UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de artemeter: Preparação e caracterização físico-química

Ivan Andrés Cordova Morales

Dissertação para obtenção de grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Nadia 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 artemeter: Preparação e caracterização físico-química

Ivan Andrés Cordova Morales

Versão original

Dissertação para obtenção de grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Nadia Araci Bou-Chacra

São Paulo
2016

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

Cordova Morales, Ivan Andrés
C796n Nanocristais de artemeter: preparação e caracterização físico-química / Ivan Andrés Cordova Morales. -- São Paulo, 2016.
196p.

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

1. Farmacotécnica 2. Nanotecnologia 3. Doenças infecciosas I. T. II. Bou-Chacra, Nadia Araci, orientador.

Ivan Andrés Cordova Morales

Nanocristais de artemeter: 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 _____.

A minha família especialmente a minha mãe Vilma Luz Morales Flores, pelo amor, pela fortaleza, pela confiança e por acreditar em mim. Sem você não conseguiria superar os momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Nádia Araci Bou-Chacra pela orientação, pelas palavras de apoio dia a dia, pela motivação, pela confiança, que foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho, tenho orgulho e sorte de ter tido uma pessoa tão maravilhosa como orientadora.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao professor Gabriel Lima Barros de Araújo, pelo conhecimento outorgado nas discussões de Analise Térmica e pelas inúmeras dúvidas sanadas.

Ao professor Flavio Carvalho, por disponibilizar as instalações do seu laboratório para os ensaios de difração de raios X.

Ao professor Humberto Gomez Ferraz e o Laboratório de Desenvolvimento e Inovação em Farmacotécnica (DEINFAR) pelo apoio brindado durante todos os ensaios.

Ao professor Marco Antônio Stephano e ao mestre Richard Saldaña, por disponibilizar as instalações do seu laboratório para os ensaios de liofilização.

Aos amigos do laboratório Megumi, Katherine, Mirla, Debora, Lis, Jessica, Aline, Oswaldo que compartilharam os momentos vividos durante este período.

Aos amigos Juan Flores e Alonso Paico pelas boas energias que me renovaram durante toda essa jornada.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

RESUMO

MORALES, I. C. **Nanocristais de artemeter: preparação e caracterização físico-química**. 2016. 196p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016.

A nanotecnologia tem sido empregada como plataforma para o desenvolvimento de formas farmacêuticas com maior eficácia e segurança. A redução do tamanho de partículas em escala nanométrica permite conferir ao material propriedades inovadoras que têm sido exploradas em inúmeras aplicações, principalmente na indústria farmacêutica. Essa nova característica permite aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água. Os nanocristais apresentam como vantagens o aumento da solubilidade de saturação e da velocidade de dissolução. Tais propriedades são decorrentes da sua maior área superficial. Além disso, os nanocristais apresentam excelente adesão em superfícies biológicas. Essa característica resulta não apenas em uma melhor biodisponibilidade, mas também em redução na variação da biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água. A malária é uma doença negligenciada prevalente nos países emergentes e afeta mais de 210 milhões de pessoas no mundo. Dentre as terapias medicamentosas para o tratamento da malária, o artemeter, derivado da artemisinina, apresenta potente atividade esquizonticida na fase hepática e na fase eritrocítica. Esse fármaco, amplamente utilizado no tratamento da malária, apresenta baixa solubilidade em água limitando sua biodisponibilidade oral. Tendo em vista a melhoria dessa característica, foram utilizados os métodos de moagem a alta energia, homogeneização a alta pressão e moagem via úmida, em escala reduzida para a obtenção de nanocristais. Esse último método foi aquele que permitiu a redução das partículas em escala nanométrica. O método por moagem a alta energia (MAE) revelou, nas condições experimentais do presente trabalho, 10% (D0,1) da população das partículas com diâmetro menor ou igual a 3,504 $\pm$ 0,19 µm, 50% (D0,5) menor ou igual a 14,225 $\pm$ 0,34 µm e 90% (D0,9) menor ou igual a 57,306 $\pm$ 5,72 µm. O diâmetro hidrodinâmico médio foi 25,01 $\pm$ 2,08 µm, sendo que o fator limitante na redução do tamanho da partícula foi a densidade do artemeter. Resultados similares foram obtidos empregando método de homogeneização a alta pressão. Diferentes tensoativos foram avaliados empregando o método selecionado, a moagem via úmida em escala reduzida. O agente estabilizante soluplus® foi aquele que favoreceu a redução do tamanho das partículas. Tal característica foi observada por meio de análise térmica. Essa análise permitiu determinar o grau de amorfização mínima, assim como, a presença de fortes ligações moleculares entre o fármaco e diferentes polímeros. A utilização do método por moagem via úmida em escala reduzida permitiu a obtenção de nanocristais de artemeter (formula R2-MUR), com diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) igual a 342 $\pm$ 16,3 nm, índice de polidispersão (IP) de 0,23 $\pm$ 0,01 e distribuição monomodal de tamanho. Essa preparação otimizada foi obtida por meio de planejamento de experimentos por superfície de resposta tendo como variáreis independentes as concentrações de artemeter e do agente estabilizante (Soluplus®) além do tempo de moagem. As respostas foram o DHM e o IP, determinados utilizando espalhamento de luz dinâmica (DLS). Adicionalmente, as avaliações empregando calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raio X (DRX) revelaram que não houve alteração na estrutura cristalina do artemeter e interação entre o fármaco e os excipientes. O presente trabalho permitiu a obtenção de nanocristais de artemeter com solubilidade de saturação até 2,0 e 1,8 vezes maior em água e tampão McIlvaine (pH 2,5) respectivamente, comparada ao fármaco micronizado. Além disso, a preparação liofilizada foi estável após armazenamento por três meses a temperatura de 25 e 4 °C.

Palavras chave: Nanocristais, artemeter, malária, moagem úmida em escala reduzida.

ABSTRACT

MORALES, I. C. **Artemether nanocrystals: preparation and physical-chemical characterization**. 2016. 196p. Dissertation (Master degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2016.

Nanotechnology has been used as a platform for the development of pharmaceutical forms with greater effectiveness and safety. The reduction of particle size on a nanometric scale enables innovative properties to the material. These properties have been exploited in numerous applications, mainly in the pharmaceutical industry. This novel feature allows increasing the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. Nanocrystals have advantages such as increased saturation solubility and dissolution rate. These properties are due to their greater surface area. In addition, nanocrystals exhibit excellent adhesion on biological surfaces. This characteristic results not only in a better bioavailability but also in a reduction in the bioavailability variation of poorly water-soluble drugs. Malaria is a neglected disease prevalent in emerging countries and affects more than 210 million people worldwide. Among the medicinal therapies for the treatment of malaria, artemisinin-derived, artemether has potent schizonticidal activity in the liver and erythrocyte phases. This drug, widely used in the treatment of malaria, presents low solubility in water limiting its oral bioavailability. In order to improve this characteristic, the methods of high energy milling, high-pressure homogenization and wet milling on a reduced scale were used to obtain nanocrystals. This last method was the one that allowed the reduction of the artemether particles in nanoscale. The high energy milling method revealed, in the experimental conditions of the present study, 10% (D0,1) of the population of particles with a diameter less than or equal to 3,504 $\pm$ 0,19 µm, 50% (D0,5) less than or equal to 14.225 $\pm$ 0.34 µm and 90% (D0.9) less than or equal to 57.306 $\pm$ 5.72 µm. The mean hydrodynamic diameter was 25.01 $\pm$ 2.08 µm, being the limiting factor in the reduction of particle size the density of the artemether. Similar results were obtained using a high-pressure homogenization method. Different surfactants were evaluated using the selected method, wet milling on a reduced scale. The stabilizing agent soluplus® was the one that favored the reduction of the particle size. This characteristic was observed by thermal analysis. This analysis allowed determining the degree of minimum amorphization, as well as the presence of strong molecular bonds between the drug and some polymers. The wet milling on a reduced scale method allowed obtaining artemether nanocrystals (formula R2-MUR) with a mean hydrodynamic diameter (MHD) of 342 ± 16.3 nm, polydispersity index (PdI) of 0,23 $\pm$ 0.01 and monomodal distribution. These preparations were obtained through the response surface methodology (RSM) having as independent variables the concentrations of artemether and stabilizing agent (Soluplus®) and the milling time. MHD and PdI were performed using dynamic light scattering (DLS). In addition, evaluations using differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) revealed that there was no change in the crystal structure of the artemether and interaction between the drug and the excipients. The present work allowed obtaining of artemether nanocrystals with saturation solubility up to 2.0 and 1.8 times higher in water medium and McIlvaine buffer (pH 2.5), respectively, compared to the micronized drug. In addition, the lyophilized preparation was stable after storage for three months at 25 and 4 ° C.

Keywords: Nanocrystals, artemether, malaria, wet scale milling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de Brasil, risco de transmissão de malária.	5
Figura 2.	Esquema do ciclo de vida do *Plasmodium*.	7
Figura 3.	Estrutura molecular da artemisinina e seus derivados.	9
Figura 4.	Sitio de ação do artemeter dentro do ciclo de vida do *Plasmodium*.	10
Figura 5.	Aumento da área superficial e o número de cristais pela diminuição do tamanho da partícula.	13
Figura 6.	**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.	14
Figura 7.	**A:** Representacâo esquemática do metodo em escala reduzida. **B:** Imagem dos frascos adaptados no presente trablho para o desensvolvimento de nanocristais.	18
Figura 8.	Absorção máxima de artemeter (20µg/ml) contra o branco reagente, no intervalo de comprimento de onda de 200-400 nm.	35
Figura 9.	Espectro da varredura do tampão HCl pH 1,3 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.	36
Figura 10.	Espectro da varredura do tampão acetato pH 4,5, no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.	37
Figura 11.	Espectro da varredura do tampão fosfato pH 6,8, no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, para avaliar a especificidade do método analítico do artemeter.	37
Figura 12.	Espectro da varredura do tampão fosfato pH 7,5, no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, para avaliar a especificidade do método analítico do artemeter.	38
Figura 13.	Espectro da varredura da fórmula placebo (Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero “Soluplus®” e manitol) no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.	38
Figura 14.	Espectro da varredura da formula (artemeter e excipientes), no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.	39

Figura 15. Reta de regressão $\hat{y} = 0,03164 + 0,02698x$ ajustada aos pontos experimentais relativos às absorbâncias conforme a concentração do artemeter. 40

Figura 16. Gráfico dos resíduos relativos ao ajuste de uma reta de regressão aos dados de absorbância do artemeter no meio água. 44

Figura 17. Curvas TG/DTG do artemeter obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min. 49

Figura 18. Curvas TG/DTA dinâmica obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do artemeter. 50

Figura 19. Curvas DSC do artemeter obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. 51

Figura 20. Curvas DSC do artemeter, hidroxipropilcelulose e mistura física artemeter/hidroxipropilcelulose, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. 54

Figura 21. Curva TG/DTG do artemeter, hidroxipropilcelulose e mistura física artemeter/hidroxipropilcelulose, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min. 55

Figura 22. Curva TG/DTG do artemeter, TGPS e mistura física artemeter/TGPS, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min. 57

Figura 23. Curvas DSC do artemeter, TGPS e mistura física artemeter/tgps, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. 59

Figura 24. Curva TG/DTG do artemeter, P-407 e mistura física artemeter/P-407, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min. 60

Figura 25. Curvas DSC do artemeter, do P-407 e da mistura física artemeter/P-407, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. 61

Figura 26. Curva TG/DTG do artemeter, soluplus e mistura física artemeter/soluplus, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min. 64

Figura 27. Curvas DSC do artemeter, Soluplus e mistura física artemeter/Soluplus, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. 66

Figura 28. Curva TG/DTG do artemeter, manitol e mistura física artemeter/manitol, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min. 68

Figura 29. Curvas DSC do artemeter, manitol e mistura física artemeter/manitol, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. 70

Figura 30.	Distribuição do tamanho da partícula, por difração a laser (DL), antes do processo de nanonização.	74
Figura 31.	Distribuição do tamanho da partícula, por difração a laser (DL), após do processo de nanonização.	75
Figura 32.	Cristais de artemeter antes **(a)** e após **(b)** o processo da nanopulverização.	77
Figura 33.	Ilustração dos movimentos simultâneos de Rotação (ω) /Revolução (Ω) e a sequência na redução do tamanho de partícula do fármaco (adaptado de Baláž, 2008).	78
Figura 34.	Homogeneizador Pistão-gap (Nano DeBEE, BEE International, Inc. USA).	81
Figura 35.	Esquema do diagrama do homogeneizador à alta pressão, **(a)** processo de obtenção de nanocristais do artemeter a partir de uma adequada suspensão e **(b)** não obtenção de nanocristais do artemeter por uma inadequada suspensão.	82
Figura 36.	Suspensões de artemeter obtidas por homogeneização à alta pressão. A: H1-HAP, B: H2-HAP e C: H3-HAP.	83
Figura 37.	Distribuição granulométrica da H1-HAP das suspensões de artemeter. n=10.	84
Figura 38.	Distribuição granulométrica da H2-HAP das suspensões de artemeter. n=10.	85
Figura 39.	Distribuição granulométrica da H3-HAP das suspensões de artemeter. n=10.	85
Figura 40.	**A:** Imagem dos frascos condicionados no laboratorio para o desensvolvimento de nanocristais. **B:** Imagem do processo de moagem a escala reduzida.	88
Figura 41.	Formulações de artemeter obtidas por moagem úmida em escala reduzida empregando diferentes tensoativos: F1 (poloxamer 407), F2 (TGPS), F3 (kollipor VA64), F4 (soluplus®).	89
Figura 42.	Gráfico de distribuição do diâmetro hidrodinâmico médio por DLS das formulações estabilizadas com diferentes tensoativos, soluplus® (a), poloxamer 407 (b), TGPS (c).	93
Figura 43.	Gráfico de cubo (planejamento fatorial 2^3) para tamanho hidrodinâmico meio (DHM). A resposta aparece nos vértices do cubo.	97
Figura 44.	Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais.	97
Figura 45.	Gráfico de efeitos principais para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de	98

artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais.

Figura 46. Gráfico de interação para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e do soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais. 99

Figura 47. Gráfico da probabilidade normal dos efeitos para DHM contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). 100

Figura 48. Gráfico de resíduos para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). 106

Figura 49. Gráfico de séries temporais da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais e axiais. 107

Figura 50. Gráfico de efeitos principais para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais. 108

Figura 51. Gráfico de interação (efeito quadrático) para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). 108

Figura 52. Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). 109

Figura 53. Gráficos de contorno relativo à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). 110

Figura 54. Gráfico de otimização da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (4,00 dias), concentração de artemeter (4,50 %p/p) e concentração do soluplus® (1,50 %p/p). Predição para 446,72 nm: R1. 111

Figura 55. Gráfico de otimização da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (4,00 dias), concentração de artemeter (4,75 %p/p) e concentração do soluplus® (2,40 %p/p). Predição para 328,46 nm: R2. 111

Figura 56. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersividade (IP) da nanosuspensão de artemeter, analisado em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200) de meio de dispersão insaturado (esquerda), parcialmente saturado (centro) e completamente saturado (direita). 114

Figura 57. Gráfico da influência da concentração da nanosuspensão contendo artemeter (R2-MUR) na determinação do seu potencial zeta. 116

Figura 58. Variação do potencial zeta aparente em função da condutividade para a nanosuspensão contendo artemeter (M2-MER). 117

Figura 59. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico médio por DLS da formulação otimizada (R2-MUR) do nanocristal de artemeter obtido por moagem úmida em escala reduzida. 118

Figura 60. Curva DSC obtida na célula DSC da suspensão de artemeter com manitol 5% a uma razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de N_2, a partir de -70°C a -20°C. 123

Figura 61. Curva DSC obtida na célula DSC da suspensão de artemeter (R2-MUR) com manitol 5% a uma razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de N_2, a partir de -60°C a 25°C e após o tratamento de *annealing*. 124

Figura 62. Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização da nanosuspensão de artemeter – manitol 5% sem *annealing*. (a) Amostra no estado liquido. (b) Cristalização da amostra. (c) Formação da fronte da liofilização da amostra, matriz liofilizada. (d) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (e) Microcolapsos. (f) Macrocolapsos. 126

Figura 63. Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização da nanosuspensão de artemeter – manitol 127

5% com *annealing*. (a) Amostra no estado liquido. (b) e (c) Cristalização da amostra. (d) Maior cristalização da amostra – *annealing*. (e) Formação da fronte da liofilização da amostra, matriz liofilizada. (f) Perdida da estrutura na matriz liofilizada.

Figura 64. Aparência da pastilha liofilizada dos nanocristais de artemeter (R2-MUR). 129

Figura 65. Frascos contendo nanosuspensão de artemeter durante o processo de liofilização. 129

Figura 66. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de artemeter (R2-MUR) reconstituída após liofilização. 130

Figura 67. Imagens da formulação R2-MUR (nanocristais de artemeter) antes da liofilização-volume 1,68 mL (a) e após o processo de liofilização (b). 132

Figura 68. Difratograma (método do pó) de artemeter puro (a), manitol (b), soluplus (c), mistura física (d), nanocristais sem manitol (e), nanocristais com manitol (f). 133

Figura 69. Curvas DSC do manitol (a), soluplus (b), artemeter (c) e nanocristais de artemeter liofilizado (d) obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}. 134

Figura 70. Curvas TG do artemeter (a), manitol (b), soluplus (c) e nanocristais de artemeter liofilizado (d) obtidas a 10°C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}. 135

Figura 71. Solubilidade obtida através do método de equilíbrio do artemeter matéria-prima, das misturas físicas (MF) e dos nanocristais de artemeter liofilizados (R2-MUR liofilizado). As barras de erros indicam o desvio padrão dos testes feitos em triplicatas. 137

Figura 72. Única microespécie do artemeter e sua distribuição em relação ao pH. 138

Figura 73. Ponto isoelétrico do artemeter em relação ao pH. 139

Figura 74. Valores de logP da molécula de artemeter em diferentes pH obtidos da ChemAxon's® Marvin. 142

Figura 75. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e potencial zeta (PZ) da nanosuspensão de artemeter (R2-MUR) durante três meses a 25°C. 144

Figura 76. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e potencial zeta (PZ) da nanosuspensão de artemeter (R2-MUR) durante três meses a 4°C. 144

Figura 77. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de artemeter liofilizados (R2-MUR liofilizados) durante três meses a 25°C. 145

Figura 78. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de artemeter liofilizados (R2-MUR liofilizados) durante três meses a 4°C. 145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Formula e condições dos ensaios para a obtenção de nanocristais de artemeter preparadas por moagem a alta energia (MAE).	25
Tabela 2.	Fórmulas e condições dos ensaios para obtenção de nanocristais de artemeter utilizando homogeneização a alta pressão (HAP).	27
Tabela 3.	Matriz de ensaios para a otimização do processo de produção de nanocristais de artemeter.	28
Tabela 4.	Parâmetros de medida de artemeter (matéria-prima) e nanocristais pelo método de difração de raios laser (DL).	29
Tabela 5.	Valores por triplicata da absorbância obtidas na curva analítica do método para a quantificação do arteméter.	40
Tabela 6.	Parâmetros da reta de regressão.	41
Tabela 7.	Parâmetros estatísticos para avaliação da significância da regressão linear.	42
Tabela 8.	Precisão intra-ensaio e inter-ensaio do método analítico para a determinação de artemeter em agua ultrapurificada.	45
Tabela 9.	Valores experimentais médios de porcentagem de recuperação obtidos para o teste de exatidão do artemeter.	46
Tabela 10.	Valores médios da absorbância do artemeter (30µg/mL) variando o comprimento de onda máximo de absorção.	46
Tabela 11.	Análise de variância ANOVA (um fator) demonstrando que o método é robusto (valor-p>0,05).	47
Tabela 12.	Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, hidroxipropilcelulose e mistura física.	54
Tabela 13.	Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, hidroxipropilcelulose e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.	56
Tabela 14.	Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, TGPS e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.	57
Tabela 15.	Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, TGPS e mistura física.	59

Tabela 16.	Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, P-407 e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.	61
Tabela 17.	Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, P-407 e mistura física.	63
Tabela 18.	Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, soluplus® e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.	65
Tabela 19.	Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, Soluplus® e mistura física.	67
Tabela 20.	Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, manitol e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.	69
Tabela 21.	Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, manitol e mistura física.	70
Tabela 22.	Componentes da formulação M1-MAE.	73
Tabela 23.	Valores de diâmetro médio, a 10%, 50% e 90% do artemeter pó e dos nanocristais.	74
Tabela 24.	Parâmetros críticos otimizados do processo de moagem de alta energia por Takatsuka e colaboradores.	76
Tabela 25.	Média dos valores da temperatura, volume real e densidade real do artemeter.	79
Tabela 26.	Resultados por triplicata das viscosidades de diversos veículos.	82
Tabela 27.	Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% do artemeter matéria-prima e das formulações. n=10.	84
Tabela 28.	Formulações para a obtenção dos nanocristais de artemeter.	88
Tabela 29.	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersividade (IP) das formulações F1, F2 e F3 de nanocristais de artemeter.	89
Tabela 30.	Avaliação da agregação e sedimentação dos nanocristais de artemeter.	94
Tabela 31.	Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula e índice de polidispersividade dos nanocristais artemeter da matriz de ensaios do planejamento fatorial.	95

Tabela 32.	Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p).	101
Tabela 33.	Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula e índice de polidispersividade dos nanocristais artemeter da matriz de ensaios de experimentos por superfície de resposta.	102
Tabela 34.	Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p).	104
Tabela 35.	Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM de nanocristais de artemeter contendo as variáveis: tempo de moagem, concentração de artemeter e do soluplus.	105
Tabela 36.	Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula e índice de polidispersividade das formulações para validação do modelo matemático de nanocristais de artemeter.	112
Tabela 37.	Diâmetro hidrodinâmico meio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) da formulação otimizada (R2-MUR) do nanocristal de artemeter obtido por moagem úmida em escala reduzida.	118
Tabela 38.	Valores dos eventos térmicos da formulação de nanocristais de artemeter – otimizada (R2-MUR) com e sem *annealing* analisadas por microscopia ótica acoplada à liofilização.	127
Tabela 39.	Diâmetro hidrodinâmico meio (DHM), o índice de polidispersividade (IP) e o potencial zeta (PZ) dos nanocristais de artemeter formulação otimizada (R2-MUR) reconstituída após a liofilização.	130
Tabela 40.	Teor de artemeter no produto liofilizado (formula R2-MUR otimizada).	131
Tabela 41.	Solubilidade de saturação do artemeter matéria-prima, da mistura física e dos nanocristais (mg/mL, n=3, ±	136

desvio padrão) e número de vezes no aumento da solubilidade observado nos nanocristais (dados entre parênteses).

Tabela 42. Parâmetros físico-químicos (logP, log D, área de superfície polar (*PSA*) e pontos aceptores e doadores de H) obtidos da ChemAxon's® Marvin. 142

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO..... 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 3
   2.1. Doenças tropicais negligenciadas..... 3
   2.2. Considerações gerais relativas à malária..... 4
   2.3.Artemeter: visão geral..... 8
   2.4.Nanocristais: novo sistema terapêutico nanotecnológico..... 11
   2.5. Tecnologias de obtenção de nanocristais..... 15
3. OBJETIVO..... 19
   3.1. Objetivo geral..... 19
   3.2. Objetivos específicos..... 19
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 20
   4.1. Material 20
   4.2. Método por espectroscopia Ultravioleta-visível..... 21
      4.2.1.Desenvolvimento do método analítico para quantificação do artemeter nos estudos de solubilidade..... 21
      4.2.2. Validação do método analítico para a quantificação do arteméter nos meios empregados no estudo de solubilidade..... 22
   4.3. Preparação dos nanocristais de Artemeter empregando moagem a alta energia..... 25
   4.4. Preparação dos nanocristais de artemeter empregando homogeneização a alta pressão (HAP) 26
   4.5. Preparação dos nanocristais de artemeter empregando via úmida em escala reduzida..... 27
      4.5.1.Otimização do processo de preparação dos nanocristais de artemeter empregando planejamento de experimentos por superfície de resposta com pontos axiais..... 28
   4.6. Caracterização físico-química..... 29
      4.6.1.Distribuição do tamanho dos nanocristais empregando difração de raios laser(DL) 29
      4.6.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) 29
      4.6.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 30
      4.6.4. Analise termogravimétrica (TG/DTG) e análise térmica diferencial (DTA)..... 31
      4.6.5. Solubilidade de saturação..... 31
      4.6.6. Liofilização da nanosuspensão obtida pelo método de moagem úmida em escala reduzida..... 32

4.6.7. Estabilidade das nanosuspensões e dos nanocristais liofilizados..... 34
4.6.8. Avaliação *in silico* das características físico-químicas do artemeter..... 34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 34
5.1. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação do artemeter nos estudos de solubilidade..... 34
5.2. Validação do método analítico para a quantificação do artemeter nos meios empregados no estudo de solubilidade..... 36
5.3. Comportamento térmico do artemeter..... 48
5.4. Comportamento térmico dos excipientes e estudo de compatibilidade fármaco-excipiente..... 52
5.4.1. Hidroxipropilcelulose (HPC) 53
5.4.2. D-α- tocoferol polietileno glicol 1000 succinato (TGPS)…… 56
5.4.3. Poloxamer 407 (P-407)..... 60
5.4.4. Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero (Soluplus®)..... 63
5.4.5 Manitol…….. 67
5.5. Ensaios exploratórios para a obtenção de nanosuspensão de artemeter empregando o método de moagem a alta energia..... 71
5.5.1. Preparação dos nanocristais por moagem à alta energia..... 71
5.5.2. Distribuição e tamanho de partículas do artemeter pó e dos nanocristais obtidos por moagem a alta energia empregando difração a laser (DL) 73
5.5.3. Análise morfológica e tamanho do cristal empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) 77
5.5.4. Determinação da densidade real do artemeter pó…. 77
5.6. Ensaios exploratórios para a obtenção de nanosuspensão de artemeter empregando o método de homogeneização a alta pressão..... 80
5.6.1. Avaliação da viscosidade dos diferentes meios 81
5.6.2. Preparação dos nanocristais de artemeter por homogeneização a alta pressão..... 83
5.6.3. Distribuição do tamanho dos cristais empregando difração a laser (DL) 83
5.6.4. Considerações relativas ao processo de homogeneização a alta pressão..... 86

5.7. Ensaios exploratórios para a obtenção de nanosuspensão de artemeter empregando o método de moagem via úmida em escala reduzida..... 87
5.7.1. Preparação dos nanocristais empregando moagem via úmida em escala reduzida..... 87
5.7.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersividade (IP) das formulações preliminares..... 89
5.7.3. Preparação dos nanocristais empregando moagem via úmida em escala reduzida..... 93
5.7.4. Otimização do processo de produção de nanocristais de artemeter utilizando planejamento fatorial completo (2^k) para k ≥ 3 fatores..... 94
5.7.5. Otimização do processo de produção de nanocristais de artemeter utilizando planejamento de experimentos por superfície de resposta..... 101
5.7.5.1. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM)..... 103
5.7.5.2. Otimização e validação do modelo matemático para o diâmetro hidrodinâmico médio..... 110
5.8. Desenvolvimento da metodologia para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais..... 112
5.8.1. Desenvolvimento do método para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e o índice de polidispersividade (IP) 112
5.8.2. Desenvolvimento do método para determinação do potencial zeta..... 114
5.8.3. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais..... 117
5.9. Ensaios exploratórios no processo de liofilização da nanosuspensão obtida pelo método de moagem úmida em escala reduzida..... 119
5.9.1. Determinação da temperatura de transição vítrea (T_g') e Temperatura eutética (T_{eut}) empregando Calorimetria Exploratória Diferencial *(DSC*) dos nanocristais de artemeter formulação R2-MUR..... 121
5.9.2. Microscopia acoplada a liofilização para a determinação da temperatura de colapso (T_c) 125
5.9.3. Considerações parciais relativas ao processo de liofilização..... 128
5.10. Liofilização da nanosuspensão de artemeter..... 129

5.11. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersividade (IP) e o potencial zeta (PZ) dos nanocristais resuspendidos após liofilização..... 130
5.12. Teor de artemeter no produto liofilizado..... 131
5.13. Difração de raios X (DRX) 132
5.14. Analise térmica das formulações obtidas por moagem via úmida em escala reduzida..... 134
5.15. Solubilidade de saturação dos nanocristais de artemeter... 135
5.16. Avaliação *in silico* das características físico-químicas do artemeter..... 138
5.16.1. Coeficiente de partição (logP), área de superfície molecular, área de superfície polar (*PSA*) e doadores e aceptores de H..... 140
5.17. Estabilidade das nanosuspensões..... 143
6. CONCLUSÕES..... 146
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 147

1. INTRODUÇÃO

A malária, doença parasitária causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, é transmitida aos seres humanos por picadas do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Trata-se de uma das causas “mais preocupantes” de mortalidade em crianças e adultos de todas as idades, a nível global, principalmente nos países tropicais. A doença é prevalente nos países emergentes, e afeta mais de 210 milhões de pessoas no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

A farmacoterapia indicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano 2011, consiste na combinação da artemisinina ou derivados (*artemisinin-based combination therapy*, ACT) para tratamento da malária não complicada, em áreas de resistência a múltiplos fármacos.

O fármaco artemeter, sintetizado a partir da artemisinina, permite o rápido desaparecimento da parasitemia e da sintomatologia sendo efetivo no tratamento da malária resistente a cloroquina. Esse fármaco, que pertence à classe II, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; BASORE et al., 2015), apresenta reduzida solubilidade em meio aquoso. Essa característica constitui verdadeiro desafio para os formuladores, em especial, no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais.

No que se refere à eficácia dos medicamentos, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) considera três fatores determinantes na velocidade e na quantidade de fármaco absorvido: a solubilidade em meio aquoso, a permeabilidade intestinal e a velocidade de dissolução (YU et al., 2002).

A eficácia e a segurança dos medicamentos são avaliadas pela sua resposta clínica ou terapêutica. Essa resposta está diretamente relacionada à biodisponibilidade do fármaco, a qual pode ser interpretada como medida de seu desempenho (CONSIGLIERE; STORPIRTIS; FERRAZ, 2000).

Embora várias metodologias como solubilização, cossolvência, complexação com ciclodextrina e dispersões sólidas possam ser usadas para aumentar a solubilidade de fármacos, essas apresentam limitações. Essas limitações referem-se ao emprego de solventes orgânicos, à necessidade de administração em elevadas dosagens ou, ainda, de administração de dose

terapêutica próximo à dose letal (elevado índice terapêutico) (KHARB et al., 2006; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004).

Abordagem alternativa e promissora para melhorar as características de solubilidade dos fármacos pertencentes às classes II e IV, fundamentada na nanotecnologia, é a obtenção de nanocristais desses fármacos. As principais vantagens dessa tecnologia referem-se à sua ampla aplicabilidade e à sua simplicidade quando comparada às outras técnicas, em especial, quando os nanocristais são comparados aos sistemas matriciais (DURÁN et al., 2010).

Quanto ao método de preparação de nanocristais, no presente trabalho, foram empregadas as tecnologias *top-down*. Nessa abordagem, o processo é iniciado a partir de partículas sólidas, em escala micrométrica, sendo submetidas à fragmentação mecânica, sob determinadas condições, resultando na obtenção de nanocristais (TAKATSUKA et al., 2009; VAN EERDENBRUGH; VAN DEN MOOTER; AUGUSTIJNS, 2008)

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de plataforma, com base nanotecnológica, para a obtenção de preparações orais contendo nanocristais de artemeter.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doenças tropicais negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) afetam principalmente, mas não exclusivamente, populações pobres nas regiões mais remotas, vulneráveis e miseráveis do planeta. Essas doenças causam sofrimento e incapacidade, por vezes, a centenas de milhões de pessoas, a nível global (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente 17 doenças parasitárias crônicas são classificadas como DTNs. Porém, segundo o Ministério da Saúde do Brasil, as doenças negligenciadas referem-se à termo, bastante empregado, a qual abrange todas as DTNs incluindo HIV/AIDS, tuberculose e malária. Essas últimas doenças têm como característica a imposição de limitações sérias às sociedades atingidas, levando a um panorama de enfermidade, sofrimento, incapacidade e morte, com graves consequências sociais, econômicas e psicológicas, para milhões de homens, mulheres e crianças (DIAS et al., 2013). Além disso, estima-se que causam a morte de um milhão de pessoas anualmente; mais de 1 bilhão de casos são reportados, dentre os 2,7 bilhões que vivem em condições de pobreza extrema (OMS, 2015; GARG, 2011).

Principalmente na última década, essas doenças estão em pauta nas principais agendas internacionais que incluem as formas de combate, de erradicação, de prevenção e do tratamento das DTNs. As opções terapêuticas disponíveis atualmente para as DTNs são muito limitadas, insuficientes e apresentam série de problemas, tais como: reduzida eficácia, elevada toxicidade e surgimento de cepas resistentes. Tal cenário reflete a falta de investimento e de inovação em programas de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de fármacos (DIAS et al., 2013).

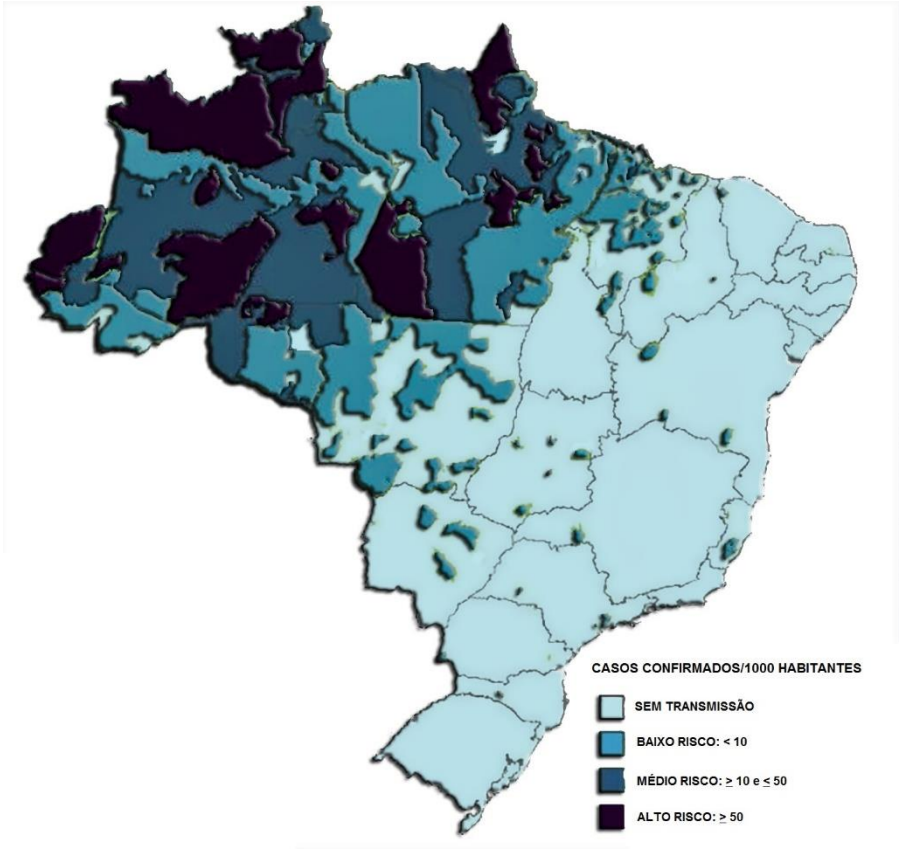
Na última década, 756 novos fármacos foram aprovados sendo que apenas 3,8% desses foram destinados ao combate das doenças negligenciadas, ainda que a incidência global dessas doenças seja superior a 10% (DIAS et al., 2013). Segundo Dias *et al*. (2013) uma das razões para esse panorama é o baixo interesse da indústria farmacêutica no investimento na área de DNTs visto que

a indústria farmacêutica centra seus esforços no desenvolvimento de produtos que alcancem lucros substanciais (DIAS et al., 2013).

2.2. Considerações gerais relativas à malária

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Plasmodium* por meio da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados (vector). Estima-se que 3,2 bilhões de pessoas (quase a metade da população mundial) correm o risco de contrair a malária, dos quais 1,2 bilhões apresentam alto risco (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Estima-se que o número de mortes por malária, a nível mundial, foi reduzido de 839.000 mortes, no ano 2000, para 438.000, em 2015, redução de 48%. Entretanto, somente em 2012, estima-se 207 milhões de novos casos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013). Segundo o informe "*Malaria Annual Report 2015*" (OMS, 2015), essa doença levou a óbito cerca de 306.000 crianças menores de cinco anos de idade em 2015. Tal índice representa 840 crianças por dia, ou quase uma criança a cada 2 minutos. Índice igual a 90% do total de mortes por malária ocorrem na África subsaariana. Em 2015, a malária afetou 57 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). No Brasil, os casos confirmados são alarmantes conforme apresentados na Figura 1.

Figura 1. Mapa do Brasil, risco de transmissão de malária. (Fonte: Adaptado de http://www.uniqmed.com.br/noticias/QBC-malaria.html)

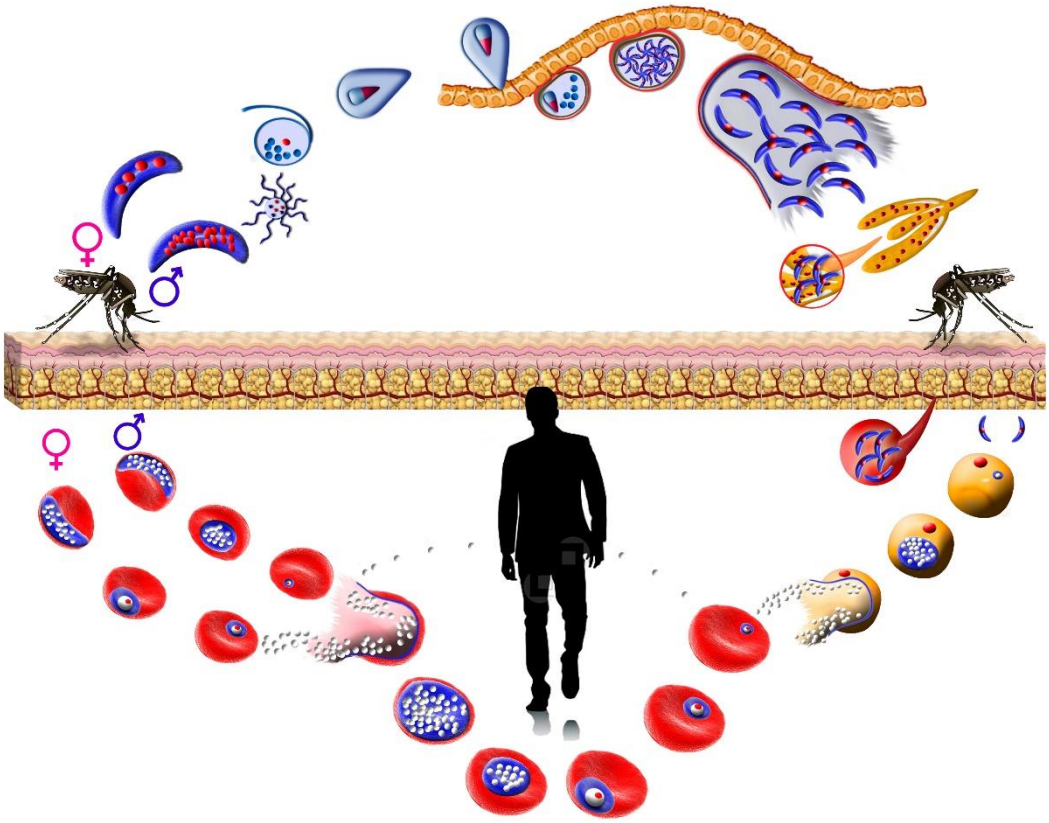


Essa doença é causada por quatro espécies de *Plasmodium*: *P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. knowlesi* e *P. Ovale*. A subespécie *P. falciparum* é a mais importante em termos do número de mortes em humanos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013). *P. vivax, P. ovale* e *P. malariae,* raramente causam doença fatal, mas *P. knowlesi* pode causar a morte devido ao seu ciclo eritrocítico assexuado explosivo (COX-SINGH et al., 2008).

O ciclo de vida do parasita tem duas fases, uma exoeritrocítica e outra eritrocítica. Na fase exoeritrocítica, a infeção em humanos, pelo parasito do gênero *Plasmodium*, acontece pela transmissão de esporozoítos através da picada dos mosquitos fêmea do gênero *Anopheles*, quando infectados. Uma porcentagem dos esporozoítos que foram inoculados na corrente sanguínea podem atravessar a membrana dos hepatócitos do hospedeiro humano. Quando a infeção é por meio do parasito de *Plasmodium falciparum* (mais letal) a formação de esquizontes pode originar milhares de merozoítos. Quando a infeção é causada por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*, alguns parasitas permanecem quiescentes no fígado na forma de hipnozoítos causando manifestações clínicas tardias e recidivas. (SANTOS-MAGALHÃES E MOSQUEIRA, 2010; MURAMBIWA et al., 2011; KHALIL et al., 2013; URBÁN E FERNÀNDEZ-BUSQUETS, 2014). Segundo Murambiwa e colaboradores (2011), essa fase hepatocitária é assintomática.

Na fase eritrocítica, após 6 a 16 dias da infecção, os esquizontes rompem-se em milhares de merozoítos dentro da corrente sanguínea. Esses entram nos eritrócitos interagindo com diversas proteínas da membrana celular. Os merozoítos adquirem a forma de anel e convertem-se em trofozoítos que amadurecem em esquizontes eritrocíticos (forma assexuada). Os merozoítos recém-formados são liberados dos eritrócitos por rompimento desses esquizontes, e com alta probabilidade de infectar novos eritrócitos. Uma porcentagem dos merozoítos diferenciam-se em gametócitos fêmeas e machos (formas sexuadas) circulando na corrente sanguínea sem provocar sintomas. Esses são transmitidos por hematofagia para o mosquito Anopheles. Nesse mosquito, formam-se os esporozoítos os quais alcançam suas glândulas salivares podendo reinfectar o hospedeiro humano (SANTOS-MAGALHÃES E MOSQUEIRA, 2010; MURAMBIWA et al., 2011; KHALIL et al., 2013; URBÁN E FERNÀNDEZ-BUSQUETS, 2014).

Figura 2. Esquema do ciclo de vida do *Plasmodium*. (Fonte: Adaptado de CD topics in International Health – Malaria de autoria da Wellcome Trust).



O conhecimento do ciclo de vida do *Plasmodium*, apresentado na Figura 2, é essencial para as intervenções e para o desenvolvimento de fármacos. Nas décadas passadas, a utilização dos medicamentos recomendados como esquema base no tratamento da malária produziu bons resultados. Entretanto, na atualidade, o uso clínico da maioria deles, como por exemplo a cloroquina, foi reduzido em função do surgimento de cepas de parasitas resistentes aos medicamentos (PINHEIRO et al., 2003). A eficácia da cloroquina (CQ) tem declinado rapidamente devido à resistência dos parasitas a esse composto. Tal fato levou à introdução dos fármacos sulfadoxina (S), pirimetamina (P) e primaquina (PQ). Porém, esses apresentam baixa biodisponibilidade via oral e graves efeitos adversos frequentes, como a anemia hemolítica, distúrbios gastrointestinais e insuficiência cardíaca (UMEYOR et al., 2013).

Com a procura de novos fármacos para o tratamento da malária, em 1967, o governo da Republica China financiou análise sistemática de plantas nativas

usadas na medicina tradicional chinesa. Uma dessas plantas, uma erva daninha conhecida como *qing hao* (*Artemisia annua L*.) (QINGHAOSU, 1979) apresentou resultados promissores. Artemisinina, composto sesquiterpeno, apresenta característica impressionante que consiste na ponte peróxido abrangendo um dos anéis da molécula. Essa característica é responsável pela sua atividade contra o *Plasmodium*.

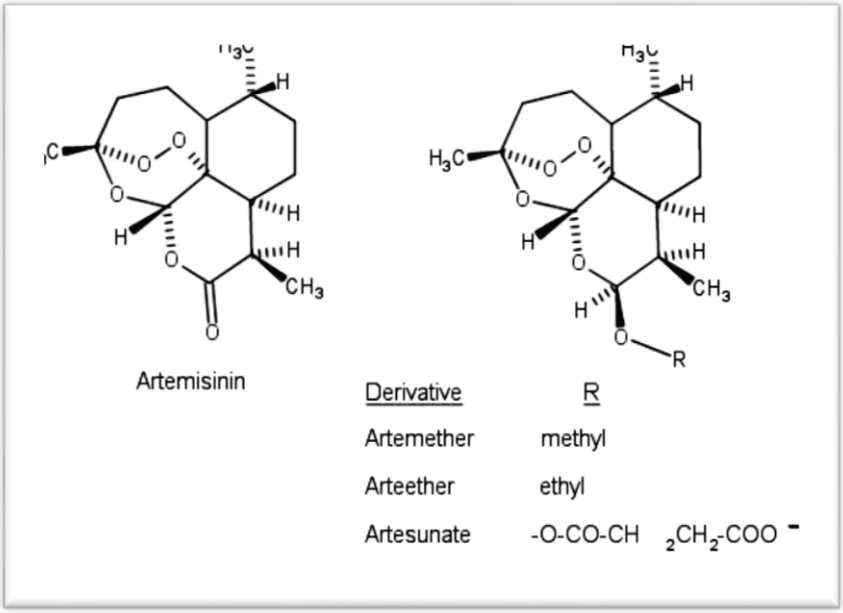
A artemisinina e seus derivados, incluindo o artesunato (AS), artemeter (ARM), arteether (AE) e dihidroartemisina (DHA) são considerados os pilares do tratamento da malária por *P. falciparum* (UMEYOR et al., 2013). Porém, a resistência à artemisinina foi recentemente observada no Camboja ocidental (ARIEY et al., 2014). Para minimizar essa resistência, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou, desde 2011, como tratamento de primeira escolha, o uso de derivados da artemisinina em combinação com outros medicamentos antimaláricos na denominada terapia combinada à base de artemisinina (*artemisinin-based combination therapy, ACT*), para o tratamento da malária não complicada em áreas de resistência a múltiplos fármacos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

2.3. Artemeter: visão geral

Artemisinina e derivados são uma importante classe de fármacos antimaláricos os quais apresentam na sua estrutura uma lactona sesquiterpênica e uma ponte endoperóxida, sendo essa a responsável pela sua atividade antimalárica. Diferentes tipos de metabólitos ativos foram sintetizados a partir da molécula de artemisinina entre os quais o artemeter, artesunato e arteéter (PAWAR et al., 2016).

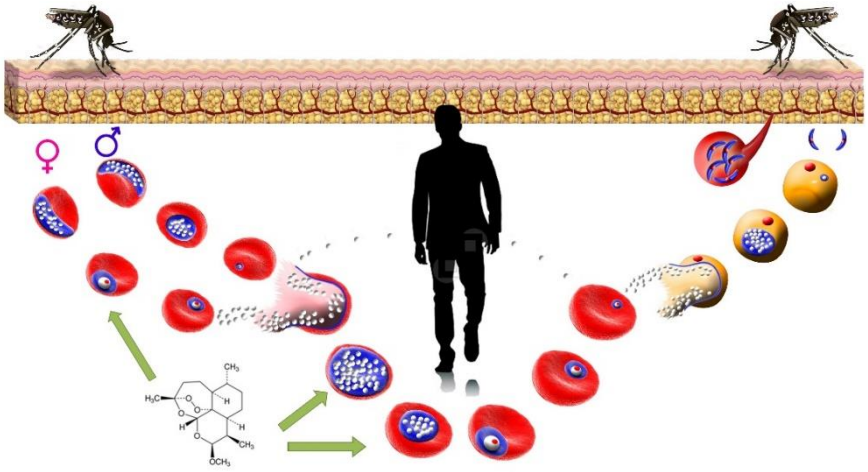
O β-artemeter, derivado da artemisinina (Figura 3), apresenta potente atividade esquizonticida na fase hepática e na fase eritrocítica. Adicionalmente, possui atividade gametocida (JAIN, SOOD, GOWTHAMARAJAN, 2014), conforme apresentado na Figura 4.

Figura 3. Estrutura molecular da artemisinina e seus derivados (Fonte: UMEYOR et al., 2013).



Quanto ao mecanismo de ação, várias linhas indicam que esse fármaco inibe uma adenosina trifosfato cálcio essencial, PfATP asa 6, exercendo a sua ação contra a malária por perturbar a homeostase redox (RISHNA; UHLEMANN; HAYNES, 2004). Outros trabalhos sugerem que a sua atividade depende da clivagem de ligação peróxido essencial após o contato com Fe^{+2}-Heme dentro do vacúolo alimentar do parasito, gerando radicais livres que podem alquilar a molécula de Heme e eliminar o parasito (OLLIARO et al., 2001).

Figura 4. Sitio de ação do artemeter dentro do ciclo de vida do *Plasmodium*.



Apesar de demonstrar atividade esquizonticida e gametocida nas fases hepáticas e eritrocíticas, respectivamente, o fármaco apresenta limitações quanto às suas características físico-químicas e sua farmacocinética, como a baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade quando administrado oralmente, biodistribuição inadequada e meia vida de eliminação muito curta (SANTOS-MAGALHÃES E MOSQUEIRA, 2010; ANSARI et al., 2010).

O artemeter pertence à classe II, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). Dessa maneira, apresenta reduzida solubilidade em meio aquoso e, por sua característica lipofílica, apresenta elevada permeabilidade (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; BASORE et al., 2015). Segundo Umapathi e colaboradores (2011), a solubilidade aquosa do artemeter, em meio tampão acetato (pH 4,5) e meio tampão fosfato (pH 6,8) é de 133$\pm$4 µ/mL, 127$\pm$5 µ/mL e 130$\pm$4 µ/mL, respectivamente. Essa característica consiste em verdadeiro desafio para os formuladores, em especial, no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais. Adicionalmente, quando associado às características de dissolução *in vitro* do fármaco, o SCB considera três fatores determinantes na velocidade e na quantidade de fármaco absorvido: (i) a solubilidade em meio aquoso, (ii) a permeabilidade intestinal e (iii) a velocidade de dissolução (YU et al., 2002).

A eficácia e a segurança dos medicamentos são avaliadas pela sua resposta clínica ou terapêutica. Essa resposta está diretamente relacionada à

biodisponibilidade do fármaco, a qual pode ser interpretada como medida de seu desempenho (CONSIGLIERE; STORPIRTIS; FERRAZ, 2000).

No entanto, o potencial terapêutico do artemeter é reduzido devido a sua baixa biodisponibilidade oral, sendo o maior fator limitante para sua absorção, sua baixa solubilidade aquosa (PAWAR et al., 2016).

2.4. Nanocristais: novo sistema terapêutico nanotecnológico

A FDA (2014) define nanotecnologia como o processo para a obtenção, o controle, a fabricação e/ou a manipulação intencional de materiais que têm pelo menos uma dimensão entre 1 a 100 nm. Além disso, o material na escala nanométrica tem que demonstrar propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam aplicação inovadora desse material. Essas propriedades inovadoras devem ser atribuídas exclusivamente a sua dimensão nanométrica. No caso de material constituído por partículas maiores que 100 e menores que 1000 nm, porém com característica inovadora, esse será considerado material obtido por nanotecnologia (FDA, 2014). A nanotecnologia farmacêutica tem sido identificada como ferramenta potencialmente essencial na luta contra a malária (URBÁN e FERNÀNDEZ-BUSQUETS, 2014). A utilização dessa estratégia tem potencial para solucionar problemas relacionados a baixa biodisponibilidade de fármacos.

Como indicado na “Lei de resposta à dose” de Paracelso, “Não existem moléculas seguras, nem tóxicas. É a dose que faz o veneno”. Assim, o desafio na atualidade é a liberação de fármacos no momento certo a partir de forma farmacêutica segura e reprodutível, geralmente para um local alvo específico, com exposição mínima a células ou tecidos adjacentes, sensíveis e saudáveis (RANJITA, 2013).

A reduzida solubilidade em água pode reduzir a eficácia do fármaco e alterar o padrão de biodistribuição, independente da via de administração (RANJITA, 2013). Apesar dos esforços das indústrias farmacêuticas no sentido de melhorar a solubilidade em água e, consequentemente, aumentar sua biodisponibilidade, o desenvolvimento de produto contendo o fármaco com tal característica ainda constitui desafio. Segundo Shegokar e Müller (2010), cerca de 40% dos medicamentos no mercado apresentam baixa solubilidade em água,

e cerca de 70% do total das novas entidades moleculares mostra certo grau de polimorfismo e reduzida biodisponibilidade. Outros fatores como o tamanho de partícula, a área superficial, o grau de hidratação de cristal, a quantidade de tensoativos utilizados, etc. afetam sua biodisponibilidade e, finalmente, seu desempenho terapêutico (ANHALT et al, 2012).

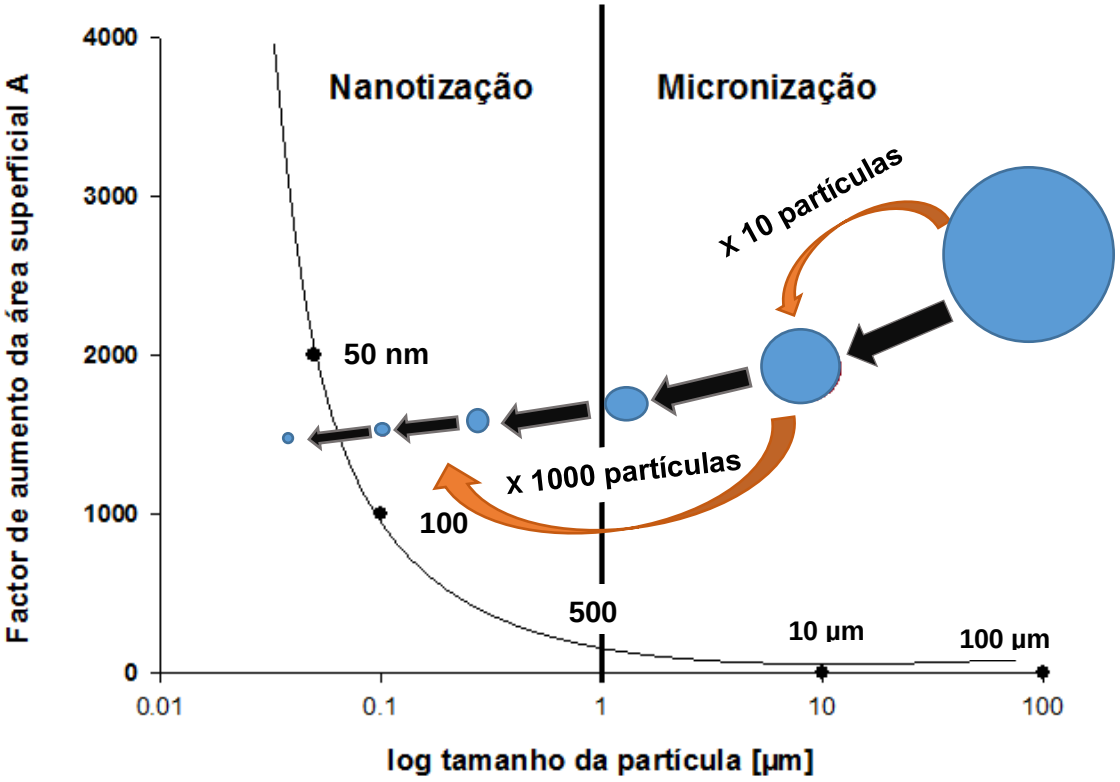
Embora diversas metodologias como solubilização, cossolvência, ajuste de pH, complexação com ciclodextrina e dispersões sólidas possam ser usadas para aumentar a solubilidade de fármacos, essas apresentam limitações. Essas limitações referem-se ao emprego de solventes orgânicos, à necessidade de administração em elevadas dosagens ou, ainda, de administração de dose terapêutica próximo à dose letal (elevado índice terapêutico) (KHARB et al., 2006; PATRAVALE et al., 2004).

Abordagem alternativa e promissora para melhorar as características de solubilidade dos fármacos pertencentes às classes II e IV, fundamentada na nanotecnologia, consiste na obtenção de nanocristais desses fármacos. As principais vantagens dessa abordagem tecnológica referem-se à sua ampla aplicabilidade e à sua simplicidade quando comparada às outras técnicas, utilizadas para melhorar a solubilidade de fármacos. Em especial, quando os nanocristais são comparados aos sistemas matriciais (DURÁN et al., 2010; SHEGOKAR, MÜLLER, 2010).

2.4.1. Propriedades dos nanocristais: aumento da velocidade de dissolução e aumento da solubilidade de saturação

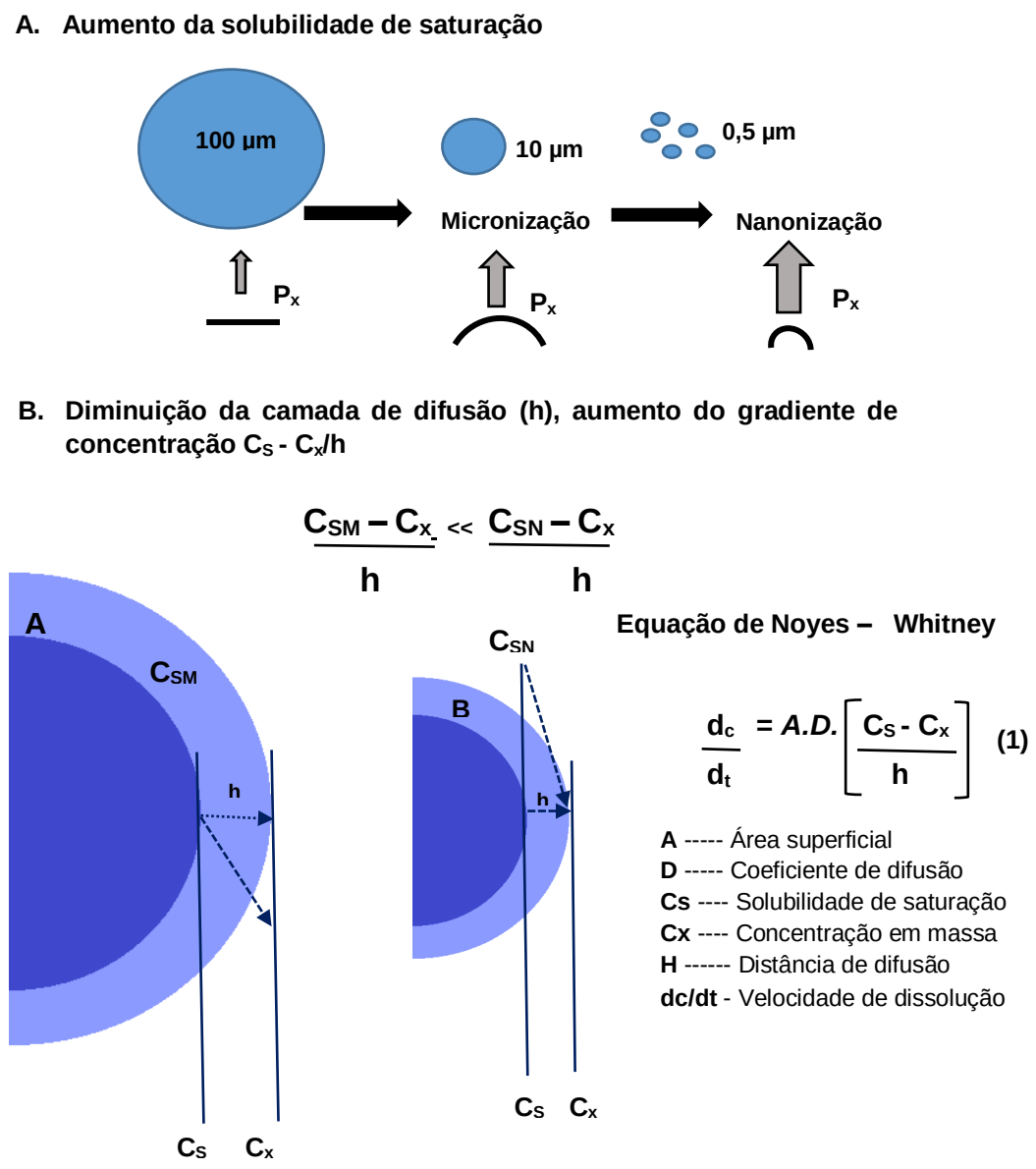
Segundo a equação de Noyes e Whitney (1897), a redução do tamanho das partículas do fármaco leva ao aumento da maior área superficial da espécie resultando em aumento da velocidade de dissolução. Na Figura 5 é possível observar o aumento da área superficial da partícula como resultado da redução dessa para a escala nanométrica.

Figura 5. Aumento da área superficial versus o número de partículas em função da redução do tamanho da partícula (Adaptado LIU, 2013).



A solubilidade de saturação (Cs) depende de cada composto ou fármaco, do meio de dissolução e da temperatura. Tal característica refere-se à partículas de tamanho micrométrico ou maior. Porém, a velocidade de saturação apresenta comportamento diferente quando se trata de partículas em escala nanométrica. Assim, a velocidade de saturação é dependente do tamanho da partícula e, como consequência, a solubilidade de saturação dos fármacos, em escala nanométrica, é maior (Figura 6A).

Figura 6. 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)



De acordo com a equação de Noyes e Whitney (Equação 1), a velocidade de dissolução é diretamente proporcional à área superficial da partícula e inversamente proporcional à espessura da camada de difusão. Consequentemente, a diminuição do tamanho de partícula conduz ao aumento da área superficial e diminuição da camada de difusão, aumentando a velocidade

de dissolução (*dc/dt*). Na Figura 6B pode-se observar que a distância de difusão (h) ao redor das partículas diminui com a redução do tamanho, resultando em elevado gradiente de concentração em torno das partículas menores (Cs-Cx)/h (Cs: solubilidade de saturação, Cx: concentração em massa). Tais fenômenos fundamentam o aumento da velocidade de dissolução dos nanocristais. Além disso, observa-se que a velocidade de dissolução (*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 origina um gradiente de concentração entre o lúmen do intestino e o sangue, favorecendo a absorção dos fármacos, os quais seguem o mecanismo de difusão passiva.

2.5. Tecnologias de obtenção de nanocristais

As tecnologias de obtenção de nanocristais surgiram como estratégias promissoras para a formulação de fármacos pouco solúveis em água. Medicamentos compostos por nanocristais foram aprovados pela FDA desde o ano 2000, e vários desses medicamentos estão sendo avaliados em testes clínicos. A simplicidade de formulação e a facilidade de escalonamento são responsáveis pela aceitação dos nanocristais pela indústria (SUN et al., 2012).

Os nanocristais são formados exclusivamente de fármaco, estabilizados por tensoativos e outros compostos, sem a presença de qualquer material como matriz. Assim, os nanocristais podem ser definidos como partículas com tamanho médio na faixa de sub-microns, que não possui matriz e sua estrutura pode ter caráter amorfo ou cristalino. Tais partículas são estabilizadas no veículo por meio da adição de tensoativos ou polímeros (MAULUDIN; MÜLLER; KECK, 2009). Em geral apresentam tamanho menor que 1 µm, tipicamente entre 200 a 500 nm (KECK; MÜLLER, 2006).

As vantagens do uso de nanocristais incluem a melhoria do desempenho da formulação, tais como a velocidade de dissolução melhorada e aumento da solubilidade de saturação, a reprodutibilidade da absorção oral e melhor biodisponibilidade para aqueles fármacos que tem a etapa de dissolução como

limitante da absorção (MAULUDIN, MÜLLER e KECK, 2009; RAVICHANDRAN, 2012; RACHMAWATI et al., 2013; SHEGOKAR e MÜLLER, 2010).

Existem diversas possibilidades de produzir nanocristais no tamanho e na forma desejados. Na atualidade, as tecnologias são agrupadas em três categorias, *bottom-up*, *top-down* e combinações de tecnologias (SALAZAR; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2014). No primeiro caso, os nanocristais são obtidos a partir do plano molecular, atingindo a forma e o tamanho desejados. Esses nanocristais são produzidos por meio de processo de precipitação. Nesse caso, o fármaco é dissolvido em um solvente apropriado e após a completa dissolução, é adicionado um "anti-solvente" precipitando o fármaco com a formação de nanocristais (SALAZAR; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2014). Devido a utilização de solventes orgânicos, dificuldade no controle do estado sólido do cristal e a dificuldade no controle da cristalização, minimizando o crescimento do cristal em escala nano, os processos *bottom-up* não apresentam suficiente interesse para atrair a atenção da indústria farmacêutica. (MÖSCHWITZER 2013; SALAZAR; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2014).

O segundo caso são as tecnologias *top-down*, na qual o processo é iniciado a partir de partículas sólidas, em escala micrométrica, sendo submetidas à fragmentação mecânica, sob determinadas condições, resultando na obtenção de nanocristais (TAKATSUKA et al., 2009; VAN EERDENBRUGH; VAN DEN MOOTER; AUGUSTIJNS, 2008).

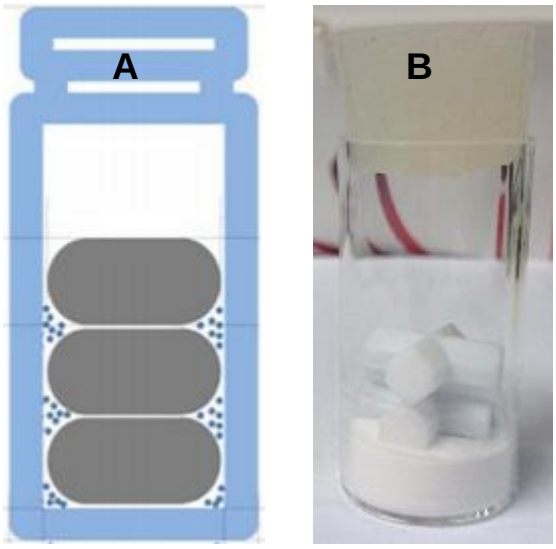
Dentre as técnicas *top-down,* amplamente utilizadas na redução do tamanho eficiente de cristais, a moagem a alta energia se destaca. Essa tecnologia emprega movimentos de rotação e revolução simultâneos, para garantir maior eficiência de nanopulverização. Nesse processo, o equipamento é formado por um recipiente de homogeneização, contendo esferas de zircônio. Os movimentos simultâneos de revolução/rotação são os responsáveis pela geração de forças centrífugas que atingem a magnitude de 400 G, e são nessas condições que as esferas produzem elevada energia de impacto e cisalhamento, permitindo a nanopulverização do material (TAKATSUKA et al., 2009).

Outra técnica *top-down* bastante utilizada é a homogeneização a alta pressão. Nesse método a dispersão de partículas é impulsionada empregando elevada pressão (cerca de 500 bars) e acelerada contra uma barreira mecânica. A colisão com a barreira resulta na produção de nanopartículas de diâmetro reduzido (JUNGHANNS e MÜLLER, 2008). O método de homogeneização a alta pressão apresenta inúmeras vantagens quando comparada a outras técnicas de preparação de nanopartículas tais como: a possibilidade de produção de nanopartículas em larga escala, tempo de produção reduzido e ausência de solventes orgânicos no processo de obtenção das nanopartículas (MÜLLER, 2008). As limitações do processo referem-se às alterações da estrutura cristalina do fármaco em função da elevada pressão e energia empregada resultando no aumento da temperatura acima de 100°C. (KHARB et al., 2006; DURAN et al., 2010).

Além das técnicas *top-down* mencionadas anteriormente, a moagem via úmida em escala reduzida foi recentemente descrita por Romero e colaboradores (2016). Sua principal vantagem refere-se à sua simplicidade e viabilidade econômica. Para o desenvolvimento dos nanocristais esses autores empregaram frascos de vidro de 2 mL de capacidade (recipiente de moagem), uma placa de agitação magnética, barras magnéticas cilíndricas e esferas de zircônia que, em conjunto, permitem a redução do tamanho das partículas de fármacos em suspensão (ROMERO et al., 2016).

Partindo dessa proposta inovadora, esse método foi adaptado para o desenvolvimento de nanocristais de artemeter no presente trabalho. Essas adaptações incluíram frascos com capacidade diferente (10 mL) com ligeira protuberância convexa na base do frasco, assim como, o uso de barras magnéticas em formato de cruz (Figura 7A e 7B). Tais características permitiram reduzir a variabilidade do processo de redução do tamanho das partículas.

Figura 7. A: Representacâo esquemática do metodo em escala reduzida. **B:** Imagem dos frascos adaptados no presente trablho para o desensvolvimento de nanocristais.



O método em escala reduzida segue o fundamento da moagem a alta energia. Os movimentos simultâneos de rotação são os responsáveis pela geração de forças de cisalhamento entre as partículas do fármaco. Além disso, atuam as forças de impacto entre as partículas de fármaco com as esferas de zircônio e as forças de impacto entre as partículas com a parede de vidro do recipiente de moagem. São essas condições de elevada energia de impacto e cisalhamento que permitem a nanopulverização do material.

Os resultados do processo dependem de uma série de fatores próprios do método tais como o número de revoluções por minuto, o tempo de moagem, a quantidade de esferas de zircônia, assim como, das características do fármaco (densidade do fármaco, dureza, ponto de fusão, peso molecular, etc.) e da seleção adequada do tensoativo (concentração na formulação, tipo do tensoativo, etc.) (LEE; CHOI; PARK, 2008).

Tal método é especialmente útil na obtenção de nanocristais de entidades químicas que se encontram na etapa de desenvolvimento, assim como, de fármacos com elevado valor agregado em função da escala reduzida, podendo ser obtidas nanosuspensões com volume final inferior a 5mL.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente projeto consistiu na obtenção de nanocristais de artemeter e sua caracterização físico-química. Esse estudo teve como escopo o desenvolvimento de plataforma com base nanotecnológica para a obtenção de preparações orais contendo esse fármaco.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Efetuar estudos exploratórios para a preparação de nanocristais de artemeter utilizando os seguintes métodos *top-down*: moagem de alta energia, homogeneização a alta pressão e moagem via úmida em escala reduzida.

3.2.2. Realizar as caracterizações físicas e morfológicas das preparações obtidas nos estudos preliminares.

3.2.3. Selecionar o estabilizante para a obtenção de nanocristais de artemeter pelo método de moagem via úmida em escala reduzida, empregando análise térmica (DSC, TG e DTG).

3.2.4. Avaliar a influência de variáveis independentes (concentrações de soluplus® de artemeter e tempo e velocidade de agitação do processo) no DHM dos nanocristais de artemeter obtidos pelo método de moagem via úmida em escala reduzida.

3.2.5. Otimizar o processo de obtenção dos nanocristais pelo método de moagem via úmida em escala reduzida empregando método por superfície de resposta.

3.2.6. Desenvolver a metodologia para determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocristais por espalhamento de luz dinâmica.

3.2.7. Efetuar estudos exploratórios para o desenvolvimento do processo de liofilização da nanosuspensão otimizada obtida pelo método de moagem via úmida em escala reduzida.

3.2.8. Realizar as caracterizações físico-químicas dos nanocristais de artemeter liofilizado: diâmetro hidrodinâmico meio, índice de polidispersão, potencial zeta, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e difração de raios-X.

3.2.9. Determinar a solubilidade de saturação dos nanocristais de artemeter em diferentes meios.

3.2.10. Desenvolver e validar método para a quantificação do artemeter no produto liofilizado, utilizando espectrofotometria Ultravioleta-Visível.

3.2.11. Avaliar a estabilidade da nanosuspensão de artemeter e dessa preparação liofilizada armazenadas por período de três meses a 25 e 4 °C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O material utilizado para a obtenção dos nanocristais inclui o fármaco Artemeter (Tedia Brazil, Brazil), hidroxipropilcelulose (Shin-Etsu Ltda, Tokio, Japão), polisorbato 80(Synth, Brasil), D-α- tocoferol polietileno glicol 1000 succinato (TGPS) (Sigma-Aldrich Co. Missouri, USA), Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero (Soluplus®) (BASF, Alemanha), poloxamer 407 (BASF, Alemanha), D-manitol (Synth, Brasil) e água ultrapura Milli-Q®. O material utilizado para o desenvolvimento da metodologia analítica foi: HCl 1N (Sigma-Aldrich Co. Missouri, USA), fosfato de potássio bibásico anidro (Synth, Brasil), fosfato de potássio monobásico anidro (Synth, Brasil) e ácido cítrico anidro (Synth, Brasil).

4.2. Método por espectroscopia Ultravioleta-visível

O método de espectroscopia Ultravioleta-visível foi usado para quantificar o artemeter na nanosuspensão. Para o desenvolvimento e a validação do método analítico foi utilizado o espectrofotômetro Ultravioleta-visível (Evolution series 201, Thermo Fischer Scientific Inc. USA) na região de 200-400 nm. As características de desempenho avaliadas no desenvolvimento do método foram aquelas preconizadas pela Resolução ANVISA 899/2003 (BRASIL, 2003): especificidade, linearidade, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio), exatidão e robustez. Foi utilizada cubeta de quartzo modelo 18UV10.

4.2.1. Desenvolvimento do método analítico para quantificação do artemeter nos estudos de solubilidade

4.2.1.1. Preparação da solução padrão

Para o preparo da solução padrão quantidade exata de 5 mg de artemeter foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de metanol para completa dissolução do fármaco seguido de 10 mL de HCl 1N visando a quebra da molécula e a formação de grupo cromóforo. Essa solução foi aquecida em banho de água durante 3 horas à temperatura de 60 ± 2 º C. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e, em seguida, o volume foi completado com água ultra purificada para se obter concentração de 100µg/mL. Essa solução foi utilizada como solução-estoque.

4.2.1.2. Determinação da absorbância máxima

A solução-estoque foi diluída empregando água ultra purificada até a concentração de 20µg/mL. Por meio da varredura no intervalo entre 200 e 400 nm determinou-se a absorbância máxima do artemeter. Água ultrapura Milli-Q® foi utilizada como branco.

4.2.2. Validação do método analítico para a quantificação do artemeter nos meios empregados no estudo de solubilidade

4.2.2.1. Especificidade

Essa característica de desempenho do método foi avaliada por meio de varredura entre 200 e 400 nm empregando os seguintes solventes: água ultrapura Milli-Q®, tampão HCl pH 1,2; tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,5; assim como os excipientes: Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero (Soluplus®) e manitol. Tal abordagem garantiu a não interferência dos solventes e dos excipientes na quantificação do fármaco.

4.2.2.2. Linearidade

Alíquotas da solução-estoque de artemeter (1,5 a 4 mL) foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, em seguida, o volume foi completado com água ultrapura Milli-Q® e os balões foram agitados por 5 minutos (Quadro 1). A absorbância do complexo foi medida a 255 nm contra o branco. O branco foi preparado por aquecimento de 5 mL de metanol acrescido de 10 mL de HCl 1N na mesma condição da amostra e diluído até 50 mL com água ultrapura Milli-Q®. Em seguida, a curva de calibração foi construída para o artemeter na faixa de concentração entre 15 e 40 µg/mL a 255 nm. As curvas analíticas foram preparadas em triplicatas em seis níveis de concentrações diferentes.

Quadro 1. Concentração das amostras do arteméter obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco a 100 µg/ml empregadas na determinação da linearidade.

Amostra	Alíquota da solução padrão (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	1,5	10	15
2	2,0	10	20
3	2,5	10	25
4	3,0	10	30
5	3,5	10	35
6	4,0	10	40

4.2.2.3. Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram calculados considerando o desvio padrão da resposta (σ) e o coeficiente angular ou inclinação da curva (S) obtidos a partir da reta de regressão. Calculou-se LQ e LD empregando as equações 2 e 3:

Equação 2: $LQ = 10\sigma/S$

Equação 3: $LD = 3{,}3\sigma/S$

4.2.2.4. Precisão intra e inter-ensaio

A precisão do método foi avaliada conforme a norma vigente RE 899/2003 da ANVISA por meio da precisão intra-ensaio e da precisão inter-ensaio. Foram preparadas soluções-padrão, em triplicata, nas seguintes concentrações: 20 µg/mL, 30 µg/mL e 40 µg/mL, para o artemeter, empregando 6 réplicas para cada concentração. O ensaio foi realizado em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em dias diferentes (precisão inter-ensaio). As precisões nas duas condições (precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio) foram expressas em termos de coeficiente de variação (CV%) calculados, conforme a Equação 4, sendo o critério mínimo de aceitação menor ou igual a 5% (BRASIL, 2003).

Equação 4

$$CV\ \% = \frac{DP}{CMD} X\ 100$$

CV% = desvio padrão relativo

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

4.2.2.5. Exatidão

Para determinar a exatidão do método proposto realizou-se o teste de recuperação. Foram adicionadas concentrações conhecidas do padrão (16, 20 e 24 µg) à solução amostra (20 µg). Foram efetuadas total de seis leituras para cada nível de concentração. A exatidão do método foi expressa como percentagem de recuperação, na qual foram determinados a partir das absorbâncias obtidas das soluções finais em função da quantidade teórica de padrão adicionado.

4.2.2.6. Robustez

A robustez do método foi determinada empregando total de 6 medições para um nível de concentração (30 µg/mL) variando-se os comprimentos de onda (253, 255, 257 nm).

4.2.2.7. Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) unifatorial foi utilizada para comparação das médias, sendo considerados valores diferentemente significativos quando a probabilidade é inferior a 5% ($p<0,05$, intervalo de confiança de 95%), teste *t* de Student – comparação entre as médias de duas amostras independentes com nível de significância $\alpha=0,05$ (intervalo de confiança de 95%). Os dados foram analisados por meio do software Minitab, versão 17.

4.3. Preparação dos nanocristais de artemeter empregando moagem a alta energia

As nanosuspensões foram preparadas utilizando o nanopulverizador NP-100® (Thinky Co., Ltda., Tóquio, Japão). A nanopulverização foi realizada conforme metodologia padrão proposta por Takatsuka e colaboradores (2009). Tal método consiste em duas etapas, nas quais diferentes velocidades, tempos de agitação e volumes da solução aquosa estabilizada são utilizados. A Tabela 1 apresenta a formulação utilizada no processo da preparação dos nanocristais. Na primeira etapa, 5 g de artemeter e 25 mL da solução aquosa estabilizada foram pesados e transferidos para o recipiente de moagem. Posteriormente, foram adicionados ao mesmo recipiente 35 g de esferas de zircônia com diâmetro igual a 0,1 mm, como meio de moagem. A moagem foi realizada a velocidade de rotação de 1500 rpm durante 20 min. Na segunda etapa, volume igual a 25 mL da solução aquosa estabilizada foi adicionado ao recipiente de moagem empregando velocidade de rotação de 400 rpm por 1 min, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Formula e condições dos ensaios para a obtenção de nanocristais de artemeter preparadas por moagem a alta energia (MAE).

FÓRMULA	Artemeter (g)	Tween®80 (g)	HPC (g)	Água purificada q.s.p (g)
M1-MAE	5,0	0,1	0,15	50

CONDIÇÕES DO TESTE				
ETAPA	**Artemeter (g)**	**Solução do agente estabilizante (g)**	**Agitação (rpm)**	**Tempo de moagem (min)**
A	5,0	25,0	1500	20
B	-	+25 (total 50)	400	1

M1-MAE. Formulação 1 usando moagem a alta energia; HPC: Hidroxipropilcelulose

4.3.1. Determinação da densidade real do artemeter pó

A densidade real do artemeter foi determinada usando picnometría com gás Hélio, conforme descrito na Farmacopeia Americana (USP 35), empregando o equipamento Ultrapycnometer 100 (Quantachrome). Foram realizadas total de 5 corridas com tempo de duração de 3 minutos cada, a temperatura média foi de 23,7 °C e a pressão média, de 25 Psi. A densidade real do artemeter foi calculada por meio da massa do fármaco em relação ao volume em g/cm^3.

4.4. Preparação dos nanocristais de artemeter empregando homogeneização a alta pressão (HAP)

A obtenção dos nanocristais foi efetuada por meio da dispersão de artemeter (10 % p/p) em água ultrapura (Milli-Q®) com hidroxipropilcelulose (3,5%p/p) e diferentes estabilizadores como poloxamer 188 (1 % p/p), tween 80® (1 %p/p) e D-α- tocoferol polietileno glicol 1000 succinato-TGPS (1 %p/p). A obtenção dos nanocristais foi efetuada por meio da dispersão do artemeter na fase aquosa. O sistema foi pre-homogeneizado empregando o agitador mecânico (Ultra turrax®, IKA) a 24.000 rpm, por 10 min. A preparação de nanopartículas por homogeneização a alta pressão foi realizada utilizando o Homogeneizador Pistão-gap (Nano DeBEE, BEE International, Inc. USA) sob pressão de 350, 600, 1000 e 1500 bar usando 5, 10, 20 e 20 ciclos para cada pressão, respectivamente.

Tabela 2. Fórmulas e condições dos ensaios para obtenção de nanocristais de artemeter utilizando homogeneização a alta pressão (HAP).

Fórmula	Artemeter (g)	Tween 80® (g)	Poloxâmero 188 (g)	TGPS	HPC	Água purificada q.s.p (g)
H1-HAP	5,0	0,5	-	-	1,75	50,0
H2-HAP	5,0	-	0,5	-	1,75	50,0
H3-HAP	5,0	-	-	0,5	1,75	50,0

CONDIÇÕES DO TESTE			
ETAPA	**Pre-moagem**	**HAP**	
		Ciclos (n)	**Pressão (bar)**
A	10 min- 24000 rpm	-	-
B	-	5	350
C	-	10	600
D	-	20	1000

H1-HAP: Formulação 1 empregando homogeneização a alta pressão, H2-HAP: Formulação 2 empregando homogeneização a alta pressão, H3-HAP: Formulação 3 empregando homogeneização a alta pressão,

4.4.1. Avaliação da viscosidade dos diferentes meios

A análise da viscosidade dos diferentes meios utilizados na obtenção de nanocristais foi realizada no viscosímetro digital Brookfield modelo DV-I Prime (Middelboro, MA USA) a temperatura ambiente (25°C). Utilizou-se o adaptador UL para medições de viscosidade abaixo de 100 centipoise (cP). Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada meio, e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

4.5. Preparação dos nanocristais de artemeter empregando moagem via úmida em escala reduzida

As formulas foram obtidas empregando sistema em reduzida escala (laboratorial) constituído de recipiente de vidro (capacidade de 10mL), esferas de zircônio de 0,1 mm (Retsch, Alemanha) e barras magnéticas em formato de cruz (ROMERO; KECK; MÜLLER, 2016). Diferentes estabilizadores estéricos foram testados: poloxamer 407, D-α- tocoferol polietileno glicol 1000 succinato (TGPS), Kollidon® VA 64 e Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero (Soluplus®).

4.5.1. Otimização do processo de preparação dos nanocristais de artemeter empregando planejamento de experimentos por superfície de resposta com pontos axiais

Otimizou-se o modelo para as variáveis que influenciaram nas características de diâmetro hidrodinâmico médio da partícula (DHM) e índice de polidispersão (IP). Essas variáveis independentes (fatores) foram: tempo (dias) de moagem, concentração do Soluplus® e concentração de artemeter. A Tabela 3 apresenta a matriz de ensaios com as faixas de tempo (dias) e de concentração do artemeter e do estabilizante (%p/p): 4 e 5 (dias) para tempo de moagem, 3,0% e 5,0% (p/p) para artemeter e e 1,0% e 3,0% (p/p) para o polímero Soluplus®. A matriz de ensaios e a análise dos resultados foram realizadas empregando o software Minitab 17.

Tabela 3. Matriz de ensaios para a otimização do processo de produção de nanocristais de artemeter.

Formulação	Ordem	Ponto central	Tempo (dias)	Artemeter (%p/p)	Soluplus® (%p/p)
1	5	1	4,0	3,0	3,0
2	7	1	4,0	5,0	3,0
3	2	1	6,0	3,0	1,0
4	10	0	5,0	4,0	2,0
5	11	0	5,0	4,0	2,0
6	6	1	6,0	3,0	3,0
7	9	0	5,0	4,0	2,0
8	3	1	4,0	5,0	1,0
9	1	1	4,0	3,0	1,0
10	4	1	6,0	5,0	1,0
11	8	1	6,0	5,0	3,0
12	12	-1	3,3	4,0	2,0
13	13	-1	6,7	4,0	2,0
14	14	-1	5,0	2,3	2,0
15	15	-1	5,0	5,7	2,0
16	16	-1	5,0	4,0	0,3
17	17	-1	5,0	4,0	3,7

4.6. Caracterização físico-química

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

A distribuição de tamanho inicial do artemeter, matéria-prima, e após o processo de nanopulverização foi determinada pelo 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 solução saturada do fármaco, previamente filtrada para a remoção do fármaco não solubilizado.

O tempo de medição e o tempo de ultrassom empregados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de medida de artemeter (matéria-prima) e nanocristais pelo método de difração de raios laser (DL).

Método	Amostra	Tempo de medida (s)
-	Artemeter matéria-prima	30
Moagem de alta energia	M1-MAE	25
Homogeneização à alta pressão	H3-HAP	25

M1-MAE: Formulação 1 usando moagem a alta energia; H3-HAP: Formulação 3 usando homogeneização a alta pressão.

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

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

Visando estabelecer as condições para as leituras de diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (IP) pelo método de espalhamento de luz dinâmica (DLS), foram realizadas diluições consecutivas de 1:50 e 1:200 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 Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.6.2.2. 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 em potencial zeta (ζ) (mV) usando a equação de Henry (Equação 5).

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(ka) \qquad (5)$$

Em que η e ε são a viscosidade e a constante dielétrica, respectivamente, 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 70 µS/cm empregando solução de NaCl 0,9% (p/v).

4.6.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial foi realizada empregando o equipamento TA-2920 (TA Instrument®, New Castle, DE, EUA) previamente calibrado com índio metálico (ponto de fusão: 156,4 °C/$\Delta H_{fusão}$: 28,50 Jg^{-1}. Usa-se faixa de temperatura de 25 a 350°C. Foram pesadas as seguintes amostras: artemeter (221 mg), hidroxipropilcelulose (2,3 mg), D-α-tocoferol polietileno glicol 1000 succinato (TGPS) (2,02 mg), polaxamer 407 (2,23 mg), Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero (Soluplus®) (2,31 mg), manitol (0,7 mg) e suas misturas físicas, artemeter e hidroxipropilcelulose (2,16 mg), artemeter e TGPS (2,02 mg), artemeter e polaxamer 407 (2,04 mg), artemeter e soluplus® (2,07 mg) e artemeter e manitol (2,03 mg). Essas amostras foram cuidadosamente

transferidas para cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e submetidos à velocidade de aquecimento de 10°C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio, com vazão de 50 mL/min

4.6.4. Analise termogravimétrica (TG/DTG) e análise térmica diferencial (DTA)

As análises de TG/DTG e DTA foram realizadas usando-se cadinhos de platina no equipamento TA-2920 (TA Instrument®, New Castle, DE, EUA) em uma faixa de temperatura de 25 a 600°C, velocidade de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min). A calibração do equipamento foi realizada empregando oxalato de cálcio. As massas do artemeter (2,391 mg), hidroxipropilcelulose (4,846 mg), D-α- tocoferol polietileno glicol 1000 succinato-TGPS (3,202 mg), poloxamer 407 (6,321 mg), soluplus® (8,173 mg), manitol (3,39 mg) e suas misturas físicas, artemeter e hidroxipropilcelulose (5,866 mg), artemeter e TGPS (3,196 mg) , artemeter e poloxamer 407 (4,614 mg), artemeter e soluplus® (4,604 mg) e artemeter e manitol (3,078 mg), foram transferidas para cadinhos de platina e a perda da massa foi registrada em função da temperatura.

4.6.5. Solubilidade de saturação

Os ensaios de solubilidade para as formulações e para as misturas físicas foram realizados empregando-se o método de equilíbrio. Dessa forma, excesso dessas foram acondicionadas no interior de frascos de vidro contendo 10 mL dos seguintes meios, preparados conforme descrito USP 32: tampão McIlvaine pH 2,5; 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 10.000 rpm por 10 minutos a 25°C em centrífuga 5424R-Eppendorf (Eppendorf, Estados Unidos) e filtradas em filtro Millex® (0,45µm). A concentração do fármaco foi determinada pelo método espectrofotométrico desenvolvido e validado no

presente trabalho empregando espectrofotômetro Evolution 201-Thermo Scientific (4.2.1.)

4.6.6. Liofilização da nanosuspensão obtida pelo método de moagem via úmida em escala reduzida

A secagem das nanosuspensões foi efetuada por meio de liofilização com o objetivo de aumentar a estabilidade das preparações obtidas em meio aquoso, assim como, permitir a realização dos ensaios de difração de raios X, solubilidade de saturação e a análise térmica das formulações. Por meio da liofilização foi possível a obtenção de formas farmacêuticas sólidas dos nanocristais.

4.6.6.1. Determinação da temperatura de transição vítrea (T_g') e Temperatura eutética (T_{eut}) usando Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry – DSC*)

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas empregando equipamento marca Perkin Elmer precisely, DSC 4000. Foi adicionado 5% de manitol (usado como agente formador de volume ou *bulking agen*t) na nanosuspensão de artemeter (R2-MUR). Foram usados cadinhos de alumínio contendo aproximadamente 7,2 mg de amostra. As análises foram submetidas à etapas de resfriamentos, isotermas e aquecimentos (incluindo o tratamento de *annealing*): resfriamento de 5°C/min de 25°C até -80°C, isoterma por 10 min, aquecimento de 10°C/min até -15°C, isoterma por 20 min, resfriamento de 5°C/min até -80°C e aquecimento de 10°C/min até 40°C. A calibração do equipamento foi feita utilizando-se água destilada (ponto de fusão a 0°C e $\Delta H_{fusão}$ = 335 Jg^{-1}). Para cada tipo de cadinho utilizado no experimento, um cadinho vazio foi utilizado como referência. Foram determinadas a temperatura de transição vítrea (T_g') e Temperatura eutética (T_{eut}) da nanosuspensão de artemeter. Os valores de T_g' e T_{eut} foram considerados como parâmetros críticos durante o evento térmico (ponto médio). As variações relativas à capacidade calorífica da Tg (ΔCp em $Jg^{-1}°C^{-1}$) foram calculadas.

4.6.6.2. Microscopia acoplada a liofilização para a determinação da temperatura de colapso (T_c)

A temperatura de colapso (T_c) das nanopartículas foi determinada por meio do microscópio acoplado a módulo de liofilização, Lyostat 2, modelo FDCS 196, (Linkam Istruments, Surrey, UK) equipado com sistema de congelamento por nitrogênio líquido (LNP94/2) e controlador de temperatura programável (TMS94, Linkam). Foi usada pressão de 100 mTorr durante a análise (bomba de vácuo Edwards E2M1.5, Linkam). Aproximadamente alíquota de 0,7µL da correspondente nanosuspensão (com manitol e sem manitol) foi usada para detectar a T_c. As amostras foram congeladas a uma taxa de resfriamento de 1°C/min até -55°C. A observação direta do congelamento e da liofilização foi realizada utilizando-se microscópio de luz polarizada Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão).

4.6.6.3. Liofilização da nanosuspensão de artemeter

A liofilização foi realizada em liofilizador Christ® Alpha 1-4 LSC (Martin Christ, Alemanha). As formulações obtidas pela moagem via úmida em escala reduzida foram liofilizadas em volume igual a 1,5 mL. Usou-se o *bulking agent* manitol a uma concentração de 5% (p/p); frascos de vidro de 10 mL foram preenchidos manualmente e parcialmente fechados com tampas de borracha. As amostras foram submetidas à congelamento lento (1°C/min) até que a temperatura do produto atingisse -45°C. O tratamento térmico *annealing* foi aplicado submetendo-se primeiro as amostras ao congelamento lento, seguido de etapa de aquecimento até -15°C e mantidas a essa temperatura por 1 hora. Finalmente, as amostras foram novamente congeladas a -45°C e submetidas a liofilização. A secagem primária foi conduzida em temperatura de prateleira de -35°C e pressão de 75 mTorr, por 48h. Na etapa da secagem secundária, a temperatura da prateleira foi de +20°C, sob a mesma pressão, durante 4h.

4.6.7. Estabilidade das nanosuspensões e dos nanocristais liofilizados

A estabilidade das nanosuspensões de artemeter, assim como, dos nanocristais liofilizados foi avaliada por período de 3 meses a temperatura ambiente (25°C) e 4°C para formulações obtidas por moagem via úmida a escala reduzida. Para avaliar a estabilidade física foram determinados o DHM, o IP e o PZ. Essas características foram determinadas durante o período de armazenamento.

4.6.8. Avaliação *in silico* das características físico-químicas do artemeter

As características físico-químicas do artemeter foram determinadas empregando as plataformas de quimioinformática ChemAxon's® Marvin. As seguintes constantes físico-químicas do artemeter foram determinadas: pKa, microespécies, ponto isoelétrico, logP, área de superfície polar, doadores e receptores de ligações de hidrogênio.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação do artemeter nos estudos de solubilidade

5.1.1. Determinação da absorbância máxima

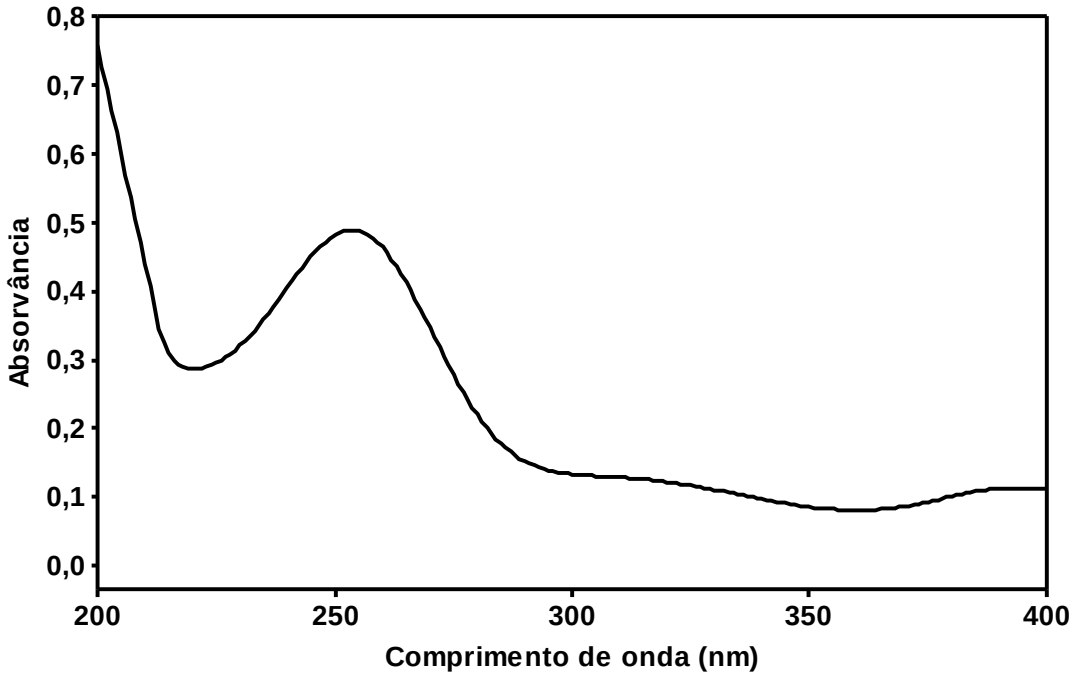
Considerando que a artemisina e seus derivados (artemeter) carecem de algum grupo cromóforo na sua molécula que permita a absorção na região de baixo comprimento de onda (ultravioleta 200-400 nm), foi necessário o desenvolvimento de método espectrofotométrico que facilite a sua quantificação. Na atualidade, os métodos espectrofotométricos UV disponíveis para a análise do artemeter fazem uso do seu produto de decomposição empregando HCl como reativo. Segundo Ward et al. (1992) esse produto de decomposição de ácido de

artemisina tem sido descrito como α-β-decalona insaturado e absorve em comprimento de onda de 254 nm (THOMAS, WARD, 1992).

O método desenvolvido foi baseado em trabalhos anteriores (SHRIVASTAVA et al., 2008, PRATAB et al., 2011, CHRISTIAN et al., 2016).

Para a determinação da absorbância máxima utilizou-se o software insight no modo Scan do espectrofotômetro UV-Visible Evolution 201. Esse ensaio foi realizado por meio de varredura no comprimento de onda de 200 a 400nm. O comprimento de onda de absorbância máxima do artemeter foi de 255 nm com pico máximo de absorbância de 0,501; como apresentado na Figura 8.

Figura 8. Absorção máxima de artemeter (20µg/ml) contra o branco reagente, no intervalo de comprimento de onda de 200-400 nm.



5.2. Validação do método analítico para a quantificação do artemeter nos meios empregados no estudo de solubilidade

5.2.1. Especificidade

Na avaliação da especificidade, foi demonstrado que os solventes utilizados para o desenvolvimento do método analítico, assim como, os excipientes que compõem a formulação, não têm interferência na longitude de onda no qual o fármaco tem absorbância máxima (255 nm), comprovando-se a especificidade do método em água ultrapura Milli-Q®, tampão HCl pH 1,2; tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,5 (Figuras 9, 10, 11 e 12); e em excipientes como Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero "Soluplus®" e manitol (formula placebo) e na mistura do artemeter e excipientes (Figuras 13 e 14).

Figura 9. Espectro da varredura do tampão HCl pH 1,3 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm,

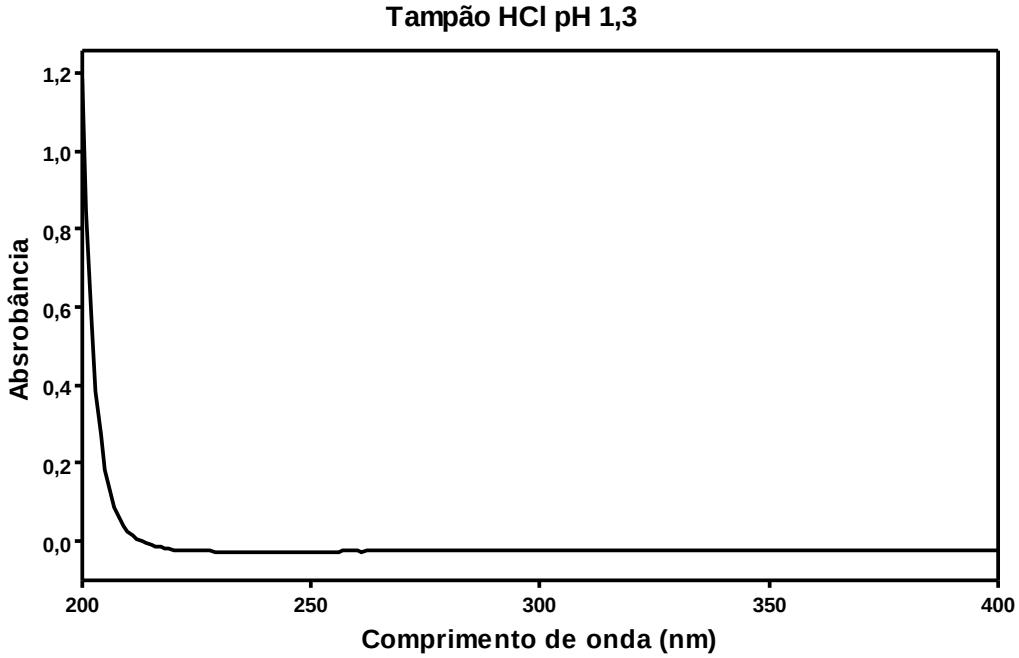


Figura 10. Espectro da varredura do tampão acetato pH 4,5, no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

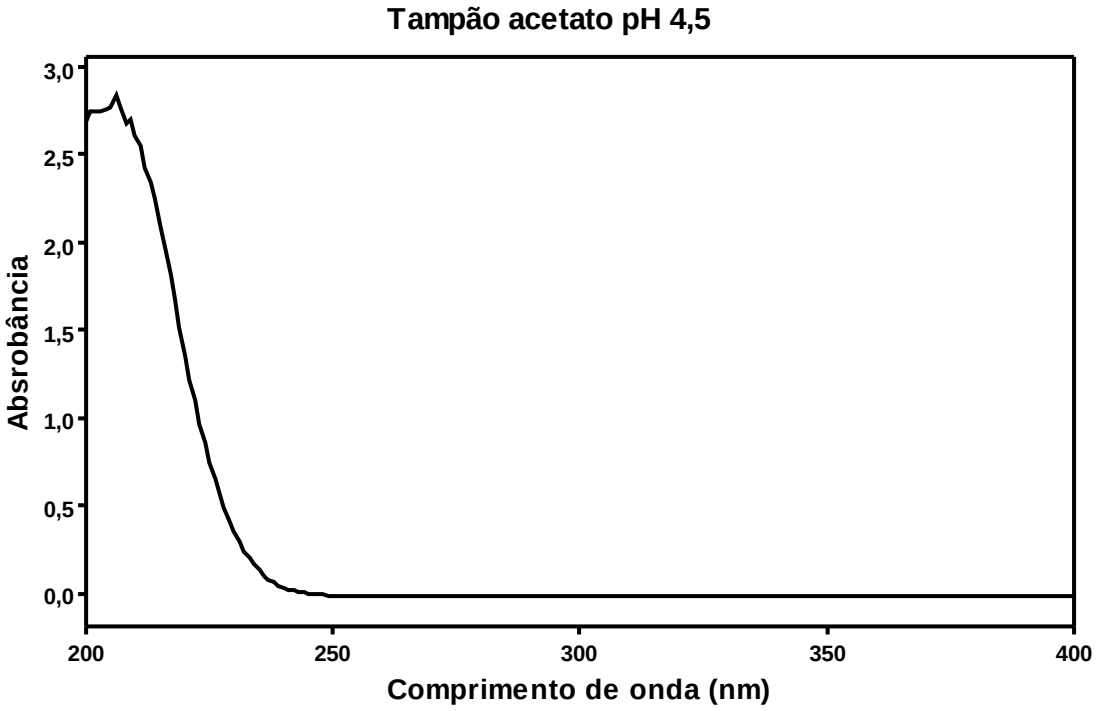


Figura 11. Espectro da varredura do tampão fosfato pH 6,8, no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, para avaliar a especificidade do método analítico do artemeter.

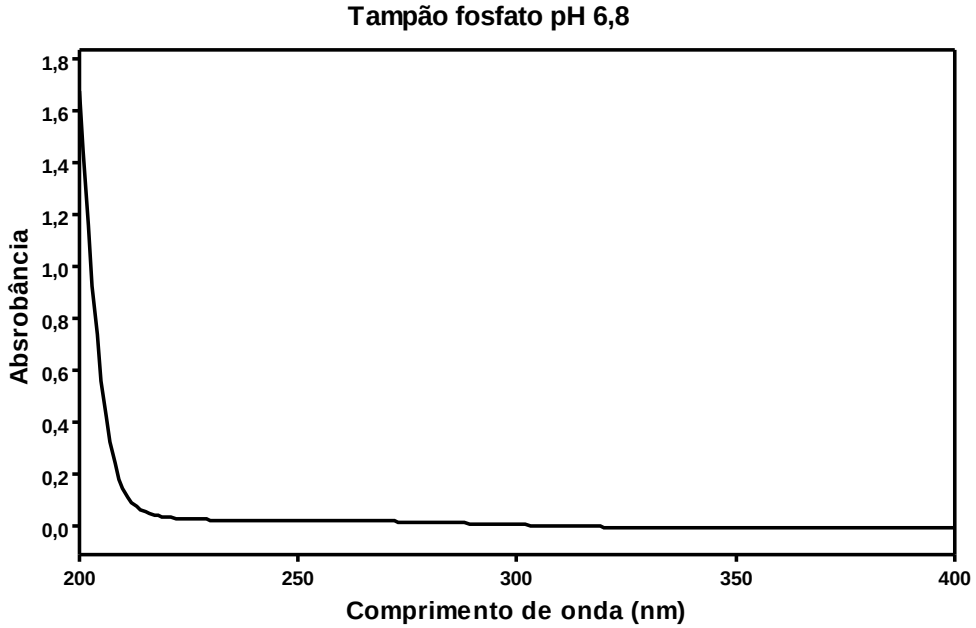


Figura 12. Espectro da varredura do tampão fosfato pH 7,5, no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, para avaliar a especificidade do método analítico do artemeter.

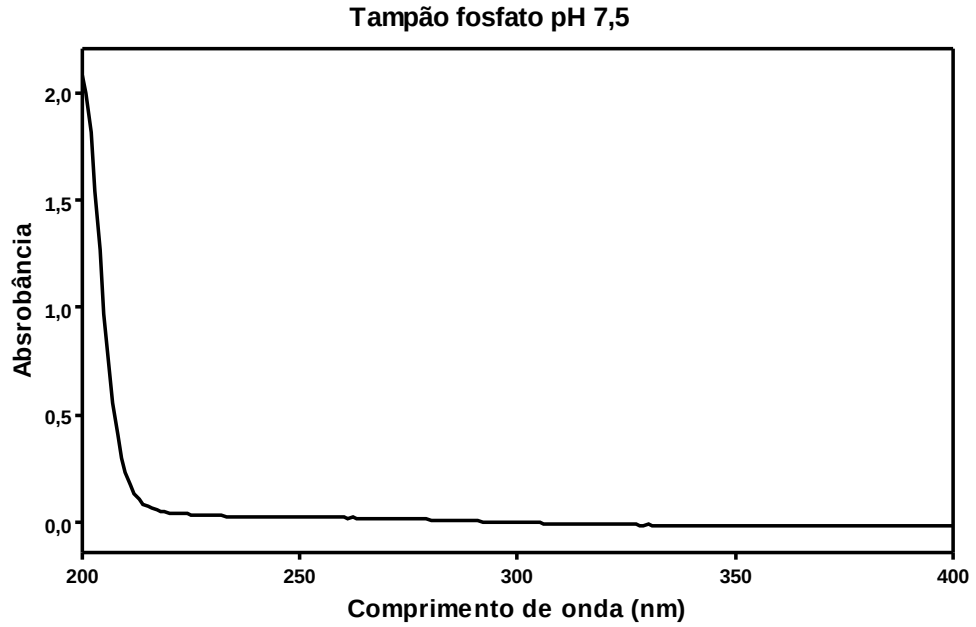


Figura 13. Espectro da varredura da fórmula placebo (Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero “Soluplus®” e manitol) no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

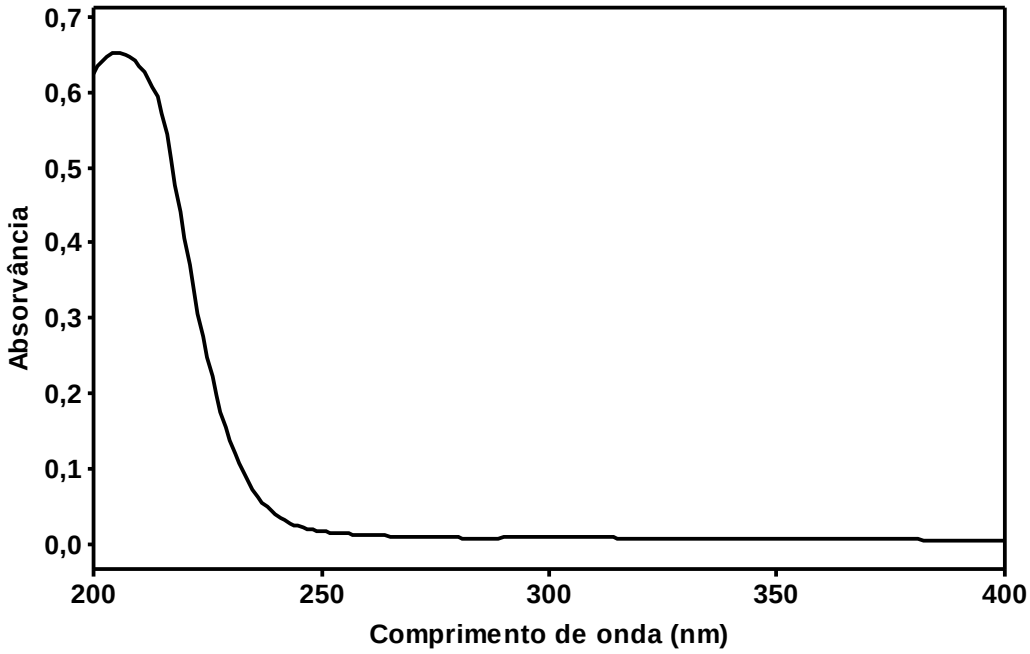
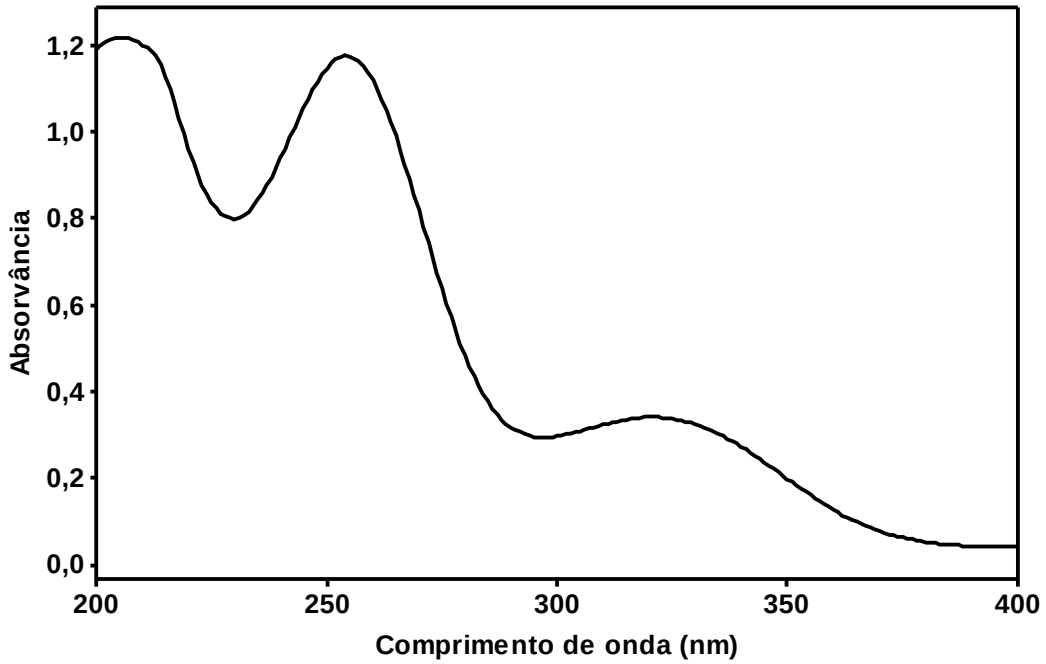


Figura 14. Espectro da varredura da formula (artemeter e excipientes), no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.



5.2.2. Linearidade

Com a finalidade de avaliar a linearidade do método e a significância do modelo, foi construído gráfico de concentração (µg/mL) *versus* absorbância (Tabela 5). O método dos mínimos quadrados permitiu a obtenção da equação da reta com sua respectiva curva analítica. Também se obteve o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (r^2) conforme apresentado na Figura 15. Foi determinado a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) das absorbâncias, em triplicata para cada nível de concentração em água ultrapura Milli-Q®. O CV é considerado aceitável quando apresentar valor abaixo de 5 %, conforme a norma vigente RE 899/2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 5. Valores em triplicata da absorbância obtida na curva analítica do método para a quantificação do artemeter.

Concentração (µg/mL)	Absorbância			Média	DP	CV%
	1	**2**	**3**			
15	0,448	0,427	0,422	0,432	0,0134	3,10
20	0,579	0,570	0,568	0,572	0,0058	1,02
25	0,724	0,699	0,713	0,712	0,0125	1,75
30	0,846	0,822	0,859	0,842	0,0186	2,21
35	0,977	0,960	0,991	0,976	0,0158	1,62
40	1,103	1,080	1,142	1,108	0,0314	2,84

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

Figura 15. Reta de regressão *ŷ = 0,03164 + 0,02698x* ajustada aos pontos experimentais relativos às absorbâncias conforme a concentração do artemeter.

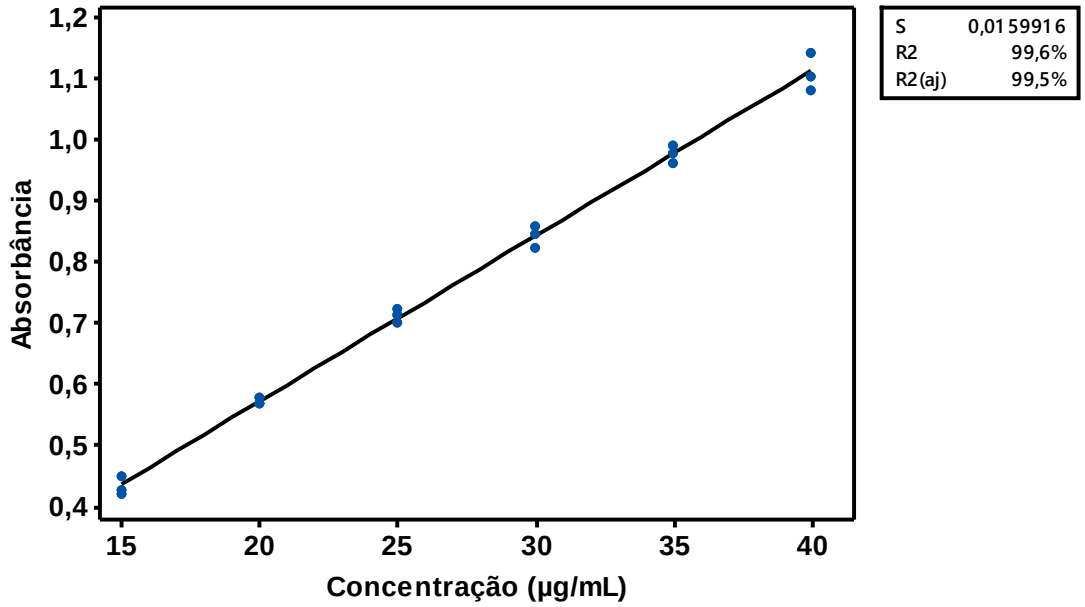


Tabela 6. Parâmetros da reta de regressão

Parâmetro	Valor
Coeficiente de correlação (r)	0,996
Coeficiente angular	0,02698
Intercepto	0,03164 ± 0,01599
LD (µg/mL)	1,955
LQ (µg/mL)	5,926

LD: Limite de detecção, LQ: Limite de quantificação.

A significância da regressão das curvas analíticas no meio água ultrapura Milli-Q® foi determinada empregando os seguintes parâmetros: coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r^2), valor calculado de "t" (t_{cal}), determinação do valor crítico do teste *t* student (utilizando a tabela *t* de student com nível de significância de α=0,01 e 4 graus de liberdade – $t_{0,01;4}$), valor-p e hipótese nula H_0 a ser rejeitada ou aceita (CALLEGARI, 2003). Esses parâmetros foram avaliados no meio de estudo (Tabela 7).

Segundo Callegari (2003), no modelo matemático $y = Bx+A$, quando não existe dependência de "*y*" em relação a "*x*", o coeficiente de regressão populacional, *B*, é igual a zero. Assim, para testar a hipótese de que *B* não é zero, determina-se o número crítico de erro padrão permitido para um afastamento não significativo entre *b* e *B* (*b* - *B*), sendo que "*b*" é o valor do coeficiente de regressão da equação ($\hat{y} = 0,03164 + 0,02698x$) ajustada aos pontos experimentais relativos às absorbâncias, conforme a concentração do artemeter em água (Quadro 2).

Quadro 2. Parâmetro do teste de hipótese para *b = 0,02698.*

Parâmetro	Valor
Hipóteses estatísticas	$H_0 : B = 0$ $H_1 : B \neq 0$
Nível de significância	$\alpha = 0{,}01$
Valor crítico do teste	Graus de liberdade (*gl*) = *n – 2*, como (*n – 2*) = 6 – 2 = 4, $t_{\alpha;gl} = t_{0{,}01;4} = 4{,}604$
Valor calculado do teste segundo a equação 5: $t_{calc} = \frac{b-B}{EP_b}$	$t_{calc} = \frac{b - B}{EP_b} = \frac{b}{EP_b} = \frac{0{,}02698}{0{,}0005084}$ $t_{calc} = 53{,}06$

*EP_b: Erro padrão de *b.*

Portanto, a distância entre *b* e zero é de aproximadamente 53,06 erros padrão. A decisão foi fundamentada da seguinte forma: como I t_{calc} I = 53,06 > $t_{0,01;6}$ = 4,604, rejeita-se a hipóteses nula (H_0) de que o coeficiente de regressão é igual a zero (*B*=0) e se aceita a hipóteses alternativa (H_1) de que o coeficiente de regressão é significativamente diferente de zero (B≠0). Assim, considera-se que o modelo ajustado é significativo a nível de significância de 1 % (valor-p = 0,000), ou seja, o modelo de regressão estimado representa satisfatoriamente a relação existente entre as variáveis concentração do artemeter (µg/mL) e absorbância.

Tabela 7. Parâmetros estatísticos para avaliação da significância da regressão linear.

Parâmetro	Valor
r	0,997
r^2	99,6%
t_{calc}	53,06
$t_{0,01;6}$	4,604
p	0,001

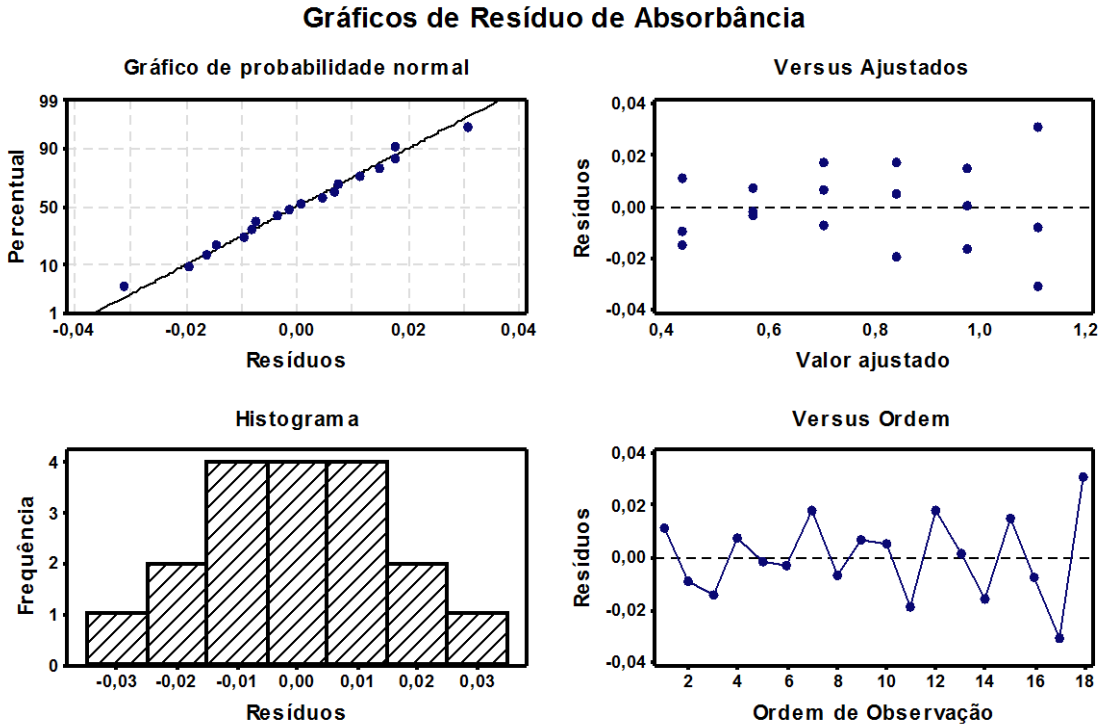
r: coeficiente de correlação, r^2: coeficiente de determinação e p: probabilidade.

O modelo de quantificação para o artemeter utilizando o espectrofotômetro UV-VIS em intervalos de concentração do fármaco entre 15 µg/mL e 40 µg/mL, em água, demonstraram a linearidade e forte correlação (r > 0,99) do método entre a concentração do artemeter (µg/mL) e a absorbância, atendendo ao critério estabelecido pela norma RE 899/2003 (BRASIL, 2003).

Os gráficos de resíduos são usados para examinar a adequação do ajuste do modelo em uma regressão, assim como, determinar se as pressuposições de mínimos quadrados ordinários estão sendo atendidas. No gráfico de probabilidade normal de resíduos, os pontos devem formar uma linha reta se os resíduos forem distribuídos normalmente; o gráfico de resíduos versus valores ajustados deve mostrar padrão aleatório de resíduos nos dois lados de 0. Ponto afastado da maioria dos pontos pode ser considerado *outlier*. *Outlier* consiste em observação que apresenta distanciamento das demais da série. Tal fenômeno pode ocorrer em função da variabilidade ou de erro experimental.

Também não deve haver qualquer padrão reconhecível no gráfico; o histograma de resíduos mostra as características gerais dos resíduos incluindo valores típicos, dispersão e forma, sendo que lateral longa em um dos lados pode indicar distribuição tendenciosa; e o gráfico de resíduos versus ordem de dados permite localizar erros não aleatórios, especialmente de efeitos relacionados ao tempo, e ajuda a verificar a pressuposição de que os resíduos não são correlacionados entre si (CALLEGARI, 2003).

Figura 16. Gráfico dos resíduos relativos ao ajuste de uma reta de regressão aos dados de absorbância do artemeter no meio água.



No presente estudo, a validade dessa análise foi verificada pela observação dos resíduos, que estão apresentados na Figura 16. Os resíduos apresentaram distribuição normal, sua distribuição foi equilibrada, sendo uniforme acima e abaixo da linha correspondente ao resíduo zero, não são correlacionados entre si e apresentam igual variabilidade, conferindo-se a homocedasticidade do teste estatístico da regressão.

5.2.3. Precisão

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos do teste de precisão intra-ensaio e inter-ensaio, expressos em coeficientes de variação (CV%) em relação às concentrações estabelecidas, cujos valores encontraram-se compreendidos entre 2,189% e 3,603%. Conforme a RE 899/2003, os valores obtidos contemplam o limite máximo aceito de 5,0% (BRASIL, 2003).

Tabela 8. Precisão intra-ensaio e inter-ensaio do método analítico para a determinação de artemeter em água ultrapurificada.

Concentração artemeter teórica (µg.mL^{-1})	**Precisão**	**Concentração artemeter média ± desvio padrão (µg.mL^{-1}) ***	**Duas amostras independentes Teste-t (p-valor)**
20	Intra-dia	19,884 ± 0,435	0,107
	CV (%)	2,189	
	Inter-dia	19,291 + 0,695	
	CV (%)	3,603	
30	Intra-dia	30,171 ± 0,884	0,860
	CV (%)	2,931	
	Inter-dia	30,253 + 0,676	
	CV (%)	2,234	
40	Intra-dia	41,315 ± 1,025	0,146
	CV (%)	2,482	
	Inter-dia	40,296 + 1,207	
	CV (%)	2,996	

* = 6 medições

O valor-p para o teste t (comparação entre as médias de duas amostras independentes) foi de 0,107; 0,860; 0,146 para as concentrações de 20, 30 e 40 µg.mL^{-1}, respectivamente em diferentes dias; a hipótese nula foi aceita para cada concentração sendo que as médias não apresentaram diferença significativa (valor-p<0,05; α=0,05).

5.2.4. Exatidão

A exatidão do método analítico representa o grau de proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação ao valor verdadeiro (Brasil, 2003). Os resultados apresentados na Tabela 9 revelaram que a exatidão variou no intervalo de 94,64 a 98,16%, com média de recuperação de 96,36% mostrando, portanto, adequada exatidão em relação ao valor esperado, de 100%.

Tabela 9. Valores experimentais médios de porcentagem de recuperação obtidos para o teste de exatidão do artemeter.

	Quantidade fixa (µg)	Quantidade adicionada (µg)	Quantidade estimada (µg)	Recuperação (%)	CV (%)	Média da recuperação (%)
ART	20	16	34,07 ± 0,48	94,64	1,427	96,36 ± 1,76
	20	20	38,51 ± 0,61	96,28	1,600	
	20	24	43,19 ± 0,73	98,16	98,16	

5.2.5. Robustez

O teste de robustez corresponde a capacidade de um método analítico em resistir a pequenas variações de alguns parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante seu uso na rotina (BRASIL, 2003).

O fator da robustez a ser avaliado foi o comprimento de onda. Esse parâmetro analítico modificado e não apresentou mudanças significativas no valor médio da concentração (30µg/mL) do artemeter (Tabela 10).

Tabela 10. Valores médios da absorbância do artemeter (30µg/mL) variando o comprimento de onda máximo de absorção.

Parâmetro		**Absorbância da solução amostra ± desvio padrão**	**Concentração do fármaco (µg/mL) ± desvio padrão**
Comprimento de onda	253 nm	0,840 ± 0,001	29,98 ± 0,052
	255 nm	0,837 ± 0,005	29,86 ± 0,202
	257 nm	0,839 ± 0,004	29,94 ± 0,146

Os resultados avaliados empregando análise de variância ANOVA (um fator), conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11. Análise de variância ANOVA (um fator) demonstrando que o método é robusto (valor-p>0,05)

ANOVA						
Fonte de variação	***SQ***	***GL***	***QM***	F_{cal}	$F_{0,05;2;15}$	**Valor-p**
Entre tratamentos	0,04484	2	0,02242	1,03	3,68	0,381
Dentro (resíduo)	0,32632	15	0,02175			
Total	0,37117	17				

SQ: Somas de quadrados, GL: Graus de liberdade, QM: Quadrado médio.

A análise mostrou que não há diferença estatística significativa ($p<0,05$; $\alpha=0,05$), uma vez que o valor F_{cal} (1,03) foi menor ao valor $F_{0,05;2;15}$ (3,68), demonstrando assim ser um método robusto considerando a alteração do comprimento de onda.

5.3. Comportamento térmico do artemeter

O conhecimento das características térmicas do artemeter é de fundamental importância na obtenção dos nanocristais, na otimização do processo, assim como, no seu armazenamento, transporte e eficácia terapêutica (GAO et al., 2013).

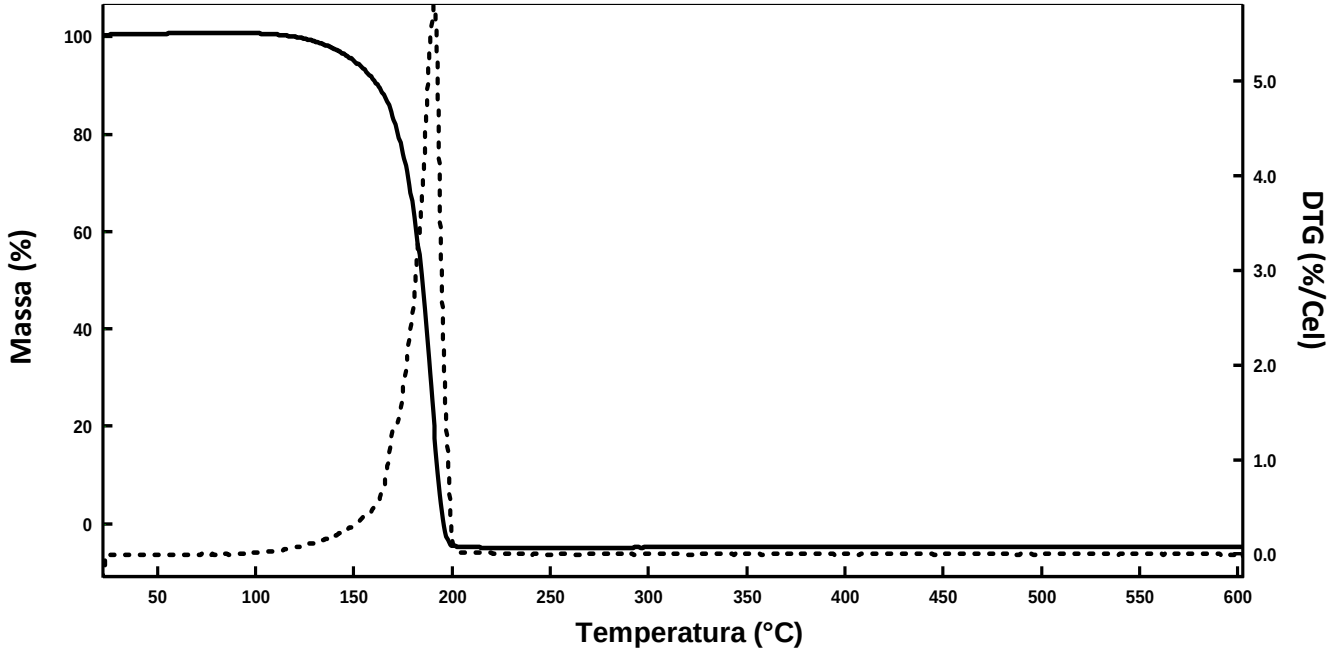
Conforme mencionado anteriormente, o fármaco artemeter apresenta estrutura particular em sua molécula: uma ponte endoperóxido na qual tem sido comprovada a sua potente atividade antimalárica (OLLIARO et al., 2001; PLOYPRADITH, 2004). Porém, o artemeter é instável ao calor e de fácil decomposição. Dessa forma, a produção de nanocristais do fármaco deve ser efetuada considerando tais limitações. A exposição inadequada ao calor pode resultar na decomposição da sua estrutura com consequente perda da eficácia terapêutica do artemeter pela desestruturação do acoplamento endoperóxido (GAO et al., 2013).

As análises do comportamento térmico do artemeter no presente estudo permitiu o conhecimento das faixas de temperatura adequada para a obtenção de nanocristais de artemeter empregando o método de homogeneização a alta pressão, considerando a característica termolábil desse fármaco.

A termogravimetria (TG) foi usada para conhecer a estabilidade térmica do artemeter medindo a perda de massa de amostra pura do fármaco em função do aumento da temperatura. A Figura 17 apresenta o perfil termogravimétrico do artemeter, mostrando a perda de massa desse em função do aumento da temperatura (25 – 600°C), empregando razão de aquecimento constante de 10 °C/min.

As curvas TG/DTG indicam que o processo de decomposição térmica do artemeter matéria-prima ocorre em uma etapa, no intervalo de temperatura e perda de massa: 119-195°C (Δm= 99,85%).

Figura 17. Curvas TG/DTG do artemeter obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.

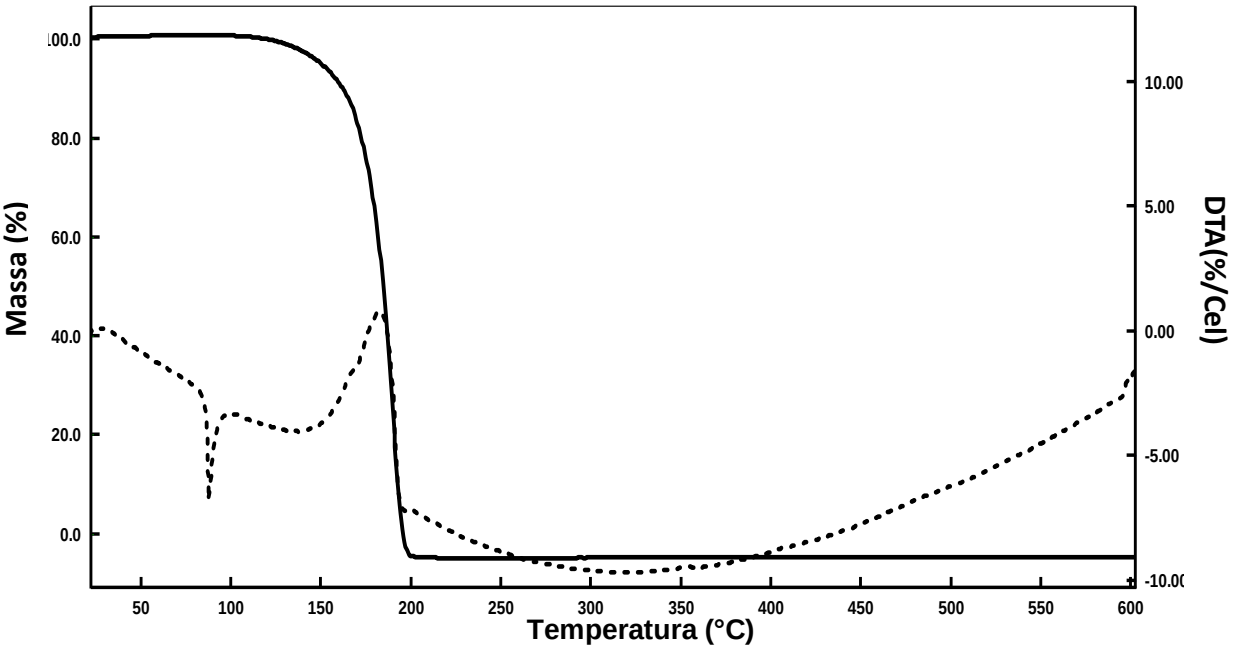


A Figura 18 apresenta os resultados das curvas TG/DTA do artemeter. Essa Figura apresenta especificamente a temperatura na qual o artemeter se descompõe formando produtos de degradação. Dois eventos térmicos foram observados na curva de DTA. Não foi observada perda de massa no primeiro evento endotérmico (T_{pico}=88°C) uma vez que esse está associado com a fusão do artemeter. O segundo evento exotérmico corresponde a etapa de decomposição térmica (T_{pico}= 182,6 °C). Perfis térmicos da matéria-prima artemeter foram avaliados em trabalhos realizados por Nnamami e colaboradores e Dong e colaboradores (DONG et al., 2007; NNAMANI et al., 2014). Esses diferem do perfil térmico da matéria-prima artemeter usado no presente trabalho. Tal diferença deve-se à característica da amostra que se apresenta na sua forma anidra.

O evento exotérmico (T_{pico}=188 °C) corresponde à primeira perda de massa associada à transição térmica com a sua decomposição, iniciando após a fusão do artemeter (T_{inicio}=119°C) (Figura 15). De acordo com Dong e colaboradores (2007), o produto de decomposição do artemeter pode ser

principalmente a molécula de ácido fórmico (HCOOH) determinado mediante o espectro IR do gás (DONG et al., 2007).

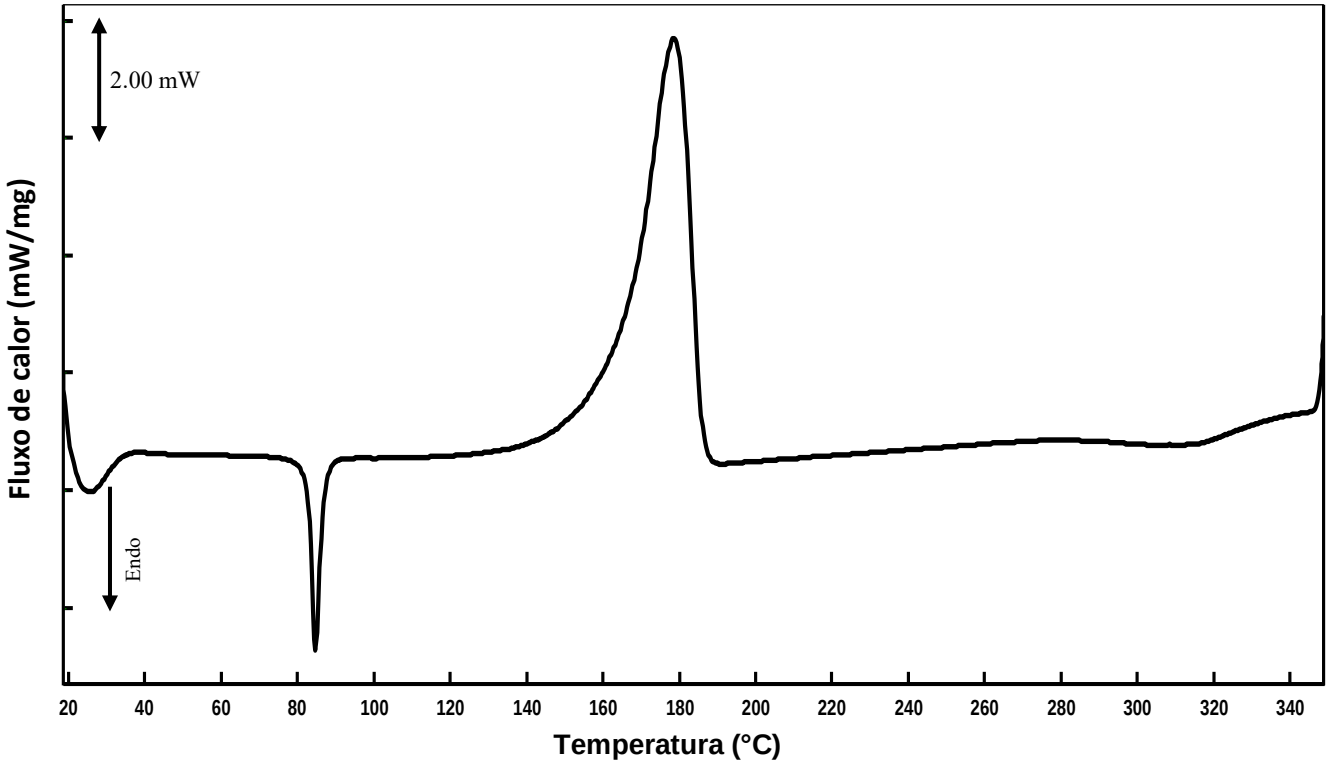
Figura 18. Curvas TG/DTA dinâmica obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do artemeter.



As curvas de DSC do artemeter matéria-prima estão apresentadas na Figura 19. Essas permitem observar que o fármaco cristalino é termicamente estável até aproximadamente 83°C. Pode-se observar que ocorrem dois eventos térmicos, um pico endotérmico (entre 83-90°C) sem perda de massa próprio da fusão do artemeter; e outro exotérmico (119-195°C) com decomposição térmica do fármaco. De acordo com Zhang e colaboradores (2011), o artemeter possui dois polimorfos (A e B), que em condição de aquecimento linear, se a temperatura atinge a temperatura de transformação cristalina, o polimorfo A é transformado em polimorfo B e esse processo de transformação produz um efeito exotérmico (ZHANG et al., 2011). O pico exotérmico causado pela transformação cristalina é facilmente sobreposto pelo pico endotérmico associado com o ponto de fusão do artemeter observados a uma razão de aquecimento de 0,5 e 1°C/min, de acordo com os trabalhos publicados por Gao e colaboradores (2013). Esses autores relatam que o processo de fusão e transformação cristalina do artemeter pode terminar aproximadamente em 90°C e as temperaturas de 86°C a 88°C estão associadas com a fusão e

transformação cristalina do fármaco, respectivamente (GAO et al., 2013). De acordo aos resultados, no presente trabalho não foi observado o pico exotérmico correspondente à transformação cristalina do artemeter (Figura 19) devido ao emprego de razão de aquecimento elevada (10°C/min).

Figura 19. Curvas DSC do artemeter obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.



5.4. Comportamento térmico dos excipientes e estudo de compatibilidade fármaco-excipiente

O uso da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a avaliação de interações físico-químicas entre o fármaco e o excipiente se fundamenta em observações relacionada ao desaparecimento, aparecimento ou mudança de eventos endotérmicos e exotérmicos, assim como, em variações nos valores de entalpia referentes a esses eventos térmicos. Sendo assim, em misturas físicas binárias na proporção 1:1 (massa/massa) nas quais não são observadas quaisquer interações entre os componentes químicos, os valores de $T_{inicial}$ relacionado ao evento de fusão ou decomposição térmica da espécie química avaliada não devem sofrer alteração (ARAUJO; STORPIRTIS; MERCURY; CARVALHO; SANTOS; MATOS, 2003, NETO; NOVÁK; MATOS, 2009, STORPIRTIS et al., 2009)

No presente trabalho foi utilizada a análise térmica para avaliar os comportamentos térmicos dos diferentes excipientes utilizados (estabilizadores e lioprotetores) na obtenção dos nanocristais de artemeter. O conhecimento de tais características é de crucial importância na eficácia da redução de tamanho da partícula, na otimização do processo, na detecção de incompatibilidade fármaco-excipiente, na avaliação do grau de amorfização dos componentes da formulação, assim como, na otimização do processo de liofilização da suspensão contendo nanocristais de artemeter.

Para as diversas formulações contendo artemeter e obtidos por diferentes processos (moagem de alta energia, homogeneização a alta pressão e moagem via úmida a escala reduzida) foram usados os excipientes: hidroxipropilcelulose (HPC), D-α- tocoferol polietileno glicol 1000 succinato (TGPS), polaxamer 407 (P-407), polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero (Soluplus®) e manitol.

Foram obtidas as curvas de TG, DTA/TG e DSC do fármaco, de cada excipiente e das respectivas misturas físicas.

5.4.1. Hidroxipropilcelulose (HPC)

A técnica de análise térmica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) tem sido extensivamente utilizada nos estudos de pré-formulação, na investigação e na predição de incompatibilidades físico-químicas entre fármacos e excipientes (ALVES, 2007). Para a triagem de excipientes em estudo de pré-formulação considera-se que as propriedades térmicas de misturas ou de formulações em teste são iguais a soma das contribuições de cada componente individual (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999).

As Figuras 20 e 21 mostram as curvas DSC e TG/DTG do artemeter, hidroxipropilcelulose e da mistura física artemeter/hidroxipropilcelulose, respectivamente. Os valores de temperatura inicial extrapolada do evento térmico (Temperatura inicial = $T_{inicial}$), temperatura final do evento térmico (Temperatura pico = T_{pico}) e variação de entalpia (ΔH), para cada evento térmico, estão apresentados na Tabela 12, e os valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa, na Tabela 15. A curva DSC (Figura 17) da hidroxipropilcelulose apresenta um evento endotérmico com um T_{pico} de 188°C e ΔH de 34,2J/g que é característico do processo de transição vítrea do polímero. Tal resultado confirma o fraco grau de cristalinidade da amostra (menos de 10%), demonstrado por difração de raios-X, conforme descrito por Talukder e colaboradores (2011).

A curva de DSC para mistura física apresenta um primeiro evento endotérmico com um T_{pico} de 80°C e ΔH de 24J/g característico da fusão do artemeter, um segundo evento exotérmico com um T_{pico} de 177°C e ΔH de 344J/g associado à decomposição do fármaco (Figura 20).

Figura 20. Curvas DSC do artemeter, hidroxipropilcelulose e mistura física artemeter/hidroxipropilcelulose, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

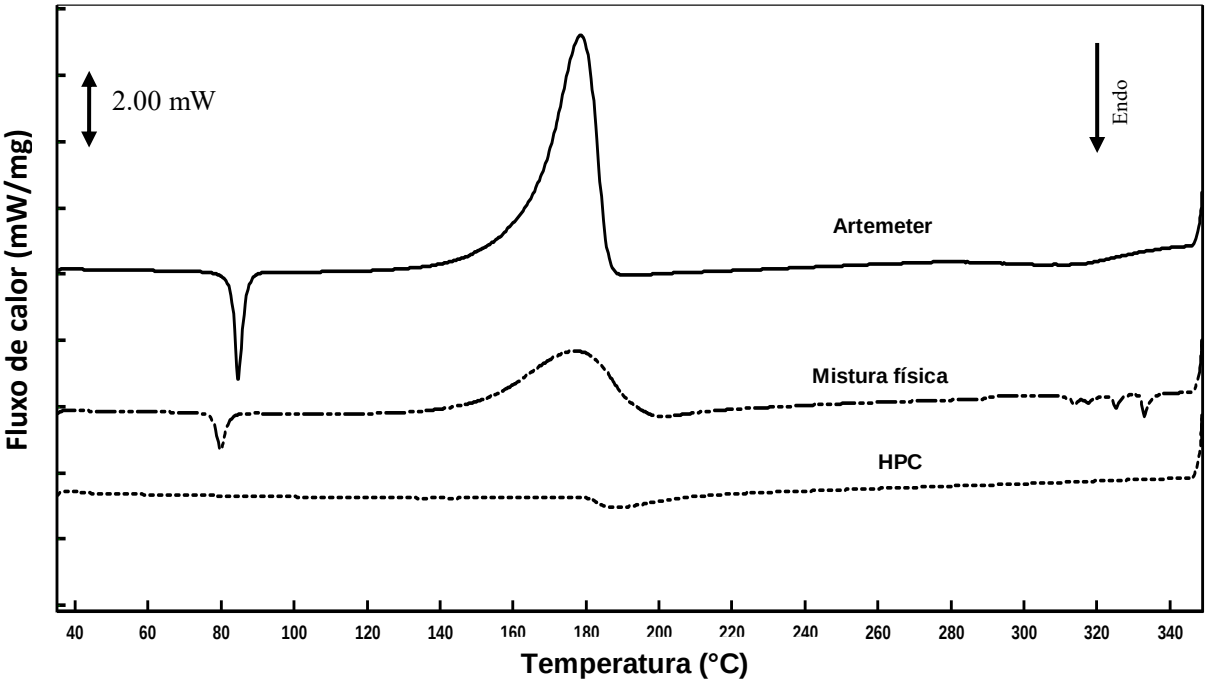


Tabela 12. Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, hidroxipropilcelulose e mistura física.

Amostra	Evento Térmico	$T_{inicial}$ (°C)	T_{pico} (°C)	ΔH (J/g)
Artemeter	Endotérmico de fusão	83	85	60,6
	Exotérmico de decomposição	138,4	179	740
Hidroxipropilcelulose	Endotérmico de Transição vítrea	183	188	34.2
Mistura física (artemeter/hidroxipropilcelulose)	Endotérmico de fusão	77	80	24
	Endotérmico de decomposição	147	177	344

A curva TG da hidroxipropilcelulose apresenta duas perdas de massa: a primeira de 2,1% no intervalo de temperatura de 40 a 150 °C que é atribuído à evaporação da umidade superficial; e a segunda de 93,5% no intervalo de temperatura de 167 a 422 °C correspondente à decomposição térmica da hidroxipropilcelulose (Figura 21).

A curva TG para mistura física apresenta quatro perdas de massa: a primeira de 2,1% associado a perda de água superficial do HPC; a segunda e a terceira de 23,3% e 15,4% correspondente à decomposição térmica do artemeter e a quarta de 53,2% relacionado à decomposição térmica do HPC. O material é termicamente estável até a temperatura de 110°C, aproximadamente (Figura 21).

Figura 21. Curva TG/DTG do artemeter, hidroxipropilcelulose e mistura física artemeter/hidroxipropilcelulose, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.

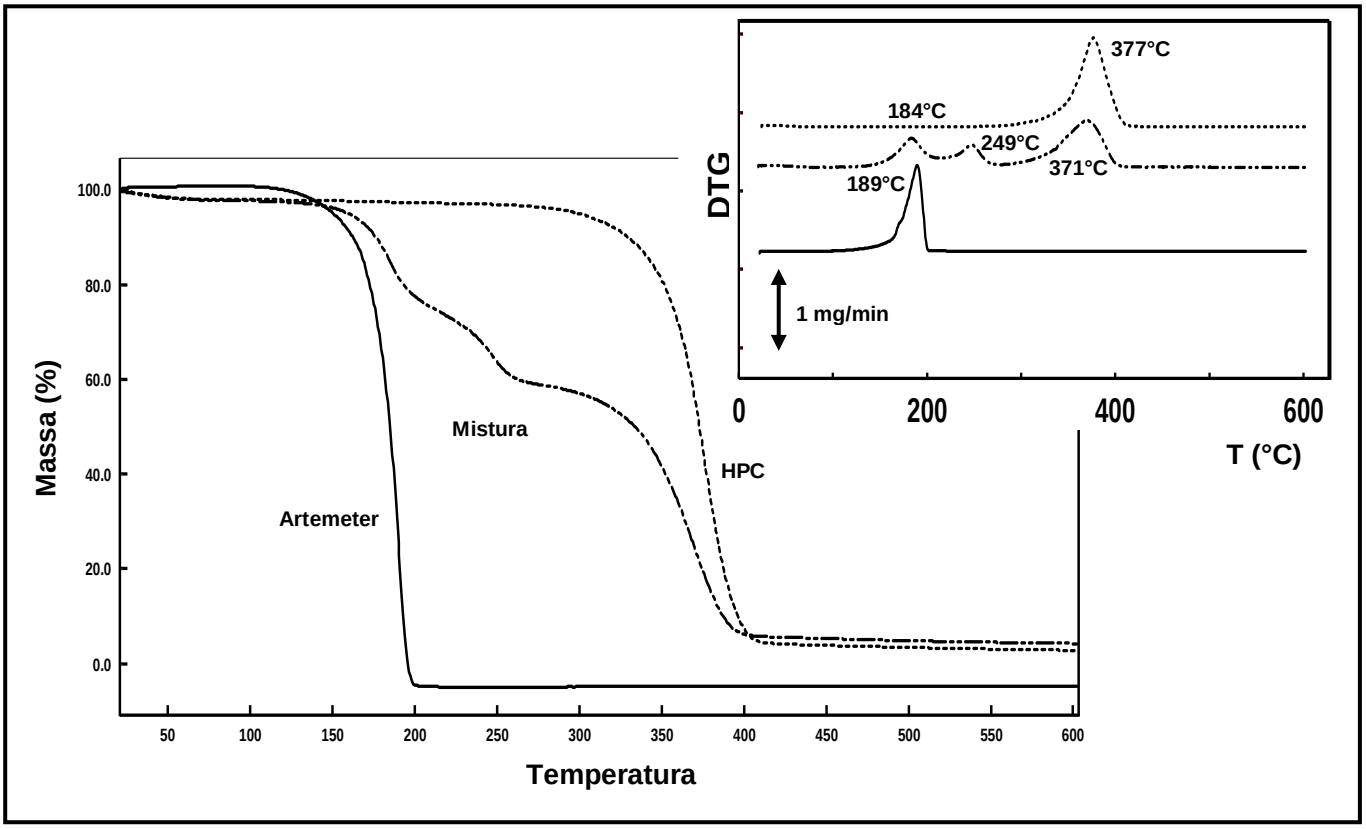


Tabela 13. Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, hidroxipropilcelulose e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.

Amostra	ΔT (°C)	Δm (%)
Artemeter	110 - 205	100
Hidroxipropilcelulose	40 - 150	2,1
	167 - 422	93,5
Mistura física (artemeter/hidroxipropilcelulose)	40 - 116	2,1
	116 - 215	23,3
	215 - 276	15,4
	277 - 420	53,2

O perfil das curvas DSC e TG da mistura física artemeter/hidroxipropilcelulose não apresentou mudanças significativas quando comparados aos perfis dos componentes observados individualmente. Portanto, conclui-se que não há interação entre as espécies.

5.4.2. D-α- tocoferol polietileno glicol 1000 succinato (TGPS)

As Figuras 22 e 23 mostram as curvas TG/DTG e DSC do artemeter, TGPS e da mistura física artemeter/TGPS, respectivamente. Os valores de Δm no intervalo de temperatura correspondentes as perdas de massa estão apresentadas na Tabela 14, e de $T_{inicial}$, T_{pico} e ΔH, para cada evento térmico, na Tabela 15.

Figura 22. Curva TG/DTG do artemeter, TGPS e mistura física artemeter/TGPS, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.

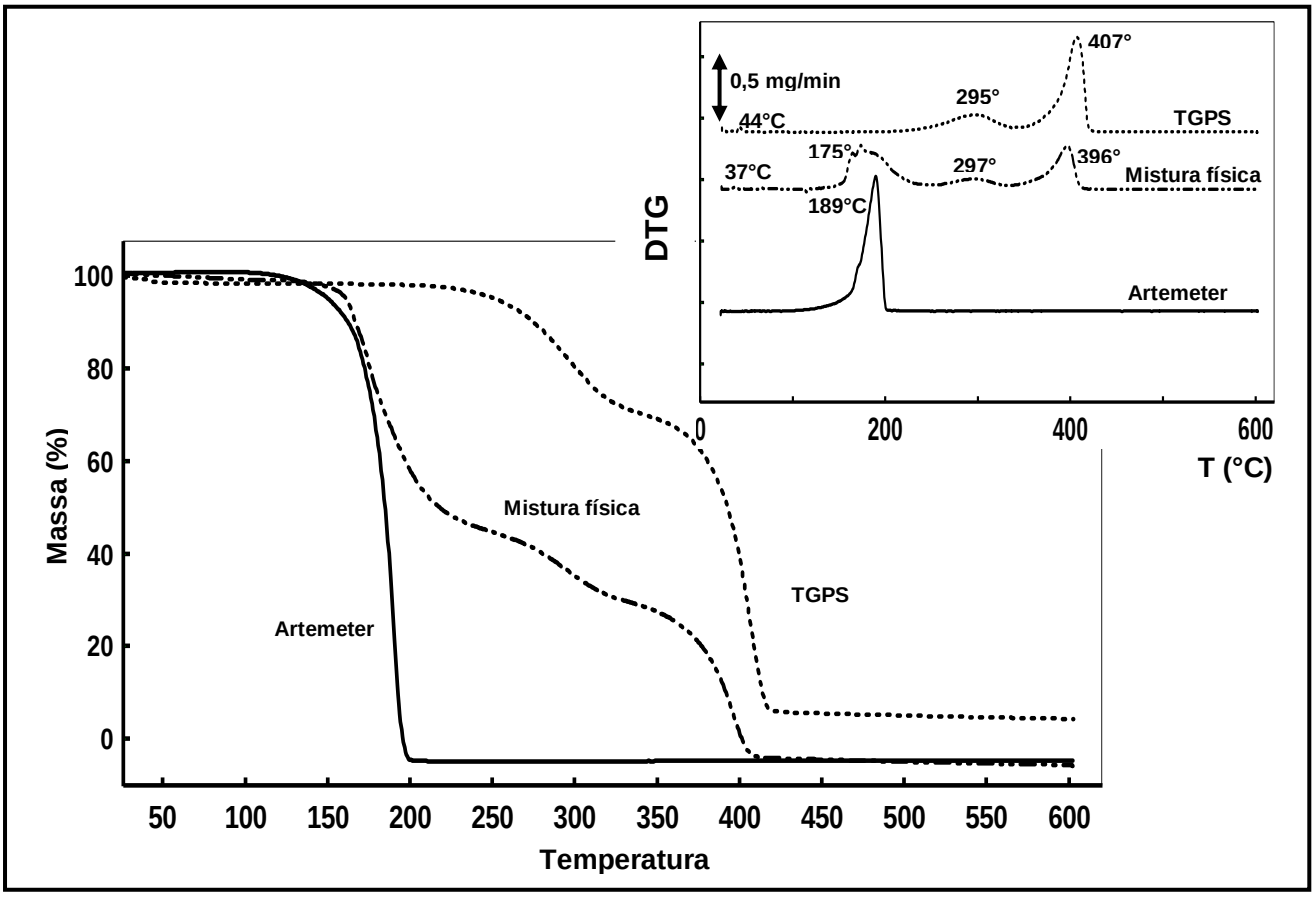


Tabela 14. Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, TGPS e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.

Amostra	ΔT (°C)	Δm (%)
Artemeter	110 - 205	100
TGPS	25 - 79	1,5
	189 - 342	28,2
	342 - 434	64,2
Mistura física (artemeter/TGPS)	25 - 82	1,2
	123 - 206	44,5
	206 - 341	25,5
	341 - 434	32,8

A curva TG do TGPS apresenta três perdas de massa: 1,5% (25 – 82°C), 28,2% (189 – 342°C) e 64,2% (342 – 434°C) referentes à perda da umidade superficial, primeira e segunda decomposição térmica do TGPS, respectivamente (Figura 19). Huang e colaboradores (2011) mostraram o típico perfil de degradação térmica para o monômero de TGPS. Esse perfil apresentou início na temperatura de 350°C com completa combustão em 450°C.

A curva TG para mistura física apresenta quatro perdas de massa: a primeira de 1,2% associado a perda de água superficial do TGPS, a segunda de 44,5% referente à decomposição térmica do artemeter, a terceira de 25,5% relacionada à primeira decomposição térmica da TGPS e a quarta de 32,8% referente à segunda decomposição térmica do TGPS. O material se apresentou termicamente estável até a temperatura de 120°C, aproximadamente.

A curva DSC (Figura 20) da TGPS apresenta um primeiro evento endotérmico com um T_{pico} de 33,8°C e ΔH de 18,3J/g que é característico da fusão do tensoativo. De forma similar, Sethia e colaboradores (2002) mostraram um único evento endotérmico (T_{pico} = 39,7°C) correspondente a temperatura de fusão do TGPS.

A curva de DSC para mistura física apresenta um primeiro evento endotérmico com um T_{pico} de 76,7°C, $T_{inicial}$ de 57,7°C e ΔH de 36J/g característico da fusão do artemeter e um segundo evento exotérmico com um T_{pico} de 172°C e ΔH de 599J/g associado à decomposição do fármaco (figura 20). Os resultados das análises de TG e DSC da mistura física artemeter/TGPS revelaram ausência de mudanças significativas. Foi observada somatória dos eventos térmicos demonstrando que não há incompatibilidade fármaco-excipiente.

Figura 23. Curvas DSC do artemeter, TGPS e mistura física artemeter/tgps, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

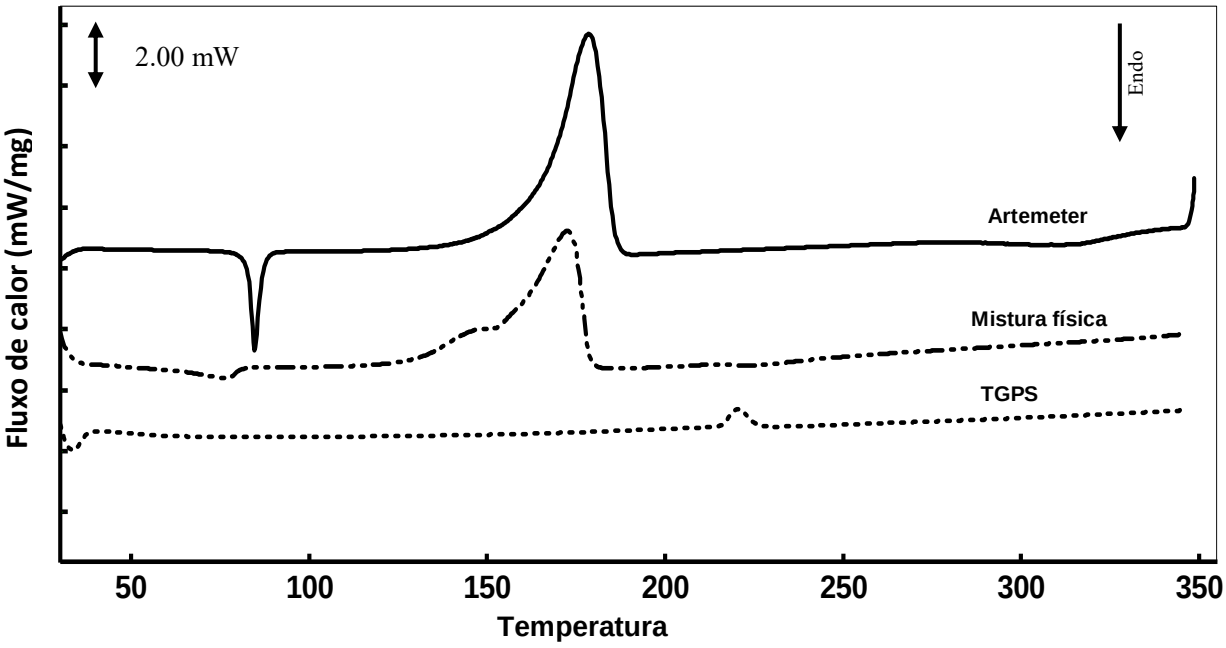


Tabela 15. Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, TGPS e mistura física.

Amostra	Evento Térmico	$T_{inicial}$ (°C)	T_{pico} (°C)	ΔH (J/g)
Artemeter	Endotérmico de fusão	83	85	60,6
	Exotérmico de decomposição	164	179	740
TGPS	Endotérmico de fusão	30,4	33,8	18,3
Mistura física (artemeter/TGPS)	Endotérmico de fusão (artemeter)	57,7	76,7	36
	Exotérmico de decomposição (artemeter)	125,4	172	559

5.4.3. Poloxamer 407 (P-407)

A Figura 24 apresenta as curvas TG e DTG para o artemeter, poloxamer 407 e sua mistura física. O resultado evidencia que a amostra de poloxamer 407 apresenta Δm de 1% relacionada a umidade superficial, entre a faixa de temperatura de 25 a 77 °C, seguido de uma segunda etapa de decomposição térmica indicada na curva DTG com $T_{pico\ DTG}$ de 390°C e com perda de massa de 99% entre o intervalo de temperatura de 261 a 438 °C (Figura 24).

A curva TG/DTG para a mistura física poloxamer 407/artemeter 1:1 (massa/massa) mostra uma primeira perda de massa de 0,5% (25 - 77°C) relacionada a umidade superficial do polímero, uma segunda perda de massa de 52% (110 – 261 °C) referente à decomposição do artemeter, e uma terceira perda de massa de 47,5 % (261 – 438 °C) referente à decomposição do P-407. A avaliação dessa curva demonstrou que esse excipiente não originou qualquer alteração na temperatura em que se inicia a primeira etapa do processo de decomposição térmica do artemeter. Dessa maneira, essa mistura física é termicamente estável até 110 °C (Figura 24).

Figura 24. Curva TG/DTG do artemeter, P-407 e mistura física artemeter/P-407, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.

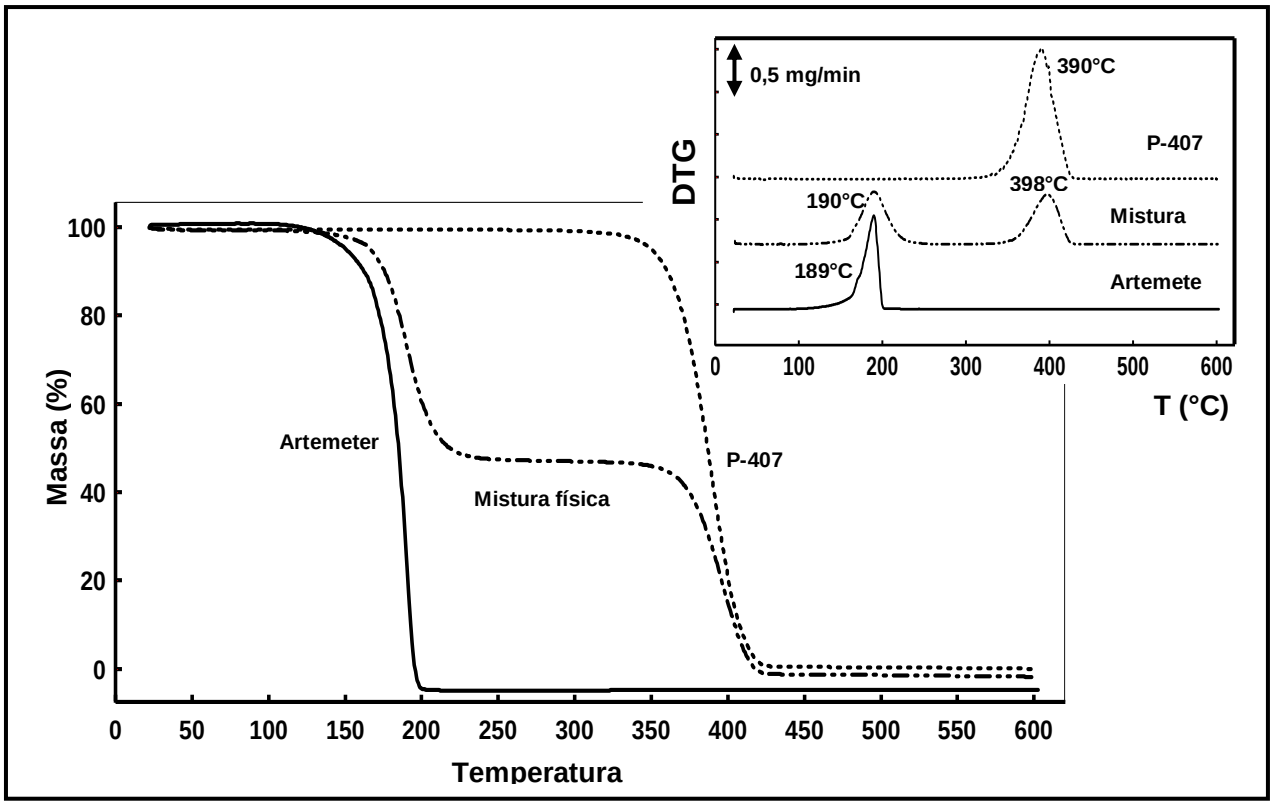
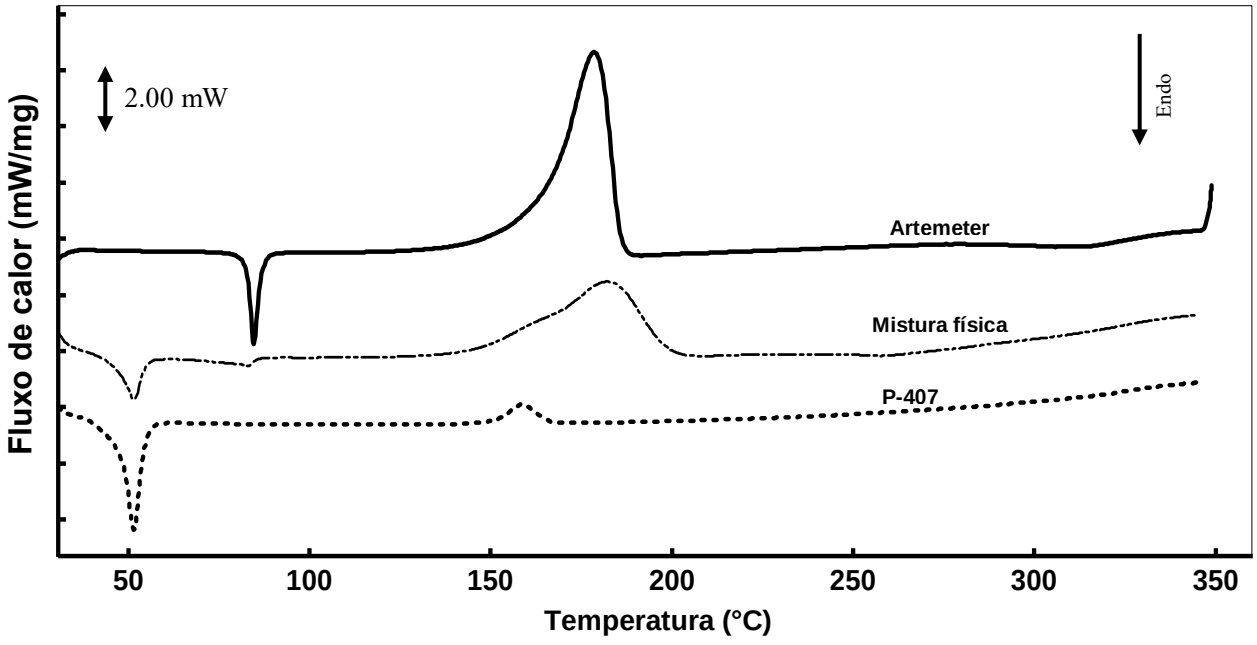


Tabela 16. Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, P-407 e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.

Amostra	ΔT (°C)	Δm (%)
Artemeter	110 - 205	100
P-407	25 - 77	1
	261 - 438	99
Mistura física (artemeter/P-407)	25 - 77	0,5
	110 - 261	52
	261 - 438	47,5

A Figura 25 apresenta as curvas DSC do artemeter, do P-407 e da mistura física. Na curva DSC referentes ao P-407 pode-se observar claramente um primeiro evento endotérmico, correspondente à temperatura de fusão ($T_{inicial}$) em 51,6°C ($\Delta H_{fusão}$ = 141J/g). Nessa faixa de temperatura não houve perda de massa. Perfis térmicos desse polímero foram similares aos trabalhos de Park e colaboradores (2016) e Datta e colaboradores (2011).

Figura 25. Curvas DSC do artemeter, do P-407 e da mistura física artemeter/P-407, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.



A curva de DSC para mistura física apresenta dois eventos endotérmicos, o primeiro com T_{pico} de 52°C, $T_{inicial}$ de 42°C e ΔH de 59,9J/ relacionada com a fusão do P-407 e o segundo com T_{pico} de 83,3°C e ΔH de 16,6J/g associado à fusão do artemeter; essa mistura também revelou evento de liberação de energia com T_{pico} de 182°C, $T_{inicial}$ de 140°C e ΔH de 479J/g (Figura 22 e Tabela 17). Nota-se que o valor de entalpia encontrado para o evento de fusão do artemeter na mistura física 1:1 (artemeter/poloxamer 407) apresentou valor menor (ΔH=16,6 J/g) que aquele que era esperado (Figura 22). O valor encontrado para o início extrapolado desse evento endotérmico ($T_{inicial}$) também se mostrou menor (62°C) que o valor esperado (Tabela 17).

Mudanças observadas, como alargamento e/ou deslocamento do pico endotérmico de fusão, no perfil térmico do artemeter na curva DSC (mistura física), demonstrado pelos valores de T_{inical}, T_{pico} e entalpia, não mostraram necessariamente a incompatibilidade desse fármaco com o poloxamer 407. Porém, demonstraram a ocorrência de forte interação entre ambos em função do aquecimento. Sendo assim, na curva DSC da mistura física 1:1 entre o artemeter e poloxamer 407, o evento de fusão do artemeter apresentou variação de entalpia (13,7 J/g), fato que pode ser atribuído à dissolução da maior parte do artemeter no próprio excipiente.

De forma similar, Ei-Badry e colaboradores (2013) relataram o efeito do poloxamer 407 na diluição de nimesulide em dispersões solidas. Tal resultado foi atribuído à ausência do evento endotérmico de fusão característico de nimesulide (T_{pico} de 149°C), revelando a perda da estrutura cristalina do fármaco (LEUNER; DRESSMAN, 2000). Milne e colaboradores (2015) determinaram a miscibilidade da zopiclona e PVP-25 empregando diferentes proporções de zopiclona e PVP-25. A análise foi realizada por meio da observação da redução da altura do pico de fusão em relação ao incremento na concentração do PVP-25. Esses autores relatam que a fusão de fármaco puro acontece a temperatura na qual o potencial químico do fármaco cristalino é igual ao potencial químico do fármaco fundido. Assim, é possível observar o fenômeno da miscibilidade entre o fármaco e o polímero (parte do fármaco embebido na matriz polimérica sofre amorfização). O potencial químico dessa mistura deve ser menor que o potencial químico do fármaco puro resultando em diminuição do ponto de fusão. Porém, se existe imiscibilidade, não deve ser observada

depressão do ponto de fusão uma vez que o potencial químico do fármaco fundido é inalterado na presença do polímero. (MILNE; LIEBENBERG; AUCAMP, 2015).

Tabela 17. Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, P-407 e mistura física.

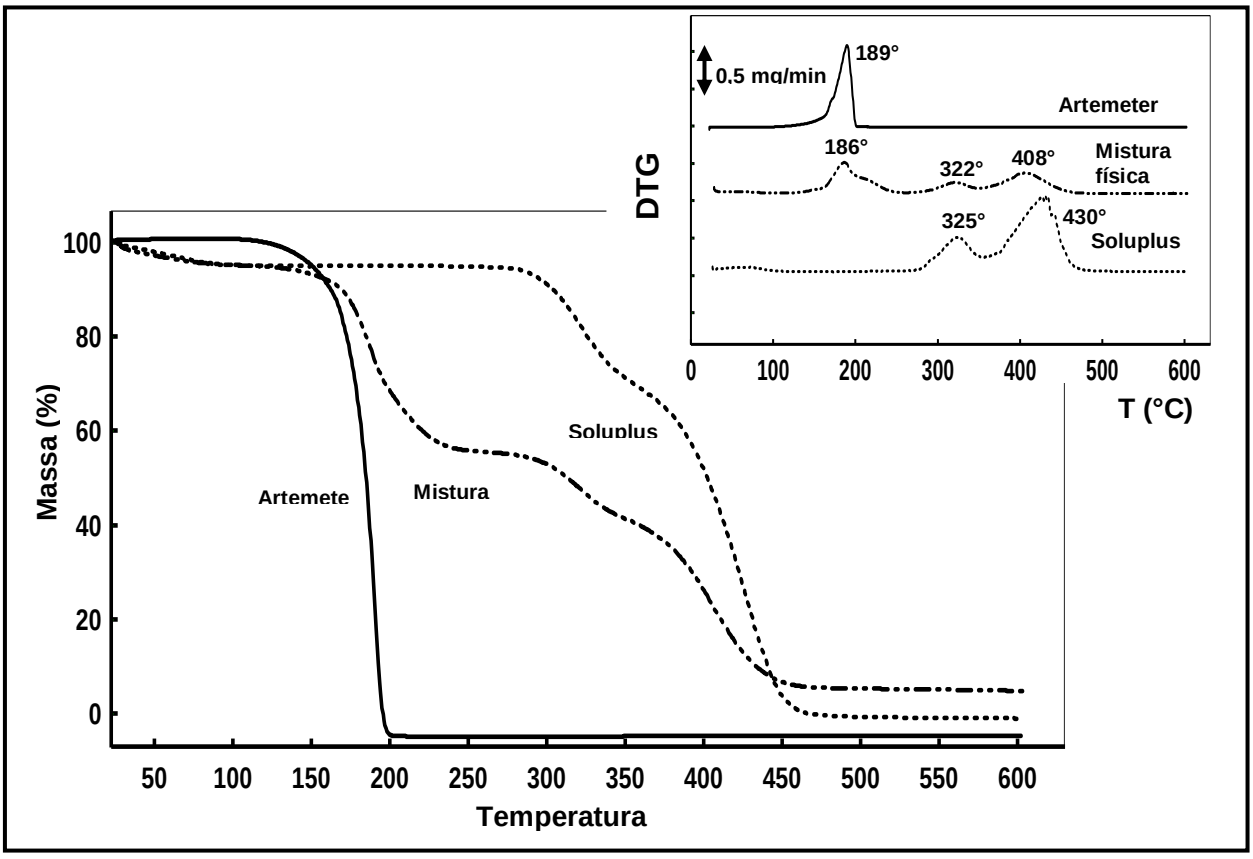
Amostra	Evento Térmico	$T_{inicial}$ (°C)	T_{pico} (°C)	ΔH (J/g)
Artemeter	Endotérmico de fusão	83	85	60,6
	Exotérmico de decomposição	164	179	740
P-407	Endotérmico de fusão	42,8	51,6	141
	Exotérmico de decomposição	150	158	36,9
Mistura física (artemeter/P-407)	Endotérmico de fusão (P-407)	42	52	59,9
	Endotérmico de fusão (artemeter)	62	83,3	16,6
	Exotérmico de decomposição	140	182	479

5.4.4. Polivinil caprolactama – acetato de polivinilo – polietilenglicol copolímero (Soluplus®)

A Figura 26 apresenta as curvas TG/DTG do artemeter, soluplus® e mistura física (artemeter/soluplus®). Essas curvas, obtidas a 10°C min^{-1} em atmosfera dinâmica de N_2, indicam que a amostra do soluplus® é estável termicamente até aproximadamente 120°C, observando-se entre 26,3 e 104,7°C perda de massa (Δm_1 = 5%) devido à desidratação da espécie, seguido de processo de decomposição térmica, em duas etapas. A primeira etapa entre 250 e 355°C (Δm_2 = 25%) e a segunda entre 356 e 481°C (Δm_3 = 70%). Segundo Repka e colaboradores (2013), polivinil lactamas são termicamente estáveis devido a sua estrutura lactama. Frequentemente, as temperaturas de degradação para esses polímeros são aproximadamente de 200°C. Dessa

maneira, o soluplus® a 250°C, entre os polímeros testados, pode ser considerado a espécie termicamente mais estável (REPKA; LANGLEY; DINUNZIO, 2013).

Figura 26. Curva TG/DTG do artemeter, soluplus® e mistura física artemeter/soluplus®, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.



A amostra da mistura física (artemeter/soluplus®) revelou o mesmo comportamento térmico observados nos componentes isoladamente, com um total de quatro perdas de massa: a primeira entre 26 e 113°C (Δm_1 = 25%) devido à perda de agua superficial do soluplus®, a segunda entre 113 e 253°C (Δm_2 = 40%) relacionada à decomposição térmica do artemeter, a terceira entre 254 e 355°C (Δm_3 = 40%) e a quarta entre 356 e 481°C (Δm_4 = 40%) correspondente as duas etapas de decomposição térmica do soluplus® (Tabela 18).

Tabela 18. Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, soluplus® e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.

Amostra	ΔT (°C)	Δm (%)
Artemeter	110 - 205	100
Soluplus®	26,3 - 104,7	5
	250 - 355,3	25
	356 - 481	70
Mistura física (artemeter/soluplus®)	26 - 113	5
	113 - 253	40
	254 - 355	15,3
	356 - 481	34,9

A Figura 27 apresenta as curvas DSC do artemeter, soluplus® e mistura física. Observa-se que na curva DSC do soluplus® não existe evento endotérmico de fusão característico da espécie. Tal resultado pode ser fundamentado na estrutura amorfa do polímero. Para estruturas amorfas, como no caso do copolímero soluplus®, observa-se uma temperatura denominada temperatura de transição vítrea (T_g'). Em temperaturas abaixo da T_g', a matriz polimérica assemelha-se à um vidro, comportando-se como um sólido amorfo, duro e frágil. De forma contrastante, em temperaturas acima da T_g' o mesmo polímero torna-se macio aumentado sua viscosidade e mobilidade (KANAUJIA et al., 2015). O valor da temperatura de transição vítrea para esse copolímero é de aproximadamente 70°C (LIU et al., 2012).

A curva de DSC para mistura física apresentou dois eventos térmicos: o primeiro com T_{pico} de 82,5°C, $T_{inicial}$ de 78,9°C e ΔH de 24,9J/g relacionada com a fusão do artemeter e o segundo com T_{pico} de 182°C e ΔH de 370J/g associado à decomposição do fármaco (Figura 24). Na curva DSC da mistura observou-se o decrescimento da ΔH (24,9J/g) e da altura do evento de fusão do fármaco. O valor observado para o início extrapolado desse evento endotérmico ($T_{inicial}$) também se mostrou menor (78,9°C) que o valor esperado. Como mencionado

anteriormente, a miscibilidade de fármacos com alguns polímeros resulta em depressão do pico de fusão do fármaco embebido na matriz polimérica, tornando-o parcial ou completamente amorfo (MILNE; LIEBENBERG; AUCAMP, 2015). Sendo assim, na curva DSC da mistura física 1:1 entre o artemeter e soluplus®, o evento de fusão do artemeter apresentou variação de entalpia (5,4J/g) devido ao efeito de dissolução de uma pequena porcentagem do artemeter no próprio excipiente.

Moravkar e colaboradores (2016) desenvolveram dispersões amorfas de artemeter com diferentes polímeros hidrofílicos via *spray dried*. Esses autores relataram que o calor de fusão (ΔH) do fármaco nas dispersões sólidas depende da concentração do polímero e das condições do processo como a temperatura de entrada e a velocidade de alimentação. No presente trabalho, a temperatura de fusão do artemeter diminuiu com o aumento da proporção do polímero. Além disso, esses autores relataram que o calor de fusão (ΔH) é proporcional à porcentagem de cristalinidade das amostras (MORAVKAR et al., 2016).

Figura 27. Curvas DSC do artemeter, Soluplus® e mistura física artemeter/Soluplus®, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

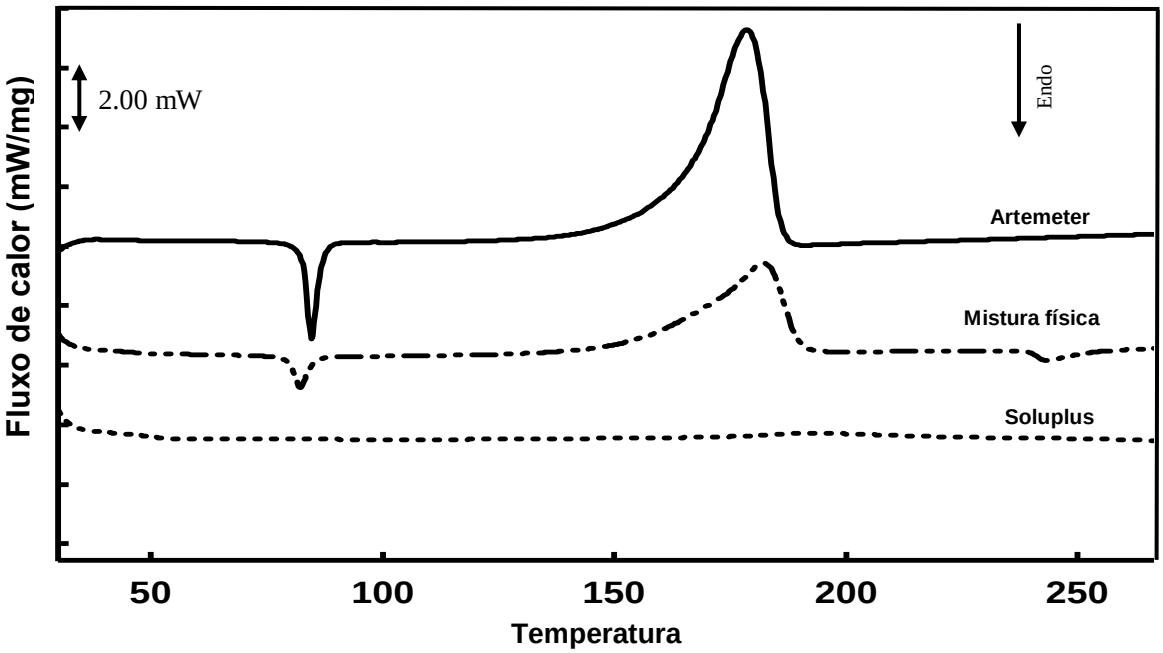


Tabela 19. Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, Soluplus® e mistura física.

Amostra	Evento Térmico	$T_{inicial}$ (°C)	T_{pico} (°C)	ΔH (J/g)
Artemeter	Endotérmico de fusão	83	85	60,6
	Exotérmico de decomposição	164	179	740
Mistura física (artemeter/Soluplus®)	Endotérmico de fusão (artemeter)	78,9	82,5	24,9
	Exotérmico de decomposição (artemeter)	164	182	370

5.4.5. Manitol

A Tabela 20 apresenta os valores de variação de temperatura (ΔT °C) e variação de massa (Δm %) envolvidos no processo de decomposição de manitol, de artemeter e desse fármaco em mistura física 1:1 (massa/massa), obtidos nas curvas TG/DTG do estudo de compatibilidade fármaco/excipiente.

A Figura 28 apresenta as curvas TG e DTG para o artemeter, manitol e sua mistura física. O resultado revelou que a amostra de manitol permanece estável até a temperatura de 210 °C e apresenta perda de massa total entre a faixa de temperatura de 210 a 366 °C como apresentado na curva DTG com $T_{pico\ DTG}$ de 330°C (Figura 28). Kumaresan e colaboradores (2011) investigaram as propriedades térmicas do D-Manitol. Esses autores relataram que esse excipiente é termicamente estável até a temperatura de 300°C, e que entre a faixa de temperaturas de 300°C e 397 °C ($T_{pico\ DTG}$ de 365°C) foi observada perda de massa total (KUMARESAN; VELRAJ; INIYAN, 2011). Na curva TG da amostra originada pela associação do artemeter com o manitol na proporção 1:1 (Figura 28), foi possível observar redução da temperatura correspondente ao início do processo de decomposição térmica do manitol ($T_{inicial\ TG}$ = 204 °C).

A redução do valor da temperatura máxima que corresponde à etapa do processo de decomposição térmica do manitol também foi observada na curva

DTG da mistura física 1:1 (massa/massa), entre o artemeter e o manitol ($T_{pico\ DTG}$ = 273°C, Figura 28).

Avaliando-se de modo comparativo as curvas TG/DTG do artemeter, do manitol e da mistura física, foi possível observar que, embora o valor encontrado para $T_{pico\ DTG}$ referente ao evento de decomposição térmica do manitol na mistura tenham apresentado uma redução de temperatura igual a 57°C (em relação ao valor encontrado para o manitol avaliado isoladamente), o início do evento observado na curva TG ($T_{inicial\ TG}$) da mistura apresentou redução menos intensa (ΔT = 6°C). Dessa maneira, pode-se considerar que a mistura entre o artemeter e manitol desencadeou aumento da taxa do processo de decomposição térmica do excipiente, mas pouco influenciou na temperatura que corresponde ao seu início (Figura 28).

Figura 28. Curva TG/DTG do artemeter, manitol e mistura física artemeter/manitol, obtidas a 10 °C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL/min.

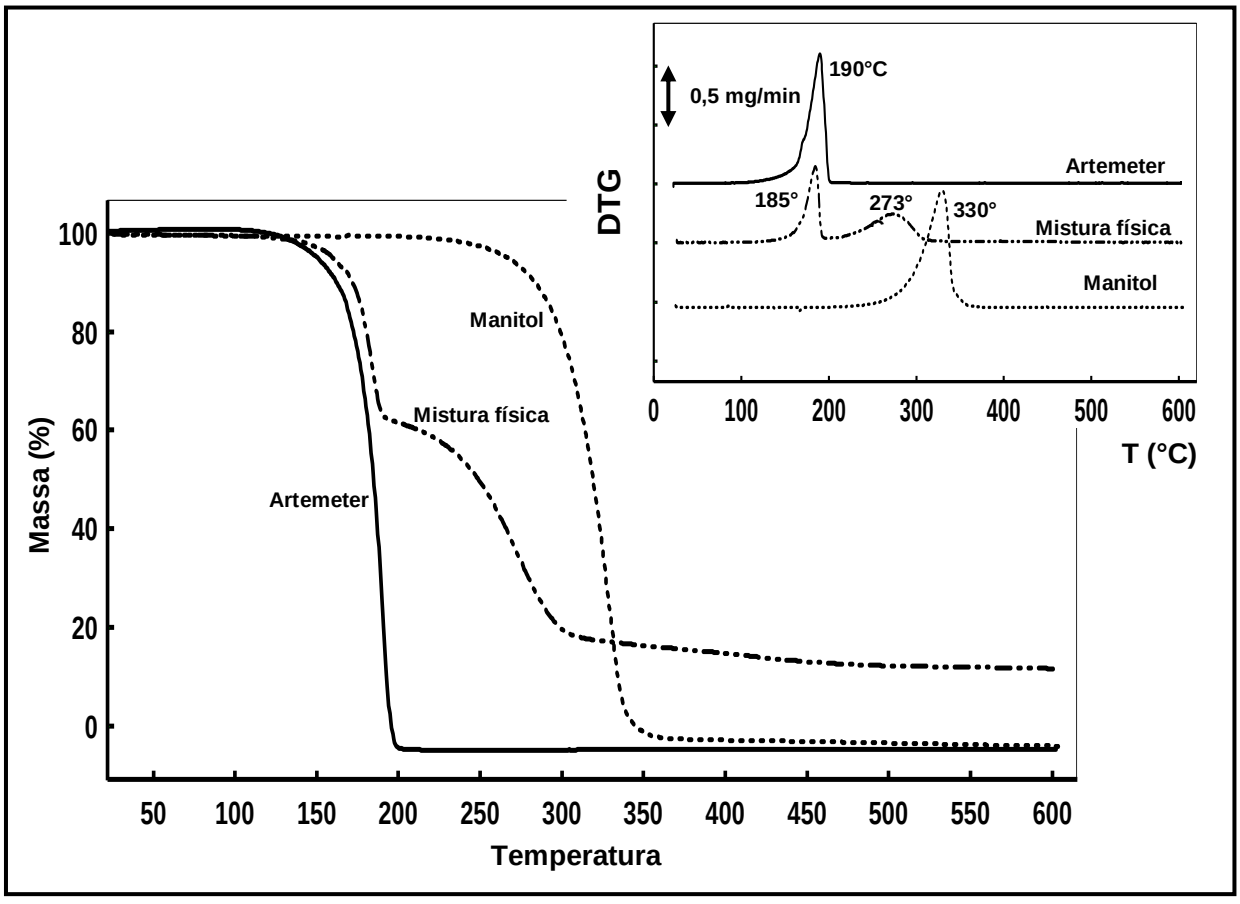


Tabela 20. Valores de variação de massa (Δm) no intervalo de temperatura (ΔT) correspondente as perdas de massa do artemeter, manitol e mistura física, a razão de aquecimento 10°C/min.

Amostra	ΔT (°C)	Δm (%)
Artemeter	110 - 205	100
Manitol	210 - 366	100
Mistura física (artemeter/manitol)	120 - 204	38,5
	204 - 570	50

A Figura 29 apresenta as curvas DSC do artemeter, manitol e mistura física artemeter/manitol. Na curva DSC do manitol pode-se observar claramente um primeiro evento endotérmico, correspondente à temperatura de fusão do excipiente (T_{pico} em 164,7°C e $\Delta H_{fusão}$ = 8,91J/g). Nessa faixa de temperatura não houve perda de massa. Na curva DSC da mistura física 1:1 (massa/massa) entre o artemeter e o excipiente manitol (Figura 29) não foi constatada qualquer alteração significativa dos valores de $T_{inicial}$ e T_{pico} do evento térmico de fusão do fármaco. O valor de entalpia (ΔH, J/g) encontrado para este mesmo evento na mistura, apresentou-se reduzido pela metade, redução esperada por se tratar de uma mistura cuja proporção é 1:1.

Figura 29. Curvas DSC do artemeter, manitol e mistura física artemeter/manitol, obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

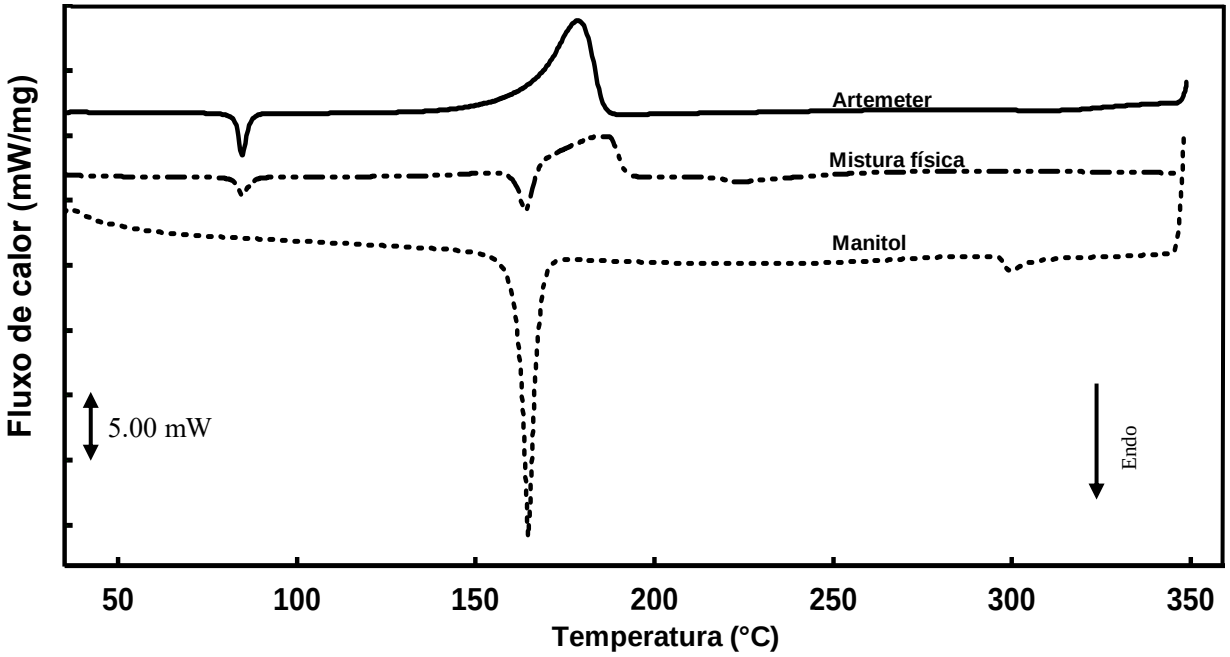


Tabela 21. Valores de $T_{inicial}$, T_{pico} e de ΔH obtidos a partir das curvas DSC a razão de aquecimento de 10°C/min para artemeter, manitol e mistura física.

Amostra	Evento Térmico	$T_{inicial}$ (°C)	T_{pico} (°C)	ΔH (J/g)
Artemeter	Endotérmico de fusão	83	85	60,6
	Exotérmico de decomposição	164	179	740
Manitol	Endotérmico de fusão	157	164,7	8,91
	Endotérmico de decomposição	294	300	48,7
Mistura física (artemeter/manitol)	Endotérmico de fusão	82	85	32,9
	Endotérmico de fusão	-	164	-
	Exotérmico de decomposição	-	185	-

5.5. Ensaios exploratórios para a obtenção de nanosuspensão de artemeter empregando o método de moagem a alta energia

5.5.1. Preparação dos nanocristais por moagem à alta energia

A concentração do fármaco é um dos fatores que influenciam no processo de redução do tamanho de partícula. Na literatura, as quantidades do fármaco usadas na formulação empregando o processo de moagem a alta energia, variam de 2 a 30% (p/p) dependendo de suas características intrínsecas, como por exemplo o peso molecular, o ponto de fusão e a energia superficial (EERDENBRUGH et al., 2009; LEE; CHOI; PARK, 2008; VAN EERDENBRUGH et al., 2007;CHOI et al., 2005; LEE, 2003, 2004; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011; YUMINOKI et al., 2012). A concentração inicial do artemeter foi 10% p/p, selecionado de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Muller e colaboradores (2011). Esses autores relatam que para concentrações iguais ou maiores a 10 % (p/p) foram observadas maior eficiência na redução do tamanho de partícula. Tal fato deve-se a maior incidência de choque mecânico entre as mesmas, melhorando o processo de nanonização.

Quanto ao veículo para a obtenção dos nanocristais de artemeter, esse foi composto por água ultrapura, hidroxipropilcelulose (0,3 % p/p) e polissorbato 80 (0,1% p/p). A seleção adequada desse veículo, também denominado sistema estabilizante, é preponderante para a homogeneidade do tamanho de partícula, assim como, para a estabilização da formulação. A dispersão adequada é caracterizada pela distribuição do tamanho de partícula, sua forma e principalmente suas propriedades interfaciais (PEUKERT; SCHWARZER; STENGER, 2005). Entre as propriedades interfaciais, a energia de superfície ou energia livre de Gibs pode explicar o fenômeno de aglomeração de nanopartículas (LEE; CHOI; PARK, 2008a).

Durante o processo de moagem, à medida que a área da superfície e a interface das partículas aumentam, a energia livre de Gibs aumenta, tornando-as termodinamicamente instáveis. Consequentemente, os nanocristais tendem naturalmente a minimizar sua energia total por meio da aglomeração. De acordo com Lee e colaboradores (2005), a estabilização de superfície compensa o aumento dramático da energia livre de Gibs relacionado a redução do tamanho

das partículas. Agentes estabilizantes geralmente revestem a superfície das nanopartículas produzindo estabilização iônica ou estérica (LEE et al., 2005).

Dessa maneira, é possível a obtenção de nanocristais com características de tamanho adequado. No presente trabalho, diferentes sistemas estabilizantes foram testados, as concentrações foram definidas conforme metodologia padronizada por Takatsuka e colaboradores (2009).

O polissorbato 80, por ser agente tensoativo não-iônico de alta hidrofilicidade, é geralmente utilizado em suspensões como agente molhante. Nesse caso, esse agente reduz a tensão interfacial entre o veículo e as partículas suspensas, facilitando a dispersão do fármaco (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007). A vantagem da utilização desse dispersante não-iônico refere-se à redução da floculação por meio da repulsão estérica (NAKACH et al., 2014).

A hidroxipropilcelulose é um polímero de hidroxipropil éter de celulose e em concentrações entre 0,25 e 1,00% (p/p) é utilizado como agente espessante, floculante e dispersante em suspensões (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

A agregação e a estabilização de nanopartículas também podem ser equilibradas com polímeros, de acordo com Peukert e colaboradores (2005). Esses autores relatam que a adsorção de polímeros na superfície das partículas pode influenciar na carga de superfície e ainda atuar como barreira estérica evitando assim contato estreito entre as partículas. Dessa maneira, é possível reduzir a coesão entre essas e impedir o processo de aglomeração (PEUKERT; SCHWARZER; STENGER, 2005).

Quando determinado agente estabilizador polimérico é utilizado no processo de moagem a alta energia, a sua adsorção física sobre a superfície do fármaco e, consequentemente, a estabilização estérica, cumpre papel importante na obtenção de nanocristais. Porém, a difusão, a adsorção e a dessorção do polímero pode ocorrer simultaneamente com a fratura mecânica do cristal tornando o processo de obtenção de nanocristais bastante complexo (LEE et al., 2005).

Nos últimos anos, os avanços em pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de nanocristais mostram que diferentes fármacos podem requerer diferentes combinações de agentes dispersantes e tensoativos para atingir o tamanho de cristal desejado. Além disso, é possível observar que diferentes técnicas de nanopulverização por revolução/rotação não apresentam

sistemas estabilizantes padronizados dificultando a sua escolha (NAKACH et al., 2014).

5.5.2. Distribuição e tamanho de partículas do artemeter pó e dos nanocristais obtidos por moagem a alta energia empregando difração a laser (DL)

Para a obtenção dos nanocristais, utilizou-se a matéria-prima com distribuição de tamanho de partícula entre 10 µm e 59 µm, conforme apresentado na Tabela 23. Após o processo de nanonização da formulação M1-MAE (Tabela 22), foi observada distribuição de tamanho de partícula entre 3 µm e 57 µm, indicando que não existe redução significativa do tamanho das partículas.

Tabela 22. Componentes da formulação M1-MAE.

Componentes	Concentração (%p/p)
Artemeter	10,00
Hydroxipropilcelulose	0,30
Polisorbato 80	0,20
água ultrapura Milli-Q® q.s.p.	100,00

Tabela 23. Valores de diâmetro médio, a 10%, 50% e 90% do artemeter pó e dos nanocristais.

Amostra	Diâmetro 10% (µm)	Diâmetro 50% (µm)	Diâmetro 90% (µm)	Diâmetro médio (µm)
Artemeter	10,813 ± 0,14	28,694 ± 0,75	58,717 ± 2,78	32,74 ± 1,22
M1-MAE	3,504 ± 0,19	14,225 ± 0,34	57,306 ± 5,72	25,01 ± 2,08

M1-MAE: Formulação 1 usando moagem a alta energia

Figura 30. Distribuição do tamanho da partícula, por difração a laser (DL), antes do processo de nanonização.

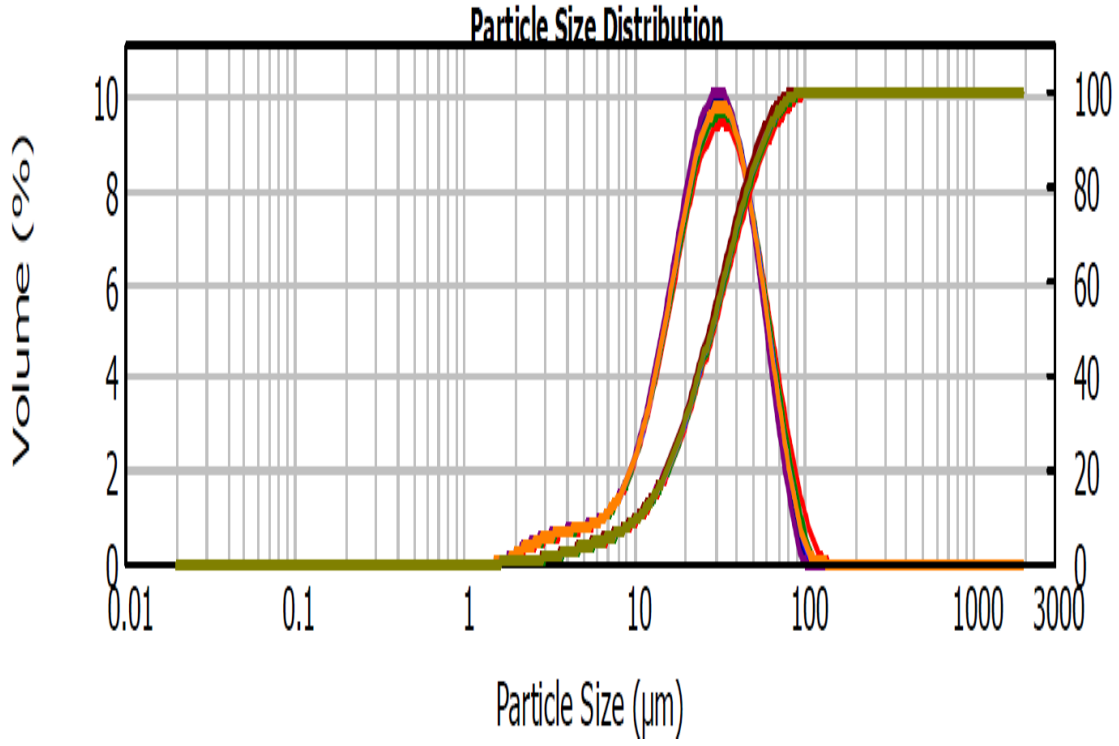
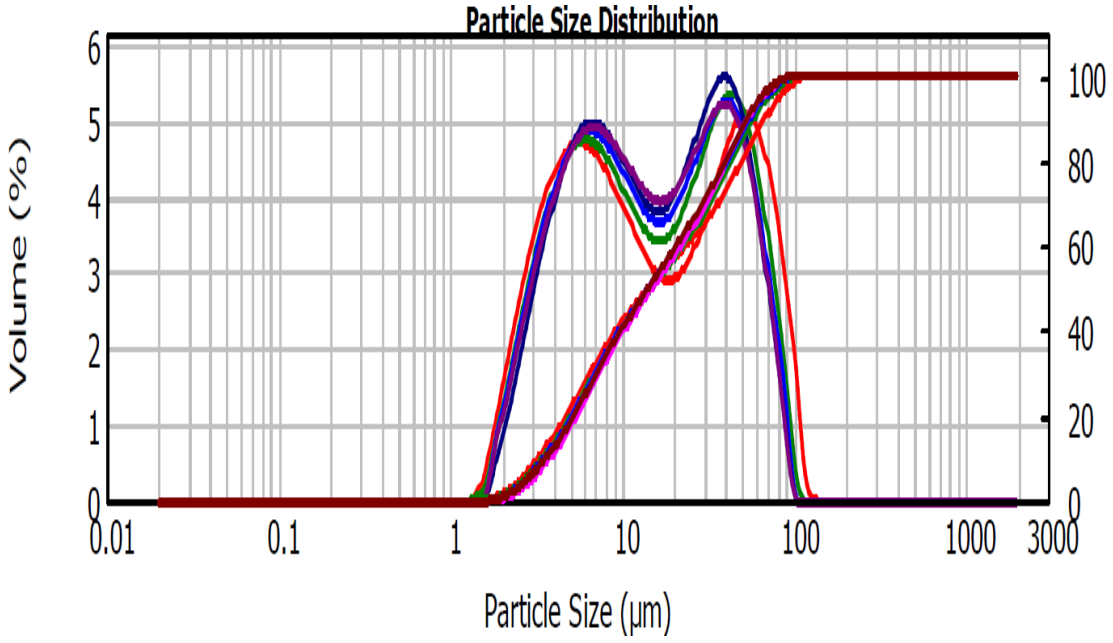


Figura 31. Distribuição do tamanho da partícula, por difração a laser (DL), após do processo de nanonização.



A Tabela 23, Figura 30 e Figura 31 apresentam a caracterização de distribuição granulométrica da matéria-prima utilizada (artemeter) e a distribuição após o processo de nanonização. Esses resultados revelaram que o processo não foi capaz de reduzir as partículas em escala nanométrica. As análises da distribuição granulométrica revelaram que, após a nanonização, 10% (D0,1) da população das partículas apresentaram diâmetro menor ou igual a 3,504 ± 0,19 µm, 50% (D0,5) menor ou igual a 14,225 ± 0,34 µm e 90% (D0,9) menor ou igual a 57,306 ± 5,72, e o diâmetro hidrodinâmico médio foi 25,01 ± 2,08 µm; não apresentando redução significativa quando comparado ao diâmetro hidrodinâmico médio da matéria-prima (32,74 ± 1,22 µm). Peltonen e Hirvonen (2010) avaliaram alguns fatores críticos no processo de moagem que influenciam na obtenção dos nanocristais. Além da quantidade do fármaco, mencionado anteriormente, os autores relatam que a velocidade de moagem (rpm), o tempo de moagem, a temperatura, a quantidade de esferas de zircônia, assim como, o diâmetro delas afetam diretamente na redução do tamanho da partícula (PELTONEN; HIRVONEN, 2010).

Takatsuka e colaboradores (2009) avaliaram esses parâmetros e otimizaram as condições para a produção de nanocristais utilizando o método de

nanopulverização por revolução/rotação. Esse autores obtiveram nanocristais de 8 diferentes fármacos SCB (Sistema de Classificação Biofarmacêutica) classes II e IV: fenitoína, indometacina, nifedipino, danazol, flurbuprofeno e probucol (TAKATSUKA et al., 2009; YUMINOKI et al., 2012).

A Tabela 24 mostra os parâmetros críticos otimizados por estes autores e que foram utilizados na produção de nanocristais de artemeter no presente trabalho.

Tabela 24. Parâmetros críticos otimizados do processo de moagem de alta energia por Takatsuka e colaboradores.

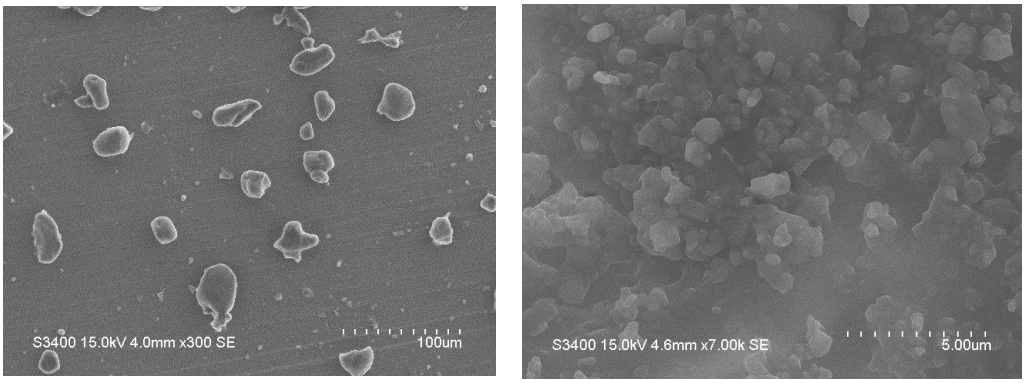
Parâmetros do processo		
Velocidade de moagem (rpm)	Primeiro passo	1500
	Segundo passo	400
Tempo de pulverização (min)	Primeiro passo	20
	Segundo passo	1
Concentração de HPC (%)		0,3
Esferas de zircônia	Diâmetro (mm)	0,1
	Massa (g)	25,0
Temperatura durante a pulverização (°C)		10

Conforme a Figura 31, não foi possível a obtenção de partícula em escala nanométrica. Tal fato deve-se, possivelmente, as características físico-químicas do fármaco. Segundo Salazar e colaboradores (2014), além dos fatores referentes ao processo de moagem (que influenciam na redução do tamanho da partícula do fármaco), existem fatores inerentes ao próprio fármaco os quais impedem a adequada redução do tamanho da partícula. Caraterísticas físico-químicas do fármaco como energia superficial, tipo e número de grupos funcionais, porosidade, estrutura do cristal, dureza, densidade e propriedades térmicas do cristal, também influenciam no processo de obtenção de nanopartículas (LEE; CHOI; PARK, 2008).

5.5.3. Análise morfológica e tamanho do cristal empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As Figuras 32A e 32B apresentam as imagens dos cristais do artemeter, antes e após o processo de nanopulverização, utilizando aumento de 300 e 7000 vezes, respectivamente. Após a nanopulverização, os cristais apresentaram tamanho de partícula maior que 1µm. Além disso, é possível observar na Figura 32b, a presença de aglomerações de cristais acima dos 5µm, indicando que existem outros fatores que influenciam no processo da redução do tamanho de partícula.

Figura 32. Cristais de artemeter antes **(A)** e após **(B)** o processo da nanopulverização

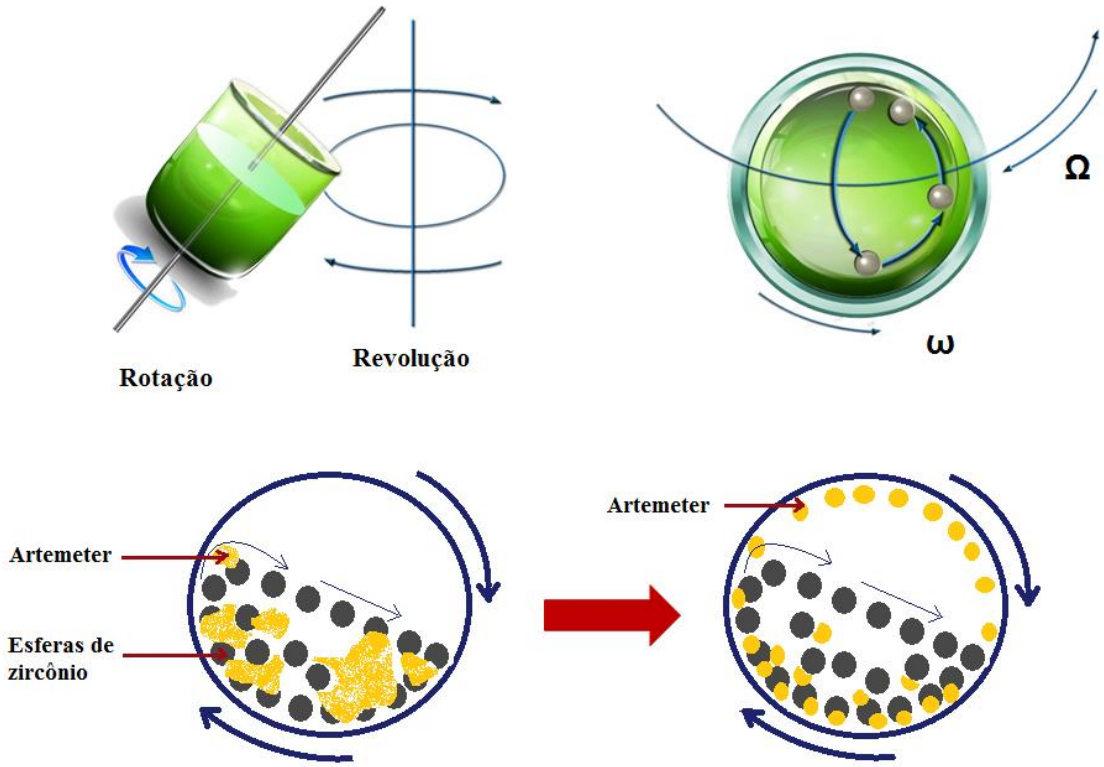


5.5.4. Determinação da densidade real do artemeter pó

Fator limitante na redução do tamanho da partícula foi a densidade do artemeter. Para Lee e colaboradores (2008), o processo de fratura de cristais de fármaco depende de dois fatores importantes: as propriedades intrínsecas dos cristais e a transferência de energia mecânica. Esse último fator envolve a viscosidade da suspensão, a energia inicial para o fracionamento, assim como, a densidade do meio de moagem e do fármaco, sendo esse último o fator com maior influência na redução do tamanho da partícula, em função do tempo (LEE; CHOI; PARK, 2008a).

O método de moagem a alta energia usado nesse trabalho para a obtenção de nanocristais foi desenvolvido por Takatsuka e colaboradores (2009). O equipamento é constituído por um recipiente de homogeneização, contendo esferas de zircônio. Os movimentos simultâneos de revolução/rotação são os responsáveis pela geração de forças centrífugas que atingem a magnitude de 400 G, e são nessas condições que as esferas produzem elevada energia de impacto e cisalhamento, permitindo a nanopulverização do material. A Figura 33 mostra o fundamento da técnica de moagem a alta energia e a sequência na redução do tamanho de partícula. No presente trabalho a redução do tamanho das partículas não ocorreu em função da baixa densidade do fármaco. Assim, não houve adequada interação das esferas de zircônia com o artemeter uma vez que esse permaneceu nas paredes do recipiente de homogeneização, conforme ilustrado na Figura 33.

Figura 33. Ilustração dos movimentos simultâneos de Rotação (ω) /Revolução (Ω) e a sequência na redução do tamanho de partícula do fármaco (adaptado de Baláž, 2008).



A Tabela 25 apresenta os valores da densidade real do artemeter, assim como, a temperatura média do teste, e a quantidade em gramas do artemeter. O resultado da densidade real do artemeter foi de 1,2335 g/cm^3. Conforme mencionado anteriormente, o método por moagem a alta energia apresenta fatores limitantes, como por exemplo, densidade do fármaco inadequada. Takatsuka e colaboradores (2009) utilizaram para a redução de partícula a técnica de moagem a alta energia, sendo que os fármacos empregados por estes autores apresentam densidade acima de 1,27 g/cm^3 (TAKATSUKA et al., 2009; YUMINOKI et al., 2012). De forma similar, nanosuspensões de fármacos empregando moagem foram desenvolvidas por Van Eerdenbrugh e colaboradores (2008). Esses autores obtiveram maior eficiência na redução do tamanho da partícula em fármacos com densidade acima de 1,30 g/cm^3.

Tabela 25. Média dos valores da temperatura, volume real e densidade real do artemeter.

Ensaio	Temperatura (°C)	Quantidade de artemeter (g)	Volume real (cm^3)	Densidade real (g/cm^3)
1	23,6		3,0884	1,2321
2	23,7		3,0822	1,2346
3	23,7	3,8053	3,0851	1,2335
4	23,8		3,0852	1,2334
5	23,8		3,0841	1,2339
Média	23,7 $\pm$ 0,083	3,8053	3,0850 $\pm$ 0,002	1,2335 $\pm$ 0,0009

5.6. Ensaios exploratórios para a obtenção de nanosuspensão de artemeter empregando o método de homogeneização a alta pressão

Nos ensaios preliminares a concentração do fármaco e dos excipientes foi a mesma empregada no método por moagem de alta energia. Embora as preparações por diferentes técnicas apresentem partículas em escala manométrica (revestidas, empregando agentes estabilizantes), a concentração de cada agente estabilizante e a eficiência da estabilização do sistema difere consideravelmente quando se utiliza os mesmos materiais, em diferentes processos de obtenção (PELTONEN; HIRVONEN, 2010). Tal fato indica que o método de estabilização, fixação e afinidade do agente estabilizante na superfície do fármaco são importantes nos processos de obtenção de nanocristais.

No processo por homogeneização a alta pressão, o tamanho dos nanocristais resultante do processo depende não só da dureza do fármaco, mas também dos parâmetros próprios do processo como, por exemplo, a pressão de homogeneização e o número de ciclos (PELTONEN; HIRVONEN, 2010). Fator crítico na redução do tamanho de partícula do fármaco, assim como, na estabilização do sistema refere-se ao calor gerado no processo de nanonização. Além disso, a alteração da estrutura cristalina do fármaco em função da elevada pressão e energia empregada, resultando em temperatura acima de 100°C, também pode ser considerado fator crítico. (KHARB et al., 2006; DURAN et al., 2010).

De acordo com Lee e colaboradores (2007), após a fusão da superfície do fármaco, a estabilização estérica por adsorção do polímero pode ser interrompida e subsequentemente a agregação pode ocorrer. Esses autores compararam e avaliaram as relações entre as propriedades de diferentes fármacos de baixa solubilidade e diversos polímeros, na obtenção de nanocristais, e concluíram, como regra geral, que os fármacos de peso molecular alto, baixa solubilidade, pontos de fusão elevados e energia superficial semelhante à dos polímeros, podem ser ótimos candidatos para obter nanocristais por método de homogeneização a alta energia (LEE; CHOI; PARK, 2008a)

5.6.1. Avaliação da viscosidade dos diferentes meios

Na prática, se observou dificuldade na obtenção de nanocristais do artemeter empregando a homogeneização a alta pressão, associada a uma baixa viscosidade da formulação. A Figura 34 mostra o Homogeneizador Pistão-gap (Nano DeBEE, BEE International, Inc. USA) empregado no presente trabalho. A Figura 35, apresenta o esquema do processo de obtenção de suspensão adequada de nanocristais. A ilustração “a” refere-se a suspensão do artemeter matéria-prima em veículo cuja viscosidade é apropriada. Essa formulação permite a recirculação constante da suspensão no equipamento. Na ilustração “b” pode se observar suspensão inadequada do artemeter matéria-prima com consequente sedimentação do fármaco impedindo a entrada da suspensão no sistema, interrompendo o processo. A Tabela 26 apresenta os resultados das viscosidades de diferentes veículos estabelecendo parâmetro ótimo de viscosidade por tentativa e erro. Assim, foi estabelecido que veículos com viscosidade acima de 35 centipoise (cP) apresentaram efeito desejável no processo, ou seja, a suspensão do artemeter matéria-prima não provocou a obstrução do sistema em função de sedimentação das partículas.

Figura 34. Homogeneizador Pistão-gap (Nano DeBEE, BEE International, Inc. USA)

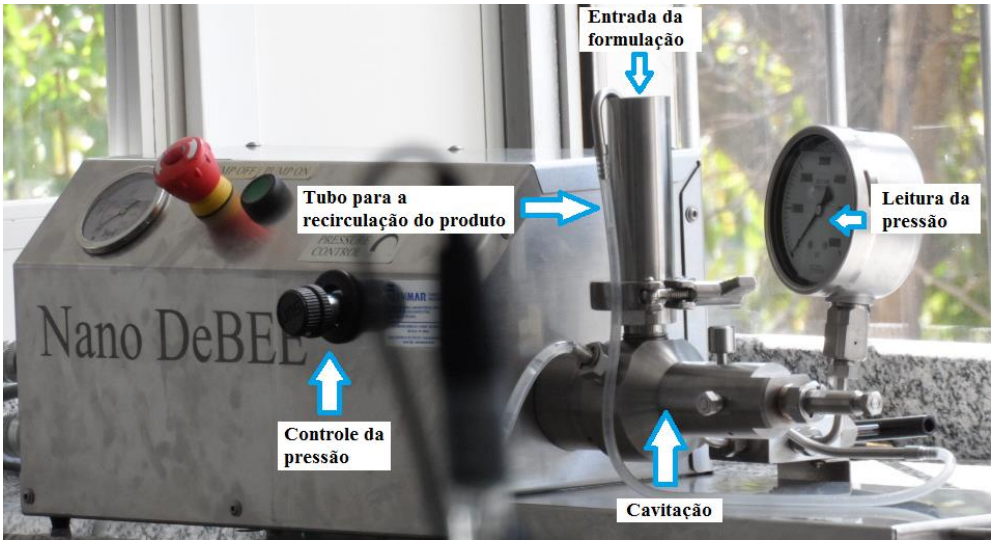


Figura 35. Esquema do diagrama do homogeneizador à alta pressão, **(a)** processo de obtenção de nanocristais do artemeter a partir de uma adequada suspensão e **(b)** não obtenção de nanocristais do artemeter por uma inadequada suspensão.

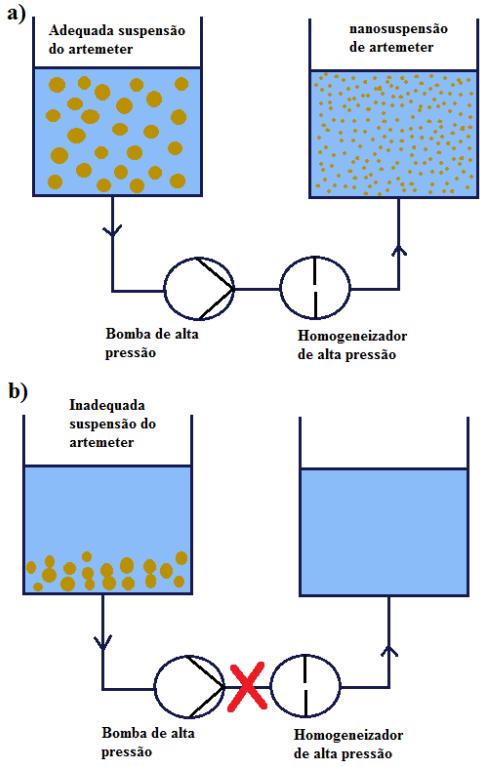


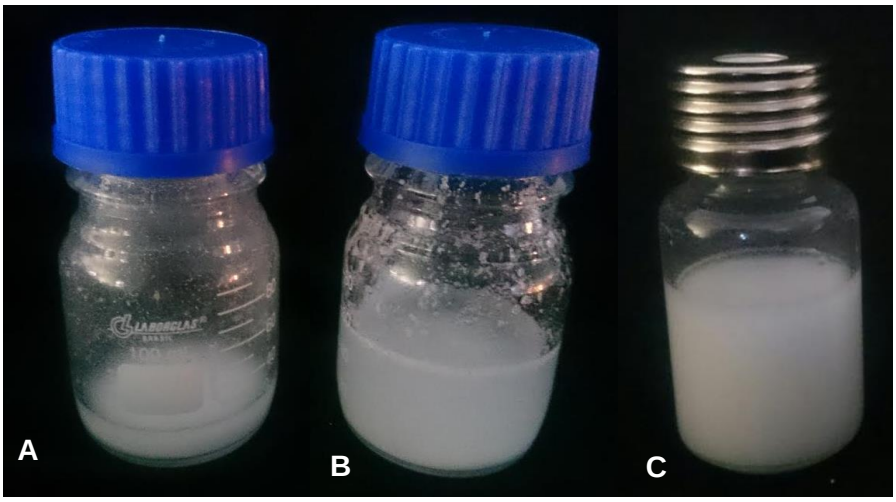
Tabela 26. Resultados por triplicata das viscosidades de diversos veículos.

Meio	Formula (%)	Quantidade (gramas)	Velocidade do *Spindle* (RPM)	Viscosidade (cP)
1	Tween 80 0,2% (p/p) Agua csp 100 mL	0,2 99,8	100	1,34 ± 0,012
2	Polaxamer 188 1% (p/p) Agua csp 100 mL	1,0 99,0	100	1,37 ± 0,013
3	Hidroxipropilcelulose 0,6 % (p/p) Agua csp 100 mL	0,6 99,4	60	2,46 ± 0,360
4	Hidroxipropilcelulose 3,5 % (p/p) Agua csp 100 mL	3,5 96,5	12	38,10 ± 0,869
5	Hidroxipropilcelulose 3,5 % (p/p) Tween 80 1% (p/p) Agua csp 100 mL	3,5 1,0 95,5	12	42,10 ± 1,715

5.6.2. Preparação dos nanocristais de artemeter por homogeneização a alta pressão

As formulações obtidas pelo método de homogeneização a alta pressão estão apresentadas na Figura 36. Observa-se a presença de aglomerados na formula H1-HAP e H2-HAP na parede do frasco, assim como, a elevada presença de precipitados. Tal fenômeno justificou o descarte dessas fórmulas. Entretanto, a fórmula H3-HAP apresentou aparência uniforme (macroscopicamente) e ausência de precipitados.

Figura 36. Suspensões de artemeter obtidas por homogeneização à alta pressão. A: H1-HAP, B: H2-HAP e C: H3-HAP.



5.6.3. Distribuição do tamanho dos cristais empregando difração a laser (DL)

A Tabela 27 e as Figura 37, 38 e 39 apresentam 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 27. Valores de diâmetro médio, d10%, d50% e d90% do artemeter matéria-prima e das formulações. n=10.

Amostra	d 10% (µm)	d 50% (µm)	d 90% (µm)	Diâmetro médio (µm)	Obscuração
Artemeter	10,813 ± 0,14	28,694 ± 0,75	58,717± 2,78	32,74 ± 1,22	15,10 ± 0,32%
H1-HAP	11,51 ± 0,90	24,79 ± 2,70	45,95 ± 1,36	26,09 ± 1,98	14,50 ± 1,11%
H2-HAP	6,53 ± 0,07	12,10 ± 0,15	23,52 ± 1,29	13,67 ± 0,41	18,80 ± 1,16%
H3-HAP	1,62± 0,01	7,38 ± 0,06	22,05 ± 0,33	9,91 ± 0,10	17,90 ± 0,79%

A distribuição granulométrica da matéria-prima utilizada (artemeter) e a distribuição após o processo de nanonização, para todas as formulações, revelaram que o processo não foi capaz de reduzir as partículas em escala nanométrica. Observou-se que após esse processo, 90% (D0,9) da população das partículas das fórmulas H1-HAP, H2-HAP e H3-HAP apresentaram diâmetro menor ou igual a 45,95 ± 1,36 µm, 23,52 ± 1,29 µm e 22,05 ± 0,33 µm, respectivamente, não apresentando redução significativa (escala nanométrica) quando comparado ao artemeter matéria prima (58,717± 2,78 µm).

Figura 37. Distribuição granulométrica da H1-HAP das suspensões de artemeter. n=10

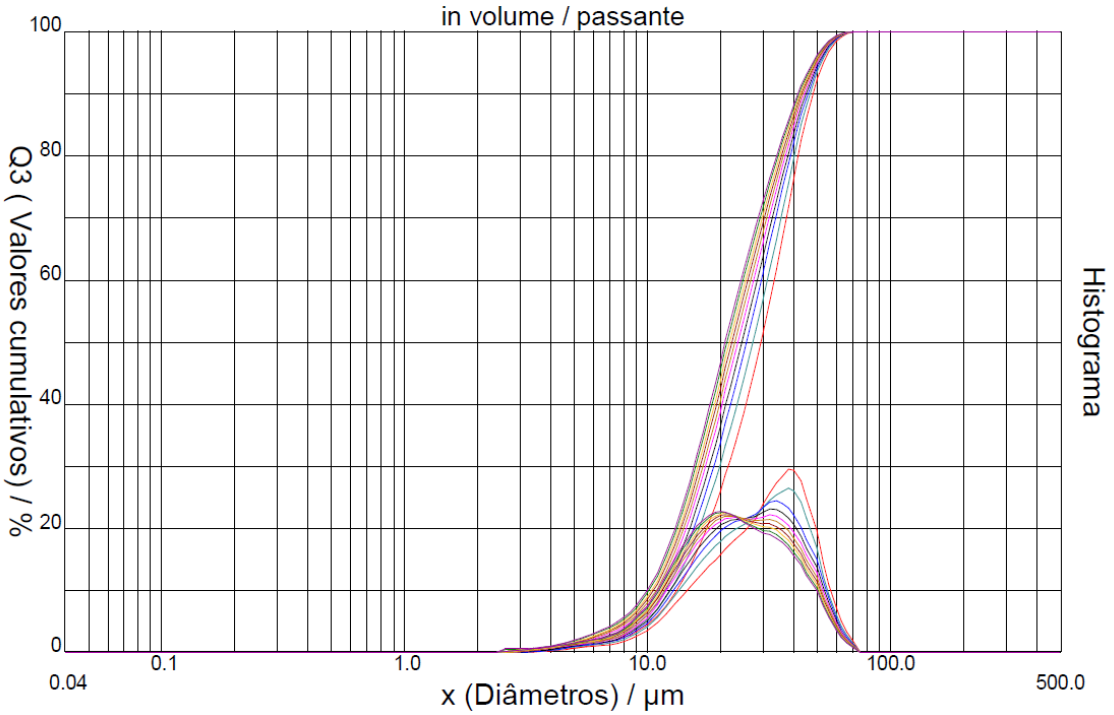


Figura 38. Distribuição granulométrica da H2-HAP das suspensões de artemeter. n=10

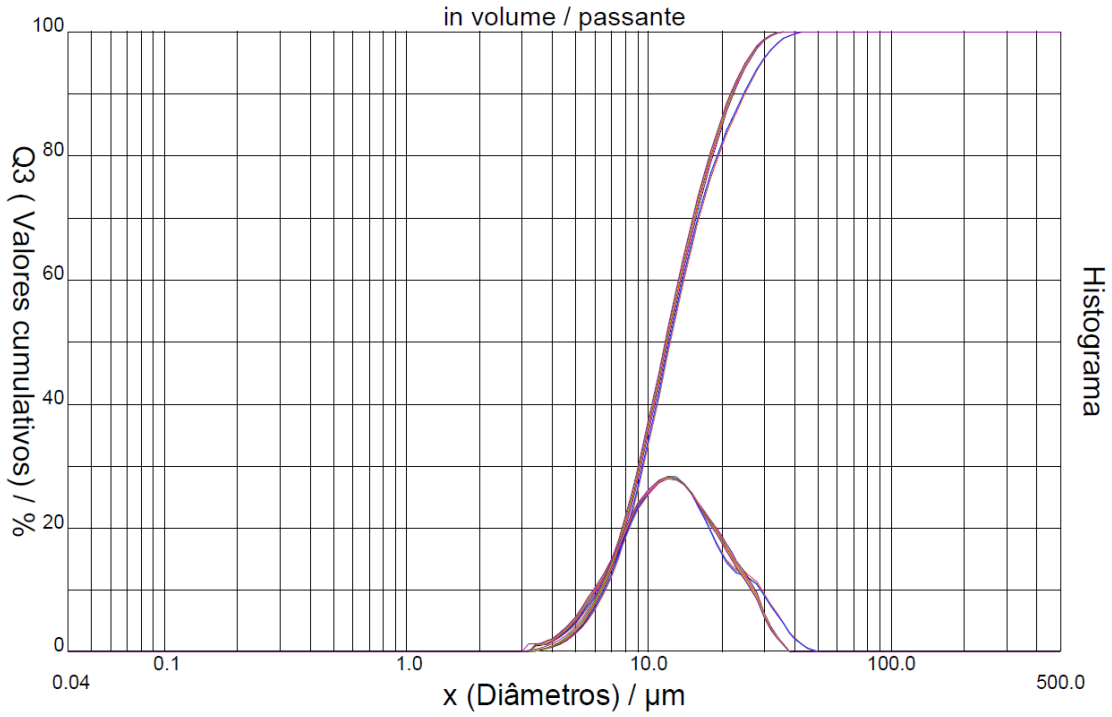
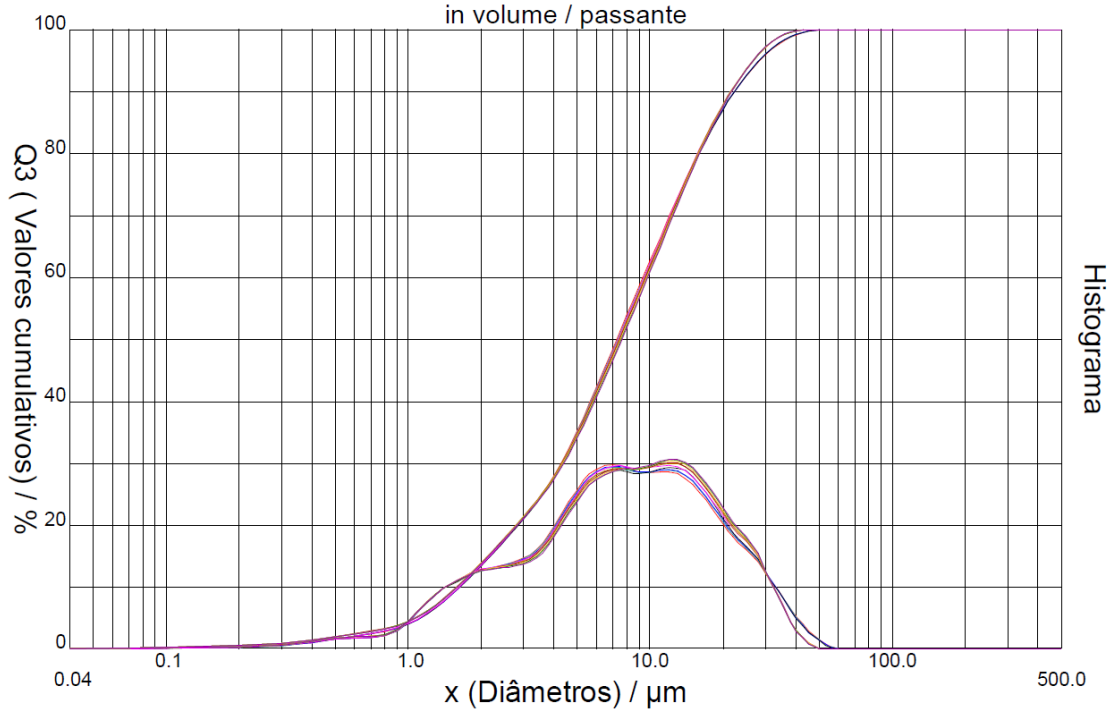


Figura 39. Distribuição granulométrica da H3-HAP das suspensões de artemeter. n=10



5.6.4. Considerações relativas ao processo de homogeneização a alta pressão

A homogeneização a alta pressão é uma das tecnologias empregadas com maior frequência na preparação de nanocristais. Esse método foi utilizado sem maior sucesso na obtenção dos nanocristais de artemeter em formulações empregando diversos tensoativos. A ineficácia na redução do tamanho de partícula foi em função principalmente das características físico-químicas do artemeter sendo a sua elevada dureza, própria da estrutura cristalina, o principal fator limitante na obtenção de nanocristais. Os tensoativos polissorbato 80, poloxamer 188 e TGPS (succinato de d-alfa tocoferol polietilenoglicol) e o polímero hidroxipropilcelulose foram selecionados com base na revisão da literatura. Além disso, as análises térmicas para todos os componentes das formulações revelaram a ausência de incompatibilidade com o fármaco. As curvas DSC e TG/DTG demostraram que os tensoativos mantiveram a característica cristalina do fármaco, não sendo observada qualquer evidência de amorfização.

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

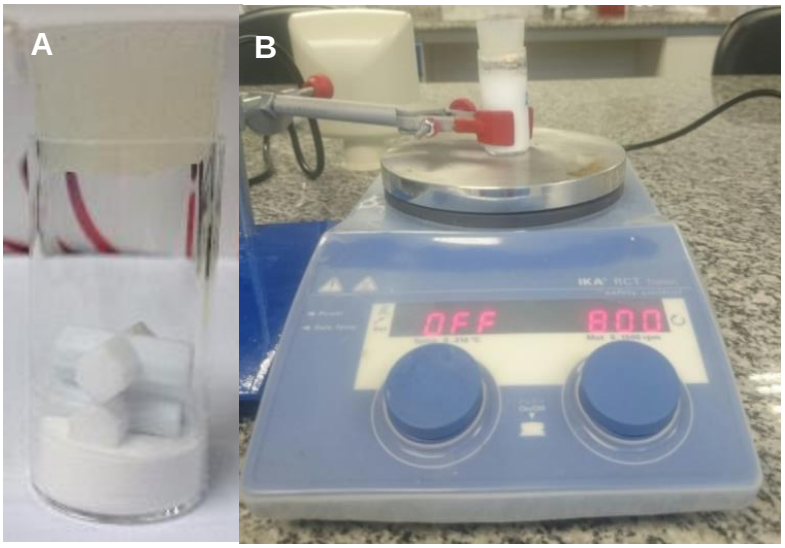
5.7. Ensaios exploratórios para a obtenção de nanosuspensão de artemeter empregando o método de moagem via úmida em escala reduzida

5.7.1. Preparação dos nanocristais empregando moagem via úmida em escala reduzida

A seleção entre os diferentes tipos de tensoativos e de sua concentração deve ser efetuada com base na sua eficiência na redução do tamanho de partícula. Dessa maneira, deve-se estabelecer o tipo e a concentração ideal, para cada sistema, assim como, avaliar as características físico-químicas do fármaco e de seu comportamento no processo de moagem. Para tanto, é necessário realizar vários ensaios, considerando as investigações preliminares de estabilidade física. Tais necessidades demandam o desenvolvimento de método *top-down,* para pequenos volumes ou em escala reduzida. Romero e colaboradores (2016) desenvolveram método *top-down* denominado "*super small scale"* ou moagem em escala reduzida e de baixo custo para a preparação de nanocristais. Para o desenvolvimento dos nanocristais esses autores empregaram frascos de vidro de 2 mL de capacidade (recipiente de moagem), uma placa de agitação magnética, barras magnéticas cilíndricas e esferas de zircônia que, em conjunto, permitem a redução do tamanho das partículas de fármacos em suspensão tais como a ciclosporina A, o resveratrol, a hesperidina, o palmitato de ascorbilo e a apigenina (concentração de 5%). Esses fármacos foram selecionados para avaliar a eficácia desse método na redução do tamanho de partículas (ROMERO; KECK; MÜLLER, 2016).

Partindo dessa proposta inovadora, esse método foi adaptado para o desenvolvimento de nanocristais de artemeter. Essas adaptações incluíram frascos com capacidade diferente (10 mL) com ligeira protuberância convexa na base do frasco, assim como, o uso de barras magnéticas em formato de cruz (Figura 40). Tais características permitiram reduzir a variabilidade do processo de redução do tamanho das partículas.

Figura 40. A: Imagem dos frascos condicionados no laboratorio para o desensvolvimento de nanocristais. B: Imagem do processo de moagem a escala reduzida.



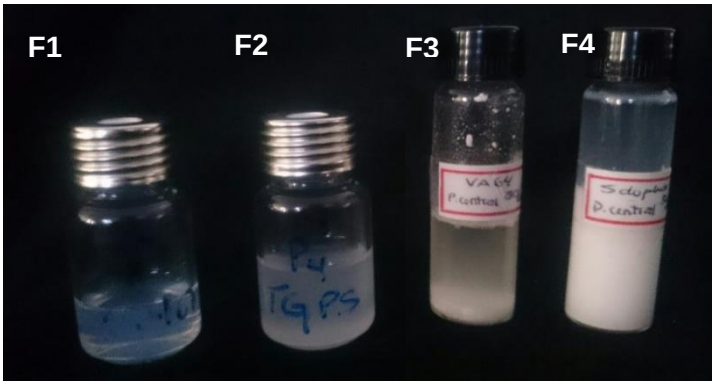
Os fatores relevantes e que influenciaram diretamente no processo foram selecionados fundamentados no conhecimento prévio do desenvolvimento da técnica. Sendo assim, foram estabelecidos parâmetros fixos no processo com o intuito de selecionar o melhor tensoativo. Esses foram: concentração de artemeter (3,0% p/p), concentração de tensoativo (2,0%p /p) e tempo de moagem (5 dias) conforme a Tabela 28.

Tabela 28. Formulações para a obtenção dos nanocristais de artemeter.

Fórmula	Artemeter (%)	Poloxamer 407 (%)	TGPS (%)	Kollidon VA64 (%)	Soluplus® (%)	Água purificada q.s.p (g)
F1	3,0	2,0	-	-	-	7,0
F2	3,0	-	2,0	-	-	7,0
F3	3,0	-	-	2,0	-	7,0
F4	3,0				2,0	7,0

A Figura 41 mostra as formulações após o processo de moagem. Pode-se observar a presença de precipitados e aglomerados na fórmula F3 correspondente ao polímero kollidon VA64 sendo descartado como possível tensoativo no desenvolvimento dos nanocristais de artemeter.

Figura 41. Formulações de artemeter obtidas por moagem via úmida em escala reduzida empregando diferentes tensoativos: F1 (poloxamer 407), F2 (TGPS), F3 (kollipor VA64), F4 (soluplus®).



5.7.2. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (IP) das formulações preliminares

A Tabela 29 e a Figura 42 apresentam os gráficos de distribuição do tamanho médio hidrodinâmico das formulações estabilizadas com os diversos polímeros obtidos anteriormente pelo método de moagem via úmida em escala reduzida. A avaliação do tamanho foi efetuada pelo método de espalhamento de luz dinâmica (DLS).

Tabela 29. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (IP) das formulações F1, F2 e F3 de nanocristais de artemeter.

Amostra	Estabilizador	DHM (d. nm)	IP
F1	Poloxamer 407	127 ± 49,4 nm 477 ± 283,1 nm	0,428 ± 0,07
F2	TGPS	137 ± 48,2 nm 1790 ± 120,0nm	0,595 ± 0,06
F4	Soluplus®	458 ± 89,0 nm	0,416 ± 0,04

O DHM para a F1, contendo poloxamer 407 como tensoativo, apresentou duas populações, a primeira foi de 127 ± 49,4 nm e a segunda de 477 ± 283,1 nm, com índice de polidispersão de 0,428. Considerando as leituras 1 hora após sua preparação, observou-se a presença de precipitados. De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de calorimetria exploratória diferencial, para a mistura física entre o poloxamer 407 e artemeter, observou-se grau de amorfização de 45,22% do artemeter, na matriz polimérica. Tal fato poderia explicar a mudança significativa do tamanho da partícula e consequentemente a sua aglomeração. Segundo Kanujia e colaboradores (2015), quando determinado fármaco amorfo é adicionado em um meio aquoso, acontecem duas etapas: a primeira, a rápida dissolução do fármaco aumentando a sua concentração no meio, e a segunda, precipitação devido a recristalização do fármaco amorfo. Desvantagem significativa dos fármacos parcialmente amorfos refere-se à instabilidade, característica da sua elevada configuração energética, consequência da conversão na forma mais estável (estado cristalino) (KANAUJIA et al., 2015). Explicação adicional para a mudança significativa de tamanho (após 1 hora) baseia-se no fenômeno de maturação, também denominado de fenômeno de Ostwald, responsável pelas alterações do tamanho e distribuição das partículas (NUTAN, REDDY, 2009). Sendo que esse fenômeno se refere ao crescimento de partículas maiores a partir de partículas menores (nanocristais).

A F2 contendo o tensoativo TGPS, derivado da vitamina E e empregado como agente estabilizante com propriedades anfifílicas, apresentou populações com tamanho de partícula acima de 1 µm e índice de polidispersão elevado (0,595). Dessa maneira, esse composto foi descartado como possível tensoativo. Nesse caso, a ineficácia na redução do tamanho de partícula se deve principalmente as características físico-químicas do artemeter sendo a sua elevada dureza, própria da estrutura cristalina, o principal fator limitante na obtenção de nanocristais.

Lee e colaboradores (2008) compararam, de forma sistemática, combinações de vários fármacos insolúveis em água com diversos polímeros. Esses autores relataram que o efeito de calor no processo de moagem pode influenciar a eficácia na redução de tamanho das partículas, para fármacos que

possuem baixo ponto de fusão. Assim, para fármacos com ponto de fusão baixo, como ibuprofeno, com $T_{fusão}$ de 76°C, foram obtidas partículas na escala micrométrica, porém para fármacos com elevado ponto de fusão, como naproxeno, com $T_{fusão}$ de 153°C, o tamanho médio foi menor que 500 nm, usando diversos polímeros como agente estabilizante (LEE; CHOI; PARK, 2008).

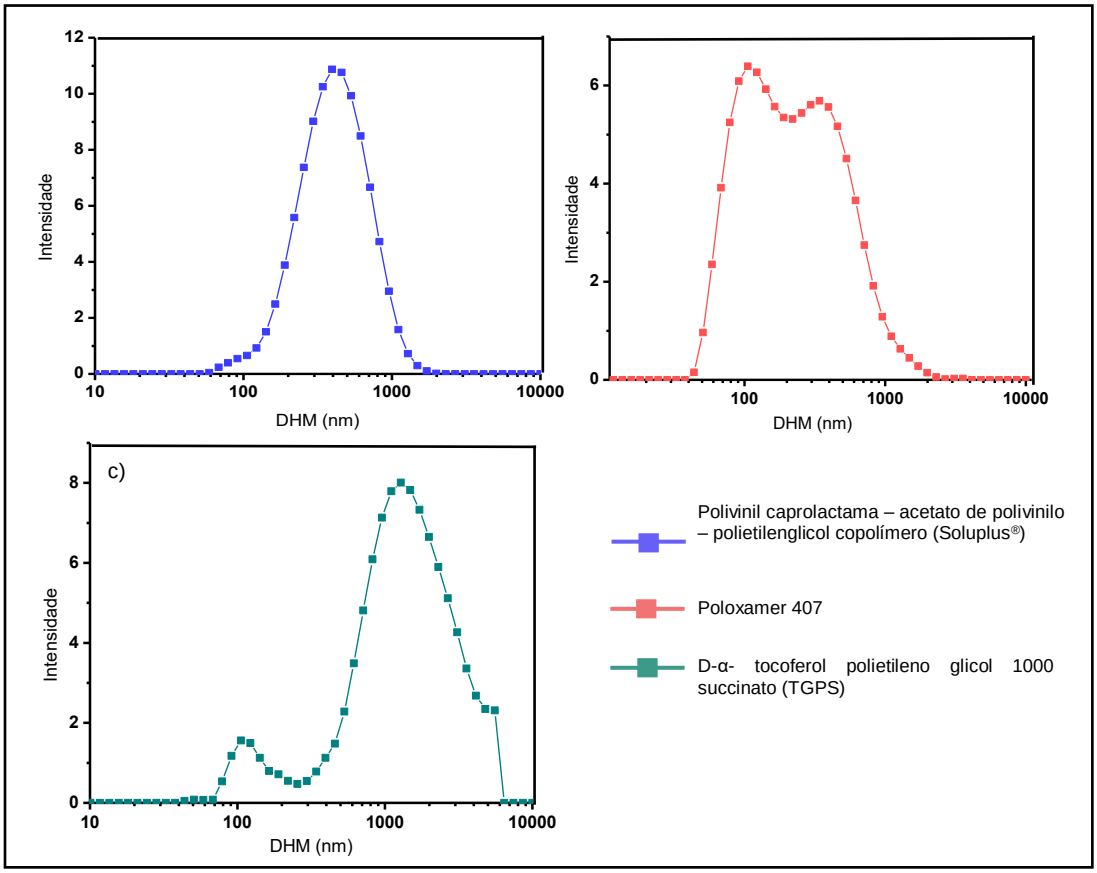
O DHM para a F4, contendo o copolímero soluplus®, foi de 458 ± 89 nm com índice de polidispersão de 0,416. O soluplus® é um copolímero formado por polivinil caprolactama (57%), polivinil acetato (30%), polietilenoglicol (13%) e aplicado principalmente nas dispersões solidas (YANG et al., 2014). Esse excipiente possui propriedades anfifílicas sendo usado para estabilizar nanosuspensões mediante a redução da energia superficial das partículas em escala nanométrica. Além disso, atua como barreira energética para prevenir a aglomeração e, como consequência, impedir o crescimento do cristal (MERISKO-LIVERSIDGE; LIVERSIDGE, 2011). Segundo Nutan e Reddy (2010), as propriedades interfaciais mais importantes na estabilidade de uma suspensão incluem a energia superficial livre e o potencial de superfície, atuando na modificação das características físicas da dispersão.

O soluplus® na nanosuspensão cumpre o papel de agente estabilizador estérico, pelo efeito de solvatação. Esse copolímero é adsorvido na superfície das partículas do fármaco por meio de dois segmentos, sendo o primeiro segmento de estabilização, que é solúvel no meio de dispersão (hidrofílico), o responsável da repulsão estérica. O segundo segmento denominado de camada de ancoragem, refere-se à porção do polímero solvatado e aderido às partículas formando uma camada fortemente ligada a elas (NUTAN; REDDY, 2010). Choi e colaboradores (2005) relataram a importância da estrutura e da massa molecular dos agentes estabilizantes, sendo o segmento de estabilização, formado pelos polímeros, suficientemente longo e denso para manter a adequada barreira estérica, capaz de minimizar a interação entre as partículas. Lee e colaboradores (2008) compararam a melhor adsorção física entre o fármaco nifedipino e diversos polímeros (hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, lutrol F127 e lutrol F68) em nanosuspensão e obtiveram melhor estabilidade para os polímeros com elevada massa molecular.

Possível explicação para a eficácia na redução do tamanho de partícula empregando soluplus® (F4), como agente estabilizante, refere-se ao grau de

amorfização mínimo do artemeter na interação com o copolímero no processo de moagem. O teste de calorimetria exploratória diferencial revelou porcentagem de amorfização do fármaco de 18,3% (proporção fármaco:polímero 1:1), indicando possível relação entre a amorfização da área superficial do fármaco e a eficácia na redução no processo de moagem. Os trabalhos de Lee, Choi e Park (2008) apresentaram as imagens por microscopia eletrônica de varredura antes e após o processo de redução do tamanho da partícula, para nanosuspensões de hidrocortisona e glimepirida, estabilizadas com diferentes polímeros (HPC, PVP e PEG). Foram observadas originalmente partículas com arestas afiadas que foram arredondadas após o processo de nanocominuição e na interação com os polímeros. Explicação adicional para o sucesso na obtenção dos nanocristais refere-se às fortes interligações moleculares entre o artemeter e o soluplus®, capaz de produzir maior adsorção o que favorece a redução do tamanho da partícula, no processo de moagem. Fule e colaboradores (2015) usaram a espectroscopia no infravermelho (IR) para investigar as possíveis interligações artemeter-polímero em sistemas de dispersão sólida pelo método de extrusão por fusão (*hot melt extrusion*). Esses autores relataram que interligações ou interação superficial entre o artemeter e o soluplus® não foram químicas. As dispersões moleculares apresentaram ligeiras mudanças de intensidades especificas em relação ao espectro IR do fármaco puro. Essas mudanças se devem as fortes interligações entre o enlace formador da ponte endoperoxido (COO-) do artemeter com os grupos aceptores de prótons (-O) do soluplus® (FULE et al., 2015). Em outro trabalho Pawar e colaboradores (2016), os estudos de modelação molecular *in silico* foram efetuados com o intuito de avaliar o ponto de ancoragem molecular entre o artemeter e diversos polímeros (HPMC, Eudragit EPO e Soluplus®). Esses autores encontraram forte interação de *van der walls* com os polímeros. No caso do soluplus®, pontes de hidrogênio foram observadas entre o oxigênio do anel oxirano do artemeter e o grupo –OH do soluplus® (MORAVKAR et al., 2016).

Figura 42. Gráfico de distribuição do diâmetro hidrodinâmico médio por DLS das formulações estabilizadas com diferentes tensoativos, soluplus® (a), poloxamer 407 (b), TGPS (c).



5.7.3. Preparação dos nanocristais empregando moagem via úmida em escala reduzida

A preparação das nanosuspensões de artemeter pelo método de moagem via úmida em escala reduzida revelou ser simples e rápida. Foi efetuado um primeiro ensaio empregando planejamento experimental por superfície reposta visando determinar as variáveis importantes do processo de moagem. Todas as formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico (DHM) e índice de polidispersão (IP) (Tabela 30). A variável esferas de zircônia (%p/p), entre as faixas de 10 e 30%, não interferiu na redução do tamanho das partículas. Além disso, foi fixado a variável revoluções por minuto (RPM). Os ensaios preliminares revelaram que para valores acima dos 800 rpm as esferas de zircônia se fragmentavam por atrito excessivo entre essas.

Tabela 30. Avaliação da agregação e sedimentação dos nanocristais de artemeter.

Formulações	Artemeter (%p/p)	Soluplus® (%p/p)	Tempo	RPM	Observação
1	2	2	5	950	Sedimentação
2	4	2	5	1250	Sedimentação
3	4	2	5	950	-
4	3	1	4	800	-
5	4	2	5	950	-
6	3	3	4	800	-
7	4	1	5	950	Sedimentação
8	4	2	5	950	-
9	5	1	6	800	-
10	3	3	4	1100	Agregados
11	3	1	4	1100	-
12	5	3	6	800	Agregados
13	3	1	6	1100	Agregados
14	4	2	3	950	Agregados
15	3	3	6	1100	Agregados
16	6	2	5	950	-
17	4	2	5	950	-
18	5	1	4	800	-
19	3	1	6	800	-
20	4	2	5	950	-
21	5	3	6	1100	Agregados
22	4	2	5	950	-
23	5	1	4	1100	Agregados
24	5	3	4	800	-
25	3	3	6	800	-
26	4	2	5	950	-
27	5	1	6	1100	Agregados
28	4	4	5	950	Sedimentação
29	5	3	4	1100	Agregados
30	4	2	7	950	-
31	4	2	5	650	-

5.7.4. Otimização do processo de produção de nanocristais de artemeter utilizando planejamento fatorial completo (2^k) para k ≥ 3 fatores

O planejamento fatorial completo permite a identificação dos fatores mais importantes que afetam o desempenho de determinado processo, também denominado caracterização de processos (MYERS, MONTGOMERY, 2004).

Os fatores e os níveis para o experimento fatorial foram selecionados a partir de um conjunto de variáveis, características do processo de redução do tamanho de partícula em escala reduzida: tempo de moagem (dias), quantidade das esferas de zircônia (mL), velocidade de agitação da barra magnética (rpm), concentração do artemeter (%p/p) e concentração do copolímero soluplus® (%p/p). Os fatores relevantes e que influenciaram diretamente no processo foram selecionados a partir de conhecimento prévio do desenvolvimento da técnica. Esse conhecimento consistiu na combinação da experiência prática adquirida no desenvolvimento do presente trabalho e no conhecimento teórico, adquirido na revisão da literatura. Os fatores relevantes foram os seguintes: tempo de moagem (dias), concentração do artemeter (%p/p) e concentração de soluplus® (%p/p).

Para o presente trabalho, foram efetuados 11 experimentos (incluindo 3 pontos centrais) correspondente ao planejamento fatorial de três fatores com dois níveis (2^3), para a avaliação da influência da concentração de artemeter (%p/p), concentração do soluplus® (%p/p) e do tempo de moagem (dias), nas seguintes resposta: diâmetro hidrodinâmico meio (DHM) e índice de polidispersão (IP).

Tabela 31. Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula e índice de polidispersão dos nanocristais artemeter da matriz de ensaios do planejamento fatorial.

F	Ordem	Ponto central	Tempo (dias)	Artemeter (%p/p)	Soluplus® (%p/p)	DHM (nm)	DHM DP	IP	IP DP
1	5	1	4,00	3,00	3,00	800	12,36	0,20	0,14
2	7	1	4,00	5,00	3,00	430	1,17	0,21	0,03
3	2	1	6,00	3,00	1,00	1460	54,30	0,37	0,09
4	10	0	5,00	4,00	2,00	386	19,47	0,20	0,05
5	11	0	5,00	4,00	2,00	333	0,95	0,18	0,01
6	6	1	6,00	3,00	3,00	825	10,50	0,57	0,02
7	9	0	5,00	4,00	2,00	317	6,71	0,15	0,02
8	3	1	4,00	5,00	1,00	386	2,44	0,11	0,05
9	1	1	4,00	3,00	1,00	1372	77,42	0,30	0,12
10	4	1	6,00	5,00	1,00	574	43,18	0,26	0,03
11	8	1	6,00	5,00	3,00	498	12,43	0,26	0,09

F: formulação; DHM: diâmetro hidrodinâmico médio de partícula; IP: índice de polidispersão; DP: desvio padrão.

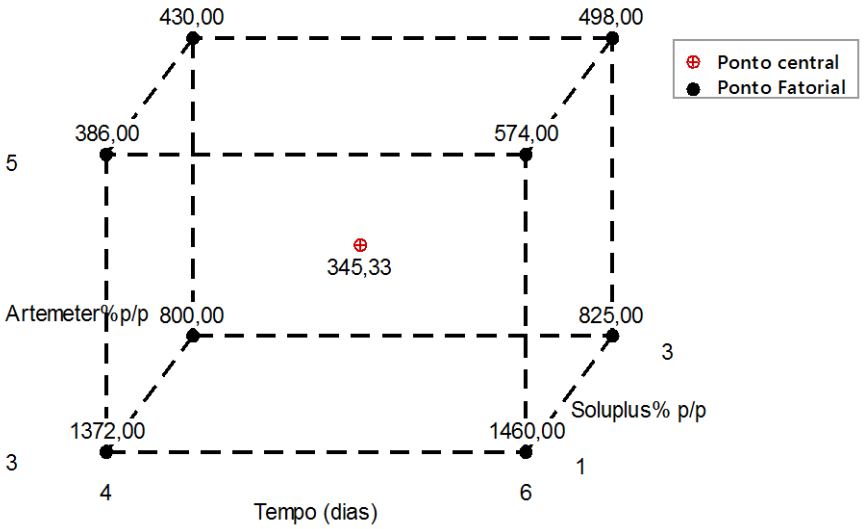
A tabela 31 apresenta os resultados de DHM e IP obtidos para os 11 experimentos. Este planejamento incluiu dois níveis para cada fator estabelecido (tempo (dias): 4 a 6, artemeter %p/p: 3 a 5% e Soluplus® %p/p: 1 a 3).

5.7.4.1. Diâmetro hidrodinâmico médio

A Figura 43 apresenta os resultados obtidos para os ensaios de redução de tamanho de partícula pelo método de moagem via úmida em escala reduzida (GREGORY et al. 2016) adaptado. Os pontos centrais foram adicionados com a finalidade de detectar possível curvatura no modelo e testar a hipóteses de linearidade dos efeitos dos fatores. De acordo a Montgomery (2001) a adição de pontos centrais a um planejamento 2^k fornece esta proteção contra os efeitos quadráticos puros (necessidade de testar se os termos quadráticos são relevantes). Além disso, com as replicações desse ponto pode-se obter estimativa independente do erro experimental.

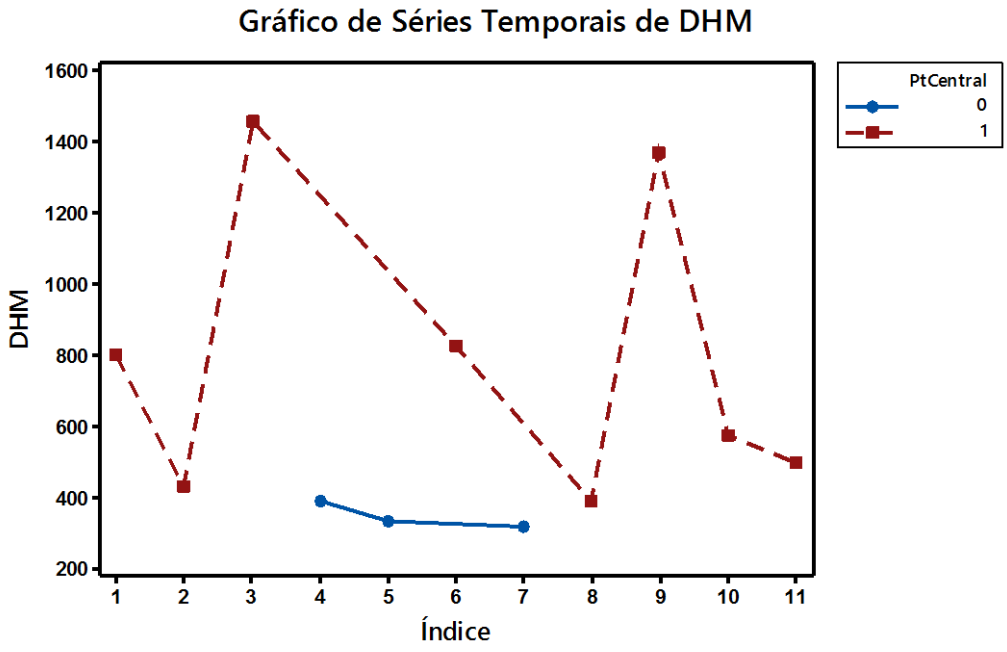
Foram observados valores de diâmetro meio hidrodinâmico de 386, 333 e 317 nm para os pontos centrais, cuja média foi 345,33$\pm$29,48 (Figura 40). Pode-se observar que o valor médio do ponto central não representa a média dos valores dos vértices do cubo (respostas do planejamento fatorial). Tal resultado indica que o planejamento fatorial 2^3 pode não ser o mais adequado para a avaliação das variáveis. Dessa maneira, será necessário testar outros modelos matemáticos com a finalidade de avaliar os efeitos reais das variáveis. Nos seguintes tópicos serão apresentados a análise de variância (ANOVA) para testar a significância do modelo, assim como, a curvatura quadrática pura.

Figura 43. Gráfico de cubo (planejamento fatorial 2^3) para tamanho hidrodinâmico meio (DHM). A resposta aparece nos vértices do cubo.



Na Figura 44 pode-se observar com maior clareza o efeito quadrático do modelo. As respostas de DHM relativas aos pontos centrais estão posicionadas na parte inferior do gráfico. No que se refere à estabilidade do ensaio, os pontos centrais apresentaram valores próximos entre si de DHM. Dessa forma, a reduzida diferença entre o maior e o menor valor de DHM (69 nm) comprova a estabilidade do ensaio.

Figura 44. Gráfico de séries temporais para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais.



A Figura 45 apresenta o gráfico de efeitos principais no diâmetro hidrodinâmico meio das partículas, nas preparações. O resultado do ensaio revelou que principalmente a concentração do artemeter e a concentração do soluplus® contribuem significativamente para a redução do tamanho de partícula. Quanto ao gráfico de interações, as linhas não paralelas (Figura 46) evidenciaram efeito de interação entre os fatores de concentração de artemeter (%p/p) e soluplus® (%p/p).

Figura 45. Gráfico de efeitos principais para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais.

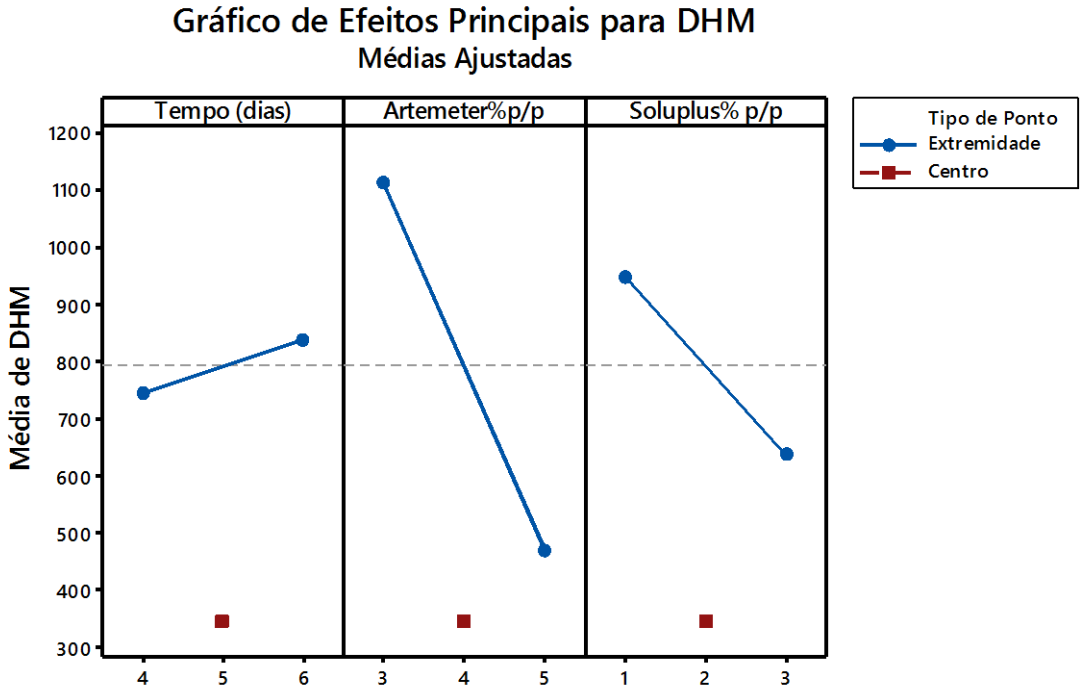
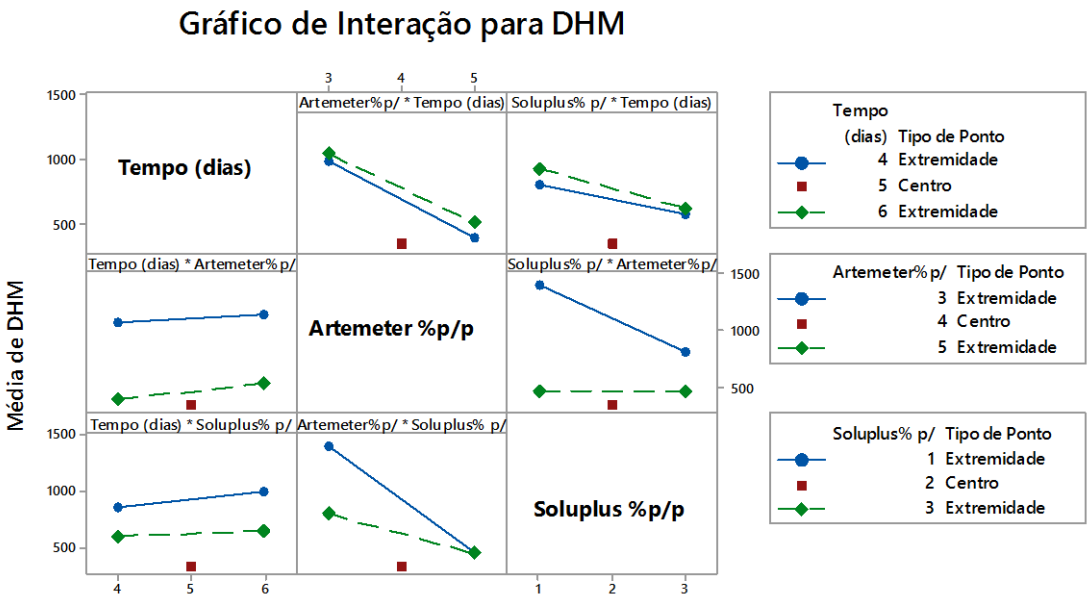


Figura 46. Gráfico de interação para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e do soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais.



Método confiável para avaliar a adequação do modelo matemático consiste na análise de variância (ANOVA). Essa permite comparar a variação devida ao tratamento (alteração nas diferentes combinações dos níveis e variáveis) com a variação devida aos erros aleatórios inerentes às medidas das respostas geradas, também chamada variância residual ou variância do erro experimental (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009, CALLEGARI, 2003). A partir dessa comparação, é possível avaliar a significância da regressão usada para prever respostas considerando as fontes de variação experimental. O modelo será bem ajustado aos dados experimentais se apresentar regressão significativa e falta de ajuste não significativa (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009, CALLEGARI, 2003).

Na ANOVA, quando valores-p (nível de significância) são menores do que 0,05 (para α=0,05), os modelos obtidos são considerados como sendo estatisticamente significativos. Isso demonstra que os termos no modelo têm efeitos significativos nas respostas.

A Figura 47 mostra o gráfico de probabilidade normal das estimativas dos efeitos do experimento na redução do tamanho de partícula. Claramente, os efeitos principais B (concentração do artemeter) e C (concentração do soluplus®) e a interação BC são significantes. A análise de variância (ANOVA), Tabela 32, confirma esse resultado, sendo seus valores-p igual a 0,002, 0,007 e 0,007 (α=0,05), para os termos B, C e BC, respectivamente. Porém, o valor-p igual a 0,003 associado à curvatura é estatisticamente significativo indicando efeito quadrático puro dos fatores e a necessidade de adoção de modelo matemático adequado para avaliar os dados experimentais.

Figura 47. Gráfico da probabilidade normal dos efeitos para DHM contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p).

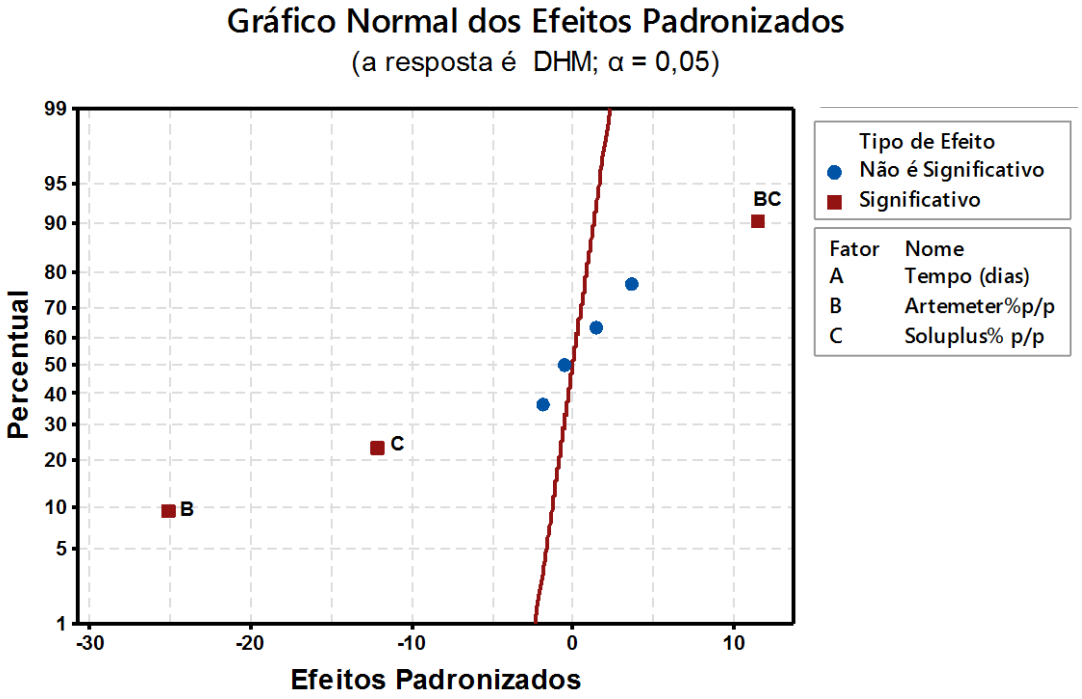


Tabela 32. Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p).

Fonte	GL	SQ (aj)	MQ (aj)	Teste F	Valor-p
Modelo	8	1651099	206387	158,23	0,006
Linear	3	1033880	344627	264,22	0,004
Tempo (dias)	1	17020	17020	13,05	0,069
Artemeter %p/p	1	824970	824970	632,48	0,002
Soluplus %p/p	1	191890	191890	147,12	0,007
Interação com 2 fatores	3	179320	59773	45,83	0,021
Tempo (dias)*Artemeter %p/p	1	2556	2556	1,96	0,296
Tempo (dias)*Soluplus %p/p	1	4186	4186	3,21	0,215
Artemeter %p/p*Soluplus %p/p	1	172578	172578	132,31	0,007
Interação com 3 fatores	1	406	406	0,31	0,633
Tempo(dias)*Artemeter%p/p* Soluplus%p/p	1	406	406	0,31	0,633
Curvatura	1	437492	437492	335,41	0,003
Erro puro	2	2609	1304	*	*
Total	10	1653708			

5.7.5. Otimização do processo de produção de nanocristais de artemeter utilizando planejamento de experimentos por superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas eficaz e poderoso para otimizar processos. Com essa metodologia, é possível reduzir o número de ensaios experimentais, economizando tempo e matérias-primas, sendo possível a identificação de interações e parâmetros críticos do processo. A metodologia envolve três etapas: (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).

Na segunda etapa do planejamento estatístico, foram adicionados 6 pontos axiais no delineamento fatorial completo (incluindo 3 pontos centrais) realizado na primeira etapa para um total de 17 experimentos (planejamento composto central). Tal procedimento teve por objetivo a avaliação da influência da concentração de artemeter (%p/p), concentração do soluplus® (%p/p) e tempo

de moagem (dias), na resposta de tamanho hidrodinâmico meio (DHM) e índice de polidispersão (IP).

A Tabela 33 apresenta os resultados de DHM e IP obtidos para os 17 experimentos. Esse método incluiu concentrações das variáveis independentes além da faixa estabelecida (pontos axiais): tempo do processo: 4 a 6 dias, artemeter %p/p: 3 a 5, Soluplus® %p/p: 1 a 3. Os resultados desses experimentos revelaram valores máximo e mínimo de DHM igual a 1800 e 317 nm, respectivamente. A concentração do artemeter mostrou-se o principal fator na redução do tamanho de partícula. Para os pontos axiais F15 e F17, foi possível perceber relação entre a elevada concentração do artemeter e o soluplus® resultando na redução do tamanho de partícula revelado pelo DHM. O sucesso do planejamento foi fundamentado na adequada escolha de faixas estabelecidas, para cada fator.

Tabela 33. Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula e índice de polidispersão dos nanocristais artemeter da matriz de ensaios de experimentos por superfície de resposta.

F	Ordem	Ponto central	Tempo (dias)	Artemeter (%p/p)	Soluplus® (%p/p)	DHM (nm)	DHM DP	IP	IP DP
1	5	1	4,00	3,00	3,00	800	12,36	0,20	0,14
2	7	1	4,00	5,00	3,00	430	1,17	0,21	0,03
3	2	1	6,00	3,00	1,00	1460	54,30	0,37	0,09
4	10	0	5,00	4,00	2,00	386	19,47	0,20	0,05
5	11	0	5,00	4,00	2,00	333	0,95	0,18	0,01
6	6	1	6,00	3,00	3,00	825	10,50	0,57	0,02
7	9	0	5,00	4,00	2,00	317	6,71	0,15	0,02
8	3	1	4,00	5,00	1,00	386	2,44	0,11	0,05
9	1	1	4,00	3,00	1,00	1372	77,42	0,30	0,12
10	4	1	6,00	5,00	1,00	574	43,18	0,26	0,03
11	8	1	6,00	5,00	3,00	498	12,43	0,26	0,09
12	14	2	3,30	4,00	2,00	800	14,32	0,45	0,03
13	12	2	6,70	4,00	2,00	799	33,70	0,22	0,12
14	17	2	5,00	2,30	2,00	1800	58,07	0,15	0,11
15	16	2	5,00	5,70	2,00	333	2,76	0,20	0,03
16	13	2	5,00	4,00	0,30	1125	89,71	0,50	0,02
17	15	2	5,00	4,00	3,70	372	1,81	0,21	0,04

F: formulação; DHM: diâmetro hidrodinâmico médio de partícula; IP: índice de polidispersão; DP: desvio padrão.

5.7.5.1. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM)

De forma similar ao fatorial completo, o modelo de segunda ordem (curvatura no sistema) será considerado bem ajustado aos dados experimentais se esse apresentar regressão significativa e falta de ajuste não significativa (MYERS, MONTGOMERY, 2009). Quanto à análise de variância, um modelo assim como os termos desse, são considerados estatisticamente significativos sempre que os valores-p forem menores do que 0,05 (α=0,05). A Tabela 34 apresenta os resultados da ANOVA para a resposta DHM. O modelo quadrático e a significância da interação entre o tempo de moagem, concentração de artemeter e concentração de soluplus®, assim como, dos termos quadráticos de cada fator, foram revelados pelo valor-p menor que 0,009 (α=0,05). O modelo obtido, portanto, foi considerado como estatisticamente significativo. Assim como a adequação do modelo, a qual foi reforçada pelo valor-p não significativo para a falta de ajuste (0,096; α=0,05).

Com referência à análise dos resíduos, a suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal e pelo histograma (Figura 48). No gráfico de probabilidade normal de resíduos, os pontos devem formar uma linha reta se os resíduos forem distribuídos normalmente. Além disso, o histograma apresenta as características dos resíduos (valores típicos, dispersão e forma). Considerando esses resultados, pode-se inferir que a suposição de normalidade é válida. Quanto ao gráfico das observações individuais, esse demonstrou a não correlação dos resíduos (aleatório). Não foi observado fenômeno de heterocedasticidade (CALLEGARI JACQUES SIDIA, 2003).

Um modelo significativo possui termos relevantes e não apresenta falta de ajuste. Entretanto, somente a ausência de falta de ajuste não significa necessariamente que o modelo é adequado. Fatores externos e não controláveis ou a omissão de variáveis importantes no experimento permitem que fração da variabilidade possa não ser explicada pelo modelo. Medida do desempenho global, como o coeficiente de determinação, indicado por R^2, deve ser avaliada. Ao mesmo tempo deve-se avaliar o R^2 ajustado, para os graus de liberdade associado. 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 não são significativamente diferentes

(Tabela 35). Portanto, para o DHM, o modelo global de segunda ordem, como expresso na Equação 2, é significativo e adequado.

Adicionalmente, o R^2 de previsão também não difere substancialmente dos valores de R^2 e R^2 ajustado. Valor maior que 0,8, para esse coeficiente, indica a probabilidade dos dados previstos (teóricos) pelo modelo serem próximos dos valores práticos. Dessa maneira, o modelo matemático poderá ser utilizado para a otimização do processo permitindo a obtenção dos resultados desejados.

Tabela 34. Análise de variância para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus (%p/p).

Fonte	GL	SQ (aj)	MQ (aj)	Teste F	Valor-p
Modelo	8	3206695	400837	41,72	0,000
Blocos	1	38357	38357	3,99	0,081
Linear	3	2331078	777026	80,87	0,000
Tempo (dias)	1	9879	9879	1,03	0,340
Artemeter %p/p	1	1857178	1857178	193,29	0,000
Soluplus® %p/p	1	464020	464020	48,29	0,000
Quadrado	3	550524	183508	19,10	0,001
Tempo (dias) * Tempo (dias)	1	164422	164422	17,11	0,003
Artemeter %p/p* Artemeter %p/p	1	511731	511731	53,26	0,000
Soluplus® %p/p* Soluplus® %p/p	1	120099	120099	12,50	0,008
Interação com 2 fatores	1	172578	172578	17,96	0,003
Artemeter %p/p * Soluplus® %p/p	1	172578	172578	17,96	0,003
Erro	8	76866	9608		
Falta de ajuste	6	74325	12388	9,75	0,096
Erro puro	2	2541	1270	*	*
Total	16	3283561			

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 35. Teste para significância dos coeficientes codificados de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação do DHM de nanocristais de artemeter contendo as variáveis: tempo de moagem, concentração de artemeter e do soluplus®.

Termos	Coeficientes	C-DP	Estatística T	Valor -p	VIF
Constante	398,6	60,8	6,55	0,000	1,09
Blocos 1	-51,8	25,9	-2,00	0,081	1,00
Tempo (dias)	26,9	26,5	1,01	0,340	1,00
Artemeter (p/p%)	-368,8	26,5	-13,90	0,000	1,00
Soluplus® (%p/p)	-183	26,5	-6,95	0,000	1,21
Tempo (dias) * Tempo (dias)	123,5	29,9	4,14	0,003	1,21
Artemeter (%p/p) * Artemeter (%p/p)	217,9	29,9	7,30	0,000	1,21
Soluplus® (%p/p) * Soluplus® (%p/p)	104,7	29,6	3,54	0,008	1,21
Artemeter (%p/p) * Soluplus® (%p/p)	146,9	34,7	4,24	0,003	1,00
DP= 98,0215 **R^2= 97,66%**	**R^2 (aj) = 95,32%**		**R^2 (prev) = 82,05%**		

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.

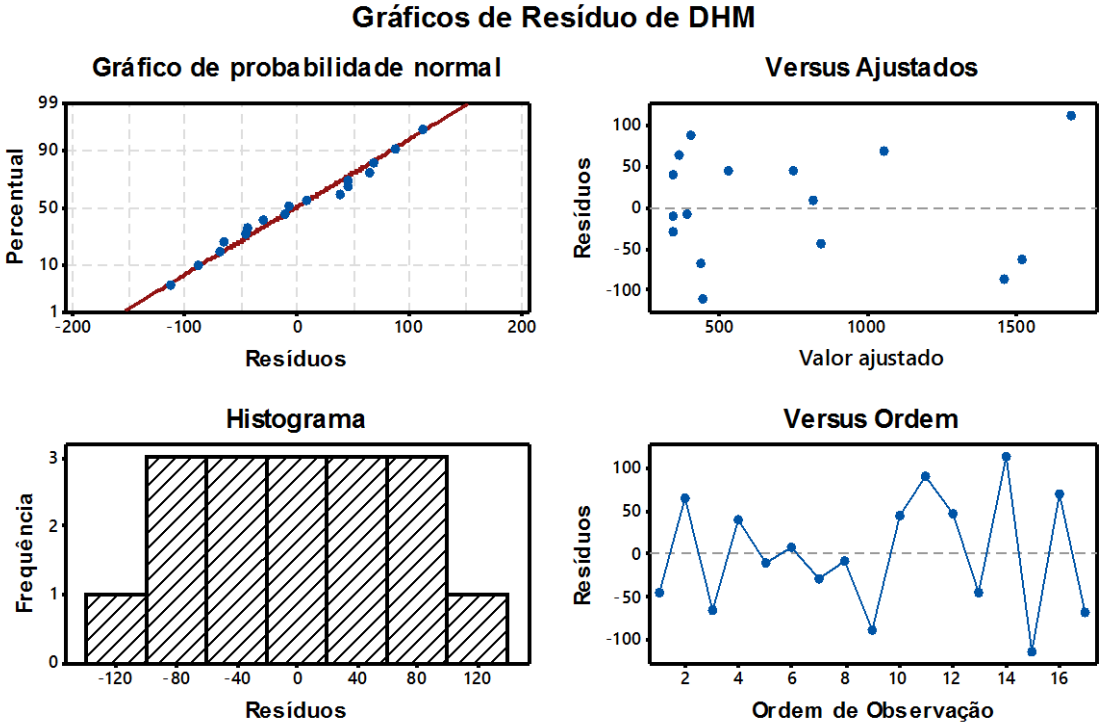
O modelo foi descrito por meio da equação 6 que relaciona a influência de cada fator, assim como, das suas interações com a resposta (DHM). Observa-se que o coeficiente para o termo concentração de artemeter %p/p (coeficiente: -2406) contribui de maneira mais eficiente para a redução do DHM se comparado ao tempo de moagem (coeficiente: -1208) e à concentração do soluplus® %p/p (coeficiente: -1190). Adicionalmente, foi observado que tanto os fatores quadráticos (tempo: T*T; artemeter %p/p: ART*ART; soluplus® %p/p: SOL*SOL) quanto a interação entre a concentração de artemeter e soluplus® (ART*SOL) resultaram em aumento do DHM (coeficientes positivos).

Equação 6

DHM= 10276 - 1208 T - 2406 ART - 1190 SOL + 123,5 T*T
+ 217,9 ART*ART + 104,7 SOL*SOL + 146,9 ART*SOL

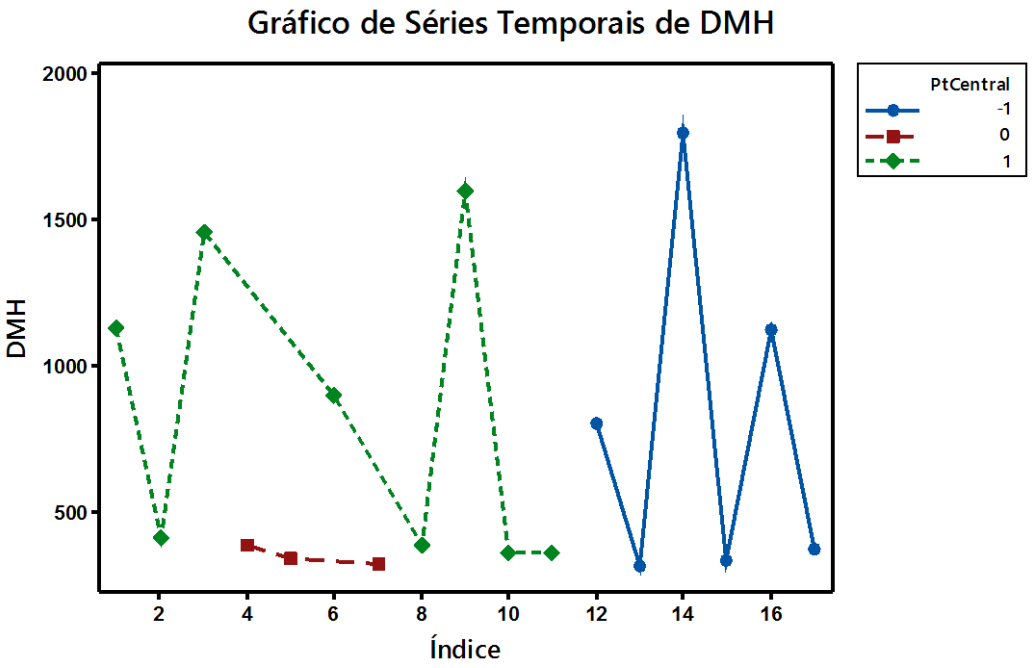
T: Tempo (dias); ART: Artemeter %p/p; SOL: Soluplus® % p/p.

Figura 48. Gráfico de resíduos para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p).



Os pontos centrais apresentaram valores iguais a 386, 333 e 317 nm (Figura 49). A replicação desses pontos centrais permite obter estimativa do erro experimental independente. Nesse caso, a diferença entre o maior e o menor valor foi de 69 nm. Esse resultado revelou reduzida variabilidade para esse ensaio.

Figura 49. Gráfico de séries temporais da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais e axiais.



A Figura 50 apresenta o gráfico de efeitos principais (tempo de moagem, concentração de artemeter e soluplus®) para o DHM dos nanocristais. O resultado do ensaio revelou que a concentração das três variáveis influenciou significativamente os valores de diâmetro hidrodinâmico médio. Quanto ao gráfico de interações, as linhas não paralelas (Figura 51) evidenciaram efeito de interação entre a concentração de artemeter e soluplus®.

Figura 50. Gráfico de efeitos principais para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p). Comparativo com os pontos centrais.

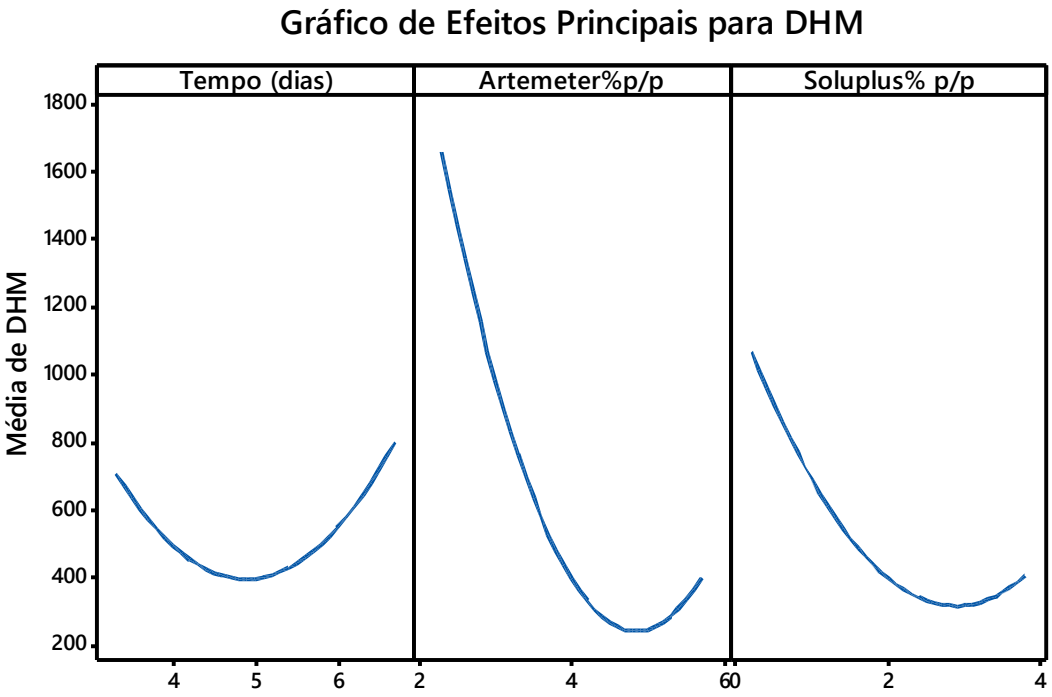
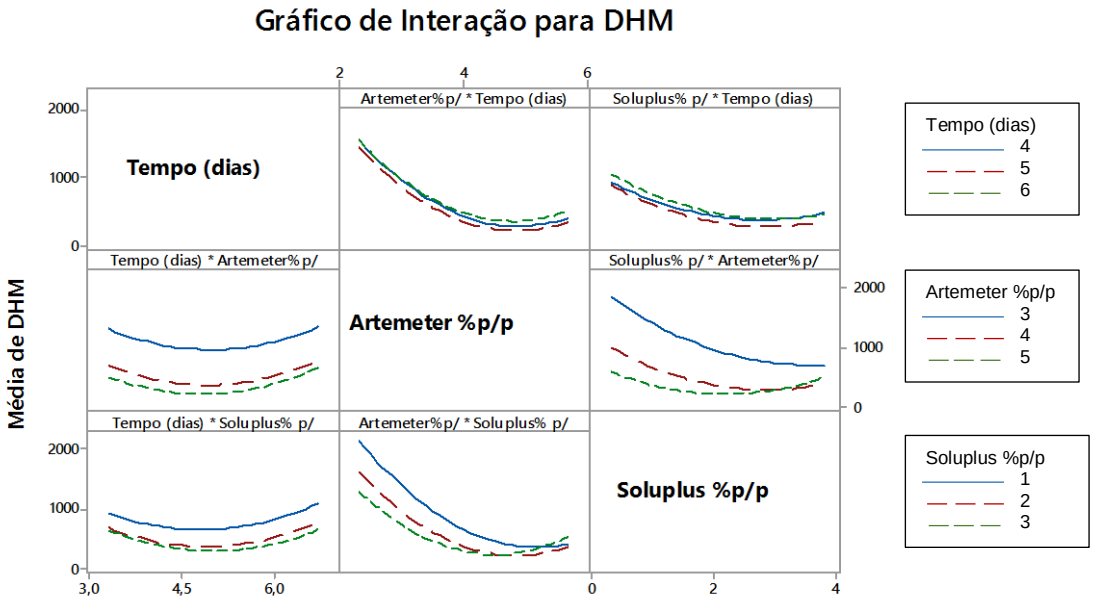


Figura 51. Gráfico de interação (efeito quadrático) para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p).



As Figuras 52 e 53 apresentam respectivamente os gráficos de superfície e de contorno para a resposta em função das variáveis independentes. A avaliação desses gráficos mostrou a região ótima para a maximização da resposta em função dos níveis de cada variável. Quando se fixaram as variáveis de tempo de moagem (5 dias), concentração de artemeter (4%p/p) e concentração de soluplus® (2%p/p), foram observados, para todos os casos, valores menores a 500 nm. Percebe-se o impacto da seleção das faixas para cada variável na resposta de DHM uma vez que valores fora dessas faixas estabelecidas origina partículas na escala micrométrica.

Figura 52. Gráfico de superfície de resposta relativa à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p).

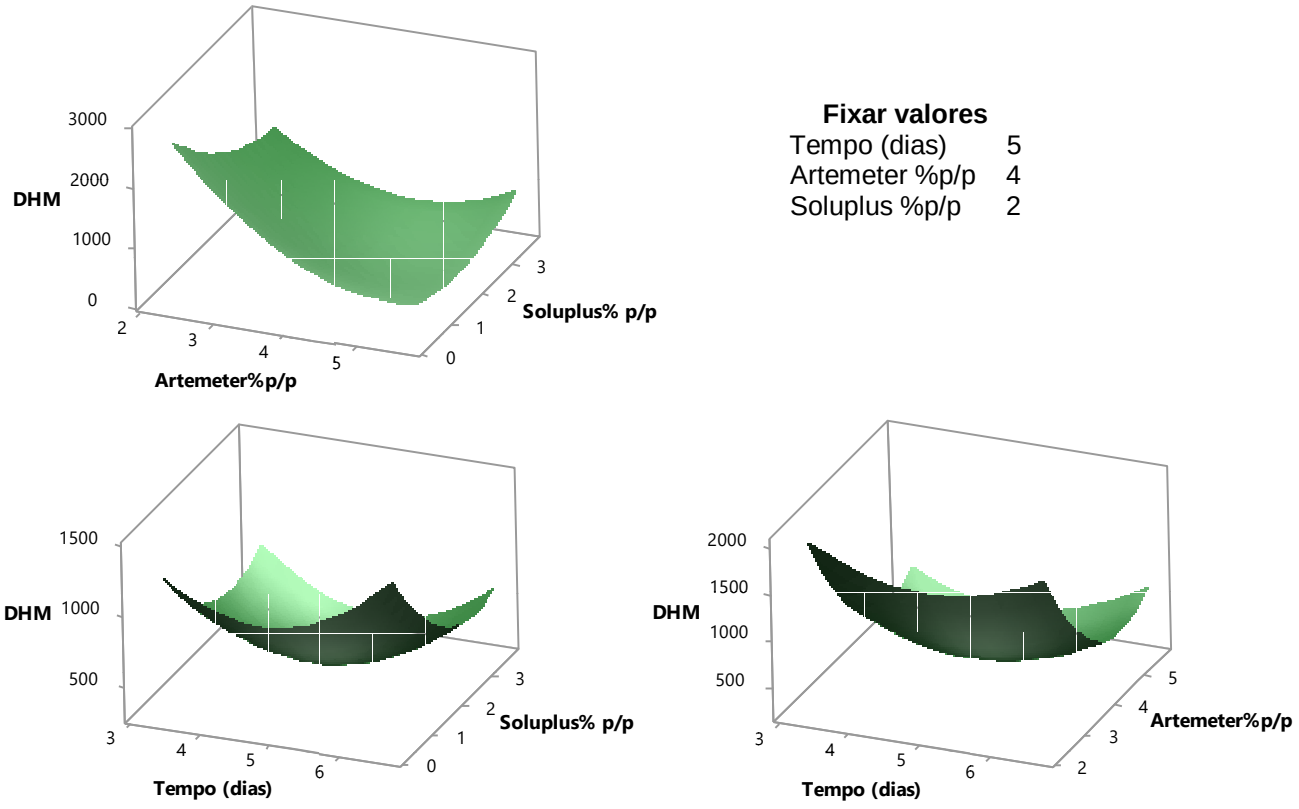
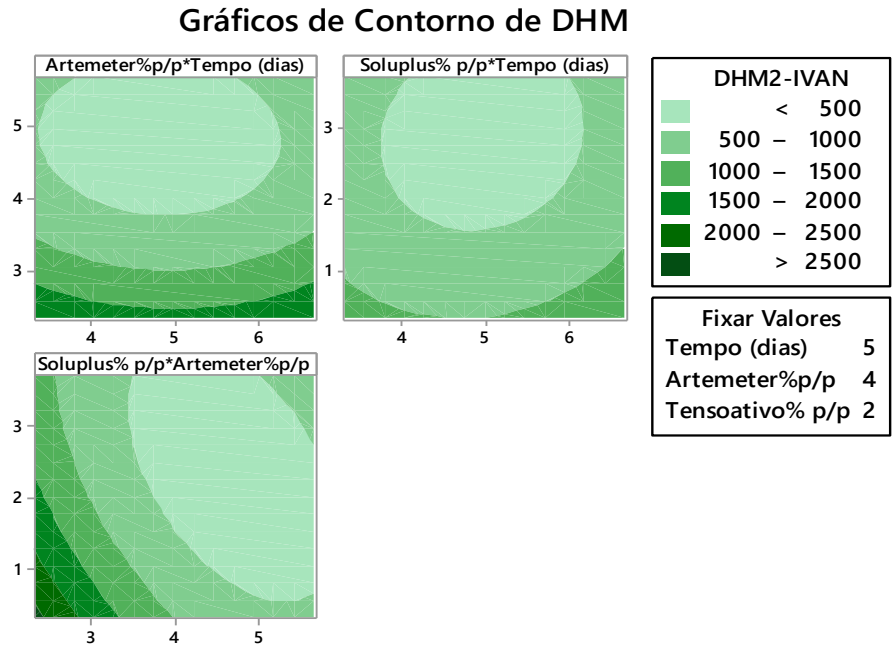


Figura 53. Gráficos de contorno relativo à da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula de nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (dias), concentração de artemeter (%p/p) e concentração do soluplus® (%p/p).



5.7.5.2. Otimização e validação do modelo matemático para o diâmetro hidrodinâmico médio

A influência do tempo de moagem, das concentrações de artemeter e do soluplus foi investigada para promover DHM ótimos. A função *desirability* é baseada em técnicas de otimização difundidas por Derringer and Suich (1980) e foi utilizada no presente trabalho. Nesta abordagem, cada resposta Y_i é convertida primeiro em uma função desirability individual d_i e que varia entre 0 e 1 ($0 \leq d_i \leq 1$). Na qual d (Y_i) = 0 representa um valor completamente indesejável de Y_i, enquanto que d (Y_i) = 1 representa um valor de resposta completamente desejável ou ideal. Os valores de d_i individuais são combinados utilizando média geométrica para dar origem a função *desirability* D geral (NATARANJAN, PERIYANAN, YANG, 2011).

As Figuras 54 e 55 apresentam os gráficos de otimização para as formulações de nanocristais de artemeter. Para a previsão de DHM igual a 446,72 nm e D: 0,95, os valores das variáveis independentes foram: tempo: 4

dias; artemeter: 4,50 %p/p e soluplus®: 1,50 %p/p. Para a previsão de DHM igual a 328,46 nm (alvo) e D: 0,45, os valores das variáveis independentes foram: tempo: 4 dias; artemeter: 4,75 %p/p e soluplus®: 2,40 %p/p.

Figura 54. Gráfico de otimização da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (4,00 dias), concentração de artemeter (4,50 %p/p) e concentração do soluplus® (1,50 %p/p). Predição para 446,72 nm: R1.

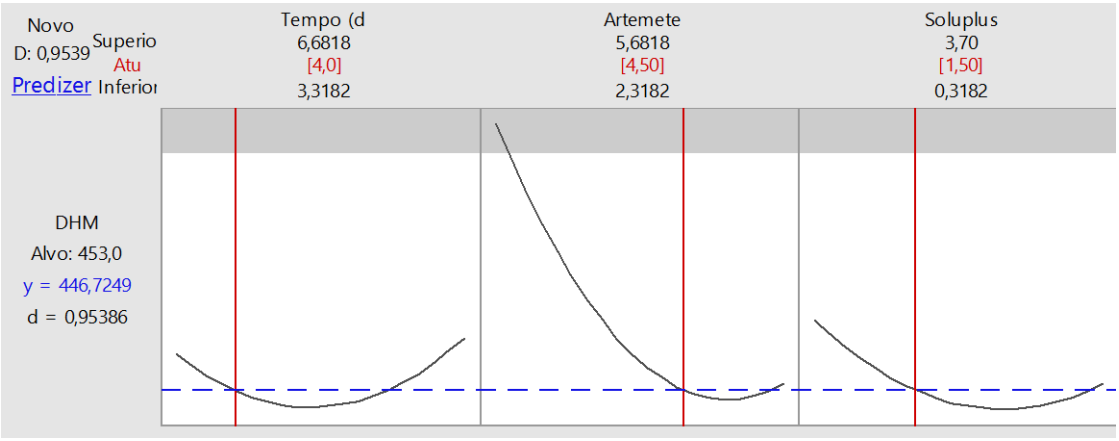
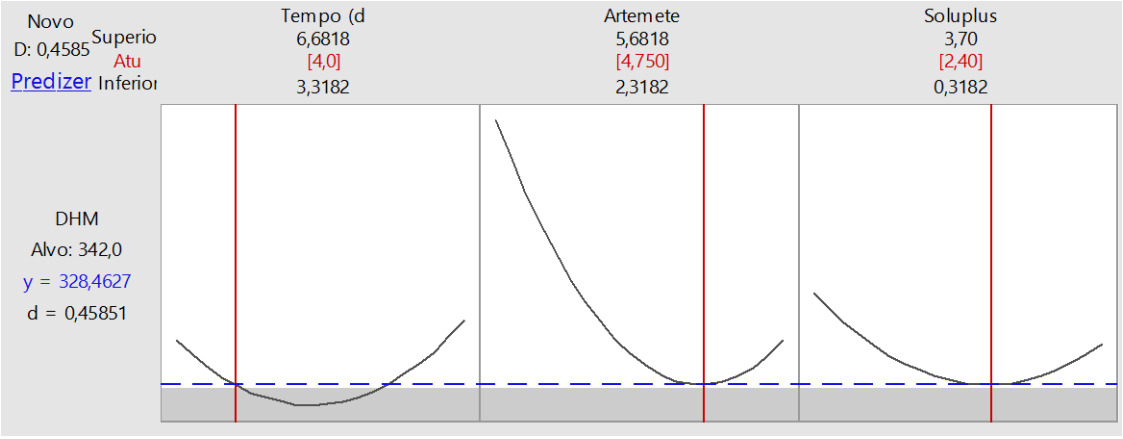


Figura 55. Gráfico de otimização da avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula dos nanocristais de artemeter contendo as seguintes variáveis: tempo de moagem (4,00 dias), concentração de artemeter (4,75 %p/p) e concentração do soluplus® (2,40 %p/p). Predição para 328,46 nm: R2.



Para validar a adequação da equação do modelo, foram conduzidos experimentos de verificação, sob as condições mencionadas acima. Nessas condições, os DHM práticos foram, para a formulação 1 (R1): 453,00 nm, formulação 2 (R2): 342,00 nm. Esses valores estão dentro da faixa de valor previsto, calculado com α=0,05 (Tabela 36). Os resultados práticos demonstraram a validade do modelo matemático para o DHM.

Tabela 36. Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula e índice de polidispersão das formulações para validação do modelo matemático de nanocristais de artemeter

F	DHM prático (nm)	DHM teórico (nm)	IP	DP IP
R1	453,00 ± 12,00	446,72	0,30	0,04
R2	342,00 ± 16,30	328,46	0,23	0,01

F: formulação; DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; IP: índice de polidispersão; DP: desvio padrão. R1 e R2: formulações otimizadas para validação do modelo para DHM; DHM teórico para α=0,05.

5.8. Desenvolvimento da metodologia para a Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais empregando espalhamento de luz dinâmica

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

O método para determinação do DHM foi desenvolvido com base no trabalho de Keck e colaboradores (2010). Esses autores relataram alteração do DHM durante as medições devido à dissolução dos nanocristais. Esse fenômeno pode ser evitado utilizando meio saturado com o fármaco matéria prima (micropartículas) em substituição a água purificada nas análises (KECK, 2010).

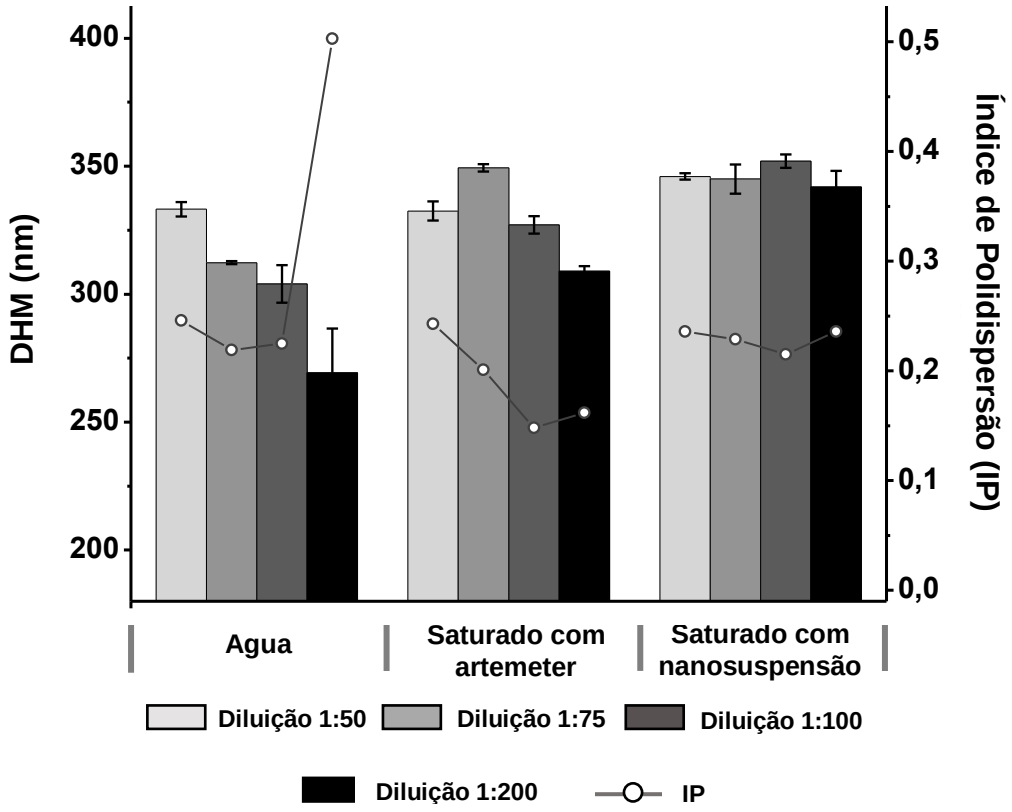
A Figura 56 apresenta os resultados de DHM das nanosuspensões de artemeter analisado em três meios de dispersão diferentes: meio insaturado (água), meio parcialmente saturado empregando artemeter matéria-prima e com meio completamente saturado (com nanosuspensão de artemeter). Para investigar a diferença no DHM, a quantidade da nanosuspensão de artemeter foi

mantida constante (10µL) sendo que essa amostra foi analisada em 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, e 4 mL de meio de dispersão.

Os resultados claramente mostram a significante influência do processo de dissolução nos resultados do diâmetro hidrodinâmico médio. As amostras analisadas em água (meio insaturado) mostraram partículas com DHM de 333,2 ± 2,8 para diluição empregando 1mL de meio de dispersão, e DHM de 269,2 ± 14,7 nm para a diluição empregando 4mL. Essa redução do tamanho de partícula foi em função do efeito de dissolução, mais pronunciado no meio de maior volume (4mL).

De maneira similar, a amostra analisada em meio parcialmente saturado empregando artemeter matéria-prima apresentou redução do DHM na diluição com proporção de 1:200 (4mL). A diferença entre o DHM obtido empregando 1 mL e 4 mL de meio de dispersão foi de 23,5 nm, com valores de 332,5 nm e 309 nm, respectivamente. Observa-se que o efeito de dissolução pode ser neutralizado usando meio saturado. Porém, os nanocristais apresentaram aumento na solubilidade de saturação. Assim, a saturação do meio de dispersão com artemeter matéria-prima (na escala micrométrica) pode não ser suficiente para reduzir o efeito de dissolução dos nanocristais, em diferentes volumes de meio de dispersão. Nesse caso, o uso de meio de dispersão saturado com nanocristais (saturação completa) pode ser considerado adequado por não influenciar significativamente na medição do diâmetro hidrodinâmico meio. O DHM e o IP se mantêm constantes independentemente do volume do meio de dispersão usado. Os valores de DHM para volumes de 1mL, 1,5mL, 2mL, e 4mL foram de 346±1,3 nm, 345±5,7 nm, 352±2,6 nm e 341±6,3 nm com índices de polidispersão de 0,236, 0,229, 0,215 e 0,236, respectivamente e distribuição monomodal de tamanho.

Figura 56. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) da nanosuspensão de artemeter, analisado em diferentes diluições (1:50, 1:75, 1:100, 1:200) de meio de dispersão insaturado (esquerda), parcialmente saturado (centro) e completamente saturado (direita).



5.8.2. Desenvolvimento do método para determinação do potencial zeta

O potencial zeta é uma propriedade física apresentada por qualquer partícula em dispersão. Além disso, é considerado característica fundamental no controle das interações eletrostáticas e estéricas nessas dispersões. Determinada partícula dispersa em meio aquoso possui carga elétrica superficial. Essa carga influencia a distribuição dos íons ao redor da região interfacial. Aumento na concentração dos contra-íons fortemente ligados à região interfacial da partícula resulta na formação da camada de Stern. Essa camada induz a formação de outra, denominada difusa, debilmente associada,

formada por íons. Essas camadas ligadas às partículas movem-se como se fossem parte dela, que estão em movimento Browniano. O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento e é medido usando a técnica de micro-eletroforese em que a voltagem é aplicada por meio do uso de um par de eletrodos na célula contendo as partículas dispersas. Assim, as partículas com carga elétrica são atraídas em direção à carga oposta, em velocidade proporcional à sua carga (KASZUBA et al., 2010).

O potencial zeta permite otimizar formulações como nanosuspensões e emulsões e permite predizer a estabilidade a longo prazo. Alguns fatores que influenciam diretamente no valor do potencial zeta são pH, a força iônica do meio e a concentração dos componentes da formulação. Em concentrações muito elevadas a luz dispersa não é detectada. Assim, o limite da concentração para medições do potencial zeta dependerá do tamanho das partículas, da polidispersão e da propriedades óticas das partículas (KASZUBA et al., 2010).

O soluplus® é um copolímero anfifílico que, na formulação, conferiu estabilidade estérica. Essa estabilidade é causada pelas cadeias adsorvidas na superfície do artemeter evitando a união entre as partículas.

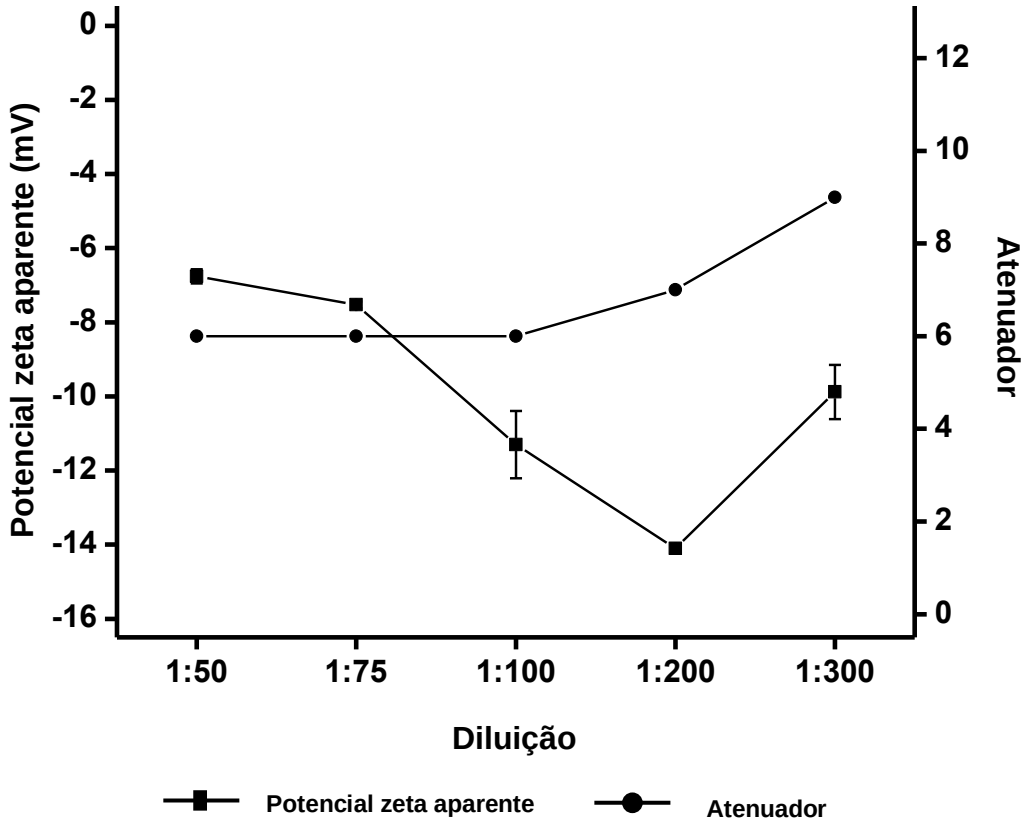
Os resultados do estudo da influência da concentração de nanocristais de artemeter na determinação do seu potencial zeta estão apresentados na Figura 57.

A determinação do potencial zeta não foi possível com a amostra sem diluição, mesmo com o atenuador no seu limite. Como consequência, foram testadas diversas diluições da amostra com meio saturado com artemeter (pH=6,67; condutividade=0,45µS/cm).

A Figura 57 revelou que para os nanocristais de artemeter, as diluições de 1:100 e 1:200 proporcionaram resultados semelhantes, sendo que a taxa de contagem das partículas (*count rate*) foram 234,4 e 228,3 e o valor de atenuador 6 e 7, respectivamente. Entretanto, na diluição 1:300, a taxa de contagem foi de 78, bem abaixo do encontrado nas outras preparações e com valor de atenuador de 9, próprio de amostras bem diluídas. O potencial zeta para todas as diluições foram negativos com valor máximo na diluição de 1:200 (-14,1$\pm$0,11mV). Resultados similares foram obtidos nos trabalhos de Kaszuba e colaboradores (2010). O menor valor de potencial zeta para amostras concentradas pode ser consequência da maior turbidez da amostra, resultando em obscurecimento da

transmissão da luz. Por conseguinte, a luz dispersa que irá ser detectada origina-se de partículas próximas da parede da célula, e não daquelas na posição central, onde tem mobilidade reduzida devido ao campo elétrico ser inferior ao assumido.

Figura 57. Gráfico da influência da concentração da nanosuspensão contendo artemeter (R2-MUR) na determinação do seu potencial zeta.

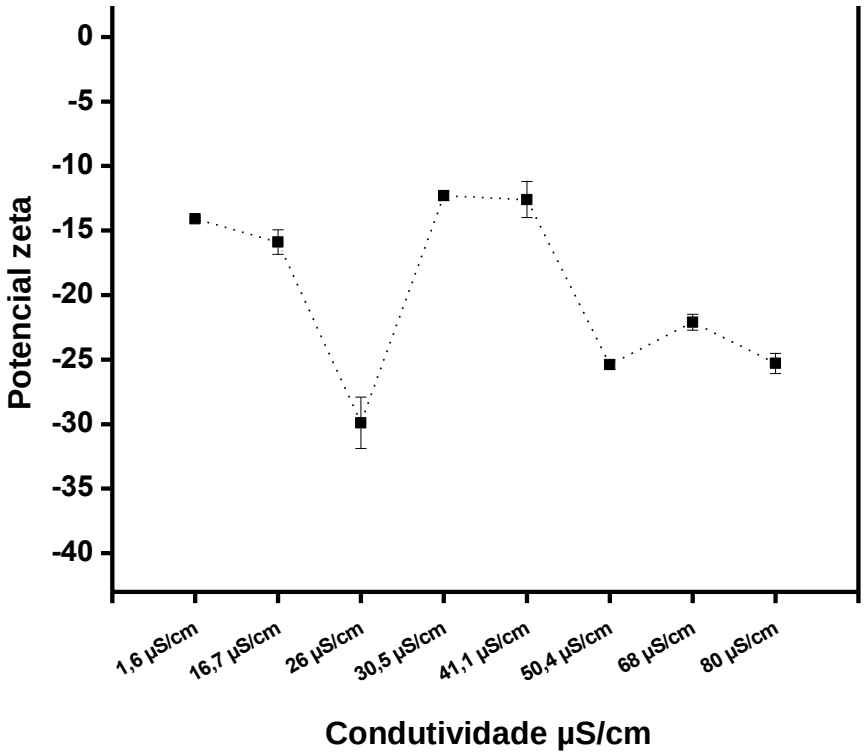


O potencial zeta não é apenas influenciado pelo pH e pela concentração dos constituintes da formulação das nanopartículas, mas também pela condutividade do meio dispersante. Quanto maior a força iônica do meio, maior será a "compressão" da dupla camada elétrica.

Os resultados obtidos relativos à influência da condutividade do diluente no potencial zeta dos nanocristais de artemeter encontram-se apresentados na Figura 58. Nessas análises observou-se que quando a diluição da amostra foi ajustada para a condutividade acima 50,4 µS/cm, os valores do potencial zeta

não sofreram alterações significativas. Assim, assumiu-se essa condutividade como referência para as determinações.

Figura 58. Variação do potencial zeta aparente em função da condutividade para a nanosuspensão contendo artemeter (M2-MER).



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

Os resultados para o DHM, IP e PZ estão apresentados na Figura 59 e na Tabela 37. Em geral, valores de potencial zeta igual ou maior a | 30mV | são considerados sistemas estáveis. Os valores de PZ, para R2-MUR, foi -25,4 $\pm$ 0,36 mV. No entanto, a estabilidade dos sistemas é dependente do tipo do tensoativo utilizado. Assim, foi conduzido estudo de estabilidade, por período de três meses, a temperatura de 4°C e 25°C, visando avaliar o DHM, o IP e o PZ dos nanocristais de artemeter.

Figura 59. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico médio por DLS da formulação otimizada (R2-MUR) do nanocristal de artemeter obtido por moagem via úmida em escala reduzida.

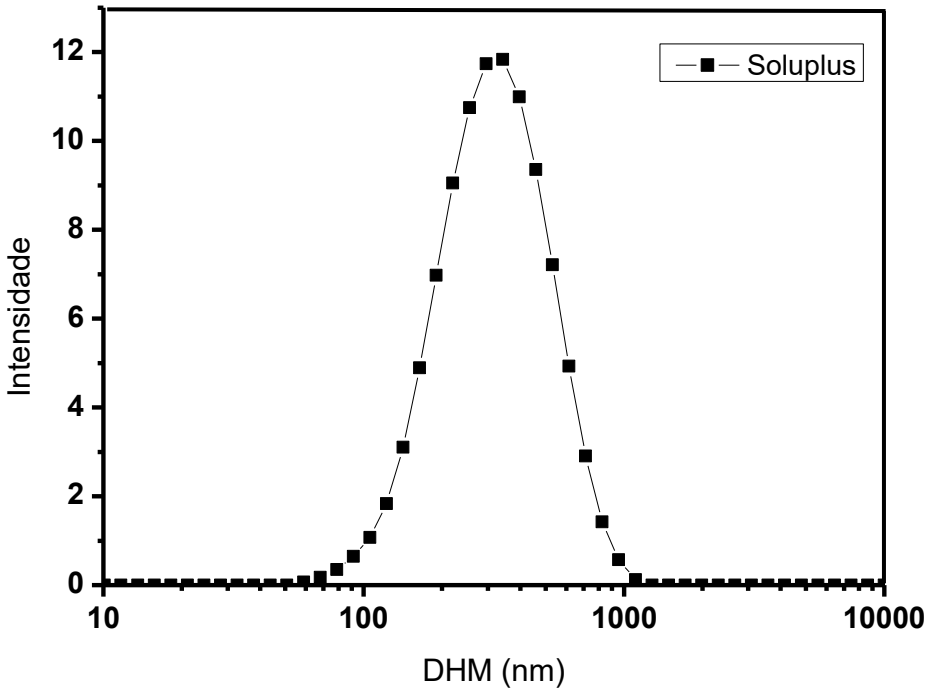


Tabela 37. Diâmetro hidrodinâmico meio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) da formulação otimizada (R2-MUR) do nanocristal de artemeter obtido por moagem via úmida em escala reduzida.

Nanocristais de artemeter	DHM (nm)	Índice de polidispersão (IP)	PZ (mV)
R2-MUR	345 ± 16,30	0,229 ± 0,01	-25,4 ± 0,36

R2-MUR: Formulação 2 otimizada empregando moagem via úmida em escala reduzida (artemeter 4,75%p/p, soluplus® 2,4%p/p).

Considerando os resultados obtidos, os nanocristais de artemeter (R2-MUR) apresentaram distribuição monomodal e uniforme de tamanho, com índice de polidispersão inferior 0,3 e ausência de sedimentação e agregados.

5.9. Ensaios exploratórios no processo de liofilização da nanosuspensão obtida pelo método de moagem via úmida em escala reduzida

A liofilização é um processo de estabilização no qual a amostra é congelada, seguida por redução do teor de água empregando sublimação, e após essa etapa, a amostra é submetida à dessorção. Esse processo permite a estabilidade físico-química e microbiológica da amostra. A liofilização é conduzida em condições de temperatura e pressão menores que o ponto triplo da água (combinação de pressão 0,006 bar e temperatura 0,01°C na qual os três estados físicos da agua podem coexistir em equilíbrio) com o intuito de permitir a sublimação do gelo. A principal vantagem é que o processo é realizado a baixa temperatura e pressão. Portanto, é apropriado para a secagem de compostos termolábeis (KUMAR; PRASHANTH; KUMARI, 2011). As etapas envolvidas na liofilização se iniciam a partir da preparação da amostra, seguida da congelação a baixa temperatura, secagem primária a baixa temperatura e pressão (sublimação) e secagem secundária em temperatura crescente (dessorção). Dessa maneira, é possível a obtenção de produto final seco, com teor de umidade bastante reduzido.

Na liofilização de nanosuspensões um dos objetivos é evitar as instabilidades físicas como agregação, aglomeração ou fusão das partículas (BEIROWSKI et al., 2012). A combinação de estabilizador estérico e estabilizador de liofilização constitui fator crítico no desenvolvimento de nanosuspensões liofilizadas quando são altamente concentradas (BEIROWSKI et al., 2011). Beirowski e colaboradores (2012) relataram que a natureza e a concentração do estabilizador estérico na nanosuspensão são importantes na estabilidade do liofilizado, independentemente do princípio ativo utilizado. Quando a natureza e a concentração de um estabilizador estérico é inapropriada para a liofilização, inclusive com quantidades excessivas de lioprotetor, esse é ineficaz para evitar o estresse da etapa de congelação e da secagem na amostra (BEIROWSKI et al., 2012).

A secagem primária na liofilização constitui etapa na qual existe elevado gasto de energia, além do alto consumo de tempo (KUMAR; BAHETI; BANSAL, 2013). Sendo assim, é fundamental minimizar a sua duração, realizando a

secagem primária à temperatura mais elevada possível. No entanto, deve-se considerar que a temperatura da secagem primária deve ser menor que a temperatura crítica do processo. Essa temperatura é a temperatura eutética (T_{eut}) para substâncias cristalinas e temperatura de transição vítrea (T_g'), para substâncias amorfas, com o intuito de garantir a integridade e a estabilidade do produto final. A secagem acima dessas temperaturas pode levar à fusão eutética para componentes cristalinos ou colapso para componentes amorfos. Diversas desvantagens surgem a partir do colapso da formulação sendo a principal a presença de maior teor de umidade residual na amostra, provocando a possível degradação do produto (KUMAR; BAHETI; BANSAL, 2013). O colapso do produto liofilizado tem como resultado a perda da aparência elegante (*cake structure*), perda da estrutura rígida e descoloração da formulação (PYNE; SURANA; SURYANARAYANAN, 2002). Assim, a determinação da temperatura crítica do processo foi de fundamental importância para a otimização do processo de liofilização dos nanocristais de artemeter.

A microscopia acoplada a liofilização é amplamente utilizada para determinar o início da temperatura de colapso (T_{oc}) para misturas. Há forte relação entre a T_g' e a temperatura na qual o produto colapsa, sendo essa entre 2°C - 5°C mais elevada que a correspondente T_g' para a maioria das formulações (MEISTER; GIESELER, 2009).

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) pode ser utilizada para determinar a T_g', essa técnica termoanalítica avalia a variação da entalpia da amostra submetida à aumento controlado de temperatura (10°C/min).

As curvas DSC por compensação de potência foram utilizadas para a avaliação das amostras. Nesse caso, a amostra e a referência sofrem troca de calor com o forno, com o objetivo de observar transições de fases de baixa energia, assim como, eventos de recristalização associados a produtos que serão submetidos à liofilização em diversas condições.

5.9.1. Determinação da temperatura de transição vítrea (T_g') e Temperatura eutética (T_{eut}) empregando Calorimetria Exploratória Diferencial *(DSC*) dos nanocristais de artemeter formulação R2-MUR

A temperatura de transição vítrea (T_g') e a temperatura eutética (T_{eut}) dos nanocristais de artemeter obtidos por moagem em escala reduzida (R2-MUR) foram determinadas. Como mencionado anteriormente, a mistura do estabilizador estérico e do lioprotetor constitui fator crítico no desenvolvimento de nanosuspensões liofilizadas quando são altamente concentradas. Segundo Hawe e Fries (2006), para o desenvolvimento de produto liofilizado é de fundamental importância o uso de diversos excipientes. Dessa maneira, é possível proteger o princípio ativo contra o estresse e a degradação durante o congelamento, secagem primária e secundária e durante o armazenamento (HAWE; FRIESS, 2006). A adequada estabilidade e a aparência elegante do produto liofilizado pode ser alcançadas por meio da mistura de excipiente cristalino formador de volume "*bulking agent*" (manitol, glicina) com um segundo excipiente que permaneça amorfo durante todo o processo de liofilização e que atue como lioprotetor (sacarose, trealose) (IZUTSU; KOJIMA, 2002; JHONSON; KIRCHHOFF; GAUD, 2002)

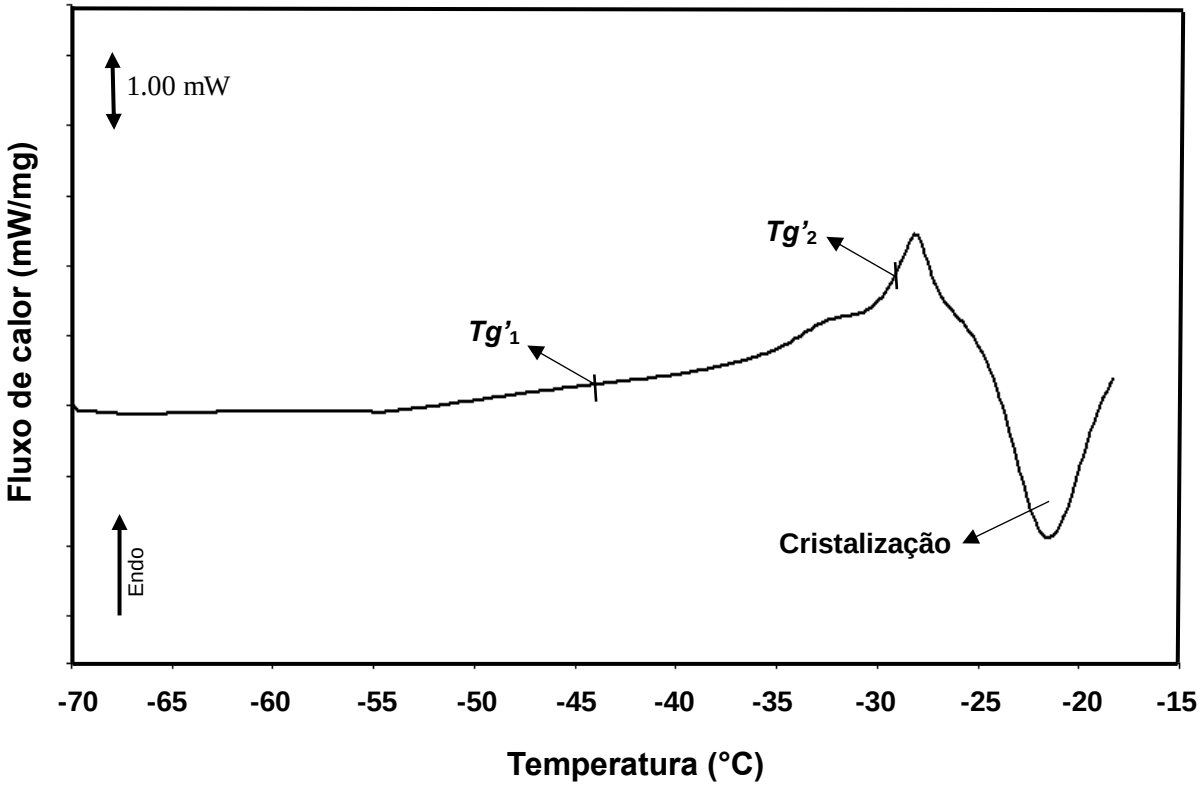
Os componentes da nanosuspensão foram: o artemeter (4,75% p/p), o soluplus® (2,4% p/p) que cumpre a função de estabilizador estérico e atua como lioprotetor e o manitol (5%p/p) que cumpre a função de formador de volume.

O manitol é um açúcar não redutor e excipiente comumente usado como formador de volume em formulações farmacêuticas liofilizadas. Característica interessante do manitol refere-se à sua fácil cristalização quando a sua solução aquosa é submetida à liofilização (PYNE; SURANA; SURYANARAYANAN, 2002). A cristalização do manitol pode ser inibida por rápida congelação na primeira etapa da liofilização, por secagem primária a temperaturas baixas, ou pela presença de aditivos (KIM; AKERS; NAIL, 1998; MARTINI et al., 1997). Essa inibição origina diversas estruturas amorfas e cristalinas no mesmo componente.

De acordo com Yu e colaboradores (1998) e Burger e colaboradores (2000), diversas formas polimórficas do manitol anidro (α, β e δ) foram encontradas durante o processo de liofilização, além da existência do hidrato de manitol e uma forma amorfa desse excipiente. Estrutura completamente cristalina do manitol, no produto liofilizado, confere série de vantagens, além de proporcionar excelente aparência ‘‘*elegant cake*’’. No caso do manitol cristalizar na etapa de congelamento, a temperatura da primeira secagem poderia aumentar em comparação da T_g’.

Inicialmente as nanosuspensão de artemeter foram congeladas a partir da temperatura ambiente até -80°C a 10°C/min, seguido de aquecimento até -15°C a 10°C/min. A curva DSC de aquecimento revelou série de transições térmicas (Figura 60). Uma primeira temperatura de transição vítrea ($T_g'_1$ = -39,15°C) foi observada, com início em -54°C relacionada a porcentagem amorfa do manitol. Em seguida, foi observada uma segunda temperatura de transição vítrea ($T_g'_2$ = -29,20°C) com início em -32°C, possivelmente associado ao soluplus® (excipiente amorfo). A terceira transição térmica refer-se a evento exotérmico (T_{eut} = -21,55°C) com início em -27°C que é atribuído a cristalização de hidrato de manitol, assim como, da água não congelada associada a fase amorfa do manitol (CAVATUR et al., 2002). Perfis térmicos similares, relacionado a solução aquosa de manitol congelada foram relatados por Cavatur e colaboradores (2012). Esses autores revelaram duas T_g’ na qual a menor temperatura de transição vítrea ($T_g'_{1\ inicial}$ = -32°C) foi considerada como a T_g’ verdadeira, relacionada à porcentagem de manitol amorfo. A temperatura de transição vítrea maior ($T_g'_{2\ inicial}$ = -25°C) foi atribuída a interação interfacial entre os cristais de gelo e a fase amorfa (fusão incipiente). Adicionalmente, os autores observaram rápida cristalização (evento exotérmico) devido a elevada mobilidade das moléculas dos componentes amorfos congelados, quando são submetidos a temperatura acima da sua T_g’.

Figura 60. Curva DSC obtida na célula DSC da suspensão de artemeter com manitol 5% a uma razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de N_2, a partir de -70°C a -20°C.

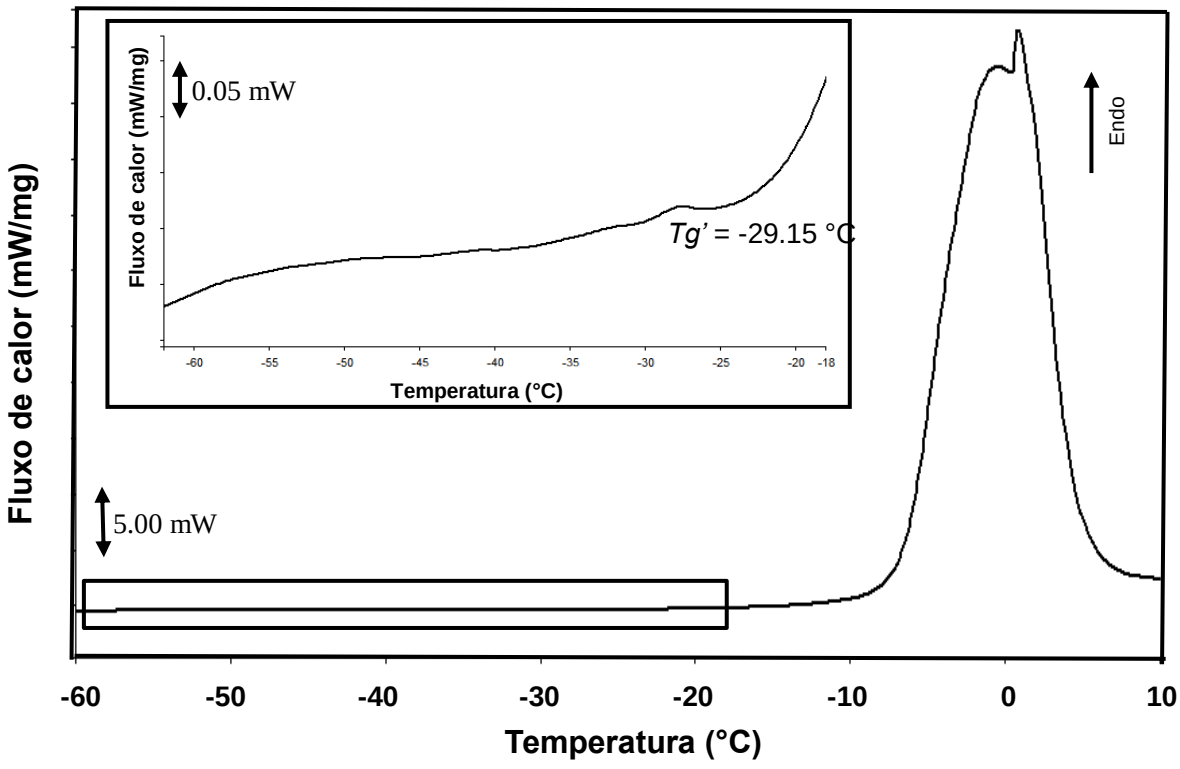


Recurso para maximizar a cristalização do manitol refere-se à aplicação de tratamento térmico denominado "*annealing*". Esse tratamento isotérmico, dentro do processo de liofilização, especificamente na etapa de congelamento, é conduzido principalmente acima da T_g' do material congelado. Dessa maneira, é possível facilitar a máxima cristalização do soluto, na formulação aquosa congelada (PYNE; SURANA; SURYANARAYANAN, 2002). Segundo Pyne e colaboradores (2002), se o manitol não apresenta cristalização completa após o processo de liofilização, essa cristalização pode acontecer durante o armazenamento uma vez que a forma cristalina é a mais estável. Essa conversão durante o período de armazenamento pode ser acompanhada de liberação de água associada com a fase amorfa. Essa água pode interagir com os outros componentes da formulação resultando em alterações físicas e químicas indesejáveis.

O “*annealing*” da nanosuspensão de artemeter (R2-MUR) empregando manitol 5% foi realizado com razão de aquecimento de 10°C/min (Figura 57). A amostra foi aquecida à temperatura de -15°C, durante 10 min, logo resfriada até -50°C seguido do aquecimento até 25°C. Essa curva de aquecimento foi apresentada na Figura 61. Observou-se aumento de 10°C no valor da T_g’ após a utilização do *annealing*, em comparação a T_g’ verdadeira da formulação, sem o tratamento.

Esse valor de T_g’ (-29,15°C) está associado à temperatura de transição vítrea verdadeira da formulação na mistura (Figura 58), sendo que a maior porcentagem de manitol foi cristalizada usando o tratamento térmico de *annealing*. Portanto, o único componente que possui estrutura amorfa é o soluplus®.

Figura 61. Curva DSC obtida na célula DSC da suspensão de artemeter (R2-MUR) com manitol 5% a uma razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera dinâmica de N_2, a partir de -60°C a 25°C e após o tratamento de *annealing*.



5.9.2. Microscopia acoplada a liofilização para a determinação da temperatura de colapso (T_c)

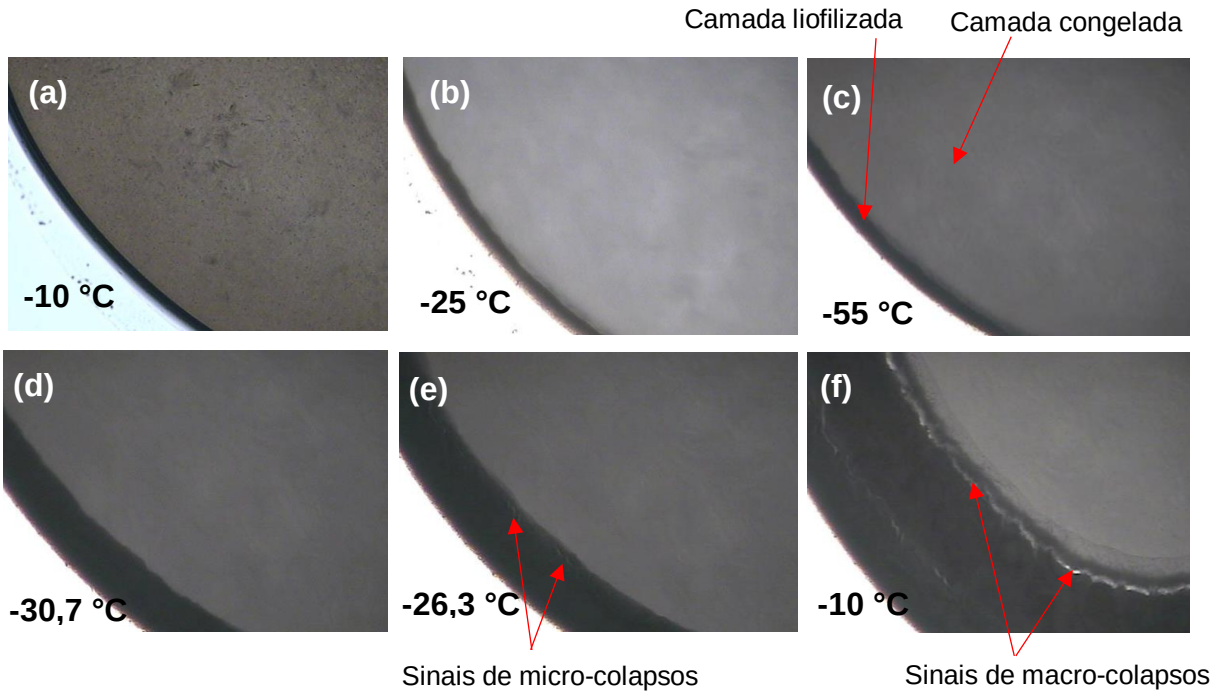
A técnica de microscopia acoplada a liofilização permite determinar série de eventos além de proporcionar imagens em tempo real do material quando esse é submetido às diferentes etapas, no processo de liofilização (congelamento e secagem). Esses eventos incluem a temperatura de nucleação, a fusão eutética, a temperatura de colapso, de macro-colapso e de micro-colapso (em alguns casos), o efeito do *annealing* de uma amostra de estrutura cristalina e a cristalização do soluto (REY; MAY, 2010). A importância dessa técnica refere-se à obtenção de informações que permitam que o evento de colapso seja identificado em fração de um grau. Produto que colapsa no processo de liofilização perde a sua estrutura rígida. Esse usualmente contém elevados níveis de água superficial comparado ao produto não colapsado, intacto. Como consequência, essa menor área superficial específica pode causar incremento no tempo de reconstituição da formulação (REY; MAY, 2010).

O início do evento de colapso (quando no limite da temperatura é observado primeiras sinais de fluxo viscoso) é definido como $T_{c\ (inicio)}$ e o ponto final do evento (quando na temperatura acima do limite não é observada a permanência da estrutura seca) como $T_{c\ (final)}$ (MEISTER; GIESELER, 2009).

A Figura 62 apresenta as imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização da nanosuspensão de artemeter empregando manitol 5% sem o tratamento de *annealing*, pela técnica de Microscopia acoplada a liofilização.

As temperaturas de micro-colapso e macro-colapso foram de -26,3 e -10,0 °C, respectivamente (Tabela 38). Como anteriormente mencionado, em função da evidente relação entre os valores de temperatura de transição vítrea (T_g') e a temperatura de colapso (T_c), a T_c de 26,3 °C pode ser relacionada à porcentagem amorfa do manitol ($T_g'_1$ = -39,15°C), assim como, ao copolímero amorfo soluplus® ($T_g'_2$ = -29,20°C).

Figura 62. Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização da nanosuspensão de artemeter – manitol 5% sem *annealing*. (a) Amostra no estado liquido. (b) Cristalização da amostra. (c) Formação da fronte da liofilização da amostra, matriz liofilizada. (d) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (e) Microcolapsos. (f) Macrocolapsos.



A Figura 63 apresenta as imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização da nanosuspensão de artemeter empregando manitol 5%, com o tratamento de *annealing*. Pode-se observar o efeito do *annealing* resultando em maior cristalização do manitol (Figura 63c). A temperatura de colapso foi de -13,7°C, com sinais de macro-colapso na amostra. De acordo com os resultados prévios, obtidos por calorimetria exploratória diferencial, a amostra após o tratamento de *annealing* apresentou Tg' de -29,15°C, relacionada ao soluplus® (componente amorfo). Porém, na Figura 63 foi difícil observar os micro-colapsos nessa faixa de temperatura após o *annealing*. Ward e Matejtschuk (2010) trabalharam no desenvolvimento do ciclo de liofilização de produto biológico contendo reduzidas quantidades de cloreto de cálcio. Nesse caso, não foi observado o colapso até temperaturas acima de -30°C pela técnica

de microscopia acoplada a liofilização. Entretanto, o uso de métodos alternativos (*Dynamic Mechanical Analysis* – DMA, *Impedance*) forneceu maior compreensão do comportamento da amostra. Esses métodos permitiram observar variações significantes de fluxo viscoso ao redor de 53°C. Dessa maneira, os autores sugeriram o emprego dessas outras técnicas para avaliar de forma abrangente as variações da amostra dentro do ciclo de liofilização.

Figura 63. Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização da nanosuspensão de artemeter – manitol 5% com *annealing*. (a) Amostra no estado liquido. (b) e (c) Cristalização da amostra. (d) Maior cristalização da amostra – *annealing*. (e) Formação da fronte da liofilização da amostra, matriz liofilizada. (f) Perdida da estrutura na matriz liofilizada.

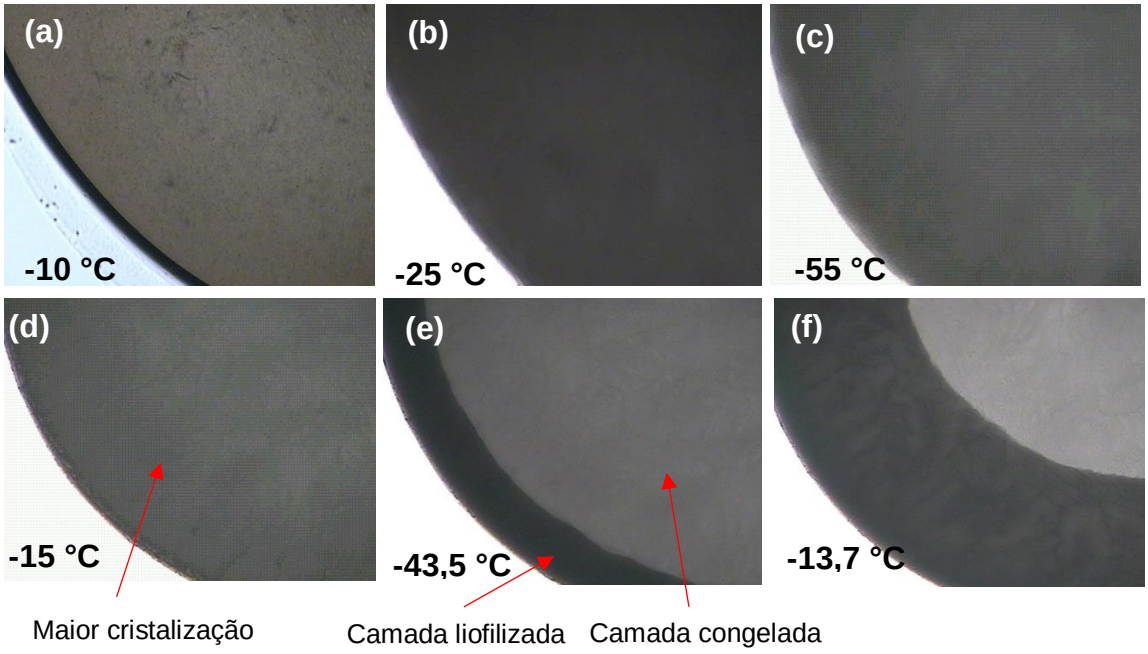


Tabela 38. Valores dos eventos térmicos da formulação de nanocristais de artemeter – otimizada (R2-MUR) com e sem annealing analisadas por microscopia ótica acoplada à liofilização.

Formula	Tratamento térmico	Evento térmicos (C°)		
		Cristalização	Micro-colapsos	Macro-colapsos
R2-MUR (nanocristais de artemeter)	Sem *annealing*	-25,0	-26,3	-10,0
	Com *annealing*	-25,0	-	-13,7

(-) não observado, R2-MUR: Formulação 2 empregando moagem via úmida em escala reduzida (artemeter 4,75%p/p, soluplus® 2,4%p/p).

5.9.3. Considerações relativas ao processo de liofilização

As técnicas de calorimetria exploratória diferencial e microscopia acoplada à liofilização permitiram o conhecimento dos parâmetros e fatores críticos, além do desenvolvimento e otimização do processo de liofilização nas diferentes etapas (congelamento, primeira secagem e segunda secagem). Adicionalmente, o desenvolvimento adequado da formulação de nanocristais de artemeter (4,75% p/p) contendo soluplus® (2,4%p/p) e manitol (5%p/p) foi de fundamental importância no processo de liofilização, assim como, da estabilidade do produto seco.

O tratamento térmico *annealing* constituiu etapa fundamental dentro do processo de liofilização por permitir a completa cristalização do manitol (5%p/p). A porcentagem amorfa desse excipiente poderia resultar na conversão para a estrutura cristalina com consequente liberação de água. Como consequência, a água pode interagir com os outros componentes da formulação permitindo o surgimento de alterações físicas e químicas indesejáveis.

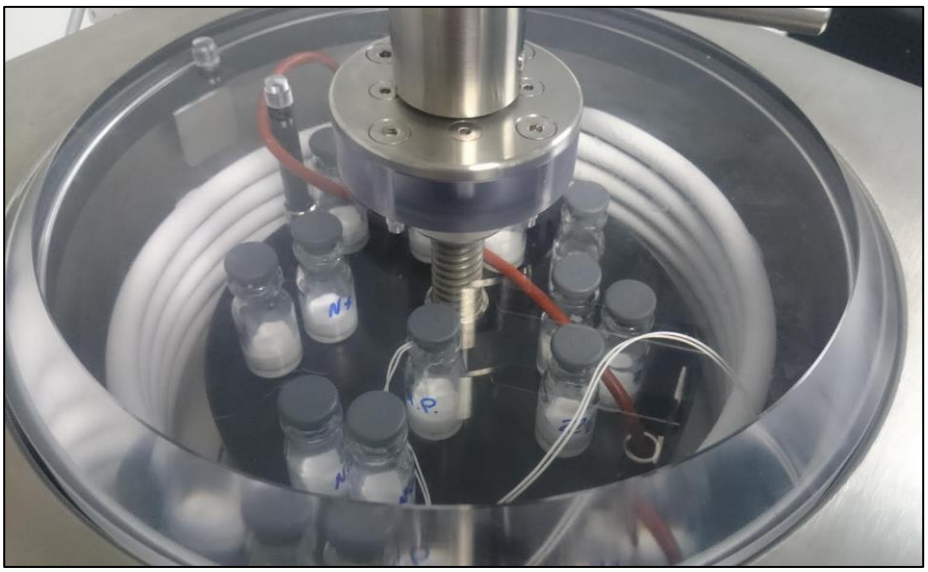
A técnica de calorimetria exploratória diferencial permitiu determinar a temperatura de transição vítrea da amostra (T_g' = -29,15°C) após o uso do recurso *annealing*. O emprego da microscopia acoplada a liofilização permitiu a identificação da temperatura na qual a amostra colapsa (T_c = -26,3°C). Considerando esses dois parâmetros, relacionados fortemente, foi possível otimizar o processo de liofilização. Assim, a temperatura e a pressão, em cada etapa, foram as seguintes: congelamento até -45°C; tratamento *annealing* com aquecimento até -15°C e mantida a essa temperatura por 1 hora; secagem primária a temperatura de prateleira de -35°C e pressão de 75mTorr por 48h; e etapa da secagem secundária, temperatura da prateleira de +20°C, sob a mesma pressão durante 4h.

5.10. Liofilização da nanosuspensão de artemeter

A Figura 64 apresenta o produto liofilizado obtido pelo método de moagem via úmida em escala reduzida, seguindo os parâmetros já estabelecidos anteriormente. As avaliações dos produtos liofilizados consistem na observação do volume final da pastilha, assim como, da aparência do *cake.* Ambas as características foram consideradas apropriadas. A Figura 65 apresenta visão geral do processo de liofilização.

Figura 64. Aparência da pastilha liofilizada dos nanocristais de artemeter (R2-MUR).

Figura 65. Frascos contendo nanosuspensão de artemeter durante o processo de liofilização.



5.11. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta (PZ) dos nanocristais resuspendidos após liofilização

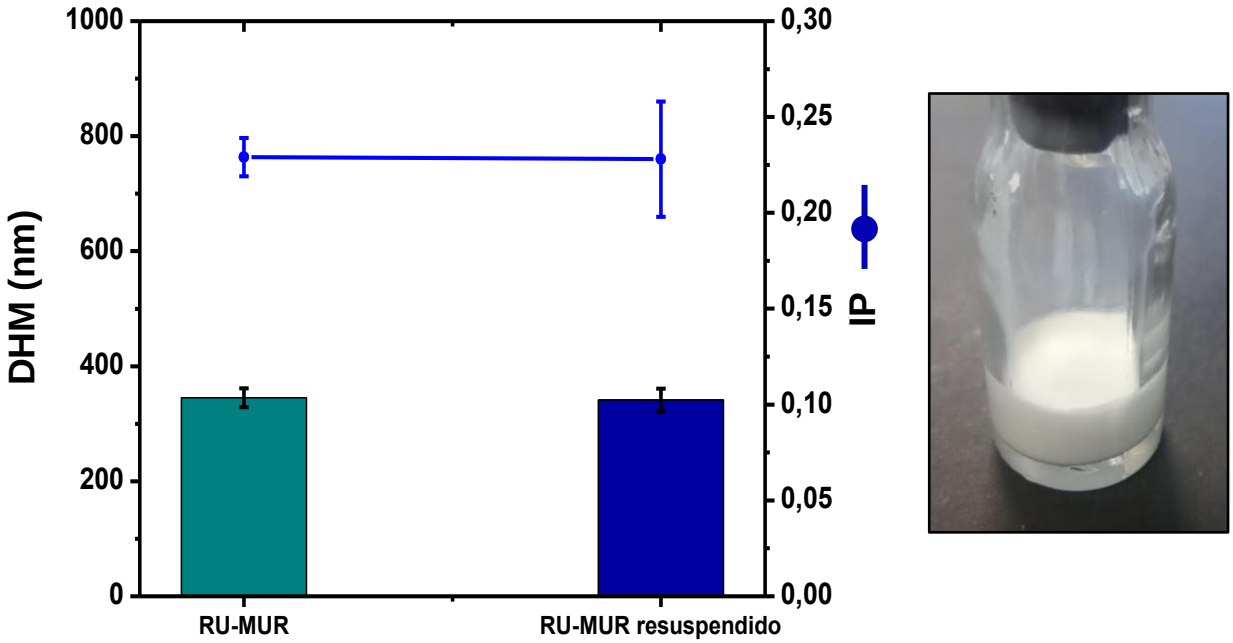
A Tabela 39 e a Figura 66 apresentam os valores de DHM, IP e PZ após reconstituição da R2-MUR (nanosuspensão otimizada de artemeter), empregando o mesmo volume de água removido na liofilização. Pode-se observar que a amostra não sofreu alterações nos valores de DHM e IP durante o processo de secagem.

Tabela 39. Diâmetro hidrodinâmico meio (DHM), o índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta (PZ) dos nanocristais de artemeter formulação otimizada (R2-MUR) reconstituída após a liofilização.

Fórmula	DHM (nm)	IP	PZ (mV)
R2-MUR	345 ± 16,30	0,229 ± 0,01	-25,4 ± 0,36
R2-MUR após reconstituição	341,1 ± 19,8	0,228 ± 0,03	-21,1 ± 0,49

R2-MUR: Formula 2 otimizada dos nanocristais de artemeter (4,75%p/p) empregando soluplus® (2,4%p/p) e manitol (5%p/p) como excipientes.

Figura 66. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice da polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de artemeter (R2-MUR) reconstituída após liofilização.



5.12. Teor de artemeter na preparação liofilizada

A Tabela 40 apresenta o valor de teor de artemeter na preparação liofilizada sendo que o volume transferido para o frasco, antes da liofilização, foi de 1,68 mL. A preparação utilizada foi a nanosuspensão de artemeter (4,75%p/p) otimizada (R2-MUR) obtida pelo método de moagem via úmida em escala reduzida. O teor de artemeter foi determinado por método espectrofotométrico, desenvolvido e validado previamente.

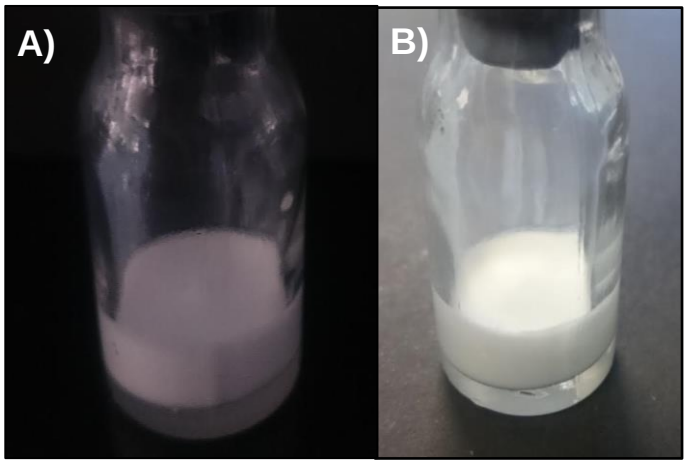
A quantidade de artemeter real no produto liofilizado foi de 71,36 $\pm$ 3,78 mg. Assim, pode-se considerar essa preparação liofilizada como uma plataforma inovadora para a obtenção de medicamentos orais, como por exemplo, na obtenção de comprimidos dispersáveis contendo nanocristais de artemeter. A Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2011) define comprimido dispersível como aquele que, quando em contato com um liquido, rapidamente produz dispersão homogênea (suspensão) e é destinado a ser disperso antes da administração.

Tabela 40. Teor de artemeter na preparação liofilizada (formula R2-MUR otimizada)

Formula	Volume do liofilizado	Quantidade teórica de artemeter (4,75%p/p) em 1,68 mL	Quantidade prática de artemeter (4,75%p/p) em 1,68 mL
R2-MUR liofilizada	1,68 mL	80 mg	71,36 $\pm$ 3,78 mg

R2-MUR liofilizada: Formula otimizada dos nanocristais de artemeter liofilizado (4,75%p/p) empregando soluplus® (2,4%p/p) e manitol (5%p/p) como excipientes.

Figura 67. Imagens da formulação R2-MUR (nanocristais de artemeter) antes da liofilização-volume 1,68 mL (A) e após o processo de liofilização (B).



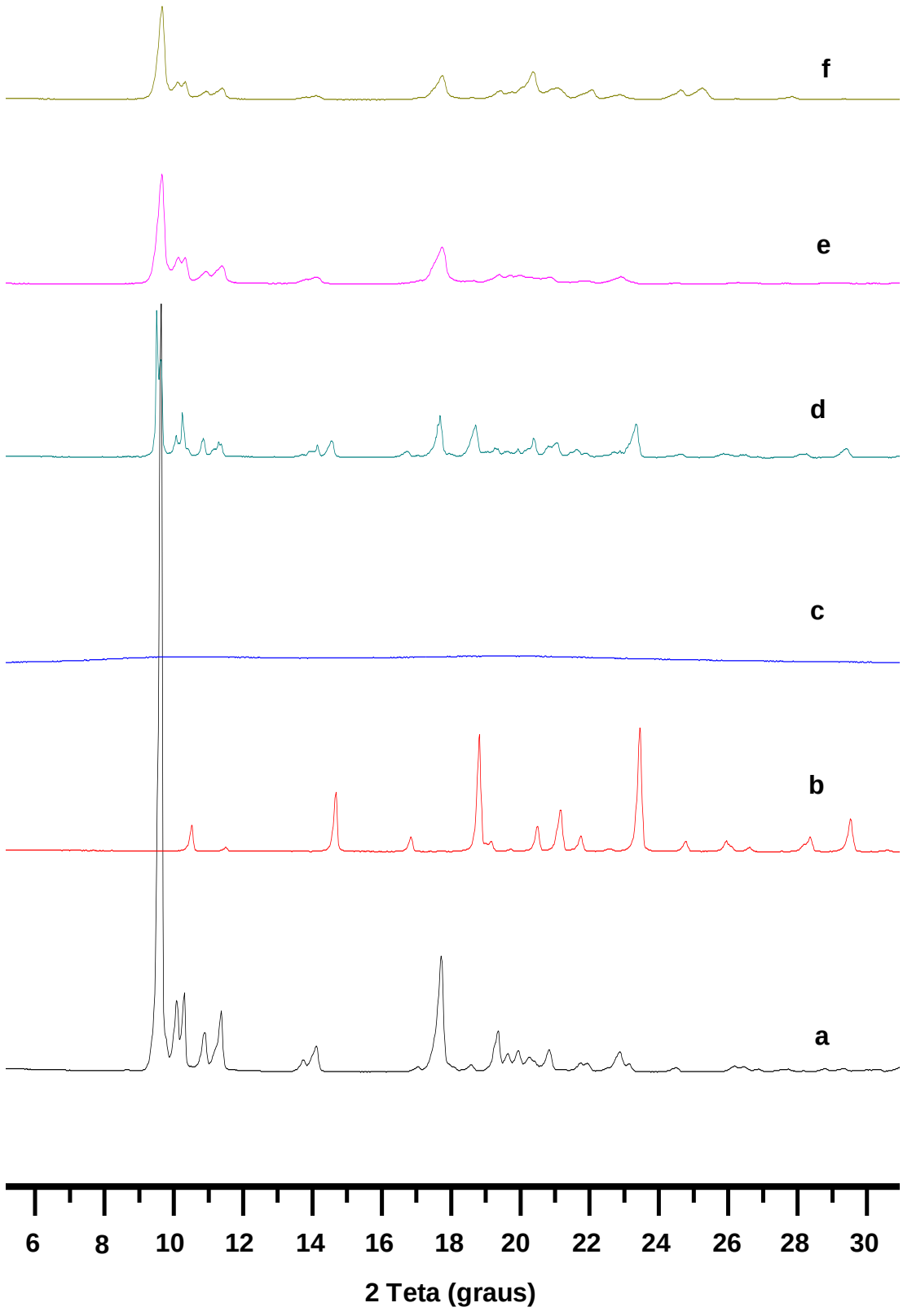
5.13. Difração de raios X (DRX)

O uso da técnica de difração de raios X permitiu o conhecimento da estrutura cristalina do fármaco antes e após o processo de nanonização. A Figura 68 apresenta os difratogramas do artemeter, dos excipientes, das misturas físicas e da formulação R2-MUR (nanocristais de artemeter).

O difratograma de raio X do artemeter puro apresentou múltiplos picos com alta intensidade, indicando a natureza e porcentagem de cristalinidade do fármaco (Figura 68a). Na Figura 64a podemos observar intensidades especificas (2θ), características do artemeter, as quais foram observadas a 9,62°; 17,71° e 19,34° 2θ com intensidades de 342015, 52478 e 19361, respectivamente.

No caso do difratograma da mistura física (Figura 68d) observa-se que o artemeter mantém a sua estrutura cristalina, com intensidades reduzidas (44873, 15652 e 5517 observadas a 9,62°; 17,71° e 19,34° 2θ), redução esperada por se tratar de mistura cuja proporção foi 1:1:1 (artemeter: soluplus®: manitol). No caso do produto liofilizado (Figura 68f e 68e) observa-se que após o processo de nanonização, a estrutura cristalina do artemeter se mantém. Tal fenômeno pode ser visualizado nas intensidades especificas (2θ), características da estrutura cristalina do artemeter observados a 9,62°; 17,71° e 19,34° 2θ.

Figura 68. Difratograma (método do pó) de artemeter puro (a), manitol (b), soluplus® (c), mistura física (d), nanocristais sem manitol (e), nanocristais com manitol (f).



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

As curvas de DSC e TG do artemeter matéria-prima, excipientes, mistura física e dos nanocristais (R2-MUR) estão apresentadas nas Figuras 69 e 70, respectivamente. Na Figura 69c observa-se o comportamento térmico do artemeter, analisado em testes anteriores, sendo característico dessa molécula um pico endotérmico (entre 83-90°C) sem perda de massa própria da fusão do artemeter; e outro exotérmico (119-195°C) com decomposição térmica do fármaco.

A curva DSC (Figura 69d) para os nanocristais de artemeter liofilizado (R2-MUR liofilizado) apresentou somatória dos eventos térmicos do artemeter, soluplus® e manitol. Além disso, observa-se um primeiro evento endotérmico com T_{pico} de 79,3°C e ΔH de 15,4J/g característico da fusão do artemeter (Figura 69d), confirmando que a característica cristalina do fármaco se manteve após o processo de nanonização. Esses estudos foram complementados com as curvas TG (Figura 70). Os resultados revelaram que não houve adiantamento da temperatura de decomposição dos componentes da fórmula.

Figura 69. Curvas DSC do manitol (a), soluplus® (b), artemeter (c) e nanocristais de artemeter liofilizado (d) obtidas a 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1}.

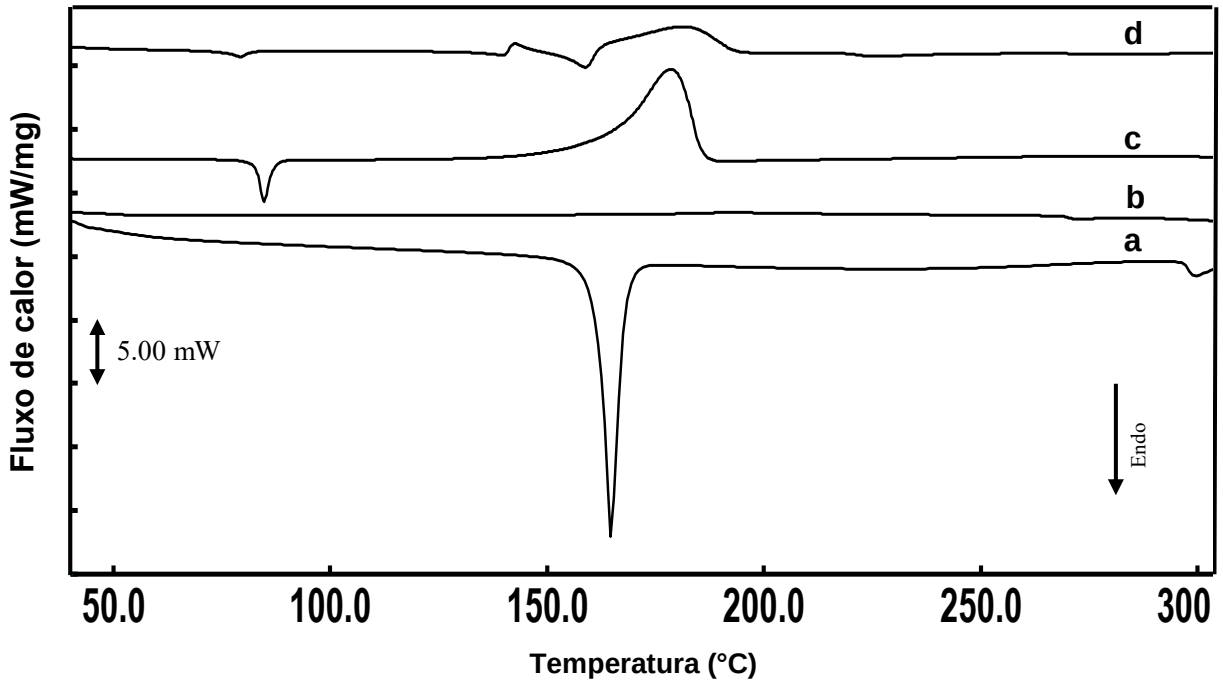
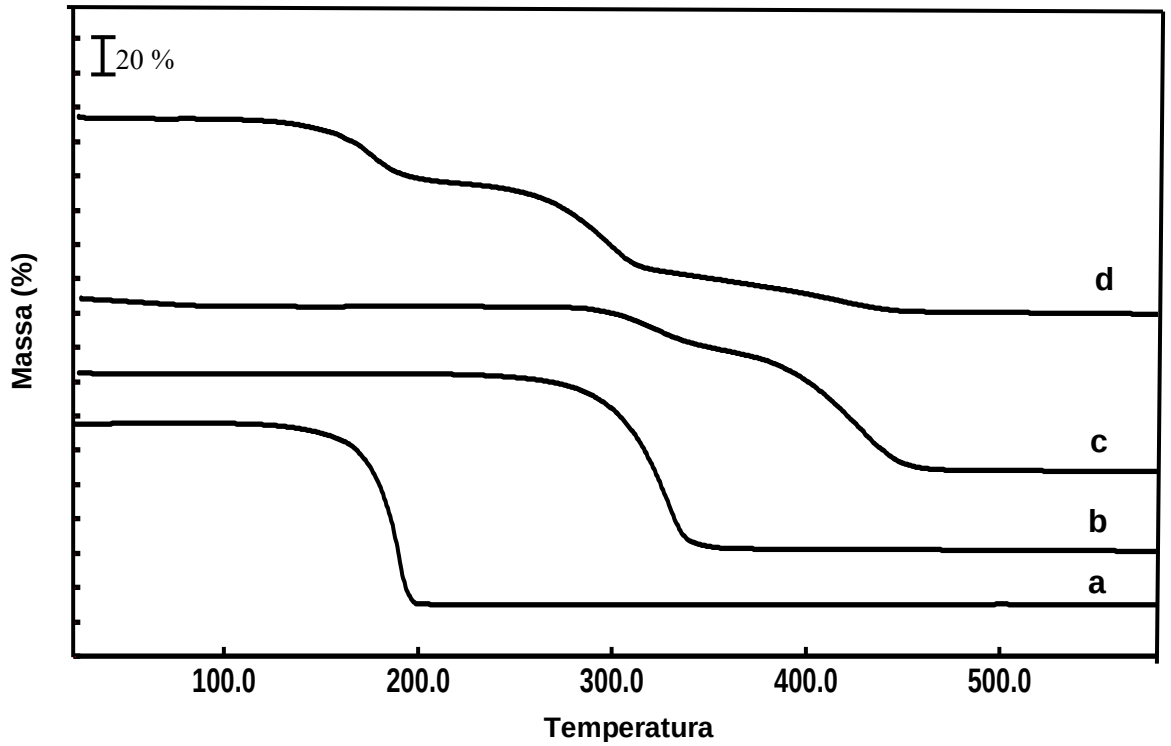


Figura 70. Curvas TG do artemeter (a), manitol (b), soluplus® (c) e nanocristais de artemeter liofilizado (d) obtidas a 10°C/min. TG: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 100 mL min^{-1}.



5.15. Solubilidade de saturação dos nanocristais de artemeter

Dentre os métodos mais recomendados para estudos de solubilidade destaca-se o método de equilíbrio. Esse método, conhecido como *shake flask* ou método de equilíbrio, avalia a solubilidade do fármaco, com adição de excesso de fármaco em meio aquoso, até atingir a saturação do meio. Em seguida, esse meio é submetido a agitação por período prolongado até a obtenção do equilíbrio entre o fármaco e o meio (AVDEEF, 2003; UNITED STATES, 2015).

A solubilidade de saturação do artemeter matéria-prima, da mistura física e dos nanocristais (R2-MUR liofilizado) foram avaliadas em cinco meios diferentes: água ultrapura e em soluções apresentando valores de pH 2,5; 4,5; 6,8 e 7,2 (Tabela 41 e Figura 71).

Tabela 41. Solubilidade de saturação do artemeter matéria-prima, da mistura física e dos nanocristais (mg/mL, n=3, ± desvio padrão) e número de vezes no aumento da solubilidade observado nos nanocristais (dados entre parênteses).

Meios/pH	Artemeter (mg/mL)	Mistura Fisica (mg/mL)	Nanocristal (R2-MUR) (mg/mL)
Água	0,129 ± 0,05	0,221 ± 0,03 **(1,71x)**	0,261 ± 0,07 **(2,02x)**
Tampão Mclavin pH 2,5	0,187 ± 0,02	0,262 ± 0,01 **(1,41x)**	0,333 ± 0,06 **(1,8x)**
Tampão acetato pH 4,5	0,115 ± 0,09	0,192 ± 0,03 **(1,66x)**	0,242 ± 0,09 **(2,10x)**
Tampão fosfato pH 6.8	0,09 ± 0,01	0,128 ± 0,03 **(1,42x)**	0,16 ± 0,09 **(1,77x)**
Tampão fosfato pH 7.2	0,073 ± 0,09	0,095 ± 0.03 **(1,30x)**	0,224 ± 0.06 **(3,06x)**

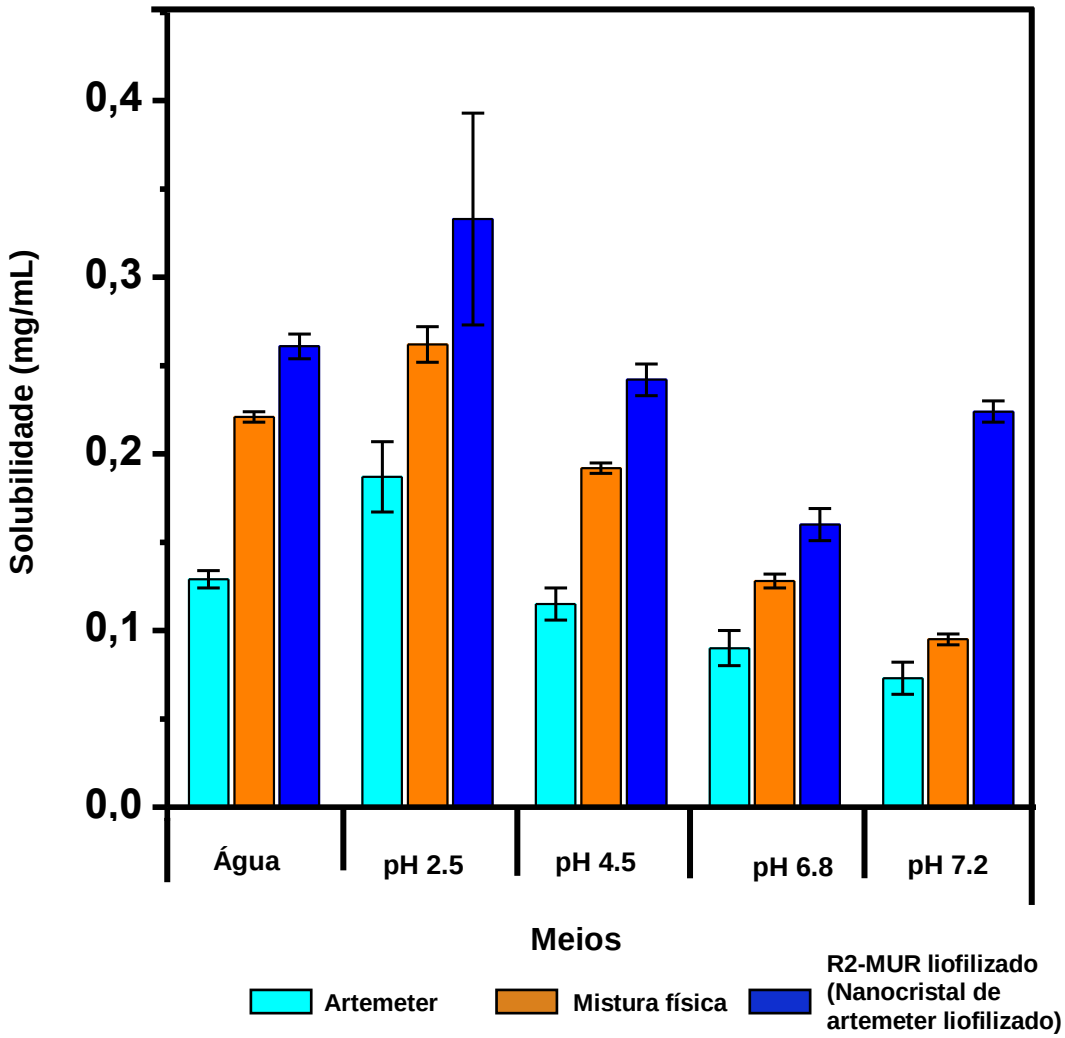
De acordo com os resultados obtidos, os nanocristais exibiram aumento na solubilidade de saturação de 77%, até três vezes maior em relação ao artemeter matéria-prima nos diferentes pH (Tabela 42 e Figura 71). De acordo à equação de Ostwald Freundlich, este incremento na solubilidade de saturação é dependente do menor tamanho da partícula e do aumento da área superficial. Fu e colaboradores (2013) determinaram e compararam a solubilidade de saturação para nimodipino matéria-prima (NMD), e para três formulações de nanocristais de nimodipino com DHM diferentes sendo de 848,7±10,4 nm, 490,3±18,7 nm e 148,3±15,0nm, respectivamente. Quando comparado aos nanocristais de nimodipino, com menor tamanho (148,3±15,0nm),os autores obtiveram um aumento da solubilidade de saturação de 27 vezes, 2,27 vezes e 1,7 vezes relacionado a nimodipino matéria-prima, nanocristais com tamanho de 848,7±10,4 e nanocristais com tamanho de 490,3±18,7 nm, respectivamente, confirmando a relação entre tamanho de partícula e aumento da solubilidade de saturação (FU et al., 2013).

Os nanocristais de artemeter (R2-MUR) apresentaram aumento da solubilidade de 1,8 vezes com concentração de 0,333 ± 0,06 mg/mL no tampão McIlvaine citrato-fosfato (pH = 2,5) considerando como referência o valor da solubilidade do artemeter matéria-prima nesse mesmo meio (0,187 ± 0,02 mg/mL). O tampão McIlvaine é uma solução composta por ácido cítrico (0,1M) e fosfato dissódico (0,2M) que, em diferentes proporções, envolve uma ampla faixa

de pH (2,2 – 8,0) (McIlvaine, 1921). Percebemos a dificuldade da reconstituição dos nanocristais de artemeter liofilizados em meio básico (pH 7,2) impossibilitando a sua correta diluição de acordo ao método analítico desenvolvido anteriormente.

O aumento da solubilidade de saturação dos nanocristais, em aproximadamente 1,8 vezes no meio ácido (Tabela 42 e Figura 71), sugere um aumento na biodisponibilidade. Considerando que esse fármaco apresenta janela de absorção em todo o pH fisiológico, a maior solubilidade em meios ácidos ocasionaria um aumento na velocidade de dissolução no estomago resultando em elevada disponibilidade do fármaco através do trato intestinal.

Figura 71. Solubilidade obtida através do método de equilíbrio do artemeter matéria-prima, das misturas físicas (MF) e dos nanocristais de artemeter liofilizados (R2-MUR liofilizado). As barras de erros indicam o desvio padrão dos testes feitos em triplicatas.



5.16. Avaliação *in silico* das características físico-químicas do artemeter

As avaliações *in silico* das características físico-químicas do artemeter apresentaram: pKa igual a -3,93 realizando uma varredura na faixa de pKa básico mínimo de -8 até pKa ácido máximo de 16; apresenta uma microespécie (em relação ao pH do meio). Não foram encontrados átomos ionizáveis. Consequentemente, uma distribuição de 100% na faixa de pH 0 – 14 era esperada; a molécula do artemeter apresenta ponto isoelétrico (*pI*) com valores em toda a faixa de pH (0 - 14). As Figuras 72 e 73 apresentam as curvas de distribuição de microespécies versus o pH e o *pI* do artemeter, respectivamente.

Figura 72. Única microespécie do artemeter e sua distribuição em relação ao pH.

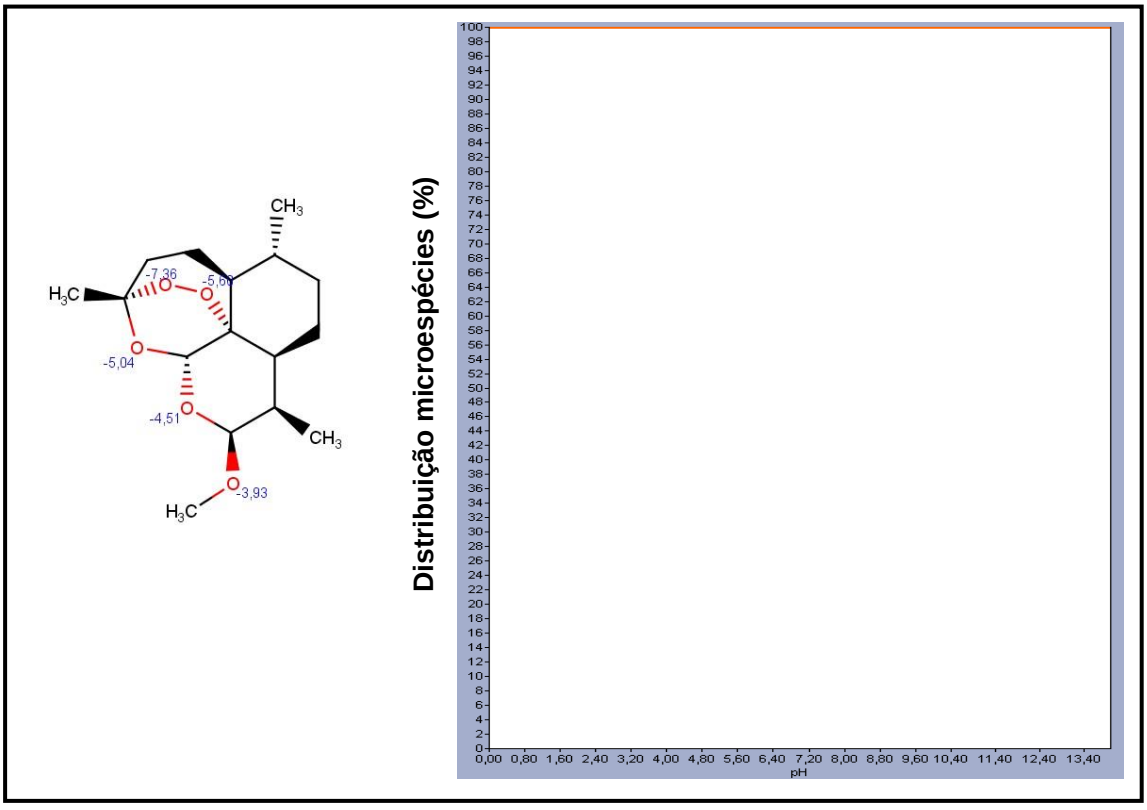


Figura 73. Ponto isoelétrico do artemeter em relação ao pH.

Segundo Pandit (2008), a classificação de compostos químicos (incluindo fármacos) pode ser fundamentada na sua ionização. Eletrólito fraco é ionizável mas apresenta dissociação parcial e uma fração de moléculas dissolvidas permanece na forma não ionizada. Eletrólito forte ioniza-se completamente e, portanto, aparece unicamente na forma de íons positivo e negativo em solução. Composto não eletrólito não se ioniza, permanecendo inteiramente como uma espécie neutra não carregada.

Em geral fármacos ionizáveis são ácidos ou bases fracas, ou sais de ácidos e bases fracos. Assim, a extensão de sua ionização depende da força dos grupos funcionais ionizáveis e do pH do ambiente (PANDIT, 2008). As formas ionizadas e não-ionizadas de um mesmo fármaco apresenta propriedades diferentes relacionadas a sua absorção, distribuição, ligação aos receptores, metabolização e eliminação (AVDEEF, 2003). Dessa maneira, o conhecimento da porcentagem de fármaco ionizado ou não-ionizado em diversos tecidos e nos diversos fluidos do corpo (variação do pH entre 1 e 8) é de fundamental importância na determinação do seu comportamento no organismo.

Os fármacos não-eletrólitos, característica conferida pelos diversos grupos funcionais (éteres, ésteres, cetonas, aldeídos e a maioria das amidas), não se ionizam nos diversos pH do organismo (PANDIT 2008). De acordo com Pandit (2008), se um fármaco não possui um grupo funcional que ionize nessa faixa de pH, comporta-se como não-eletrólito mantendo a sua forma não ionizada ou neutra ao longo de toda a faixa de pH fisiológico.

Conforme avaliação *in silico*, a molécula do artemeter não possui microespécies ionizáveis (Figura 72) sendo considerada uma espécie que apresenta uma alta lipofilicidade (valor de distribuição de 100%) em toda a faixa de pH. Essa característica de distribuição do fármaco refere-se ao percentual de formas não-ionizada e ionizada como função do pH, para bases fracas ou ácidos fracos. Porém, em função das características químicas da molécula do artemeter, essa permanece neutra nos diversos pHs. Tal característica permite a passagem do fármaco através das membranas do corpo (tecidos e células que possuem diferentes pH), atingindo o alvo desejado.

O ponto isoelétrico ou pI é definido como o valor de pH na qual a molécula apresenta carga elétrica total igual a zero. Dessa forma, o pI é o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos da molécula (HARRIS, 1932). Na Figura 73 é possível observar que a molécula do artemeter apresenta ponto isoelétrico (*pI*) com valores em toda a faixa de pH (1 – 14), com carga igual a zero constante nessa faixa, sendo o seu comportamento neutro, não sofrera variação em toda a faixa de pH fisiológico.

5.16.1. Coeficiente de partição (logP), área de superfície molecular, área de superfície polar (*PSA*) e doadores e aceptores de H

Para sua absorção, determinada substância deverá atravessar uma série de membranas epiteliais, do ambiente externo para a corrente sanguínea e, em seguida, atravessar o endotélio capilar para passar do sangue aos diversos tecidos (PANDIT 2008). Na absorção de fármacos, especificamente dos compostos antimaláricos, esses devem atravessar várias barreiras de membrana para atingir seu alvo (parasito) dentro de eritrócitos infectados e exercer seu mecanismo de ação (BASORE et al., 2015). Nutrientes e fármacos deverão atravessar cada membrana por difusão através da porção de bicamadas

lipídicas (transporte transcelular) ou por meio de carreador ou proteína transportadora (difusão facilitada), ou transporte ativo quando energia externa é usada (PANDIT 2008). Cada mecanismo de transporte possui diversas características sendo que o seu conhecimento determinará a via de permeação de diversos fármacos. Por exemplo, a difusão lipídica (absorção intestinal passiva) é unicamente para compostos ou fármacos que não apresentam carga ou formas não ionizadas, mais solúveis em lipídeos, e que difundirão com maior facilidade em relação às formas ionizadas, apresentando maior biodisponibilidade (WATERBEEMD; TESTA, 2009). Portanto, as propriedades físico-químicas dos fármacos têm um papel fundamental nos transportes de membranas. Segundo Waterbeemd et al. (2003), essas propriedades físico-químicas que influenciam a absorção oral dos fármacos são a solubilidade, a carga, a ionização, a lipofilicidade, o tamanho, a forma, a distribuição de carga e a anfifilicidade.

Segundo Pandit (2008), a lipofilicidade é um fator chave na avaliação do comportamento *in vivo* de fármacos atuando diretamente na permeação através de membranas biológicas (absorção e distribuição), ligação do fármaco com proteínas plasmáticas, acumulação de fármacos nos tecidos e reconhecimento, afinidade e especificidade do fármaco pelo receptor. Assim sendo, a determinação do coeficiente de partição é fundamental.

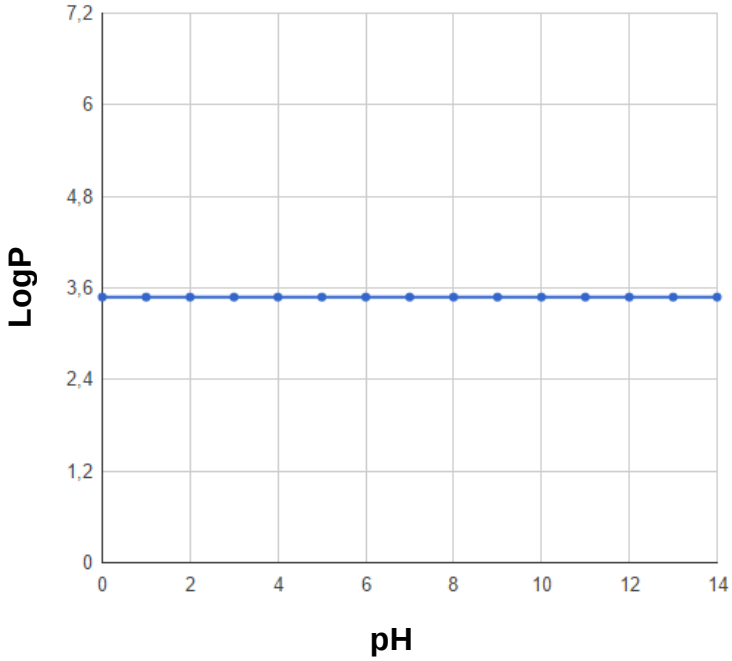
Abordagem que permite predizer a difusão lipídica baseia-se nos métodos computacionais os quais envolvem as características físico-químicas dos fármacos. Lipinski e colaboradores (2001) estabeleceram uma regra chamada “regra dos 5” a qual pode prever absorção ou permeação erráticas quando o valor do peso molecular é maior do que 500 daltons, o coeficiente de partição octanol/água calculado (logP) é maior que 5, o número de doadores de H maior a 5, e o número de aceptores de H maior que 10.

De acordo com os cálculos estimados da ChemAxon’s® Marvin, os valores de logP, área de superfície polar (*PSA*) e pontos aceptores e doadoes de H foram determinados (Tabela 42 e Figura 74).

Tabela 42. Parâmetros físico-químicos (logP, log D, área de superfície polar (*PSA*) e pontos aceptores e doadores de H) obtidos da ChemAxon's® Marvin.

Parâmetros	Valor
LogP	3,48
Área de superfície polar (*PSA*)	46,15 Å^2
Aceptores de H	5
Doadores de H	0

Figura 74. Valores de logP da molécula de artemeter em diferentes pH obtidos da ChemAxon's® Marvin.



De acordo com Waterbeend e Testa (2009), valores de logP inferiores a zero indicam baixa absorção e permeabilidade do fármaco através do jejuno humano. Elevada permeabilidade e probabilidade de biodisponibilidade oral adequada está relacionada com valores de *PSA* iguais ou menores que 140 Å^2 (VAN DE WATERBEEND; TESTA, 2009; VEBER et al., 2002).

Egan e colaboradores (2000) desenvolveram abordagem multivariada identificada como "AlogP98". Esse método computacional simples identifica

parâmetros independentes de logP e PSA (área de superfície polar). As faixas definidas para essas características que indicam alta permeabilidade são fundamentadas a partir da base de dados de fármacos que apresentam absorção adequada e não adequada. Basore et al (2015) utilizaram esse método para avaliar a permeabilidade dos compostos antimaláricos aprovados, assim como, candidatos a fármacos. Esses autores observaram que os fármacos aprovados, entre eles o artemeter, apresenta elevada permeabilidade indicando alta probabilidade (95% de confiança) para adequada difusão lipídica atingindo o alvo desejado.

5.17. Estabilidade das nanosuspensões

A estabilidade por período de 3 meses a 25°C e 4°C das nanosuspensões de artemeter (R2-MUR), assim como, do seu produto liofilizado (R2-MUR liofilizado) está apresentada nas Figuras 75, 76, 77 e 78. Na Figura 75 observa-se aumento do diâmetro hidrodinâmico médio da nanosuspensão de artemeter ao longo do tempo, com tamanho de partícula original de 345±16,3 nm. Após 3 meses de armazenamento a 25°C foi observado tamanho de partícula de 763,4±38 nm, com presença de sedimentação. Tal fenômeno pode ser explicado pelo fenômeno de Ostwald, responsável pelas alterações do tamanho e distribuição das partículas (NUTAN, REDDY, 2009) e refere-se ao crescimento de partículas maiores a partir de partículas menores (nanocristais).

A Figura 76 também revelou aumento do diâmetro hidrodinâmico médio da nanosuspensão de artemeter, porém menos pronunciado, com DHM inicial de 345±16,3 nm e DHM de 430,5±6,46 nm, após 3 meses de armazenamento a 4°C.

Os resultados da formulação de nanocristais liofilizados (R2-MUR liofilizados), apresentados nas Figuras 77 e 78, refletem a estabilidade dessas preparações (uniformidade e ausência de formação de agregados), sendo que os valores de DHM, IP e PZ não apresentaram alterações significativas no decorrer do tempo (DHM<400 nm, IP< 0,3 e PZ entre -25 e -19 mV).

Figura 75. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e potencial zeta (PZ) da nanosuspensão de artemeter (R2-MUR) durante três meses a 25°C.

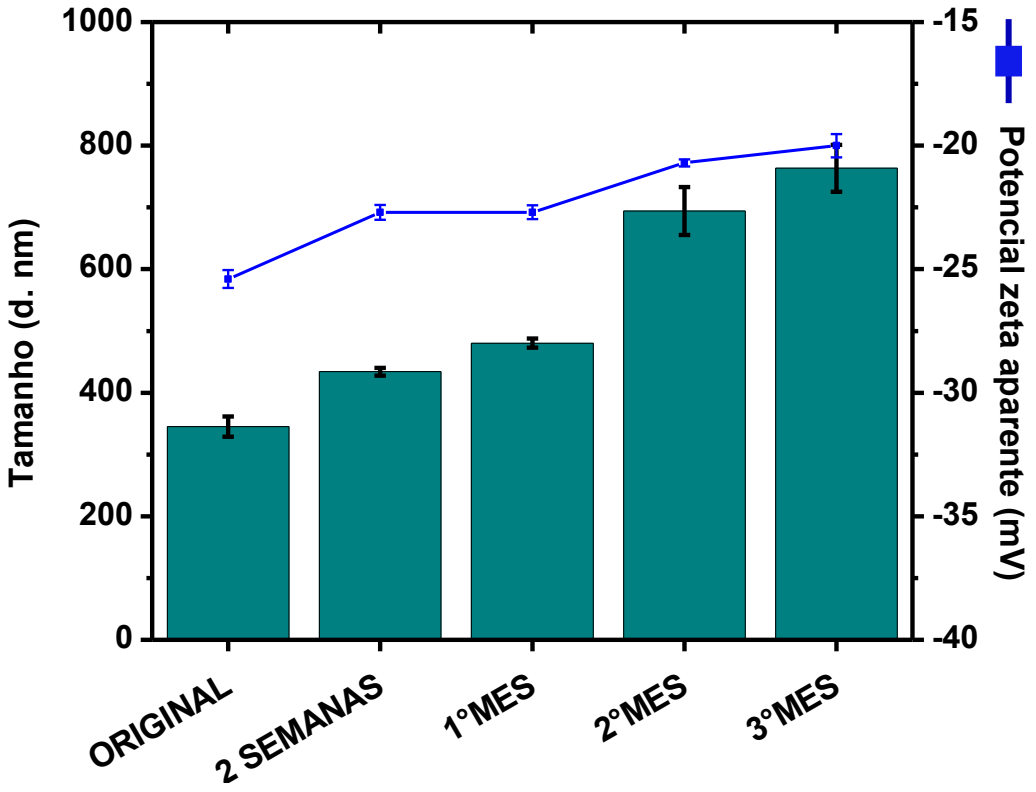


Figura 76. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e potencial zeta (PZ) da nanosuspensão de artemeter (R2-MUR) durante três meses a 4°C.

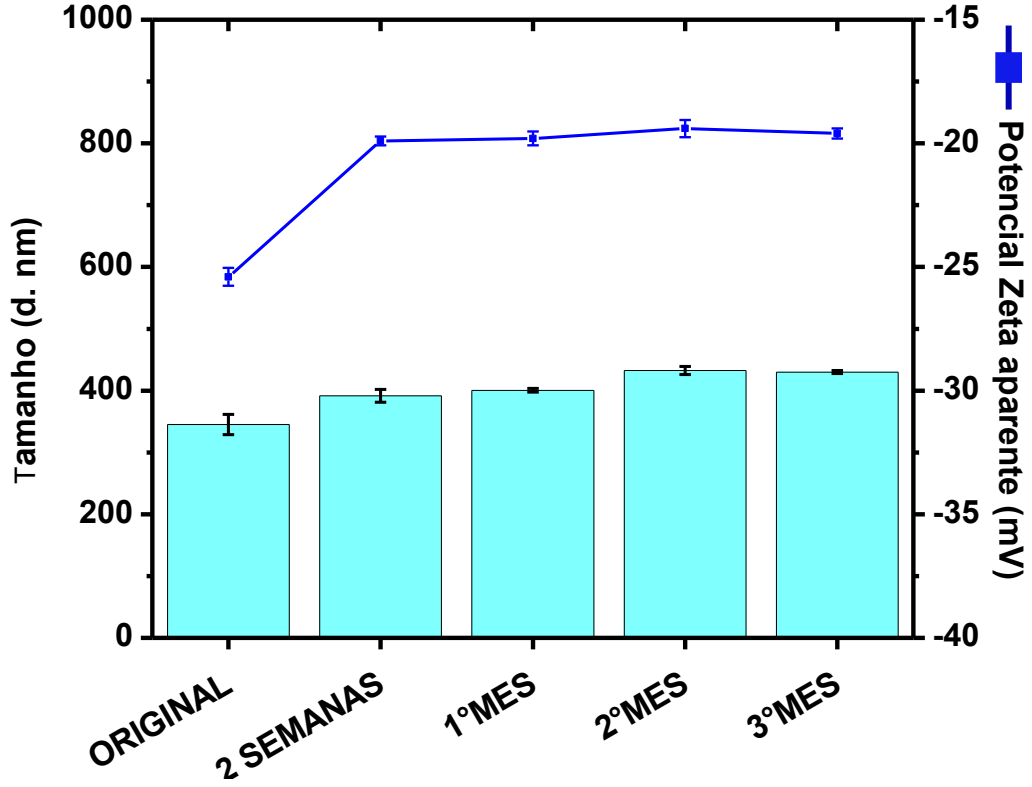


Figura 77. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de artemeter liofilizados (R2-MUR liofilizados) durante três meses a 25°C.

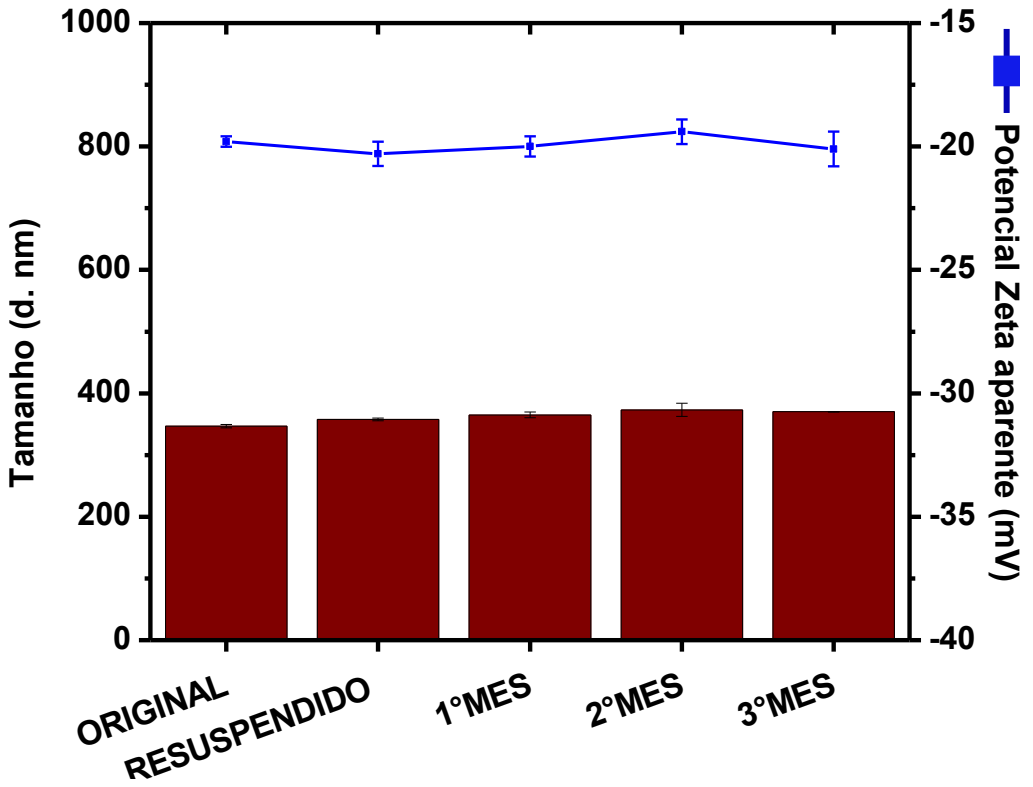
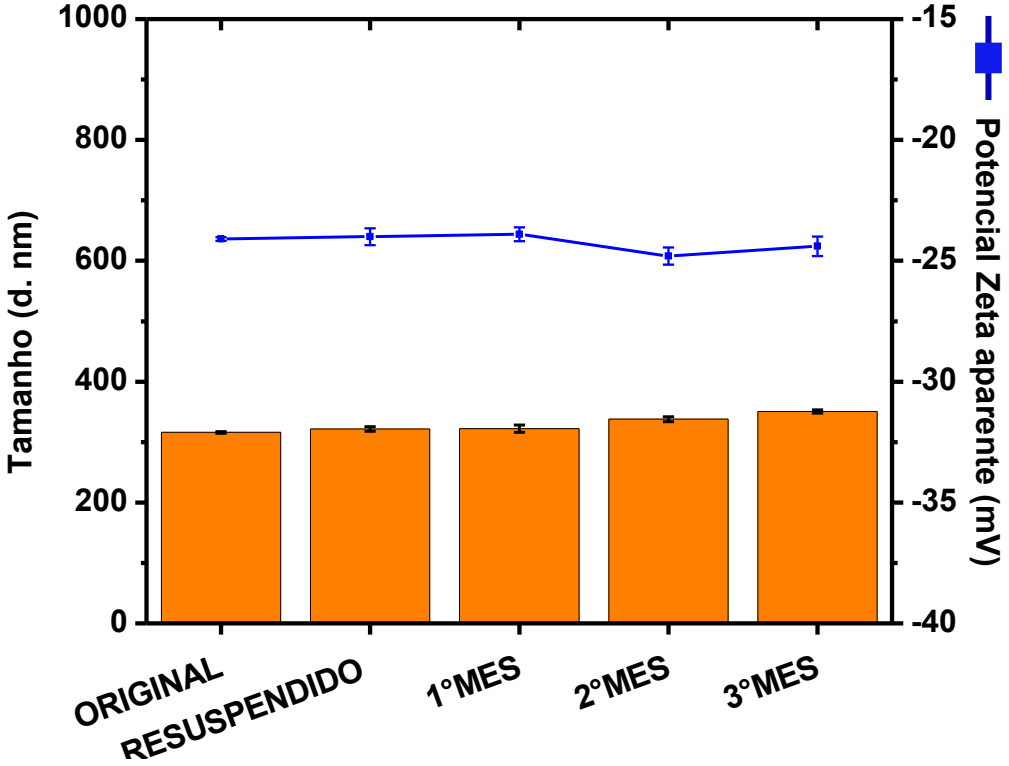


Figura 78. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e potencial zeta (PZ) dos nanocristais de artemeter liofilizados (R2-MUR liofilizados) durante três meses a 4°C.



6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu, com sucesso, o desenvolvimento de plataforma tecnológica para a obtenção de preparações orais contendo nanocristais de artemeter, com potencial maior eficácia antimalárica quando comparada aos produtos convencionais.

Os estudos exploratórios elucidaram que o método por moagem via úmida, em escala reduzida, foi adequado para a obtenção dos nanocristais de artemeter. Esse método permitiu a redução de até 99 vezes o tamanho da partícula do fármaco micronizado.

A análise térmica consistiu de ferramenta essencial na determinação da porcentagem mínima de amorfização do artemeter na mistura física com diversos tensoativos. Foi identificado que o soluplus® permitiu a redução do tamanho da partícula com maior eficácia em relação ao grau de amorfização.

A abordagem metodológica, empregando planejamento estatístico de experimentos, permitiu entender as variáveis significativas para o processo de obtenção dos nanocristais de artemeter. Concluiu se que o aumento da concentração de artemeter e da concentração do soluplus® reduz o DHM da partícula.

Os resultados obtidos no desenvolvimento do método para as determinações do DHM, IP e PZ revelaram que o meio saturado com nanocristais de artemeter foi aquele adequado.

Os nanocristais de artemeter liofilizados apresentaram DHM, IP e PZ similares a nanosuspensão, após a resuspensão do pó.

A solubilidade de saturação dos nanocristais de artemeter em água e no tampão McIlvaine foi respectivamente 2,02 e 1,80 vezes maior que o artemeter micronizado.

Quanto ao método analítico, por UV-vis, esse apresentou características de linearidade, de especificidade, de exatidão, de precisão e de robustez adequadas. O método revelou 89,2% de artemeter no produto liofilizado.

Não foram observadas alterações significativas no DHM, IP e PZ das preparações de nanocristais de artemeter liofilizadas, acondicionadas em frascos ampola, armazenadas por período de três meses armazenados a 25 e 4

°C. Portanto, concluiu se que o processo de liofilização foi fundamental para a estabilidade dessas preparações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITYA, N. P. et al. Advances in nanomedicines for malaria treatment. **Advances in Colloid and Interface Science,** v. 201-202, p. 1-17, 2013.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 8. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALMEIDA, A. CAPRIATA, R. ALMEIDA, H. GUIMARÃES, T. Estudos sobre adesão ao tratamiento da malária**. Enfermeria Global** v. 12, n. 4, p. 288-303, 2013.

ALVES, R. **Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose**. 2007. Dissetação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) - Faculdade de Ciências Farmaêuticas, USP, São Paulo, 2007

ANHALT, K.; GEISSLER, S.; HARMS, M.; WEIGANDT, M.; FRICKER, G. Development of a New Method to Assess Nanocrystal Dissolution Based on Light Scattering. **Pharm Res**, v.29, p.2887–290, 2012.

ANSARI, M. T.; KARIM, S.; RANJHA, N.M.; MUHAMMAD S. Physicochemical characterization of artemether solid dispersions with hydrophilic carriers by freeze dried and melt methods. **Archives of Pharmacal Research,** v. 33, n. 6, p. 901-910, 2010.

ARAÚJOS, A.A.S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L.P.; CARVALHO, F.M.S.; SANTOS, M.; MATOS, J.R. Thermal analysis of the antiretroviral Zidovudine (AZT) and evaluationof the compatibility with excipients used in solid dosage forms**. International Journal of Pharmaceutics**, v. 206, p. 303-314, 2003.

ARIEY, F. et al. A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 50-55, 2014.

AVDEEF, A. Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state. Hoboken: Wiley Interscience, 2003, p. 116-153.

BALÁŽ, P. High-Energy Milling. In: BALÁŽ, P. **Mechanochemistry in Nanoscience and Minerals Engineering**. Heidelberg: Springer, 2008. ed. 1. p. 112.

BASORE, K.; CHENG, Y.; KUSHWAHA, A.K.; NGUYEN, S.T.; DESAI, S.A. How do antimalarial drugs reach their intracellular targets? **Frontiers in pharmacology**, v. 6, n. May, p. 91, jan. 2015.

BEIROWSKI, J.; INGHELBRECHT, S.; ARIEN, A.; GIESELER, H. Freeze-Drying of Nanosuspensions , 1 : Freezing Rate Versus Formulation Design as Critical Factors to Preserve the Original Particle Size Distribution. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 100, n. 5, p. 1958-1968, 2011.

BEIROWSKI, J.; INGHELBRECHT, S.; ARIEN, A.; GIESELER, H. Freeze-Drying of Nanosuspensions , Part 3 : Investigation of Factors Compromising Storage Stability of Highly Concentrated. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 101, n. 1, p. 11-14, 2012.

BRASIL. Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos, 1ª Edição / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

BRASIL. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003.

BURGER, A.; HENCK, J. O.; HETZ, S.; ROLLINGER, J. M.; WEISSNICHT, A. A.; STOTTNER, H. Energy/temperature diagram and compression behavior of the polymorphs of D-mannitol. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 89, p. 457-468, 2000.

CALLEGARI-JACQUES, S. Correlação linear simples. In: CALLEGARI-JACQUES, S. **Bioestatística: princípios e aplicações.** Porto Alegre: Artmed, 2003.

CAVATUR, R. K. et al. Crystallization Behavior of Mannitol in Frozen Aqueous Solutions. **Pharm. Res**. v. 19, n. 6, p. 894-900, 2002.

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

CHRISTIAN, J.; SHAH, P.; PATEL, M.; PETEL, K.; GANDHI, T. Optimizing derivatizing conditions using experimental design and simultaneuus estimation of artemether and lumefrantine by ratio first order derivativ spectrophotometric method. **Journal of Taibah University for Science**, v 10, set. 2016.

CLAS, S.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry : applications in drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today.** v. 2, n. 8, 1999.

COX-SINGH, J. et al. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases,** v. 46, n. 2, p. 165-171, 2008.

CONSIGLIERE, V. O.; STORPIRTIS, S.; FERRAZ, H. G. Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodiponibilidade e bioequivalência de medicamentos. **Revista de ciências farmacêuticas** , v. 21 p.23-41, 2000.

DATTA, A. et al. Development , characterization and solubility study of solid dispersion of nifedipine hydrochloride by solvent evaporation method using poloxamer 407. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**. v. 2 n. 1, p. 2-8, 2011.

DERRINGER, G.C.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219. 1980.

DIAS, L. C. et al. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Quimica Nova.** v. 36, n. 10, p. 1552-1556, 2013.

DJALLÉ, D. et al. Efficacy and safety of artemether + lumefantrine, artesunate + sulphamethoxypyrazine-pyrimethamine and artesunate + amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine + amodiaquine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Bangui, Central African Republic: A randomized trial. **Malaria Journal,** v. 13, n. 1, 2014.

DONG, J.; QI, Z.; ZHANG, Z.; LIU, Y. Standard Molar Enthalpies of Formation and Thermal Stabilities of Artemisinin and Its Two Derivatives : Artemether and Artesunate. **Journal of Chemical & Engineering.** v. 52. n. 3. p. 1045-1049, 2007.

DURÁN, N.; DURÁN, M.; TASIC, L.; MARCATO, P. D. Tecnologia de Nanocristais em Fármaco. **Química Nova,** v.33, p. 151-158, 2010.

EI-BADRY, M., HASSAN, M., IBRAHIM, M., ELSAGHIR, H. Performance of poloxamer 407 as hydrophilic carrier on the binary mixtures with nimesulide. **Farmacia**, v. 61, n. 6, p. 1137-1150, 2013.

FASINU, P.; PILLAY, V.; NDESENDO, V.M.K.; DU TOIT. L.C.; CHOONARA, Y.E. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**. V.32, p.185–209, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Guidance for Industry, DRAFT GUIDANCE. Rockville: FDA, 2011. Disponível em: http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm. Acesso em: 14 março 2014.

FU, Q. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Nimodipine nanocrystals for oral bioavailability improvement : Preparation , characterization and pharmacokinetic studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 109, p. 161-166, 2013.

FULE, R. et al. Development of hot melt co-formulated antimalarial solid dispersion system in fixed dose form (ARLUMELT): Evaluating amorphous state and in vivo performance. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 496, p. 137-156, 2015.

GAO, H.; CHEN, L.; CHEN, W.; BAO, S. Thermal stability evaluation of β-artemether by DSC and ARC. **Thermochimica Acta**. v. 569, n. 200, p. 134-138, 2013.

GARG, N.J.; Global Health: Neglected Diseases and Access to Medicines. **Infectious Disease Clinics of North America.** n.25, p.639–651, 2011.

HARRIS, M. The Isoelectric Point of Wool. **Bureau of Standards Journal of Research**. V. 43, p. 779-786, 1932.

HAWE, A.; FRIESS, W. Physico-chemical lyophilization behavior of mannitol, human serum albumin formulations. **AAPS Pharmaceutical Science Technology.** v. 28, n. 3, p. 224-32, jun. 2006.

HUANG, L. et al. Nanoformulation of D-α-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate-b-poly(ε-caprolactone-ran-glycolide) diblock copolymer for breast cancer therapy. **Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro**, v. 3, n. 10, p. 993-1002, out. 2011.

IZUTSU, K.; KOJIMA, S. Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 54, p. 1033–1039, 2002.

JAIN, K.; SOOD, S.; GOWTHAMARAJAN, K. Lipid nanocarriers and molecular targets for malaria chemotherapy. **Current Drug Targets,** v. 15, n. 3, p. 292-312, 2014.

JOHNSON, R.; KIRCHHOFF, C.; GAUD, H. Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 91, p. 914–922, 2002.

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

KANAUJIA, P. et al. Amorphous formulations for dissolution and bioavailability enhancement of poorly soluble APIs. **Powder Technology**. v. 285, p. 2-15, 2015.

KASZUBA, M. et al. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philosophical transactions.** v. 368, n. 1927, p. 4439-51, 28 out. 2010.

KECK, C. M. Particle size analysis of nanocrystals: improved analysis method. **International journal of pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 3-12, 5 maio 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, jan. 2006.

KHALIL, N. M. et al. Nanotechnological strategies for the treatment of neglected diseases. **Current Pharmaceutical Design,** v. 19, n. 41, p. 7316-7329, 2013.

KHARB, V.; BHATIA, M.; DUREJA, H.; KAUSHIK, D. Nanoparticle Technology for Delivery of Porly Water-Solubre Drugs. **Pharmaceutical Technology** , v.2, 2006.

KIM, A.; KERS, M.; NAIL, S. The Physical State of Mannitol after Freeze-Drying : Effects of Mannitol Concentration , Freezing Rate , and a Noncrystallizing Cosolute. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 87, n. 8, p. 931-935, 1998.

KUMAR, G. P.; PRASHANTH, N.; KUMARI, B. C. Review paper Fundamentals and Applications of Lyophilization. **Journal of Advanced Pharmaceutical Research.** v. 2, n. 4, p. 157-169, 2011.

KUMAR, L.; BAHETI, A.; BANSAL, A. K. Determination of glass transition of the freeze concentrate for lyophilization using novel ex situ supersaturation technique. **Thermochimica Acta**, v. 559, p. 82-85, maio 2013.

KUMARESAN, G.; VELRAJ, R.; INIYAN, S. Thermal Analysis of D-mannitol for Use as Phase Change Material for Latent Heat Storage. **Journal of Applied Sciences,** v. 11, n. 16, p. 3044-3048. 2011.

LEE, J. Drug Nano- and Microparticles Processed into Solid Dosage Forms : Physical Properties. **Journal of Pharmaceutical Science.** v. 92, n. 10, p. 2057-2068, 2003.

LEE, J. Intrinsic adhesion force of lubricants to steel surface. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 93, n. 9, p. 2310-8, set. 2004.

LEE, J. et al. Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 24, n. 5, p. 441-9, abr. 2005.

LEE, J.; CHOI, J.-Y.; PARK, C. H. Characteristics of polymers enabling nano-comminution of water-insoluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 355, n. 1-2, p. 328-36, 1 maio 2008.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v. 50, n. 1, p. 47-60. 2000.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265–278. 2004.

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

LIU, X. et al. Improving the chemical stability of amorphous solid dispersion with cocrystal technique by hot melt extrusion. **Pharmaceutical research**, v. 29, n. 3, p. 806-17, mar. 2012.

MARTINI, A. et al. Use of Subambient Differential Scanning Calorimetry to Monitor the Frozen-State Behavior of Blends of Excipients for Freeze-Drying. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.** v. 51, p. 62-67. 1997.

MAULUDIN, R.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 36, n. 4-5, p. 502-10, 2 mar. 2009.

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. 202-209, 2009.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biochem**. v. 49, p. 183-186, 1921.

MEISTER, E.; GIESELER, H. Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition data. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 98, n. 9, p. 3072-87, set. 2009.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G. G. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 6, p. 427-40, 30 maio 2011.

MILNE, M.; LIEBENBERG, W.; AUCAMP, M. The Stabilization of Amorphous Zopiclone in an Amorphous Solid Dispersion. **AAPS Pharmaceutical Science Technology.** v. 16, n. 5, p. 1190-202, out. 2015.

MYERS, R.; MONTGOMERY, D.; ANDERSON-COOK, C. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. New Yersey: Wiley. 3. ed. 2009.

MONTGOMERY, C.D. Introdução ao controle estatístico da qualidade. 4. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2004. 513p.

MÖSCHWITZER, J. P. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. **International journal of pharmaceutics**. v. 453, n. 1, p. 142-56, 30 ago. 2013.

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, maio 2011.

MURAMBIWA, P. et al. Anti-malarial drug formulations and novel delivery systems: A review. **Acta Tropica,** v. 118, n. 2, p. 71-79, 2011.

NAKACH, M. et al. Engineering of nano-crystalline drug suspensions: employing a physico-chemistry based stabilizer selection methodology or approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, n. 1-2, p. 277-88, 10 dez. 2014.

NATARAJAN, U.; PERIYANAN, P.R.; YANG, S.H. Multiples-response optimization for micro-endmilling process using response surface methodology. **International Journal of Advanced Design & Manufacturing Technology,** n. 56, n. 1/4, p. 177-185. 2011.

NNAMANI, P. O. et al. Development of artemether-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1-2, p. 208-17, 30 dez. 2014.

NOYES, A. A.; WHITNEY, W. R. The rate of solution of solid substances in their own solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 19, n. 12, p. 930-934. 1897

NUTAN, M. T. H.; REDDY, I. K. General Principles of Suspensions. In: KULSHRESHTHA, A.; SINGH, O. **Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing.** New York: Springer. 2010. cap. 2, p. 39-63.

OLLIARO, P. L. et al. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. **Trends in Parasitology,** v. 17, n. 3, p. 122-126, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: update 2015. Geneva: WHO, 2015. 190p. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf?ua=1. Acesso em: 24 novembro 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Malaria Report 2013. Latest report WHO. Geneva: WHO, 2013. 199p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Malaria, Fact sheet N°94, key facts. 2013. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/. Acesso em: 13 maio 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Campaign, World Malaria Day, 25 April 2014. Disponível em: http://www.who.int/campaigns/malaria-day/2014/event/en/. Acesso em: 13 maio 2014.

PANAGIOTOU, T.; FISHER, R. Enhanced Transport Capabilities via Nanotechnologies: Impacting Bioefficacy, Controlled Release Strategies, and Novel Chaperones. **Journal of Drug Delivery**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2011.

PANDIT, N. Princípios Básicos. In: PANDIT, N. **Introdução as ciências Farmacêuticas.** Porto Alegre: Artmed, 2008. v. 1, p. 27-55.

PARK, J. et al. Development and evaluation of decorated aceclofenac nanocrystals. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**, v. 143, p. 206-212, 2016.

PAWAR, J. et al. Development of amorphous dispersions of artemether with hydrophilic polymers via spray drying: Physicochemical and in silico studies. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 11, n. 3, p. 385-395, 2016.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology, p**. 827–840, 2004.

PRATAP, Y. P., MANISHA, P. C., GEETANJALI, K. G., MANISH, A. R., HARSHADA, P. B. Validated spectrophotometric method for quantitative determination of artemether in pharmaceutical formulation. **Der Pharma Chemica,** v. 3, n. 3, p. 135-139, 2011.

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, nov. 2010.

PEUKERT, W.; SCHWARZER, H.-C.; STENGER, F. Control of aggregation in production and handling of nanoparticles. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 44, n. 2, p. 245-252, fev. 2005.

PINHEIRO, L.; FRANCO, S.; ADAGU, I.S.; ROSA, R.; DOROSÁRIO, V.E.; WARHURST, D.C. DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DUPLA 86^{TYR} E 1246^{TYR} no gene pfmdr1 em clones de uma amostra de Plasmodium falciparum da África Ocidental, resistente à cloroquina. **Acta Médica Portuguesa,** n. 16, p. 229-233, 2003.

PLOYPRADITH, P. Development of artemisinin and its structurally simplified trioxane derivatives as antimalarial drugs. **Acta Tropica**, v. 89, n. 3, p. 329-342, fev. 2004.

PYNE, A.; SURANA, R.; SURYANARAYANAN, R. Crystallization of Mannitol below Tg during Freeze-Drying in Binary and Ternary Aqueous Systems. **Pharmaceutical Research.** v. 19, n. 6, p. 901-908. 2002.

QINGHAOSU. Antimalarial Coordinating Research Group. Antimalarial studies on qinghaosu. **Chinese Medical Journal**, v. 92, n. 81, p. 1-6. 1979.

RACHMAWATI, H. et al. Development of curcumin nanocrystal: Physical aspects. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 102, n. 1, p. 204-214, 2013.

RANJITA, S. Nanosuspensions: A new approach for organ and cellular targeting in infectious diseases. **Journal of Pharmaceutical Investigation,** v. 43, n. 1, p. 1-26, 2013.

RAVICHANDRAN, R. Development of an oral curcumin nanocrystal formulation. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine,** v. 3, n. 4, 2012.

RISHNA, S.; UHLEMANN, A.; HAYNES, R. Artemisinins: mechanism of action and potential for resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 233-244. 2004.

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, 30 mar. 2016.

SALAZAR, J.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Combinative Particle Size Reduction Technologies for the Production of Drug Nanocrystals. **Journal of Pharmaceutics.** v. 2014, p. 1-14. 2014.

SALVIO, H.; NOVÁK, C.; MATOS, J.R. Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n.1, p. 367-374, 2009.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 62, n. 4-5, p. 560-575, 2010.

SENN, N. et al. Effectiveness of artemether/lumefantrine for the treatment of uncomplicated plasmodium vivax and P. falciparum malaria in young children in papua New Guinea. **Clinical Infectious Diseases,** v. 56, n. 10, p. 1413-1420, 2013.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 9, p. 1948-1957, 2002.

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. 129-139, 2010.

SHRIVASTAVA, A. et al. New Simple and Economical Spectrophotometric Method for Estimation of Artemether in Pharmaceutical Dosage Forms. Asian **Journal Research Chemical,** v. 1, n. 1, p. 19 – 21. 2008.

SILAMUT, K. et al. Artemether Bioavailability after Oral or Intramuscular Administration in Uncomplicated Falciparum Malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 47, n. 12, p. 3795-3798, 2003.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica.** Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2009, v. único, p. 32-65.

SUN, W.; TIAN, W.; ZHANG, Y.; HE, J.; MAO, S.; FANG, L. Effect of novel stabilizers—cationic polymers on the particle size and physical stability of poorly soluble drug nanocrystals. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.8, p.460–467, 2012.

TAKATSUKA, T. ENDO, T. JIANQUO, Y. HASHIMOTO, N. Nanosizing of Poorly Water Soluble Compounds Using Rotation / Revolution Mixer. **Chem. Pharm. Bull.** v. 57, n. October, 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 Pharmaceutical Sciences Technology**, v. 12, n. 4, p. 1227-33, dez. 2011.

THOMAS, C. G.; Ward, S.A. Selective determination, in plasma, of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,** v. 583, n. 1, p. 131-136. 1992.

TINTO, H. et al. Effectiveness of artesunate-amodiaquine vs. artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Nanoro, Burkina Faso: A non-inferiority randomised trial. **Tropical Medicine and International Health**, v. 19, n. 4, p. 469-475. 2014.

TRINH, T.K.; KANG, L.S. Response surface methodological approach to optimize the coagulation-floculation process in drinking water treatment. **Chemical Engineering Research and Design,** v. 89, n. 7, p. 1126-1135. 2011.

UMAPATHI, P.; AYYAPPAN, J.; DARLIN, S. Development and validation of a Dissolution test method for artemether and lumefantrine in tablets. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research,** v. 10, n. 5, p. 643-653. 2011.

UMEYOR, C. et al. Recent advances in particulate anti-malarial drug delivery systems: A review. **International Journal of Drug Delivery,** v. 5, n. 1, p. 1-14, 2013.

UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral forms based on a biopharmaceutics classifications system. Rockville: FDA, 2015. p. 1-13. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>

URBÁN, P.; FERNÀNDEZ-BUSQUETS, X. Nanomedicine against malaria. **Current Medicinal Chemistry,** v. 21, n. 5, p. 605-629, 2014.

VAN EERDENBRUGH, B. et al. Characterization of physico-chemical properties and pharmaceutical performance of sucrose co-freeze-dried solid nanoparticulate powders of the anti-HIV agent loviride prepared by media milling. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1-2, p. 198-206, 29 jun. 2007.

VAN EERDENBRUGH, B. et al. Drying of crystalline drug nanosuspensions-the importance of surface hydrophobicity on dissolution behavior upon redispersion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 35, n. 1-2, p. 127-35, 2 set. 2008.

VAN EERDENBRUGH, B.; VAN DEN MOOTER, G.; AUGUSTIJNS, P. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization

and transformation into solid products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 1, p. 64-75, 19 nov. 2008.

VAN EERDENBRUGH, B; VERMANT, J.; MARTENS, J.; FROYEN, L.; AUGUSTIJNS, P.; VAN DEN MOOTER, G . A Screening Study of Surface Stabilization during the Production of Drug Nanocrystals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 98, n. 6, p. 2091-2103, 2009.

VEBER, D. F. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

WANG, H.; LIU, Y.; WEI, S.; YAN, Z. Aplication of response surface methodology to optimise supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from C*yperus rotundus* Linn. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 582-587. 2012.

WARD, K.; MATEJTSCHUK, P. The Use of Microscopy, Thermal Analysis, and Impedance Measurements to Establish Critical Formulation Parameter for Freeze-Drying Cycle Development. In: REY, L.; MAY, J. **Freeze-drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products.** New York: informa healthcare. ed. 3. v. 206. p. 112-132. 2010.

WATERBEEMD, H.; LENNERMÄS, H.; ARTURSSON, P. **Drug Bioavailability Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability**. Weinheim: Wiley-VCH. v. 18, p. 1-32.

YANG, H. et al. Investigation of a nanosuspension stabilized by Soluplus® to improve bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 477, p. 88-95, 2014.

YU, L.; MILTON, N.; GROLEAU, E.; MISHRA, D.; VANSICKLE, R. Existence of a mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 88, n. 2, p. 196-198, 1999.

YU, L. X. et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs**. International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1-2, p. 221-227, 2004.

YU, L. X.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; METHA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.L.; LEE, V.H.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiver extension. **Pharmaceutical Research**, v.18, n. 7, p. 921-925. 2002.

YUMINOKI, K. et al. Nano-pulverization of poorly water soluble compounds with low melting points by a rotation / revolution pulverizer. **Pharmazie,** v. 67, n. 8, p. 681-686, 2012.

ZHANG, Y.; LIU, Q.; ZHANG, D.; JIANG, Y. Polymorphism, Crystal structure and Crystal habit of β-artemether. **Journal of Chemical Industry and Engineering**, v. 10, oct. 2011.

ANEXOS

ANEXO A

Participação na Conferência de “Infectious Diseases: Scientific Responses to Economic Challenges and Opportunities” na Univesidade de Alberta (Canada) com apresentação de póster

Artemether Nanocrystals: an innovative antimalarial therapy

I.A.C. Morales [1], N. Bou-Chacra [1], R. Löbenberg [2].

[1]Universidade de Sao Paulo, [2] University of Alberta

Methods

The nanocrystals were prepared using a top-down approach, in this case, wet bead milling in a super reduced scale. The milling chamber consisted of a 10 mL glass bottle filled with 30% (v / v) grinding medium and 50% (v / v) artemether coarse suspension. Magnetic stirring was prepared under the conditions of 800 rpm at 25 ° C, for 4 days. For this technique, the standard formula was used, which contains Artemether (3 % w / w) (Sigma-Aldrich, Brazil), polaxamer 407 (1 % w / w) (Shin-Etsu Ltd., Tokyo) and purified water. Measurements of size distribution and average diameter were performed using laser Dynamic Light Scattering (DLS) and Laser Difraction (LD), respectively.

Results

The nanocrystals presented a particle size distribution in the nanometer scale. The particles size distribution of the micronized artemether by LD was D10: 10.813 $\pm$ 0.14 µm; D50: 28.694 $\pm$ 0.75 and D90: 58.717 $\pm$ 2.78 with z-average: 32.74 + 1.22. After 4 days of milling, the dynamic light scattering (DLS) showed a hydrodynamic mean diameter (HDM) of 356 $\pm$ 18.4 nm with a polydispersity index of 0.411 $\pm$ 0,076. The formulation showed stability over a period of 60 days at 4°C.

Conclusion

The artemether nanocrystals using polaxamer 407 as stabilizer were successfully prepared using the super small-scale approach. The nanocrystals have the potential to improve the physicochemical properties of artemether improving its efficacy.

Background

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

ANEXO B

Participação na AAPS (American Association of Pharmaceuticals Scientist)

Anual meeting 2016 com apresentação de póster.

Artemether Nanocrystals: an innovative antimalarial therapy

I.A.C. Morales [1], N. Bou-Chacra [1], R. Löbenberg [2].
[1]Universidade de Sao Paulo, [2] University of Alberta

Purpose

Nanotechnologies have been used as a pharmaceutical platform for the development of new dosage forms. The reduction of particle size to the nanometer-scale can improve the solubility of the drug. As a result, there is an increase in the oral bioavailability of drugs poorly soluble in water. The high energy milling and high pressure homogenization are among the technologies "top-down" most often used to obtain nanocrystals. However, these conventional methods suffer from disadvantages such as heat generation during pulverization, which makes the heat-labile compounds degrade. In order to solve these problems of production and increase the solubility of the drug, a new approach used in this work is the production of nanocrystals of artemether (low melting point 86 ° C) for " wet bead milling in a super reduced scale ".

Methods

The nanocrystals were prepared using a top-down approach, in this case, wet bead milling in a super reduced scale. The milling chamber consisted of a 10 mL glass bottle filled with 30% (v / v) grinding medium and 50% (v / v) artemether coarse suspension. Magnetic stirring was prepared under the conditions of 800 rpm at 25 ° C, for 4 days. For this technique, the standard formula was used, which contains Artemether (3 % w / w) (Sigma-Aldrich, Brazil), polaxamer 407 (1 % w / w) (Shin-Etsu Ltd., Tokyo) and purified water. Measurements of size distribution and average diameter were performed using laser Dynamic Light Scattering (DLS) and Laser Difraction (LD), respectively.

Results

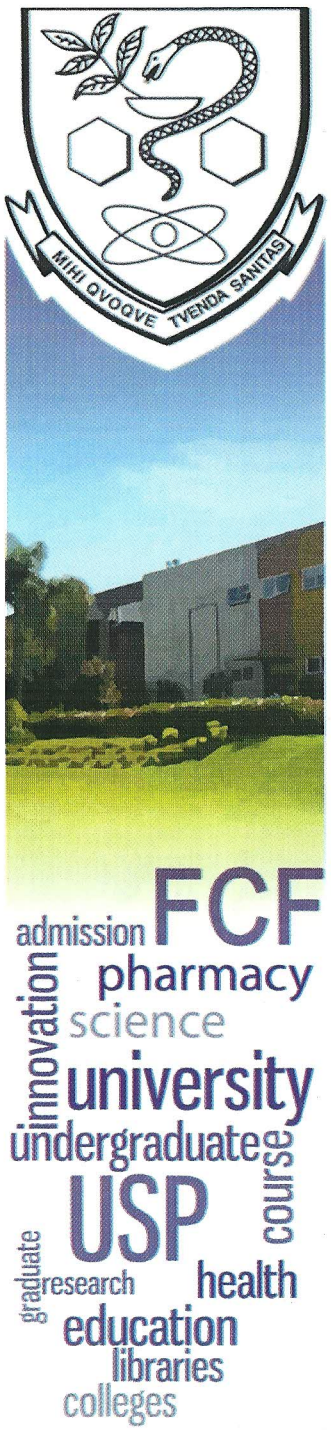
The nanocrystals presented a particle size distribution in the nanometer scale. The particles size distribution of the micronized artemether by LD was D10: 10.813 ± 0.14 µm; D50: 28.694 ± 0.75 and D90: 58.717 ± 2.78 with z-average: 32.74 + 1.22. After 4 days of milling, the dynamic light scattering (DLS) showed a hydrodynamic mean diameter (HDM) of 356 ± 18.4 nm with a polydispersity index of 0.411 ± 0,076. The formulation showed stability over a period of 60 days at 4°C.

Conclusion

The artemether nanocrystals using polaxamer 407 as stabilizer were successfully prepared using the super small-scale approach. The nanocrystals have the potential to improve the physicochemical properties of artemether improving its efficacy.

Background

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

XXI semana farmacêutica de Ciência e Tecnologia

Certificado

Certificamos que **IVAN CORDOVA MORALES** apresentou o trabalho "A NEW APPROACH LOW COST OF PRODUCTION: NANOCRYSTALS ARTEMETHER", de autoria de Ivan Cordova Morales (M), Grégori Bahú Romero (D), Nádia Araci Bou-Chacra, na XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, realizada no período de 26 a 30 de setembro de 2016, tendo recebido o prêmio de melhor apresentação em forma de pôster na categoria de Mestrado.

São Paulo, 30 de setembro de 2016.

Prof. Dr. Flávio Finardi Filho

Presidente da Comissão de Avaliação de Pôsteres

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP