafios e conquistas. 2011**. Disponível em:

<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/gerencia_dst_aids/noticias/2011/Perfil_Aids_27_anos_Epidemia.pdf>. Acesso em: 10/01/2012.

DIVE, 2013. Gerência de Vigilância das DST/ HIV/ AIDS/ HV.

Informativo Epidemiológico. Ano XI - n° 02/2013. Disponível em: http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/informativo_epidemiologico/Informativo_Epidemiologico_2013_2.pdf. Acesso em: 02/07/2014.

DIVE, 2014 (a). **Divisão de Epidemiologia**. Gerência Estadual de DST/AIDS/Hepatites Virais de Santa Catarina – DIVE/SES/SC HIV/AIDS. Disponível em:

<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/dst_aids/apresentacoes/Apresentacao_C3%A7C3%A3o%20Marcia.pdf>. Acesso em: 30/03/2016.

DIVE, 2014 (b). **HIV/ AIDS – Dados**. Disponível em

<<http://aids.sc.gov.br/dados.html>>. Acesso em: 30/03/2016.

DRESSMAN, J.B.; REPPAS, C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 11(2), p. S73-S80, 2000.

ELIAS, F.L.F. PATENTE DE MEDICAMENTO: **A questão do licenciamento compulsório do Efavirenz**. Revista Eletrônica do Centro de Direito Internacional, v. 4, p. 336-361, **2009**. Disponível em: <http://www.cedin.com.br/revistaeletronica/volume4/arquivos_pdf/sumario/art_v4_XII.pdf>; ISSN/ISBN: 19819439. Acesso em: 16/12/2011.

ESTÉ, J.A.; CIHLAR, T. Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. **Antiviral Research**, v. 85, p. 25-33, 2010.

ETTER, M.C. Hydrogen Bonds as Design Elements in Organic Chemistry. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, p. 4601-4610, 1991.

ETTER, M.C.; REUTZEL, S.M. Hydrogen Bond Directed Cocrystallization and Molecular Recognition Properties of Acyclic Imides. **Journal of American Chemical Society**, v. 113, p. 2586-2598, 1991.

EUROPEAN Medicine Agency, 2010. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf>. Acesso em: 09 march 2014.

FANDARUFF, C.; RAUBER, G.S.; ARAYA-SIBAJA, A.M.; PEREIRA, R.N.; CAMPOS, C.E.M.; ROCHA, H.V.A.; MONTI, G.A.; MALASPINA, T.; SILVA, M.A.S.; CUFFINI, S.L. Polymorphism of Anti-HIV Drug Efavirenz: Investigations on Thermodynamic and Dissolution Properties. **Crystal Growth & Design**, v. 14, p. 4968-4975, 2014.

FANDARUFF, C.; SILVA, M.A.S.; BEDOR, D.C.G.; SANTANA, D.P.; ROCHA, H.V.A.; REBUFFI, L.; RICARDO, C.L.A.; SCARDI, P.; CUFFINI, S.L. Correlation between microstructure and bioequivalence in Anti-HIV drug Efavirenz. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 91, p. 52-58, 2015.

FDA – Food and Drug Administration. **CDER Fast Track Products Approved Since 1998 through June 1, 2010**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/DrugandBiologicApprovalReports/UCM216527.pdf>>. Acesso em: 15 dez 2010.

FENG, T.; PINAL, R.; CARVAJAL, M.T. Process induced disorder in crystalline materials: differentiating defective crystals from the amorphous form of griseofulvin, **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 97(8), p. 3207-3221, 2008.

FERRAZ, H.G. Novas Ferramentas Farmacotécnicas para Modular a Biodisponibilidade de Medicamentos, in: **Ciências Farmacêuticas**

Biofarmacotécnica. 1 ed., Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro, 2009, 66 p.

FORNICO, R.G.; WILLIAMS, G.R.; BRUM, J.VOGT, F.G. The study of micronization induced disorder in active pharmaceutical ingredients, **American Pharmaceutical Review**, October 2013.
<<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/148746-The-Study-of-Micronization-Induced-Disorder-in-Active-Pharmaceutical-Ingredie%E2%80%A6>>. Acesso em: 27 jun 2014.

FOTAKI, N.; BROWN, W.; KOCHLING, J.; CHOKSHI, H.; MIAO, H.; TANG, K.; GRAY, V. Rationale for Selection of Dissolution Media: Three Case Studies. **Dissolution Technologies**, v. August, p. 6-13, 2013.

FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Griding. **Crystal Growth & Design**, v. 9(3), p. 1621-1637, 2009.

FUKUOKA, E.; MAKITA, M.; YAMAMURA, S. Preferred orientation of crystallites in tablets. III. Variations of crystallinity and crystallite size of pharmaceuticals with compression. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 4(3), p. 595-598, 1993.

GIRON D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 335-357, 2002.

GIUDICI, G.; BIDDAU, R.; D'INCAU, M.; LEONI, M.; SCARDI, P. Dissolution of nanocrystalline fluorite powders: An investigation by XRD and solution chemistry. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 69, p. 4073-4083, 2005.

GLOVER, W.; CHAN, H.K.; EBERL, S.; DAVISKAS, E.; VERSCHUER, J. Effect of particle size of dry powder mannitol on the lung deposition in healthy volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 314-322, 2008.

GOMES, T.A.; COSTA, S.P.M.; MEDEIROS, G.C.R.; SILVA, C.R.; LYRA, M.A.M.; SILVA, K.E.R.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA,

R.M.F.; NETO, P.J.R. Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antirretroviral classe II: Efavirenz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36(2), p.239-249, 2015.

GU, C.; GRANT, D.J.W. Estimating the Relative Stability of Polymorphs and Hydrates from Heats of Solution and Solubility Data. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 90(9), p. 1277-1287, 2001.

HEINZ, A.; STRACHAN, C.J.; ATASSI, F.; GORDON, K.C.; RADES, T. Characterizing and Amorphous System Exhibiting Trace Crystallinity: A Case Study with Saquinavir. **Crystal Growth & Design**, v. 8(1), p. 119-127, 2007.

HONÓRIO, T.S.; PINTO, E.C.; ROCHA, H.V.A.; ESTEVES, V.S.D.; SANTOS, T.C.; CASTO, H.C.; RODRIGUES, C.R.; SOUSA, V.P.; CABRAL, L.M. In Vitro–In Vivo Correlation of Efavirenz Tablets Using GastroPlus[®]. **AAPS PharmSciTech**, V. 14(3), p.1244-1254, 2013.

HORST, J.H.; CAINS, P.W. Co-crystal polymorphs from a solvent-mediated transformation. **Crystal Growth and Design**, v. 8(7), p. 2537-2542, 2008.

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

ICH – International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

JAEGHERE, F.D.; ALLÉMANN, E.; KUBEL, F.; GALLI, B.; COZENS, R.; DOELKER, E.; GURNY, R. Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 291-298, 2000.

JAIN, A.; RAN, Y.; YALKOWSKY, S.H. Effect of pH-Sodium Lauryl Sulfate Combination on Solubilization of PG-300995 (an Anti-HIV Agent): A Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 5(3), p. 1-3, 2004.

JAIN, R.; DUVVURI, S.; KANSARA, V.; MANDAVA, N.K.; MITRA, A.K. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of Saquinavir in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, p. 233-240, 2007.

KARNER, S.; URBANETZ, N.A. The impact of eletrostatic charge in pharmaceutical powders with specific focus on inhalation-powders. **Journal of Aerosol Science**, v. 42, p. 428-445, 2011.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, p. 1-10, 2011.

KEMPSON, I.M.; KIRKBRIDE, K.P.; SKINNER, W.M.; COUMBAROS, J. Applications of synchrotron radiation in forensic trace evidence analysis. **Talanta**, v. 67, p. 286-303, 2005.

KHAN, K.A.; RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p. 48-49, 1975.

KHANKARI, R.K.; GRANT, D.J.W. Pharmaceutical hydrates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 61-79, 1995.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. AIDS e Outras Imunodeficiências, in: Imunologia de KUBY. 6 ed., Artmed Editora S.A.: Porto Alegre, 2008, 704 p.

KOBECK, P.; BAUMGARTNER, S.; KRISTL, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 179-186, 2006.

KUBOTA, N. Effect of impurities on the growth kinetics of crystals. **Crystal Research and Techology**, v. 36, p. 749-769, 2001.

KUMAR, L.; AMIN, A.; BANSAL, A.K. An overview of automated systems relevant in pharmaceutical salt screening. **Drug Discovery Today**, v. 12(23, 24), p. 1046-1053, 2007.

KUMINEK, G.; RAUBER, G.S.; RIEKES, M.K.; CAMPOS, C.E.M.; MONTI, G.A.; BORTOLUZZI, A.J.; CUFFINI, S.L; CARDOSO, S.G. Single Crystal structure, solid state characterization and dissolution rate of terbinafine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 78-79, p. 105-111, 2013.

KURLOV, A.S.; GUSEV, A.I. Determination of the Particle Size, Microstrains, and Degree of Inhomogeneity in Nanostructured Materials from X-ray Diffraction Data. **Glass Physics and Chemistry**, v. 33, p. 276-282, 2007.

LACY, C.F.; ARMSTRONG, L.L.; GOLDMAN, M.P.; LANCE, L.L. **Drug Information Handbook International**. 13 ed., Lexi-Comp Inc.: United States, 2005, 540 p.

LEONI, M.; CONFETE, T.; SCARDI, P. PM2K: a flexible program implementing Whole Powder Pattern Modelling. **Z. Kristallogr. Suppl.**, v. 23, p. 249-254, 2006.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 47-60, 2000.

LI, J.C.M. Microstructure and Properties of Materials, World Scientific Publishing, Singapore; Vol 1 (ISBN: 978-981-02-2403-5), 1996 and Vol 2 (ISBN: 978-981-02-4180-3), 2000.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administrated drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265-278, 2004.

LIU, Z.; WANG, S.; HU, M. Oral Absorption Basics: Pathways, Physico-chemical and Biological Factors Affecting Absorption, in Developing Solid Oral Dosage Forms. 1 ed., Elsevier: USA, 2009, 265-288 p.

LOHANI, S.; GRANT, D.J.W. Thermodynamics of Polymorphs, in: Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry. 1 ed., Hilfiker, R.; Ed.; Wiley-VCH: Germany, 2006, 21-42 p.

MAHAJAN, H.S.; PINGALE, M.H.; AGRAWAL, K.M. Solubility and dissolution enhancement of saquinavir mesylate by inclusion complexation technique. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 76, p. 467-472, 2013.

MAHAPATRA, S.; THAKUR, T.S.; JOSEPH, S.; VARUGHESE, S.; DESIRAJU, G.R. New solid state forms of the anti-HIV drug Efavirenz. Conformational flexibility and high Z' issues. **Crystal Growth & Design**, v. 10, p. 3191-3202, 2010.

MARQUES, M.R.C. Dissolução de Medicamentos, in: **Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica**. 1 ed., Storpirtis, S.; Gonçalves, J.E.; Chiann, C.; Gai, M.N., Eds.; Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro, 2009; 96-108 p.

MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 42, p. 620-643, 2002.

MELO, A.C.C.; AMORIM, I.F.; CIRQUEIRA, M.L. Toward Novel Solid-State Forms of the Anti-HIV Drug Efavirenz: From Low Screening Success to Cocrystals Engineering Strategies and Discovery of a New Polymorph. **Crystal Growth & Design**, v. 13, p. 1558-1569, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. **Protocolo de Assistência Farmacêutica em DST/HIV/Aids. Recomendações do grupo de trabalho de assistência farmacêutica. Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_assistencia_farmaceutica_aids.pdf>. Acesso em: 01/12/2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo_13_3_2014_pdf_28003.pdf>. Acesso em: 02/07/2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Redução de óbitos no Brasil é de 13%**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>. Acesso em: 29/03/2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015. **Boletim Epidemiológico HIV – AIDS – 2015**. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58534/boletim_aids_11_2015_web_pdf_19105.pdf. Acesso em 29/03/2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (a). Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Quais são os antirretrovirais, 2016**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>>. Acesso em: 29/03/2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (b). Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Medicamentos antirretrovirais, 2016**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/medicamentos-antirretrovirais>>. Acesso em: 29/03/2016.

MISHRA, S.; TANDON, P.; AYALA, A.P. Study on the structure and vibrational spectra of efavirenz conformers using DFT: Comparison to experimental data. **Spectrochimica Acta A**, v. 88, p. 116-123, 2012.

MITTEMEIJER, E.J. *Fundamentals of Materials Science*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010. ISBN 978-3-642-10499-2. Doi: 10.1007/978-3-642-10500-5.

MORENO, S.; ALDEGUER, J.L.; ARRIBAS, J.R.; DOMINGO, P.; IRIBARREN, J.A.; RIBERA, E.; RIVERO, A.; PULIDO, F. The future of antirretroviral therapy: challenges and needs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 827-835, 2010.

MOSHARRAF, M.; NYSTRÖM, C. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of micronized practically insoluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 122, p. 35-47, 1995.

MSD. MERCK SHARP & DOHME. **STOCRIN® (Efavirenz), MSD. 2010**. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25948-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25948-1-0].PDF)>. Acesso em: 11/01/2012.

NANGIA, A. Conformational polymorphism in organic crystals. **Accounts of Chemical Research**, v. 41(5), p. 595-604, 2008.

NIH. **Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services.** October 14, 2011; 1-67. Disponível em: <<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>>. Acesso em: 10/01/2012.

NOWACEK, A.S.; BALKUNDI, S.; MCMILLAN, J.; ROY, U.; SKINNER, A.M.; MOSLEY, R.L.; KANMOGNE, G.; KABANOV, A.V.; BRONICH, T.; GENDELMAN, H.E. Analyses of nanoformulated antiretroviral drug charge, size, shape and content for uptake, drug release and antiviral activities in human monocyte-derived macrophages. **Journal of Controlled Release**, v. 150, p. 204-211, 2011.

OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I.; NAIDOO, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 697-710, 2008.

OLUSANMI, D.; JAYAWICKRAMA, D.; BU, D.; MCGEORGE, G.; SAILES, H.; KELLEHER, J.; GAMBLE, J.F.; SHAD, U.V.; TOBYN, M. A control strategy for bioavailability enhancement by size reduction: Effect of micronization conditions on the bulks, surface and blending characteristics of an active pharmaceutical ingredient. **Powder Technology**, v. 258, p. 222-233, 2014.

OTSUKA, M.; OFUSA, T.; MATSUDA, Y. Dissolution improvement of water-insoluble glybuzole by co-grinding and co-melting with surfactants and their physicochemical properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 10, p. 217-226, 1998.

PANIKUMAR, A.D.; VENKAT, R.Y.; SUNITHA G.; SATHESH, B. P.R.; SUBRAHMANYAM C.V.S. Development of Biorelevant and Discriminating Method for Dissolution of Efavirenz and its formulations. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5 (3), p. 220-223, 2012.

PANKAJ, P.; KAILASH, B.; RAO, P.R.T.; KUMUD, P.; AJIT, S.; SINGH, K.P. Micronization: an efficient tool for dissolution enhancement of dienogest. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3 (2), p. 329-333, 2011.

PHARMACIA BRASILEIRA, 2008.

http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/67/037a052_vArias.pdf

PARTHASARADHI, R.B.; RATHNAKAR, R.K.; RAJI, R.R.; MURALIDHARA, R.D.; SUBASH, C.R.K.; SRINIVASA, R.B. Novel Polymorphs of Saquinavir, 2010.

PATHAK, S.M.; MUSMADE, P.; DENGLE, S.; KARTHIK, A.; BHAT, K.; UDUPA, N. Enhanced oral absorption of saquinavir with Methyl-Beta-Cyclodextrin-Preparation and in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41(3-4), p. 440-451, 2010.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.S.; CAMPOS, C.E.M.; MAURÍCIO, M.H.P.; AVILLES, R.R.; CAPOBIANCO, G.; CARDOSO, S.G.; CUFFINI, S.L. Dissolution enhancement of Deflazacort using hollow crystals prepared by antisolvent crystallization process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 294-301, 2013.

PEROLD, Z.; SWANEPOEL, E.; BRITS, M. Anomalous dissolution behaviour of a novel amorphous form of Efavirenz. **American Journal of PharmTech Research**, v.2(2), p. 2249-3387, 2012.

PERONI, R.N.; GENNARO, S.S.D.; HOCHT, C.; CHIAPPETTA, D.A.; RUBIO, M.C.; SOSNIK, A.; BRAMUGLIA, G.F. Efavirenz is a substrate and in turn modulates the expression of the efflux transporter ABCG2/BCRP in the gastrointestinal tract of the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 1227-1233, 2011.

PINTO, E.C.; CABRAL, L.M.; SOUSA, V.P. Development of a discriminative intrinsic dissolution method for efavirenz. **Dissolution Technologies**, v. May, p. 31-40, 2014.

PISCITELLI, S.C.; PENZAK, S.R.; FLEXNER, C. Practical Therapeutics, in: **Aids and Other Manifestations of HIV Infection**. 4 ed., Elsevier: USA, 2004, 913-930 p.

POURGHARAMANI, P.; ALTIN, E.; MALLEMBAKAM, M.R.; PEUKER, W.; FORSSBERG, E. Microstructural characterization of hematite during wet and dry millings using Rietveld and XRD line profile analyses. **Powder Technology**, v. 186, p. 9-21, 2008.

PRADO, L.D. Preparação e caracterização de polimorfos de mebendazol e carvedilol. 2012. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal Fluminense. Centro de Estudos Gerais, Niterói, Brasil, 2012.

RABEL, S.; SUN, S.; MAURIN, M.; PATEL, M. **AAPS Pharm SciTech**, v. 3, p. 26-29, 2001.

RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA-JR, A.; TAVARES, L.C. Micellar solubilization of drugs. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science**, v. 8(2), p. 147-136, 2005.

RAVIKUMAR, K., SRIDHAR, B. Molecular and crystal structure of Efavirenz, a potent and specific inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase, and its monohydrate. **Molecular Crystals & Liquid Crystals**, v. 515, p. 190-198, 2009.

REBUFFI, L.; PLAISIER, J.R.; ABDELLATIEF, M.; LAUSI, A.; SCARDI, P. MCX: a synchrotron radiation beamline for X-ray diffraction line profile analysis, **Z. Anorg. Allg. Chemie**, v. 640 (15), p. 3100-3106, 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/zaac.201400163>.

REINHOUDT, D.N. Supramolecular Chemistry and Heterocycles. Module in Chemistry, **Molecular Sciences and Chemical Engineering**, Elsevier, 2013. Doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.05396-8.

RENAME, 2014. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/13/Rename-2014.pdf>>. Acesso em: 30/03/2016.

RIIPPI, M.; TANNINEN, V.P.; YLIRUUSI, J. Effect of compression force on the crystal properties of erythromycin acistrate tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 365-371, 2000.

RODRÍGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C.P.; JAYASANKAR, A.; MATZGER, A.J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 241-274, 2004.

ROSSI, R.C.; DIAS, C.L.;BAJERSKI, L.; BERGOLD, A.M.; FRÖEHLICH, P.E.J. Development and validation of discriminating method of dissolution for fosamprenavir tablets based on in vivo data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 439-444, 2011.

ROY, H.; BRAHMA, C.K.; KUMAR, R.; NANDI, S. Formulation of saquinavir Mmesylate loaded microparticle by counterion induced aggregation method: Approach by hyperosmotic technique. **Drug Invention Today**, v. 5, p. 259-266, 2013.

RUDDY, S.B.; MATUSZEWSKA, B.K.; GRIM, Y.A.; OSTOVIC, D.; STOREY, D.E. Design and characterization of a surfactant-enriched tablet formulation for oral delivery of a poorly water-soluble immunosuppressive agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, p. 173-186, 1999.

SANTOS, R.S.L. Sustentabilidade do Programa Nacional de DST/AIDS: Análise da capacidade de oferta e preços dos medicamentos antirretrovirais (mestrado em Políticas Públicas, Estratégia e Desenvolvimento). Instituto de Economia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Políticas Públicas, Estratégia e Desenvolvimento, Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, Y.P.; WRIGHT, N.; PARSONS, D.L.; RANGARI, V.K.; FASINA, O.; BABU, R. J. Physicochemical characterization of Efavirenz-cyclodextrin inclusion complexes. **AAPS. American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10(1), p. 81-87, 2009.

SAVJANI, K.T.; GAJJAR, A.K.; SAVJANI, J.K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **International Scholarly Research Network**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

SCARDI, P.; LEONI, M. Diffraction line profiles from polydisperse crystalline systems. **Acta Crystallographica A57**, p. 604-613, 2001.

SCARDI, P.; LEONI, M. Whole powder pattern modeling. **Acta Crystallographica A A58**, P. 190-200, 2002.

SCARDI, P. Microstructural properties: lattice defects and domain size effects, in: Powder Diffraction: Theory and Practice, Dinnebier, R.E.; Billinge, S.J.L., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2008, 376–413 p. ISBN 978-0-85404-231-9.

SCARDI, P.; ORTOLANI, M.; LEONI, M. WPPM: microstructural analysis beyond the Rietveld method. **Materials Science Forum**, v. 651, p. 155-171, 2010.

SEKHON, B.S. Pharmaceutical co-crystals – a review. **ARS Pharmaceutica**, v. 50(3), p. 99-117, 2009.

SHAN, N.; ZAWOROTKO, M.J. The role of cocrystals in pharmaceutical science. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 440-446, 2008.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, fourth ed., Appleton & Lange, 1999.

SHELDRICK, G.M. SHELXL97. Program for Crystal Structure Determination; University of Göttingen: Germany, 1997.

SHELDRICK, S. M. (2008) **Acta Crystallographica**. A64, 112-122.

SOLLOHUB, K.; CAL, L. Spray Drying Technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99(2), p. 587-597, 2010.

SOUZA, M.V.N.; ALMEIDA, M.V. Drogas Anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 26 (3), p. 366-372, 2003.

SPECK, A.L. PLATON. **Acta Crystallographica Section A**, v. 46, C34, 1990.

STEED, J. W. The role of co-crystals in pharmaceutical design. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34(3), p. 185-193, 2013.

STODDART, C.A.; REYES, R.A. Models of HIV-I disease: A review of current status. **Drug Discover Today: Disease Models**, v. 3 (1), p. 113-119, 2006.

STRICKLEY, R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21(2), p. 201-230, 2004.

SUGIMOTO, M.; OKAGAKI, T.; NARISAWA, S.; KOIDA, Y.; NAKAJIMA, K. Improvement of dissolution characteristics and bioavailability of poorly water-soluble drugs by novel cogrinding method using water-soluble polymer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 160, p. 11-19, 1998.

TAKANO, R.; TAKATA, N.; SHIRAKI, K.; HIGO, S.; HAYASHI, Y.; YAMASHITA, S. A Theoretical-Empirical Analysis on the Initial Dissolution Rate of Drugs from Polydispersed Particles. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32(11), p. 1885-1891, 2009.

TENHO, M., HEINÄNEN, P., TANNINEN, V.P., LEHTO, VESA-PEKKA. Does the preferred orientation of crystallites in tablets affect the intrinsic dissolution?. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1315-1323, 2007.

TILTON, J.C.; DOMS, R.W. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. **Antiviral Research**, v. 85, p. 91-100, 2010.

TINKE, A. P.; VANHOUTTE, K.; MAESSCHALCK, R.; VERHEYEN, S.; WINTER, H. A new approach in the prediction of the dissolution behavior of suspended particles by means of their particle size distribution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 900-907, 2005.

TORCHILIN, V.P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 137-172, 2001.

TORRADO, G.; FRAILE, S.; TORRADO, S.; TORRADO, S. Process-induced crystallite size and dissolution changes elucidated by a variety

of analytical methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, p. 55-63, 1998.

TSUME, Y.; MUDIE, D.M.; LANGGUTH, P.; AMIDON, G.E.; AMIDON, G.L. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57(1), p. 152-163, 2014.

UNAIDS, 2011. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. **Unaid World Aids Day Report 2011. How to get to zero: Faster. Smarter. Better.** Disponível em: <http://www.unaids.org/en/media/unaidspublication/2011/JC2216_WorldAIDSday_report_2011_en.pdf>. Acesso em: 30 nov 2011.

UNAIDS, 2015 (a). Joint United Nations Programme on HIV/ AIDS. **AIDS by the numbers.** Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_en.pdf>. Acesso em: 29 mar 2016.

UNAIDS, 2015 (b). Joint United Nations Programme on HIV/ AIDS. **FACT SHEET 2015.** Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20150901_FactSheet_2015_en.pdf>. Acesso em: 29 mar 2016.

USP, 2007 – **UNITED STATES PHARMACOPEIA**, The (USP) 30 ed., Rockville, United States Convention, 2007.

USP, 2009 – **UNITED STATES PHARMACOPEIA**, The (USP) 32 ed., Rockville, United States Convention, 2009. Disponível em: <http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_c1087.html>. Acesso em: 01/04/2016.

USP's PENDING STANDARDS GUIDELINES, 2007. Disponível em: <http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/pendingStandards/efavirenz.pdf>. Acesso em: 14 jul 2016.

UVAROV, V.; POPOV, I. Metrological characterization of X-ray diffraction methods for determination of crystallite size in nano-scale materials. **Materials Characterization**, v. 58, p. 883-891, 2007.

VAN EERDENBRUGH, B.; VERMANT, J.; MARTENS, J.A.; FROYEN, L.; VAN HUMBEECK, J.; VAN DEN MOOTER, G.; AUGUSTIJNS, P. Solubility increases associated with crystalline drug nanoparticles: methodologies and significance. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7(5), p. 1858-1870, 2010.

VERNON-PARRY, K.D. Scanning Electron Microscopy: an introduction. **Analysis**, v. 13(4), p. 40-44, 2000.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48(1), p. 3-26, 2001.

VOGT, M.; KUNATH, K.; DRESSMAN, J.B. Dissolution enhancement of fenofibrate by micronization, cogrinding and spray-drying: Comparison with commercial preparations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 283-288, 2008.

WASEDA, Y.; MATSUBARA, E.; SHINODA, K. (EDS.). **X-Ray Diffraction Crystallography**. 310 p. Springer, 2011.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 1-12, 1990.

WENSING, A.M.J.; MAARSEVEEN, N.M.V.; NIJHUIS, M. Fifteen years of HIV protease inhibitors: raising the barrier to resistance. **Antiviral Research**, v. 85, p. 59-74, 2010.

WEYNA, D.; CHENEY, M.L.; SHAN, N.; HANNA, M.; WOJTAS, Ł.; ZAWOROTKO, M.J. Crystal engineering of multiple-component organic solids: Pharmaceutical cocrystals of tadalafil with persistent hydrogen bonding motifs. **CrystEngComm**, v. 14(7), p. 2377-2380, 2012.

WIGG, M.D. Vírus da Imunodeficiência Humana, in: **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed., Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro, 2008, 410-447 p.

WILLIAMS, H.D.; TREVASKIS, N.L.; CHARMAN, S.A.; SHANKER, R.M.; CHARMAN, W.N.; POUTON, C.W.; PORTER, C.J.H. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. **Pharmacological Reviews**, v. 65, p.315-499, 2013.

WILLMANN, S.; THELEN, K.; BECKER, C.; DRESSMAN, J.B.; LIPPERT, J. Mechanism-based prediction of particle size-dependent dissolution and absorption: Cilostazol pharmacokinetics in dogs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 83-94, 2010.

WONG, S.M.; KELLAWAY, I.M.; MURDAN, S. Enhancement of the dissolution rate and oral absorption of a poorly water soluble drug by formation of surfactant – containing microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 137, p. 61-68, 2006.

WOUTERS, J.; QUÉRÉ, L., Eds.; *Pharmaceutical Salts and Co-Crystals*, RSC Drug Discovery Series; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2012; Vol. 16, ISBN: 978-1-84973-158-4.

YOULE, M. Overview of boosted protease inhibitor in treatment-experienced HIV-infected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1195-1205, 2007.

YU, L.X.; CARLIN, A.S.; AMIDON, G.L.; HUSSAIN, A.S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 221-227, 2004.

ZDZIENNICKA, A.; SZYMCZYK, K.; KRAWCZYK, J.; JAŃCZUK, B. Critical micelle concentration of some surfactants and thermodynamic parameters of their micellization. **Fluid Phase Equilibria**, v. 322-323, p. 126-134, 2012.

ZHAI, X.; LADEMANN, J.; KECK, C.M.; MÜLLER, R.H. Nanocrystals of medium soluble actives – novel concept for improved dermal delivery and production strategy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 470, p. 141-150, 2014.

ZHANG, G.G.Z.; GU, C.; ZELL, M.T.; BURKHARDT, R.T.; MUNSON, E.J.; GRANT, D.J.W. Crystallization and Transitions of Sulfamerazine Polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 91(4), p. 1089-1100, 2002.

ZHANG, G.G.Z.; ZHOU, D. Crystalline and Amorphous Solids, in: *Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and*

Practice; QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.G.Z.; LIU, L.; PORTER, W.R.; Ed.; Elsevier: United States of America, 2009; pp 25-60.

Polymorphism of Anti-HIV Drug Efavirenz: Investigations on Thermodynamic and Dissolution Properties

Cinira Fandaruff,[†] Gabriela S. Rauber,[†] Andrea M. Araya-Sibaja,[‡] Rafael N. Pereira,[‡] Carlos E. M. de Campos,[§] Helvécio V. A. Rocha,^{||} Gustavo A. Monti,[⊥] Thaciana Malaspina,[#] Marcos A. S. Silva,[†] and Sílvia L. Cuffini^{*,†,#}

[†]Laboratório de Controle de Qualidade, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brasil

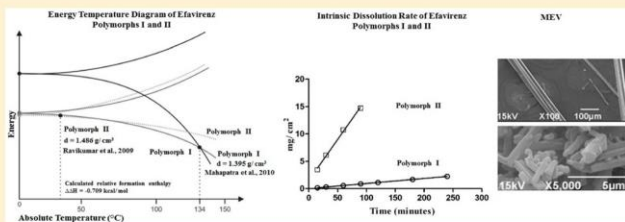
[‡]Escola de Química, Universidade de Costa Rica, 2060, San José, Costa Rica

[§]Laboratório de Difração de Raio-X, Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brasil

^{||}Laboratório de Sistemas Farmacêuticos Avançados, Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 22775-610, Brasil

[⊥]FaMAF, Universidad Nacional de Córdoba & IFEG-CONICET, Córdoba 5000, Argentina

[#]Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Federal de São Paulo, São José dos Campos, São Paulo, 12231-280, Brasil



ABSTRACT: Polymorphs, cocrystals, solvates, and hydrates have been reported for efavirenz (EFV), which is part of high activity antiretroviral therapy (HAART), and it is considered to be the best choice in the treatment of adults and children. However, studies about thermodynamic stability and improvement of dissolution properties have been rarely reported for the anhydrous polymorphic forms. Therefore, the aim of this work was to characterize the solid state of anhydrous polymorph I and polymorph II (herein obtained), to study the thermodynamic stability and strategies to improve the dissolution properties. In addition, techniques such as, X-ray powder diffraction (XRPD), differential scanning calorimetry (DSC), hot stage microscopy (HSM), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FT-IR), raman spectroscopy (RS), theoretical calculations, and solid-state nuclear magnetic resonance (ss-NMR) were used to complete this work. Thermodynamic studies showed that polymorphs I and II are enantiotropically related with the isoenergetic point between 35 and 40 °C. The EFV polymorph II showed itself to be more stable and 10-fold more soluble than polymorph I, due to modifications of morphology. Therefore, polymorph II could be an excellent candidate with significant advantages for pharmaceutical formulations.

1. INTRODUCTION

Efavirenz (EFV), (4S)-6-chloro-4-(2-cyclopropylethynyl)-4-(trifluoromethyl)-2,4-dihydro-1H-3,1-benzoxazin-2-one, belongs to the class of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). It is manufactured by Bristol-Myers Squibb and Merck Sharp & Dohme as Sustiva and Stocrin, respectively, and was approved for the treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1) in 1998.¹ It is part of high activity antiretroviral therapy (HAART), and it is considered to be the best choice in the treatment of adults and children.²

EFV belongs to class II of Biopharmaceutical Classification System (BCS); that is, it is poorly water-soluble and highly permeable.³ Due to its low solubility in water, significant differences in bioavailability can be observed in the various polymorphic forms of EFV.⁴ Recent studies have been related to cocrystals, solvates, and anhydrous polymorphic compounds of EFV (Table 1).^{5–8} However, studies about its thermody-

Received: April 13, 2014

Revised: August 4, 2014

Published: September 22, 2014



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Correlation between microstructure and bioequivalence in Anti-HIV Drug Efavirenz



Cinira Fandaruff^a, Marcos Antônio Segatto Silva^a, Danilo Cesar Galindo Bedor^b, Davi Pereira de Santana^b, Helvécio Vinícius Antunes Rocha^c, Luca Rebuffi^{d,e}, Cristy Leonor Azanza Ricardo^d, Paolo Scardi^d, Sílvia Lucia Cuffini^{a,f,*}

^a Laboratório de Controle de Qualidade, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^b Departamento de Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^c Laboratório de Sistemas Farmacêuticos Avançados, Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

^d Department of Civil, Environmental and Mechanical Engineering, University of Trento, Trento, Italy

^e Elettra-Sincrotrone Trieste, Trieste, Italy

^f Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Federal de São Paulo, São José dos Campos, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2014

Accepted in revised form 24 January 2015

Available online 3 February 2015

Keywords:

Anti-HIV
Efavirenz
Bioequivalence
Microstructure
Synchrotron Radiation
Powder diffraction

ABSTRACT

Polymorphism and particle size distribution can impact the dissolution behaviour and, as a consequence, bioavailability and bioequivalence of poorly soluble drugs, such as Efavirenz (EFV). Nevertheless, these characteristics do not explain some failures occurring in *in vitro* assays and in *in vivo* studies. EFV belongs to Class II and the High Activity Antiretroviral Therapy (HAART) is considered the best choice in the treatment of adults and children. EFV is a drug that needs bioequivalence studies for generic compounds. In this work, six raw materials were analyzed and two of them were utilized with human volunteers (*in vivo* assays or bioequivalence). All the routine pharmaceutical controls of raw materials were approved; however, the reasons for the failure of the bioequivalence assay could not be explained with current knowledge. The aim of this work was to study microstructure, a solid-state property of current interest in the pharmaceutical area, in order to find an explanation for the dissolution and bioequivalence behaviour. The microstructure of EFV raw materials was studied by Whole Powder Pattern Modelling (WPPM) of X-ray powder diffraction data. Results for different EFV batches showed the biorelevance of the crystalline domain size, and a clear correlation with *in vitro* (dissolution tests) and *in vivo* assays (bioequivalence).

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

All solid-state characteristics of drugs can potentially impact their dissolution behaviour and, as a consequence, their bioavailability and bioequivalence. This is especially true in the case of poorly soluble drugs, for which crystalline structure or

polymorphism, particle size distribution, apparent density, flowability and compressibility are all carefully controlled by solid-state pharmaceutical routine protocols. However, other solid-state properties should be studied to understand some failures occurring in *in vitro* assays (dissolution tests) and *in vivo* studies (bioequivalence), which cannot be explained by the currently used protocols.

According to the Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS), in 2012 the number of people living with AIDS worldwide was estimated at 35.3 million, and antiretroviral therapy averted 6.6 million AIDS-related deaths [1].

Efavirenz (EFV) was approved for the treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1) in 1998 [2–4]. In the High Activity Antiretroviral Therapy (HAART), it is considered the best choice in the treatment of adults and children [5]. EFV is a Class II drug (low solubility, high permeability) according to the Biopharmaceutical Classification System (BCS) [6], showing

Abbreviations: EFV, Efavirenz; HAART, High Activity Antiretroviral Therapy; WPPM, Whole Powder Pattern Modelling; UNAIDS, United Nations Program on HIV/AIDS; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; BCS, Biopharmaceutical Classification System; API, active pharmaceutical ingredients; SLS, sodium lauryl sulphate; DE, Dissolution Efficiency; SD, standard deviation; SR, Synchrotron Radiation; XRPD, X-ray Powder Diffraction; SEM, Scanning Electron Microscopy.

* Corresponding author. Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Federal de São Paulo, São José dos Campos, Brazil. Tel.: +55 1233099500.

E-mail address: scuffini@unifesp.br (S.L. Cuffini).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.01.020>

0939-6411/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Isomorphous Salts of Anti-HIV Saquinavir Mesylate: Exploring the Effect of Anion-Exchange on Its Solid-State and Dissolution Properties

Published as part of the *Crystal Growth & Design Margaret C. (Peggy) Etter Memorial virtual special issue*

Cinira Fandaruff,[†] Laura Chelazzi,[‡] Dario Braga,[‡] Silvia Lucia Cuffini,^{*,§} Marcos Antônio Segatto Silva,[‡] Jackson A. L. C. Resende,^{||} Elena Dichiarante,[⊥] and Fabrizia Grepioni^{*,‡}

[†]Laboratório de Controle de Qualidade, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

[‡]Dipartimento di Chimica G. Ciamician, Università degli Studi di Bologna, Via Selmi 2, 40126 Bologna, Italy

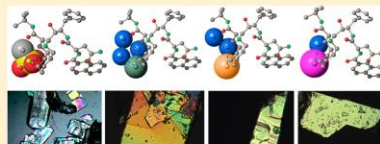
[§]Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Rua Talim, 330. Sla 208, Vila Nair, São José dos Campos CEP, 12.231-280, São Paulo, São Paulo, Brazil

^{||}Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

[⊥]PolyCrystalLine s.r.l., Via F.S. Fabri, 127/1, 40059 Medicina, Bologna, Italy

Supporting Information

ABSTRACT: Saquinavir (SQV) is an important protease inhibitor used for AIDS/HIV antiretroviral therapy. As a free base it is almost insoluble in water, and it is commercialized as its mesylate salt (SQVM), classified as belonging to class IV (low permeability and solubility). Anion exchange has been used in this work to explore the effect of halides replacing the mesylate anion on the solid state and solubility properties of saquinavir at ambient temperature. All solid forms obtained were characterized via X-ray single crystal and powder diffraction, and their thermal behavior was analyzed via differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis, hot-stage microscopy and variable temperature X-ray powder diffraction. Saquinavir chloride (SQVCl), saquinavir bromide (SQVBr), and saquinavir iodide (SQVI) are all hydrates, the difference in the anion size being responsible for the different number of water molecules (3, 2, and 1, respectively). Dissolution properties have also been investigated, and it has been found that the behavior in water of SQVM and SQVCl are very similar, with 43 and 38% dissolved in 90 min, respectively, whereas for SQVBr and SQVI this percentage was 31 and 18%, respectively. Solid SQVCl could therefore be used as a valid alternative to current pharmaceutical formulations.



INTRODUCTION

Design and synthesis of molecular solid state structures with desired properties is a goal of crystal engineering and a subject of significant interest for pharmaceutical companies, especially when dealing with active pharmaceutical ingredients (APIs) which are characterized by limited bioavailability, therefore with suboptimal efficacy by oral route.¹ A thorough understanding of the relevant noncovalent interactions at work between molecules and ions in pure molecular solids, solvates, co-crystals, and ionic co-crystals of APIs allows, at least in principle, modification of the physical and chemical properties of a drug.² When ionizable groups are present, salt formation is the method most commonly employed to improve the solubility of a poorly soluble API;³ inclusion of solvent, especially water, in the crystalline edifice, often accompanies the salt formation, but the phenomenon is more general and not limited to salts: it is known that approximately one-third of the APIs form crystalline hydrates due to the small size of water

molecule and its multidirectional hydrogen bonding capability for linking drug molecules into stable crystal structure.⁴ A control on the crystal forms resulting from a manufacturing process is also crucial, as final properties of an API may dramatically and unexpectedly change upon solvent loss or addition, or due to appearance of polymorphic modifications.⁵

Saquinavir (SQV), named (2*S*)-*N*-[(2*S*,3*R*)-4-[(3*S*,4*S*,8*S*)-3-(*tert*-butylcarbamoyl)-3,4,4*a*,5,6,7,8,8*a*-octahydro-1*H*-isoquinolin-2-yl]-3-hydroxy-1-phenylbutan-2-yl]-2-(quinoline-2-carbonylamino) butanediamide, and saquinavir mesylate (SQVM), *N*-*tert*-butyl-decahydro-2-[2(*R*)-hydroxy-4-phenyl-3(*S*)-[[*N*-(2-quinolylcarbonyl)-1-asparaginy]amino] butyl]-4*a*,5,8*a*,8*S*]-isoquinoline-3(*S*)-carboxamide methanesulfonate (Scheme 1), are anti-HIV drugs, classified by the Biopharmaceutical

Received: May 20, 2015

Revised: September 23, 2015

APÊNDICE D
ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

Anomalous Dissolution Behavior of Saquinavir Mesylate in Sodium Lauryl Sulphate

Cinira Fandaruff¹, Thiago Caon², Marcos Antônio Segatto Silva¹, Cláudia Maria Oliveira Simões², Carlos Eduardo Maduro de Campos³, Adailton João Bortoluzzi⁴, Jackson A. L. C. Resende⁵, Silvia Lucia Cuffini*⁶

¹ Laboratório de Controle de Qualidade, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

² Laboratório de Virologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

³ Laboratório de Difração de Raio-X, Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

⁴ Laboratório de Química Inorgânica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

⁵ Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

⁶ Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Federal de São Paulo, São José dos Campos, Brasil.