UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de rifampicina: preparação e caracterização físico-química

Katherine Jasmine Curo Melo

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de rifampicina: preparação e caracterização físico-química

Katherine Jasmine Curo Melo

Versão original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Melo, Katherine Jasmine Curo
M528n Nanocristais de rifampicina: preparação e caracterização físico-química / Katherine Jasmine Curo Melo. -- São Paulo, 2016.
144p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo. Departamento Farmácia.
Orientador: Bou-Chacra, Nádia Araci

1. Farmacotécnica 2. Nanotecnologia I. T. II. Bou-Chacra, Nádia Araci, orientador.

615.4b CDD

Katherine Jasmine Curo Melo.

Nanocristais de rifampicina: preparação e caracterização físico-química.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do título de Mestre

_____
Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra
(Orientadora/presidente)

_____
1˚ Examinador

_____
2˚ Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016.

Á minha família por sua capacidade de acreditar em mim. Mesmo distantes, fizeram com suas palavras e amor ter a fortaleza e persistência para continuar lutando por meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Nádia Araci Bou –Chacra pela orientação, pelo apoio, pela confiança e por todo o ensinado desde o início do caminho.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos pela oportunidade de crescimento professional e pessoal.

À Fundação Capes pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Prof. Dr. Marco Antônio Stephano, por disponibilizar os recursos do Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos e pelo apoio brindado ao longo desta etapa.

Ao professor Humberto Gomes Ferraz e o Laboratório de desenvolvimento e inovação em farmacotécnica (DEINFAR) pelo apoio brindado durante todos os ensaios.

Ao Prof. Mario Hirata Hirata por brindar as instalações de seu laboratório para os ensaios de concentração mínima inibitória.

À mestre Richard Saldaña Gonzales pelo amor, compreensão e apoio incondicional.

À Dra. Márcia Regina Spuri Ferreira e sua família, pela hospitalidade no Brasil e por ter compartilhado cada tristeza, alegria e aventura neste pais.

À mestranda Natalia Vieira de Souza e à doutora Michele Georges Issa por ter compartilhado tantas aventuras comigo e por ser até hoje um apoio incondicional.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.
Albert Einstein

RESUMO

MELO, K.J. **Nanocristais de rifampicina: preparação e caracterização físico-química.** 2016.144f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A tuberculose (TB) ainda se apresenta como desafio para a Saúde Pública, a nível global. Essa doença negligenciada (DN) tem como tratamento de primeira escolha a rifampicina. Esse fármaco pertence à classe II, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), apresentando baixa solubilidade em água. Tal característica constitui desafio no desenvolvimento de formas farmacêuticas eficazes e seguras. O uso de nanotecnologia tem se destacado como alternativa promissora para melhorar a solubilidade aquosa de fármacos. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a preparação e a caracterização físico-química de nanocristais de rifampicina. A preparação dos nanocristais foi realizada empregando método de moagem de alta energia, homogeneização a alta pressão e moagem via úmida em escala reduzida. Os resultados referentes ao método de moagem de alta energia (MAE) demostraram formação de nanocristais, mas em quantidade reduzida seguida da formação de agregados (F1-M, F2-M e F3-M). A homogeneização a alta pressão (HAP) permitiu a formação de nanocristais (F1-H e F2-H). A formulação F1-H contendo o poloxâmero 188 não apresentou estabilidade após 24 horas da preparação. A F2-H obteve diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de 412,60 ± 4,12 nm, índice de polidispersividade igual a 0,12 ± 0,02 e potencial zeta igual a -9,94 ± 0,19 mV. A elevada concentração requerida do agente estabilizante para essa formulação foi fator limitante para o seu desenvolvimento. A moagem via úmida em escala reduzida permitiu a formação de nanocristais de rifampicina F1-MU e F2-MU, com DHM igual a 340,20 ± 5,44 nm e 364,2 ± 4,50 nm, respectivamente, e distribuição de tamanho uniforme. A avaliação do DHM, do IP e do PZ, por período de três meses, revelou a estabilidade dessas formulações. Essas formulações foram obtidas por meio de planejamento de experimentos por superfície de resposta tendo como variáreis a concentração de rifampicina, a concentração do agente estabilizante e a quantidade de esferas de zircônia. As medidas de distribuição de tamanho médio das partículas e a morfologia foram realizadas utilizando difração a laser (LD) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), respectivamente. Adicionalmente, as avaliações empregando calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raio X (DRX) revelaram que não houve mudança na estrutura cristalina do polimorfo II de rifampicina e nem interação entre o fármaco e os excipientes. O presente trabalho permitiu a obtenção de de nanocristais de rifampicina estáveis e com solubilidade maior de até 1,92 vezes (F1-MU) e 1,66 vezes (F2-MU), em água, quando comparada à rifampicina matéria-prima. Os perfis de dissolução das formulações F1-MU e F2-MU demonstraram dissolução de 95% de rifampicina em aproximadamente 5 minutos. Esse resultado é significativamente superior àquele observado para o produto FURP-rifampicina suspensão oral 20 mg/mL que apresentou dissolução de 23,2% nesse mesmo intervalo de tempo. A avaliação da atividade antimicrobiana das nanosuspensões foi confirmada frente à rifampicina padrão por meio da determinação da sua concentração mínima inibitória.

Palavras-Chave: tuberculose, rifampicina, nanosuspensão, nanocristais.

ABSTRACT

MELO, K.J. **Nanocrystals: preparation and physical-chemical characterization.** 2016. 144f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Tuberculosis (TB) still presents a challenge for public health globally. This Neglected Tropical Disease (NTDs) has as the treatment of choice rifampicin. This drug belongs to the class II, according to Biopharmaceutics Classification System (BCS), with low water solubility. This characteristic is a challenge in the development of safe and effective dosage forms. The nanotechnology has emerged as a promising alternative to improve the aqueous solubility of drugs. Accordingly, the present work aimed to the preparation and physicochemical characterization of nanocrystals of rifampicin. The preparation of the nanocrystals was performed using high-energy ball milling method, high-pressure homogenization and wet grinding process on a small scale. The results of the high-energy ball milling method demonstrated formation of nanocrystals, but in small amounts followed by the formation of aggregates (F1-M, F2-M and F3-M). The high pressure homogenization (HPH) allowed the formation of nanocrystals (F1-H and F2-H). F1-M formulation containing Poloxamer 188 did not show stability after 24 hours preparation. F2-H obtained mean hydrodynamic diameter (DHM) of 412.60 ± 4.12 nm, polydispersity index of 0.12 ± 0.02 and zeta potential of -9.94 ± 0.19 mV. The high concentration of stabilizing agent required for this formulation was a limiting factor for the development. The wet grinding process on a small scale allowed the formation of rifampicin nanocrystal F1-MU and F2-MU with DHM of 340,20 ± 5,44 nm e 364,2 ± 4,50, respectively, and size distribution uniform. The evaluation of DHM, IP and PZ, for three months, showed stability of these formulations. These formulations were obtained by design of experiments using response surface having as variables the concentration of rifampicin, the concentration of the stabilizing agent and the amount of zirconia beads. The mean size distribution measurements of particles and morphology were performed using laser diffraction (LD) and transmission electron microscopy (TEM), respectively. Additionally, the evaluations using differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) revealed that there was no change in the crystalline structure of polymorph II of rifampicin and no interaction between the drug and excipients. This study allowed obtaining stable rifampicin nanocrystals and greater solubility of up to 1.92 times (F1-MU) and 1.66 times (F2-MU) in water compared to rifampicin feedstock. The dissolution profiles of F1-MU and F2-MU formulations showed 95% dissolution of rifampicin in approximately 5 minutes. This result is significantly higher than that observed for the rifampicin-FURP oral suspension product 20 mg / ml that had Dissolving 23.2% over the same time interval. The evaluation of the antimicrobial activity of nanosuspensions was confirmed against the standard rifampicin by determining its minimum inhibitory concentration.

Keywords: tuberculosis, rifampicin, nanosuspensions, nanocrystals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Taxas de incidência estimada de tuberculose em 2014.	3
Figura 2-	Tuberculose pulmonar causada pelo *Mycobacterium tuberculosis.*	5
Figura 3-	Estrutura molecular da Rifampicina fármaco utilizado no tratamento de TB.	8
Figura 4-	Absorbância máxima da rifampicina 50 µg/mL no intervalo de 200-600 nm.	17
Figura 5-	Espectro de varredura do tampão HCl pH 1,2 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.	18
Figura 6-	Espectro de varredura do tampão acetato pH 4,5 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.	18
Figura 7-	Espectro de varredura da água pH 6,0 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.	18
Figura 8-	Espectro de varredura do tampão fosfato pH 6,8 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.	19
Figura 9-	Espectro de varredura do tampão fosfato pH 7,2 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.	19
Figura 10-	Figura 10. Espectro de varredura da mistura de excipientes (Povacoat™ e manitol) para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.	20
Figura 11-	Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em tampão HCl pH 1,2.	21
Figura 12-	Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em tampão acetato pH 4,5.	22
Figura 13-	Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em água pH 6,0.	23
Figura 14-	Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em tampão fosfato pH 6,8.	24
Figura 15-	Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em tampão fosfato pH 7,2.	25
Figura 16-	Solubilidade da rifampicina nos diferentes meios.	29

Figura 17- Distribuição granulométrica da rifampicina matéria-prima. n=10. 30

Figura 18.- **A**: Fotografia MEV (um) da rifampicina matéria-prima e **B:** Fotografia MEV (um) gerada pelo Imagen.j para determinação do tamanho médio da rifampicina matéria-prima. 32

Figura 19- Fotografia MET (um) das partículas de rifampicina matéria-prima. Ampliação 25000x 32

Figura 20- Difratograma de raios X (método do pó) do polimorfo II da rifampicina. 33

Figura 21- Curvas DSC da amostra de rifampicina (polimorfo II) obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min-1. 34

Figura 22- Curvas TG/DTG da amostra de rifampicina (polimorfo II) obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min-1 35

Figura 23- Diferentes nanoestruturas empregadas como sistemas de liberação de fármaco. 40

Figura 24- Aumento da área superficial e o número de cristais pela diminuição do tamanho da partícula (Adaptado LIU,2013). 41

Figura 25- **A:** Aumento da solubilidade de saturação (Cs) e aumento da pressão de dissolução de uma superfície plana, uma micropartícula e uma nanopartícula. P_x: pressão de dissolução**.** 42

B. Diminuição da camada de difusão (h) e aumento do gradiente de concentração C_S - C_x/h, todo em conjunto aumenta a velocidade de dissolução dc/dt do fármaco (Adaptado Liu,2013) 43

Figura 26- Comportamento mucoadesivo dos nanocristais, após administração oral. 44

Figura 27- Adsorção de partículas > 1 µm (A) e para nanocristais ou partículas < 1 µm (B). 45

Figura 28- Métodos de obtenção de nanocristais. 46

Figura 29- Ilustração dos movimentos simultâneos de Rotação (ω)/Revolução (Ω). 47

Figura 30- Ilustração do processo de homogeneização a alta pressão que produz nanocristais de rifampicina. 49

Figura 31- **A:** Representacâo esquemática do metodo em escala reduzida. 50

B: Imagem dos frascos condicionados no laboratorio para o desensvolvimento de nanocristais. 50

Figura 32- Nanosuspensões de rifampicina obtidas por moagem de alta energia e seus liofilizados. 63
Figura 33- Distribuição granulométrica da F1-M dos nanocristais de rifampicina. n=10 65
Figura 34- Distribuição granulométrica da F2-M dos nanocristais de rifampicina. n=10 66
Figura 35- Distribuição granulométrica da F3-M dos nanocristais de rifampicina. n=10 66
Figura 36- Fotografia MET (um) das partículas de F1-M **A:** Ampliação 20000x e **B:** Ampliação 50000x. 69
Figura 37- Fotografia MET (um) das partículas de F2-M **A:** Ampliação 4000x e **B:** Ampliação 10000x. 69
Figura 38- Fotografia MET (um) das partículas de F3-M **A:** Ampliação 20000x e **B:** Ampliação 50000x 70
Figura 39- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), HPC e mistura física rifampicina/HPC obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min-1. 71
Figura 40- Curvas TG/DTG da rifampicina (polimorfo II), HPC e mistura física rifampicina/HPC obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min-1. 72
Figura 41- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), lecitina e mistura física rifampicina/lecitina obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min-1. 73
Figura 42- Curvas TG/DTG da rifampicina (polimorfo II), lecitina e mistura física rifampicina/lecitina obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min-1. 74
Figura 43- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), e mistura física rifampicina/poloxâmero 188 obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min-1. 75
Figura 44- Curvas TG/DTG rifampicina (polimorfo II), poloxâmero 188 e mistura física rifampicina/poloxâmero 188 obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min-1. 76
Figura 45- Nanosuspensões de rifampicina obtidas por homogeneização à alta pressão. A: F1-H e B: F2-H. 77
Figura 46- Distribuição granulométrica da F1-H dos nanocristais de rifampicina. n=10 79

Figura 47- Distribuição granulométrica da F2-H dos nanocristais de rifampicina. n=10 79

Figura 48- Esquema do mecanismo de aglomeração da F1-H após um dia de obtenção empregando homogeneização a alta pressão. Adaptado de (PONGPEERAPAT et al., 2008). 81

Figura 49- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais na formulação F2-H reconstituída após liofilização. 84

Figura 50- Fotografia TEM (um) das partículas de F2-H obtida por homogeneização à alta pressão. **A:** Ampliação 6000x e **B:** Ampliação 10000x. 85

Figura 51- Fotografia TEM (um) das partículas de F2-H liofilizada e reconstituída em água obtida por homogeneização à alta pressão. Ampliações de 15000x. 85

Figura 52- Estrutura química do Povacoat™ 86

Figura 53- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), Povacoat™ e mistura física rifampicina/ Povacoat™ obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}. 87

Figura 54- Curvas TG/DTG rifampicina (polimorfo II), Povacoat™ e mistura física rifampicina/ Povacoat™ obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 $mL.min^{-1}$ 88

Figura 55- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), da mistura física rifampicina/ Povacoat™ e da F2-H obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min-1. 89

Figura 56- Curvas TG/DTG rifampicina (polimorfo II), da mistura física rifampicina/ Povacoat™ e da F2-H obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min-1. 89

Figura 57- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de rifampicina em formulação F2-H durante 3 meses a 25ºC e 4º 90

Figura 58- Nanosuspensões de rifampicina obtidas por moagem via úmida em escala reduzida com presença de agregados e precipitados. 93

Figura 59- Gráfico de resíduos da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™. 97

Figura 60- Gráfico de séries temporais da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™. 98

Figura 61- Gráfico de efeitos principais para avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™. 98

Figura 62- Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™. 99

Figura 63- Gráficos de contorno relativo à da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™. 100

Figura 64- Gráfico de otimização da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as seguintes variáveis Rifampicina (p/p%): 3,25; Zircônio (p/p%): 20 e Povacoat™ (p/p%): 2,56, predição para 345,0 nm: F1-MU. 101

Figura 65- Gráfico de otimização da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as seguintes variáveis Rifampicina (p/p%): 3,28; Zircônio (p/p%): 20 e Povacoat™ (p/p%): 2,00, predição para 370,0 nm: F2-MU. 101

Figura 66- Nanosuspensões de rifampicina obtidas por moagem úmida em escala reduzida. A: F1-MU e B: F2-MU. 102

Figura 67- Distribuição granulométrica da F1-MU dos nanocristais de rifampicina. n=10 103

Figura 68- Distribuição granulométrica da F1-MU dos nanocristais de rifampicina. n=10 104

Figura 69- Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm) e índice de polidispersividade (IP) para a nanocristais da F1-MU avaliada em solução saturada do fármaco. 105

Figura 70- Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm) e índice de polidispersividade (IP) para a nanocristais da F2-MU avaliada em solução saturada do fármaco. 105

Figura 71- Variação do potencial zeta aparente em função da condutividade para a nanocristais da F1-MU 107

Figura 72- Variação do potencial zeta aparente em função da condutividade para a nanocristais da F2-MU. 107

Figura 73- Aparência da pastilha liofilizada das formulações. A: F1-MU e B: F2-MU com manitol 5%. 109

Figura 74- Frascos contendo nanosuspensões de rifampicina antes da liofilização e sendo colocados no liofilizador. 109

Figura 75- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais nas formulações F1-MU e F2-MU reconstituída após liofilização. 111

Figura 76- Fotografia TEM (um) das partículas de F1-MU obtida por moagem úmida em escala reduzida. **A:** Ampliação 25000x. **B:** Ampliação 30000x. 112

Figura 77- Fotografia TEM (um) das partículas de F1-MU liofilizada obtida por moagem úmida em escala reduzida. **A:** Ampliação 6000x. **B:** Ampliação 25000x 112

Figura 78- Fotografia TEM (um) das partículas de F2-MU obtida por moagem úmida em escala reduzida. **A:** Ampliação 5000x.**B:** Ampliação 40000x 113

Figura 79- Fotografia TEM (um) das partículas de F2-MU liofilizada obtida por moagem úmida em escala reduzida 113

Figura 80- **A:** Nanosuspensões de rifampicina obtidas por moagem via úmida em escala reduzida e **B:** Picnômetro vazio. 114

Figura 81- Difratograma de raios X (método do pó) do polimorfo II da rifampicina. 117

Figura 82- Difratograma de raios X (método do pó) do polimorfo II da rifampicina. 117

Figura 83- Difratograma de raios X (método do pó) do polimorfo II da rifampicina. 118

Figura 84- Curvas DSC do manitol, da rifampicina (polimorfo II), e mistura física rifampicina/Povacoat™/manitol obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min-1. 119

Figura 85- Curvas TG/DTG do manitol, da rifampicina (polimorfo II), e mistura física rifampicina/Povacoat™/manitol obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min-1. 120

Figura 86- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), da mistura física rifampicina/Povacoat™/manitol e dos nanocristais F1-MU e F2-MU obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão 121

Figura 87- Curvas TG/DTG da mistura física rifampicina/Povacoat™/manitol e dos nanocristais F1-MU e F2-MU obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min-1. 121

Figura 88- Solubilidade obtida através do método de equilíbrio da rifampicina matéria-prima, das misturas físicas (MF) MFF1-MU, MFF2-MU e dos nanocristais nas formulações F1-MU e F2-MU As barras de erros indicam o desvio padrão dos testes feitos em triplicatas. 123

Figura 89- Ensaio de dissolução da suspensão de rifampicina referência (20 mg/mL) (F-FURP), avaliada em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8) contendo 1% de Tween® 80, utilizando aparato 2, na velocidade de 50 rpm e tempo de ensaio de 60 minutos. 125

Figura 90- Ensaio de dissolução da suspensão de rifampicina referência (20 mg/mL) (F-FURP), avaliada em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8) contendo 1% de Tween® 80, utilizando aparato 2, na velocidade de 50 rpm e tempo de ensaio de 60 minutos. 126

Figura 91- Perfil de dissolução dos nanocristais na F1-MU, avaliados em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8) contendo 1% de Tween® 80, utilizando aparato 2, na velocidade de 50 rpm e tempo de ensaio de 60 minutos. 128

Figura 92- Perfil de dissolução dos nanocristais na F2-MU, avaliados em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8) contendo 1% de Tween® 80, utilizando aparato 2, na velocidade de 50 rpm e tempo de ensaio 128

Figura 93- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) da nanocristais de 130

Figura 94- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) da nanocristais de rifampicina em F2-MU durante 3 meses a 4ºC. 130

Figura 95- Gráfico de resíduos da avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) das nanosuspensões de rifampicina (F1-MU e F2-MU), suspensão de rifampicina 20mg/mL e rifampicina padrão. 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Concentração das amostras de rifampicina obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 500 µg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.	12
Tabela 2-	Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade de rifampicina em tampão HCl pH 1,2.	20
Tabela 3-	Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade da rifampicina em tampão acetato pH 4,5.	21
Tabela 4-	Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade da rifampicina em água pH 6,0.	22
Tabela 5-	Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade da rifampicina em tampão fosfato pH 6,8.	23
Tabela 6-	Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade da rifampicina em tampão fosfato pH 7,2.	24
Tabela 7-	Valores médios de limite de quantificação da rifampicina em diferentes meios, referentes a três determinações.	25
Tabela 8-	Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter-corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em tampão HCl 1,2.	26
Tabela 9-	Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter-corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em tampão acetato 4,5.	27
Tabela 10-	Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter-corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em água pH 6,0.	27
Tabela 11-	Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter- corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em tampão fosfato 6,8.	27
Tabela 12-	Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter-corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em tampão fosfato 7,2.	27
Tabela 13-	Resultados do estudo de robustez do método analítico para quantificação de rifampicina em água pH 6,0.	28
Tabela 14-	Solubilidade da rifampicina em diferentes meios a 37,0°C. n=3	29
Tabela 15-	Valores de diâmetro médio, a 10%, 50% e 90% da rifampicina matéria-prima n=10.	30
Tabela 16-	Problemas relacionados com o desempenho de fármacos pouco solúveis em água na administração oral.	38
Tabela 17-	Fórmulas e condições dos ensaios para obtenção de nanocristais de rifampicina utilizando moagem de alta energia.	54

Tabela 18-	Fórmulas e condições dos ensaios para obtenção de nanocristais de rifampicina utilizando homogeneização à alta pressão (HAP).	55
Tabela 19-	Matriz de ensaios para a otimização do processo de produção de nanocristais de rifampicina.	56
Tabela 20-	Parâmetros de medida de rifampicina, matéria-prima e nanocristais pelo método de difração de raios laser (DL).	58
Tabela 21-	Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% da rifampicina matéria-prima e dos nanocristais. n=10.	64
Tabela 22-	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) das formulações F1-M, F2-M e F3-M de nanocristais de rifampicina.	67
Tabela 23-	Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% da rifampicina matéria-prima e dos nanocristais. n=10	78
Tabela 24-	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) das formulações F1-H e F2-H de nanocristais de rifampicina.	80
Tabela 25-	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais na formulação F2-H reconstituída após liofilização.	83
Tabela 26-	Avaliação da agregação e precipitação dos nanocristais de rifampicina.	92
Tabela 27-	Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta dos nanocristais de rifampicina na matriz de ensaios do planejamento de experimentos por superfície de resposta.	94
Tabela 28-	Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.	96
Tabela 29-	Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.	96
Tabela 30-	Diâmetro hidrodinâmico médio de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.	102
Tabela 31-	Valores de diâmetro médio, d10%,d50% e d90% da rifampicina matéria-prima e dos nanocristais. n=10.	102
Tabela 32-	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) das formulações F1-UM e F2-MU dos nanocristais de rifampicina.	108
Tabela 33-	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais nas formulações F1-MU e F2-MU reconstituída após liofilização.	110

Tabela 34-	Massas do Picnômetro vazio, com a solução padrão (água) e com a F1-P.	114
Tabela 35-	Massas do Picnômetro vazio, com a solução padrão (água) e com a F1-P.	114
Tabela 36-	Densidade relativa da suspensão referência de rifampicina 20 mg/mL (FURP) e das nanosuspensões de rifampicina F1-MU e F2-MU.	**115**
Tabela 37-	Teor de rifampicina na suspensão referência de rifampicina 20 mg/mL (FURP) e nas nanosuspensões F1-MU e F2-MU.	**115**
Tabela 38-	Solubilidade de saturação da rifampicina matéria-prima, das misturas físicas (MF) MFF1-MU, MFF2-MU e dos nanocristais nas formulações F1-MU e F2-MU e o número de vezes no aumento da solubilidade observados.	**123**
Tabela 39-	Eficiência de dissolução (ED%) das nanosuspensões de rifampicina F1-MU, F2-MU e suspensão de rifampicina referência 20 mg/mL (F-FURP) avaliados em tempo de ensaio de 45 minutos.	**127**
Tabela 40-	Valores das absorbâncias obtidas na determinação mínima inibitória das nanosuspensões de rifampicina (F1-MU e F2-MU), suspensão de rifampicina 20mg/mL (F-FURP) e rifampicina padrão	**131**
Tabela 41-	Médias, desvio padrão (DP) e IC (95%) das absorbâncias.	**131**
Tabela 42-	Análise de variância das absorbâncias para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio de avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) das nanosuspensões de rifampicina (F1-MU e F2-MU), F-FURP 20mg/mL e rifampicina padrão.	**132**
Tabela 43-	Teste de Tukey	**132**

SÚMARIO

Capitulo..... 1

1. INTRODUÇÃO. 2
2. REVISÃO IBLIOGRÁFICA..... 3
   2.1. A tuberculose..... 3
      2.1.1. Tuberculose a nível global e no Brasil..... 3
      2.1.2. Etiologia e transmissão da doença..... 4
      2.1.3. Terapêutica da tuberculose..... 6
      2.1.4. Medidas preventivas da tuberculose 6
   2.2. Rifampicina..... 8
   2.3. Mecanismo de ação..... 8
   2.4. Características físico-químicas..... 8
3. MATERIAL E MÉTODO..... 9
   3.1. Matéria-prima, solventes e reagentes..... 9
   3.2. Aparelhos, equipamentos e acessórios..... 9
   3.3. Métodos..... 10
      3.3.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões..... 10
      3.3.2. Validação de metodologia analítica para a quantificação de rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões..... 11
      3.3.3. Determinação da solubilidade de saturação da rifampicina matéria-prima..... 14
      3.3.4. Distribuição do tamanho das partículas de rifampicina matéria-prima empregando difração de raios laser (DL) 15
      3.3.5. Análise morfológica e avaliação do tamanho dos cristais de rifampicina matéria-prima empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) 15
      3.3.6. Difração de raios X (DRX) 15
      3.3.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 16
      3.3.8. Analise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica derivada (DTG) 16
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 16
   4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões..... 16
      4.1.1. Determinação da absorbância máxima da rifampicina..... 16
   4.2. Validação de metodologia analítica para a quantificação de rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões..... 17
      4.2.1. Especificidade..... 17
      4.2.2. Linearidade..... 20
      4.2.3. Limite de quantificação..... 25

4.2.4. Precisão e exatidão..... 26
4.2.5. Robustez..... 28
4.3. Determinação da solubilidade de saturação da rifampicina matéria-prima..... 28
4.4. Distribuição do tamanho das partículas de rifampicina matéria-prima empregando difração de raios laser (DL) 29
4.5. Análise morfológica e avaliação do tamanho dos cristais de rifampicina matéria-prima empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) 31
4.6. Difração de raios X da rifampicina matéria-prima (DRX) 32
4.7. Comportamento térmico da rifampicina..... 33
Capitulo II 36

1. INTRODUÇÃO..... 37
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 38
2.1. Fármacos pouco solúveis em água: desafios e oportunidades..... 38
2.2. Nanocristais: considerações gerais..... 39
2.3. Propriedades dos nanocristais..... 41
2.3.1. Aumento da velocidade de dissolução por aumento da área superficial e aumento da solubilidade de saturação..... 41
2.3.2. Aumento da adesividade em membranas biológicas..... 43
2.3.3. Tecnologias de nanonização..... 45
3. OBJETIVOS..... 51
3.1. Objetivo geral..... 51
3.2. Objetivos específicos..... 51
4. MATERIAL E MÉTODO..... 52
4.1. Matéria-prima, solventes e reagentes..... 52
4.2. Aparelhos, equipamentos e acessórios..... 52
4.3. Métodos..... 53
4.3.1. Preparação dos nanocristais de rifampicina empregando moagem de alta energia..... 53
4.3.2. Preparação dos nanocristais de rifampicina empregando homogeneização a alta pressão (HAP) 54
4.3.3. Preparação dos nanocristais de rifampicina empregando moagem via úmida em escala reduzida..... 55
4.4. Liofilização das nanosuspensões..... 56
4.4.1. Liofilização das nanosuspensões obtidas pelo método de moagem de alta energia..... 56
4.4.2. Liofilização para as formulações obtidas pelo método de homogeneização a alta pressão e moagem úmida em escala reduzida..... 57
4.5. Caracterização físico-química dos nanocristais..... 57
4.5.1. Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser (DL) 57

4.5.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) 58
4.5.3. Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET)..... 59
4.5.4. Determinação da densidade relativa das nanosuspensões..... 59
4.5.5. Teor de rifampicina nas nanosuspensões obtidas por moagem via úmida em escala reduzida..... 60
4.5.6. Difração de raios X dos nanocristais (DRX)..... 60
4.5.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)..... 60
4.5.8. Analise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica derivada (DTG)..... 61
4.5.9. Solubilidade de saturação dos nanocristais..... 61
4.5.10. Perfil de dissolução..... 61
4.5.11. Estabilidade das nanosuspensões..... 62
4.5.12. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) das nanosuspensões de rifampicina obtidas empregando método de moagem via úmida em escala reduzida..... 62
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 63
5.1. Preparação dos nanocristais de rifampicina por moagem de alta energia 63
5.1.1. Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser (DL)..... 63
5.1.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais..... 67
5.1.3. Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET)..... 68
5.1.4. Estudo de compatibilidade fármaco-excipiente..... 70
5.1.5. Considerações parciais..... 76
5.2. Preparação dos nanocristais empregando homogeneização a alta pressão (HAP)..... 77
5.2.1. Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser..... 78
5.2.2. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais..... 79
5.2.3. Liofilização das nanosuspensões..... 83
5.2.4. Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET)..... 84
5.2.5. Estudos de compatibilidade fármaco- excipiente..... 85
5.2.6. Analise térmica da formulação obtida por homogeneização a alta pressão..... 88
5.2.7. Estabilidade física da nanosuspensão no tempo..... 90
5.2.8. Considerações parciais..... 90
5.3. Preparação de nanocristais empregando moagem via úmida em escala reduzida..... 91

5.3.1. Otimização do processo de preparação dos nanocristais de rifampicina empregando planejamento de experimentos por superfície de resposta..... 93
5.3.2. Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser..... 102
5.3.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais..... 109
5.3.4. Liofilização das nanosuspensões de rifampicina..... 109
5.3.5. Analise morfológica e determinação de tamanho dos nanocristais microscopia eletrônica de transmissão (MET)..... 111
5.3.6. Determinação da densidade relativa das nanosuspensões..... 114
5.3.7. Teor de rifampicina nas nanosuspensões..... 115
5.3.8. Difração de raios X (DRX) 116
5.3.9. Estudos de compatibilidade fármaco- excipientes..... 118
5.3.10. Analise térmica das formulações obtidas por moagem via úmida em escala reduzida..... 120
5.3.11. Solubilidade de saturação dos nanocristais de rifampicina..... 122
5.3.12. Perfil de dissolução..... 125
5.3.13. Estabilidade das nanosuspensões..... 129
5.3.14. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) das nanosuspensões de rifampicina obtidas empregando método de moagem via úmida em escala reduzida..... 130
6. CONCLUSÕES..... 133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 135
8. ANEXOS..... 144

Capitulo I

Caracterização físico-química da rifampicina

1. INTRODUÇÃO

A ausência da introdução de novos fármacos para o tratamento da tuberculose e os elevados índices de resistência ao microrganismo, como consequência de tratamento inadequado, são fatores responsáveis pelos alarmantes índices de reincidência da tuberculose na atualidade.

A tuberculose (TB) no Brasil faz parte do grupo das doenças negligenciadas (DN) que são constituídas por conjunto de doenças infecciosas altamente prevalentes. Essas doenças afetam profundamente a qualidade de vida das pessoas e geram impactos sócio- econômicos negativos para a população, principalmente nos países mais pobres (DNDi, 2015; BRASIL, 2010; OMS, 2015a; KEALEY; SMITH, 2010).

O tratamento da TB consiste na administração de diversos fármacos em conjunto sendo um deles a rifampicina, considerado agente de primeira linha que possui ação bactericida de amplo espectro (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

No entanto, o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento dessa doença não é atrativo para parte das indústrias farmacêuticas em função do seu reduzido potencial de retorno lucrativo. Essas doenças acometem principalmente a população de baixa renda e é prevalente em países emergentes ou em desenvolvimento (OMS,2015a).

Considerando o atual cenário para profilaxia, controle e tratamento da TB e as atuais estratégias estabelecidas pela OMS e o documento *The Stop TB - Partnership*, é possível observar a existência de lacuna na Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) de novas formas farmacêuticas de fármacos tão importantes como a rifampicina (DNDi, 2015, MORAN et al, 2009; MOREL, 2006).

O presente trabalho tem como objetivo contribuir para a terapêutica da TB por meio do desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, nanosuspensões de rifampicina estáveis e com potencial de maior eficácia terapêutica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

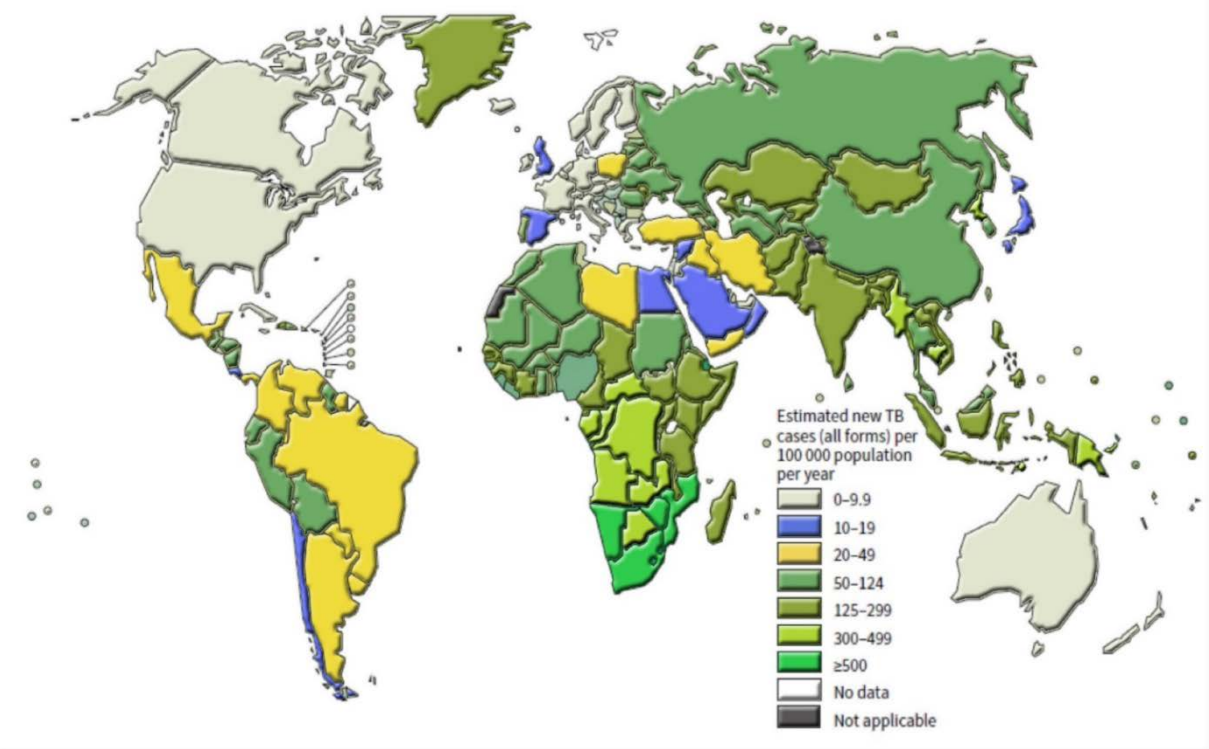
2.1. A tuberculose (TB)

2.1.1. Tuberculose a nível global e no Brasil

A TB é uma doença milenar causada pelo *Mycobacterium tuberculosis,* cuja transmissão é feita pelo ar e que afeta principalmente os pulmões. Atualmente é considerada uma das principais causas de morte a nível mundial. No entanto, essa doença infecciosa pode ser previsível e curável.

A TB ocupa 8° e 9° lugar como principal causa de morte em países de baixa renda e renda média-baixa, respetivamente (OMS,2016a). Em 2014, 9,6 milhões de pessoas foram acometidas pela doença e 1,5 milhões morreram como decorrência dessa (Figura 1) (OMS,2016b).

Figura 1- Taxas de incidência estimada de tuberculose em 2014.



A TB é considerada a principal causa de morte das pessoas infectadas pelo vírus do HIV (vírus de imunodeficiência humana adquirida). Em 2014, a terça parte dos infectados pelo vírus também estavam infectados pelos bacilos da TB. Essa

combinação tem se mostrado letal totalizando aproximadamente 400.000 mortes de pacientes HIV positivos (OMS,2016c).

Os medicamentos para o tratamento da TB estão sendo usados há mais de 4 décadas e a resistência ao microrganismo se vem propagando de forma muito elevada. Os principais fármacos que possuem resistência são a isoniazida e a rifampicina, que pertencem à primeira linha de tratamento da TB. A resistência produzida é devido ao tratamento inadequado ou ao uso de medicamento de baixa qualidade que muitas vezes são distribuídos ou comercializados nos países emergente e em desenvolvimento. Em 2014, foram relatados 480.000 casos de Tuberculose Multi-Droga Resistente (TB-MDR) (OMS,2015c).

A partir de julho de 2015, 130 países relataram dados de mortalidade para TB. O Brasil faz parte dos 22 países de alta carga de TB, ocupando a 16ª posição a nível mundial, com referência ao número absoluto de casos (OMS,2015c).

Em 2015, a incidência de casos de TB no Brasil foi reduzida a 20,2%, passando de 38,7 casos/100 mil habitantes em 2006 a 30,9 casos/100 mil habitantes. Assim também a taxa de mortalidade foi reduzida de 15,4%, passando de 2,6 óbitos /100 mil habitantes em 2006 a 2,2 óbitos/100 mil habitantes. Quanto ao número de novos casos registrados no país na última década, alcançou-se a redução de 12,5%, sendo 63.189 novos casos em comparação a 72.213 casos em 2006 (BRASIL, 2016).

Dados adicionais relevantes acerca da TB são aqueles disponibilizados pela Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO-OMS), em 2014. Esse relatório indica que o Brasil ocupa o 1° lugar quanto ao número estimado de casos de TB (incidência de 93.000 casos) representando um terço (33%) da carga de incidência de TB nas Américas e 84% da carga incidente nos sete países de América do Sul. Assim mesmo, o Brasil ocupa o 2° lugar em casos de TB Multi-droga Resistente (TB-MDR) (1.800 casos) representando 29% dos casos totais. Além disso, o Brasil ocupa o 1° lugar em casos de TB associada a HIV- positivo (13.000 casos) ou 41% dos casos totais em toda a região das Américas (PAHO-OMS, 2014).

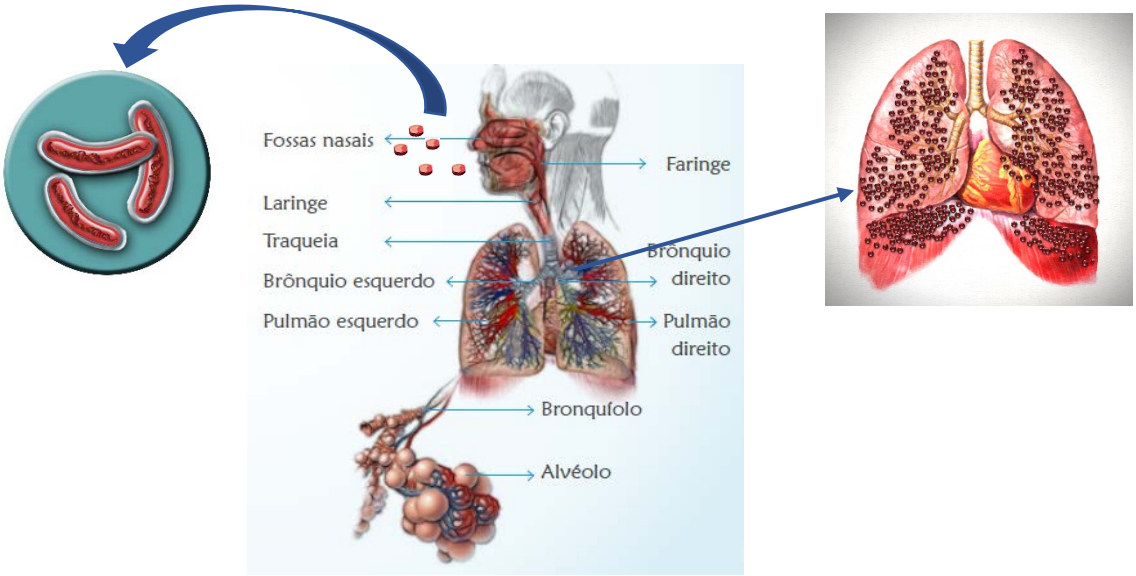
2.1.2. Etiologia e transmissão da doença

A TB é uma doença milenar causada pelo *Mycobacterium tuberculosis,* bactéria anaeróbica, que se aloja principalmente nos pulmões, possui um envelope celular altamente hidrofílico e produz enzimas hidrolíticas ou enzimas modificadoras

como às beta-lactamases e as acetil transferases que lhe conferem extrema resistência aos fármacos utilizados para o seu tratamento (ROSSETI et al, 2002).

A transmissão da TB ocorre de pessoa a pessoa, principalmente, pelo ar. O contágio se dá pelo contato de gotículas contaminadas com o bacilo provenientes do ato de tossir, falar ou espirrar. Estes bacilos poderão ser inalados por outras pessoas permitindo, dessa forma, a propagação da infeção (Figura 2) (OMS, 2016b).

Figura 2- Tuberculose pulmonar causada pelo *Mycobacterium tuberculosis.*



Após contanto com ar infectado o risco de infecção é de 10% e esse risco se mantém ao longo da vida. O período de incubação do bacilo dura de 4 a 12 semanas, o mesmo tempo para identificação das lesões primárias. A probabilidade de que o indivíduo infectado evolua para a doença propriamente dita, depende de múltiplas causas, destacando-se, a idade avançada, as condições socioeconômicas e algumas condições médicas (diabetes mellitus, alcoolismo, infecção pelo vírus HIV, etc.). De modo geral, a evolução ocorre quando o sistema imunológico está debilitado e não consegue manter o bacilo sob controle (BRASIL, 2009).

A bactéria no início produz infecção latente, o primeiro sintoma é uma reação inflamatória aguda e inespecífica e continua com reação granulomatosa específica (2-4 semanas). Posteriormente, a cura se dá por fibrose e calcificação, sendo que nem todos os bacilos são destruídos podendo permanecer viáveis por décadas. Muitos dos pacientes infectados podem permanecer saudáveis por anos. Quando os pacientes apresentam depressão imunológica, como os idosos enfermos e indivíduos

imunocomprometidos (portadores de VIH, transplantados e em vigência de quimioterapia) poderão em algum momento apresentar reativação tardia, especialmente dos vestígios das lesões da infecção primária (VERONESI, 2005).

2.1.3. Terapêutica da tuberculose

O arsenal terapêutico da TB manteve padrão por mais de 30 anos no Brasil. A isoniazida (H), a rifampicina (R) e a pirazinamida (Z) foram usadas durante todo este tempo como esquema de tratamento. A partir do 2009 este esquema foi alterado sendo introduzido o etambutol (E) como quarto fármaco na chamada fase de ataque ou intensiva (nos primeiros dois meses) sendo reduzidas as concentrações da isoniazida e pirazinamida (BRASIL,2011).

A justificativa para a mudança foi o aumento da resistência primaria à isoniazida e a resistência primaria à isoniazida associada a rifampicina. A incorporação do etambutol no tratamento representa redução significativa do surgimento dessa multirresistência. Dessa maneira, é usado mundialmente nos esquemas básicos de tratamento com excelentes resultados com relação à eficiência e à adesão do paciente. Esse novo esquema terapêutico manteve os fármacos: rifampicina e isoniazida durante a etapa de manutenção (BRASIL, 2011).

Os fármacos anteriormente mencionados juntamente com a estreptomicina (S) são considerados os agentes de primeira linha que combinam o maior nível de eficácia com grau aceitável. Os agentes de segunda linha incluem: moxifloxacino (Mx) ou gatifloxacino (Gx), a etionamida (Et), o ácido aminosalicílico (Aa), a ciclosserina (Cs), a amicacina (Am), a canamicina (Cn), a capreomicina (Cp) e a linezolida (L) (JUNIOR, 2007).

Dessa forma podemos observar que a rifampicina apesar de ser um fármaco antigo ainda continua sendo importante no tratamento da TB.

2.1.4. Medidas preventivas da tuberculose

Considerando o que foi mencionado anteriormente, é de fundamental importância a pesquisa e o desenvolvimento de novas estratégias de controle, diagnóstico e tratamento para a TB. A OMS estabeleceu diversas metas desafiadoras após o ano 2015, ano que culminou com a publicação do relatório dos Objetivos do Desenvolvimento do Milênio (OMS, 2015b).

Dentre essas novas estratégias os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (2015-2030), estabelecidos pela OMS e a ONU em 2015, referem-se à continuação dos Objetivos do Desenvolvimento do Milênio. Esse documento apresenta 17 objetivos com um total de 169 metas. O objetivo relacionado à área da saúde é o Objetivo 3 que visa assegurar vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades até o 2030. O parágrafo 3.3 deste objetivo estabelece como data limite o ano de 2030 para erradicação de doenças como a malária, a tuberculose, as epidemias de AIDS, entre outras doenças transmissíveis (OMS,2016d).

Estratégia adicional de fundamental importância, é aquela intitulada “Fim da Tuberculose (2015-2035) ” que tem como visão de futuro “Um mundo livre da TB: zero mortes, adoecimento e sofrimento causados por esta doença”. Esta estratégia pretende redução de 95% das mortes e de 90% dos casos incidentes no final de 2035. Economicamente, esse relatório fixa como meta que as famílias não tenham despesas durante o tratamento. Assim, os governos devem se comprometer, a adotar medidas financeiras que indiquem elevado compromisso com seus habitantes (OMS,2016e).

Finalmente, o Plano Global pelo Fim da TB 2016-2020 que é parte do *Stop TB Partnershi*p, nasceu imediatamente após a avaliação da estratégia global *Plan to Stop* TB 2006-2015. Esse plano constitui ferramenta para cumprimento de todas estratégias anteriormente mencionadas já que visa controlar a proliferação da doença, focando-se na identificação rápida dos casos, centrando a atenção nos grupos vulneráveis e marginalizados, implementando novos tipos de diagnósticos e tratamentos, assim como, o oferecimento e formação de pacotes de serviço para o tratamento da TB (*Stop TB Partnership*, 2016).

As diversas estratégias e medidas preventivas adotadas até o 2015, pelas autoridades sanitárias dos países com incidência de TB, permitiram, entre os anos 2000 e 2014, salvar 43 milhões de vidas, a nível mundial. Tal resultado foi alcançado em função de diagnóstico rápido e de tratamento adequado. Assim também, o Relatório Anual da TB do 2015 relatou que o Brasil atingiu todas as metas internacionais relacionadas à incidência, prevalência e mortalidade por TB (OMS, 2016c).

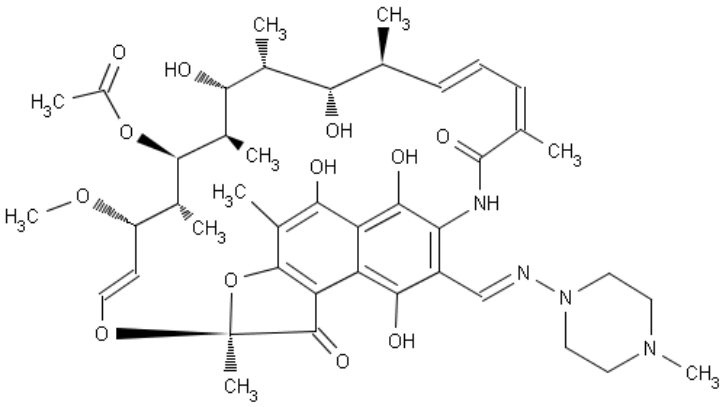
2.2. Rifampicina

2.2.1. Mecanismo de ação

A rifampicina (Figura 3) é um antibiótico semissintético da rifampicina B 3-(4-metil-1-piperaziniliminometil) constituída por um complexo macrocíclico produzido pelo *Streptomyces mediterranei*. Possui ação bactericida de amplo espectro, atuando de forma especifica na inibição da atividade da enzima RNA polimerase DNA dependente, mediante a formação de complexo estável com a enzima mencionada.

Atua em microrganismos intra e extracelulares e em bacilos em processo de divisão ou em estado latente (BACCHI et al., 1998; GOODMAN et al., 2012; ZHANG,2005). Este fármaco possui biodisponibilidade variável, dependente da administração durante o estado jejum e estado alimentando, pelo qual recomenda-se ser administrada em estado alimentando já que a presença do suco gástrico poderia inativar a sua atividade, permitindo o surgimento do fenômeno de resistência bacteriana.

Figura 3- Estrutura molecular da Rifampicina fármaco utilizado no tratamento de TB.



2.2.2. Características físico-químicas

A rifampicina se apresenta como pó cristalino, de cor castanho-avermelhada, possui elevada massa molecular de 822,94 g/mol e características anfóteras (“zwitterion”) relacionadas com pKa de 1,7 pertencente ao grupo 4-hidroxila e pKa de 7,9 relacionado ao nitrogênio do grupo piperazina. Quando em solução aquosa seu ponto isoelétrico é igual a 4,8 (ALVES, 2007).

A sua baixa solubilidade em água (1,5 mg/mL) e a elevada permeabilidade a classifica como fármaco classe II, segundo o Sistema de classificação Biofarmacêutica (SCB) (BECKER,2009).

Quanto à sua estrutura química se apresenta em duas formas polimórficas cristalinas anidras I e II, e em duas formas amorfas. A forma I é a forma mais estável e a II é metaestável (PELIZZA,1977). A principal diferença entre estas formas refere-se à solubilidade em água e consequentemente no seu comportamento durante a dissolução, que é refletido na absorção e na biodisponibilidade final do fármaco durante a administração oral.

A pesar da evidente importância da caracterização dos polimorfos da rifampicina e o seu impacto na biodisponibilidade, as farmacopeias não estipulam nem especificam o tipo de polimorfo que deveria seu usados pelos fabricantes do medicamento (HENWOOD et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Matéria-prima, solventes e reagentes

- ✓ Rifampicina -Fundação para o Remédio Popular –FURP, São Paulo, Brasil
- ✓ Metanol- J.T.Baker® ,Mexico
- ✓ Metanol SeccoSolv® Metanol-MERCK, Alemanha
- ✓ Metanol Panreac, Espanha
- ✓ Ácido clorídrico 37%- Fmaia ,Brasil
- ✓ Cloreto de potássio - Synth,São Paulo, Brasil
- ✓ Acetato de sódio anidro - Synth,São Paulo, Brasil
- ✓ Ácido acético glacial- Fmaia ,Brasil
- ✓ Fosfato de potássio monobásico - Synth,São Paulo, Brasil
- ✓ Hidróxido de sódio - Synth,São Paulo, Brasil
- ✓ Água de osmose.

3.2. Aparelhos, equipamentos e acessórios

- ✓ Equipamento espectrofotométrico Evolution 201-Thermo Scientific
- ✓ Cubetas de quartzo- Thermo Scientific

- ✓ Balões volumétricos de 10,25,50,200 e 1000 mL-Laborglas Ltda., São Paulo, Brasil
- ✓ Banho ultrasõnico-Unique, São Paulo, Brasil
- ✓ Balança analítica AX200, Shimadzu®
- ✓ Equipamento de difração de raios laser Granulometer Cilas 1900-Cilas.,Orleans, França
- ✓ Microcopio eletrônico de varredura SU-3400- Hitachi High Technologies., Tokio, Japão
- ✓ Microscópio eletrônico de transmissão Jeol modelo JEM-1010, Estados Unidos
- ✓ Calorímetro de Varredura DSC TA-2920 –TA Instruments®., New Castle, DE, Estados Unidos
- ✓ Analisador termogravimétrico TG/DTG 2950 -TA- Instruments®.,New Castle, DE, Estados Unidos
- ✓ Difratômetro Bruker D8 Advance Da Vinci –Bruker., Japão

3.3. Métodos

3.3.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões

A espectrofotometria na região UV-Vis permite a identificação de fármacos e outros tipos de matérias primas com elevada precisão, com baixo custo e com facilidade na execução, que o definem como uns dos métodos mais usado na indústria farmacêutica.

3.3.1.1. Espectro UV- visível (UV-VIS)

O espectro de absorção da rifampicina foi obtido em espectrofotometria UV-Vis na região de 200-600 nm. Soluções da rifampicina foram preparadas em água, nos tampões farmacopéicos HCl pH 1,2; acetato pH 4,5; fosfato pH 6,8 e pH 7,2. As leituras foram realizadas em espectrofotométrico Evolution 201-Thermo Scientific, utilizando cubeta de quartzo de 1 mm de comprimento e os tampões descritos acima como brancos.

3.3.1.2. Preparo da solução- padrão e soluções de rifampicina

Para o preparo da solução padrão de 500 µg/mL de rifampicina pesaram-se, 25 mg do fármaco (padrão secundário) transferindo-se para balão volumétrico de 50 mL, adicionando-se 5 mL de metanol P.A e deixando em agitação em ultrassom por 5 minutos até a completa solubilização do fármaco, em seguida o volume foi completado com água. Foram utilizadas diluições desta solução para a validação do método analítico.

3.3.2. Validação de metodologia analítica para a quantificação de rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões

A validação foi conduzida de acordo com a Guia para validação de métodos analíticos e bioanaliticos- Resolução ANVISA 899/2003 (Brasil, 2003) e com as recomendações da ICH -The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 1996). Os parâmetros de validação utilizados foram: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (intra- corrida (repetibilidade) e inter- corrida (intermediaria)), limite de quantificação, exatidão e robustez.

3.3.2.1. Especificidade

A especificidade é a capacidade do método para distinguir o composto analisado dos outros componentes da formulação (Brasil,2003). Esta foi avaliada a partir da realização da varredura entre 200- 600 nm dos solventes descritos no item 3.2.1.1, com a finalidade de garantir que o método analítico não sofra interferências a causa dos outros excipientes.

3.3.2.2. Linearidade

Refere se a capacidade do método analítico em demostrar que os valores obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especifico (Brasil,2003).

A partir da solução padrão de rifampicina foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com os solventes em analise conforme a Tabela 1, obtendo-se soluções com concentrações definidas do fármaco. A Tabela 1 apresenta o esquema de diluições utilizado para o preparo de cada solução e as concentrações finais obtidas. As curvas analíticas foram preparadas em triplicata em oito níveis de concentrações diferentes. As absorbâncias medias correspondentes à três determinações para cada diluição, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (µg/mL) no eixo das abscissas.

Tabela 1- Concentração das amostras de rifampicina obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 500 µg/mL e empregadas para determinação da linearidade do método de quantificação.

Amostra	Alíquota da solução padrão (µL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	200	10	10
2	400	10	20
3	600	10	30
4	800	10	40
5	1000	10	50
6	1200	10	60
7	1600	10	80
8	1800	10	90

3.3.2.3. Intervalo

Representa a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Foi derivado do estudo de linearidade e foi confirmado mediante o exatidão, precisão e linearidade da amostra dentro desta faixa.

3.3.2.4. Precisão

A finalidade da precisão é averiguar a proximidade dos resultados obtidos em uma serie de quantificações (Brasil, 2003). Os resultados são expressados por meio da imprecisão dada pelo coeficiente de variação das absorbâncias, a partir da equação 1:

$$CV\% = \frac{DP}{AMD} \times 100 \qquad (1)$$

Na qual:

CV%= coeficiente de variação
DP= desvio padrão
AMD= absorbância media determinada na analise

O critério de aceitação do coeficiente de variação (CV%) foi menor ou igual a 5% (Brasil,2003).
A precisão foi avaliada em dois níveis:

- **Repetibilidade (precisão intra- corrida)**

Representa a concordância entre os resultados dentro de curto período de tempo. Foi verificada através de três repetições das concentrações 30, 40 e 50 µg/mL obtidas a partir da solução padrão de rifampicina, contendo um total de nove réplicas. As avaliações foram realizadas no mesmo dia em períodos alternados (manhã, tarde e noite), verificando se os resultados se encontram dentro da máxima diferença aceitável.

- **Precisão intermediaria (precisão inter- corrida)**

A precisão intermediaria representa a concordância do mesmo laboratório, mas obtidas em dias diferentes. Foi determinada de forma similar à repetibilidade através de três repetições das concentrações 30, 40 e 50 µg/mL obtidas a partir da solução padrão de rifampicina contendo um total de nove réplicas. As avaliações foram realizadas em dias diferentes em períodos alternados (manhã, tarde e noite).

3.3.2.5. Limite de quantificação

Definida como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas no método (Brasil,2003). É obtida da equação 2:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \qquad (2)$$

Na qual:

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo do Y

IC: a inclinação da curva de calibração

3.3.2.6. Exatidão

Representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico estabelecido em relação ao valor verdadeiro (Brasil,2003). Foi determinado pela análise de amostras controle em três diferentes concentrações e em nove réplicas em um mesmo dia (exatidão intra- corrida) e em dias diferentes (inter- corrida), sendo que é necessário inicialmente determinar a especificidade, a linearidade e que todas as concentrações se encontrem dentro intervalo do método.

$$Exatidão\ (\%) = \frac{Concentrção\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100 \qquad (3)$$

3.3.2.7. Robustez

Mede a capacidade do método em resistir pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando a confiança que o método tem durante o uso diário. Foi verificada pela variação de certos parâmetros como diferentes fabricantes do metanol (Metanol J.T.Baker®, SeccoSolv® Metanol-MERCK e metanol Panreac), solvente usando na solubilização da rifampicina e a variação dos operadores durante os ensaios. A concentração usada foi de 50 µg/mL de rifampicina. A avaliação da robustez foi realizada pela análise dos coeficientes de variação (CV%) entre as médias obtidas.

3.3.3. Determinação da solubilidade de saturação da rifampicina matéria-prima

Para determinar a solubilidade de saturação da rifampicina foi empregado o método do equilíbrio. Dessa forma excesso de rifampicina foi acondicionada no interior de frascos de vidro contendo 5 mL dos seguintes meios: tampão HCl pH 1,2; tampão acetato pH 4,5; água deionizada; tampão fosfato pH 6,8 e 7,2; preparados conforme

descrição da USP 29. Os frascos foram constantemente agitados a 150 rpm durante 72 horas a 37°C, em agitador orbital Tecnal TE 4080 (Tecnal, São Paulo, Brasil). Após atingir a saturação alíquotas foram retiradas e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 37°C em centrifuga 5424R-Eppendorf (Eppendorf, Estados Unidos) sendo a concentração do fármaco determinada pelo método espectrofotométrico desenvolvido e validado no presente trabalho.

3.3.4. Distribuição do tamanho das partículas de rifampicina matéria-prima empregando difração de raios laser (DL)

Para a determinação do tamanho inicial da rifampicina matéria-prima foi utilizado o equipamento de difração de raios laser Granulometer Cilas 1900 (Cilas, Orleans, França) programado para método de via úmida. Como meio dispersante usa-se solução saturada do fármaco, previamente filtrada para a remoção do fármaco não solubilizado. O sistema foi mantido sem ultrassom para evitar a quebra das partículas maiores do fármaco e o tempo de medição foi de 30 segundos.

3.3.5. Análise morfológica e avaliação do tamanho dos cristais de rifampicina matéria-prima empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)

A superfície, a forma e o tamanho dos cristais da rifampicina matéria-prima foram determinados empregando o equipamento SU-3400 (Hitachi High Technologies, Japão) a tensão de aceleração 15,0 kV e aumento de 5.000 a 50.000 vezes. Assim também usou- se o microscópio eletrônico de transmissão Jeol modelo JEM-1010, Estados Unidos a amostra foi diluída em solução saturada do fármaco de 1:10 e depositados sobre grids de cobre de 150 MESH recobertos com película de FORMVAR por 10 minutos (tempo de secagem). Os tamanhos dos cristais foram determinados usando o programa Imagen.j nas imagens geradas pela microscopia.

3.3.6. Difração de raios X (DRX)

A caracterização do estado cristalino da rifampicina matéria-prima foi obtido utilizando o método do pó. Utilizo- se um difratômetro de raios X Bruker Modelo D8

Advance Da Vinci (Bruker, Japão), na radiação de Cu- Kα As amostras da mistura física em valores absolutas e dos nanocristais foram expostas a rediacao CuKa 40 Kv e tempo de passo de 0,01.

3.3.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial foi realizada empregando o TA-2920 (TA Instrument®, New Castle, DE, EUA) previamente calibrada com índio metálico (ponto de fusão: 156,4 °C/ $\Delta H_{fusão}$:28,50 J g^{-1}. Usa-se faixa de temperatura de 25- 350 °C. As amostras foram cuidadosamente pesadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e submetidos à velocidade de aquecimento de 10 °C.min^{-1} e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

3.3.8. Analise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica derivada (DTG)

As análises de TG/DTG foram realizadas usando- se cadinhos de platina no equipamento TA-2950 (TA Instrument®, New Castle, DE, EUA) em faixa de temperatura de 25- 600 °C, velocidade de aquecimento de 10 °C e atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL.min^{-1}). A calibração do equipamento do equipamento foi realizada com padrão de oxalato de cálcio. Massa conhecida das amostras foi adicionada a um cadinho de platina e a perda de peso, registrada em função da temperatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

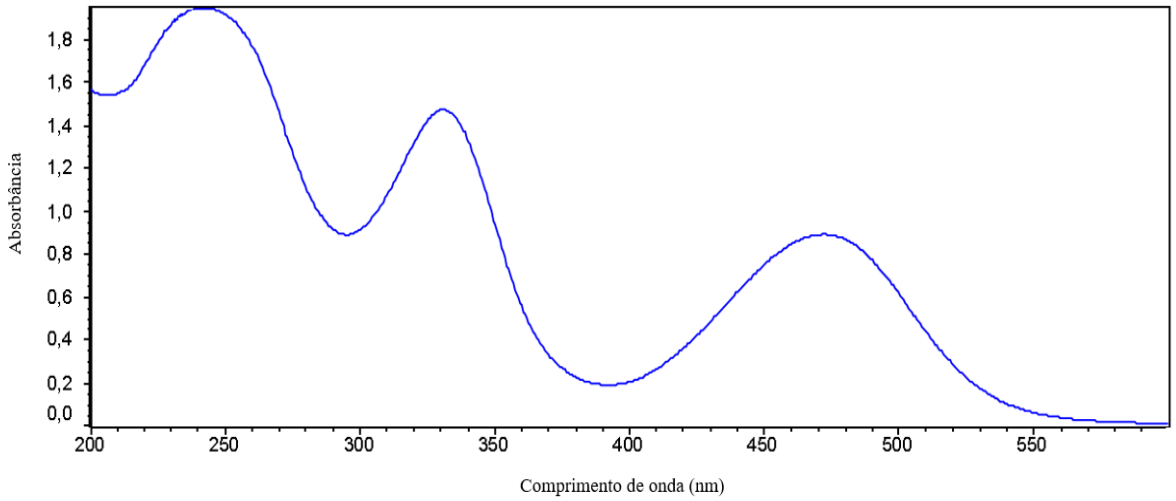
4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões

4.1.1. Determinação da absorbância máxima da rifampicina

Para a determinação da absorbância máxima da rifampicina utilizou-se varredura entre 200 a 600 nm em espectrofotômetro UV-Vis Evolution 201, esta

varredura foi realizada com solução de rifampicina de 50 µg/mL. Foi determinado que o comprimento de absorbância máxima foi de 472 nm, com um pico de máximo de absorbância de 0,88 como é observado na Figura 4.

Figura 4-Absorbância máxima da rifampicina 50 µg/mL no intervalo de 200-600 nm.



4.2. Validação de metodologia analítica para a quantificação de rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões

4.2.1. Especificidade

As Figuras 5, 6, 7, 8 e 9 apresentam a absorção desprezível dos meios tampões HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, água pH 6,0 , fosfato pH 6,8 e 7,2 respetivamente na varredura de 200-600 nm. Cada espectro obtido demostra que não houve interferência nenhuma dos meios com o comprimento de onda utilizado para a detecção de rifampicina (472 nm). Concluindo que o método é especifico e seletivo para a determinação da rifampicina nos respectivos meios.

Figura 5- Espectro de varredura do tampão HCl pH 1,2 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.

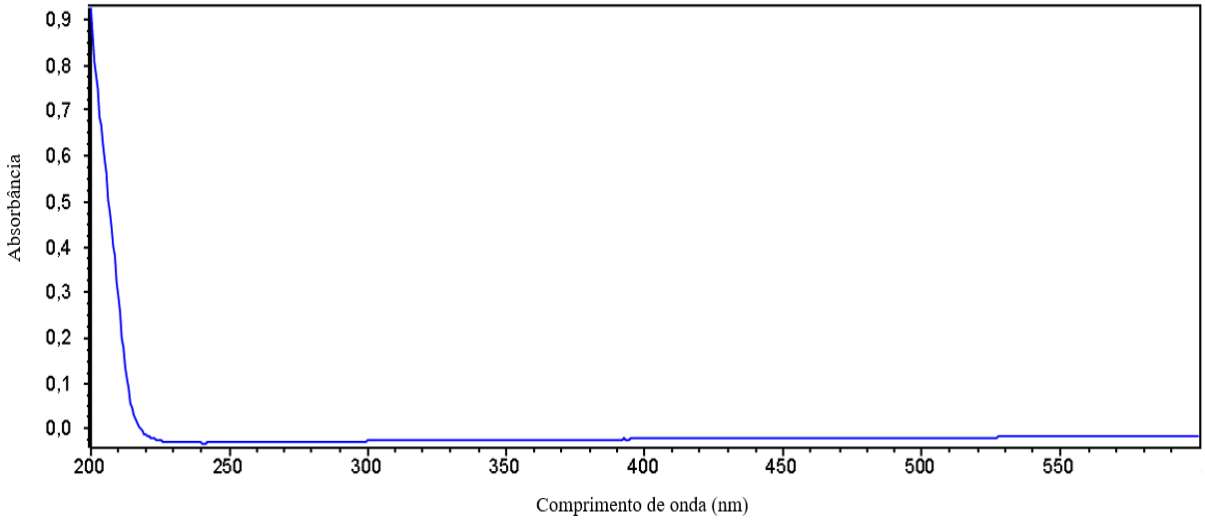


Figura 6- Espectro de varredura do tampão acetato pH 4,5 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.

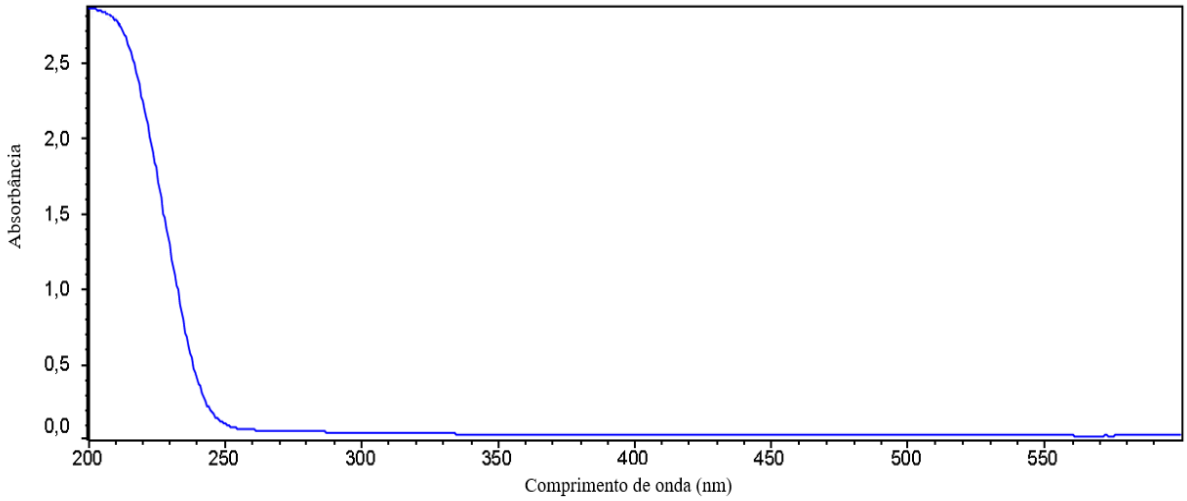


Figura 7- Espectro de varredura da água pH 6,0 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.

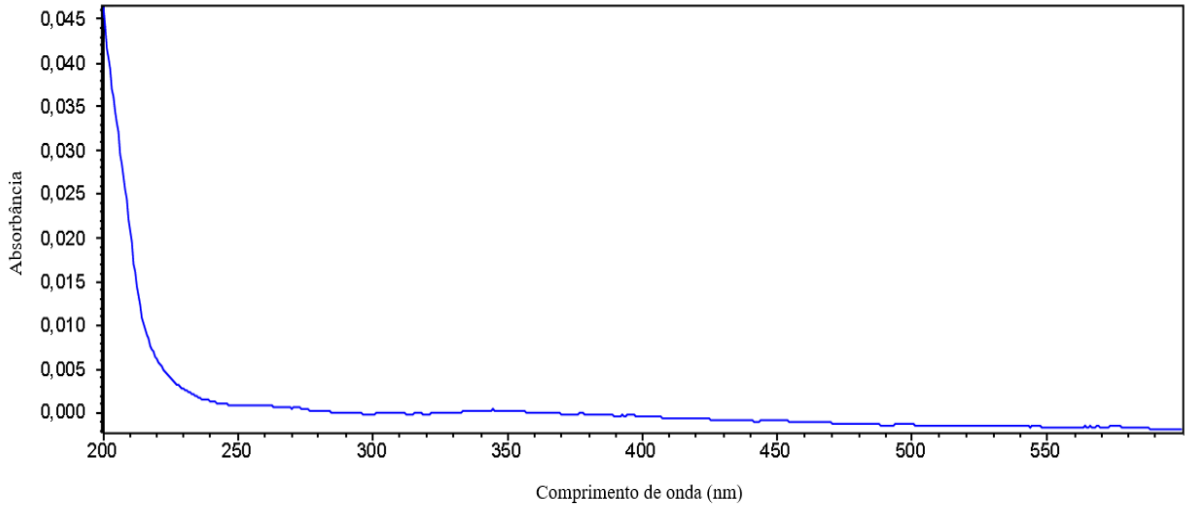


Figura 8- Espectro de varredura do tampão fosfato pH 6,8 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.

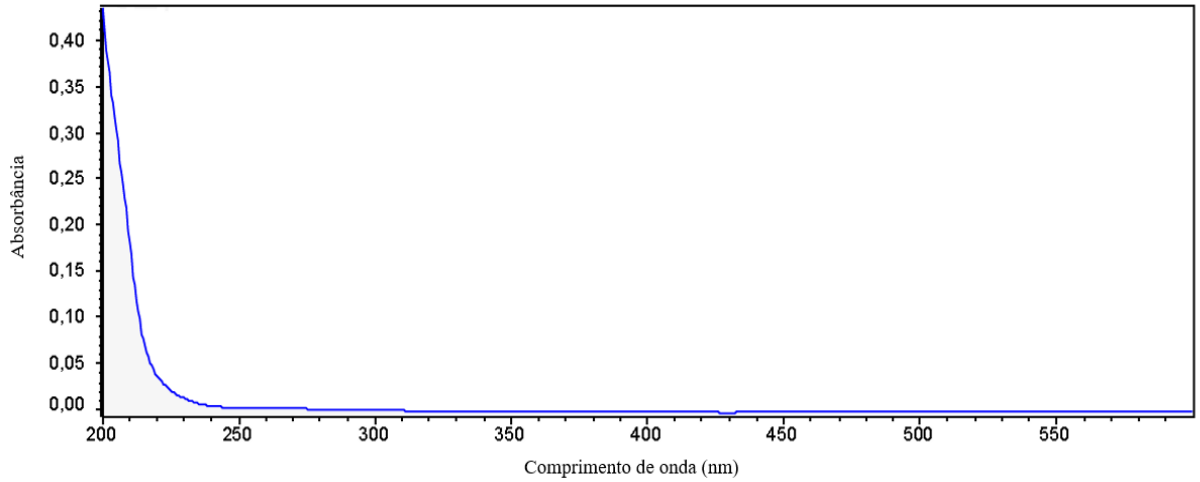
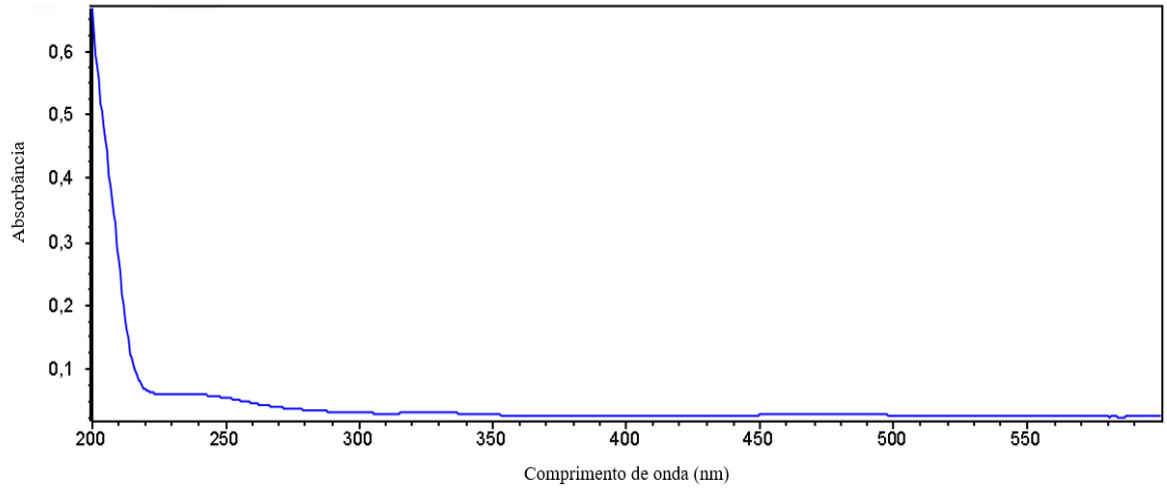


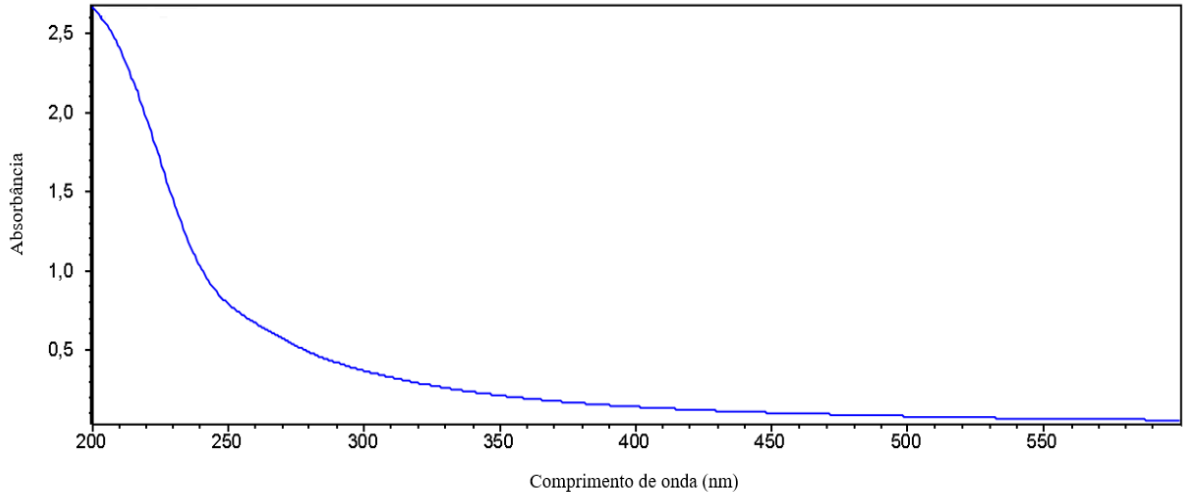
Figura 9- Espectro de varredura do tampão fosfato pH 7,2 para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.



4.2.1.1. Especificidade da rifampicina em presença dos excipientes utilizados nas formulações obtidas por moagem via úmida em escala reduzida

A especificidade da rifampicina na presença dos excipientes usados nas formulações finais foi avaliada utilizando solução dos excipientes (Povacoat™ e manitol) utilizados nas formulações de nanocristais. A finalidade foi determinar possível interferência com o espectro de absorção do fármaco, que é muito importante para quantificação final da rifampicina nas formulações. O resultado demostrou que o método é especifico para o fármaco desde que a mistura não apresenta pico de absorção no comprimento de 472 nm (Figura 10).

Figura 10- Espectro de varredura da mistura de excipientes (Povacoat™ e manitol) para avaliar a especificidade do método analítico da rifampicina.



4.2.2. Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi determinada mediante a construção de gráficos de concentração (µg/mL) versus absorbância, também chamadas de curvas de calibração referente a cada meio utilizado no desenvolvimento do método.

Foram determinadas as curvas analíticas, a equação da reta pela regressão linear usando o método de mínimos quadrados, assim como seu correspondente coeficiente de correlação linear (r^2) (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15).

Assim também foram determinados o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação dos pontos das absorbâncias para cada nível de concentração da curva de linearidade sendo considerado aceitáveis todos aqueles que apresentem um valor abaixo de 5% (Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6) como descrito na norma vigente RE899/2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 2- Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade de rifampicina em tampão HCl pH 1,2.

Concentração (µg/mL)	Absorbância			Media	DP	CV%
	1°rep	2°rep	3°rep			
10	0,129	0,125	0,126	0,127	0,002	0,027
20	0,250	0,263	0,268	0,260	0,009	0,045
30	0,354	0,353	0,370	0,359	0,010	0,031
40	0,466	0,457	0,489	0,471	0,017	0,040
50	0,549	0,544	0,587	0,560	0,024	0,047
60	0,669	0,668	0,680	0,672	0,007	0,011
80	0,859	0,850	0,849	0,853	0,006	0,007
90	0,951	0,935	1,000	0,962	0,034	0,038

DP= Desvio padrão da média (n=3), CV%= Coeficiente de variação (n=3)

Figura 11- Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em tampão HCl pH 1,2.

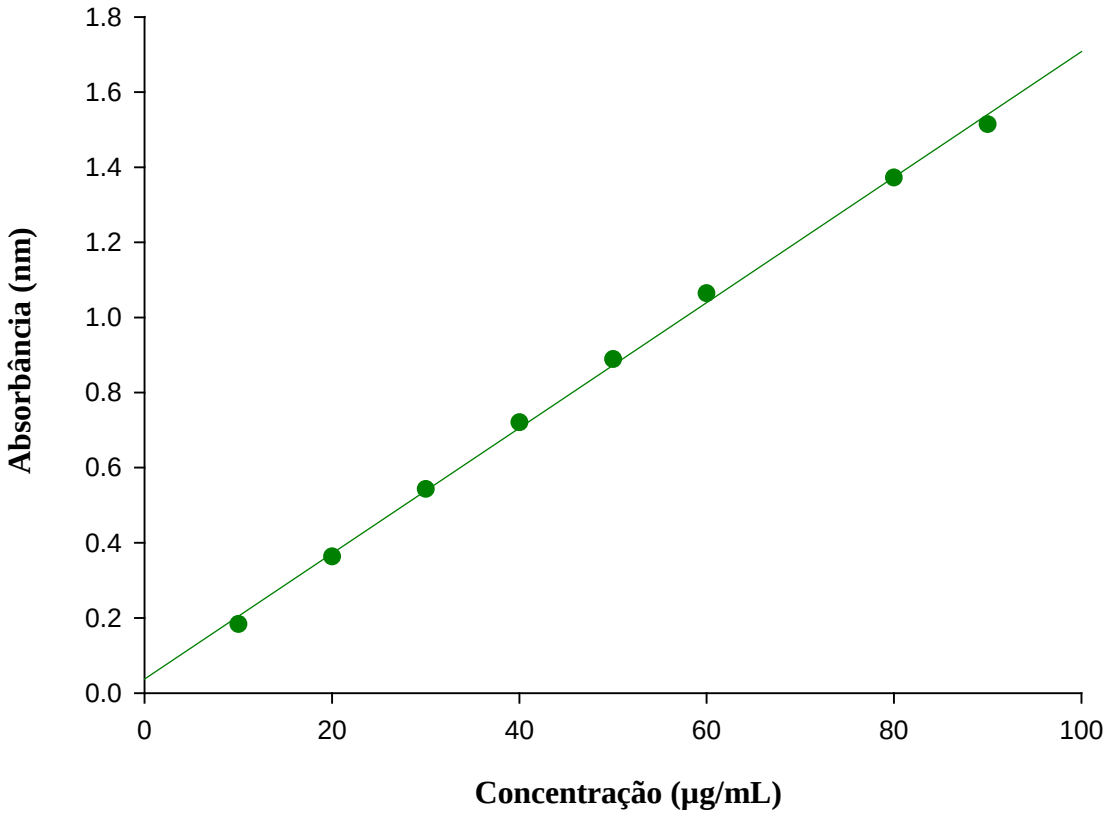


Tabela 3- Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade da rifampicina em tampão acetato pH 4,5.

Concentração (µg/mL)	Absorbância			Media	DP	CV%
	1°rep	2°rep	3°rep			
10	0,186	0,185	0,180	0,184	0,003	0,036
20	0,360	0,374	0,370	0,368	0,007	0,036
30	0,543	0,550	0,536	0,543	0,007	0,023
40	0,713	0,721	0,714	0,716	0,004	0,011
50	0,887	0,894	0,896	0,892	0,005	0,009
60	1,058	1,076	1,080	1,071	0,012	0,019
80	1,380	1,395	1,383	1,386	0,008	0,010
90	1,521	1,539	1,533	1,531	0,009	0,010

DP= Desvio padrão da média (n=3), CV%= Coeficiente de variação (n=3)

Figura 12- Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em tampão acetato pH 4,5.

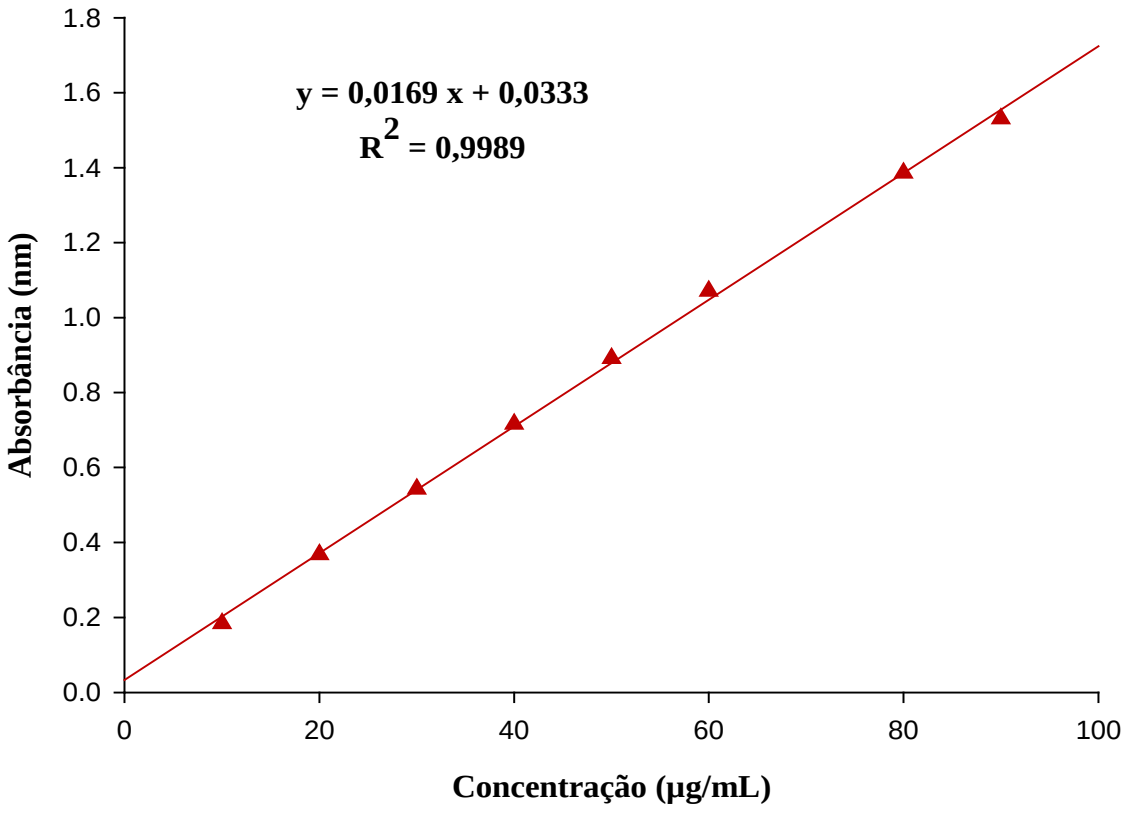


Tabela 4- Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade da rifampicina em água pH 6,0.

Concentração (µg/mL)	Absorbância			Media	DP	CV%
	1°rep	2°rep	3°rep			
10	0,167	0,184	0,179	0,177	0,009	0,100
20	0,348	0,368	0,352	0,356	0,011	0,054
30	0,539	0,532	0,530	0,534	0,005	0,016
40	0,699	0,713	0,701	0,704	0,008	0,019
50	0,887	0,885	0,895	0,889	0,005	0,010
60	1,045	1,062	1,059	1,055	0,009	0,015
80	1,365	1,390	1,352	1,369	0,019	0,024
90	1,468	1,504	1,518	1,497	0,026	0,029

DP= Desvio padrão da média (n=3), CV%= Coeficiente de variação (n=3)

Figura 13- Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em água pH 6,0.

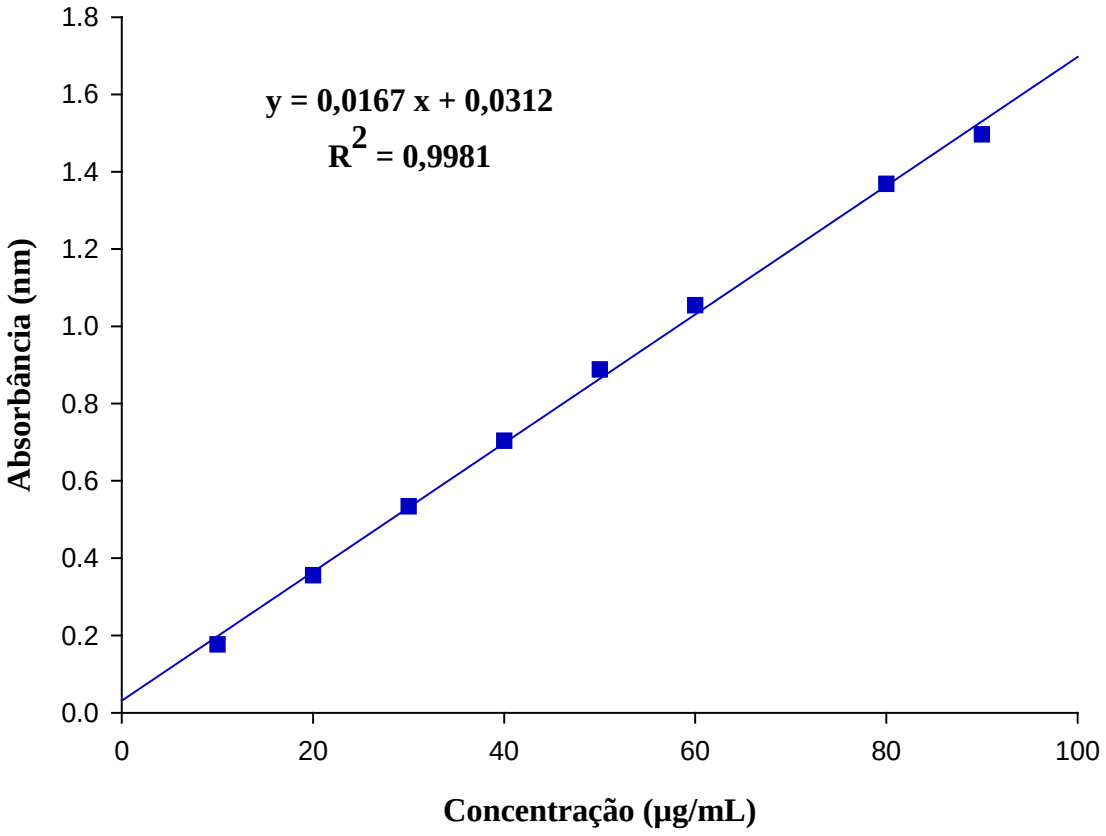


Tabela 5- Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade da rifampicina em tampão fosfato pH 6,8.

Concentração (µg/mL)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1°rep	2°rep	3°rep			
10	0,178	0,175	0,173	0,175	0,003	0,028
20	0,363	0,356	0,352	0,357	0,006	0,028
30	0,531	0,541	0,524	0,532	0,009	0,028
40	0,716	0,721	0,711	0,716	0,005	0,012
50	0,881	0,897	0,894	0,891	0,009	0,017
60	1,060	1,074	1,063	1,066	0,007	0,012
80	1,371	1,384	1,382	1,379	0,007	0,009
90	1,525	1,534	1,545	1,535	0,010	0,011

DP= Desvio padrão da média (n=3), CV%= Coeficiente de variação (n=3)

Figura 14- Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em tampão fosfato pH 6,8.

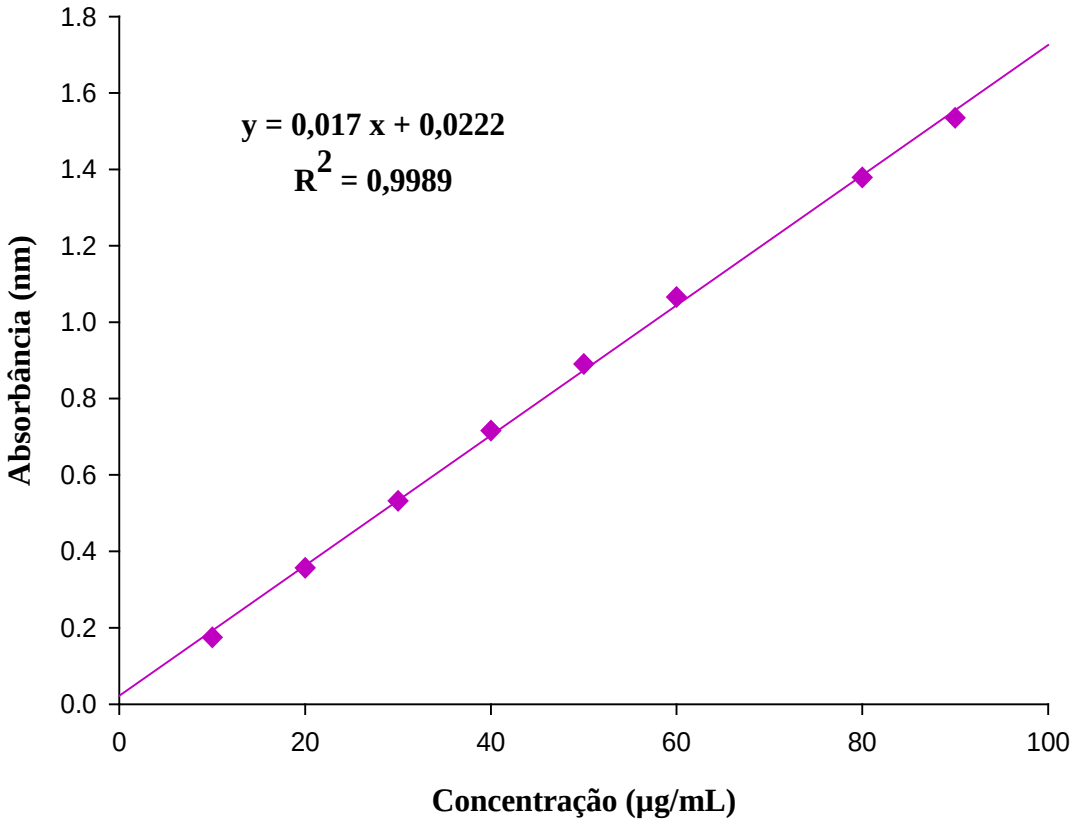
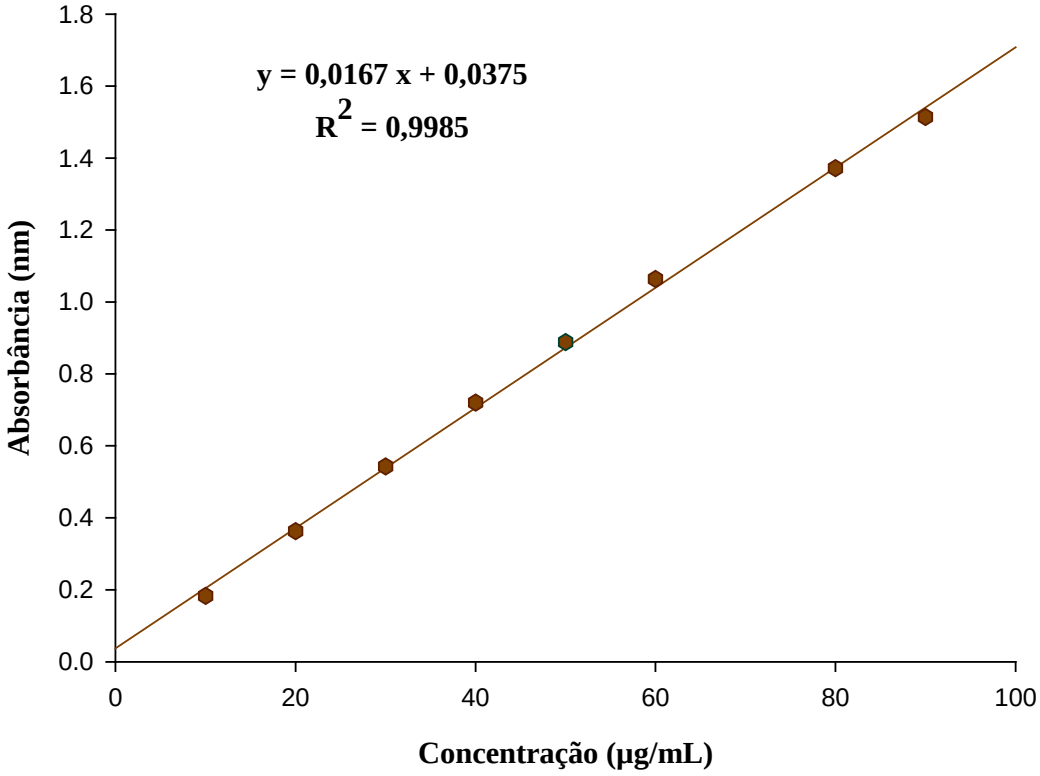


Tabela 6- Valores de absorbância obtidas na curva analítica do método para quantificação e solubilidade da rifampicina em tampão fosfato pH 7,2.

Concentração (µg/mL)	Absorbância			Media	DP	CV%
	1°rep	2°rep	3°rep			
10	0,182	0,187	0,180	0,183	0,004	0,041
20	0,365	0,358	0,365	0,363	0,004	0,021
30	0,548	0,535	0,545	0,543	0,007	0,022
40	0,724	0,719	0,718	0,720	0,003	0,008
50	0,884	0,893	0,889	0,889	0,005	0,009
60	1,069	1,057	1,065	1,064	0,006	0,010
80	1,374	1,378	1,364	1,372	0,007	0,009
90	1,512	1,511	1,520	1,514	0,005	0,006

DP= Desvio padrão da média (n=3), CV%= Coeficiente de variação (n=3)

Figura 15- Curva analítica da rifampicina obtida por espectrofotometria a 472 nm a partir de diluições volumétricas da solução- padrão em tampão fosfato pH 7,2.



4.2.3. Limite de quantificação

Os resultados de limite de quantificação de rifampicina estão apresentados na Tabela 7, estes valores representam a média das determinações das três curvas analíticas usadas na linearidade. Os resultados concluem que o método espectrofotométrico demostrou limites de quantificação satisfatórios em cada meio, uma vez que os valores foram inferiores à menor concentração utilizada na construção da curva de linearidade (10,00 µg/mL).

Tabela 7- Valores médios de limite de quantificação da rifampicina em diferentes meios, referentes a três determinações.

Meios	Rifampicina (µg/mL)
Tampão HCL pH 1,2	3.92
Tampão pH 4,5	1.78
Água pH 6,0	2.39
Tampão fosfato pH 6.8	4.41
Tampão fosfato pH 7.2	1.38

4.2.4. Precisão e exatidão

Os resultados de precisão intra-corrida e inter-corrida, expressos em coeficientes de variação (CV%) e o valor da exatidão em % em relação à concentração conhecida são apresentados nas Tabelas 8, 9, 10, 11 e 12. A precisão inter-corrida foi avaliada em dois dias diferentes e consecutivos.

Para a avaliação da precisão do método foi tomado como referente um valor do coeficiente de variação (CV%) menor a 5%, critério mínimo estabelecido pela RE 899/2003 (Brasil,2003). Os resultados da precisão intra e inter-corrida demostraram que o método espectrofotométrico possui precisão para a quantificação e solubilidade da rifampicina. O maior valor encontrado para coeficiente de variação foi de 2,307% para precisão intra- corrida e 1,449% para precisão inter- corrida ambos no tampão HCl 1,2 (Tabela 8). Pode se observar que os valores obtidos são bem inferiores ao valor de 5% estabelecido pela legislação.

A avaliação da exatidão foi realizada pela verificação dos mesmos três níveis de concentração avaliadas durante a precisão sendo 30, 40 e 50 µg/mL. Observa-se que a exatidão em cada meio variou no intervalo de 91,86 - 106,21% (Tabelas 8, 9, 10, 11 e 12) mostrando, por tanto uma boa exatidão em relação ao valor especificado que é de 100%, lembrando-se que o desvio especificado não deve de exceder 15% (Brasil,2003).

Tabela 8- Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter-corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em tampão HCl 1,2.

Concentração teórica (µg/mL)	Precisão (CV%)		Exatidão intra-corrida (%)	Exatidão inter-corrida (%)
	Intra- corrida	Inter- corrida		
30	1.424	1.413	91.86	92.83
40	2.307	1.201	94.39	97.08
50	1.74	1.449	95.9	98.64

Tabela 9- Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter-corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em tampão acetato 4,5.

Concentração teórica (µg/mL)	Precisão (CV%)		Exatidão intra-corrida (%)	Exatidão inter-corrida (%)
	Intra- corrida	Inter- corrida		
30	1.512	0.5	99.24	98.77
40	0.648	0.984	100.89	100.25
50	0.298	0.376	101.64	100.92

Tabela 10- Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter-corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em água pH 6,0.

Concentração teórica (µg/mL)	Precisão (CV%)		Exatidão intra-corrida (%)	Exatidão inter-corrida (%)
	Intra- corrida	Inter- corrida		
30	1.885	1.272	104.42	103.33
40	0.735	0.813	105.72	105.35
50	0.552	0.982	106.14	106.2

Tabela 11- Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter- corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em tampão fosfato 6,8.

Concentração teórica (µg/mL)	Precisão (CV%)		Exatidão intra-corrida (%)	Exatidão inter-corrida (%)
	Intra- corrida	Inter- corrida		
30	1.020	0.851	98.39	103.10
40	0.574	0.458	99.38	100.13
50	0.495	0.588	100.21	104.32

Tabela 12- Precisão intra e inter-corrida e exatidão intra e inter-corrida do método analítico para a determinação da rifampicina em tampão fosfato 7,2.

Concentração teórica (µg/mL)	Precisão (CV%)		Exatidão intra-corrida (%)	Exatidão inter-corrida (%)
	Intra- corrida	Inter- corrida		
30	0.855	0.768	101.3	95.9
40	0.46	0.48	102.77	96.93
50	0.297	0.478	103.17	97.78

4.2.5. Robustez

A avaliação da robustez foi determinada pela variação dos seguintes fatores: fornecedores de metanol e analistas. A absorbância média e o desvio padrão obtidas para a análise do coeficiente de variação (%CV) estão apresentados na Tabela 13. Com relação à variação do fornecedor do metanol e aos analistas, esses não afetaram significativamente a absorbância da rifampicina. Observa-se que os resultados experimentais do coeficiente de variação foram menores que 5%, conforme exigência regulatória Resolução ANVISA 899/2003 (Brasil, 2003) demostrando que o método é robusto.

Tabela 13- Resultados do estudo de robustez do método analítico para quantificação de rifampicina em água pH 6,0.

Analista	Metanol-1	Metanol-2	Metanol-3	DP ind	DP	AMD	%CV
1	0,775	0,744	0,74	0,019	0,020	0,753	2,544
2	0,736	0,714	0,732	0,012		0,727	1,611

Metanol-1: J.T.Baker®, Metanol-2: SeccoSolv® Metanol-MERCK e Metanol-3: Metanol Panreac.

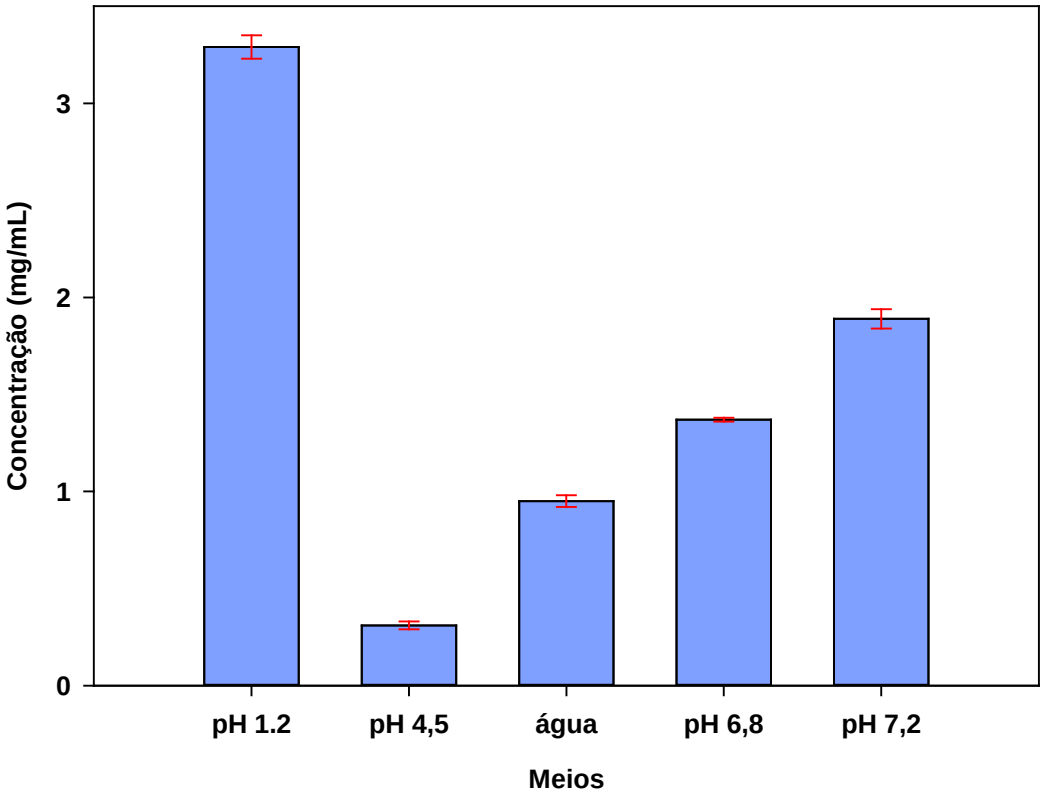
4.3. Determinação da solubilidade de saturação da rifampicina matéria-prima

O resultado referente à solubilidade da rifampicina foi similar àquele encontrado na literatura (BECKER,2009). A rifampicina apresentou ligeira solubilidade em água e solubilidade variável de acordo com o pH. Devido a sua natureza anfótera observou-se que em meio ácido, tampão HCl 1,2, a solubilidade foi de 3,29 ± 0,06 mg/mL e em tampão fosfato 7,2, a solubilidade foi de 1,89 ± 0,05 mg/mL. A Tabela 14 e a Figura 16 apresentam os resultados do estudo de solubilidade de rifampicina nos diferentes meios. Os resultados obtidos demonstram a baixa solubilidade da rifampicina em água e sua classificação como fármaco classe II segundo o sistema e classificação farmacêutica (BECKER,2009).

Tabela 14- Solubilidade da rifampicina em diferentes meios a 37,0°C. n=3

Meios/pH	Solubilidade (mg/mL)	Dose: solubilidade (mL)	pH ao final do experimento
Tampão HCl pH 1,2	3,29 ± 0.06	91,19	1,29
Tampão acetato pH 4,5	0.31 ± 0.02	967,74	4.46
Água pH 6.0	0.95 ± 0.03	315,79	5.86
Tampão fosfato pH 6.8	1.37 ± 0.01	218,98	6.77
Tampão fosfato pH 7.2	1.89 ± 0.05	158,73	7.14

Figura 16- Solubilidade da rifampicina nos diferentes meios.



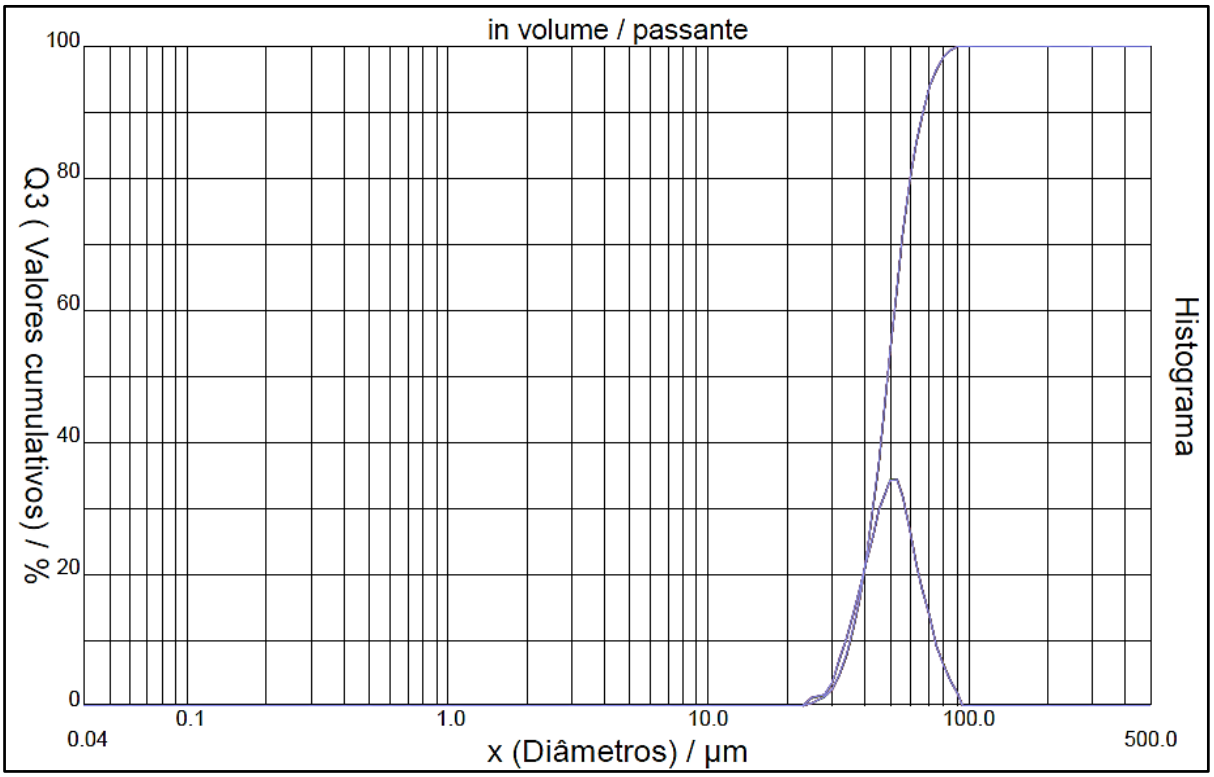
4.4. Distribuição do tamanho das partículas de rifampicina matéria-prima empregando difração de raios laser (DL)

A Tabela 15 e a Figura 17 apresentam a distribuição granulométrica da rifampicina matéria-prima. A avaliação do tamanho foi realizada pelo método úmido por difração a laser (DL). A obscuração foi atingida com um valor maior que 10%.

Tabela 15- Valores de diâmetro médio, a 10%, 50% e 90% da rifampicina matéria-prima n=10.

Amostra	d10% (µm)	d50% (µm)	d90% (µm)	Diâmetro médio (µm)
Rifampicina	35,17 ± 0,04	48,86 ± 0,03	66,77± 0,04	50,08 ± 0,03

Figura 17- Distribuição granulométrica da rifampicina matéria-prima. n=10.



O método de difração de raios laser (DL) é capaz de determinar o tamanho das partículas que possuem forma esférica. No entanto, esse método é utilizado comumente para determinar o tamanho de cristais com diferentes formas.

O desenvolvimento do método para partículas tais como a rifampicina pode ser difícil e complexo devido a morfologia de agulha característica dos compostos cristalinos. A principal desvantagem consiste na leitura dos cristais assumindo diferentes orientações. Tal possibilidade pode gerar superestimação do tamanho como consequência da grande projeção do diâmetro.

Fator adicional a considerar é a concentração das partículas (obscuração), na amostra analisada. Esse parâmetro deve ser mantido durante a leitura uma vez que sua redução indica solubilização das partículas ou sua precipitação no recipiente. No

entanto é permitida pequena variação dentro do intervalo de 0,1-0,3 (HERNANDEZ, 2007). Uma alta concentração de partículas (alta obscuração) pode gera dispersão excessiva da luz, com consequente superavaliação das partículas tanto pequenas como maiores.

Para fármacos que são solúveis ou levemente solúveis em água como a rifampicina, outro ponto crítico da metodologia consiste na escolha do meio dispersante utilizado. Normalmente é utilizada a água (HERNANDEZ, 2007). Porém, devido à solubilidade da amostra se sugere o uso de outro meio dispersante, para superar esta dificuldade. No presente trabalho utilizou- se como meio dispersante a água saturada com o fármaco, evitando assim a dissolução das partículas durante o preparo e a avaliação do tamanho efetuada no equipamento de difração de raios laser (KECK, 2010).

Os resultados do tamanho médio da rifampicina matéria-prima (Tabela 15) foi 50,08 ± 0,03 µm, 10% (d10%) das partículas apresentaram valores abaixo dos 35,17 ± 0,04 µm. Observa-se, também que 90% (d90%) das partículas apresentam tamanhos inferiores a 66,77± 0,04 µm, valores que posteriormente foram confirmados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET).

Portanto os valores dos diâmetros d10%, d50% e d90% confirmam que a rifampicina matéria-prima se encontra na forma micronizada (STEELE,2001).

4.5. Análise morfológica e avaliação do tamanho dos cristais de rifampicina matéria-prima empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)

As análises por MEV e MET permitiram observar a morfologia e o tamanho das partículas de rifampicina matéria-prima. Na Figura 18A, observa-se a estrutura cristalina e a morfologia típica de agulha dos cristais. A Figura 18B representa a imagem gerada pelo programa Imagen.j, que permite a contagem das partículas determinando o seu tamanho médio. O valor obtido foi de 71,04 ± 10,14 µm; este valor é indicativo do tamanho, já que não representa o total das partículas na amostra.

A Figura 19 gerada pela MET permite observar a característica típica da rifampicina em formar agregados. Observa-se que partícula de tamanho 6,01 µm é constituída por partículas pequenas do mesmo fármaco. Essa característica foi a maior dificuldade a ser superada, representando verdadeiro desafio durante o

desenvolvimento dos nanocristais de rifampicina e que será apresentada no capítulo seguinte.

Figura 18. A- Fotografia MEV (um) da rifampicina matéria-prima e **B:** Fotografia MEV (um) gerada pelo Imagen.j para determinação do tamanho médio da rifampicina matéria-prima.

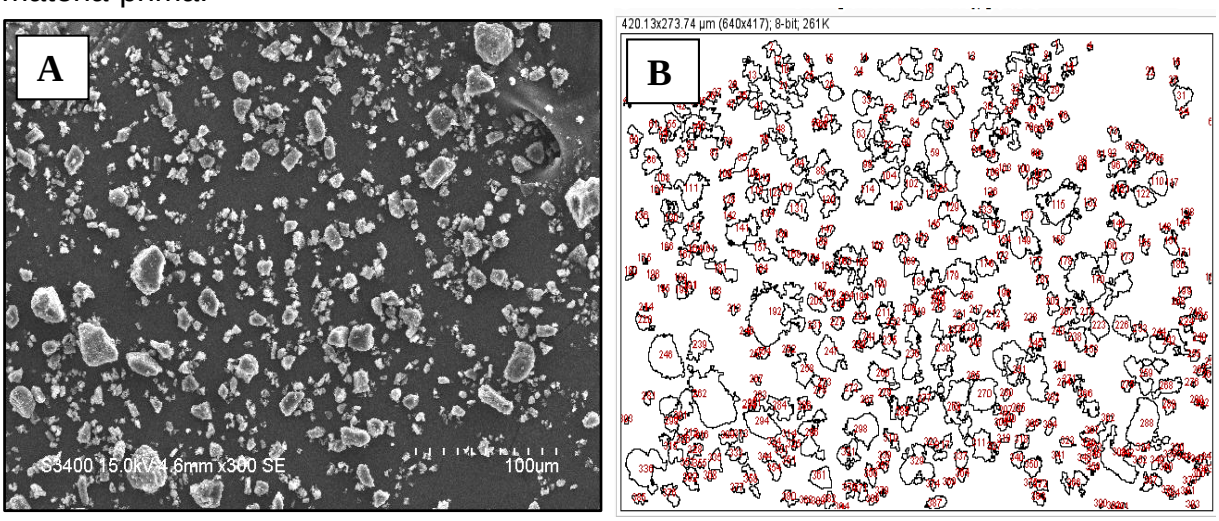
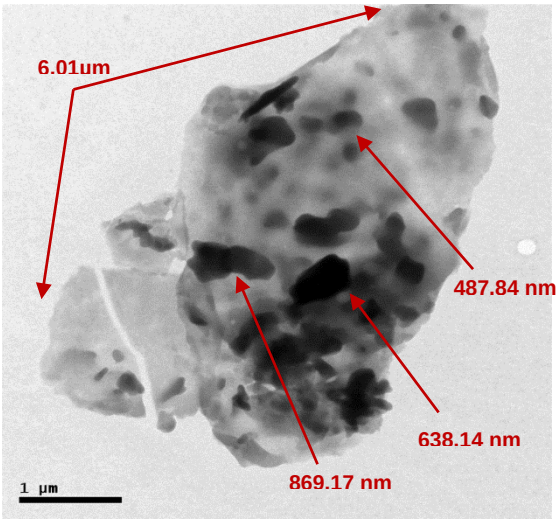


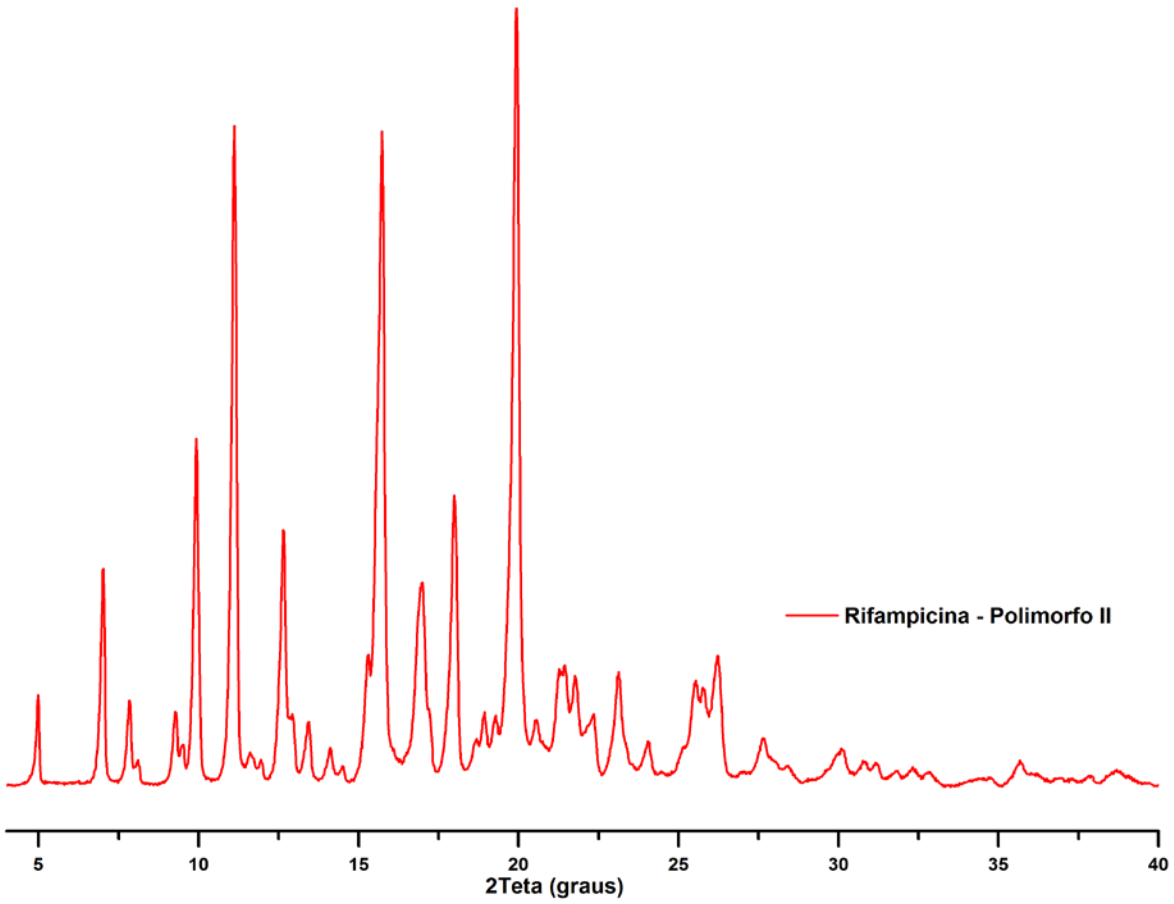
Figura 19- Fotografia MET (um) das partículas de rifampicina matéria-prima. Ampliação 25000x.



4.6. Difração de raios X da rifampicina matéria-prima (DRX)

Cada composto apresenta um difratograma de raios X único, sendo que os ângulos de difração característicos e as intensidades dos picos são resultados diretos da diferente estrutura cristalina dos compostos. A Figura 20 apresenta o difratograma de raios X do polimorfo II da rifampicina que é similar ao determinado por Alves (2007).

Figura 20- Difratograma de raios X (método do pó) do polimorfo II da rifampicina.



4.7. Comportamento térmico da rifampicina

As curvas de DSC e TG/DTG da rifampicina matéria-prima estão ilustradas nas Figuras 21 e 22 respectivamente. Estas permitem observar que o fármaco cristalino é termicamente estável até aproximadamente 196ºC.

A decomposição térmica da rifampicina ocorre em três eventos, os quais são observados na curva de DSC e que estão de acordo com as perdas de massa indicadas nas curvas de TG/DTG. A curva DSC mostra um evento térmico entre 25 e 100ºC, que corresponde a desidratação da amostra (ALVES, 2007). Em seguida, ocorre uma endoterma em 192,3ºC (Tpico), evento típico do processo de fusão. A primeira exoterma ocorre em 200,0°C e representa a recristalização do fármaco (AGRAWAL et al., 2004). A decomposição térmica inicia-se com o calor liberado pela recristalização que conduz a formação do polimorfo I e continua termicamente como o observado na curva de DSC na temperatura de 248,9°C (Tpico).

Essas características, em conjunto, descrevem o comportamento térmico da forma polimórfica II da rifampicina, determinando-se que é este o polimorfo com que vamos trabalhar nos seguintes ensaios.

Figura 21- Curvas DSC da amostra de rifampicina (polimorfo II) obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

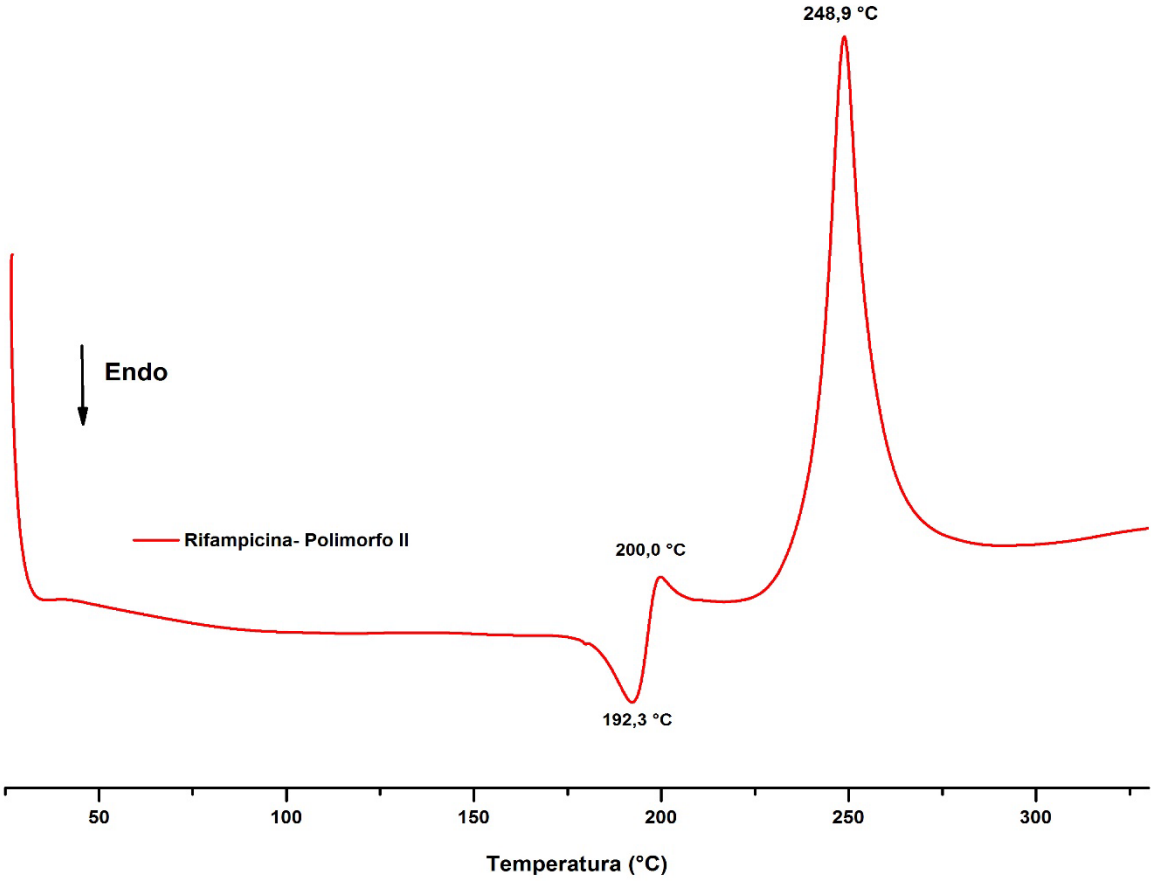
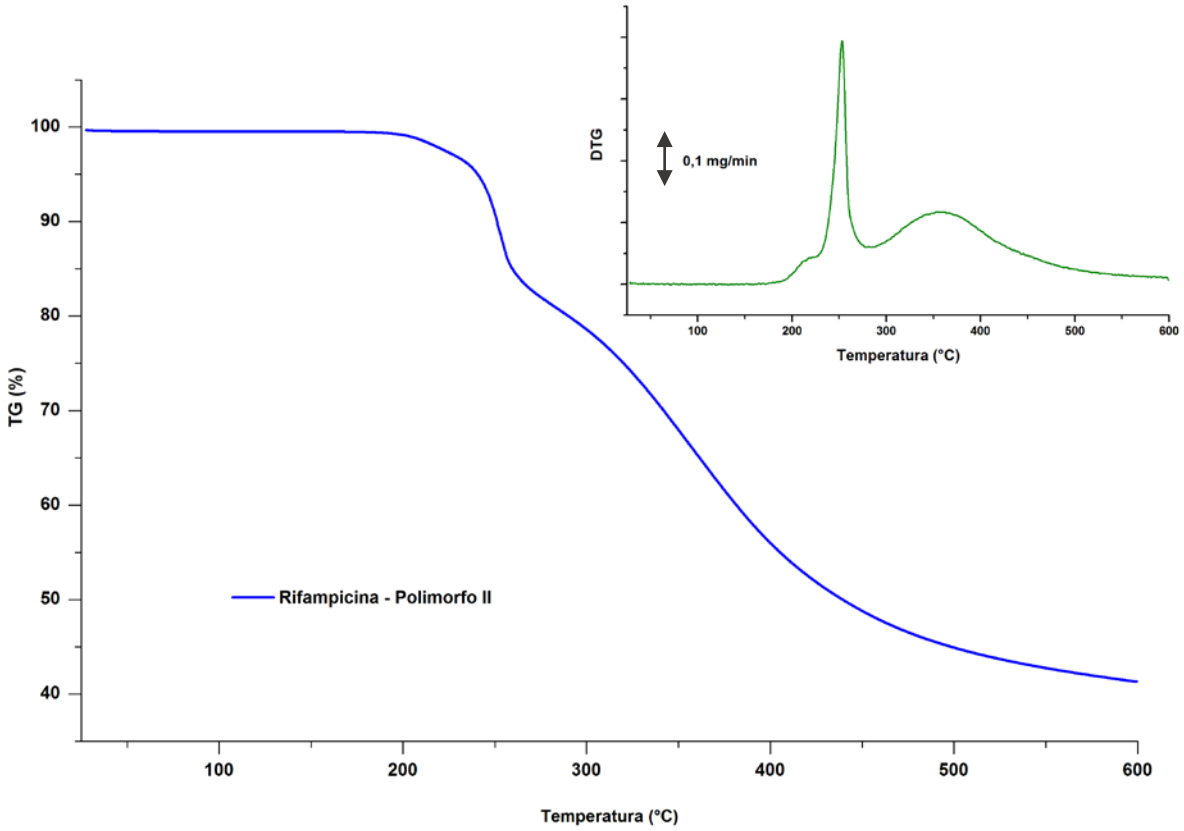


Figura 22- Curvas TG/DTG da amostra de rifampicina (polimorfo II) obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}.



Capitulo II

Obtenção e caracterização físico-química dos nanocristais de rifampicina

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de novos fármacos tem revelado entidades químicas de elevado peso molecular, alta lipofilicidade e reduzida solubilidade aquosa. Essas características constituem verdadeiro desafio para os formuladores (DOLENC et al., 2009), que necessitam garantir a dissolução e a absorção adequada do fármaco para seu posterior efeito terapêutico.

Diferentes abordagens tecnológicas e/ou farmacotécnicas podem ser empregadas para melhorar a solubilidade dos fármacos na fase aquosa. Na última década, as pesquisas relativas às estratégias de liberação modificada dos fármacos migraram da escala micrométrica para a nanométrica (a nanotecnologia) (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008; PATHAK; THASSU, 2009). A tecnologia para a redução do tamanho de partículas consiste de abordagem promissora. Nesse sentido, na última década, as tecnologias para a obtenção de nanocristais têm se destacado. Os nanocristais podem apresentar alterações significativas em suas propriedades físico-químicas, atribuídas a sua dimensão nanométrica. Tais alterações referem-se à maior absorção e biodisponibilidade dos fármacos.

A rifampicina é utilizada no tratamento da tuberculose, doença negligenciada (DN) segundo Ministério de Saúde (BRASIL, 2010). Essas doenças são aquelas em que não há investimentos significativos em tecnologias para seu diagnóstico e/ou tratamento. Esse desinteresse fundamenta-se no reduzido retorno financeiro desses investimentos que tem como alvos pacientes de baixa renda. Assim, a pesquisa de novas entidades químicas e a pesquisa e desenvolvimento de formas farmacêuticas inovadoras devem ser induzidas por políticas públicas. No Brasil, a partir de 2014, o Sistema Único de Saúde oferece teste de diagnóstico rápido para a tuberculose.

O presente trabalho tem como objetivo a preparação de nanocristais de rifampicina, fármaco descoberto em 1965 utilizado como primeira escolha no tratamento da TB, doença ainda prevalente a nível global. O uso das nanotecnologias tem potencial para elevar a eficácia terapêutica e a segurança de medicamentos contendo rifampicina. Além disso, a elevada resistência bacteriana, causado pelo tratamento inadequado e a hepatotoxicidade podem ser reduzidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fármacos pouco solúveis em água: desafios e oportunidades

O efeito terapêutico está relacionado a adequada absorção e biodisponibilidade do fármaco no organismo. Em geral, a síntese de novas entidades farmacêuticas resulta em fármacos com elevado peso molecular, alta lipofilicidade e baixa solubilidade aquosa (STEGEMANN et al., 2007).

Estima-se que 60% dos novos fármacos sintetizados apresentam baixa solubilidade em água (HEMWOOD,2000). Além disso, 70% dos fármacos já existentes e que são administrados oralmente apresenta alta lipofilicidade (KU, 2008; MERISKO-LIVERSIDGE; LIVERSIDGE, 2008).

De acordo com Müller e colaboradores (2011), os principais problemas biofarmacêuticos (reduzida biodisponibilidade após administração oral; baixa biodisponibilidade dérmica; grandes volumes para administração intravenosa) e efeitos indesejáveis após aplicação via parenteral associados à liberação dos fármacos podem ser solucionados pela obtenção de seus nanocristais (GAO; ZHANG; CHEN, 2008; SHEGOKAR; MÜLLER, 2010; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004; RABINOW, 2004; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011).

Os principais problemas durante a administração oral dos fármacos classe II e IV são apresentados na Tabela 16 (SHEGOKAR; MÜLLER, 2010).

Tabela 16- Problemas relacionados com o desempenho de fármacos pouco solúveis em água na administração oral.

PROBLEMAS NA ADMINISTRAÇÃO ORAL
Baixa e variável biodisponibilidade.
Variação pela administração com alimentos ou jejum.
Início retardado da ação.
Falta de proporcionalidade da dose.
Variação entre pacientes.
Falta de adesão de adesão do paciente ao tratamento

A redução do tamanho de partículas da escala micrométrica para nanométrica pode resultar em propriedades inovadoras do material que são exclusivamente

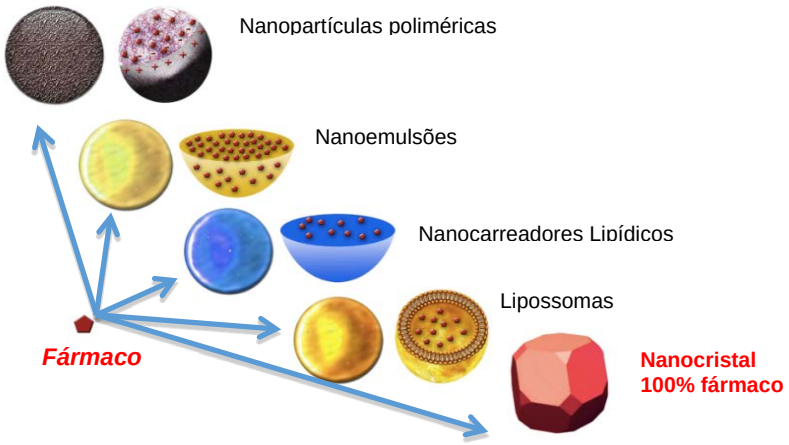
decorrentes dessa redução. Os nanocristais apresentam alterações significativas em suas propriedades físico-químicas tais como aumento da solubilidade de saturação, aumento da velocidade de dissolução e aumento da adesividade nas superfícies das membranas celulares quando comparados aos fármacos micronizados (MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001; RABINOW, 2005). Essas características permitem melhor absorção e biodisponibilidade dos fármacos.

2.2. Nanocristais: considerações gerais

Os nanocristais são definidos como partículas com tamanho médio na faixa sub-microns, possuem núcleo sólido cuja estrutura pode ter caráter amorfo ou cristalino. Essas partículas são estabilizadas em veículo aquoso por meio da adição de tensoativos, polímeros ou mistura de ambos. A formulação final é denominada de nanosuspensão. Esse sistema bifásico constitui dispersões coloidais de nanocristais revestidos pelos agentes estabilizantes presentes no veículo e cuja função é garantir a estabilidade do sistema (MAULUDIN; MÜLLER; KECK, 2009). Em geral essas partículas apresentam tamanho menor que 1 µm, tipicamente entre 200 a 500 nm (KECK; MÜLLER, 2006; RABINOW,2004).

Quando comparados aos sistemas matriciais nanoestruturados (Figura 23), apresentam como vantagens: maior facilidade de obtenção e não necessitam de avaliações dos sistemas matriciais (avaliação da eficiência de formação das matrizes, determinação da eficiência de encapsulação, estudos de cinética de liberação do fármaco e estudos de estabilidade do fármaco no interior da matriz (MÜLLER; PETERS, 1998; DURÁN et al., 2010; GAO et al., 2013).

Figura 23- Diferentes nanoestruturas empregadas como sistemas de liberação de fármaco.



As nanosuspensões oferecem a possibilidade de incorporar concentração elevada do fármaco em volume reduzido do meio dispersante, vantagem importante na administração de antimicrobianos como a rifampicina. Dependendo das características do fármaco pode-se produzir nanosuspensões com concentrações na faixa de 50-100 mg/mL. Como vantagem as nanosuspensões permitem a redução do tempo de tratamento e o aumento da adesão do paciente (HERNANDEZ, 2007).

A melhora da dissolução do fármaco quando na escala nanométrica ocorre devido ao aumento da área superficial da partícula e ao aumento da solubilidade de saturação (DURÁN et al., 2010; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004). Essa melhora na dissolução garante o aumento da absorção gastrointestinal e da biodisponibilidade provocando ação rápida do fármaco (SHEGOKAR; MÜLLER, 2010; GAO et al., 2012, GAO et al., 2013).

Os parâmetros farmacocinéticos melhorados em função das mudanças nas características físico-químicas dos fármacos após a nanonização são: aumento da concentração máxima (Cmax), redução do tempo para alcançar a Cmax e redução na variabilidade de absorção nos estados de jejum e alimentado.

Portanto, o fármaco nanonizado permite melhor biodisponibilidade oral e a redução da variabilidade no efeito terapêutico no estado jejum e estado alimentado (SHEGOKAR; MÜLLER, 2010) (LÖBENBERG et al.,2013).

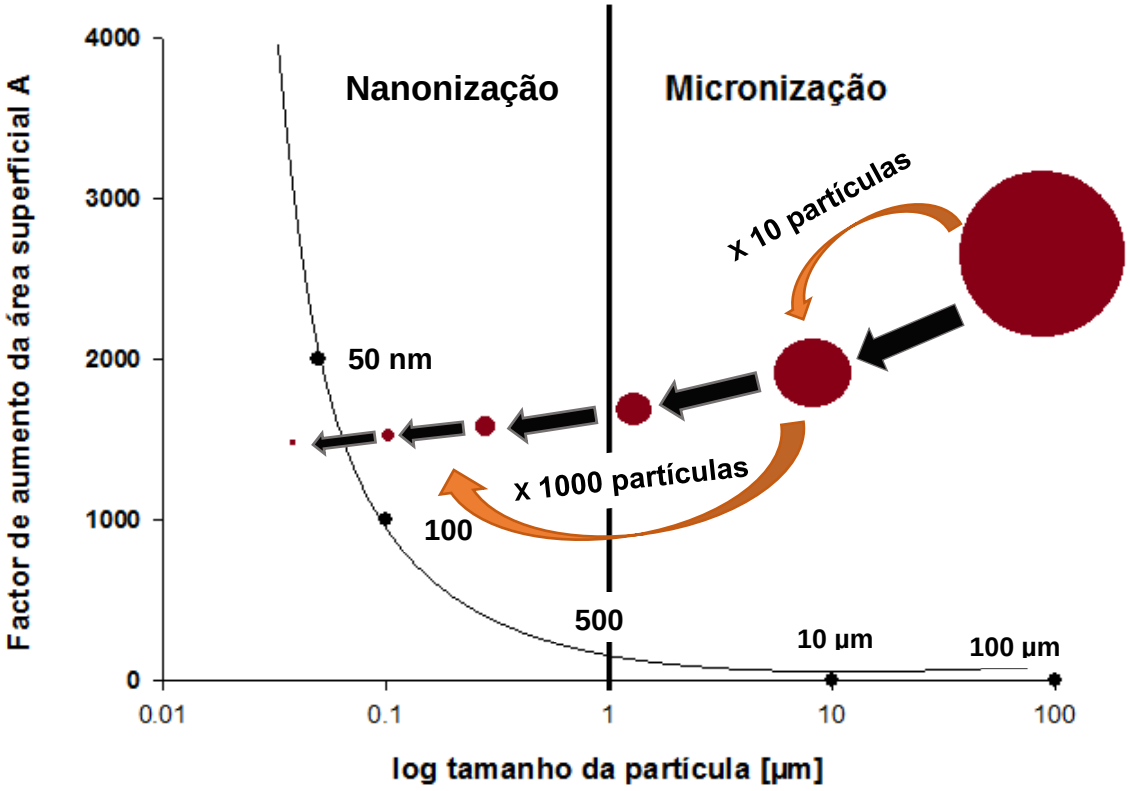
Conforme mencionando anteriormente, a obtenção de nanocristais constitui abordagem promissora no desenvolvimento de formas farmacêuticas inovadoras para fármacos pouco solúveis (RABINOW, 2004). As potenciais características inovadoras são: melhora dos parâmetros farmacocinéticos, a relação custo-benefício adequada na preparação e facilidade para escalonamento a nível industrial.

2.3. Propriedades dos nanocristais

2.3.1. Aumento da velocidade de dissolução por aumento da área superficial e aumento da solubilidade de saturação

A redução do tamanho das partículas do fármaco conduz ao aumento da área superficial e, portanto, o aumento da velocidade de dissolução, de acordo com a equação Noyes e Whitney (Equação 3) (1978). Consequentemente, a área superficial total das partículas é incrementada quando uma partícula grande é dividida em diversas nanopartículas (Figura 24).

Figura 24- Aumento da área superficial e o número de cristais pela diminuição do tamanho da partícula (Adaptado LIU,2013).



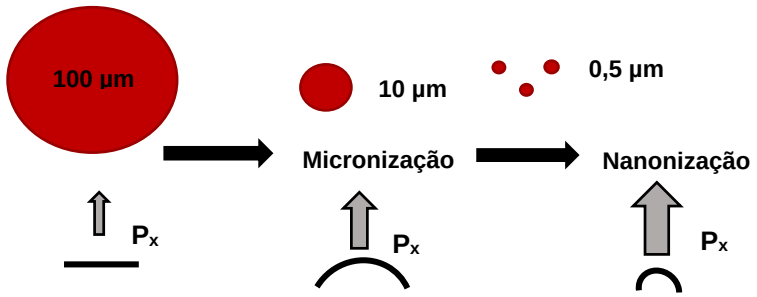
A solubilidade de saturação (C_s) consiste de característica que depende de cada composto, do meio de dissolução e da temperatura. Essa definição é válida para fármacos com tamanho micrométrico ou maior. No entanto, essa velocidade de saturação para partículas entre 1 e 2 µm, se converte em fator dependente do tamanho. Como decorrência, a solubilidade de saturação aumenta com a diminuição do tamanho das partículas, fundamentando dessa forma, a maior solubilidade dos fármacos em escala nanométrica (Figura 25 A).

Segundo a equação de Noyes e Whitney (Equação3) (1987) o aumento da área superficial da partícula (redução do tamanho) aumenta a sua velocidade de dissolução. A distância de difusão (h) ao redor das partículas diminui com a redução do tamanho, formando elevado gradiente de concentração em torno das partículas mais pequenas (Cs-Cx)/h (sendo que Cs é solubilidade de saturação, Cx concentração em massa). Como consequência destes fenômenos é possível explicar o aumento da velocidade de dissolução dos nanocristais. A equação antes mencionada indica que dc/dt é proporcional ao gradiente de concentração (Cs-Cx)/h, sendo que Cs é a solubilidade de saturação, Cx a concentração do fármaco nos líquidos intersticiais e h a distância de difusão.

Dessa forma o aumento da solubilidade de saturação permite que o gradiente de concentração entre o lúmen do intestino e o sangue seja elevada resultando em aumento da absorção do fármaco pela difusão passiva (Figura 25 B).

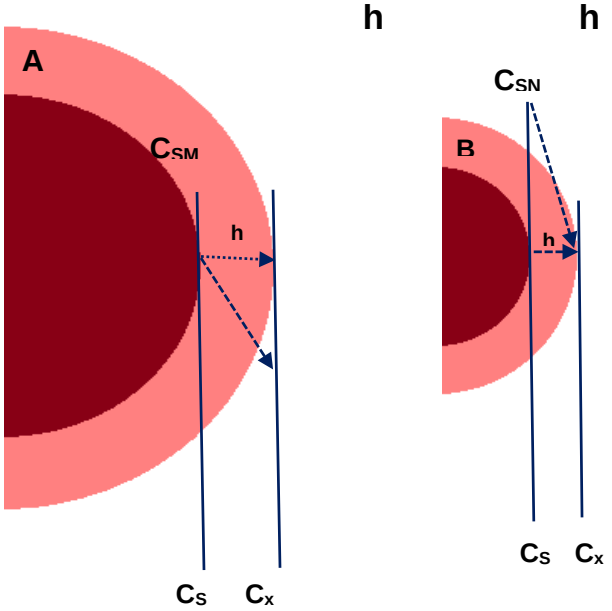
Figura. 25- A: Aumento da solubilidade de saturação (Cs) e aumento da pressão de dissolução de uma superfície plana, uma micropartícula e uma nanopartícula. P_x: pressão de dissolução**. B.** Diminuição da camada de difusão (h) e aumento do gradiente de concentração C_S - C_x/h, todo em conjunto aumenta a velocidade de dissolução dc/dt do fármaco (Adaptado Liu,2013)

A. Aumento da solubilidade de saturação



B. Diminuição da camada de difusão (h), aumento do gradiente de concentração C_S - C_x/h

$$\frac{C_{SM} - C_x}{h} << \frac{C_{SN} - C_x}{h}$$



Equação de Noyes – Whitney

$$\frac{d_c}{d_t} = A.D.\left[\frac{C_S - C_x}{h}\right] \quad (3)$$

A ----- Área superficial
D ----- Coeficiente de difusão
Cs ---- Solubilidade de saturação
Cx ---- Concentração em massa
H ------ Distância de difusão
dc/dt - Velocidade de dissolução

A equação de Ostwald-Freundlich revela o aumento da solubilidade em função do aumento da pressão de dissolução. A pressão de vapor de uma gotícula em um líquido se altera com o aumento da área superficial (diminuição do tamanho). A medida que o raio da gotícula diminui, a sua área superficial aumenta elevando-se a pressão de vapor. A equação de Ostwald-Freundlich baseia-se na transferência de moléculas a partir de gotículas para a fase gasosa, semelhante ao processo de transferência da fase sólida (nanocristais) para a fase líquida (meio de dissolução) (JUNGHANNS, MÜLLER,2008).

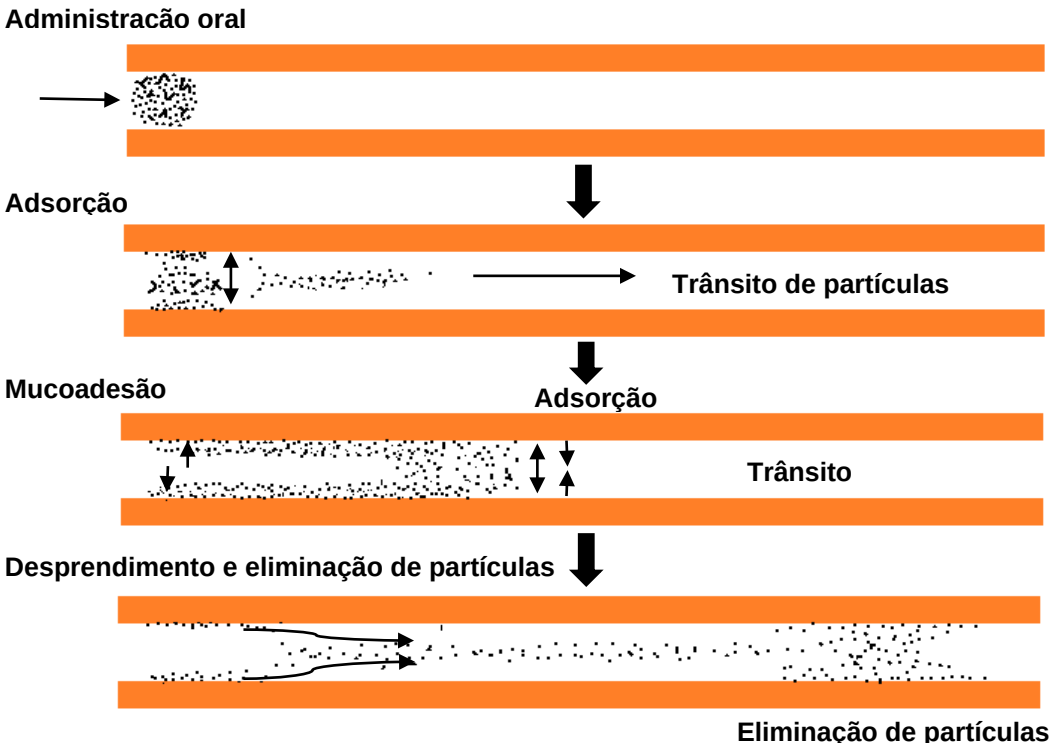
A velocidade de dissolução e a solubilidade de saturação dos fármacos classe II são fatores determinantes na sua biodisponibilidade. Os problemas destes fármacos poderiam ser solucionados com o emprego da nanotecnologia, com a obtenção de nanocristais.

2.3.2. Aumento da adesividade em membranas biológicas

Os fármacos administrados oralmente tanto na escala micrométrica quanto na nanométrica, são submetidos três fenômenos no trato gastrointestinal: adsorção das

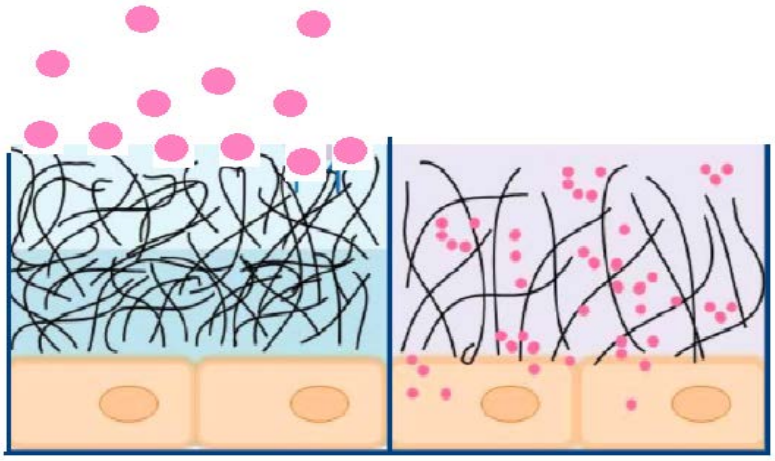
partículas pelo tecido linfoide associado à mucosa no intestino, mucoadesão e, finalmente, a eliminação após o trânsito luminal (PONCHEL et al.,1997) (Figura 26).

Figura 26- Comportamento mucoadesivo dos nanocristais, após administração oral.



Para os nanocristais e as nanopartículas, em geral, a camada mucosa do trato gastrointestinal consiste de estrutura porosa que pode ser penetrada rápida e profundamente. Entretanto, essa camada assemelha-se mais a superfície lisa para as partículas em escala micrométrica devido ao grande tamanho dessas partículas as quais não conseguem penetrar nessa camada (Figura 27).

Figura 27- Adsorção de partículas > 1 µm (A) e para nanocristais ou partículas < 1 µm (B).

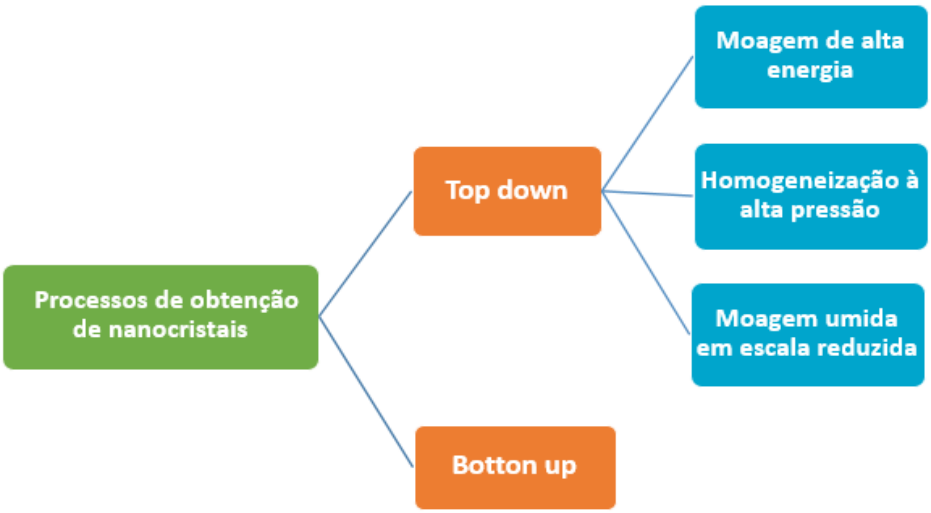


Lampert e colaboradores (2001) demostraram a dependência do tamanho da partícula na adsorção após a administração oral. Durer e colaboradores (1994) quantificaram a adsorção de estireno em ratas. Os autores demostraram que o incremento da adesividade das nanopartículas permite maior tempo de contato e retenção dessas no trato gastrointestinal (DURRER et al., 1994). Esses resultados indicaram a possibilidade da administração de fármacos com maiores intervalos de tempo permitindo a redução de efeitos colaterais tal como a hepatotoxicidade, causada por uso prolongado e excessivo de medicamentos.

2.3.3. Tecnologias de nanonização

Atualmente existem diversos métodos de obtenção de nanocristais com tamanho e forma desejada. Geralmente esses processos são agrupados em duas categorias, *top-down* e *bottom-up* (DURÁN et al., 2010). A Figura 28 apresenta as principais técnicas usadas na obtenção de nanocristais.

Figura 28- Métodos de obtenção de nanocristais.



Os nanocristais obtidos por métodos *bottom-up* partem do plano molecular e alcançam a forma e o tamanho desejado. Os métodos top-down produzem nanocristais a partir de partículas sólidas em escala micrométrica, que são submetidas à ação mecânica, sob determinadas condições (KHARB et al., 2006; MÜLLER; PETERS, 1998; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004; MISHRAA et al.,2009; DURÁN et al., 2010).

A principal vantagem dos métodos *top down* refere-se à sua capacidade de produzir dispersões de nanocristais de fármacos em meio líquido, normalmente água, denominadas nanosuspensões.

O presente trabalho prevê o desenvolvimento de nanocristais pelos métodos *top-down*, empregando a moagem de alta energia, a homogeneização a alta pressão e a moagem via úmida em escala reduzida.

2.3.3.1. Moagem de alta energia (Nanocrystal®)

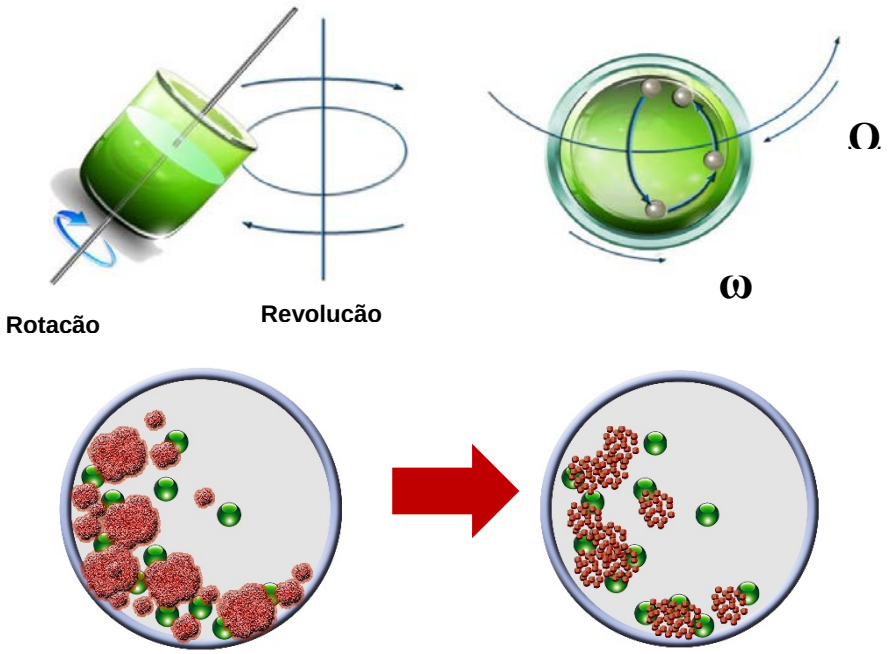
Este método fundamenta-se pelo uso de movimentos de rotação e revolução simultâneos, como forma de garantir maior eficiência da nanopulverizacão. O equipamento é constituído por recipiente de homogeneização, contendo esferas de zircônio ou de outros materiais como cerâmica, aço inoxidável, vidro entre outros.

Os movimentos simultâneos de revolução/rotação são responsáveis pela geração de forças centrífugas que atingem magnitudes de 400G. As esferas de zircônio são responsáveis pela geração de elevada energia (Figura 29). A energia de impacto e cisalhamento produzidas entre as partículas do fármaco, entre as partículas do fármaco e as esferas e finalmente entre as partículas do fármaco e a câmara de moagem permitem a redução do tamanho dessas em reduzido intervalo de tempo (TAKATSUKA et al., 2009).

A dureza e a densidade do fármaco, a concentração e o tipo de agente estabilizante; a viscosidade da suspensão inicial; a concentração do fármaco na formulação; a quantidade, tamanho e densidade das esferas de moagem e os parâmetros de moagem (velocidade e tempo) são fatores que influenciam no desempenho do processo (PELTONEN, HIRVONEN,2010).

As formulações que são submetidas ao método de moagem de alta energia são relativamente simples. Possuem partículas do fármaco ainda na escala micrométrica, meio de dispersão (por exemplo água, tampão entre outros), agente estabilizante: tensoativo, polímero ou mistura deles.

Figura 29- Ilustração dos movimentos simultâneos de Rotação (ω)/Revolução (Ω).



As principais vantagens do método são: aplicação em fármacos com baixa solubilidade em meio aquoso e não aquoso; a não utilização de solventes orgânicos;

facilidade para escalonamento industrial; reduzida variação dos lotes; obtenção de nanocristais com distribuição granulométrica estreita e possibilidade de obter nanosuspensões com elevada concentração do fármaco (MÜLLER; PETERS, 1998; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004).

O emprego de quantidades reduzidas da amostra, o tempo reduzido de procedimento (2 a 5 minutos); a possibilidade de trabalhar em baixas temperaturas; uso de pequeno volume do meio de pulverização e a facilidade de limpeza (apenas da câmara de moagem) são vantagens adicionais do uso desse método (TAKATSUKA et al., 2009).

No que refere- se à desvantagem, a erosão do material de atrito durante a moagem pode ser evitada pelo revestimento das esferas de moagem com materiais como a yttria (BRUNO et al.,1992).

Desvantagem adicional consiste na aderência do produto final na superfície das esferas e nas paredes da câmera de moagem, ocasionando perda do material. Essa perda pode ser considerável nos casos fármacos de elevado valor agregado e fármacos em desenvolvimento (KATTEBOINAA, CHANDRASEKHAR, BALAJI, 2009). Finalmente, a transição polimórfica dos fármacos durante o processo de moagem pode resultar em perda da atividade terapêutica (LIVERSIDGE, CONZENTINO,1995).

2.3.3.2. Homogeneização a alta pressão (DissoCubes®)

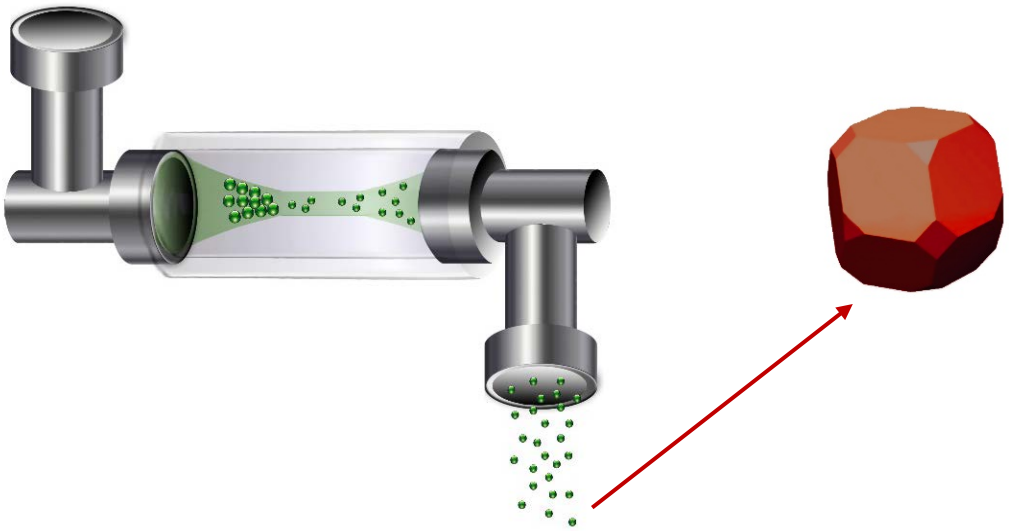
A metodologia de obtenção de nanocristais por homogeneização a alta pressão, denominada DissoCubes®, foi desenvolvida e patenteada, em 1996, por Müller e colaboradores (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008; MÜLLER et al., 1999). Esse método usa os homogeneizadores do tipo pistão-orifício.

A suspensão aquosa, com partículas do fármaco na escala micrométrica e estabilizada por tensoativos, polímeros ou uma mistura deles, é introduzida no equipamento através do pistão com orifício na faixa de 3 a 5µm, sob elevada pressões (1000 a 2000 bar).

Segundo a Lei Bernoulli (MULLER et al.,1995), elevadas pressões permitem que a velocidade de fluxo ou pressão dinâmica aumente, produzindo redução da pressão estática sobre o fluído. Nesse momento o veículo aquoso entra em ebulição à temperatura ambiente formando bolhas de ar, que implodem no momento em que a suspensão passa pelo estreito orifício (pistão).

Em conjunto, o fluxo da suspensão a altas pressões e a implosão das bolhas de ar geram fluxos turbulentos, colisões entre as partículas da suspensão gerando alta energia de cisalhamento e ondas de choque responsáveis pela redução do material para escala nanométrica (Figura 30). O fenômeno de formação e implosão das bolhas de ar é denominado cavitação (DÚRAN et al., 2010; JUNGHANNS; MÜLLER, 2008; MÜLLER,2001)

Figura 30- Ilustração do processo de homogeneização a alta pressão que produz nanocristais de rifampicina.



A principal vantagem do método é a obtenção de nanosuspensões em escala reduzida e industrial, dependendo do desenho do equipamento (REED et al., 2002; KESISOGLOU; PANMAI; WU, 2007). Adicionalmente, o nível de contaminação do fármaco nesse processo, é praticamente inexistente.

Quanto às limitações, essas referem-se às alterações da estrutura cristalina do fármaco em função da elevada pressão e energia empregada. (KHARB et al., 2006; DURAN et al., 2010). Além disso, a adequada viscosidade da suspensão inicial é de vital importância para evitar precipitação e tamponamento do equipamento durante o procedimento.

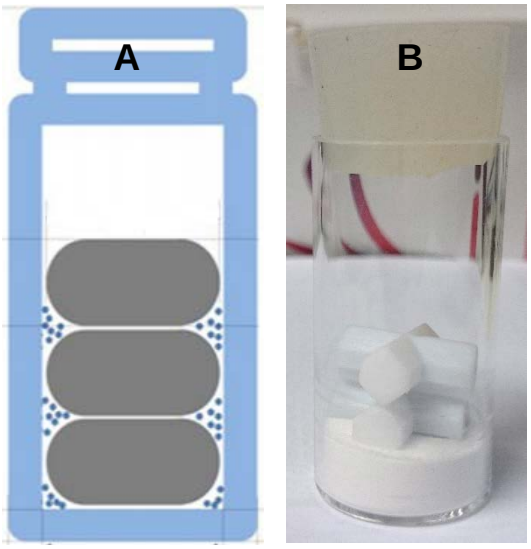
2.3.3.3. Moagem via úmida em escala reduzida

Esse método foi recentemente descrito por Romero e colaboradores (2016) e sua principal vantagem refere-se à sua simplicidade e viabilidade econômica.

Para o desenvolvimento de nanocristais são usados agitadores magnéticos, barras magnéticas e esferas de zircônia que, em conjunto, permitem a redução do tamanho das partículas do fármaco em suspensão.

O sistema é constituído por frascos de vidro contendo esferas de zircônio e barras magnéticas. A suspensão contendo o fármaco e o agente estabilizante é introduzida nos frascos e submetida à agitação por período de tempo determinado e a velocidade adequada (Figura 31).

Figura 31- A: Representacâo esquemática do metodo em escala reduzida. **B:** Imagem dos frascos condicionados no laboratorio para o desensvolvimento de nanocristais.



O fundamento desse método é similar ao de moagem de alta energia sendo que os movimentos simultâneos de rotação são os responsáveis pela geração de forças de impacto e cisalhamento entre as partículas do fármaco, entres as partículas do fármaco e as esferas e finalmente entre as partículas do fármaco e a parede do frasco de vidro.

Os resultados do processo dependem da dureza e da densidade do fármaco; da concentração e tipo de agente estabilizante utilizado; da viscosidade da suspensão

inicial (viscosidade elevada não permite agitação adequada); da concentração do fármaco, do tamanho e da densidade das esferas de moagem.

Esse procedimento é especialmente útil na obtenção de nanocristais de entidade químicas em desenvolvimento e de fármacos de elevado valor agregado em função da escala reduzida, podendo ser obtidas nanosuspensões com volume final de 2 mL.

3. OBJETIVOS

3.3. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção e a caracterização físico-química dos nanocristais de rifampicina empregando os métodos de moagem de alta energia, homogeneização a alta pressão e moagem via úmida em escala reduzida.

3.4. Objetivos específicos

a) Obtenção dos nanocristais de rifampicina empregando moagem de alta energia, homogeneização a alta pressão e moagem via úmida em escala reduzida;
b) Otimização do processo de obtenção dos nanocristais de rifampicina pelo método de moagem via úmida em escala reduzida utilizando planejamento de experimentos por superfície de resposta
c) Caracterização de tamanho hidrodinâmico médio, da distribuição do tamanho e potencial zeta dos nanocristais;
d) Caracterização da morfologia e do tamanho dos nanocristais usando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e o programa Imagen.j;
e) Caracterização físico-química dos nanocristais empregando as técnicas de calorimetria exploratória diferencial e difração de raio X
f) Determinação da solubilidade de saturação dos nanocristais empregando técnica *Shake-flask*.
g) Determinação dos perfis de dissolução das formulações finais
h) Determinação da estabilidade dos nanocristais quanto as características de diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Matéria-prima, solventes e reagentes

- ✓ Rifampicina -Fundação para o Remédio Popular –FURP.,São Paulo,Brasil.
- ✓ Polissorbato 80 (Tween® 80) -Shin-Etsu Ltda.,Tokio, Japão
- ✓ Lauril sulfato de sódio (LSS) (99%)- Synth, São Paulo, Brasil
- ✓ Lecitina de soja (Lecithin) - Mapric®..,São Paulo, Brasil
- ✓ Hidroxipropilcelulose (HPC) - Ashland Inc., São Paulo, Brasil
- ✓ Poloxâmero 188 (Lutrol® Micro 68 MP) - BASF., São Paulo, Brasil
- ✓ Povacoat ™- Daido Chemical., Tokio,Japão.
- ✓ Água ultrapura Mili-Q®.
- ✓ Manitol- Cinética., São Paulo, Brasil
- ✓ Solução de cloreto de sódio 0,9%
- ✓ Cloreto de potássio – Synth,São Paulo, Brasil
- ✓ Acetato de sódio anidro – Synth,São Paulo, Brasil
- ✓ Ácido acético glacial- Fmaia ,Brasil
- ✓ Fosfato de potássio monobásico – Synth,São Paulo, Brasil
- ✓ Hidróxido de sódio – Synth,São Paulo, Brasil
- ✓ Água de osmose

4.2. Aparelhos, equipamentos e acessórios

- ✓ Nanopulverizador NP-100® - Thinky Co., Ltda., Tóquio, Japão
- ✓ Esferas de zircônio - Thinky Co., Ltda., Tóquio, Japão
- ✓ Homogeneizador Nano DeBEE® -BEE International, Estados Unidos
- ✓ Esferas para moagem de oxido de zircônio 0,1 mm- Retsch,Germany
- ✓ Balança analítica Shimadzu®
- ✓ Agitador magnético RT 5 power, IKAMAG®, Alemanha.
- ✓ Purificador de água Milli-Q, Gradient 10®, Millipore®
- ✓ Liofilizador Edwards®
- ✓ Zetasizer Nano ZS 90, Malvern Instruments, Malvern, UK®.
- ✓ Microcopio eletrônico de varredura SU-3400- Hitachi High Technologies., Tokio, Japão
- ✓ Microscópio eletrônico de transmissão Jeol modelo JEM-1010, Estados Unidos

- ✓ Calorímetro de Varredura DSC TA-2920 –TA Instruments®., New Castle, DE, Estados Unidos
- ✓ Analisador termogravimétrico TG/DTG 2950 -TA- Instruments®.,New Castle, DE, Estados Unidos
- ✓ Difratômetro Bruker D8 Advance Da Vinci –Bruker., Japão
- ✓ Shaker TE 4080 –Tecnal., São Paulo, Brasil
- ✓ Equipamento espectrofotométrico Evolution 201-Thermo Scientific
- ✓ Cubetas de quartzo- Thermo Scientific
- ✓ Centriguga 5424 R- Eppendorf., Estado Unidos

4.3. Métodos

4.3.1. Preparação dos nanocristais de rifampicina empregando moagem de alta energia.

A preparação das nanosuspensões foi efetuada empregando nanopulverizador NP-100® (Thinky Co., Ltda., Tóquio, Japão). A Tabela 17 apresenta as formulações e etapas do processo. O método de preparação consiste de duas etapas empregando as mesmas condições de velocidades (V), tempos (T) e volumes da solução aquosa do polímero para as três fórmulas (F1-M, F2-M e F3-M). Quantidade igual a 7 g da rifampicina foi adicionada a quantidade suficiente para 100 g de solução aquosa do tensoativo. A mistura foi transferida para recipiente contendo 25 g de esferas zircônio, com diâmetro igual a 0,1 mm.

Tabela 17- Fórmulas e condições dos ensaios para obtenção de nanocristais de rifampicina utilizando moagem de alta energia.

FÓRMULA	Rifampicina (g)	Tween®80 (g)	Lecitina (g)	Poloxâmero 188 (g)	HPC (g)	Água purificada q.s.p (g)
F1-M	7,0	0,2	1,0	-	0,3	100,0
F2-M	7,0	-	-	-	0,3	100,0
F3-M	7,0	-	-	1,0	0,3	100,0

CONDIÇÕES DO TESTE

ETAPA	Rifampicina (g)	Solução do agente estabilizante (g)	Agitação (rpm)	Tempo de moagem (min)
A	7,0	50,0	1500	20
B	-	+50 (total 100)	400	1

F1-M. Formulação 1; F 2-M. Formulação 2 e F 3-M. Formulação 3

4.3.2. Preparação dos nanocristais de rifampicina empregando homogeneização a alta pressão (HAP).

As formulações F1-H e F2-H foram preparadas empregando poloxâmero e Povacoat™ (polímero derivado de PVA) respetivamente, como agentes estabilizantes. As condições de preparo das nanosuspensões de rifampicina por homogeneização a alta pressão estão apresentadas na Tabela 18. Anteriormente à homogeneização da suspensão a alta pressão essa foi submetida à mistura de elevado cisalhamento o equipamento Turrax® a 24000 rpm por 5 minutos. Após esse procedimento, a suspensão foi transferida para o homogeneizador Nano DeBEE® (BEE International) e submetida preliminarmente a pressões de 300, 500 e 1000, empregando 5 ciclos para cada pressão. Adicionalmente foram empregados 15 ciclos de 1500 bar.

Tabela 18- Fórmulas e condições dos ensaios para obtenção de nanocristais de rifampicina utilizando homogeneização a alta pressão (HAP).

Fórmula	Rifampicina (g)	Povacoat® (g)	Poloxâmero 188 (g)	Água purificada q.s.p (g)
F1-H	5,0	-	4,0	100,0
F2-H	2,5	10,0	-	100,0

CONDIÇÕES DO TESTE			
ETAPA	**Pre-moagem**	**HAP**	
		Ciclos (n)	**Pressão (bar)**
A	5 min- 24000 rpm	-	-
B	-	15	1500

4.3.3. Preparação dos nanocristais de rifampicina empregando moagem via úmida em escala reduzida

As nanosuspensões foram obtidas empregando sistema constituído de recipiente de vidro, esferas de zircônio de 0,1 mm de diâmetro (Retsch, Alemanha) e barras magnéticas. Como agente estabilizante utilizou-se Povacoat™, polímero derivado do PVA. A velocidade de agitação foi de 800 rpm a uma temperatura de 25°C por período de 5 dias.

4.3.3.1. Otimização do processo de preparação dos nanocristais de rifampicina empregando planejamento de experimentos por superfície de resposta

A influência das variáveis independentes (fatores): concentração de rifampicina, quantidade das esferas de zircônio e concentração do polímero Povacoat ™ nas características de tamanho de partícula e de potencial zeta foram avaliadas. O estudo teve como objetivo o desenvolvimento de método de preparo robusto. A matriz de ensaios (Tabela 19) apresenta as faixas de concentrações utilizadas para as variáveis: entre 3,0 a 5,0% (p/p) para rifampicina, 10,0 a 20,0% (p/p) para esferas de zircônio e 1,0 a 3,0% (p/p) para o polímero Povacoat™. A matriz de ensaios e a análise dos resultados foram efetuadas empregando software Minitab 17.

Tabela 19- Matriz de ensaios para a otimização do processo de produção de nanocristais de rifampicina.

Formulação	Ordem	Nível	Blocos	Rifampicina (%P/P)	Zircônia (%P/P)	Povacoat® (%P/P)
8	1	2	1	5	15	3
14	2	0	1	4	15	2
10	3	2	1	4	20	1
4	4	2	1	5	20	2
5	5	2	1	3	15	1
15	6	0	1	4	15	2
3	7	2	1	3	20	2
13	8	0	1	4	15	2
2	9	2	1	5	10	2
11	10	2	1	4	10	3
12	11	2	1	4	20	3
7	12	2	1	3	15	3
1	13	2	1	3	10	2
9	14	2	1	4	10	1
6	15	2	1	5	15	1

4.4. Liofilização das nanosuspensões

A secagem das nanosuspensões foi efetuada por meio de liofilização com o objetivo de aumentar a estabilidade das preparações obtidas em meio aquoso, assim com, permitir a realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a análise térmica das formulações. Por meio da liofilização foi possível a obtenção de formas farmacêuticas sólidas dos nanocristais (VARSHOSAZ; ESKANDARI; TABBAKHIAN, 2012)

4.4.1. Liofilização das nanosuspensões obtidas pelo método de moagem de alta energia

A liofilização para as formulações obtidas por este método foi realizada sem adição de crioprotetor. As nanosuspensões foram transferidas em tubos cônicos de 30 mL e foram congeladas a -70 °C e submetidas à liofilização por 48 horas sob pressão de 0,120 mbar e temperatura de 24 °C, empregando o equipamento Christ® Alpha I-5 (Martin Christ, Alemanha).

4.4.2. Liofilização para as formulações obtidas pelo método de homogeneização a alta pressão e moagem úmida em escala reduzida

A liofilização para essas formulações foi realizada em liofilizador FTS Systems, modelo TDS-00209-A microprocessado com secador controlado de bandejas (Dura-Stop, Dura-Dry-MP).

Volume igual a 1,5 mL das nanosuspensões obtidas pelo método de homogeneização a alta pressão foi liofilizado sem adição de crioprotetor em frascos de 10 mL. As formulações obtidas pela moagem via úmida em escala reduzida foram liofilizadas em volume igual a 1,5 mL sendo que as nanosuspensões foram diluídas a concentração de 5% (p/p) de manitol; frascos de vidro de 10 mL foram preenchidos manualmente e parcialmente fechados com tampas de borracha.

As amostras foram congeladas a temperatura final de -40 °C, durante 4 h. A secagem primária foi realizada em -30 °C, pressão da câmara a 100 mTorr e temperatura do condensador de -90 °C. A secagem secundária a 10 °C, pressão da câmara a 100 mTorr e temperatura do condensador de -90 ± 1 ◦ C (GONZALES,2015).

4.5. Caracterização físico-química dos nanocristais

4.5.1. Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser (DL)

Para a determinação do tamanho inicial da rifampicina, matéria-prima, e dos nanocristais de rifampicina nas nanosuspensões foi utilizado o método de difração de raios laser (DL) empregando equipamento Granulometer Cilas 1900 (Cilas, Orleans, França) programado para o método de via úmida. Como meio dispersante utilizou-se uma solução saturada do fármaco, previamente filtrada para a remoção do fármaco não solubilizado.

O tempo de medida e o tempo de ultrassom empregados estão apresentados na Tabela 20. Para a F1-H, o uso de ultrassom foi requerido devido a presença de agregados de partículas. Nesse caso o ultrassom permitiu desagregar as partículas fornecendo estimativa mais próxima do real tamanho dos cristais.

Tabela 20- Parâmetros de medida de rifampicina, matéria-prima e nanocristais pelo método de difração de raios laser (DL).

Método	Amostra	Tempo de medida (s)	Tempo de ultrassom (s)
	Rifampicina matéria-prima	30	-
Moagem de alta energia	F1-M	25	-
	F2-M	25	-
	F3-M	25	-
Homogeneização a alta pressão	F1-H	25	10
	F2-H	25	-
Moagem via úmida em escala reduzida	F1-MU	30	-
	F2-MU	30	-

4.5.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ)

4.5.2.1. Desenvolvimento de método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersividade (IP)

Visando estabelecer as condições para as leituras de diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersividade (IP) pelo método de espalhamento de luz dinâmica (DLS) foi foram realizadas diluições consecutivas de 1:100 e 1:300 da amostra em solução saturada do fármaco das formulações finais obtida pelo método de moagem via úmida em escala reduzida. As medições foram efetuadas em triplicata utilizando ângulo de 90° no equipamento Zetsizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.5.2.2. Desenvolvimento de método para a determinação do potencial zeta (PZ)

As determinações foram realizadas no equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) pelo método de mobilidade eletroforética, a qual é convertida no potencial zeta (ζ) (mV) usando a equação de Henry (Equação 4).

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(ka) \qquad (4)$$

Em que η e ε são a viscosidade e a constante dielétrica, respetivamente, do solvente na temperatura de 25°C. U_E ,mobilidade eletroforética e ζ potencial zeta.

A força do campo aplicado foi de 20 V/cm. As condições para a determinação do potencial zeta foram determinadas por meio de curva de condutividade *versus* potencial zeta. A faixa de condutividade avaliada foi de 10 a 110 µS/cm empregando solução de NaCl 0,9% (p/v). As amostras de nanocristais foram previamente diluídas em solução saturada do fármaco e ajustadas a uma condutividade de 60 µS/cm para F1-MU e F2-MU.

4.5.3. Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A superfície e a forma dos nanocristais foram determinados utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET) empregando o equipamento Jeol modelo JEM-1010 a 80 kV. Para a determinação do tamanho, foi usado o programa Imagen.j nas imagens geradas pela microscopia. As amostras das nanosuspensões foram diluídas em solução saturada do fármaco em 1:20 e depositados sobre grids de cobre de 150 MESH recobertos com película de FORMVAR por 10 minutos (tempo de secagem).

4.5.4. Determinação da densidade relativa das nanosuspensões

A densidade relativa é a razão entre as densidades absolutas de duas substâncias.

$$\rho_{\text{formulação, água}} = \frac{\rho_{\text{formulação}}}{\rho_{\text{água}}} \qquad (5)$$

Onde $\rho_{água}$ é a substância padrão sendo que $\rho_{água} \cong 1{,}00$ g/cm^3 para temperatura ambiente (25°C).

Para determinar a densidade das formulações de nanocristais foi utilizado picnômetro. A massa desses foi determinado vazios e posteriormente preenchidos com os líquidos (formulações e água) obtendo-se o valor da densidade pela equação:

$$\rho_{\text{formulação, água}} = \frac{m_{\text{formulação}}}{m_{\text{água}}} \quad (6)$$

4.5.5. Teor de rifampicina nas nanosuspensões obtidas por moagem via úmida em escala reduzida

Para determinação do teor foi transferida quantidade igual a 0,15 g das nanosuspensões de rifampicina para balão volumétrico de 50 mL. Nesse balão foi adicionado aproximadamente 30 mL de metanol e a solução foi submetida a ultrassom por 5 minutos, visando garantir a solubilização completa do ativo. Após este tempo, o volume do balão foi completado procedendo-se homogeneização final. O ensaio foi efetuado em triplicata. A quantidade de rifampicina na solução resultante foi determinada empregando espectrofotômetro Evolution 201-Thermo Scientific no comprimento de onda de 472 nm.

4.5.6. Difração de raios X dos nanocristais (DRX)

Os difratogramas de raios X para os nanocristais preparados pelo método de moagem via úmida em escala reduzida foram obtidos pelo método do pó empregando difratômetro de raios X Bruker Modelo D8 Advance Da Vinci (Bruker, Japão), na radiação de Cu- Kα As amostras da mistura física em valores absolutas e dos nanocristais foram expostas a rediacao CuKa 40 Kv e tempo de passo de 0,01.

4.5.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial foi realizada empregando o TA-2920 (TA Instrument®, New Castle, DE, EUA) previamente calibrada com índio metálico (ponto de fusão: 156,4 °C/ $\Delta H_{fusão}$:28,50 J g^{-1}. Utilizou-se faixa de temperatura entre 25 a 350 °C. As massas das amostras foram cuidadosamente determinadas e transferidas para cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e submetidos à velocidade de aquecimento de 10 °C min^{-1} e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

4.5.8. Analise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica derivada (DTG)

As análises de TG/DTG foram realizadas usando- se cadinhos de platina no equipamento TA-2950 (TA Instrument®, New Castle, DE, EUA) em faixa de temperatura entre 25 a 600 °C, velocidade de aquecimento de 10 °C e atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min^{-1}). A calibração do equipamento do equipamento foi realizada com padrão de oxalato de cálcio. Massa conhecida das amostras foi adicionada a cadinho de platina e sua perda, registrada em função da temperatura.

4.5.9. Solubilidade de saturação dos nanocristais

Os ensaios de solubilidade para as formulações e misturas físicas foram realizados empregando-se o método de equilíbrio. Dessa forma um excesso destas foram acondicionadas no interior de frascos de vidro contendo 5 mL dos seguintes meios, preparados conforme drescrito USP 32, tampão acetato pH 4,5; água deionizada; tampão fosfato pH 6,8 e 7,2.

Os frascos foram constantemente agitados a 150 rpm durante 72 horas a 37°C, em agitador orbital Tecnal TE 4080 (Tecnal, São Paulo, Brasil). Após atingir a saturação as alíquotas foram retiradas e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 37°C em centrifuga 5424R-Eppendorf (Eppendorf, Estados Unidos). A concentração do fármaco foi determinada pelo método espectrofotométrico desenvolvido e validado no presente trabalho em espectrofotométrico Evolution 201-Thermo Scientific

4.5.10. Perfil de dissolução

Os ensaios de dissolução da suspensão de rifampicina 20mg/mL refêrencia (FURP, São Paulo, Brasil) e das nanosuspensões de rifampicina obtidas pelo método de moagem via úmida em escala reduzida, foram efetuados em triplicata em equipamento 708-DS Dissolution Apparatus (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos) utilizando aparato 2 (pá) a 50 rpm. A quantidade de suspensão para cada teste foi ajustada de forma a obter 200 mg de rifampicina.

O meio empregado foi o tampão fosfato pH 6,8 (900 mL) contendo 1% de Tween® 80 a 37°C, em agúa previamente desgaseificada.

Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos tempos de 5,10,15,30,45 e 60 minutos e submetidas à filtração empregando membrana filtrante com tamanho de poro de 0,45 mμ (Quality Lab Accessories, Bridgewater, Estados Unidos). A rifampicina foi quantificada empregando método validado em espectrofotométrico UV Vis Evolution 201-Thermo Scientific, no comprimento de onda de 472 nm.

4.5.11. Estabilidade das nanosuspensões

A estabilidade das nanosuspensões foi avaliada por período de 3 meses à temperatura ambiente (25 ° C) e 4 ° C para formulações obtidas por homogeneização a alta pressão e a 4°C para aquelas obtidas por moagem via úmida em escala reduzida. Para avaliar a estabilidade física foram determinados o DHM, IP e PZ os quais foram determinados durante o período de armazenamento.

4.5.12. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) das nanosuspensões de rifampicina obtidas empregando método de moagem via úmida em escala reduzida

Foram avaliadas amostras das nanosuspensões de rifampicina (F1-MU e F2-MU), produto FURP-Rifampicina suspensão oral 20mg/mL, e rifampicina padrão. As diluições avaliadas foram: 8;4;2;1;0,5;0,25;0,125 e 0,063 µg/mL.

A atividade dos bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foi avaliada utilizando ensaio de redução de sal de tetrazol XTT (2,3 - bis (2 -methoxy -4 –nitro -5 -sulphenyl) - (2H) -tetrazolium -5 -carboxanilide) (COSTA et al., 2015), em microplaca de 96 poços. A bactéria foi transferida para os poços em concentração aproximada de 10^6 UFC/poço (50 µL), empregando acetilcisteína (50 µL) e diluído em meio Middlebrook 7H9 até a concentração especificada. As placas foram incubadas a 37°C em 5% CO_2 por período de 5 dias. Após esse período foi adicionada solução do sal de tetrazol XTT até concentração final de 5mg/mL. Após 3 horas foram adicionadas 100 µL de tampão de lise (20% p/v de lauril sulfato de sódio (LSS) / 50% de DMF - dimetilformamida em água destilada) e as microplacas foram incubadas durante a noite a 37°C em 5% de CO_2. As culturas de micobactérias foram utilizadas como controle positivo para inibição de crescimento. Meio Middlebrook 7H9 foi utilizado,

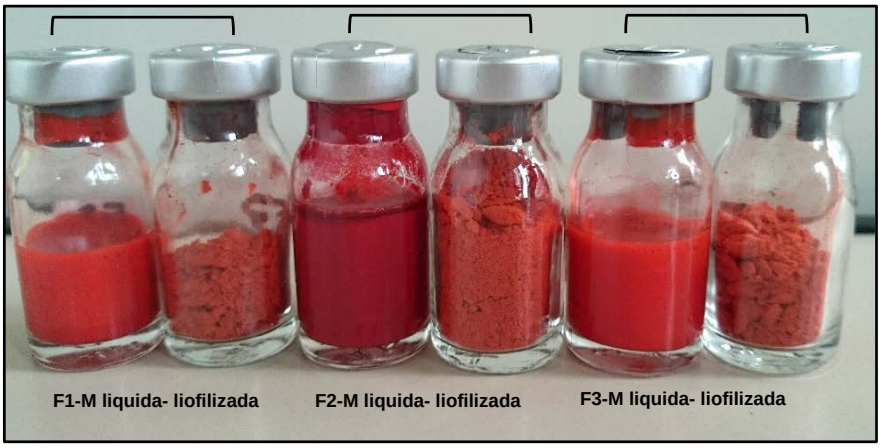
isoladamente, como controle negativo. A leitura das placas foi efetuada empregando espectrofotômetro, comprimento de onda 570 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Preparação dos nanocristais de rifampicina por moagem de alta energia

As nanosuspensões originalmente obtidas e liofilizadas estão apresentadas na Figura 32. Observa-se que a F2-M apresenta separação de fases e agregados na parede do frasco. Tal fenômeno indica instabilidade da preparação.

Figura 32-. Nanosuspensões de rifampicina obtidas por moagem de alta energia e seus liofilizados.



5.1.1. Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser (DL)

A Tabela 21 e as Figura 33, 34 e 35 apresentam a distribuição granulométrica das partículas nas nanosuspensões obtidas por moagem de alta energia. A avaliação do tamanho foi feita pelo método úmido de difração a laser (DL). A obscuração atingida teve valor maior que 10%, portanto adequada para o método.

Tabela 21- Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% da rifampicina matéria-prima e dos nanocristais. n=10.

Amostra	d10% (µm)	d 50% (µm)	d 90% (µm)	Diâmetro médio (µm)	Obscuração
Rifampicina	35,17 ± 0,04	48,86 ± 0,03	66,77± 0,04	50,08 ± 0,03	22,10 ± 0,32%
F1-M	4,37 ± 0,02	13,90 ± 0,10	40,10 ± 0,31	18,21 ± 0,17	23,00 ± 0,00 %
F2-M	1,72 ± 0,04	7,26 ± 0,22	21,08 ± 0,64	9,49 ± 0,32	24,20 ± 0,42%
F3-M	3,05 ± 0,02	14,39 ± 0,06	25,41 ± 0,31	14,41 ± 0,11	21,00 ± 0,00%

Os primeiros ensaios foram efetuados utilizando água como meio dispersante. Os resultados indicaram solubilização da amostra no meio, revelado pela mudança repentina e significativa na obscuração (redução na quantidade de partículas em função da dissolução dessas). Portanto, selecionou-se como meio dispersante para o ensaio a solução saturada do fármaco, previamente filtrada (KECK, 2010).

Como mencionado anteriormente a rifampicina matéria-prima apresentou tamanho médio de 50,08 ± 0,03µm, 10% das partículas apresentaram valores inferiores a 35,17 ± 0,04 µm. Considerando os valores de d10%, d50% e d90% obtidos é possível afirmar que a matéria-prima se encontra na forma micronizada (STEELE,2001).

Os resultados de tamanhos médio e d10% das partículas nas nanosuspensões foram: para F1-M, 18,20 ± 0,16 µm e valor d10% de 4,37 ± 0,02 µm, para F2-M, 9,48 ± 0,32 µm e valor de d10% de 1,72 ± 0,04 µm, finalmente para F3-M, 14,40 ± 0,10 µm e valor de d10% de 3,05 ± 0,02 µm. Os resultados indicam que houve redução significativa do tamanho médio das partículas. No entanto, a quantidade de nanocristais obtida foi baixa em todas as formulações sendo que as primeiras partículas detectadas pelo equipamento foram maiores que 1 µm.

A redução não significativa do tamanho das partículas para a escala nanométrica pode ser explicada pela insuficiente energia durante o processo da moagem. Considerando que com o tempo as imperfeições dos cristais diminuem, é necessário o aumento de energia para que a redução do tamanho das partículas do fármaco seja total e homogênea. De maneira similar, o aumento do tempo de moagem é necessário visando a uniformidade na redução de tamanho da partícula.

Outro aspecto a considerar é a concentração do agente estabilizante no sistema. A concentração inadequada do tensoativo poder não garantir o revestimento total da superfície das partículas, comprometendo gravemente a estabilidade do sistema (KOELMANS, OVERBEEK, 1954). As concentrações dos tensoativos foram determinadas com base na revisão da literatura dos principais agentes estabilizantes usados na preparação de nanosuspensões.

Todos os resultados de DL foram comparados com a microscopia eletrônica de transmissão (MET), técnica associada ao programa Imagen.j que permite determinar estimativa do tamanho das partículas.

Figura 33- Distribuição granulométrica da F1-M dos nanocristais de rifampicina. n=10

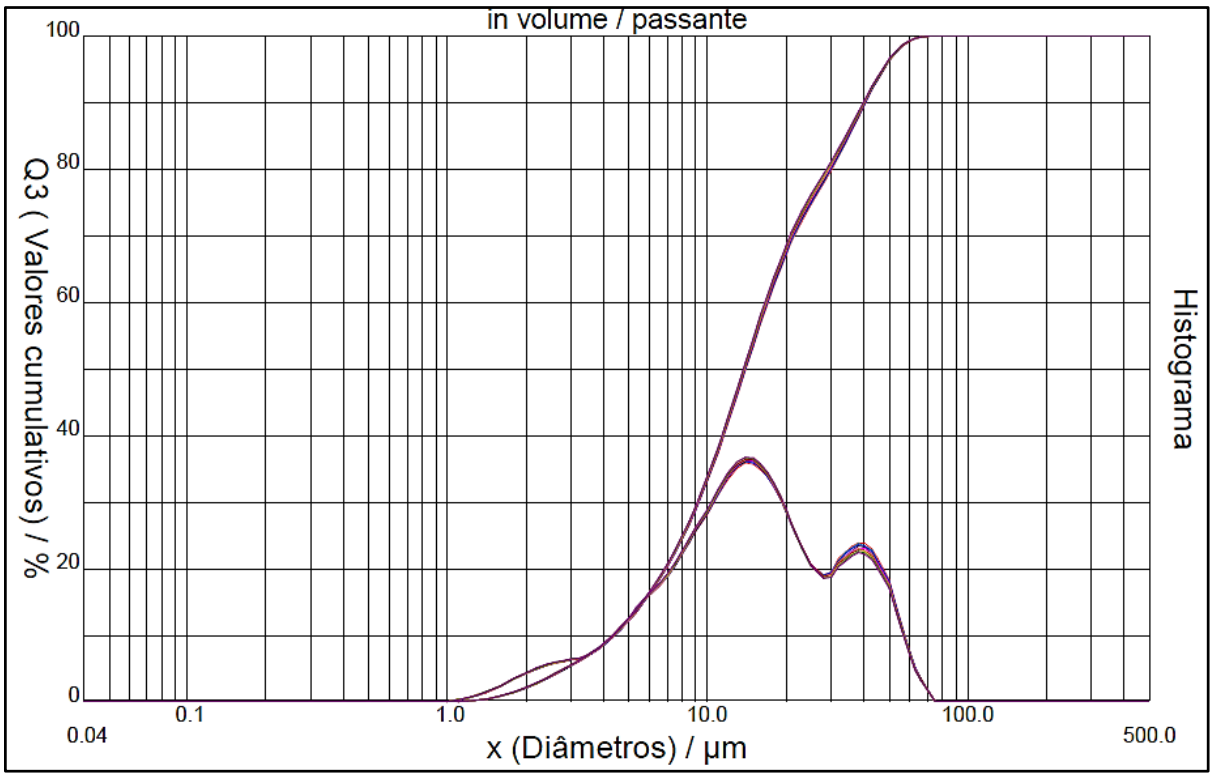


Figura 34- Distribuição granulométrica da F2-M dos nanocristais de rifampicina. n=10

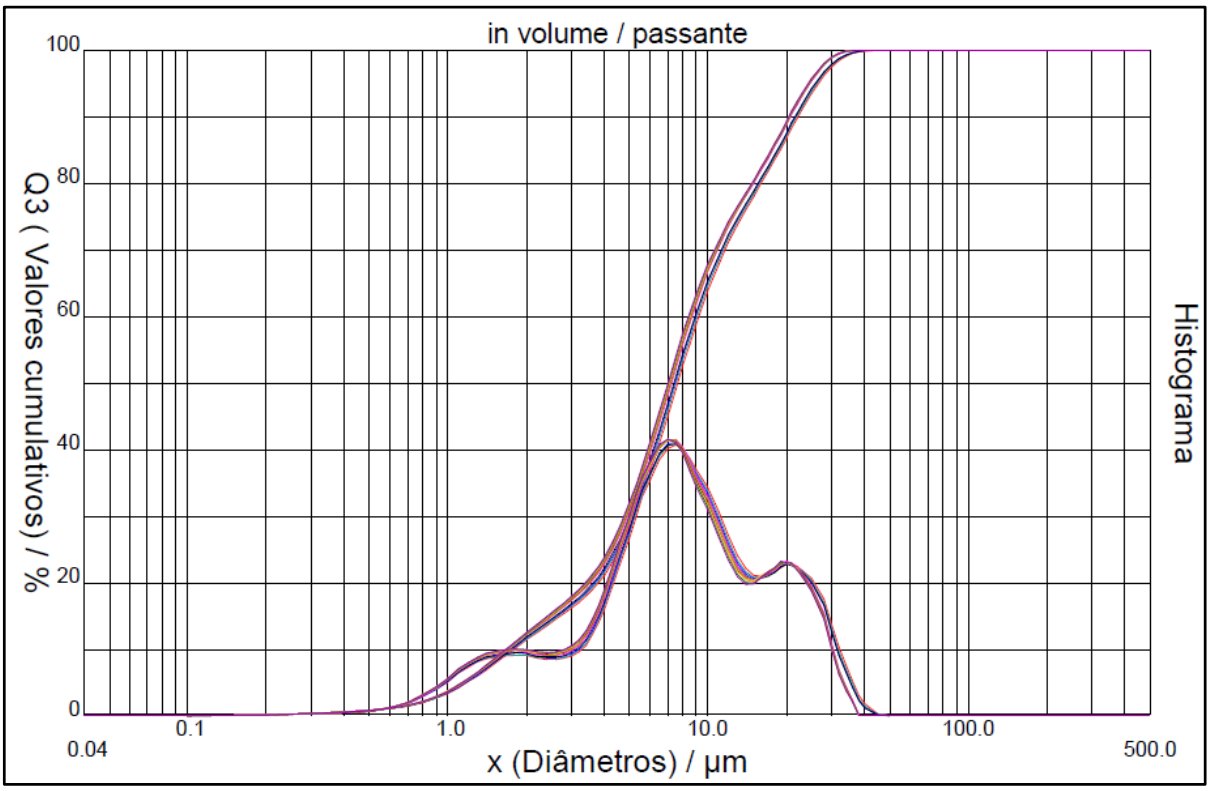
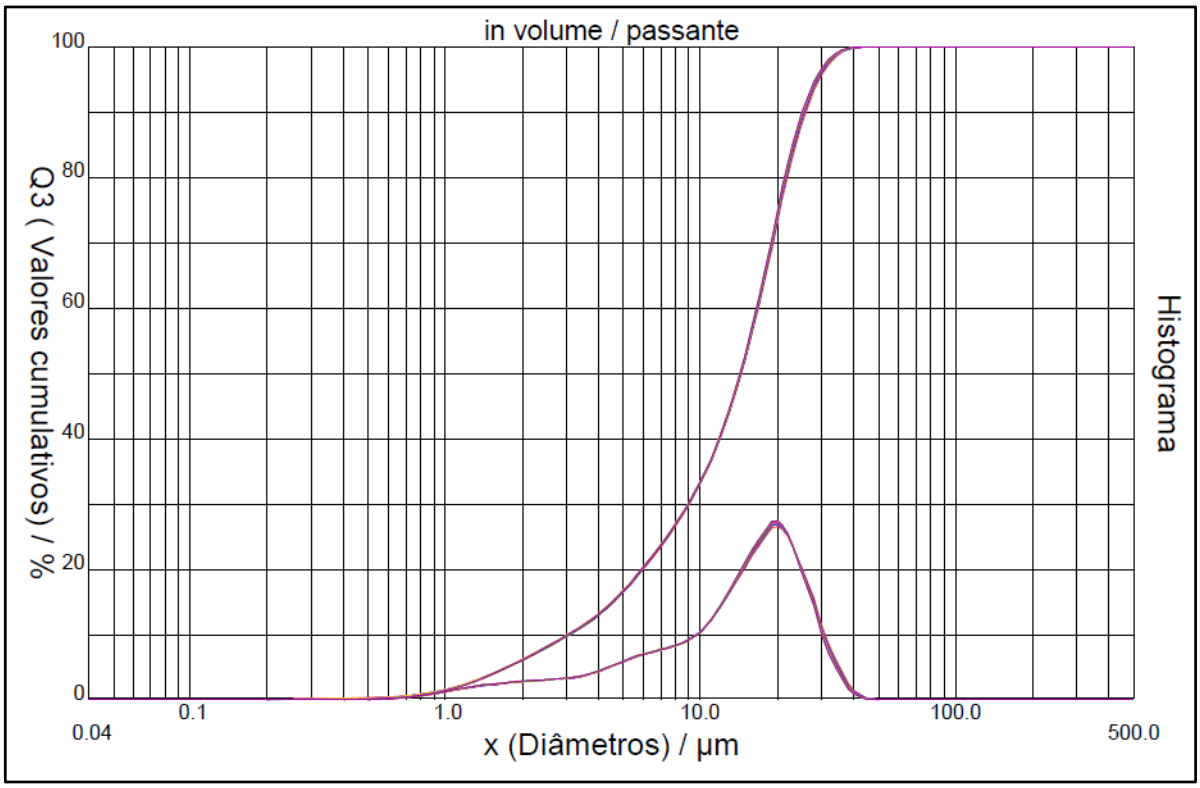


Figura 35- Distribuição granulométrica da F3-M dos nanocristais de rifampicina. n=10



5.1.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais

Os valores de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) das formulações F1-M, F2-M e F3-M de nanocristais de rifampicina.

Nanocristais de Rifampicina	DHM (d. nm)	IP	PZ (mV)
F1-M	593,20 ± 33,24	0,42 ± 0,12	-16,5 ± 0,15
F2-M	974,20 ± 11,62	0,28 ± 0,04	-44,0 ± 0,80
F3-M	59,15 ± 0,23	0,31 ± 0,01	-24,3 ± 0,44

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade foi usado o método de espalhamento de luz dinâmica (DLS).

O DHM para a F1-M, contendo o Tween® 80 como agente estabilizante, foi igual a 593,20 ± 33,24 nm, valor que comprova a presença de partículas na escala nanométrica (nanocristais). Os resultados para a mesma formulação pelo método de difração de raios laser (DL) indicam tamanho médio de 18,21 ± 0,17 µm e d10% de 4,37 ± 0,02 µm. As primeiras partículas observadas foram aquelas de 1,10 µm. Tal divergência justifica-se pela baixa quantidade de nanocristais na formulação, os quais são dissolvidos durante o procedimento de medição empregando DL. Esse procedimento utiliza 400 mL de meio dispersante e os tensoativos da amostra gerando aumento da sua solubilidade.

Para F2-M, que contém a lecitina de soja como estabilizante, foi obtido DHM de 974,20 ± 11,62 nm. Esse valor indica a incapacidade da lecitina de atuar como agente estabilizante na formação de nanosuspensões. Portanto, é recomendável o uso desse agente em associação a outros tensoativo, tais como poloxâmero 188 e lauril sulfato de sódio (LSS). O método DL detecta partículas a partir de 400 nm. Na Figura 32 é possível observar os aglomerados na parede do frasco. Esses

aglomerados indicam a presença de fenômeno de maturação, denominado fenômeno de Ostwald (GAO; ZHANG; CHEN, 2008).

A F3-M, que contém o poloxâmero 188 como agente estabilizante, obteve DHM de 59,15 ± 0,23 nm. Os resultados do método de difração de raios laser para esta formulação confirmam a presença de partículas a partir de 200 nm até 45 µm. No entanto, observa-se maior quantidade de partículas em escala nanométrica. Porém, a sua distribuição não pode ser considerada uniforme.

Os resultados obtidos foram corroborados empregando terceira tecnologia, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) com o objetivo de avaliar o tamanho das partículas e a presença de possíveis aglomerados.

As avaliações do potencial zeta foram efetuadas pelo método de mobilidade eletroforética usando água, como meio dispersante e solução de NaCl 0,9% (p/v) para o ajuste da condutividade a 50 µS/cm para a F1-M e 60 µS/cm para as F2- M e F3-M. O ajuste da condutividade tem por finalidade evitar as flutuações do potencial zeta em decorrência da condutividade variável da água (variabilidade interdias e entre laboratórios).

A F1-M apresentou potencial zeta igual a -16,5 ± 0,15 mV. O Tween® 80 proporciona estabilidade estérica para as formulação (JACOBS; KAYSER; MÜLLER, 2000). A F2-M apresenta potencial zeta igual a - 44,0 ± 0,80 mV. O elevado potencial zeta negativo dessa preparação é justificado pela presença da lecitina de soja.

Por fim, a F3-M usando poloxâmero 188 como tensoativo, apresentou potencial zeta igual a -24,3 ± 0,44 mV. O poloxâmero é um polímero bastante usado como estabilizante estérico. Esse polímero foi adsorvido na superfície dos nanocristais durante a moagem formando camada de até 7 nm (MÜLLER, 1991).

5.1.3. Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Essa análise permitiu monitorar a morfologia e o tamanho das partículas nas formulações obtidas empregando método de moagem de alta energia. As Figuras 36-38 apresentam as microscopias das três formulações. Observa-se as partículas de rifampicina com forma de agulha, típica dos cristais de compostos cristalinos.

Pode-se observar a presença de partículas na escala nanométrica, assim como a presença de agregados formados a partir da união dessas partículas mais pequenas. Esse fenômeno de agregação é típico da rifampicina e foi o principal desafio a ser superado durante todo o trabalho. A microscopia TEM demostrou a incapacidade dos tensoativos em manter estável o sistema.

Figura 36- Fotografia MET (um) das partículas de F1-M **A:** Ampliação 20000x e **B:** Ampliação 50000x.

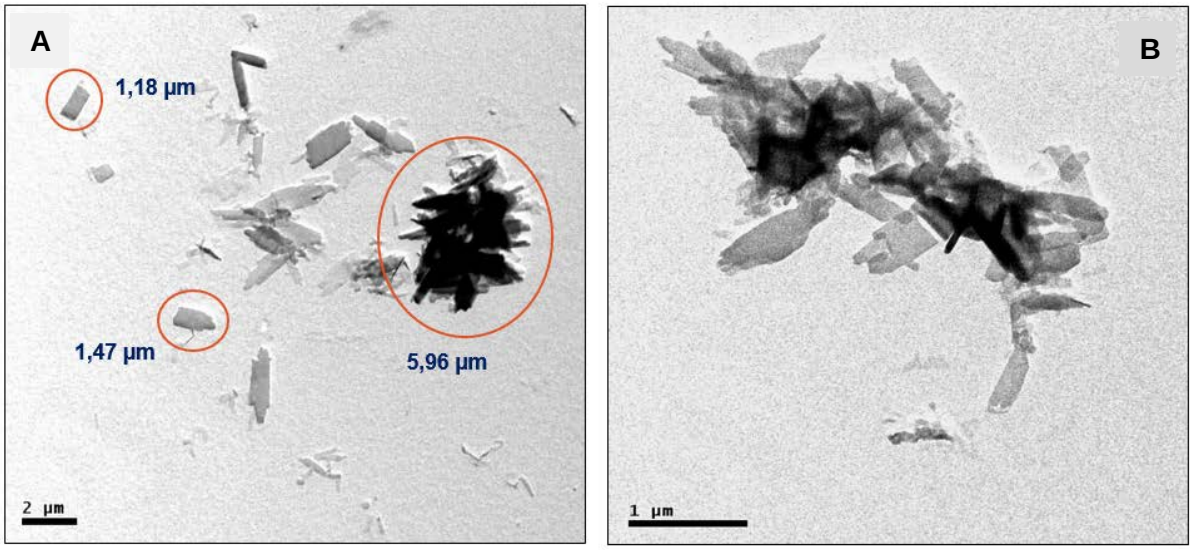


Figura 37- Fotografia MET (um) das partículas de F2-M **A:** Ampliação 4000x e **B:** Ampliação 10000x.

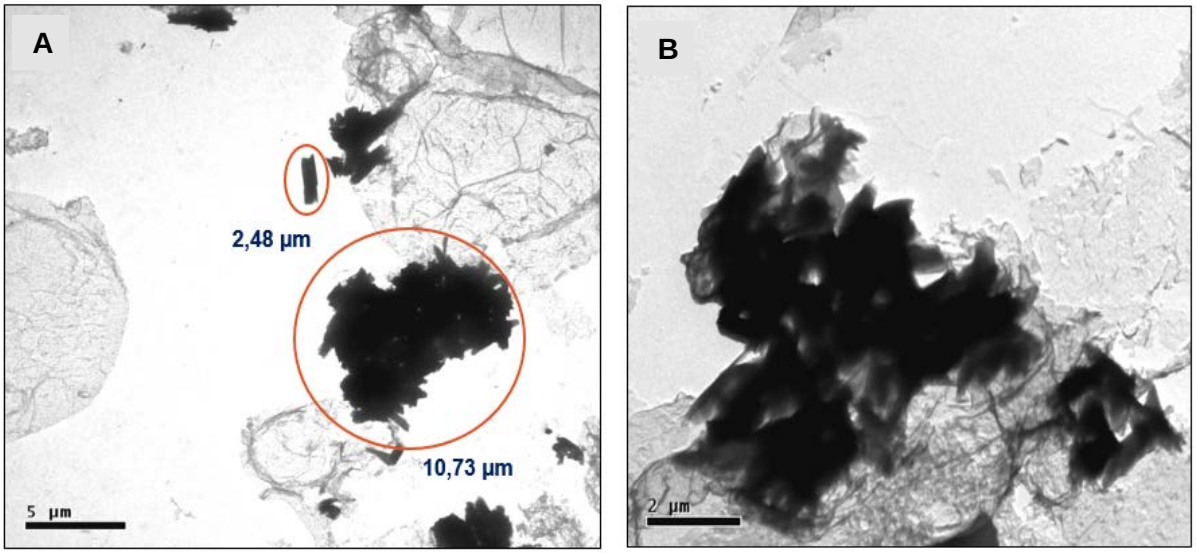
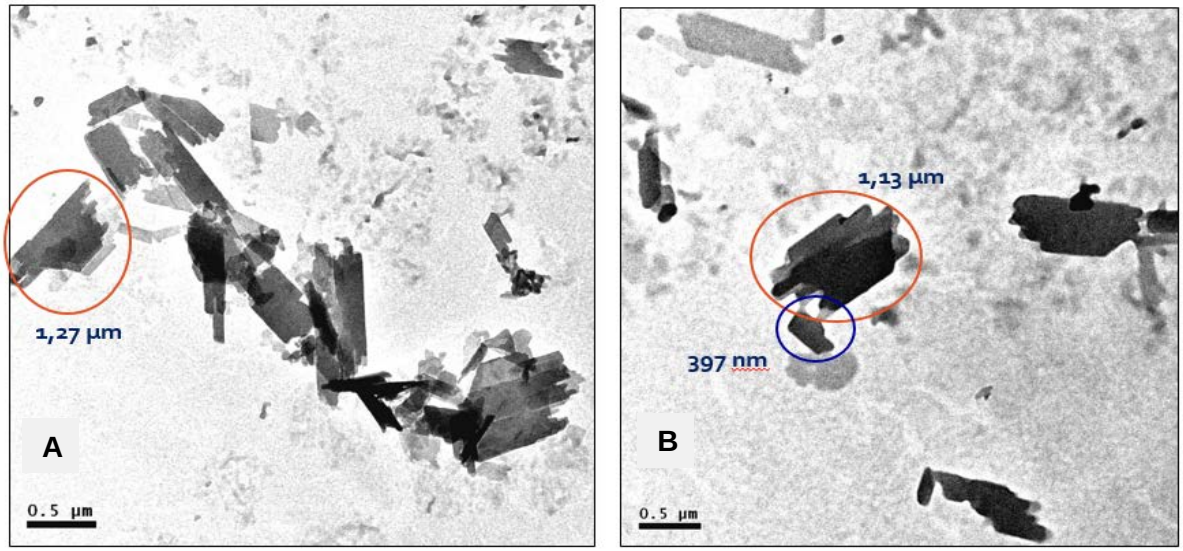


Figura 38- Fotografia MET (um) das partículas de F3-M **A:** Ampliação 20000x e **B:** Ampliação 50000x.



5.1.4. Estudo de compatibilidade fármaco-excipiente

Para a preparação das nanosuspensões de rifampicina pelo método de moagem de alta energia foram selecionados como excipientes: hidroxipropilcelulose (HPC), lecitina de soja e poloxâmero 188 (Lutrol ®F68). Para a determinação de possíveis interações e/ou incompatibilidade entre os compostos de cada formulação foram obtidas as curvas de DSC e TG/DTG do fármaco, de cada excipiente e das respetivas misturas físicas.

5.1.4.1. Estudo de compatibilidade entre rifampicina e hidroxipropilcelulose (HPC)

A Hidroxipropilcelulose (HPC) é um polímero semissintético não iônico que é usado como agente suspensor em formulações de nanocristais, pois permite uma dispersão adequada das partículas no sistema. Cabe ressaltar que condição indispensável para moagem homogênea refere-se à adequada dispersão das partículas na suspensão inicial. Essa condição permitirá a redução uniforme do tamanho e a adequada distribuição do tensoativo nas partículas e que será refletida na estabilidade do sistema.

As Figuras 39 e 40 apresentam as curvas de DSC e TG/DTG do HPC, da rifampicina (polimorfo II) e mistura física rifampicina/HPC. É possível observar que a amostra de HPC apresenta um evento térmico próximo a 40ºC, referente a perda de água. Um segundo evento é observado a 193,6ºC (Tpico), característico de fusão, o que confirma o fraco grau de cristalinidade (menos de 10%), demonstrado pela difração de raios-X (TALUKDER et al., 2011).

A curva de DSC para mistura física apresenta um evento exotérmico na temperatura de 238,7ºC (Tpico). O material é termicamente estável até cerca de 225°C. O perfil das curvas DSC e TG/DTG da mistura física rifampicina/HPC não apresentou mudanças significativas quando comparados aos perfis dos componentes observados individualmente. Portanto, conclui-se que não há interação entre as espécies.

Figura 39- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), HPC e mistura física rifampicina/HPC obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

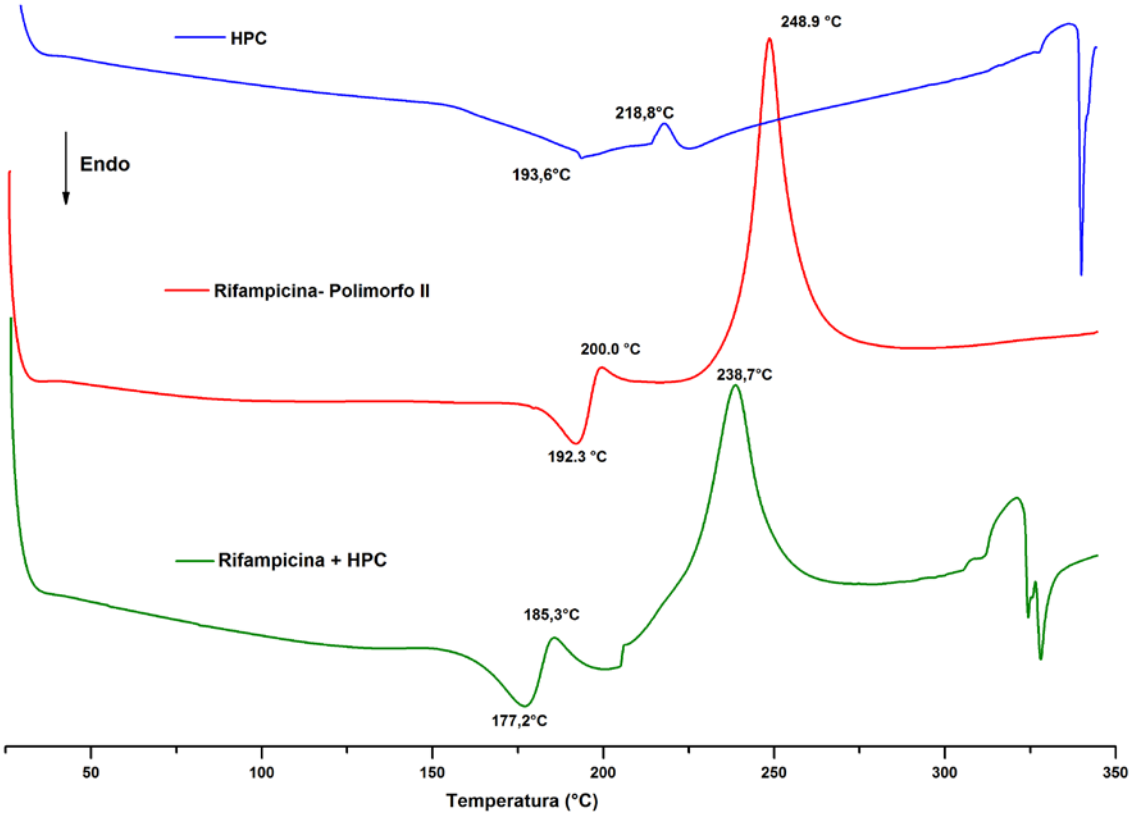
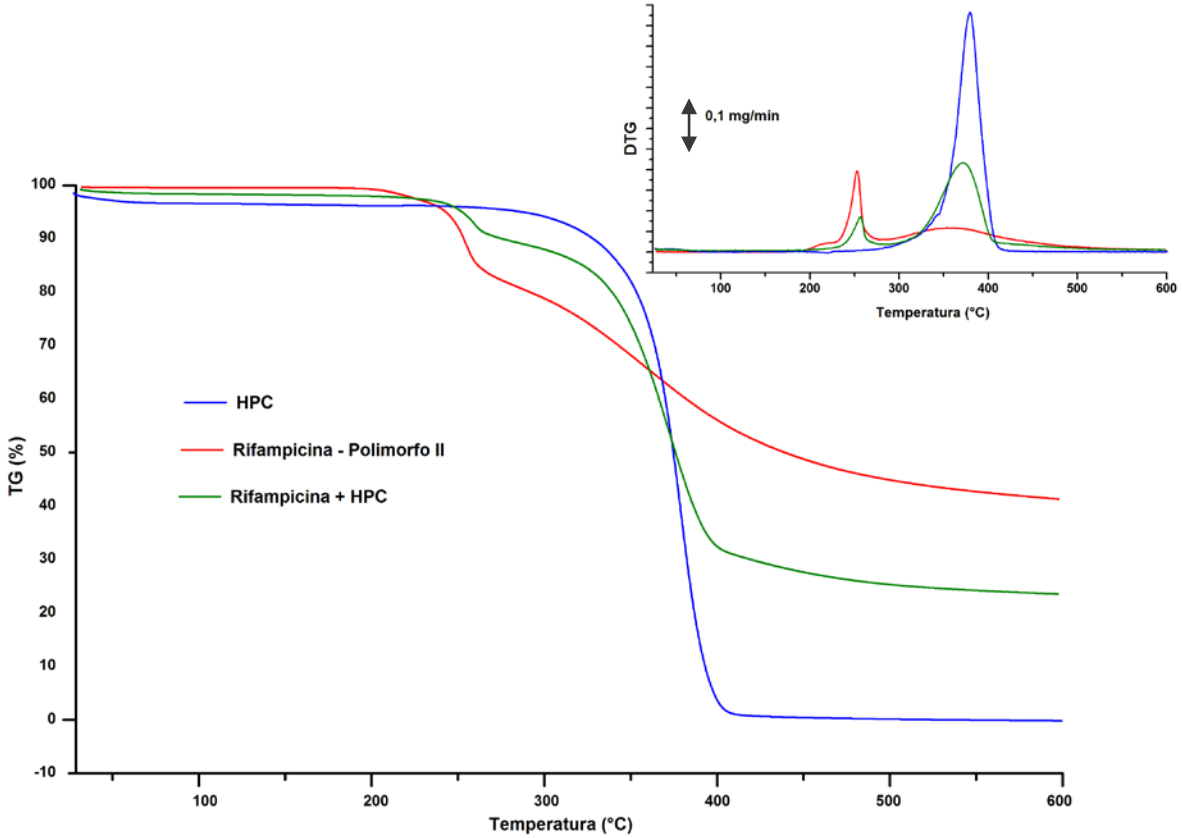


Figura 40- Curvas TG/DTG da rifampicina (polimorfo II), HPC e mistura física rifampicina/HPC obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}.



5.1.4.2. Estudo de compatibilidade entre rifampicina e lecitina

A lecitina é um tensoativo anfotérico usada comumente nas formulações por ser de origem natural, biodegradável além de ser aceita pela FDA e WHO para formulação de medicamentos injetáveis (MIKAEL; INGEGÄRD, 2010). As Figuras 41 e 42 apresentam as curvas de DSC e TG/DTG da lecitina, da rifampicina (polimorfo II) e mistura física rifampicina/lecitina. A lecitina apresenta endotérmica a 132,8ºC (Tpico) que é característica do processo de fusão (CHANDA.H et al., 2011).

Segundo as curvas de TG/DTG, a mistura é termicamente estável até cerca de 200°C temperatura em que inicia sua degradação. A curva de DSC para essa, apresenta evento endotérmico característico do ponto de fusão da rifampicina a 176,7°C (Tpico) seguido de recristalização na primeira exotérmica em 184,3°C (Tpico) e do processo da decomposição térmica que é observado na curva de DSC na temperatura de 225,8°C (Tpico) (AGRAWAL et al., 2004). Observa-se a ausência dos eventos térmicos da lecitina, o qual pode estar atribuído a capacidade de dissolução

da lecitina na rifampicina, visto que esse excipiente apresenta fusão em 132,0ºC (Tpico).

O perfil das curvas DSC e TG/DTG da mistura física rifampicina/lecitina indicou que não houve mudanças significativas quando comparados aos perfis dos componentes observados individualmente, portanto, conclui-se que não há interação entre as espécies.

Figura 41- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), lecitina e mistura física rifampicina/lecitina obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

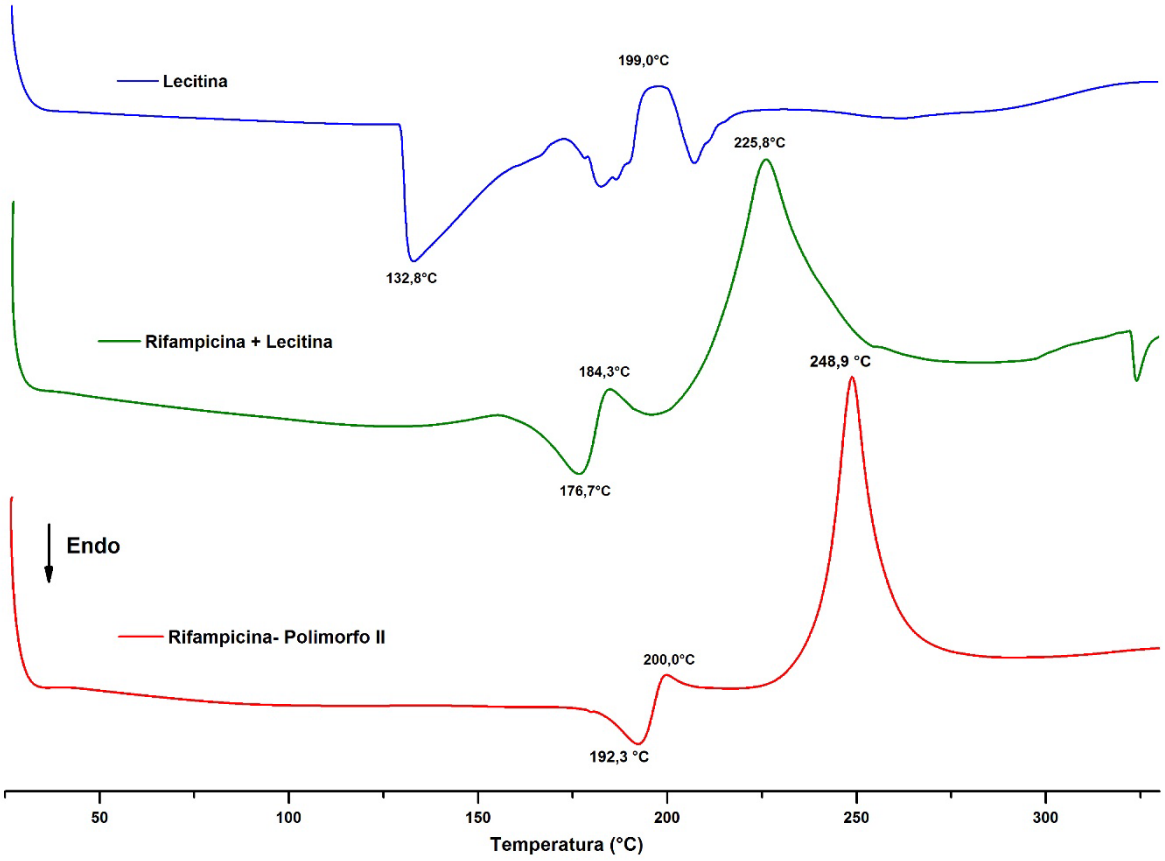
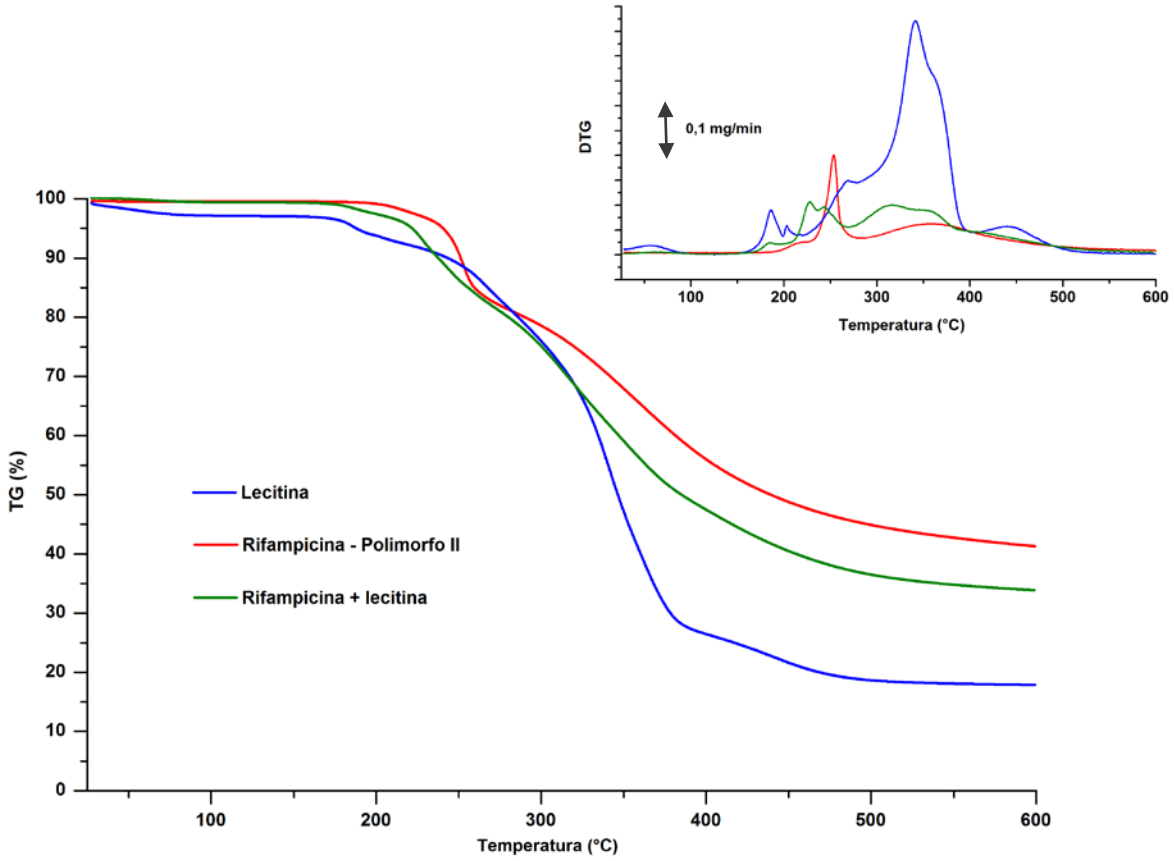


Figura 42- Curvas TG/DTG da rifampicina (polimorfo II), lecitina e mistura física rifampicina/lecitina obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}.



5.1.4.3. Estudo de compatibilidade entre rifampicina e poloxâmero 188 (Lutrol ®F68)

O poloxâmero 188 é tensoativo não iônico usado nas formulações como agente solubilizante ou tensoativo. As Figuras 43 e 44 mostram as curvas de DSC e TG/DTG do poloxâmero 188, da rifampicina (polimorfo II) e da mistura física rifampicina/poloxâmero 188. A curva de DSC para o poloxâmero 188 mostrou evento endotérmico em 51,2°C (Tpico) referente ao processo de fusão seguido de posterior evento exotérmico em 160,5°C (Tpico) devido à decomposição térmica da amostra.

Observa-se que a partir de aproximadamente 320°C inicia-se a perda de massa confirmado pela curva de TG/DTG. As diferenças nas temperaturas de decomposição térmica da amostra de poloxâmero 188 entre os ensaios de DSC e TG/DTG podem ser justificadas pelo fato do ensaio de DSC ter sido realizado em cadinho fechado, enquanto que o ensaio de TG foi realizado em cadinho aberto. No

entanto, as curvas de DSC e TG/DTG da mistura física revelam que não houve alterações significativas nos perfis termoanalíticos.

Figura 43- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), poloxâmero 188 e mistura física rifampicina/poloxâmero 188 obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

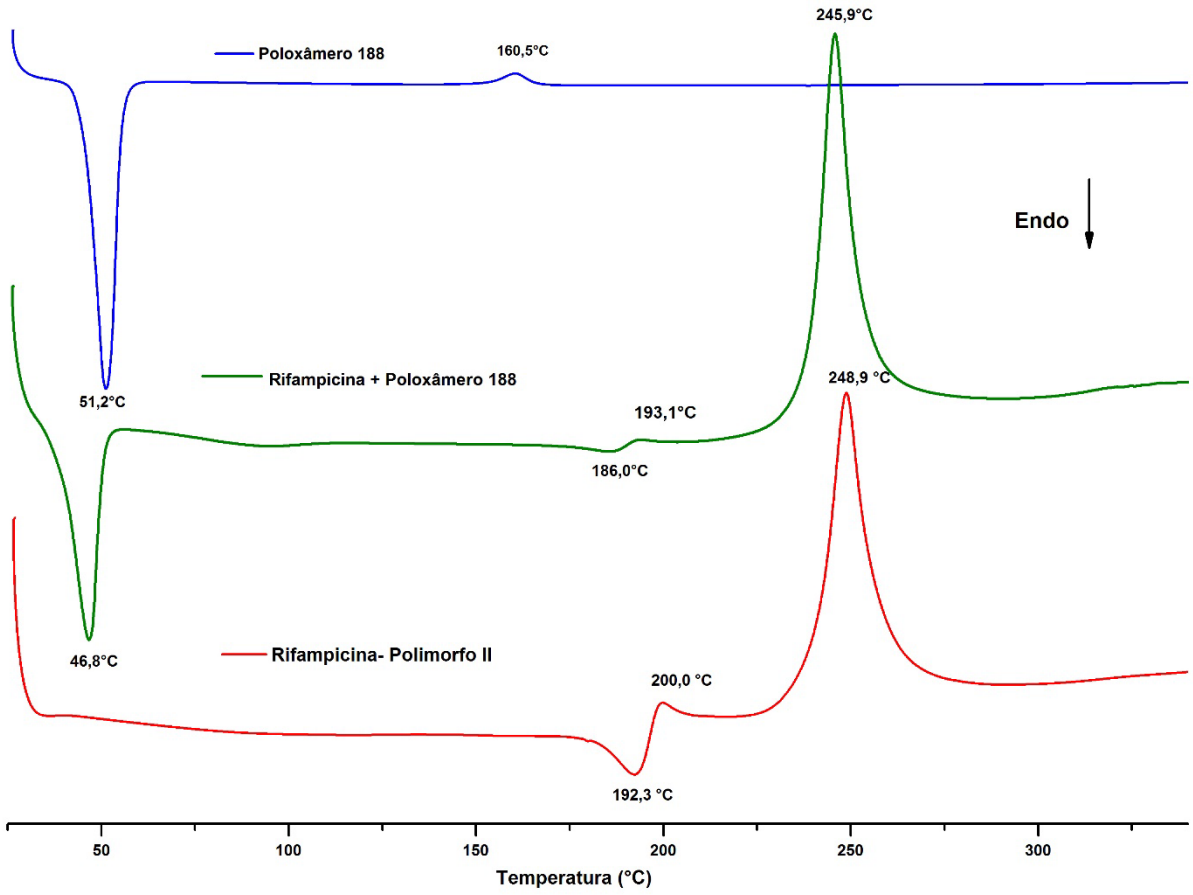
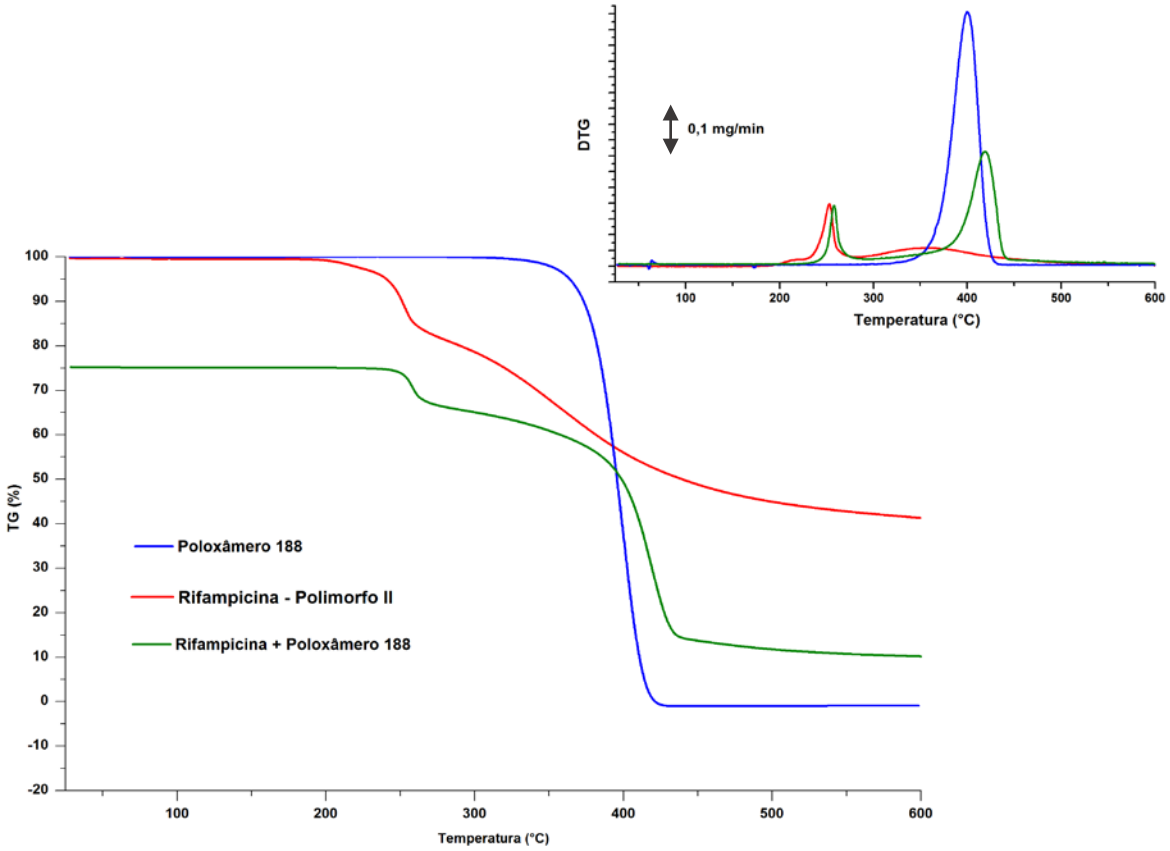


Figura 44- Curvas TG/DTG rifampicina (polimorfo II), poloxâmero 188 e mistura física rifampicina/poloxâmero 188 obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}.



5.1.5. Considerações parciais

O desenvolvimento de formas farmacêuticas inovadoras com maior eficácia terapêutica e segurança para o tratamento da tuberculose é de fundamental importância. Considerando a classificação (SCB) da rifampicina, o aumento da solubilidade desse fármaco tem potencial para aumentar sua biodisponibilidade. Os objetivos propostos pela OMS para erradicação de TB a nível global vencem em 2030. Portanto, espera-se maior preocupação por parte das indústrias farmacêuticas e do governo no sentido de viabilizar e/ou disponibilizar investimentos que permitam alcançar tal objetivo.

Neste sentido, o método de moagem de alta energia revelou a formação de nanocristais de rifampicina. No entanto, a quantidades dessas partículas foi menor que aquele esperado (d10% igual a 4,37 ± 0,02 para F1-M, d10% igual a 1,72 ± 0,04 para F2-M e d10% igual a 3,05 ± 0,02 para F3-M). Além disso, a distribuição do tamanho apresentou elevada polispersividade. Esses resultados indicam instabilidade

do sistema e revelam o principal desafio enfrentado durante todo o trabalho que consistiu em evitar a agregação dos cristais de rifampicina, característica desse fármaco.

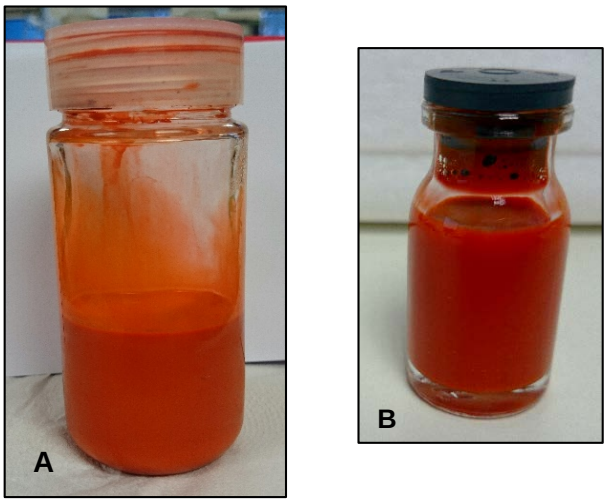
Os resultados de análise térmica (DSC e TG/DTG) para avaliação de compatibilidade fármaco-excipientes demostraram que houve uma somatória dos eventos térmicos nas curvas DSC para todas misturas físicas (rifampicina-HPC, rifampicina-poloxâmero 188 e rifampicina-lecitina). Assim, também as curvas DT/DTG permitiram corroborar a ausência de qualquer tipo de interação e/ou incompatibilidade entre o fármaco e os excipientes. Esses resultados demonstraram que os agentes estabilizantes usados são candidatos promissores para formação de nanocristais.

Desse modo, a preparação de nanocristais de rifampicina pelo método de moagem de alta energia revelou que não foi utilizada energia suficiente durante o processo e, ainda, que a concentração dos tensoativos e polímeros no sistema foi insuficiente para alcançar a estabilidade física da preparação.

5.2. Preparação dos nanocristais empregando homogeneização a alta pressão (HAP)

As formulações obtidas pelo método de homogeneização a alta pressão estão apresentadas na Figura 45. Observa-se a presença de aglomerados na F1-H aderidos na parede do frasco. Tal fenômeno indicou que a preparação não apresentou estabilidade física. A nanosuspensão F2-H apresentou aparência uniforme.

Figura 45- Nanosuspensões de rifampicina obtidas por homogeneização a alta pressão. A: F1-H e B: F2-H.



5.2.1. Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser

A Tabela 23 e a Figura 46 e 47 apresenta a distribuição granulométrica das partículas das nanosuspensões obtidas por homogeneização a alta pressão. A avaliação do tamanho foi efetuada pelo método úmido de difração a laser (DL). A obscuração teve valor maior que 10%.

Tabela 23- Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% da rifampicina matéria-prima e dos nanocristais. n=10.

Amostra	d 10% (µm)	d 50% (µm)	d 90% (µm)	Diâmetro médio (µm)	Obscuração
Rifampicina	35,17 ± 0,04	48,86 ± 0,03	66,77± 0,04	50,08 ± 0,03	22,10 ± 0,32%
F1-H (sem ultrassom)	2,23 ± 0,06	6,18 ± 0,07	12,16 ± 0,34	6,85 ± 0,16	29,20 ± 2,94%
F1-H (com ultrassom)	0,07 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,60 ± 0,03	0,30 ± 0,01	17,00 ± 0,00%
F2-H	0,07± 0,00	0,33 ± 0,01	0,98± 0,02	0,45 ± 0,01	25,30 ± 1,16%

O tamanho médio das partículas para F1-H foi de 6,89 ± 0,06 µm, com valor d10% de 2,25 ± 0,02 µm. Esses resultados indicaram a redução no tamanho das partículas quando comparada ao tamanho inicial da rifampicina matéria-prima (Tabela 23). No entanto, as primeiras partículas detectadas no equipamento foram acima de 0,8 µm, determinando-se ainda baixa proporção de partículas na escala nanométrica.

De maneira contrastante, a F2-H apresentou tamanho médio igual a 0,44 ± 0,01 µm e d10% igual a 0,07± 0,01 µm. Esse resultado indicou redução elevada e característica homogênea do tamanho das partículas do fármaco. As partículas detectadas estão abaixo do seu limite inferior, 400 nm, o que indica formação elevada de nanocristais.

Figura 46- Distribuição granulométrica da F1-H dos nanocristais de rifampicina. n=10

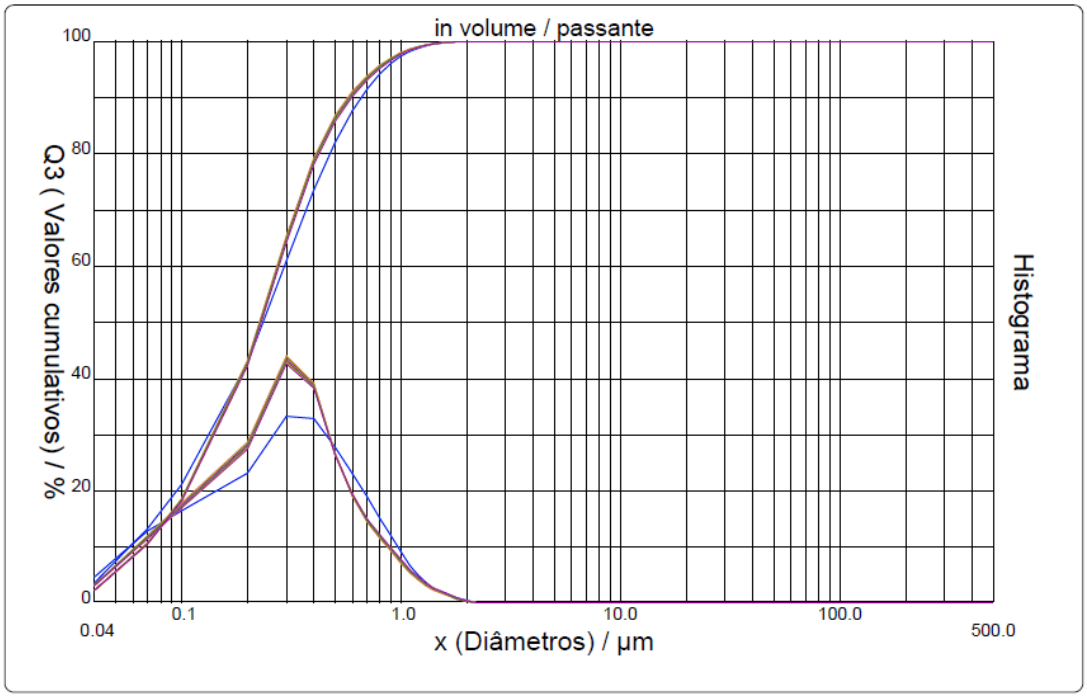
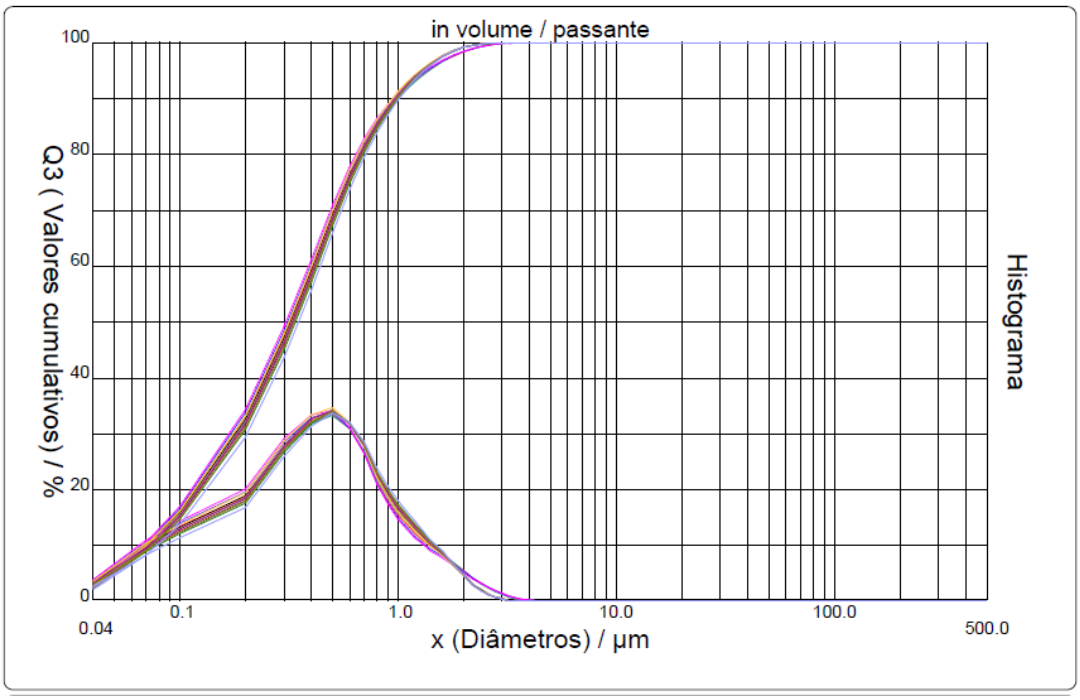


Figura 47- Distribuição granulométrica da F2-H dos nanocristais de rifampicina. n=10



5.2.2. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais

Os resultados da determinação desses parâmetros estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) das formulações F1-H e F2-H de nanocristais de rifampicina.

Amostra		DHM (d. nm)	IP	PZ (mV)
F1-H	**T_0**	31,05 ± 2,85	0,27 ± 0,03	-20,70 ± 0,52
	T_{24}	524,30 ± 11,31	0,31 ± 0,03	-18,05 ± 2,85
F2-H		412,60 ± 4,12	0,12 ± 0,02	-9,94 ± 0,19

T_0: imediatamente após a preparação. **T_{24}**: após 24 horas

O DHM para a F1-H, contendo poloxâmero 188 como tensoativo, foi de 31,05 ± 2,85 nm imediatamente após a sua preparação (T_0). No entanto, no dia seguinte (T_{24}) foi observada presença de partículas na parede do frasco indicando a não-estabilidade do sistema. Nesse intervalo de tempo, o tamanho foi de 524,30 ± 11,31 nm. Tendo em vista maior entendimento do fenômeno ocorrido, foi realizada avaliação empregando método DL com e sem ultrassom. Esse método com ultrassom revelou diâmetro médio de 0,30 ± 0,01 µm, com d10% de 0,07 ± 0,01 µm.

A mudança significativa de tamanho, após 24 horas, pode ser explicada pelo fenômeno de maturação, também chamado de fenômeno de Ostwald, responsável pelas alterações do tamanho e distribuição das partículas (NUTAN, REDDY,2009). Esse fenômeno se refere ao crescimento de partículas maiores a partir de partículas menores (nanocristais).

As partículas menores possuem maior solubilidade de saturação e velocidade de dissolução quando comparadas às maiores, de acordo com a equação Ostwald–Freundlich. Assim, forma-se solução saturada de fármaco em torno das partículas maiores. Esta sobressaturação ocasiona gradiente de concentração entre ambos os tipos de partículas no sistema conduzindo a posterior recristalização do fármaco sobres as partículas maiores, formando os agregados. Esse processo continua até que quase todas as partículas menores se dissolvam permitindo o aumento de tamanho das partículas maiores ao longo do tempo.

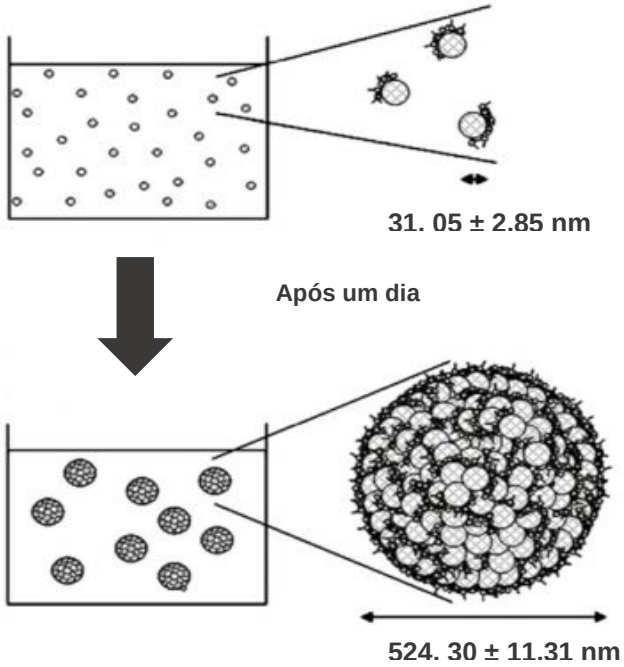
O fenômeno poderia ser evitado se a distribuição do tamanho fosse estreita, ou seja, se o tamanho das partículas apresentasse uniformidade (PATRAVALE, DATE, KULKARNI, 2004). Dessa maneira, seria possível minimizar a diferença da solubilidade de saturação e do gradiente de concentração do fármaco no meio dispersante.

A escolha do tipo de agente estabilizante também é de fundamental importância uma vez que ele não pode influenciar demasiado na solubilidade do fármaco. Sua função é permanecer adsorvido na superfície do nanocristal reduzindo a tensão interfacial entres as partículas sólidas e o meio dispersante. A solubilidade, a temperatura e a agitação mecânica também podem influir no surgimento do fenômeno de Ostwald (MCCLEMENTS, 2004).

Estudo conduzido para nanosuspensões de ibuprofeno usando tensoativos como lauril sulfato de sódio, Tween® 80 e poloxâmero 188, demonstrou correlação entre a solubilidade do fármaco em soluções com esses agentes e o tamanho das partículas (distribuição polidispersa) obtidas imediatamente após sua obtenção. O aumento do agente estabilizante no meio dispersante pode contribuir para o aumento de tamanho das partículas desde que aumente a solubilidade das partículas pequenas, conseguindo uma variação do tamanho final das partículas (VERMA, GOKHALE, BURGESSA,2009).

Assim, a homogeneização a alta pressão, para a formulação contendo elevada concentração de poloxâmero (4%p/p) em relação a rifampicina (p/p), permitiu o aumento da solubilidade das partículas nanométricas. Essa solubilização permitiu a formação de agregados observados após 24 horas de preparo (Figura 48)

Figura 48- Esquema do mecanismo de aglomeração da F1-H após um dia de obtenção empregando homogeneização a alta pressão. Adaptado de (PONGPEERAPAT et al., 2008).



A F2-H contendo Povacoat™, polímero derivado de PVA, como agente estabilizante, apresentou DHM igual a 412,60 ± 4,12 nm, tamanho que é similar ao obtido pelo método DL: 440,00 ± 0,01 nm.

O poloxâmero 188 e o Povacoat™ (derivado do PVA) proporcionam estabilidade estérica, pelo efeito de solvatação. Esses polímeros são adsorvidos na superfície das partículas do fármaco por meio de dois segmentos (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). O primeiro, denominado segmento de estabilização, é solúvel no meio de dispersão e produz a repulsão estérica. A medida que esse segmento se estende desde a superfície da partícula até a certa distância para dentro do meio de dispersão, esse interage fortemente com outras partículas dispersas.

O segundo segmento, denominado de camada de ancoragem, refere-se à porção do polímero que se encontra solvatado e aderido às partículas. Esse se estende ao longo da superfície dessas, formando camada fortemente ligada às partículas (NUTAN, REDDY,2009).

A adequada estabilidade estérica é alcançada se os agentes estabilizantes são adsorvidos na superfície da partícula, formando corretamente a camada de ancoragem, e ainda, se existe adequada solvatação entre o meio dispersante e o segmento de estabilização do nanocristal (KIM, 2004).

Condição adicional refere-se à estrutura e massa molecular do agente estabilizante a ser usado uma vez que o segmento de estabilização formado pelos polímeros deve ser suficientemente longa e densa para manter adequada barreira estérica, capaz de minimizar a interação entre os nanocristais (CHIO,2005). Os agentes estabilizantes com elevada massa molecular são excelentes estabilizantes estéricos (CANELAS, BETTS, DESIMONE, 1996). O comprimento da cadeia deverá ser suficiente para superar as forças de Van der Waals (DENG, HUANG, LIU, 2010).

A F1-H apresentou potencial zeta igual a -20,70 ± 0,52 mV, imediatamente após o preparo e -18,05 ± 2,85, após 24 horas. A perda de estabilidade foi observada na formação de agregado e demostrado nas leituras de DL e de DLS. Essa instabilidade é explicada pela baixa massa molecular do poloxâmero 188 (7680-9510 g/mol), motivo pelo qual houve a formação de camadas de estabilização muito finas permitindo posterior agregação.

O resultado do potencial zeta para a F2-H foi de -9,94 ± 0,19 mV. Esse valor pode indicar não adequada estabilidade da formulação em função do valor, em

módulo, ser abaixo de $|30|$, valor normalmente assumido para estabilidade. No entanto, a estabilidade no tempo (3 meses) indicou que a formulação foi estável devido ao uso do Povacoat®, como agente estabilizante. Este polímero possui massa molecular de 40.000 g/mol, permitindo a formação de camadas longas e densas ao redor das partículas que impedem o contato entre os nanocristais.

5.2.3. Liofilização das nanosuspensões

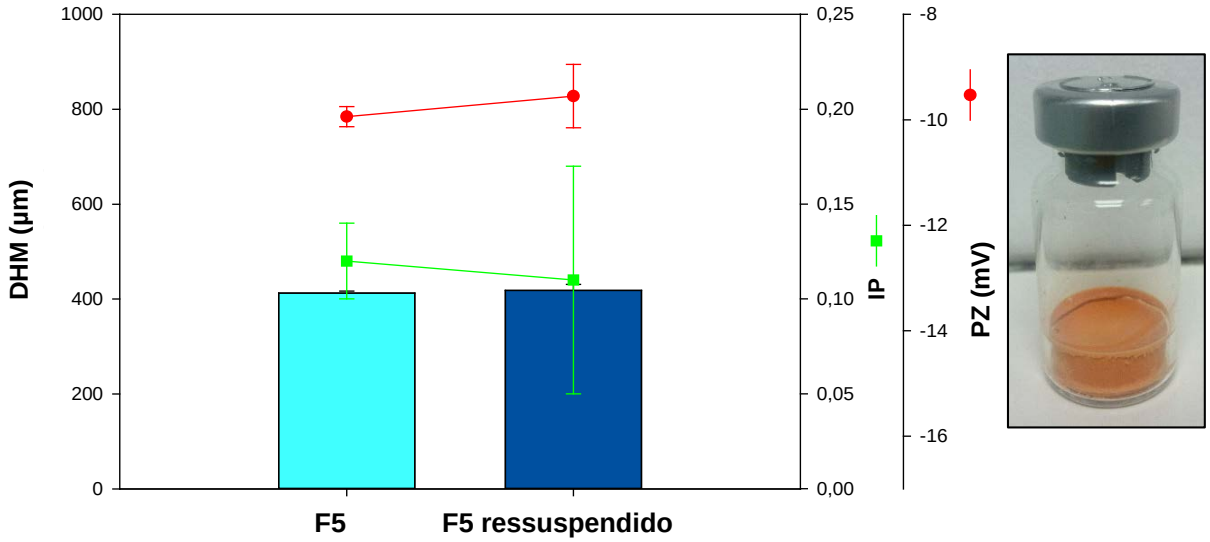
A liofilização da F2-H foi efetuada sem crioprotetor, resultando em liofilizado com aparência uniforme. Como em todas as avaliações de liofilizados, foram observados o volume final da pastilha e a aparência do *cake* (Figura 49), sendo que ambos foram cumpridos com excelentes resultados.

O liofilizado foi reconstituído no mesmo volume de água que foi removido da formulação. Foram avaliados, após a reconstituição, o diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), o índice de polidispersividade (IP) e o potencial zeta (PZ). Os resultados estão apresentados na Tabela 25. Os resultados indicaram que não houveram alterações significativas nessas características após a liofilização.

Tabela 25- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais na formulação F2-H reconstituída após liofilização.

Fórmula	DHM (d. nm)	IP	PZ (mV)
F2-H	412,60 ± 4,12	0,12 ± 0,02	-9,94 ± 0,19
F2-H após reconstituição*	418,10 ± 12,87	0,11 ± 0,06	-9,55 ± 0,60

Figura 49- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais na formulação F2-H reconstituída após liofilização.



5.2.4. Análise morfológica e tamanho dos nanocristais empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A F2-H, em nanosuspensão, e imediatamente após a liofilização, foi avaliada (Figuras 50 e 51). Observa-se a morfologia aproximadamente esférica dos nanocristais de rifampicina e a ausência de agregados. O programa Imagen.j determinou partículas entre os tamanhos de 215,90 nm e 547,13 nm. Esses valores estão dentro dos tamanhos de partículas determinados pelos métodos DL e DLS. Observa-se claramente que as partículas se encontram na escala manométrica.

Figura 50- Fotografia MET (um) das partículas de F2-H obtida por homogeneização a alta pressão. **A:** Ampliação 6000x e **B:** Ampliação 10000x.

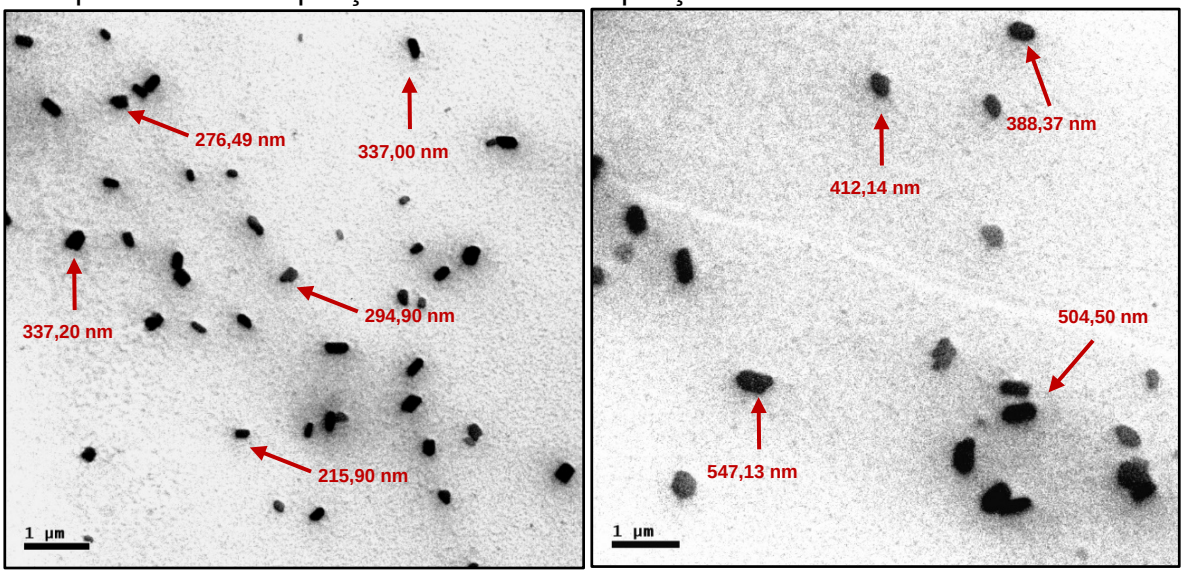
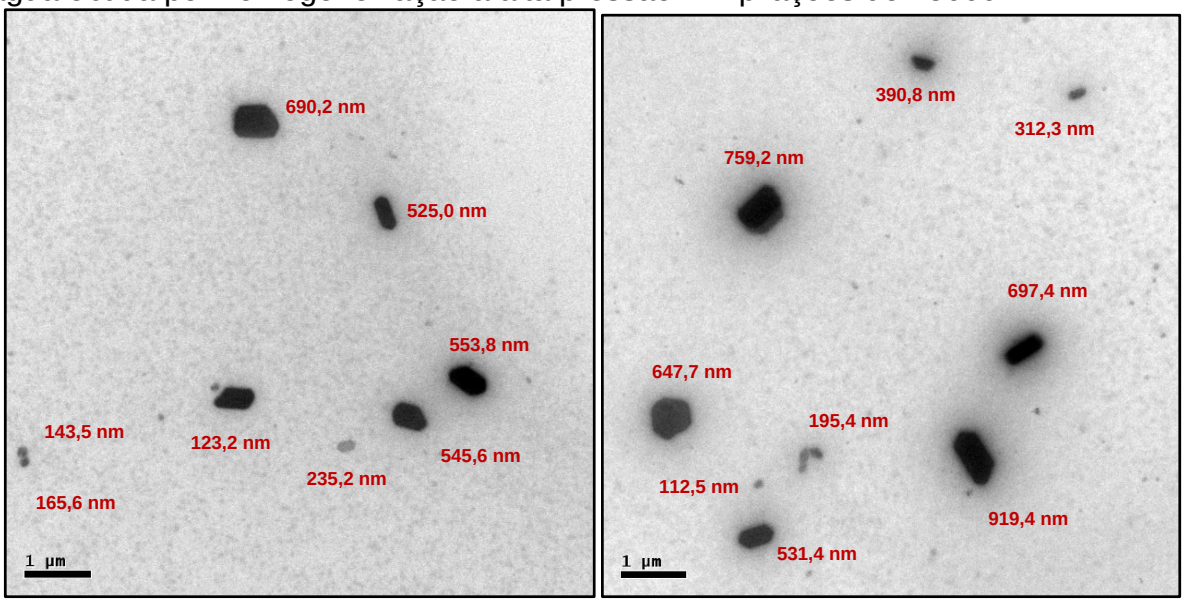


Figura 51- Fotografia MET (um) das partículas de F2-H liofilizada e reconstituída em água obtida por homogeneização a alta pressão. Ampliações de 15000x.



5.2.5. Estudos de compatibilidade fármaco- excipiente

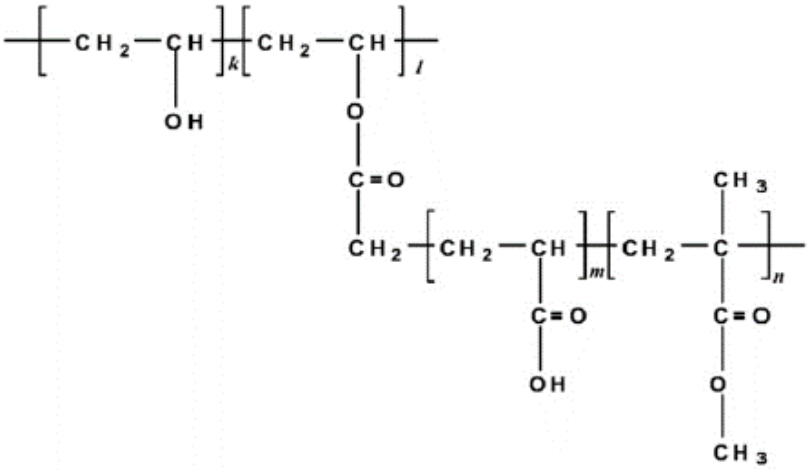
Os tensoativos usados para a obtenção de nanosuspensões de rifampicina pelo método de homogeneização a alta pressão foram o poloxâmero 188 (Lutrol ®F68) e o Povacoat™, derivado do polímero PVA. Para a determinação possíveis incompatibilidades entre esses compostos e o fármaco foram obtidas as curvas de DSC e TG/DTG do fármaco, de cada excipiente e das respectivas misturas físicas. O

estudo de compatibilidade com o poloxâmero foi anteriormente determinado (método de moagem de alta energia).

5.2.5.1. Estudo de compatibilidade rifampicina e Povacoat™

Esse copolímero semissintético de PVA, polivinil álcool/ ácido acrílico/ metacrilato de metilo (Figura 52) é considerado novo excipiente farmacêutico. O tipo F apresenta massa molecular de 40.000 g/mol e é usado como filme de revestimento, ligante da granulação úmida e matriz em dispersões sólidas, segundo o fabricante. Possui elevada solubilidade em água.

Figura 52- Estrutura química do Povacoat™



As Figuras 53 e 54 mostram as curvas de DSC e TG/DTG do polímero, da rifampicina polimorfo II e da mistura física, respectivamente.

A curva de DSC para o Povacoat™ (Figura 52) mostrou evento endotérmico em 199,5°C (Tpico) referente a formação de anidro cíclico por meio da condensação do éster intramolecular (LIN, WEI, 2011). Nesse ensaio não se aprecia o evento endotérmico característico do polímero correspondente a transição vítrea: 40,0°C até 130,0°C aproximadamente. Observa-se que a partir de aproximadamente 220,0°C inicia-se a perda de massa, confirmada pela curva de TG/DTG (XU, et al.,2014).

A curva DSC para mistura física apresenta endotérmica em 182,6ºC (Tpico), evento típico do processo de fusão seguido da recristalização da rifampicina representada pela primeira exotérmica em 193,0ºC (Tpico). Observa-se segunda e terceira exotérmicas em 233,7ºC e 245,0°C (Tpico). A mistura é termicamente estável

até cerca de 176,0°C. O perfil das curvas DSC e TG/DTG da mistura física rifampicina/ Povacoat™ não apresentou mudanças significativas quando comparado aos perfis dos componentes observados individualmente. Portanto, conclui-se que não há interação entre as espécies.

Figura 53- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), Povacoat™ e mistura física rifampicina/ Povacoat™ obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

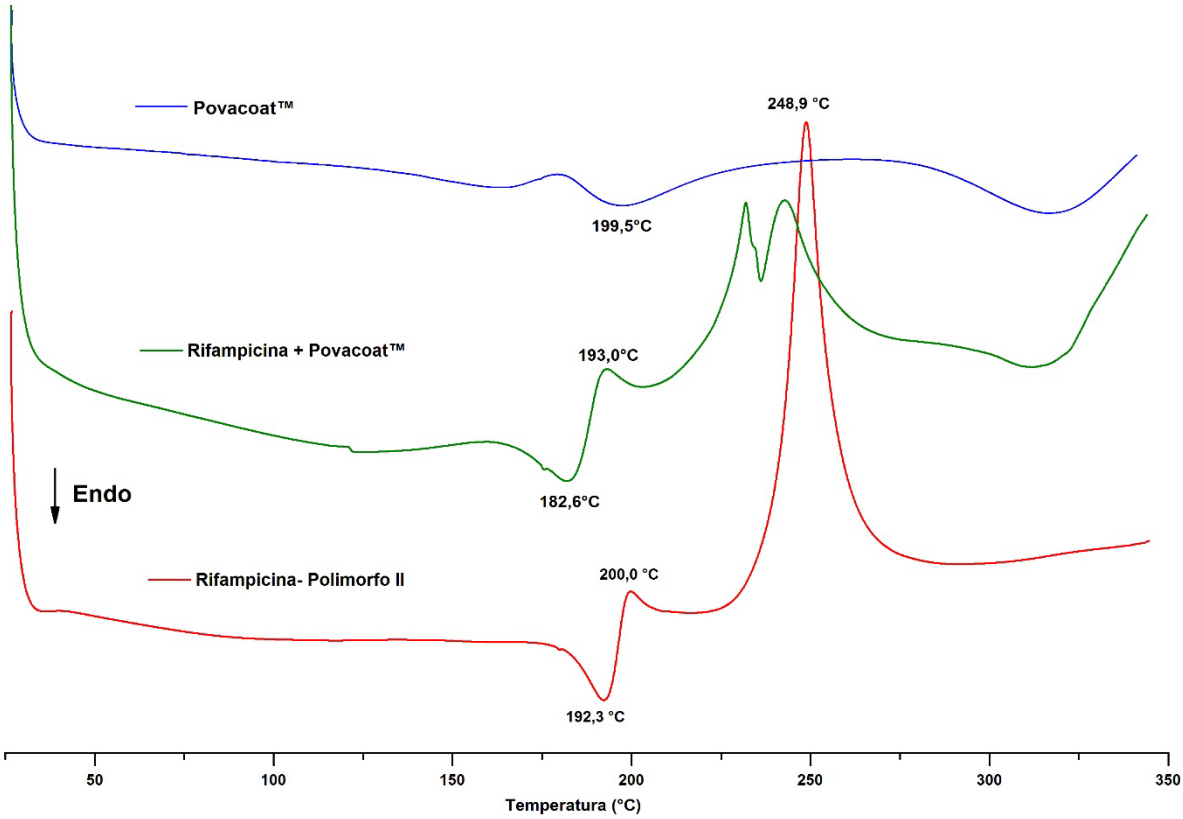
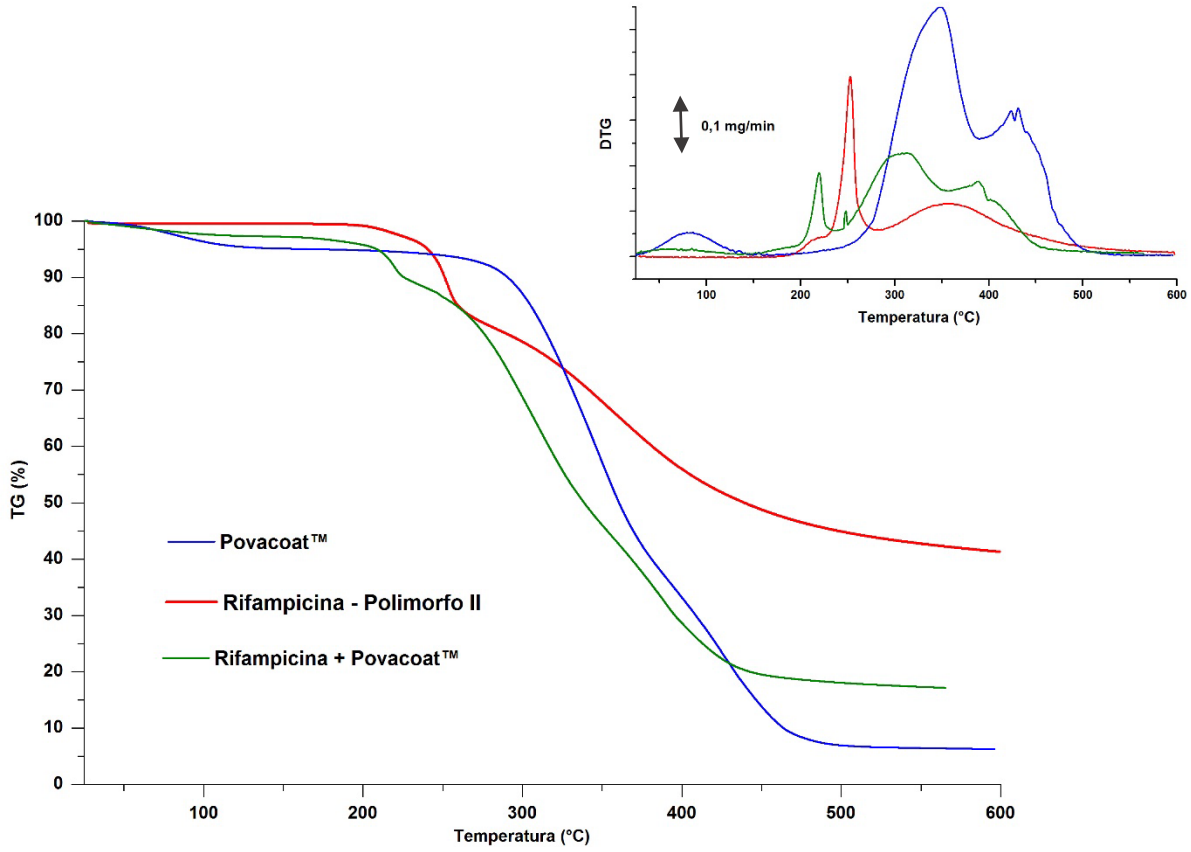


Figura 54- Curvas TG/DTG rifampicina (polimorfo II), Povacoat™ e mistura física rifampicina/ Povacoat™ obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL.min^{-1}.



5.2.6. Analise térmica da formulação obtida por homogeneização a alta pressão

A curva DSC (Figura 55) para F2-H apresenta como primeiro evento a acomodação térmica do sistema a temperatura de 57,2°C (Tpico). O evento endotérmico típico da fusão da rifampicina não é observado indicando possível amorfização do fármaco durante o processo de nanonização. Posteriormente é observado evento exotérmico a 204,6°C. A F2-H é termicamente estável até cerca de 202,0°C. (Figura 56).

Figura 55- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), da mistura física rifampicina/ Povacoat™ e da F2-H obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

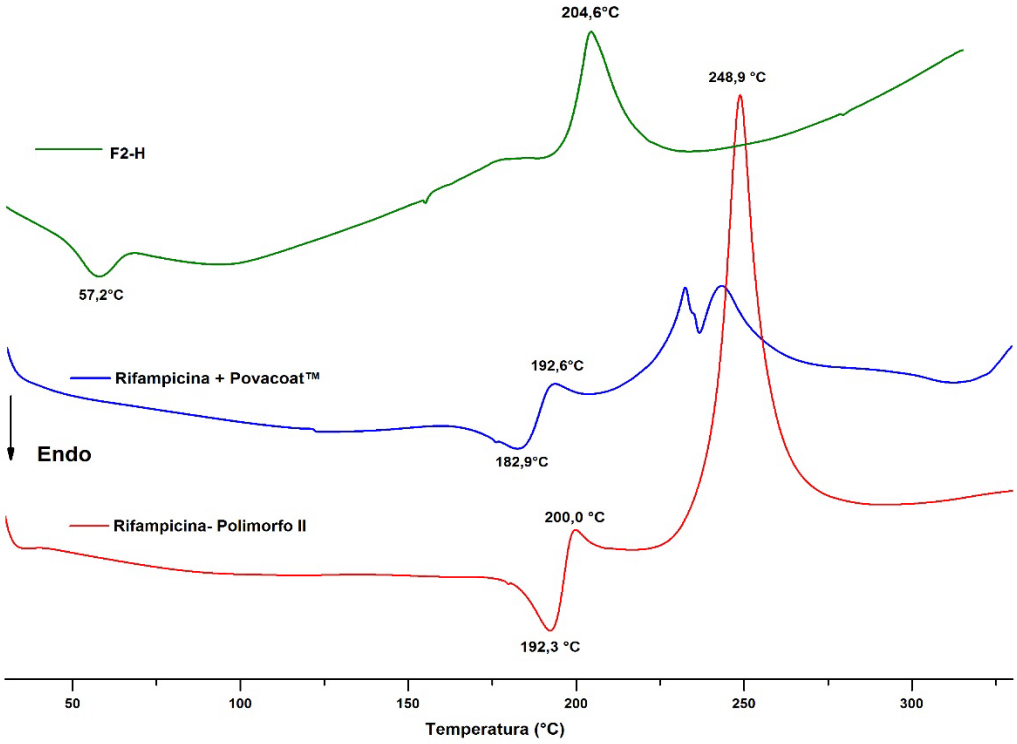
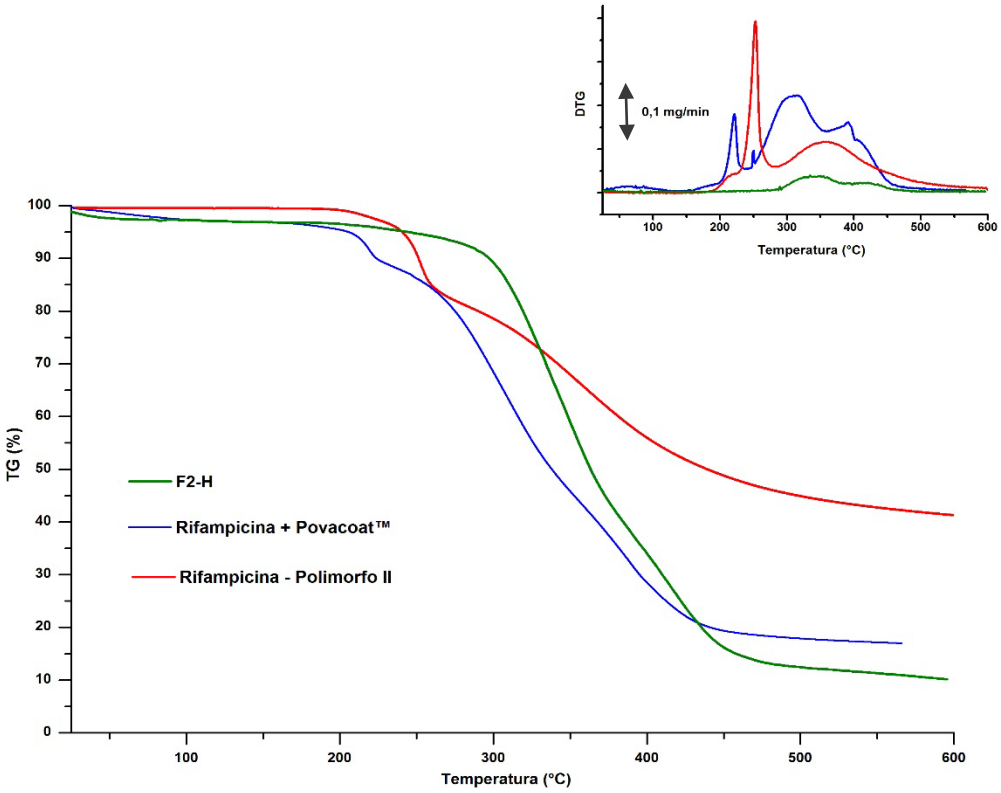


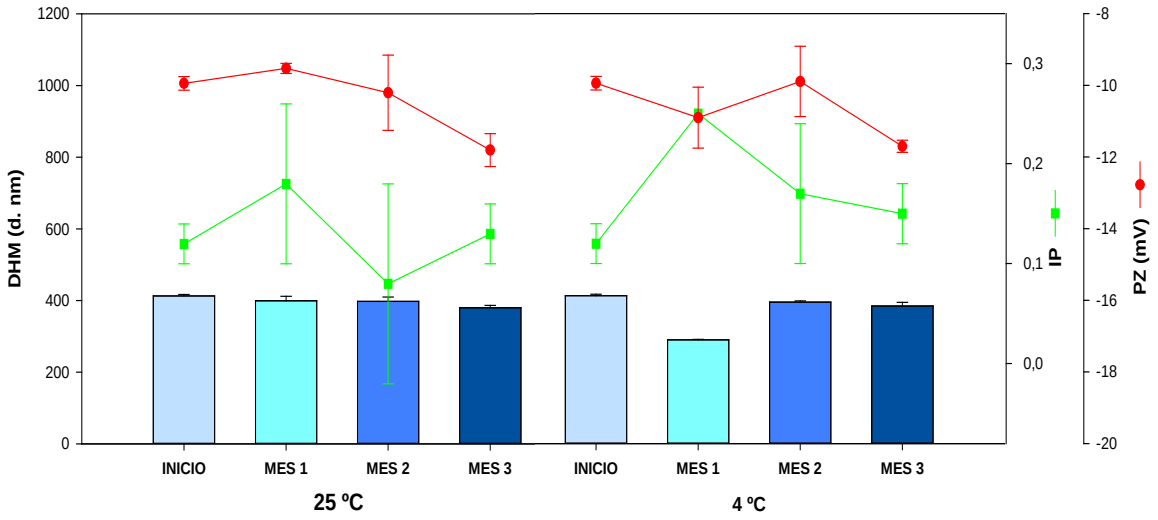
Figura 56- Curvas TG/DTG rifampicina (polimorfo II), da mistura física rifampicina/ Povacoat™ e da F2-H obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}.



5.2.7. Estabilidade física da nanosuspensão no tempo

A estabilidade no tempo da F2-H é apresentada na Figura 57. Observa-se que o tamanho das partículas a 25°C não apresenta variação significativa do tamanho e potencial zeta, durante período de 3 meses. Sob refrigeração, temperatura de 4°C, observa-se no primeiro mês pequena variação do tamanho que não persiste após esse período. Tal fato pode ser justificado em função do procedimento da preparação da amostra. Os resultados na sua totalidade refletem a estabilidade do sistema, que apresenta boa uniformidade no tempo.

Figura 57- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de rifampicina em formulação F2-H durante 3 meses a 25ºC e 4ºC.



5.2.8. Considerações parciais

A homogeneização a alta pressão é uma das tecnologias mais usadas na preparação de nanocristais. Esse método apresentou melhores resultados na preparação de nanocristais em comparação com o método de moagem de alta energia. No entanto, o fator limitante para o uso desse método na preparação de nanocristais foi a necessidade da obtenção de adequada dispersão das partículas micrométricas do fármaco antes de ser submetidas a alta pressão. Tal limitação foi superada com elevada concentração do agente estabilizante (Povacoat™ a 10%).

Os polímeros poloxâmero 188 e Povacoat ™ foram selecionados com base na revisão da literatura. Além disso, as análises térmicas revelaram a ausência de incompatibilidade com o fármaco. As curvas DSC e DT/DTG demostraram que ambos o polímero mantém a característica cristalina do fármaco, polimorfo II, permitindo concluir que são candidatos adequados para preparação de nanocristais de rifampicina.

Os resultados de tamanho e de morfologia do nanocristal corroboram a incapacidade do poloxâmero 188 em manter a estabilidade do sistema. Esse polímero foi utilizado no preparo de nanosuspensão empregando moagem de alta energia (F3-M). Essa nanosuspensão foi aquela que apresento maior estabilidade física entre as três nanosuspensões preparadas com diferentes agentes estabilizantes. Portanto, esse esse agente estabilizante foi selecionado para a preparação de nanosuspensão pelo método de homogeneização a alta pressão com incremento da concentração (de 1 para 4%p/p) visando obter melhor estabilidade física da preparação e ausência de agregados. Os resultados obtidos demonstraram que tais objetivos não foram alcançados. Entretanto, a nanosuspensão preparada com o polímero Povacoat™, revelou excelente resultados quanto ao tamanho, morfologia e estabilidade no tempo. No entanto, a elevada concentração de Povacoat™ (10% p/p) poderia elevar a toxicidade da preparação..

Considerando o insucesso dos métodos anteriores na obtenção de preparações de nanocristais estáveis, foi selecionado terceiro método: moagem via úmida em escala reduzida. A adoção desse método, simples e economicamente viável, permitiu corrigir os problemas detectados na preparação de nanocristais de rifampicina empregando os métodos de moagem de alta energia e homogeneização a alta pressão.

5.3. Preparação de nanocristais empregando moagem via úmida em escala reduzida

A preparação das nanosuspensões de rifampicina pelo método de moagem via úmida em escala reduzida revelou ser simples e rápida. Foi possível verificar em período de 5 dias o tamanho do fármaco foi reduzido. Foram efetuados três ensaios de superfície de resposta visando determinar as variáveis do processo de nanonizacão. As formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico

médio (DHM), o potencial zeta (PZ) e o índice de polidispersividade (PD). Tal abordagem permitiu determinar que a velocidade de agitação na faixa entre 800 e1100 rpm e o tempo de agitação na faixo entre 3 e 7 dias não interferem na redução do tamanho das partículas. A concentração de Povacoat™ na faixa entre 1-3% p/p permitiu a correta formação de suspensões iniciais do fármaco.

Para concentrações entre 5 e 7 % p/p do fármaco e entre 10 e 30% de esferas de zircônia foi observada a formação de agregados (Figura 58). A Tabela 26 apresenta as formulações desenvolvidas durante o segundo ensaio de superfície de resposta, na etapa preliminar. Dessa maneira, os critérios de DHM, PZ e PDI foram determinantes para discriminar os parâmetros.

Tabela 26- Avaliação da agregação e precipitação dos nanocristais de rifampicina.

Formulação	Rifampicina (%p/p)	Zircônia (%p/p)	Povacoat (%p/p)	RPM	Observação
1	6	30	3	950	Precipitados
2	5	20	2	1100	Precipitados
3	6	20	1	1100	-
4	7	20	3	950	Agregados
5	6	30	2	1100	-
6	6	20	3	800	-
7	6	20	2	950	-
8	5	20	3	950	Precipitados
9	5	20	2	800	-
10	6	10	2	800	-
11	6	20	3	1100	-
12	7	20	2	800	Agregados
13	5	20	1	950	-
14	5	30	2	950	-
15	6	10	2	1100	-
16	7	20	1	950	Agregados
17	7	30	2	950	Agregados
18	7	20	2	1100	Agregados
19	6	20	1	800	-
20	5	10	2	950	-
21	7	10	2	950	Agregados
22	6	20	2	950	-
23	6	20	2	950	-
24	6	30	2	800	Precipitados
25	6	10	1	950	-
26	6	30	1	950	Agregados
27	6	10	3	950	-

Figura 58- Nanosuspensões de rifampicina obtidas por moagem via úmida em escala reduzida com presença de agregados e precipitados.

5.3.1. Otimização do processo de preparação dos nanocristais de rifampicina empregando planejamento de experimentos por superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste de método estatístico eficaz e poderoso para otimizar processos. O uso desse método visa reduzir o número de ensaios experimentais, reduzindo consequentemente o tempo do desenvolvimento dos nanocristais e a quantidade de matéria-prima. Adicionalmente, esse método permite identificar interações e parâmetros críticos do processo.

A metodologia envolve três fases: (1) a elaboração de projeto rotativo composto central; (2) a modelagem de superfície de resposta por meio de análise de regressão; e (3) a otimização do processo usando os modelos de superfície de resposta (WANG et al., 2012).

Para o presente trabalho, foram necessários apenas 15 experimentos (incluindo 3 pontos centrais) para a avaliação da influência da concentração de Povacoat™, das esferas de zircônio e da rifampicina nas respostas (DHM, PDI e PZ). Com este estudo foi possível obter base racional científica para o entendimento do processo de nanonização. Adicionalmente, foi possível construir modelos matemáticos tendo em vista a otimização do tamanho dos nanocristais de rifampicina.

A Tabela 27 apresenta os resultados de DHM, PDI e PZ obtidos para os 15 experimentos. Este método incluiu faixa de concentrações das variáveis independentes rifampicina 3-5% p/p, Povacoat™ 1-3% p/p e esferas de zircônio 10-

20%. O resultado desse planejamento revelou que para a obtenção de valores de DHM menores, a concentração ideal de Povacoat™ é entre 2,5 e 3,0% p/p e rifampicina em concentrações < 3,5% p/p.

Tabela 27- Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta dos nanocristais de rifampicina na matriz de ensaios do planejamento de experimentos por superfície de resposta.

F	Ordem ensaio	Rifampicina (%P/P)	Zircônio (%P/P)	Povacoat™ (%P/P)	DHM (nm)	DHM DP	IP	IP DP	PZ (Mv)	PZ DP
8	1,00	5,00	15,00	3,00	362,90	5,53	0,14	0,06	-9,53	0,24
14	2,00	4,00	15,00	2,00	356,40	4,55	0,16	0,02	-10,10	0,15
10	3,00	4,00	20,00	1,00	442,40	8,90	0,25	0,02	-9,35	0,28
4	4,00	5,00	20,00	2,00	390,90	20,82	0,11	0,06	-9,20	0,09
5	5,00	3,00	15,00	1,00	401,60	0,32	0,18	0,04	-10,10	0,22
15	6,00	4,00	15,00	2,00	340,40	2,08	0,16	0,05	-9,91	0,23
3	7,00	3,00	20,00	2,00	362,90	4,35	0,19	0,03	-8,83	0,35
13	8,00	4,00	15,00	2,00	384,40	3,69	0,16	0,04	-9,60	0,19
2	9,00	5,00	10,00	2,00	393,30	19,01	0,08	0,06	-9,94	0,18
11	10,00	4,00	10,00	3,00	480,80	10,32	0,25	0,07	-9,76	0,37
12	11,00	4,00	20,00	3,00	330,30	2,64	0,17	0,01	-9,72	0,26
7	12,00	3,00	15,00	3,00	336,60	1,64	0,20	0,01	-9,81	0,26
1	13,00	3,00	10,00	2,00	407,20	4,45	0,19	0,03	-8,82	0,35
9	14,00	4,00	10,00	1,00	421,80	14,04	0,18	0,04	-9,35	0,46
6	15,00	5,00	15,00	1,00	377,90	6,95	0,24	0,02	-9,42	0,32

F: formulação; DHM: diâmetro hidrodinâmico médio de partícula; PZ: potencial zeta; IP: Polidispersividade; DP: desvio padrão.

5.3.1.1. Diâmetro hidrodinâmico médio

A avaliação da adequação do modelo matemático foi feita pela análise de variância (ANOVA) que consiste em método confiável que permite comparar a variação do tratamento (alteração na combinação de níveis variáveis) com a variação causada pelos erros aleatórios inerentes às medidas das respostas geradas (DHM, IP e PZ). Com essa comparação será possível avaliar a significância da regressão usada para prever respostas considerando as fontes de variação experimental. Um modelo será bem ajustado aos dados experimentais se ele apresenta regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa (MYERS, MONTGOMERY, 2009).

Na ANOVA quando o nível de significância denotado pelo valor p, apresenta valor menor que 0,05 (para α=0,05) o modelo obtido é considerado estatisticamente significativo. Portanto, se demostra que os termos no modelo têm efeitos significativos

sobre as respostas. A Tabela 28 apresenta os resultados da ANOVA para DHM. O modelo linear e a significância da interação entre Rifampicina (%p/p) *Zircônio (%p/p), Rifampicina (%P/P) * Povacoat™ (%p/p) e Zircônio (%p/p) * Povacoat™ (%p/p) foram revelados pelo valor-p igual a 0,000 (α=0,05), para cada termo. Portanto, o modelo obtido foi considerado como estatisticamente significativo e adequado, o qual foi reforçado pelo valor- p não significativo para a falta de ajuste (0,484; α=0,05).

Com relação aos resíduos, a suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal e pelo histograma (Figura 59). No gráfico de probabilidade normal, o resíduo é representado em função de seu valor esperado, calculado a partir da suposição de que os estes seguem distribuição normal. Considerando os dados obtidos, a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade, assim como, o histograma, é possível inferir que a suposição de normalidade é válida. O gráfico das observações individuais demonstro o comportamento aleatório dos resíduos (MYERS, MONTGOMERY, 2009).

Apenas a ausência da falta de ajuste não satisfaz a significância do modelo proposto. Ambiente experimental muito ruidoso, expresso por elevada variabilidade, e variáveis importantes que não foram consideradas no experimento podem invalidar o modelo. Dessa forma, a avaliação do desempenho global que inclui o coeficiente de determinação, indicado por R^2, o qual deve ser analisado conjuntamente ao R^2 ajustado, para os graus de liberdade associado, é de fundamental importância. Quando R^2 e R^2 ajustado diferem drasticamente, há indicação de que termos não significativos foram incluídos no modelo (TRINH, KANG, 2011)

Para a avaliação do DHM, os dois valores de R^2 e R^2 ajustado não são significativamente diferentes (Tabela 29). Além disso, os gráficos de probabilidade normal dos resíduos não mostram evidências fortes de desvios da normalidade (Figura 58). Adicionalmente, o R^2 de previsão também não difere substancialmente dos valores de R^2 e R^2 ajustado. Valor maior que 0,8 (80%), para esse coeficiente, indica a probabilidade de que os dados previstos (teóricos) pelo modelo são próximos aos valores práticos. Dessa maneira, o modelo matemático poderá ser utilizado para a otimização do processo permitindo a obtenção dos resultados desejados. Consequentemente, para o DHM, o modelo global de primeira ordem, como observa-se na Equação 7, é considerado significativo e adequado.

Tabela 28- Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	13650,4	1516,71	228,57	0,000
Linear	3	4478,9	1492,96	225,00	0,000
Rifampicina (p/p%)	1	34,9	34,86	5,25	0,070
Zircônio (p/p%)	1	1240,0	1240,02	186,88	0,000
Povacoat™ (p/p%)	1	3204,0	3204,00	482,86	0,000
Interação com 2 Fatores	3	3277,6	1092,53	164,65	0,000
Rifampicina (%P/P) *Zircônio (%P/P)	1	438,9	438,90	66,14	0,000
Rifampicina (%P/P) * Povacoat™ (%P/P)	1	625,0	625,00	94,19	0,000
Zircônio (%P/P) * Povacoat™ (%P/P)	1	2213,7	2213,70	333,62	0,000
Erro	5	33,2	6,64		
Falta de ajuste	3	21,3	7,11	1,20	0,484
Erro puro	2	11,8	5,92	*	*
Total	14	13683,5			

GL: graus de liberdade; SQ seq: soma dos quadrados; SQ aj: soma dos quadrados ajustados; Teste F: estatística F; MQ (aj): média quadrática ajustada. Valor-p: nível de significância

Tabela 29- Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.

Termos	Coeficientes	C-DP	Estatística T	Valor -p	VIF
Constante	359,20	1,49	241,52	0,000	
Rifampicina (p/p%)	2,087	0,911	2,29	0,000	1
Zircônio (p/p%)	-12,450	0,911	-13,67	0,000	1
Povacoat™ (p/p%)	-20,012	0,911	-21,97	0,000	1
Rifampicina (%P/P) *Zircônio (%P/P)	10,47	1,29	8,13	0,000	1
Rifampicina (%P/P) * Povacoat™ (%P/P)	12,50	1,29	9,71	0,000	1
Zircônio (%P/P) * Povacoat™ (%P/P)	-23,52	1,29	-18,27	0,000	1
DP= 2,57959	**R^2= 99,76%**	**R^2 (aj) = 99,32%**	**R^2 (prev) = 97,31%**		

Índices de ajuste do modelo: R_2: coeficiente de determinação; R_2 (aj): coeficiente de determinação ajustado; R_2 (prev): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; DP = desvio-padrão; Valor-p: nível de significância C; DP: coeficientes de desvio padrão.

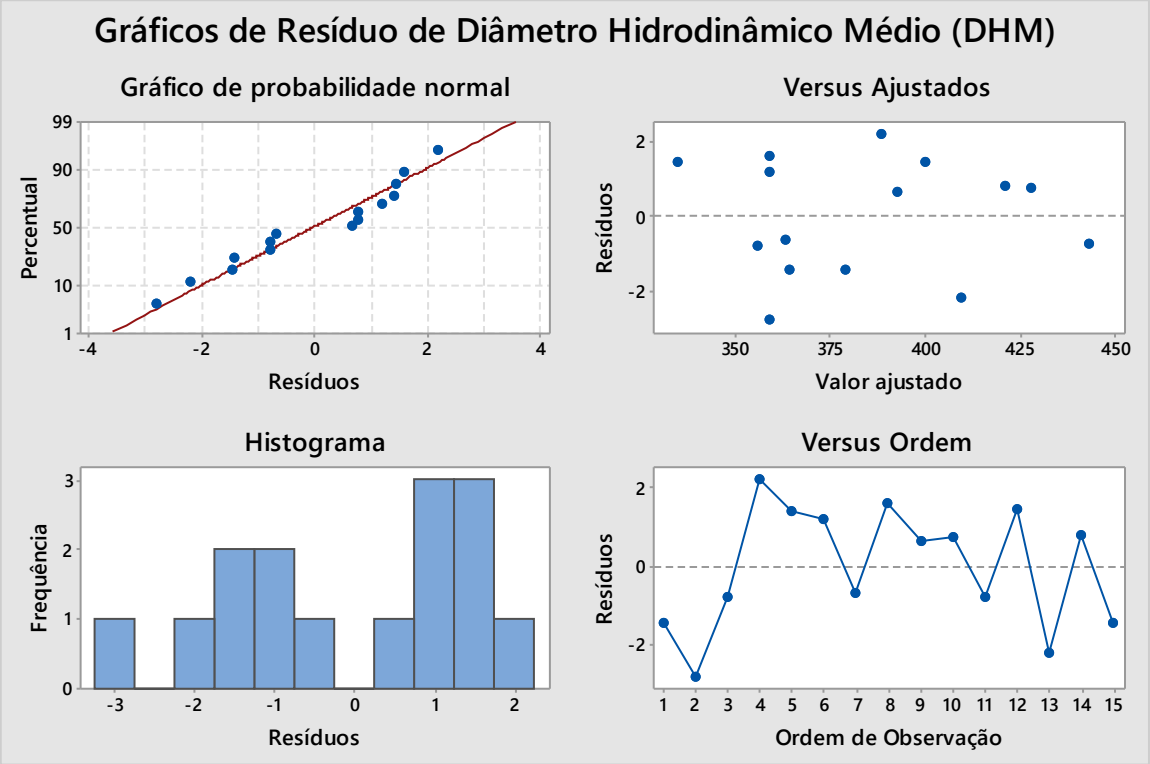
A Equação 7 apresenta o modelo e os coeficientes que descrevem as influências da concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™. É possível afirmar que o Povacoat™ (p/p%) (coeficiente -67,54) contribui de maneira mais eficiente para a redução do DHM se comparado às esferas de zircônio (p/p%) (coeficiente -44,48) e Rifampicina (p/p%) (coeficiente -2,5). Adicionalmente, foi

observado que as interações entre o fármaco – esferas de zircônio e fármaco-polímero resultam em aumento do DHM, pois os fatores de interação apresentam coeficientes positivos de 2,095 e 12,50, respectivamente.

Equação 7
DHM= 799,9 - 2,5 RIF - 44,48 ZIRC - 67,54 POVA - 6,48 RIF * RIF + 1,4340 ZIRC * ZIRC + 17,03 POVA * POVA + 2,095 RIF * ZIRC + 12,50 RIF * POVA - 4,705 ZIRC * POVA

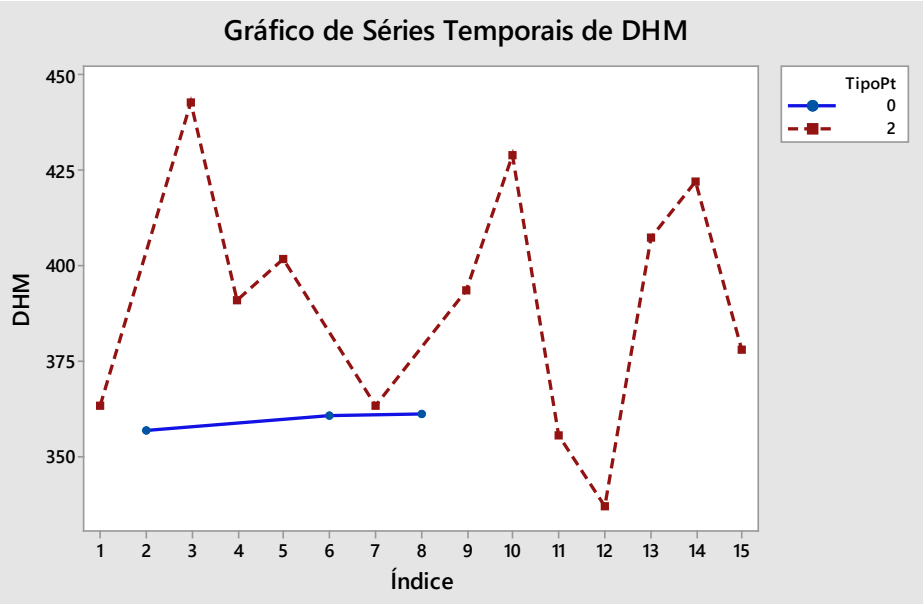
RIF: Rifampicina (p/p%); ZIRC: Zircônio (p/p%) e POVA: Povacoat™ (p/p%)

Figura 59- Gráfico de resíduos da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.



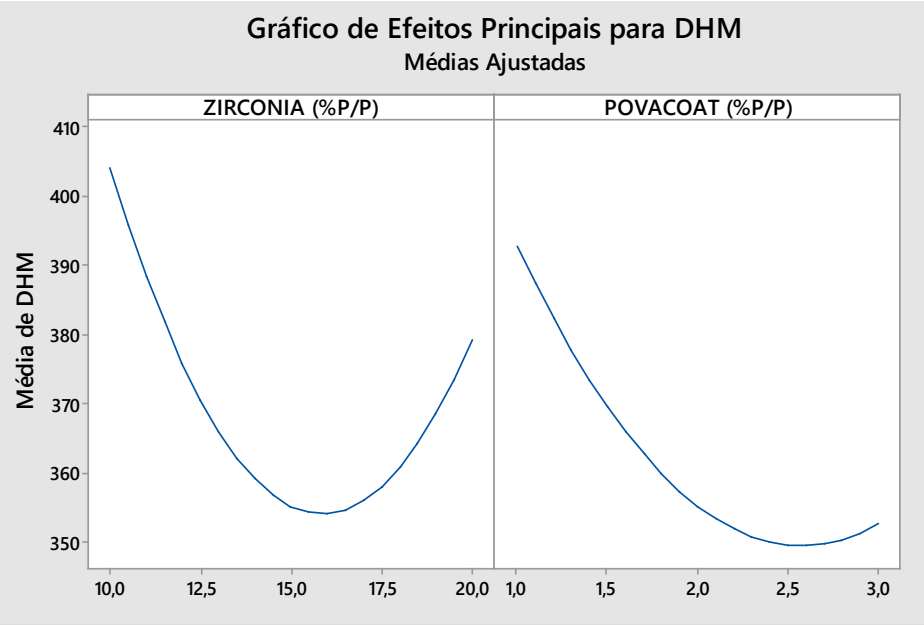
Os pontos centrais apresentaram valores iguais a 356,4, 360,4 e 360,8 nm (Figura 60). Esses pontos podem indicar a estimativa independente do erro experimental. Nesse caso, a diferença entre o maior e o menor valor foi de 4,4 nm. Esse resultado revelou reduzida variabilidade para esse ensaio.

Figura 60- Gráfico de séries temporais da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.



A Figura 61 apresenta o gráfico de efeitos principais esferas de Zircônio (p/p%) e Povacoat™ (p/p%) no DHM dados nanocristais. O resultado do ensaio revelou que as concentrações das duas variáveis influenciam significativamente os valores de diâmetro hidrodinâmico médio das partículas.

Figura 61- Gráfico de efeitos principais para avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.



As Figuras 62 e 63 apresentam respectivamente os gráficos de superfície e de contorno para a resposta em função das variáveis. A análise desses gráficos revelou a região ótima para a maximização da resposta em função das concentrações de cada variável. Quando se fixou a concentração das esferas de zircônio, foram observados valores de DHM entre 340 e 360 nm, para concentração de Povacoat™ entre 1,7- 3,0% p/p e concentração de rifampicina entre 3,0-5,0% p/p (Figura 63). Adicionalmente, esse gráfico evidenciou que valores de DHM menores que 340 nm foram observados para concentrações de 2,5-3,0% p/p de Povacoat™ e concentrações menores que 3,5% p/p de rifampicina (Figura 63).

Figura 62- Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.

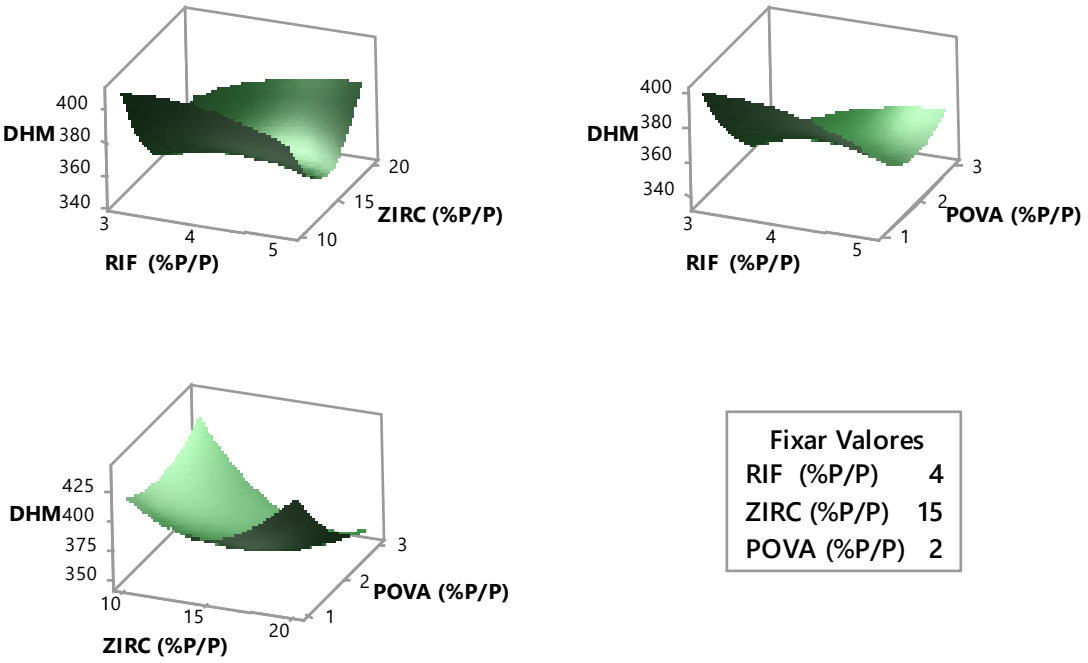
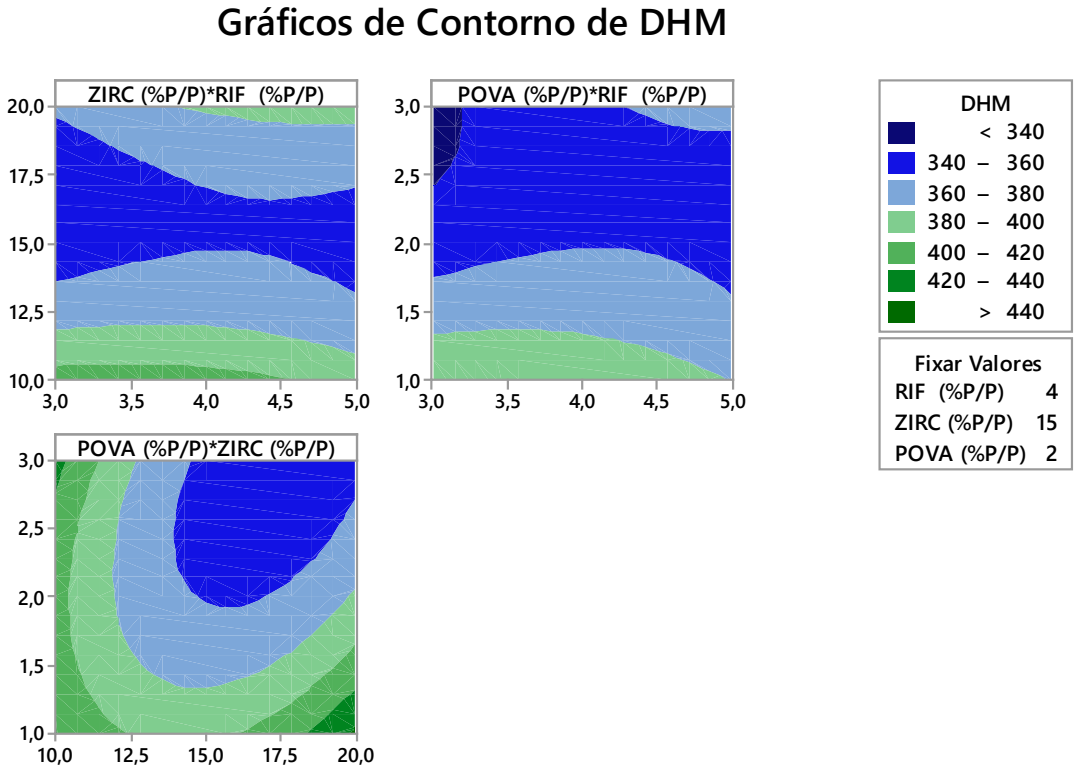


Figura 63- Gráficos de contorno relativo à da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.



5.3.1.2. Otimização do modelo matemático para o diâmetro hidrodinâmico médio (DHM)

No presente trabalho, a influência das concentrações de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™ foi investigada para promover DHM ótimos. A função desejo (*desirability*) é baseada em técnicas de otimização difundidas por Derringer and Suich (1980) e foi utilizada no presente trabalho. Nesta abordagem, cada resposta Yi é convertida primeiro em uma função desejo (desirability) individual di e que varia entre 0 e 1 (0≤di≤1). Na qual d (Yi) = 0 representa um valor completamente indesejável de Yi, enquanto que d (Yi) = 1 representa um valor de resposta completamente desejável ou ideal. Os valores de di individuais são então combinados utilizando uma média geométrica para dar origem a uma função desejo (D) geral (NATARANJAN, PERIYANAN, YANG, 2011).

As Figuras 64 e 65 apresentam os gráficos de otimização para as formulações dos nanocristais de rifampicina obtidas pelo método de moagem via úmida em escala reduzida. Para a previsão de DHM: 345,0 nm com D: 1,00, os valores das variáveis

independentes são: Rifampicina (p/p%): 3,25; Zircônio (p/p%): 20 e Povacoat™ (p/p%): 2,56. Para a previsão de DHM: 370,0 nm com D: 1,00, os valores das variáveis são: Rifampicina (p/p%): 3,28; Zircônio (p/p%): 20 e Povacoat™ (p/p%): 2,00.

Figura 64- Gráfico de otimização da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as seguintes variáveis Rifampicina (p/p%): 3,25; Zircônio (p/p%): 20 e Povacoat™ (p/p%): 2,56, predição para 345,0 nm: F1-MU.

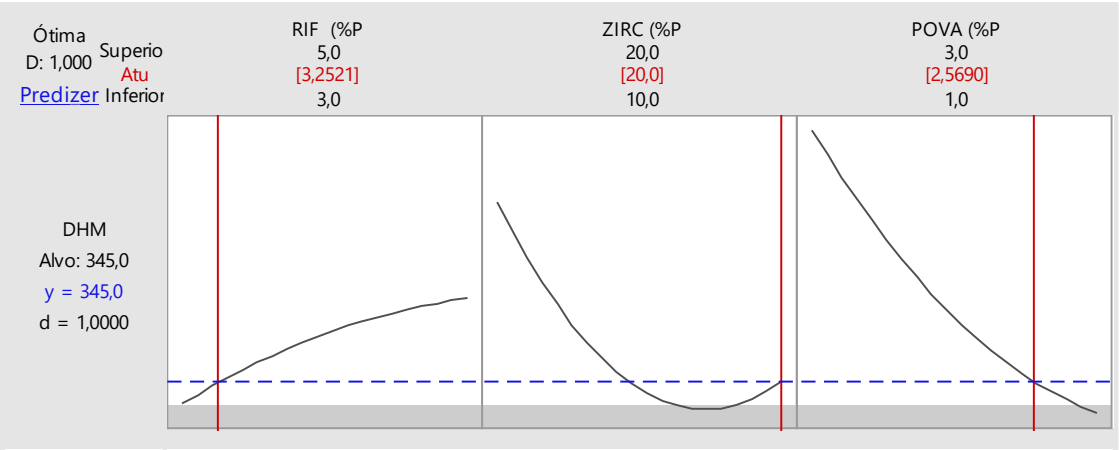
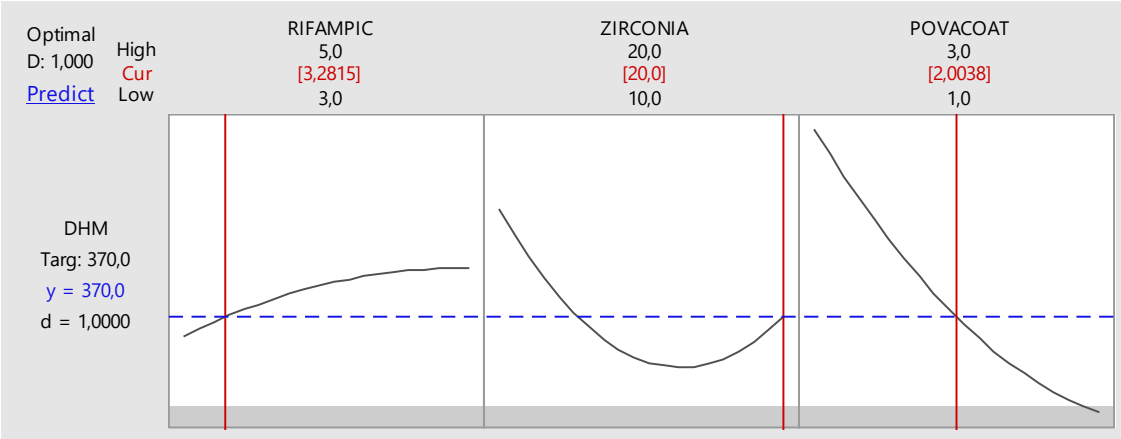


Figura 65- Gráfico de otimização da avaliação do DHM de nanocristais de rifampicina contendo as seguintes variáveis Rifampicina (p/p%): 3,28; Zircônio (p/p%): 20 e Povacoat™ (p/p%): 2,00, predição para 370,0 nm: F2-MU.

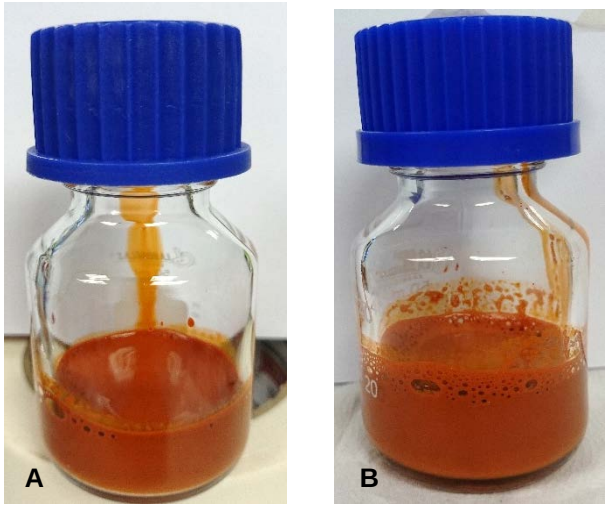


Para a validação do modelo matemático estabelecido para DHM, foram conduzidos dois experimentos, sob as condições indicadas nas Figuras 64 e 65. Para essas condições, os DHM práticos foram para a formulação 1 (F1-MU): 345,00 nm e para formulação 2 (F2-MU): 370,00 nm (Figura 66). Esses valores estão dentro da faixa de valor previsto, calculado com α=0,05 (Tabela 30). Os resultados práticos demonstram a validação do modelo matemático para o DHM.

Tabela 30- Diâmetro hidrodinâmico médio de nanocristais de rifampicina contendo as variáveis: concentração de rifampicina, de esferas de zircônio e Povacoat™.

F	DHM prático (nm)	DHM teórico (nm)	IP	PZ (mV)
F1-UM	340,6 0 ± 5,44	345,00	0,20 ± 0,00	-8,8 ± 0,45
F2-UM	364,20 ± 4,50	370,00	0,27 ± 0,02	-8,91 ± 0,03

Figura 66- Nanosuspensões de rifampicina obtidas por moagem via úmida em escala reduzida. A: F1-MU e B: F2-MU.



5.3.2. Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser

A Tabela 31 e a Figura 67 e 68 apresentam a distribuição de tamanho das partículas nas nanosuspensões obtidas por moagem via úmida em escala reduzida. A avaliação do tamanho foi feita pelo método úmido de difração a laser (DL).

Tabela 31- Valores de diâmetro médio, d10%,d50% e d90% da rifampicina matéria-prima e dos nanocristais. n=10.

Amostra	d 10% (µm)	d 50% (µm)	d 90% (µm)	Diâmetro médio (µm)	Obscuração
Rifampicina	35,17 ± 0,04	48,86 ± 0,03	66,77± 0,04	50,08 ± 0,03	22,10 ± 0,32 %
F1-MU	0,41 ± 0,01	0,57 ± 0,00	0,89 ± 0,01	0,62 ± 0,01	11,00 ± 0,00 %
F2-MU	0,12 ± 0,01	0,62 ± 0,02	1,75 ± 0,02	0,80 ± 0,02	12,10 ± 0,00 %

Como nas avaliações anteriores, foi utilizada solução saturada de rifampicina, previamente filtrada, como agente dispersante para evitar a dissolução partículas devido a seu reduzido tamanho.

O tamanho médio das partículas para F1-MU foi de 0,62 ± 0,01 µm, com valor d10% de 0,41 ± 0,01 µm, sendo que as primeiras partículas detectadas por meio deste método foram aquelas com tamanho maior ou igual a 70,0 nm. A F2-MU apresentou tamanho médio de 0,80 ± 0,02 µm, com valor d10% de 0,12 ± 0,01 µm. O equipamento detecto partículas a partir do valor limite de detecção do equipamento (40 nm), motivo pelo qual pode-se inferir a presença de partículas com tamanhos ainda menores a esse valor. Foi determinado que houve formação significativa e uniforme de partículas em escala nanométrica.

Figura 67- Distribuição granulométrica da F1-MU dos nanocristais de rifampicina. n=10

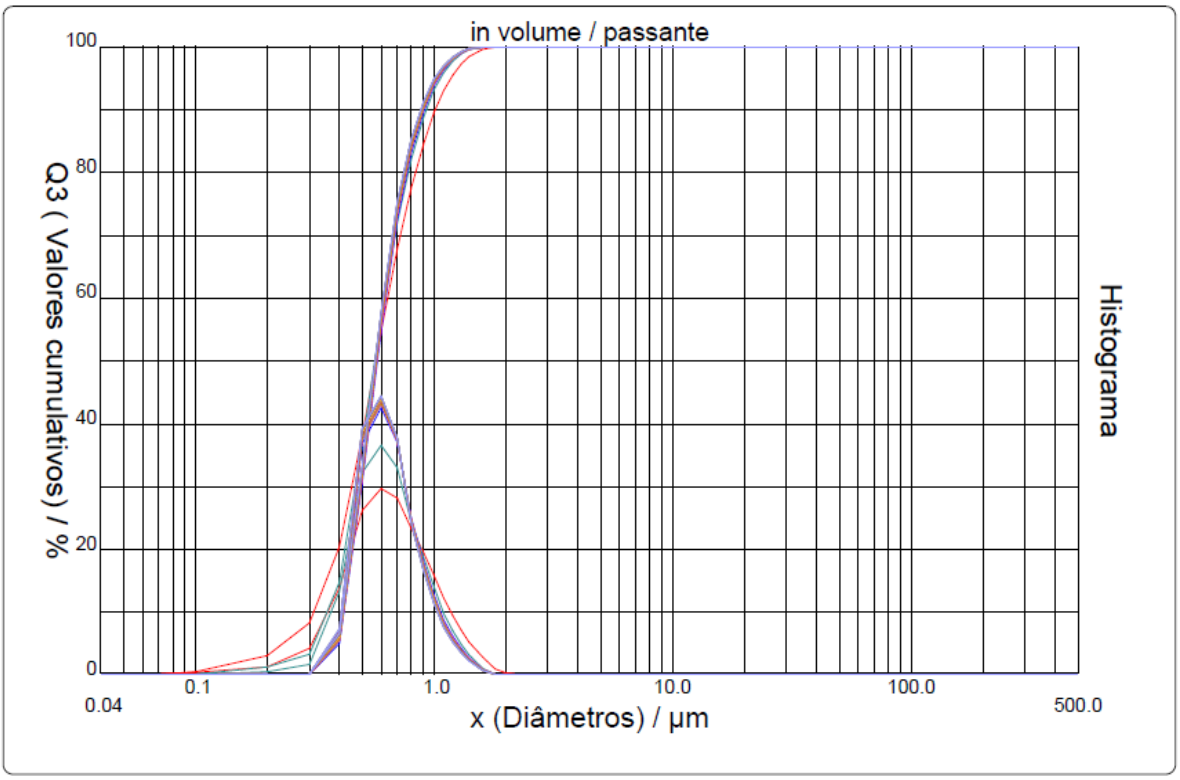
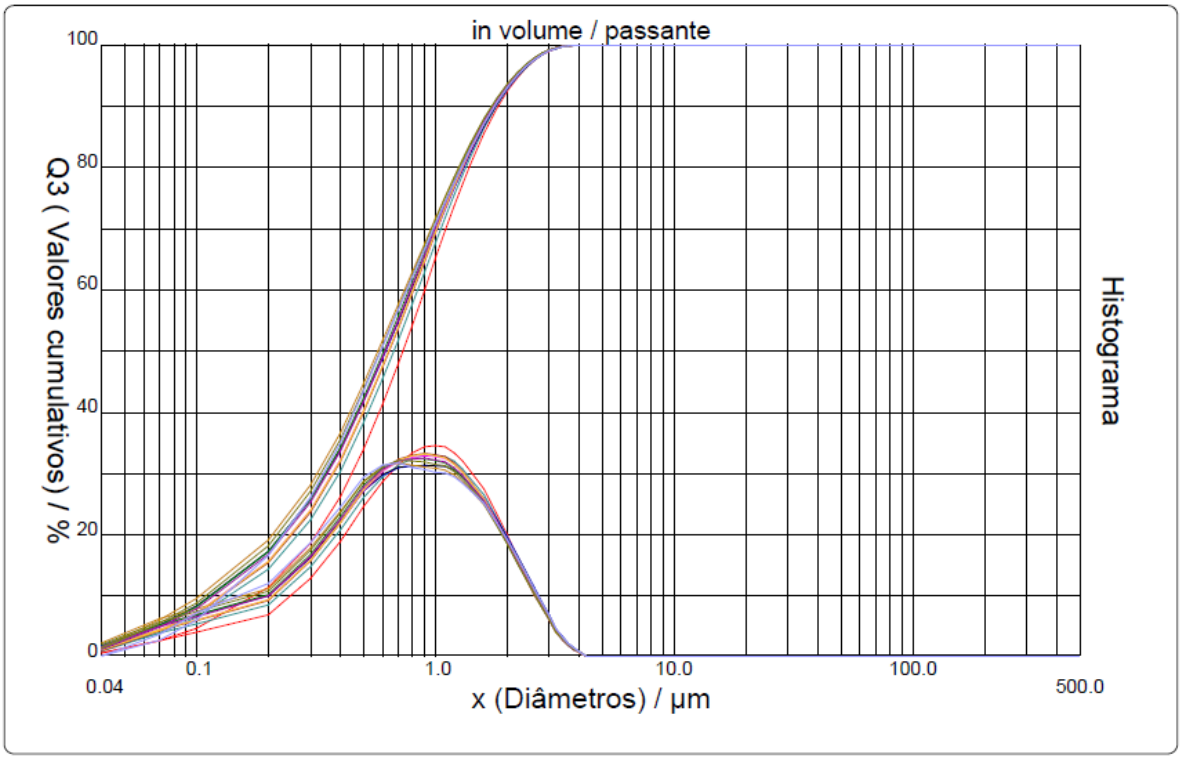


Figura 68- Distribuição granulométrica da F2-MU dos nanocristais de rifampicina. n=10



5.3.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais

5.3.3.1. Desenvolvimento do método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersividade (IP).

Foi desenvolvido método para determinação DHM em solução saturada do fármaco para evitar a solubilização das partículas. As diluições usadas foram entre 1:100 e 1:300. Os parâmetros avaliados foram o atenuador e o comportamento da amostra durante a leituras. As Figuras 69 e 70 demonstraram que a diluição adequada para as formulações foi 1:200. O valor do atenuador foi 9 e a variação durante as réplicas foi muito baixa. Tal resultado indicou ausência de solubilização da amostra e ausência de formação de agregados.

Para a formulação F1-MU o DHM foi igual a 340,6 ± 5,44 nm e para F2-MU, 364,2 ± 4,50 nm. Esses diâmetros médios foram considerados os valores iniciais para o estudo de estabilidade no tempo. Quanto ao IP (Figuras 69 e 70) os valores

determinados foram adequados, com valor menor ao mímino estabelecido (< 0,3), indicando distribuição estreita do tamanho das partículas.

Figura 69- Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm) e índice de polidispersividade (IP) para nanocristais da F1-MU avaliada em solução saturada do fármaco.

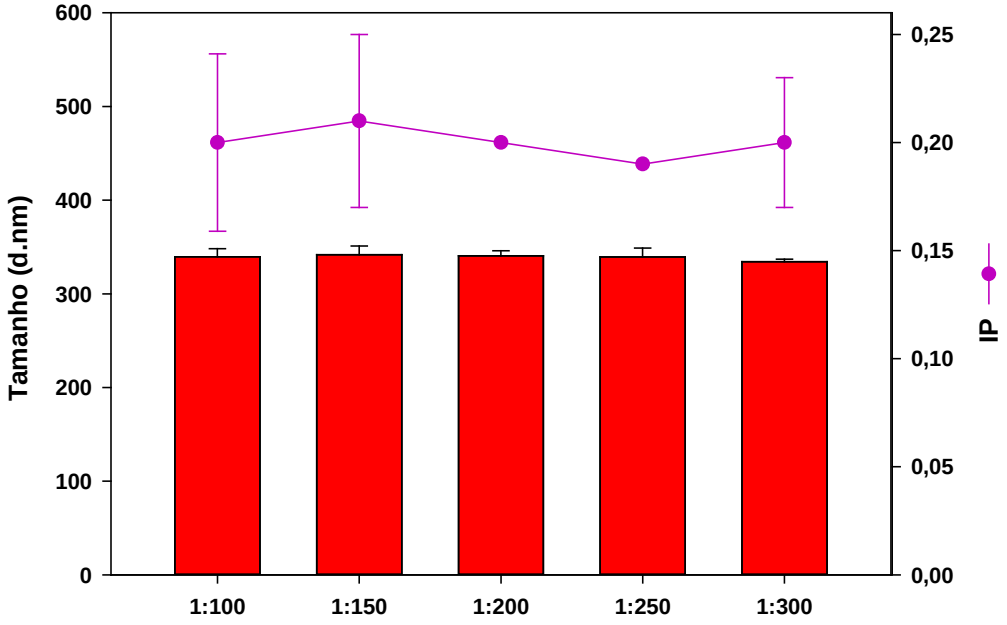
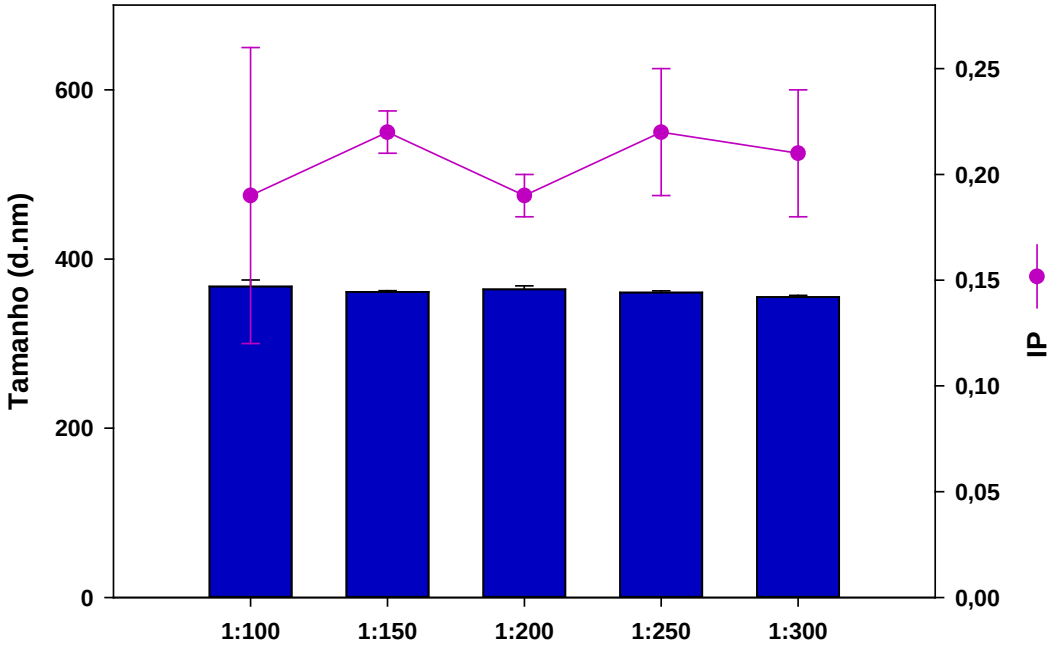


Figura 70- Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm) e índice de polidispersividade (IP) para a nanocristais da F2-MU avaliada em solução saturada do fármaco.



5.3.3.2. Desenvolvimento do método para determinação do potencial zeta

O potencial zeta consiste de propriedade física exibida por qualquer partícula em suspensão. Circunjacente a determinada partícula carregada, contra íons ligam-se fortemente formando a camada de Stern. Essa camada induz a formação de outra, denominada difusa, composta de íons. Essas camadas movem-se como se fossem parte da partícula, que estão em movimento Browniano. O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento e é medido pela mobilidade eletroforética das partículas, após aplicação de diferença de potencial elétrico no meio. Assim, as partículas movem-se em direção à carga oposta, em velocidade proporcional à sua carga (KASZUBA et al., 2010).

Essa característica permite otimizar formulações, prever interações e otimizar revestimentos de partículas. Adicionalmente, o potencial zeta pode auxiliar na previsão de estabilidade a longo prazo. Em geral, partículas com potenciais zeta iguais a 30 mV, em módulo, são consideradas estáveis. Porém, o pH, a condutividade e ou a força iônica do meio e a concentração dos componentes da fórmula podem influenciar o seu valor (MALVERN, 2014). O Povacoat ™, conferiu estabilidade estérica aos sistemas. Essa estabilidade está relacionada às cadeias formadas ao redor das partículas evitando a união dessas. O comportamento do sistema depende das cargas conferida pelo estabilizante e pela interação com o meio dispersante, nesse caso, a água saturada com rifampicina.

O meio dispersante pode influir na condutividade do sistema alterando os valores de potencial zeta dos nanocristais. Para evitar a interferência do meio efetuou-se estudo que permitiu avaliar o grau de influência da condutividade no potencial zeta. Os resultados podem ser observados nas Figuras 71 e 72.

Para as formulações F1-MU e F2-MU observa-se que quando a diluição da amostra foi ajustada para condutividade acima de 60 µS/cm, os valores de potencial zeta não sofreram alterações significativas. Dessa forma, assumiu-se esse valor como referência para as leituras.

Figura 71- Variação do potencial zeta aparente em função da condutividade para nanocristais da F1-MU.

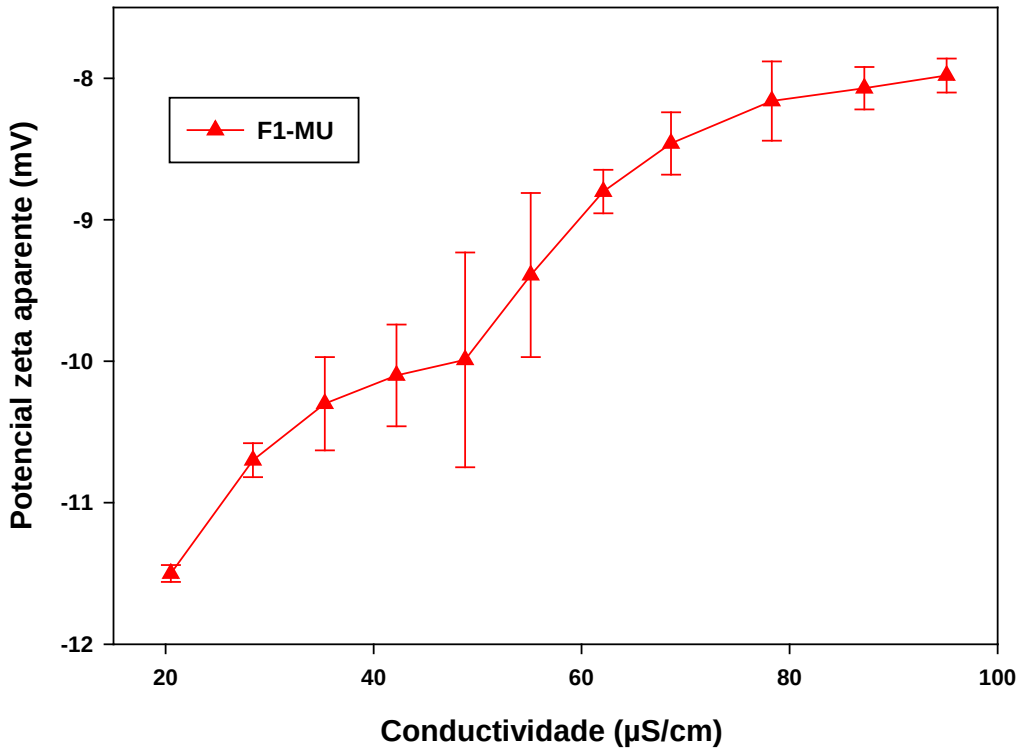
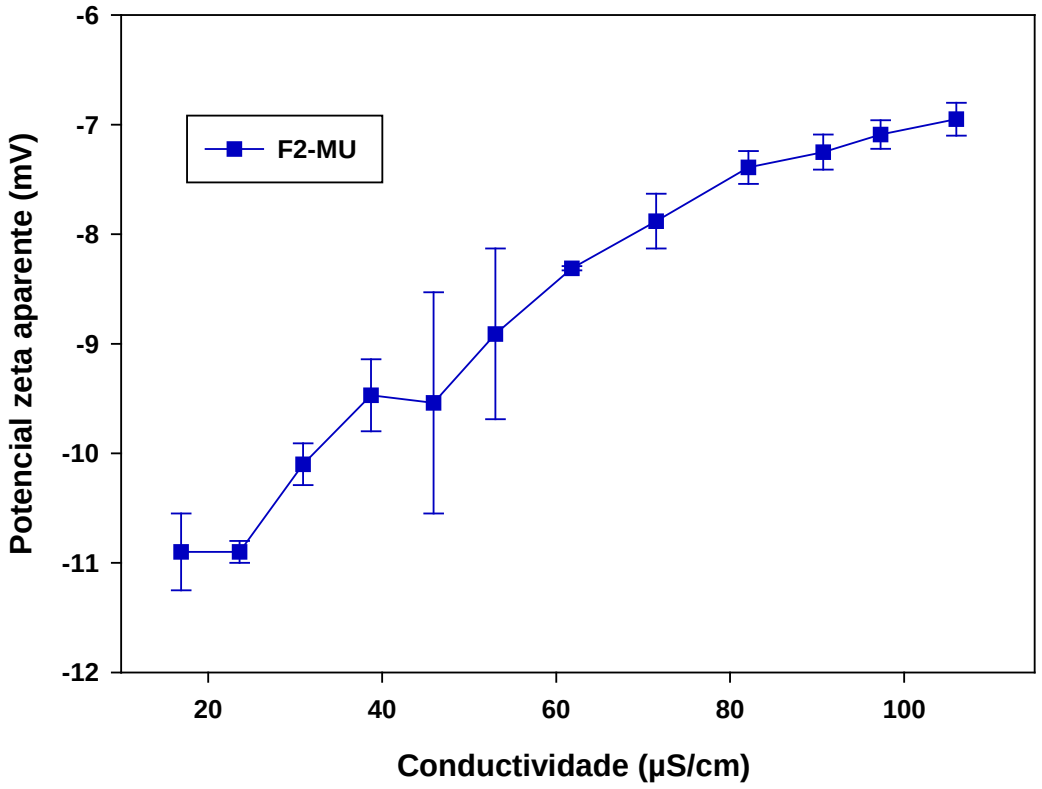


Figura 72- Variação do potencial zeta aparente em função da condutividade para nanocristais da F2-MU.



5.3.3.3. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais.

Os resultados para o DHM, IP e PZ estão apresentados na Tabela 32. De maneira geral, sistemas com valor de PZ igual ou maior a │30│ apresentam boa estabilidade. Os valores de PZ, para F1-MU e F2-MU, foram de -8,80 ± 0,45 mV e -8,91 ± 0,03 mV, respectivamente. No entanto, a estabilidade do sistema também é influenciada pela sua composição, em especial, pelos tensoativos utilizados. Portanto, foi conduzido estudo por período de três meses para observar o comportamento real do sistema, a nível macroscópico, e mediante a determinação dos parâmetros de DHM, IP e PZ.

Tabela 32- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) das formulações F1-MU e F2-MU dos nanocristais de rifampicina.

Nanocristais de Rifampicina	DHM (d. nm)	IP	PZ (mV)
F1-MU	340,60 ± 5,44	0,20 ± 0,00	-8,80 ± 0,45
F2-MU	364,20 ± 4,50	0,27 ± 0,02	-8,91 ± 0,03

Considerando os resultados obtidos, as nanosuspensões F1-MU e F2-MU apresentaram distribuição uniforme de tamanho com índice de polidispersividade inferior a 0,3 e ausência de agregados, após três meses de armazenamento a temperatura 4°C. Tal característica, alcançada somente nas preparações contendo Povacoat ™, foi também observada por Yuminoki e colaboradores (2014). Esses autores compararam diferentes estabilizantes (Álcool polivinílico (PVA), hidroxipropilcelulose (HPC), polivinilpirrolidona (PVP) e Povacoat™) na preparação de nanosuspensões de griseofulvina. Apenas nas preparações empregando o Povacoat™ não foram observados agregados. Neste sentido, o presente trabalho corrobou o estudo de Yuminoki e colaboradores (2014).

Como mencionado anteriormente, o principal desafio do presente trabalho foi evitar a formação de agregados durante o desenvolvimento das nanosuspensões.

5.3.4. Liofilização das nanosuspensões de rifampicina

A Figura 73 apresenta as patilhas liofilizadas das formulações obtidas pelo método de moagem via úmida em escala reduzida e a Figura 74 apresenta visão geral do processo de liofilização.

Figura 73- Aparência da pastilha liofilizada das formulações. A: F1-MU e B: F2-MU com manitol 5%.

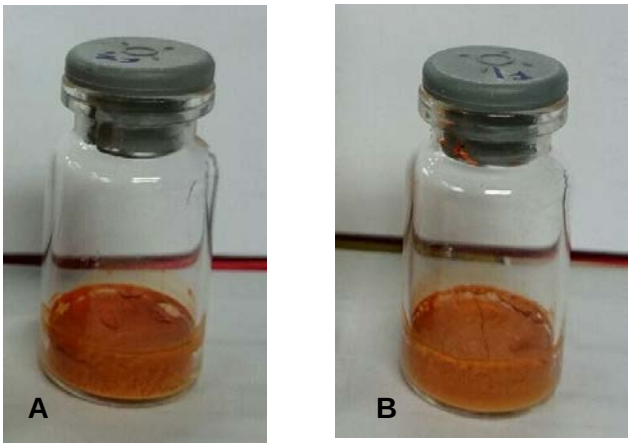
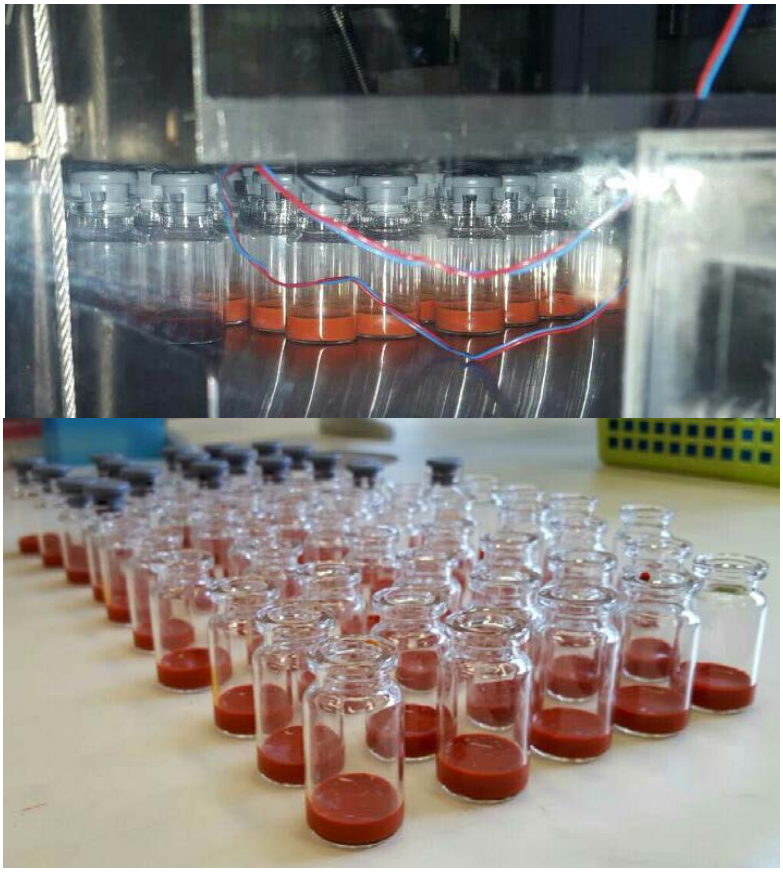


Figura 74- Frascos contendo nanosuspensões de rifampicina antes da liofilização e sendo colocados no liofilizador.



A liofilização das F1-MU e F2-MU, obtidas por moagem via úmida em escala reduzida, foi efetuada tendo em vista os estudos de analise térmica, difração de raios X. Além disso, o liofilizado pode constituir base para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. Para a liofilização, das formulações, essas foram suplementadas com manitol a 5% (p/p). Essa concentração de manitol permitiu a manutenção das características da nanosuspensão após a reconstituição do liofilizado.

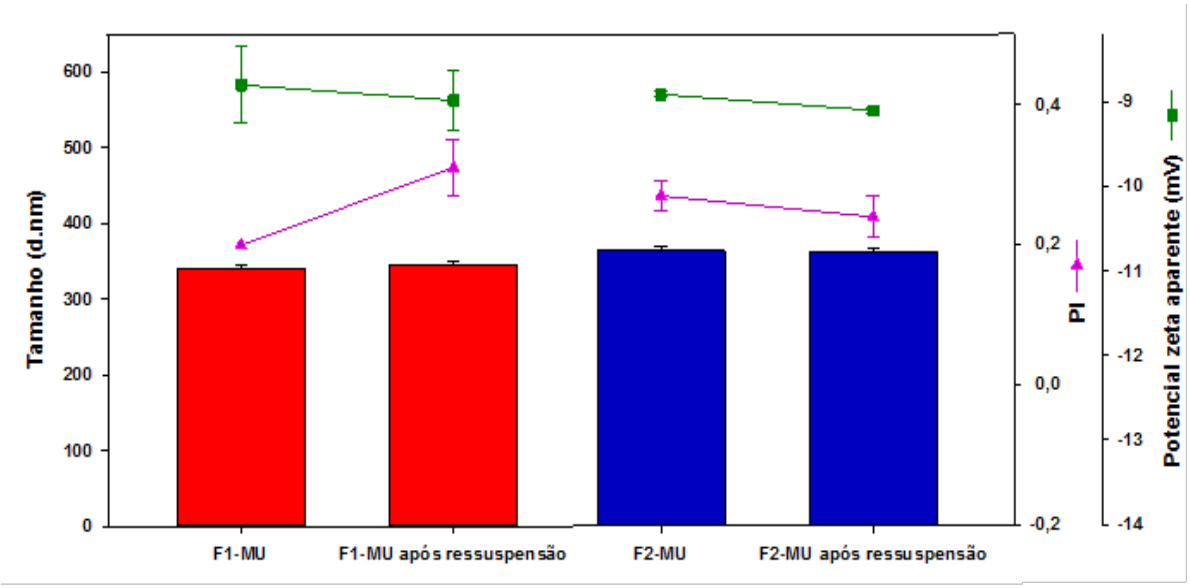
5.3.4.1. Determinacao do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), indice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais resuspendisos após liofilização

A Tabela 33 e a Figura 75 apresentam os valores de diametro hidrodinamico médio, de índice de polidispersividade e de potencial zeta após reconstituição da F1-MU e da F2-MU, empregando o mesmo volume de água removido na liofilização. Observa-se , que as amostra não sofreram alterações nos valores dos de DHM e IP durante o processo de secagem.

Tabela 33- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais nas formulações F1-MU e F2-MU reconstituídas após liofilização.

Amostra	DHM (d. nm)	IP	PZ (mV)
F1-MU	340,60 ± 5,44	0,20 ± 0,00	-8,80 ± 0,45
F1-MU após reconstituição	345,70 ± 3,45	0,31 ± 0,04	-8,98 ± 0,36
F2-MU	364,20 ± 4,50	0,27 ± 0,02	-8,91 ± 0,03
F2-MU após reconstituição	363,20 ± 2,96	0,24 ± 0,02	-9,01 ± 0,03

Figura 75- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais nas formulações F1-MU e F2-MU reconstituídas após liofilização.



5.3.5. Analise morfológica e determinação de tamanho dos nanocristais microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As microscopias das nanosuspensões e de seus respectivos liofilizados obtidos pelo método de moagem via úmida em escala reduzida estão apresentadas nas Figuras 76-79. É possível observar que ambas as formulações apresentaram elevada quantidade de partículas na escala nanométrica.

Para F1-MU, o intervalo de tamanho foi de 45,43 nm a 400,66 nm, já para o seu liofilizado, após a reconstituição os tamanhos variaram de 61,68 nm a 930,49 nm (Figuras 76 e 77). A F2-MU apresentou partículas que variaram de 55,00 nm a 978,94 nm e as partículas após reconstituição entre 53,76 nm e 556,30 nm (Figura 78 e 79).

Quanto a sua morfologia, observa-se partículas semi-esférica que se mantiveram inalteradas após a liofilização. É possível observar também ausência de agregados, característica de fundamental importância para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas a medida que esses podem influir na dissolução dos produtos e, portanto, na biodisponibilidade.

O uso do programa Imagen.j para avaliação do tamanho dos nanocristais e dos liofilizados oferece informação relevante para as avaliações seguintes: ensaio de dissolução e solubilidade uma vez que se confirmou a não alteração significativa no tamanho das partículas.

Figura 76- Fotografia MET (um) das partículas de F1-MU obtida por moagem via úmida em escala reduzida. **A:** Ampliação 25000x. **B:** Ampliação 30000x.

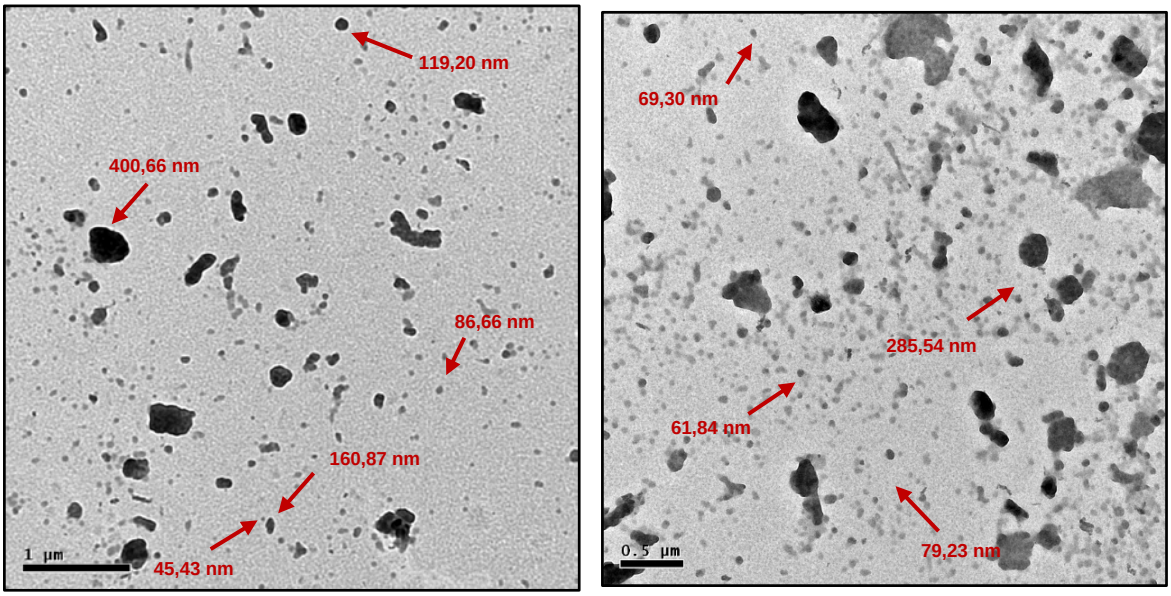


Figura 77- Fotografia MET (um) das partículas de F1-MU liofilizada obtida por moagem via úmida em escala reduzida. **A:** Ampliação 6000x. **B:** Ampliação 25000x

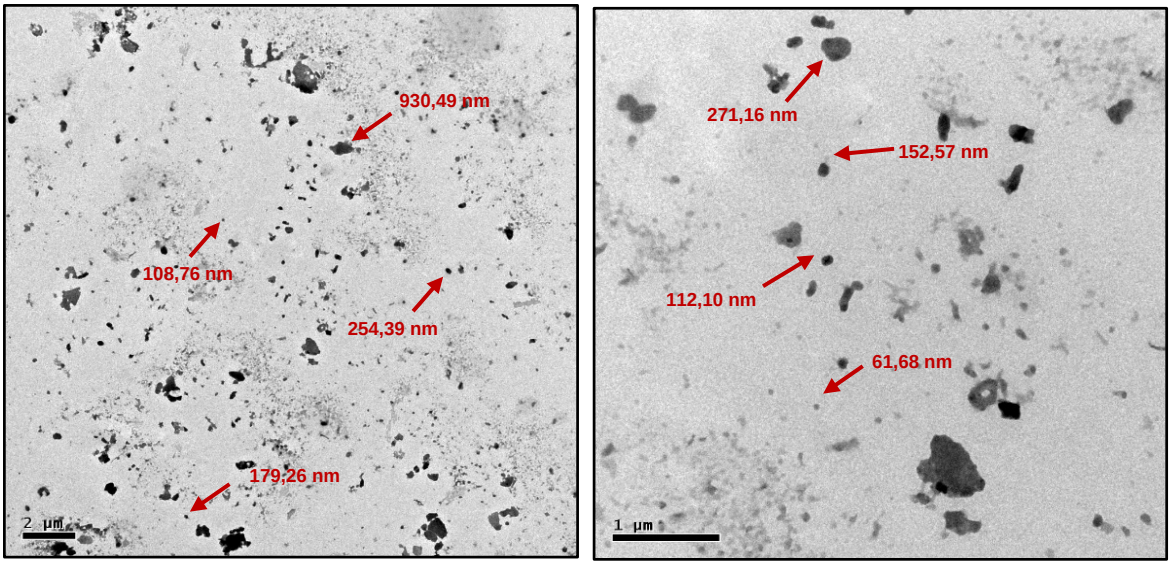


Figura 78- Fotografia MET (um) das partículas de F2-MU obtida por moagem via úmida em escala reduzida. **A:** Ampliação 5000x.**B:** Ampliação 40000x

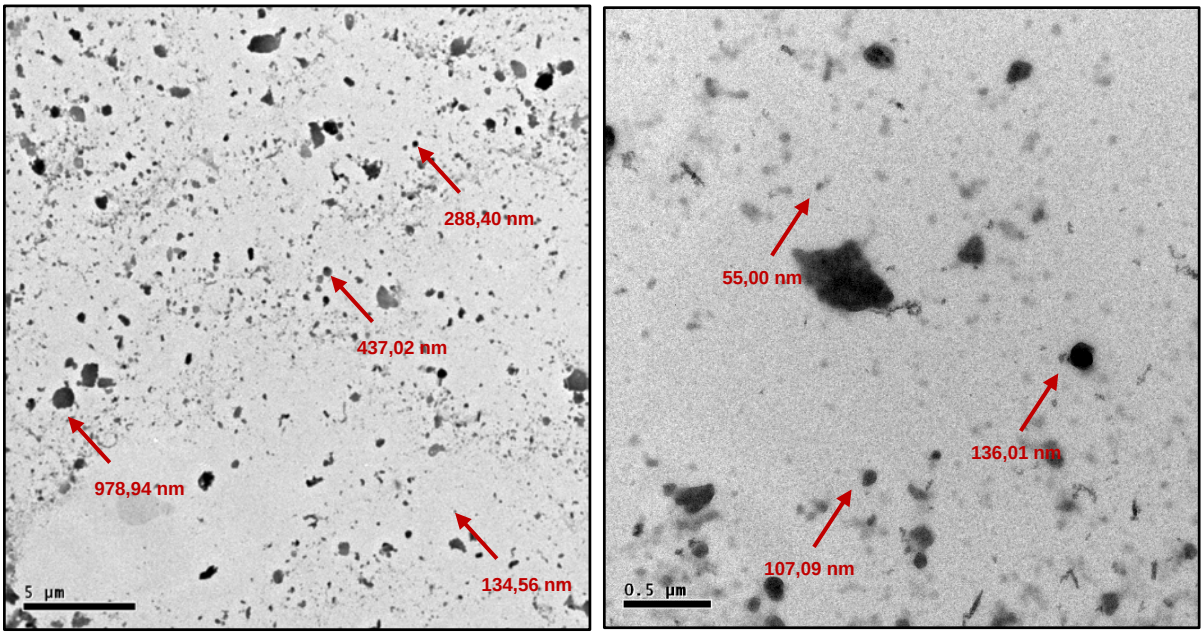
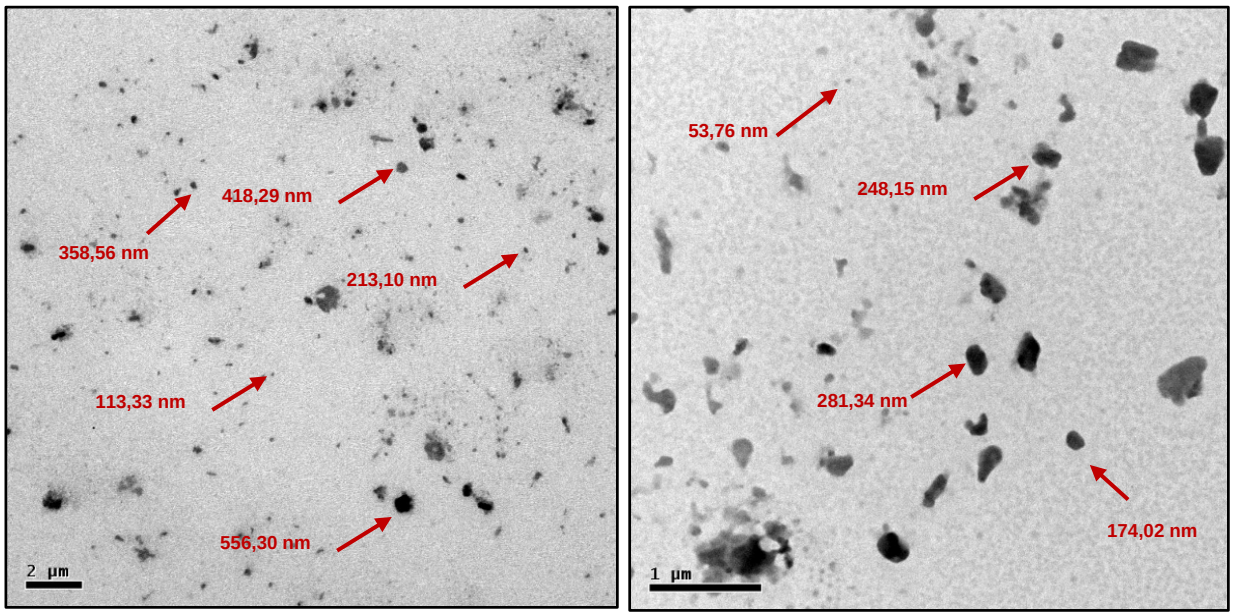


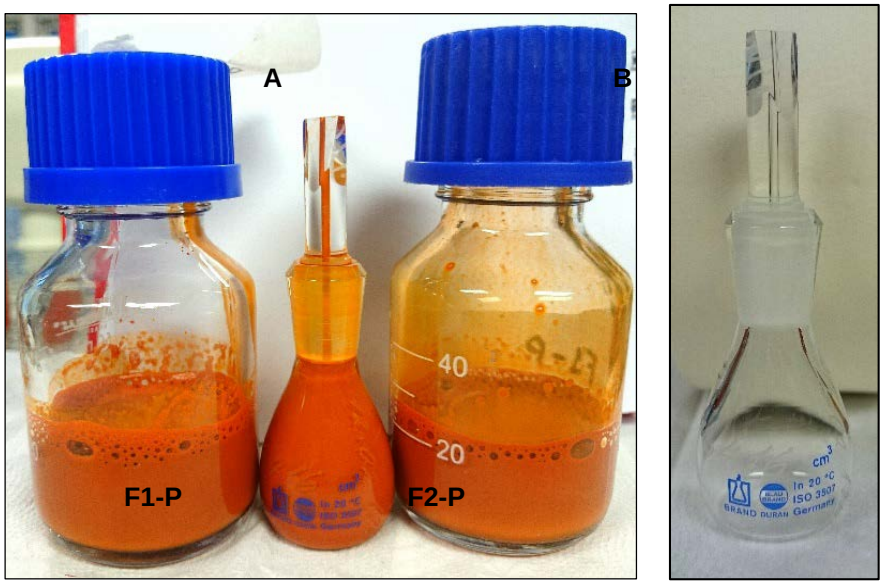
Figura 79- Fotografia MET (um) das partículas de F2-MU liofilizada obtida por moagem via úmida em escala reduzida. **A:** Ampliação 6000x. **B:** Ampliação 25000x.



5.3.6. Determinação da densidade relativa das nanosuspensões

Para determinar a densidade relativa das formulações foi utilizado um picnômetro para cada uma das formulações. Foram inicialmente determinados os pesos dos picnômetros vazios, preenchidos de liquido padrão (água) e preenchidos finalmente com cada formulação (Figura 80).

Figura 80- A: Nanosuspensões de rifampicina obtidas por moagem via úmida em escala reduzida e **B:** Picnômetro vazio.



Os dados de massas para a F1-P são apresentados na Tabela 34:

Tabela 34- Massas do Picnômetro vazio, com a solução padrão (água) e com a F1-P.

Picnômetro (10,123cm3)	**Massa (g)**
Picnômetro vazio	16,99
Picnômetro + água	27,06
Picnômetro + F1-P	27,24

Os dados de massas para a F2-P são apresentados na tabela 35:

Tabela 35- Massas do Picnômetro vazio, com a solução padrão (água) e com a F1-P.

Picnômetro (10,416cm3)	**Massa (g)**
Picnômetro vazio	17,13
Picnômetro + água	27,50
Picnômetro + F1-P	27,66

Finalmente mediante a Equação 6 foi determinado a densidade relativa de cada formulação:

$$\rho_{\text{formulação, água}} = \frac{m_{\text{formulação}}}{m_{\text{água}}} \qquad (6)$$

$$\rho_{\text{F1-P, água}} = \frac{10,25}{10,07} \qquad \rho_{\text{F2-P, água}} = \frac{10,53}{10,37}$$

A densidade da suspensão referência de rifampicina 20 mg/mL (FURP) e das nanosuspensões de rifampicina estão apresentadas na Tabela 36:

Tabela 36- Densidade relativa da suspensão referência de rifampicina 20 mg/mL (FURP) e das nanosuspensões de rifampicina F1-MU e F2-MU.

Amostra	Densidade (g/cm3)
F1-MU	1,02
F2-MU	1,02
F-FURP	1,157

5.3.7. Teor de rifampicina nas nanosuspensões

A Tabela 37 apresenta os valores de teor de rifampicina nas nanosuspensões obtidas pelo método de moagem via úmida em escala reduzida e que foram posteriormente comparadas com a forma farmacêutica do mercado (produto FURP-Rifampicina suspensão oral 20mg/mL). O teor de rifampicina foi determinado por método espectrofotométrico, desenvolvido e validado para rifampicina (Capitulo 1), no comprimento de onda de 472 nm.

Tabela 37- Teor de rifampicina na suspensão referência de rifampicina 20 mg/mL (FURP) e nas nanosuspensões F1-MU e F2-um.

Amostra	Concentração (mg/mL)	Teor (%)
F1-P	42.87 ± 0.38	96.27 ± 0.38
F2-P	42.39 ± 0.47	95.97 ± 0.47
F-FURP	17.78 ± 2.02	88.9% ± 2.02

5.3.8. Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X foi usada como ferramenta para determinar a estrutura cristalina do fármaco antes e após o processo de nanonização. As Figuras 81-83 apresentam os difratograma da rifampicina, dos excipientes, das misturas físicas e das formulações F1-MU e F2-MU.

O padrão de reflexão da rifampicina apresentou picos característicos indicando sua natureza cristalina correspondente ao polimorfo II. O difratograma da mistura física (rifampicina, Povacoat ™ e manitol) revelou que houve mudança no padrão de difração nessa mistura (Figura 81 e 82). Os difratograma da mistura tanto como das formulações refletem sobreposição dos principais picos do manitol. Dessa forma, a análise térmica constituiu ferramenta de fundamental importância para a discriminação de polimorfos nas formulações.

A alteração no padrão de difração foi investigada por meio de estudo do crioprotetor. Foi observado os padrões de difração para as misturas físicas com e sem o manitol. Observa-se na Figura 83 que o padrão de difração da rifampicina e da mistura física sem manitol são semelhantes apreciando-se os picos característicos do fármaco em ambos os difratogramas. No entanto, observa-se que os padrões de difração da rifampicina e da mistura física com manitol revelaram diferença significativa. Tal diferença foi devido ao padrão de difração do manitol que se mostrou com intensidade forte dificultando a visualização da cristalinidade do fármaco. Assim, foram observadas sobreposições dos principais picos do crioprotetor, assim como ocorre nos difratogramas das formulações (YUMINOKI et al., 2014).

Figura 81- Difratograma de raios X (método do pó) do polimorfo II da rifampicina.

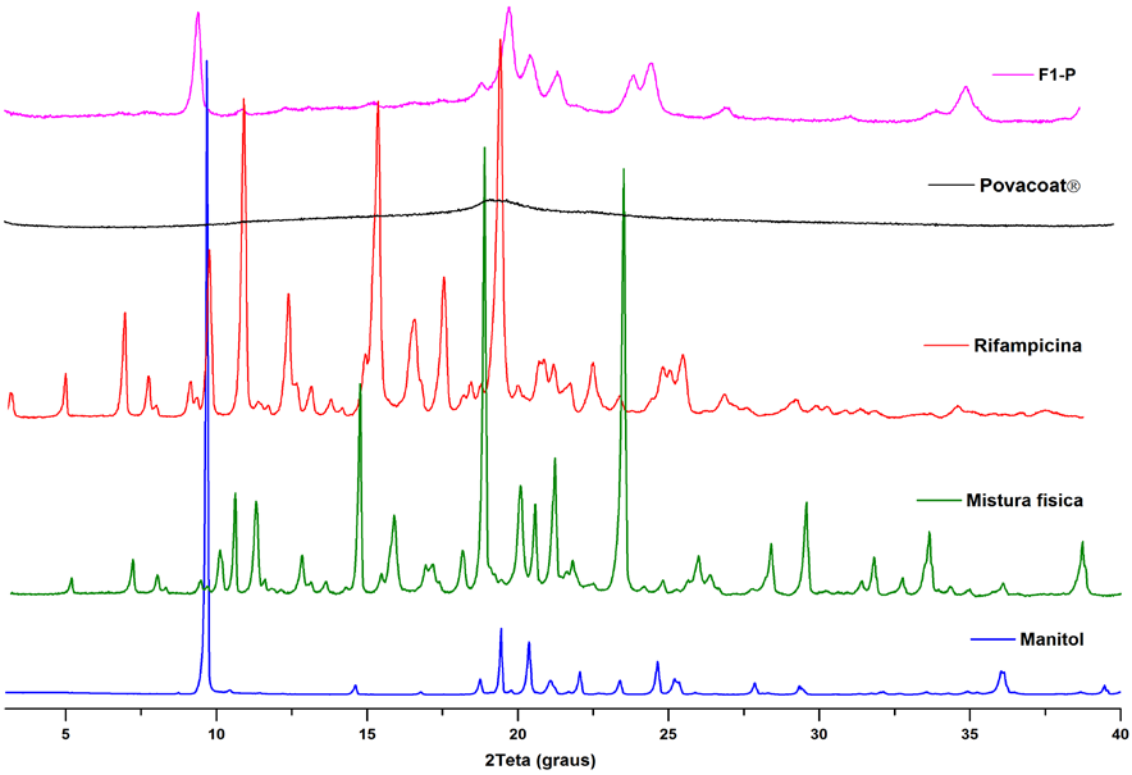


Figura 82- Difratograma de raios X (método do pó) do polimorfo II da rifampicina.

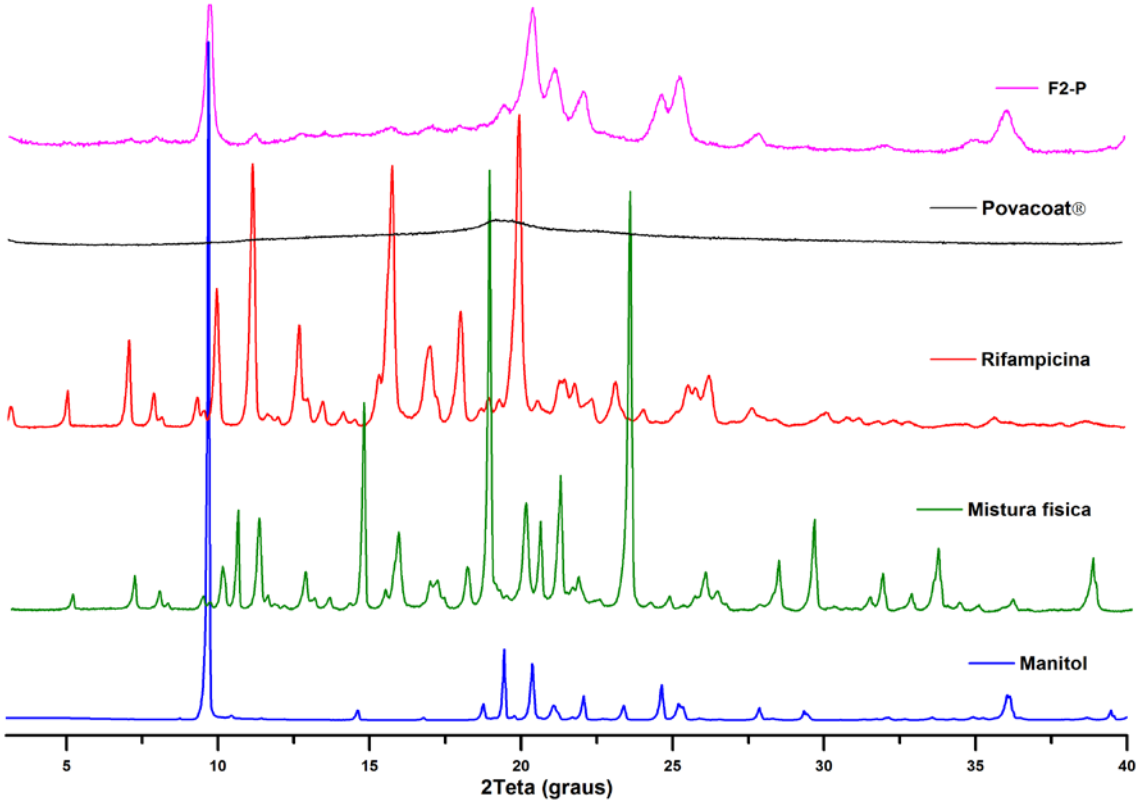
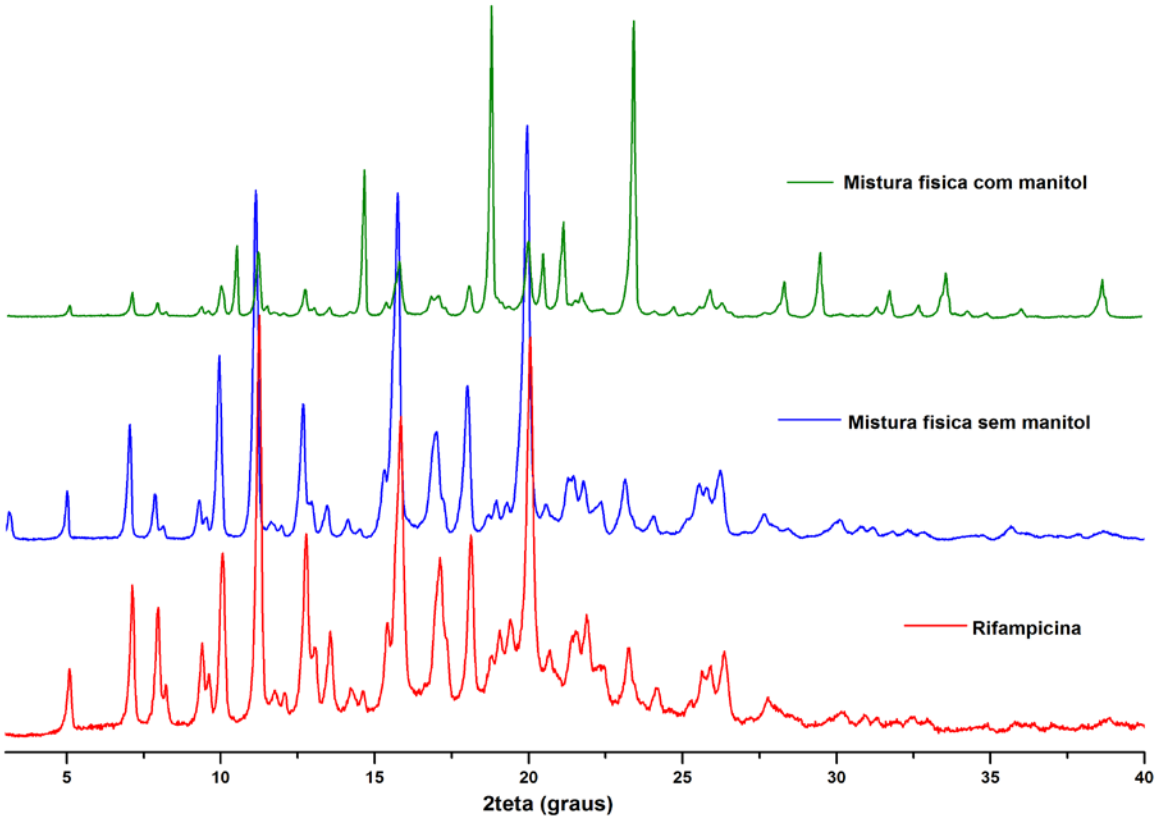


Figura 83- Difratograma de raios X (método do pó) do polimorfo II da rifampicina.



5.3.9. Estudos de compatibilidade fármaco- excipientes

O polímero Povacoat™ e o manitol foram excipientes utilizados para a obtenção de nanosuspensões de rifampicina pelo método de moagem via úmida em escala reduzida e sua compatibilidade com a rifampicina estão apresentados nas Figura 84 e 85. O manitol é um açúcar usado como crioprotetor para a liofilização de nanopartículas e que é adicionado às nanosuspensões coloidais antes do processo para evitar o estresse das partículas durantes a secagem. A quantidade de crioprotetor varia dependendo das caraterísticas da formulação,podendo ser utilizada concentração entre 2 e 30% (p/p) (KUMAR; GOKHALE; BURGESS, 2014).

As Figuras 84 e 85 mostram as curvas de DSC e TG/DTG do manitol, da rifampicina polimorfo II e da mistura física, respectivamente.

A curva de DSC para o manitol (Figura 84) mostrou que esse açúcar é estável termicamente até aproximadamente 150°C. Entre 155 e 185 °C observa-se um evento endotérmico representado por pico estreito a 150,0°C (Tpico) que corresponde ao processo de fusão do material. As curvas TG/DTG não apresentam perda de massa

até aproximadamente 200°C. A decomposição térmica do manitol ocorre em faixa de temperatura (210-430°C), observadas nestas curvas em duas perdas de massas. Essa decomposição pode ser observada na curva DSC por dois eventos exotérmicos (tpico= 325 e 363°C).

Figura 84- Curvas DSC do manitol, da rifampicina (polimorfo II), e mistura física rifampicina/Povacoat™/manitol obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

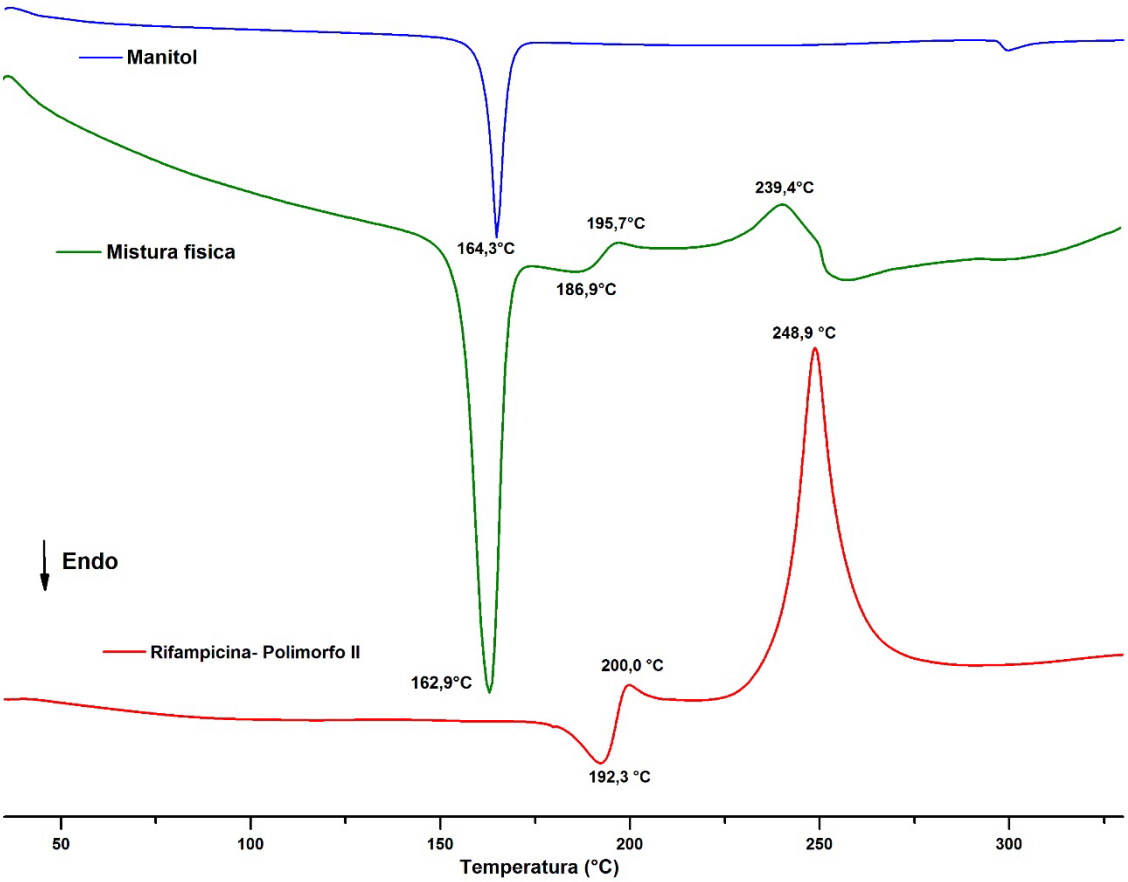
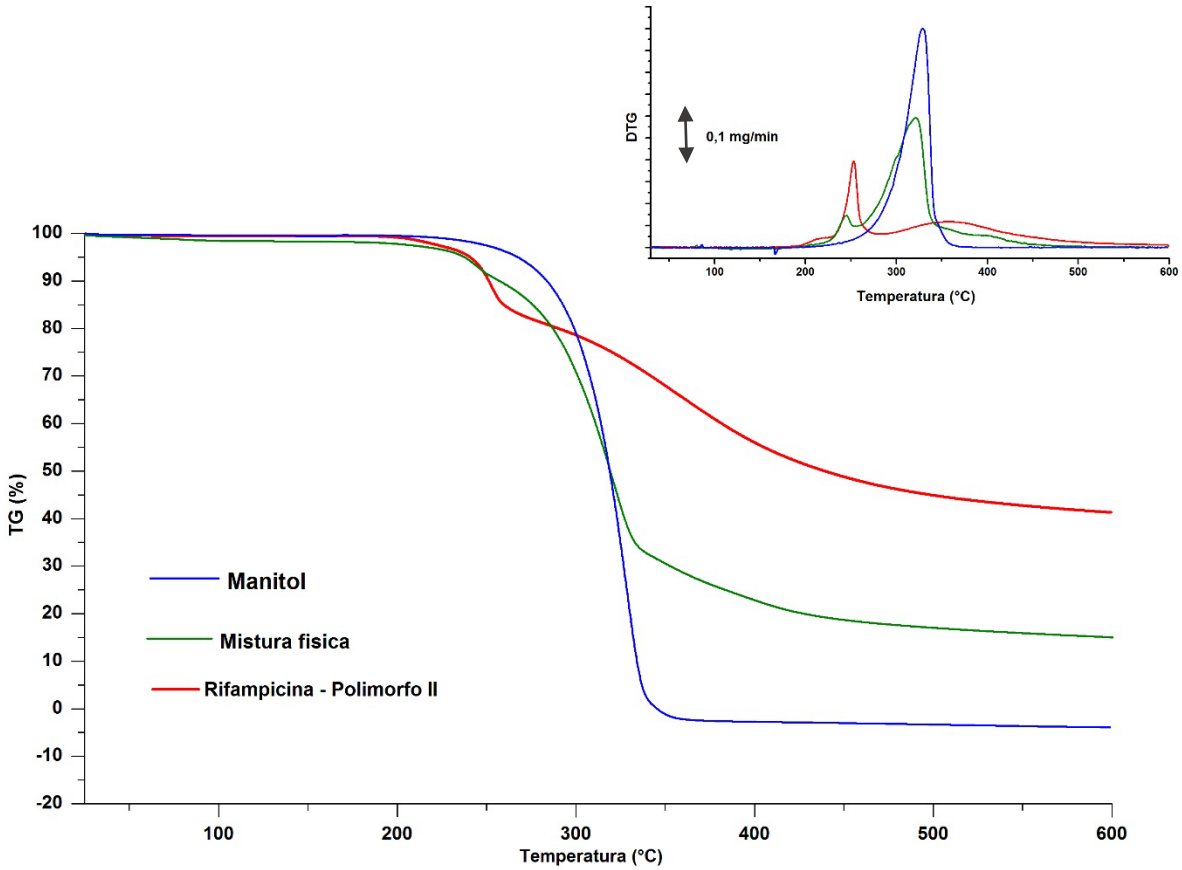


Figura 85- Curvas TG/DTG do manitol, da rifampicina (polimorfo II), e mistura física rifampicina/Povacoat™/manitol obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}.



5.3.10. Analise térmica das formulações obtidas por moagem via úmida em escala reduzida

As curvas de DSC e TG/DTG da rifampicina matéria-prima, mistura física e das formulações F1-MU e F2-MU estão apresentadas nas Figuras 86 e 87, respectivamente. Observa-se que a rifampicina apresenta um evento endotérmico em 192,3ºC (Tpico), evento típico do processo de fusão seguido da recristalização, que é característica pela primeira exotérmica em 200ºC (Tpico) (AGRAWAL et al., 2004).

A curva DSC (Figura 86) para F1-MU e F2-MU apresenta somatória dos eventos térmicos da rifampicina e manitol, confirmando que a característica cristalina do fármaco se manteve após o processo de nanonização. Tal característica é imprescindível para sua função terapêutica. Esses estudos foram complementados com as curvas TG/DTG (Figura 87). Os resultados indicaram que não houve adiantamento da temperatura de decomposição das formulações.

Figura 86- Curvas DSC da rifampicina (polimorfo II), da mistura física rifampicina/Povacoat™/manitol e dos nanocristais F1-MU e F2-MU obtidas a 10ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

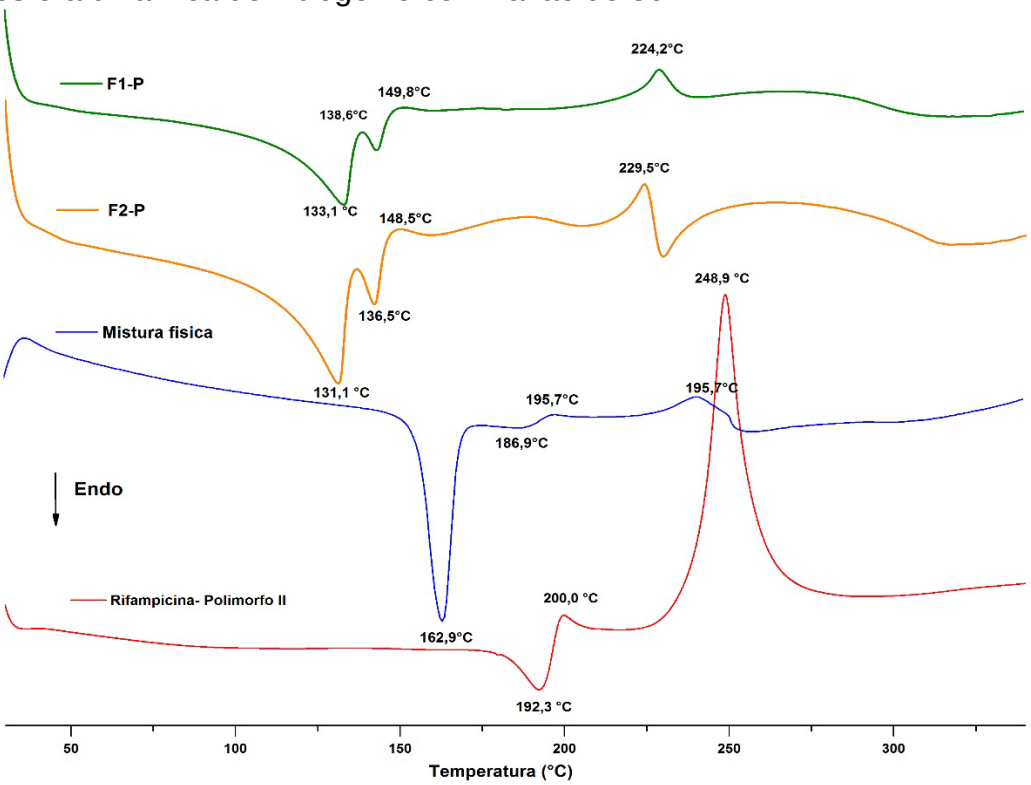
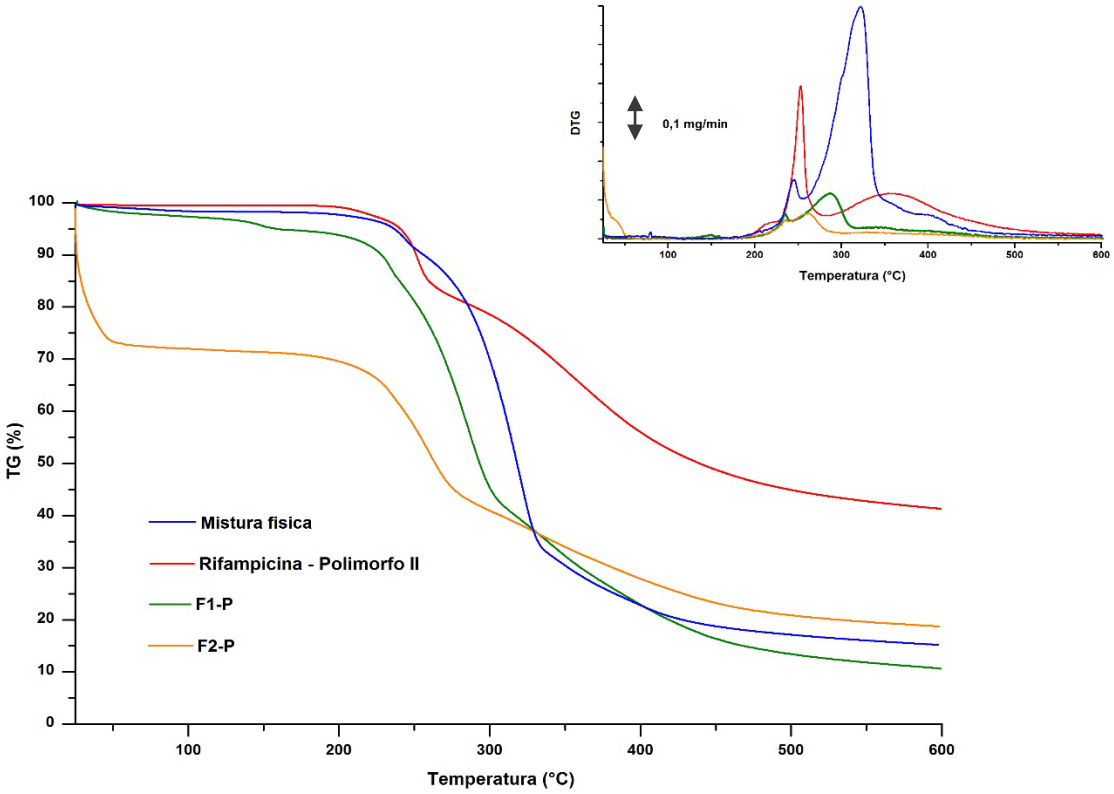


Figura 87- Curvas TG/DTG da mistura física rifampicina/Povacoat™/manitol e dos nanocristais F1-MU e F2-MU obtidas a 10ºC/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}.



5.3.11. Solubilidade de saturação dos nanocristais de rifampicina

A solubilidade das formulações F1-MU e F2-MU e da mistura física (rifampicina/Povacoat™/manitol) (Figura 88 e Tabela 38) revelou aumento significativo da solubilidade de saturação em todos os meios. As formulações F1-MU e F2-MU apresentaram aumento da solubilidade de 4,19 e de 3,03 vezes, respectivamente, no tampão acetato pH 4,5, considerado como referência o valor da solubilidade da rifampicina matéria-prima nesse mesmo meio.

O estudo de solubilidade foi realizado da mesma maneira em tampão HCl pH 1,2. No entanto, esses resultados não foram apresentados desde que a formação de uma elevada viscosidade não permitiu a saturação e posterior quantificação da rifampicina. As misturas físicas MFF1-MU e MFF2-MU (fármaco-Povacoat™ e manitol) apresentaram solubilidade maior a 35,7 ± 0,03 mg/mL e 39,3 ± 0,04 mg/mL, respetivamente, valores determinados logo do início da formação de viscosidade, nos frascos contendo a mistura em agitação de 150 rpm a 37°C. Assim também nas mesmas condições a solubilidade das formulações F1-MU e F2-MU apresentaram valores maiores a 52,66 ± 0,07 mg/mL e 49,91 ± 0,26 mg/mL, respetivamente.

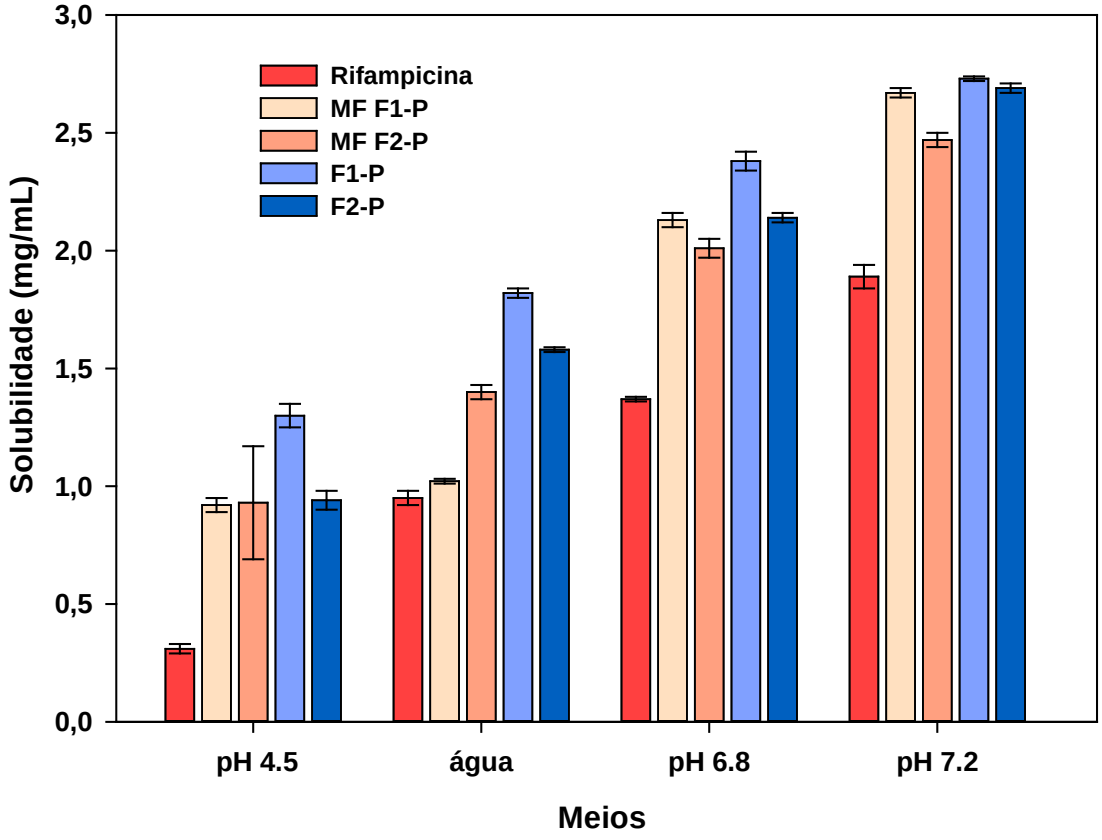
O estudo da solubilidade das misturas permitiu a avaliação da solubilidade do fármaco na presença do polímero e do crioprotetor. Assim, foi possível avaliar o impacto da redução do tamanho das partículas e da presença do agente estabilizante na solubilidade. A rifampicina é um fármaco classe II e apresenta dificuldade de umectação. No entanto, pode-se observar que as misturas físicas MFF1-MU contendo 2,6% p/p (1,27 vezes) e MFF2-MU com 2,0% p/p (1,19 vezes) de Povacoat ™ apresentaram aumento significativo na solubilidade de equilíbrio. Este aumento observado da solubilidade pode ser atribuído à maior capacidade de molhabilidade da solução do polímero (DIAK, 2011), ao efeito co-solvente deste (AHUJA,2007) e à solubilização micelar em função da estrutura anfipática que o polímero possui (MEHANNA,2010).

Segundo a classificação das dispersões sólidas, as dispersões que possuem polímeros como o Povacoat™ são classificadas como de terceira geração. Atribui-se a melhora no perfil de dissolução ao polímero, já que esse possui atividade superficial ou propriedades auto emulsificantes. Esses polímeros podem aumentar a biodisponibilidade dos fármacos pouco solúveis e também podem estabilizar o sistema (VACONCELOS,2007).

Tabela 38- Solubilidade de saturação da rifampicina matéria-prima, das misturas físicas (MF) MFF1-MU, MFF2-MU e dos nanocristais nas formulações F1-MU e F2-MU e o número de vezes no aumento da solubilidade observados.

Meios/pH	Rifampicina (mg/mL)	MF F1-MU (mg/mL)	MF F2-MU (mg/mL)	F1-MU (mg/mL)	F2-MU (mg/mL)
Tampão acetato pH 4,5	0,31 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,93 ± 0,24	1,30 ± 0,05 **(4,19x)**	0,94 ± 0.04 **(3,03x)**
Água pH 6.0	0,95 ± 0,03	1,21 ± 0,01	1,40 ± 0,03	1,82 ± 0,02 **(1,92x)**	1,58 ± 0,01 **(1,66x)**
Tampão fosfato pH 6.8	1,37 ± 0,01	2,13 ± 0,03	2,01 ± 0,04	2,38 ± 0,04 **(1,74x)**	2,14 ± 0,02 **(1,56x)**
Tampão fosfato pH 7.2	1,89 ± 0,05	2,67 ± 0.02	2,47 ± 0.03	2,73 ± 0,01 **(1,44x)**	2,69 ± 0.02 **(1,42x)**

Figura 88- Solubilidade obtida através do método de equilíbrio da rifampicina matéria-prima, das misturas físicas (MF) MFF1-MU, MFF2-MU e dos nanocristais nas formulações F1-MU e F2-MU . As barras de erros indicam o desvio padrão dos testes feitos em triplicatas.



Considerando os resultados obtidos em quanto a solubilidade de saturação, as formulações de rifampicina F1-MU e F2-MU apresentam aumento significativo da

solubilidade em água com valores de até 1,74 e 1,56 vezes, respetivamente, quando comparado com a rifampicina matéria-prima. Esse aumento foi resultado do aumento da área superficial das partículas a causa da redução do seu de tamanho.

Segundo Barbosa e colaboradores (2015) a solubilidade de saturação dos nanocristais de furosemida, fármaco classe IV, foram de 1,2 a 3,0 vezes mais elevada quando comparada à matéria-prima do fármaco. De forma similar, o aumento da solubilidade dos nanocristais de efavirenz, medicamento antirretroviral usado no tratamento de pacientes infectados pelo HIV-1, foi avaliado mediante o método *shake flask*. Os resultados revelaram que a solubilidade do fármaco foi extremadamente baixa, com valor igual a 5.84 ± 0.3 µg/ml. A mistura física (fármaco e agentes estabilizantes PVP K30 (1.0% p/v) e LSS (0.5% p/v)) apresentou solubilidade de 25,62 ± 1,6µg/mL (4,4 vezes maior ao fármaco puro). Da mesma forma, os nanocristais de efavirenz apresento solubilidade igual a 235,6 ± 6,1 µg/mL, aumento de 40 vezes quando comparado com o fármaco puro (PATEL et al., 2014).

Ahuja e colaboradores (2015) determinaram a solubilidade de saturação para febuxostate (FTX), para mistura física contendo fármaco e o agente estabilizante (succinato de d- alfa tocoferilo polietilenoglicol 1000 (TPGS)) e para os nanocristais em meio tampão HCl pH 1,2 e tampão fosfato pH 6,8. Os resultados em meio tampão HCl pH 1,2 determinaram baixa solubilidade aquosa do fármaco com valor igual a 0,21 ± 0,01 µg/ml. A solubilidade para os nanocristais foi de 35,61 ± 0,38 µg/mL, comprovando um aumento de até 169 vezes. Em quanto aos resultados apresentando para no tampão fosfato pH 6,8, esses revelaram aumento solubilidade do fármaco com valor igual a 847,45 ± 1,51 µg/mL. A solubilidade dos nanocristais foi igual a 1519,20 ± 20,83 µg/mL, sendo que o aumento foi de 1,8 vezes. Esses autores indicam aumento significativo da solubilidade de saturação do FTX na presença do agente estabilizante (misturas físicas), no entanto, os valores não foram apresentados.

Consequentemente, se conclui que a solubilidade do fármaco é incrementada em presença dos agentes estabilizante, devido à ação umectante desses.

O incremento significativo da solubilidade de saturação da rifampicina nas misturas físicas (rifampicina-Povacoat™-manitol) foi ligeiramente menor aos resultados obtidos para os nanocristais. Determinando-se que o incremento da solubilidade do fármaco não foi de todo em função da redução do tamanho das partículas. No entanto, as principais vantagens dos nanocristais em quanto à melhora

da biodisponibilidade do fármaco não são estabelecidas apenas pelo incremento da solubilidade. O presente trabalho demostro que os nanocristais de rifampicina possuem potencial vantagens quando comparados a formas farmacêuticas tradicionais, que visam melhorar a solubilidade dos fármacos classe II, mediante o uso de polímeros, tensoativos ou agentes molhantes. Essas vantagens são: aumento na estabilidade física (não formação de agregados) do sistema, a forma semi-esférica e o reduzido tamanho dos nanocristais tem capacidade para aumentar a mucoadesividade das partículas do fármaco e portanto permitir maior retenção deles que ajudaria a aumentar o tempo de intervalo da doses. Essa última premissa permitirá uma melhor adesão do paciente ao tratamento e menor tempo de contato com o fármaco que evita o surgimento da resistência do microorgansmo à rifampicina.

5.3.12. Perfil de dissolução

O ensaio de dissolução utilizando aparato 2 para as formulações F1-MU e F2-MU comparadas com suspensão de rifampicina referência (20 mg/mL) (F-FURP), são apresentados nas Figuras 89 e 90.

Figura 89- Ensaio de dissolução da suspensão de rifampicina referência (20 mg/mL) (F-FURP), avaliada em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8) contendo 1% de Tween® 80, utilizando aparato 2, na velocidade de 50 rpm e tempo de ensaio de 60 minutos.

Figura 90- Ensaio de dissolução da suspensão de rifampicina referência (20 mg/mL) (F-FURP), avaliada em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8) contendo 1% de Tween® 80, utilizando aparato 2, na velocidade de 50 rpm e tempo de ensaio de 60 minutos.

Os perfis de dissolução doo produto FURP-Rifampicina suspensão oral 20mg/mL e das preparações F1-MU e F2-MU estão apresentados nas Figuras 91 e 92.

Becker e colaboradores (2008) determinaram perfil de dissolução de rifampicina matéria-prima e de outras formas farmacêuticas orais (300mg) em 500 mL de fluído intestinal simulado sem enzima (SIFsp) pH 6,8, empregando 75 rpm de agitação e aparato 2. Os resultados obtidos revelaram dissolução lenta e incompleta da rifampicina matéria-prima. Esse resultado foi confirmado pela OMS. Em 2011, a OMS declarou que a rifampicina apresenta velocidade de dissolução lenta em tampão fosfato pH 6,8.

A OMS (2012) utilizou o tampão fosfato pH 6,8 contendo 0,25% p/v de lauril sulfato de sódio nos ensaios de dissolução para comprimidos de rifampicina (150 e 300mg). De forma similar, a FURP (Fundação para o Remédio Popular) em seu procedimento utiliza o mesmo meio, porém contendo 1% p/v de Tween®80. A presença de tensoativo no meio de dissolução tem como objetivo melhorar a solubilidade do fármaco promovendo a molhabilidade e a solubilização micelar da rifampicina (SCHOTT; KWAN; FELDMAN, 1982).

Os resultados obtidos para as formulações F1-MU e F2-MU revelaram perfil de dissolução distintos quando comparados à produto FURP-Rifampicina suspensão oral 20mg/mL.

O perfil de dissolução da F1-MU e da F2-MU permitem observar liberação de 92,6% e de 93,1% de rifampicina nos primeiros 5 minutos de ensaio. O produto FURP-Rifampicina suspensão oral liberou apenas 23,2% do fármaco no mesmo tempo. A velocidade de dissolução dos nanocristais se manteve em nível alto durante todo o experimento.

A eficiência de dissolução (ED%), parâmetro de cinética de dissolução, é definido como a curva de dissolução em determinado intervalo de tempo e permite comparação mais confiável entre dois produtos. Esse parâmetro está relacionado com a quantidade real do fármaco dissolvido no meio, permitindo melhor prognóstico dos resultados *in vivo* (SKOUG et al., 1997). De acordo com os dados obtidos para ED% (Tabela 39), as nanosuspensões de rifampicina (F1-MU e F2-MU) mostraram elevada liberação do fármaco em 45 minutos. No entanto, a F-FURP apresentou liberação, em 45 minutos, aproximadamente 3,8 vezes menor quando comparada às nanosuspensões (Tabela 39) (Figuras 90 e 91).

.

Tabela 39- Eficiência de dissolução (ED%) das nanosuspensões de rifampicina F1-MU, F2-MU e suspensão de rifampicina referência 20 mg/mL (F-FURP) avaliados em tempo de ensaio de 45 minutos.

Amostra	ED%
F1-MU	89,3
F2-MU	89,6
F-FURP	78,0

A maior área superficial das partículas de nanocristais permitem adequada umectação aumentando a velocidade de dissolução do fármaco. Adicionalmente, esses resultados indicaram a importância do polímero na modulação da dissolução do fármaco.

Figura 91- Perfil de dissolução dos nanocristais na F1-MU, avaliados em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8) contendo 1% de Tween® 80, utilizando aparato 2, na velocidade de 50 rpm e tempo de ensaio de 60 minutos.

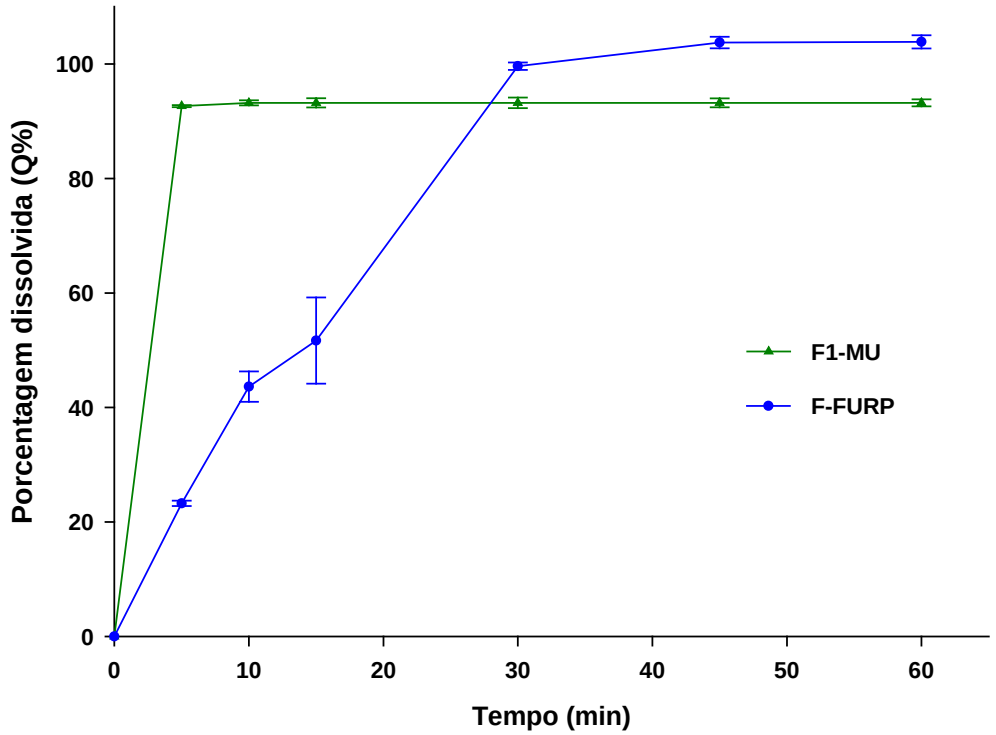
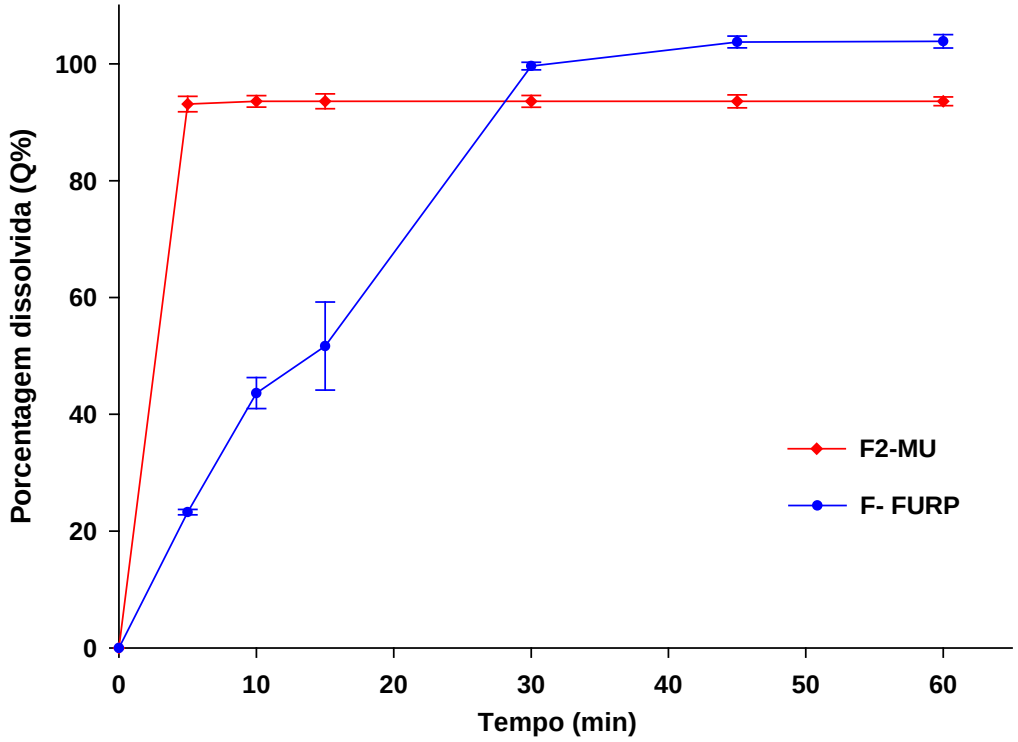


Figura 92- Perfil de dissolução dos nanocristais na F2-MU, avaliados em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8) contendo 1% de Tween® 80, utilizando aparato 2, na velocidade de 50 rpm e tempo de ensaio de 60 minutos.



Considerando os resultados obtidos, as nanosuspensões F1-MU e F2-MU apresentam potencial para elevar a biodisponibilidade oral da rifampicina.

O aumento da dose de rifampicina pode otimizar o efeito antituberculose desse fármaco até mesmo contra cepas resistentes desde que os efeitos tóxicos sistêmicos e locais sejam minimizados (Zhang et al., 2014).

A biodisponibilidade oral relativa de nanosuspensão de febuxostate, fármaco classe II, utilizado no tratamento de hiperuricemia (nível elevado de ácido úrico no sangue), teve aumento de 221,6% quando comparada à suspensão convencional do fármaco, em água (AHUJA et al., 2015).

De forma similar, o aumento da biodisponibilidade oral para nanosuspensões de fármacos pouco solúveis em água, em ratos, foi comprovado por diferentes autores (SAWANT; PATEL; PATEL, 2016); (GE et al., 2015),; (PATEL et al., 2014).
A biodisponibilidade oral de nanosuspensão de cefdinir (Swant, Patel, Patel, 2016), terceira geração de antibiótico cefalosporínico, e nanosuspensão de efavirenz (PATEL et al., 2014), antirretroviral, quando comparado ao produto comercializado, foi 3 e 2,19 vezes maior, respectivamente. Para o ácido ursólico, a nanosuspensão apresentou biodisponibilidade oral cerca de 27,5 vezes maior, comparada à matéria-prima (GE et al., 2015).

O aumento da biodisponibilidade absoluta de flavonóides foi evidenciado nos estudos de Hong e colaboradores (2014) e Qian e colaboradores (2016). No caso de nanosuspensão de miricetina, os níveis máximos no plasma (Cmax) foi até 2,25 vezes maior quando comparado à substância pura, em escala micrométrica (Hong et al., 2014). Da mesma forma, o aumento da biodisponibilidade absoluta da nanosuspensão de kaempferol, flavonóide, foi de 38,17% comparado à substância pura (Gian et al., 2016).

5.3.13. Estabilidade das nanosuspensões

A estabilidade das formulações F1-MU e F2-MU por período de 3 meses a 4°C está apresentada nas Figuras 93 e 94. Os resultados, na sua totalidade, refletem a estabilidade dessas preparações (uniformidade e ausência de formação de agregados). Os valores de de DHM, IP e PZ não apresentaram alterações significativas no decorrer do tempo (DHM < 400 nm, IP < 0,3 e PZ entre -8,0 e - 9,0 mV).

Figura 93- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) da nanocristais de rifampicina em F1-MU durante 3 meses a 4ºC.

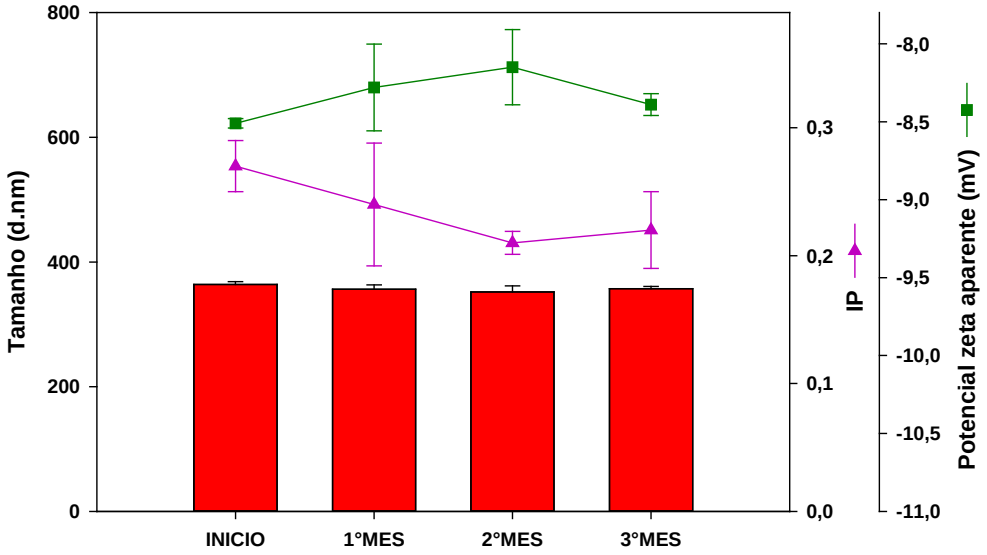
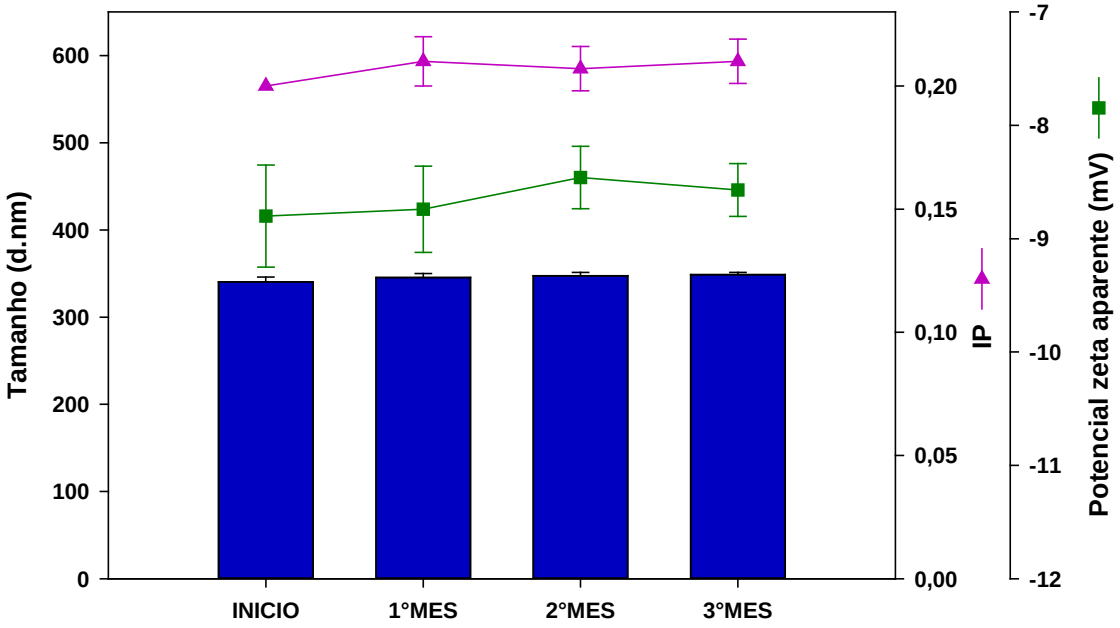


Figura 94- Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) da nanocristais de rifampicina em F2-MU durante 3 meses a 4ºC.



5.3.14. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) das nanosuspensões de rifampicina obtidas empregando método de moagem via úmida em escala reduzida

Os valores de absorbância máxima e mínima foram atribuídos aos controles positivo (micobactéria) e negativo (meio de cultura). A Tabela 40 apresenta os resultados das absorbâncias do ensaio concentração mínima inibitória.A média dos

valores (total de 24 ensaios) para as formulações F1-UM, F2-UM, F-FURP e rifampicina-padrão (Tabela 41) foi comparada empregando análise de variância. A análise revelou diferença significativa entre as médias das preparações F1-MU, F2-MU, F-FURP e rifampicina-padrão (valor-p igual a 0,000; α=0,05) (Tabela 41).

Tabela 40- Valores das absorbâncias obtidas na determinação mínima inibitória das nanosuspensões de rifampicina (F1-MU e F2-MU), suspensão de rifampicina 20mg/mL (F-FURP) e rifampicina padrão.

Concentração (µg/mL)	H37Rv	Rifampicina padrão	F1-MU	F2-MU	F-FURP
	0,7491	0,0655	0,0754	0,068	0,0668
8	0,6269	0,0627	0,0755	0,0635	0,0643
	0,6227	0,0626	0,0508	0,0653	0,0678
	0,6204	0,0652	0,0724	0,0649	0,0677
4	0,636	0,0691	0,0767	0,0722	0,0777
	0,5835	0,0688	0,0744	0,0738	0,072
	0,6537	0,0766	0,0893	0,0751	0,0782
2	0,7458	0,0921	0,0973	0,063	0,0968
	0,7431	0,0676	0,0776	0,0671	0,0732
	0,6103	0,0646	0,0738	0,062	0,0696
1	0,6602	0,0663	0,0766	0,0651	0,0695
	0,6001	0,0678	0,0795	0,0623	0,0719
	0,6556	0,0718	0,0805	0,065	0,0769
0,5	0,572	0,0699	0,0802	0,0655	0,0785
	0,6205	0,0828	0,0941	0,0496	0,0831
	0,6875	0,0922	0,1048	0,0882	0,1028
0,25	0,5868	0,0682	0,0922	0,0609	0,0824
	0,5447	0,073	0,09	0,0634	0,0799
	0,566	0,0747	0,0952	0,0634	0,0793
0,125	0,5855	0,0704	0,1023	0,0656	0,0865
	0,6085	0,0709	0,1044	0,0676	0,0972
	0,5757	0,0734	0,0994	0,0733	0,0917
0,063	0,633	0,0787	0,1032	0,0699	0,0943
	0,644	0,092	0,1255	0,0867	0,1099

Tabela 41- Médias, desvio padrão (DP) e IC (95%) das absorbâncias.

Condição	N	Média	DP	IC de 95%
F-FURP	24	0,08075	0,01236	(0,07604; 0,08546)
F1-MU	24	0,08713	0,01559	(0,08242; 0,09184)
F2-MU	24	0,06756	0,00802	(0,06285; 0,07226)
Rifampicina padrão	24	0,07279	0,00889	(0,06808; 0,07749)

Tabela 42- Análise de variância das absorbâncias para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio de avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) das nanosuspensões de rifampicina (F1-MU e F2-MU), F-FURP 20mg/mL e rifampicina padrão.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Condição 1	9	0,005365	0,001788	13,27	0,000
Erro	92	0,012399	0,000135		
Total	95	0,017764			

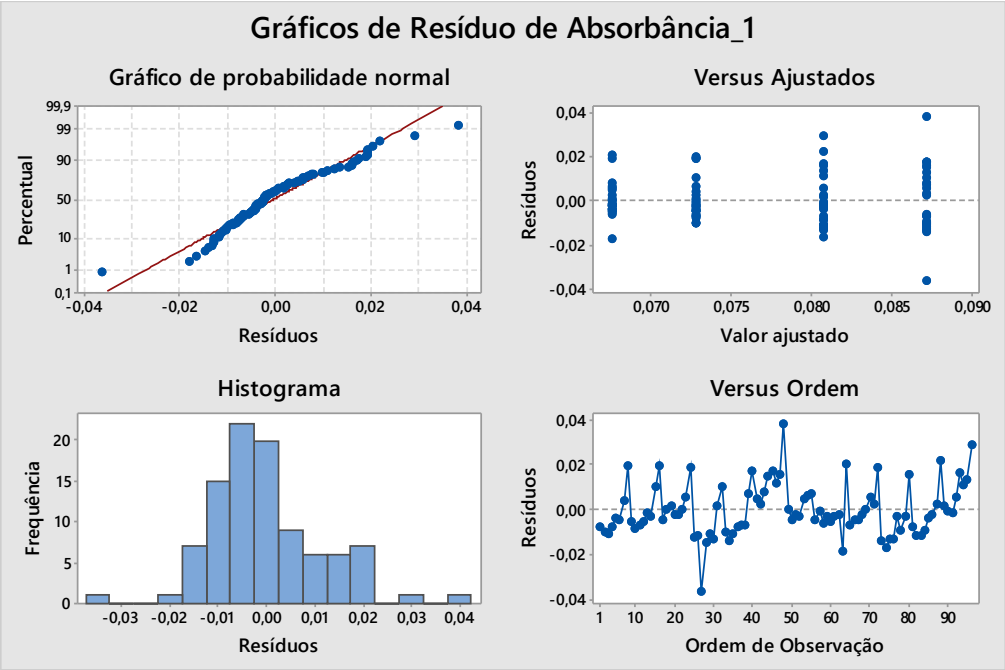
A magnitude das diferenças observadas na análise de variância foi revelada utilizando teste de comparação múltiplas, o teste de Tukey. Esse teste permite comparar as médias dos tratamentos (F1-MU, F2-MU, F-FURP e rifampicina padrão). A Tabela 42 apresenta os resultados do teste de Tukey para a concentração mínima inibitória (CMI). As médias seguidas de mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significantes, ao nível de significância de 5%. Observa-se que os agrupamento F1-MU e F-FURP; F-FURP e rifampicina padrão e rifampicina padrão e F2-MU não apresentam diferenças significativas entre si. Assim, esses resultados confirmaram a atividade antimicrobiana das nanosuspensões frente a micobactéria (Tabela 43).

Tabela 43- Teste de Tukey

Condição	Tratamento	Média	Agrupamento		
F1-MU	24	0,08713± 0,01559	A		
F-FURP	24	0,08075± 0,01236	A	B	
Rifampicina padrão	24	0,07279± 0,00889		B	C
F2-MU	24	0,06756± 0,00802		C	

As absorbâncias médias referem-se à concentração das preparações (F1-MU, F2-UM, F-FURP e rifampicina -padrão), na faixa entre 8,0 e 0,063 e µg/mL.Suo e colaboradores (1988) determinaram a concentração mínima inibitória para cepas de *Mycobacterium tuberculosis* susceptíveis a rifampicina. Os autores revelaram que tais cepas apresentaram CMI menor ou igual 0,5µg/mL. Para cepas resistentes (Zhang et al, 2014), as CMI podem exceder 256 µg/mL.

Figura 95- Gráfico de resíduos da avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) das nanosuspensões de rifampicina (F1-MU e F2-MU), suspensão de rifampicina 20mg/mL e rifampicina padrão.



Com referência aos resíduos, a suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal e pelo histograma (Figura 95). No gráfico de probabilidade normal, o resíduo é representado em função de seu valor esperado, calculado a partir da suposição de que os resíduos seguem distribuição normal. Considerando os resultados obtidos, a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade, assim como, o histograma, é possível inferir que a suposição de normalidade é válida. Além disso, o gráfico das observações individuais demonstrou comportamento aleatório dos resíduos (Figura 95).

6. CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido e validado para determinação para quantificação de e rifampicina nos estudos de solubilidade e nas nanosuspensões por espectrofotometria na região UV-Vis cumpriram com as especificações estabelecidas pela RDC 899/2003 em quanto a: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, limite de quantificação e robustez nos meios proposto para o estudo: água, tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e 7,2.

Foi desenvolvido método de determinação de tamanho médio para rifampicina matéria-prima e nanosuspensões do mesmo fármaco usando-se equipamento de difração de raios laser (DL).

O método de moagem de alta energia permitiu a formação de nanocristais de rifampicina, no entanto, foram observados formação de agregados. A redução do tamanho das partículas da matéria-prima (50,08 ± 0,03 µm) foi significativa para as três formulações (F1-M:18,21 ± 0,17 µm, F2-M: 9,49 ± 0,32 µm e F3-M:14,41 ± 0,11 µm) quando comparados pelo método de difração de raios laser (DL).

Os ensaios de caracterização de tamanho e morfologia para as formulações obtidas pelo método de moagem de alta energia permitiram determinar a presença de agregados, formados na sua vez por partículas pequenas. Esse fenômeno foi devido a uma instabilidade do sistema causado pela baixa capacidade dos agentes estabilizantes em causar a repulsão das partículas.

Os estudos de analise térmica das misturas físicas (rifampicina-hidroxipropilcelulose, rifampicina-poloxâmero 188 e rifampicina-lecitina) utilizados no método de moagem de alta energia revelaram a ausência de incompatibilidade. Portanto esses agentes estabilizantes são recomendados para futuros estudos de preparação de nanocristais de rifampicina. Mas sugere-se aumento da concentração ou mistura deles.

O método de homogeneização a alta pressão permitiu a obtenção de nanocristais de rifampicina (F1-H e F2-H.). Os nanocristais da F1-H, utilizando poloxâmero188 como agente estabilizante apresento formação de agregados após 24 horas (Dia 0: 31,05 ± 2,85 nm e Dia 1: 524,30 ± 11,31 nm). Que permite determinar a incapacidade do polímero em manter estável o sistema. Se sugere uso em conjunto com outros tipos de tensoativos ou polímeros. A F2-H que contem Povacoat™ como agente estabilizante apresento excelentes resultados em quanto a tamanho (412,60 ± 4,12 nm), morfologia e estabilidade.

O estudo de analise térmica das misturas física do fármaco-Povacoat™ permitiu determinar ausência de incompatibilidade permitindo seu uso nas formulações. No entanto, a elevada concentração de Povacoat™ (10% p/p) poderia elevar a toxicidade da preparação.

A avaliação do processo de moagem via úmida em escala reduzida pela metodologia de superfície de resposta permitiu a formação de formulações estáveis e

com adequadas características físico –químicas. A validação do modelo matemático para diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) permitiu a obtenção das formulações F1-MU e F2-MU. Essas formulações apresentam DHM de 340,60 ± 5,44 nm e 364,20 ± 4,50 nm, respetivamente. A morfologia apresentada foi semi- esférica e com adequada estabilidade no período de 3 meses (não formação de agregados).

A solubilidade de saturação da rifampicina foi até 3,03 vezes maior quando comparado com a matéria –prima micronizada.

Os perfis de dissolução em 45 minutos para as nanosuspensões F1-MU e F2-MU e produto FURP-Rifampicina suspensão oral 20mg/mL demostraram uma dissolução rápida do fármaco, como resultado da redução do tamanho da partícula.

A avaliação da atividade antimicrobiana das nanosuspensões foi confirmada frente à rifampicina padrão por meio da determinação da sua concentração mínima inibitória.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, S. et al. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 22, n. 2-3, p. 127–44, 2004.

ALVES, R. **Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco –excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose.** São Paulo: USP, 2007.90p. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo,2007.

AHUJA, B. K. et al. Formulation, optimization and in vitro-in vivo evaluation of febuxostat nanosuspension**. International journal of pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 540–52, 2015.

BACCHI, A et al. Comprehensive study on structure-activity relationships of rifamycins: discussion of molecular and crystal structure and spectroscopic and thermochemical properties of rifamycin O. **Journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 13, p. 2319–32, 1998.

BARBOSA S.F. et al. Physical–chemical properties of furosemide nanocrystals developed using rotation revolution mixer. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.1,n.11. 2005.

BECKER, C. et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Rifampicin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 7, p. 2252–67, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Resolução RE n°899,29 de maio de 2003. **Guia de validação de métodos analíticos e bioanaliticos**. Diário oficial da União da Republica Federativo do Brasil, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde-Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, série A, 7 ed., cad.7, p.39-60, Brasil, 2009.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde**. Rev. Saude Publ. v.44, n.1, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. [s.l.], 2011b. 2 p.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. **Incidência da tuberculose cai 20,2% no Brasil em uma década, 2016**. Disponível em: < http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/22740-incidencia-da-tuberculose-cai-20-2-no-brasil-em-uma-decada>. Acesso em: 30 de março de 2016.

CANELAS, D. A.; BETTS, D. E.; DESIMONE, J. M. Dispersion Polymerization of Styrene in Supercritical Carbon Dioxide: Importance of Effective Surfactants. **Macromolecules**, v. 29, n. 8, p. 2818–2821, 1996.

CHANDA.H et al. Development and evaluation of liposomes of fluconazole. **Journal of pharmaceutical and biomedical sciences**, v.5, n.5, p. 1-9, 2011.

CHOI, J. Y. et al. Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. **Current Applied Physics**, v. 5, n. 5, p. 472–474, 2005.

COSTA, I. F. B. et al. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of Ocotea notata from Brazilian restinga. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 947248, 2015.

DENG, J.; HUANG, L.; LIU, F. Understanding the structure and stability of paclitaxel nanocrystals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 242–9, 2010.

DOLENC, A. et al. Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 376, n. 1-2, p. 204–12, 2009.

DRESSMAN, J. B.; REPPAS, C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11 Suppl 2, p. S73–80, 2000.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES initiative, 2015. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/>. Acesso em: 15 de maio 2016.

DURÁN, N. et al. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.

DURRER, C. et al. Mucoadhesion of Latexes. I. Analytical Methods and Kinetic Studies. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 5, p. 674–679, 1994.

GONZALES, R. S. **Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas.** São Paulo: USP, 2015.155 p. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Fermentações, Universidade de São Paulo, São Paulo,2015.

GAO, L.; ZHANG, D.; CHEN, M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 5, p. 845–862, 2008.

GAO, L. et al. Drug nanocrystals: In vivo performances. **Journal of controlled reléase**, v. 160, n. 3, p. 418–30, 28 jun. 2012.

GAO, L. et al. Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 2, p. 307–24, 2013.

GE, Z.-Q. et al. Enhanced oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles via antisolvent precipitation with TPGS1000 as a stabilizer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology,** v. 29, p. 210–217, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HENWOOD, S. Q. et al. Solubility and dissolution properties of generic rifampicin raw materials. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 403–8, 2000.

HERNANDEZ, K. N. **Development and characterisation of buparvaquone nanosuspensions for pulmonary delivery in the treatment of Pneumocystis pneumonia.** 2007. 199p. Dissertation (Master) (Fachbereich/Einrichtung FB Biologie, Chemie, Pharmazie), Freien Universität Berlin, Deutschland.

ICH – "International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for registration of Pharmaceutical for Human use**. Validation of Analytical procedure: methodology Q2(R1)"**, USA,1996.

JACOBS, C.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 161–164, mar. 2000

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

JUNIOR, W.A.P. Quimioterapia da tuberculose, complexo Mycobacterium avium e hanseníase. In: **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p.1083-1102.

KATTEBOINAA, S.; P, V. S. R. C.; BALAJI, S. Drug nanocrystals: A novel formulation approach for poorly soluble drugs. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 3, p. 682–694, 2009.

KESISOGLOU, F.; PANMAI, S.; WU, Y. Nanosizing--oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 631–44, 2007.

KHARB, V. et al. Nanoparticle Technology for the Delivery of Poorly Water-Soluble **Pharmaceutical Technology** ,v.30, n.2, p.82, 2006.

HONG, C. et al. Effects of stabilizing agents on the development of myricetin nanosuspension and its characterization: an in vitro and in vivo evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 477, n. 1-2, p. 251–60, 2014

KEALEY, A.; SMITH, R. Neglected tropical diseases: infection, modeling, and control. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 21, n. 1, p. 53–69, 2010.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 1, p. 3–16, 2006.

KECK, C. M. Particle size analysis of nanocrystals: improved analysis method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 3–12, 2010.

Kim, C. J.. Surface chemistry and colloids. In:_____.**Advanced pharmaceutics: physico- chemical principles**. CRC Press, 2004, p. 193–256.

KOELMANS, H.; OVERBEEK, J. T. G. Stability and electrophoretic deposition of suspensions in non-aqueous media. **Discussions of the Faraday Society**, v. 18, n. 0, p. 52, 1954.

KU, M. S. Use of the Biopharmaceutical Classification System in early drug development. **The AAPS journal**, v. 10, n. 1, p. 208–12, 2008

KUMAR, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. Sugars as bulking agents to prevent nano-crystal aggregation during spray or freeze-drying. **International journal of pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 303–11, 2014.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. M. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 788–93, jun. 2001.

LIN, S.-Y. et al. DSC-FTIR microspectroscopy used to investigate the heat-induced intramolecular cyclic anhydride formation between Eudragit E and PVA copolymer. **Polymer Journal**, v. 43, n. 6, p. 577–580, 2011.

LIU, P. **Nanocrystal formulation for poorly soluble drugs.** 2013. Ph. D. Thesis (Pharmacy) - Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, Finland , 2013

LIVERSIDGE, G. G.; CONZENTINO, P. Drug particle size reduction for decreasing gastric irritancy and enhancing absorption of naproxen in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, n. 2, p. 309–313, 1995.

MAULUDIN, R.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n. 1-2, p. 202–9, 31 mar. 2009.

MCCLEMENTS, D.J.. **Emulsion stability, Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques.** CRC Press, 2 nd, 2004, p. 185–234

MERISKO-LIVERSIDGE, E. M.; LIVERSIDGE, G. G. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 43–8, jan. 2008.

MIKAEL. K, INGEGÄRD. J. Surfactants from Renewable Resources. In: Willem van Nieuwenhuyzen. **Lecithin and Other Phospholipids.** USA: Wiley, 2010. cap. 10.

MISHRA, P. R. et al. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 182–9, 17 abr. 2009.

MORAN, M. et al. Neglected disease research and development: how much are we really spending?. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 2, p. e30, 2009.

MOREL, C. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cad. Saude Publica**, v. 22, n. 8, p. 1522-1523, 2006.

MÜLLER R.H, PETERS K, BECKER R, et al. **Nanosuspensions – a novel formulation for the IV administration of poorly soluble drugs.** In: 1st World Meeting of the International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 1995, Budapest.

MÜLLER, R. H.; PETERS, K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs I. Preparation by a size-reduction technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 160, n. 2, p. 229-237, 1998.

MULLER R.H.; BECKER. R; KRUSS. B; PETERS, P. **Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution**. US 5858410 A, 9 nov. 1995,12 jan.1999.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 3–19, 2001.

MÜLLER, R. H.; GOHLA, S.; KECK, C. M. State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 1, p. 1–9, 2011.

Nano Systems L.L.C. Bruno, J.A. et al. **Method of grinding pharmaceutical substances.** US Patent 5518187, 1996.

NUTAN, M.T.H.; Reddy I.K. General principles of suspensions, in: Kulshreshtha, A.K.; Singh, O.N.; Wall, G.M. **Pharmaceutical suspensions: from formulation development to Manufacturing**, Springer, 2009, p. 39–66.

Organização Mundial de Saúde. Rifampicin Compressi- Rifampicin Tablets. 2012.

Organização Mundial de Saúde. Tuberculosis y poblaciones vulnerables: desafios, 2015a. Disponível em: < http://www.who.int/tb/challenges/es/>. Acesso em: 11 de maio 2016

Organização Mundial de Saúde. **Sustainable Development Goals (SDGs)**, 2015b. Disponível em: <http://www.who.int/topics/sustainable-development-goals/en/. > Acesso em:10 de fevereiro de 2016b.

Organização Mundial de Saúde. **WHO End TB Strategy**. 2015c. Disponível em: <http://www.who.int/tb/post2015_strategy/en/>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2016.

Organização Mundial de Saúde. **The top 10 causes of death.** 2016a. Disponível em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>. Acesso em: 11 de maio de 2016.

Organização Mundial de Saúde. **Tuberculosis**. 2016b. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. Acesso em: 11 de maio de 2016.

Organização Mundial de Saúde. **Global tuberculosis report,** v.10,2016c. Disponível em: < http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 12 de julho de 2015.

Organização Mundial de Saúde. **Sustainable Development Goal 3.** 2016d. Disponível em: < http://www.who.int/topics/sustainable-development-goals/targets/en/>. Acesso em: 11 de maio de 2016.

Organização Mundial de Saúde. **WHO End TB Strategy.** 21016e. Disponível em: < http://www.who.int/tb/post2015_strategy/es/>. Acesso em: 11 de maio de 2016.

Organização Pan Americana da Saúde- Organização Mundial de Saúde. **Tuberculosis in the Americas- Regional Report**. Whashington: OPAS-OMS;2014.

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

PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug delivery nanoparticles formulation and characterization**. 1st e. New York: Informa Healthcare, 2009.416p.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827–40, 2004.

PELIZZA, G. et al. Polymorphism of rifampicin. **Il Farmaco; Edizione Scientifica**, v. 32, n. 7, p. 471–81, 1977.

PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1569–79, 2010.

PONCHEL, G. et al. Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 44, n. 1, p. 25–31, 1997.

PONGPEERAPAT, A. et al. Formation mechanism of colloidal nanoparticles obtained from probucol/PVP/SDS ternary ground mixture. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1-2, p. 309–16, 2008.

QIAN, Y. S. et al. Production, Characterization and Evaluation of Kaempferol Nanosuspension for Improving Oral Bioavailability. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 549–55, 2016

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

RABINOW, B. Pharmacokinetics of drugs administered in nanosuspension. **Discovery Medicine**, v. 5, n. 25, p. 74–9, 2005.

REED R.G, CZEKAI D.A, BOSCH H.W, RYDE N.P, RYDE T. **Small scale mill and methods thereof.** US 6431478 B1, 31 maio 2000, 13 ago. 2002.

ROMERO, G. B.; KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 501, n. 1-2, p. 236–44, 2016.

ROSSETTI, M. L. R. et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 4, p. 525–532, 2002.

SAWANT, K. K.; PATEL, M. H.; PATEL, K. Cefdinir nanosuspension for improved oral bioavailability by media milling technique: formulation, characterization and in vitro-in vivo evaluations. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 42, n. 5, p. 758–68, 2016.

SHEGOKAR, R.; MÜLLER, R. H. Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, n. 1-2, p. 129–39, 2010.

SKOUG, J. W. et al. Roteiro para o desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharm. Technol**., São Paulo, n. 1, p. 34-43, 1997

STEELE, G. Preformulation Predictions from Small Amounts of Compound as an Aid to Candidate Drug Selection. In: GIBSON, M. **Pharmaceutical Preformulation and Formulation**, Florida: Taylor & Francis, 2001.

STEGEMANN, S. et al. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 5, p. 249–261, 2007.

Stop TB Partnership. **The Global Plan to End TB 2016 – 2020**. Disponível em: < http://www.stoptb.org/global/plan/plan2/>. Acesso em: 11 de maio de 2016.

SUO, J. et al. Minimal inhibitory concentrations of isoniazid, rifampin, ethambutol, and streptomycin against Mycobacterium tuberculosis strains isolated before treatment of patients in Taiwan. **The American review of respiratory disease**, v. 138, n. 4, p. 999–1001, 1988.

TAKATSUKA, T. et al. Nanosizing of poorly water soluble compounds using rotation/revolution mixer. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 10, p. 1061-1067, 2009.

TALUKDER, R. et al. Dissolution and Solid-State Characterization of Poorly Water-Soluble Drugs in the Presence of a Hydrophilic Carrier. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1227–1233, 2011.

Training Workshop on Assessment of Quality Part of Dossier: **Dissolution case studies. Copenhagen.** WHO: WHO Prequalification Programme,2011.

USP. United States Pharmacopea and National Formulary USP 29-NF 24; United Pharmacopeial Convention, Inc,: Rockville, MD,2010.

VARSHOSAZ, J.; ESKANDARI, S.; TABBAKHIAN, M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1157–1163, 2012.

VERMA, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, n. 1, p. 216–222, 2009.

VERONESI, R. Tratado de infectologia. São Paulo: Editora Atheneu, v.1.2005.1225p.

XU, M. et al. Application and functional characterization of POVACOAT, a hydrophilic co-polymer poly(vinyl alcohol/acrylic acid/methyl methacrylate) as a hot-melt extrusion carrier. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 1, p. 126–35, 2014.

WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 90–9, ago. 2010.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annual review of pharmacology and toxicology, v. 45, n. 2, p. 529–64, 2005

ZHANG, Z. et al. Could high-concentration rifampicin kill rifampicin-resistant M. tuberculosis? Rifampicin MIC test in rifampicin-resistant isolates from patients with osteoarticular tuberculosis. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 9, p. 124, 2014.

ANEXOS

02/06/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 7930400/2 - Katherine Jasmine Curo Melo

Email:	katherinecm30@usp.br
Data de Nascimento:	30/06/1987
Cédula de Identidade:	RNE - V801567-9 - DF
Local de Nascimento:	Peru
Nacionalidade:	Peruana
Graduação:	Bachiller en Farmacia y Bioquímica - Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Peru - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	03/02/2014
Início da Contagem de Prazo:	03/02/2014
Data Limite para o Depósito:	03/08/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Nádia Araci Bou Chacra - 03/02/2014 até o presente. Email: chacra@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/02/2014 Português, Aprovado em 31/05/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 17/04/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 03/02/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2016

Impresso em: 02/06/2016 06:31:43

02/06/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 7930400/2 - Katherine Jasmine Curo Melo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-3/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/02/2014	28/05/2014	45	3	100	B	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	8	91	A	N	Concluída
FBF5800-1/3	Patentes em Fármaco e Medicamentos	26/08/2014	27/10/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5813-1/1	Tecnologias de Caracterização de Sistemas Nanoestruturados	04/09/2014	15/10/2014	90	6	90	A	N	Concluída
FBF5805-1/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	80	A	N	Concluída
FBA5754-1/2	Atualização em Ciências Farmacêuticas	20/10/2014	26/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5706-2/2	Planejamento Experimental para Otimização de Produtos e Processos em Alimentos	26/02/2015	21/06/2015	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
QFL5714-7/1	Introdução à Análise Térmica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/08/2015	04/10/2015	90	6	97	A	N	Concluída
FBF5821-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Avanços e Desafios no Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados para a Liberação Modificada de Fármacos)	23/09/2015	21/10/2015	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	33
Estágios:			
Total:	0	25	33

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2016
Impresso em: 02/06/2016 06:31:43

02/06/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 7930400/2 - Katherine Jasmine Curo Melo

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
1231705	Nádia Araci Bou Chacra	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2016
Impresso em: 02/06/2016 06:31:43

Currículo Lattes

Imp curr

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Eventos +

Katherine Jasmine Curo Melo

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/3051137656523463

Última atualização do currículo em 25/11/2015

Mestrando na área de Produção e Controle Farmacêuticos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Possui graduação em Farmácia y Bioquímica pela Universidad Nacional Mayor de San Marcos (2012) e graduação sanduíche na Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo (2012). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Produção e Controle Farmacêuticos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Katherine Jasmine Curo Melo

Nome em citações bibliográficas

MELO, K. J. C.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2014

Mestrado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Nádia Araci Bou Chacra.

2013

Aperfeiçoamento em andamento em Fármacos e Medicamentos. (Carga Horária: 8h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: ?Nanocarreadores lipídicos contendo dexametasona: preparação e caracterização físico-química?.

2012 - 2012

Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: EXPRESSÃO DE BACTERIOCINA DE LACTOBACILLUS PLANTARUM ST16PA EM AGITADOR ROTATIVO UTILIZANDO SORO DE LEITE.
Orientador: . Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira.

2007 - 2012

Graduação em Farmacia y Bioquímica.
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, UNMSM, Peru.

Formação Complementar

2011 - 2011

12º Programa de Certificação de Empresas COFIDE.. (Carga horária: 27h).
Corporación Financiera de Desarrollo S.A., COFIDE, Peru.

2009 - 2009

Boas práticas de dispensação e ventas de produtos.. (Carga horária: 30h).
Boticas Torres de Limatambo, BTL, Peru.

2006 - 2006

Curso Básico de Informática. (Carga horária: 60h).
Centro Informático San Marcos (Info San Marcos), CBI, Peru.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Vínculo institucional

2012 - Atual

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Iniciadora científica, Carga horária: 20

Hospital Nacional Dos de Mayo, HNDM, Peru.

Vínculo institucional

2011 - 2011

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Assistente de Farmacotécnica e Dose Unitaria, Carga horária: 30

Boticas Torres de Limatambo, BTL, Peru.

Vínculo institucional

2009 - 2011

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Estudante QF-Vendedor multifuncional, Carga horária: 24

Drogaria Nacional S.A.C., DN, Peru.

Vínculo institucional

2009 - 2009

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Atendimento ao cliente, Carga horária: 30

Farma Internacional S.A.C., F.I., Peru.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Atendimento ao cliente, Carga horária: 30

Projetos de pesquisa

2014 - Atual

NANOCRISTAIS DE RIFAMPICINA: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO- QUÍMICA.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Katherine Jasmine Curo Melo - Coordenador / Nádia Araci Bou-Chacra - Integrante.

2012 - 2012

EXPRESSÃO DE BACTERIOCINA DE LACTOBACILLUS PLANTARUM ST16PA EM AGITADOR ROTATIVO UTILIZANDO SORO DE LEITE

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Integrantes: Katherine Jasmine Curo Melo - Coordenador / Richard Saldaña Gonzales - Integrante / Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira - Integrante.

2012 - Atual

?NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO DEXAMETASONA: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA?

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Katherine Jasmine Curo Melo - Coordenador / Nádia Araci Bou-Chacra - Integrante.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: PRODUÇÃO E CONTROLE FARMACÊUTICOS.

2.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Tecnología Farmacéutica.

3.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmacia Hospitalaria.

Idiomas

Espanhol

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Português

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

2012

Reconocimiento a Becarios SANMARQUINOS, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, DECANA DE AMERICA, OGCRI..

2010

Reconocimiento como integrante del grupo estudiantil BIOCIFAR (Associação Farmacêutica de Biotecnologia), Vicerrectorado de Investigación- Universidad Nacional Mayor de San Marcos, DECANA DE AMERICA..

2009

Reconocimiento como integrante del grupo estudiantil SOFIC (Sociedade Farmacêutica de Pesquisa Científica), Vicerrectorado de Investigación- Universidad Nacional Mayor de San Marcos, DECANA DE AMERICA..

Produções

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1.

MELO, K. J. C.; BOU-CHACRA, N. A. . Development of Rifampin Nanocrystals Using High Energy Milling: Physical Aspects. In: Published Meeting Abstracts, 2014, San Diego. Published Meeting Abstracts, 2014.

Produção artística/cultural

Outras produções artísticas/culturais

1.

MELO, K. J. C.. 43 ABAV Expo Internacional de Turismo. 2015 (Cultural).

2.

MELO, K. J. C.. World Travel Market LA 2015. 2015 (Cultural).

3.

MELO, K. J. C.. 27ª Feira de Turismo de Gramado FESTURIS. 2015 (Cultural).

4.

MELO, K. J. C.. 42 ABAV Expo Internacional de Turismo. 2014 (Cultural).

5.

MELO, K. J. C.. 41 ABAV Expo Internacional de Turismo. 2013 (Cultural).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

O sussesso da redução de tamanho de partícula na indústria farmacêutica: tecnologia de moagem e mistura & caracterização de tamanho. 2015. (Outra).

2.

Workshop: How to Write for and Get Published in Scientific Journals. 2015. (Outra).

3.

Nanofibras: materiais poliméricos e suas tecnologias inovadoras de aplicação nos sistemas de liberação modificada de fármacos, na medicina.. 2014. (Outra).

4.

Nanotecnologia Sistemas de Moagem e de Análise Térmica. 2014. (Seminário).

5.

Workshop: Aspectos Práticos da Implementação do QbD na Industria Farmacêutica. 2014. (Outra).

6.

Workshop NAP-NN. 2014. (Outra).

7.

Absorption of Drugs and Nanoparticles Through the Skin. 2013. (Outra).

8.

Atualização em Imunização. 2013. (Seminário).

9.

Curso de Bioestatística. 2013. (Outra).

10.

Curso de Bioestatística Prática. 2013. (Outra).

11.

Dissolução de Formas Farmacêuticas Sólidas. 2013. (Outra).

12.

Empreendedorismo Farmacêutico ? Start Up e Cases de Sucesso. 2013. (Seminário).

13.

I Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica. 2013. (Outra).

14.

Mini Curso de Nanotecnologia. 2013. (Outra).

15.

Nanotecnologia Sistemas de Moagem e de Análise Térmica. 2013. (Seminário).

16.

Novas técnicas farmacêuticas para a solubilização de fármacos. 2013. (Seminário).

17.

Simpósio de Nanotecnologia. 2013. (Simpósio).

18.

Workshop Risk analysis, modeling and statical methods for a quality by design envnvironment. 2013. (Outra).

19.

Worshop em Controle de Medicamentos e Cosméticos: Atualização e Tendências. 2013. (Outra).

20.

Biotecnologia e Inovação. 2012. (Outra).

21.

Desafios e oportunidades para inovação em medicamentos no Brasil. 2012. (Outra).

22.

Desenvolvimento de Perfume. 2012. (Oficina).

23.

Desenvolvimento de processos para produção de fármacos. 2012. (Outra).

24.

Marketing Farmacêutico: Propaganda, Planejamento estratégico, pesquisa de mercado e promoção.. 2012. (Outra).

25.

Nanoencapsulação- Estabilização de Perptídeos Bioativos para Aplicações Alimentícias. 2012. (Outra).

26.

Planejamento de Experimentos Aplicado ao Desenvolvimento de Bioprocessos. 2012. (Outra).

27.

Probióticos, prebiótico, simbióticos. 2012. (Outra).

28.

Processos aquosos de duas fases para a recuperação de produtos com alto valor biológico. 2012. (Outra).

29.

Prospecção de peptídeos ativos a partir do soro de leite. 2012. (Outra).

30.

Simpósio de Inovação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.. 2012. (Simpósio).

31.

Investifgación Clínica y Administración de Ensayos Clínicos. 2011. (Seminário).

32.

Programa de Certificación Empresarial de COFIDE: TABLA DE NEGOCIOS MYPE. 2011. (Oficina).

33.

Buenas Prácticas de Dispensación y Ventas de Productos Farmacéuticos. 2009. (Seminário).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 02/06/2016 às 14:42:19

Baixar Currículo | Imprimir Currículo