

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

**Obtenção de Gel Mucoadesivo de Nistatina para o Tratamento  
da Candidíase Oral. Desenvolvimento e Caracterização de  
Dispersões Sólidas de Nistatina**

Michelle Maria Gonçalves Barão de Aguiar

Tese para Obtenção do Título de  
**DOUTOR**

Orientador: Profa. Dra. Cristina Helena  
dos Reis Serra

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

**Obtenção de Gel Mucoadesivo de Nistatina para o Tratamento  
da Candidíase Oral. Desenvolvimento e Caracterização de  
Dispersões Sólidas de Nistatina**

Michelle Maria Gonçalves Barão de Aguiar

Versão Corrigida conforme resolução CoPGr 6018.  
A versão original encontra-se disponível  
no Serviço de Pós-graduação da FCF/USP

Tese para Obtenção do Título de  
**DOCTOR**

Orientador: Profa. Dra. Cristina Helena  
dos Reis Serra

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Ficha Catalográfica**

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

A282o Aguiar, Michelle Maria Gonçalves Barão de  
Obtenção de gel mucoadesivo de nistatina para o tratamento da candidíase oral. Desenvolvimento e caracterização de dispersões sólidas de nistatina / Michelle Maria Gonçalves Barão de Aguiar. -- São Paulo, 2015.  
211p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Serra, Cristina Helena dos Reis

1. Tecnologia farmacêutica 2. Candidíase 3. Solubilidade  
4. Fármacos I. T. II. Serra, Cristina Helena dos Reis, orientador.

615.4 CDD

Michelle Maria Gonçalves Barão de Aguiar

**Obtenção de Gel Mucoadesivo de Nistatina para o Tratamento da Candidíase Oral. Desenvolvimento e Caracterização de Dispersões Sólidas de Nistatina**

Comissão Julgadora  
da

Tese para Obtenção do Título de **DOUTOR**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cristina Helena dos Reis Serra (orientador/presidente)  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral (1<sup>o</sup> examinador)  
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Marlus Chorilli (2<sup>o</sup> examinador)  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de  
Mesquita Filho

---

Prof. Dr. Newton Andreó Filho (3<sup>o</sup> examinador)  
Instituto de Ciências ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal  
de São Paulo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vladi Olga Consiglieri (4<sup>o</sup> examinador)  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

São Paulo, 04 de abril de 2016.

---

*Michelle Maria Gonçalves Barão de Aguiar*

## Dedicatória

*Dedico esse trabalho árduo, longo e prazeroso ao meu filho **Miguel**. Você esteve ao meu lado, ainda na barriga, enquanto eu participava do processo seletivo para o ingresso no doutorado. Por saber que voltaria para casa todos os dias e veria seu sorriso, eu me sentia pronta para mais um dia de batalha!*

*“O desenvolvimento da ciência e das atividades criativas do espírito exige uma liberdade que consiste na independência do pensamento em relação às restrições do preconceito autoritário e social.*

**Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por atender a todas minhas preces, pela força que me deu nos momentos difíceis e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho. Agradeço ainda pela minha família linda e abençoada que me deu, e que no meio do processo de escrita do projeto, me deu a maior alegria da minha vida: meu querido bebê Miguel. O Senhor me fez perceber que de todas as coisas que ansiava em minha vida, ser mãe me fez me sentir a pessoa mais completa, feliz e tranquila, que jamais pensei que seria. Obrigada meu Deus, pelos presentes maravilhosos que recebi, quando cheguei ao estado de São Paulo.*

*Agradeço à Professora Cristina Serra, querida orientadora, que me abriu as portas do Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade e foi minha porta de entrada na Universidade de São Paulo, um lugar que aprendi a amar. À professora, serei eternamente grata pelas suas palavras de incentivo e sua orientação em novas áreas científicas para mim. Tive, assim, a oportunidade que buscava no doutorado, em aprender novas áreas. Querida Professora Cris, obrigada!*

*Agradeço ao meu querido Miguel, meu filho, que entrou na minha vida de modo repentino. Eu, que me via tão segura e autoconfiante, me deparei com a missão de ser mãe, e por um momento me vi despreparada. Mas quando o vi pela primeira vez no ultrassom, e sentia você crescendo na minha barriga, eu me sentia forte e sabia que ser mãe era o que eu precisava na minha vida, mesmo sem saber. Meu bebê, você passou todas as etapas do doutorado ao meu lado e sua força e sorriso me estimularam para alcançar meus objetivos. Espero ser um bom exemplo e dar a você tudo que precisa. Mamãe te ama, Gurinho!*

*Agradeço ao meu marido Ricardo, zeloso, prestativo, carinhoso e compreensivo. Desde o começo, você me apoiou, quando ainda morávamos em Itapeva e eu sonhava em fazer o doutorado. Então, para me fazer feliz, você pede transferência para outra cidade, me apoia em todas as etapas e ainda cuida do nosso filho, levando-o e buscando-o na escola, para que possa me dedicar à pesquisa. As jornadas longas*

*de ônibus de Sorocaba a São Paulo foram aliviadas quando via seu rosto a me esperar na chegada, com seu sorriso cativante. Meu amor, te amo e obrigada por tudo!*

*Agradeço aos meus queridos pais Luiz e Gina, por todos os anos de cuidado, incentivo, amor e carinho. Hoje posso dizer que o que sou é fruto de toda dedicação, zelo e alegria com cada coisa simples que fazia, e que alegrava o coração de vocês. Sempre pude seguir em frente, porque ao olhar para trás, com medo e excitante, via os rostos de vocês afetuosos e me encorajando, e isso me enchia de determinação para seguir em frente. Pai e mãe, sempre serei a eterna garotinha de vocês.*

*Agradeço ao vovô Justo e à vovó Lolô, in memoriam, pelas lindas tardes que passei em sua casa durante minha infância. Se fechar os olhos, ainda posso sentir o cheiro da casa, ouvir suas vozes e até correr pelo corredor... Momentos felizes que nunca esquecerei! Agradeço ainda a vovó Domingas pelo seu carinho.*

*Agradeço aos Professores Dr. Jivaldo Matos e Dra. Myriam Krasilchik, pelas disciplinas Introdução de Métodos Termoanalíticos e Metodologia do Ensino Superior, respectivamente. Além de aprender com conteúdo técnico, puder me deparar com 2 professores que amam a profissão e se dedicam a ela de corpo e alma. Foi revigorante ver que, apesar de anos de docência, o brilho nos olhos e o entusiasmo de entrar em uma sala de aula não se perde com o tempo. Vocês são um exemplo a ser seguido.*

*Agradeço ao Professor Dr. Humberto Ferraz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, por permitir que realizasse todas as análises térmicas, em seu laboratório. Obrigada por ceder os equipamentos necessários, que foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.*

*Agradeço à Professora Dra. Camila Dornellas, da Universidade Federal de Alagoas, por realizar as análises de difração de raio-X e espectroscopia de infravermelho em seu laboratório. Obrigada ainda por toda ajuda, nas discussões, da troca de informações, por abrir as portas para novos projetos. Cami, querida amiga, você sempre terá um lugar especial no meu coração!*

*Agradeço à Professora Dra. Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas, do Instituto de Química-USP, por ceder o equipamento reômetro, para as análises de comportamento reológico dos géis desenvolvidos. Obrigada, pela ajuda com esse assunto novo para mim, com o aprendizado que me foi passado por uma especialista competente, e de bom coração.*

*Agradeço à Professora Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp, por permitir o uso dos equipamentos células de Franz e texturômetro, e ajuda com experimentos e com aprendizado por uma especialista no assunto.*

*Agradeço ao Professor Robson, do Instituto Butantã, por permitir o uso do liofilizador, que foi útil para o preparo de umas das formulações, sendo importante, para avaliar o próprio processo de produção deste trabalho.*

*Agradeço aos queridos amigos que fiz na pós-graduação, que deixaram todo o processo mais divertido! Obrigada aos amigos Alberto Vetore, Amanda Forte, Camila Areias, Claudineia Pinto, Cristiane Barbeiro, Daniela Perez, Fabiane Lacerda, Jéssica Zaghi, José Eduardo, Marc Strausser, Marcelo Duque, Marcelo Guimarães, Mariane Fernandes, Michelli Dario, Michele Issa, Thamires Freire, Thalita Candido, Thayane Araújo, Roxana Flores e Soraya Santos. Nós choramos e nos divertimos muito!*

*Agradeço aos queridos amigos do Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade Francinalva Medeiros, Juliana Rossato, Marina Silva, Rafael Melo, Rafael Paraíso pelo convívio diário, pela ajuda nas diversas etapas, nas preocupações, troca de informações, cafés e almoços divertidos no bandeirão. Fico muito feliz pelas amizades construídas e que levarei em meu coração!*

*Agradeço aos técnicos de laboratório Edgar Machado e Eremita Santos, que me ajudaram em vários momentos, e também pelas risadas dadas nos corredores dessa nossa universidade.*

*Agradeço de modo especial e com carinho a alguns "anjos" que encontrei pelo meu caminho, e que me deram grande ajuda em assuntos específicos da área acadêmica, nos quais eu iniciava meu aprendizado. Assim, agradeço à amiga Amanda Forte pela ajuda com análise térmica e o programa Origin. Agradeço à Marina Silva pela ajuda e com as análises de HPLC, onde nossas conversas foram muito importantes. Agradeço à Marize Gouveia pelas conversas regadas à café sobre dispersão sólida, sistema que adorei trabalhar. Agradeço ainda à Thais Bioni, aluna de mestrado do IQ, que respondeu gentilmente ao pedido da Profa. Elizabeth Arêas, e muito me ajudou nas análises de reologia. Agradeço a Juliana Barbosa pelas trocas e ajuda nos ensaios de PAMPA. Por fim, agradeço à Gina Polo, com as análises estatísticas do ensaio de solubilidade.*

*Agradeço aos meus queridos colegas de fretado Eric Barioni, Michelle Klein e Mayra Rodrigues, pelas infinitas horas de conversas, risadas, cafés da manhã e lanches da tarde.*

*Agradeço às empresas Fundação para o Remédio Popular e a Lubrizol pela doação de materiais para o desenvolvimento desse projeto. Sou grata pela presteza e ajuda, que foram importantes para mim e para universidade.*

*Agradeço aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial ao David, Jorge e Alexandre, pela ajuda e apoio em diversos momentos.*

*Agradeço aos queridos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, que encontrei pelo caminho, que me ensinaram vários assuntos, e me mostraram como a vida na docência é inspiradora e sem rotinas.*

*Agradeço aos meus queridos professores da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que me ensinaram os conceitos básicos na minha formação de farmacêutica. Em especial agradeço à Professora Dra. Ana Luíza Palhares, que muito me ensinou sobre o pensamento científico, em meu estágio de iniciação científica. Agradeço também aos queridos Professores Dr. Lúcio Mendes Cabral e Dra. Carla Holandino, queridos orientadores do mestrado, e que com vocês muito pude aprender.*

*Agradeço ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico, de pela concessão da bolsa de doutorado.*

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	I
LISTA DE QUADROS .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE TABELAS .....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
RESUMO.....	XX
ABSTRACT .....	XXII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 Objetivo Geral .....	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	6
3.1 Candidíase Oral .....	7
3.1.1 Formas Clínicas da Candidíase Oral .....	11
3.1.1.1 Candidíase Pseudomembranosa.....	13
3.1.1.2 Candidíase Eritematosa.....	13
3.1.1.3 Candidíase Hiperplásica .....	15
3.1.1.4 Candidíase Mucocutânea .....	15
3.1.2 O Gênero <i>Candida</i> .....	16
3.2 Nistatina (NYS) .....	17
3.2.1. Apresentações Farmacêuticas contendo NYS .....	20
3.3 Dispersões Sólidas .....	22
3.3.1 Classificação das Dispersões Sólidas conforme às Características de Partícula.....	27

3.3.2 Métodos de Preparo das Dispersões Sólidas .....	28
3.3.3 Carreadores Empregados nas Dispersões Sólidas .....	29
3.3.4 Caracterização das Dispersões Sólidas .....	31
3.4 Mucoadesão.....	31
3.4.1 A Cavidade Oral.....	32
3.4.1.2 Mucosa Oral .....	33
3.4.1.3 Teorias da Mucoadesão .....	34
3.4.1.4 Sistemas Mucoadesivos Oraís.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Materiais .....	40
4.1.1 Matérias-primas .....	40
4.1.2 Reagentes e Solventes.....	40
4.1.3 Equipamentos.....	41
4.2 Métodos .....	44
4.2.1 Obtenção e Caracterização de Dispersões Sólidas de Nistatina .....	44
4.2.1.1 Avaliação da Qualidade da Nistatina Matéria-prima .....	44
4.2.1.1.1 Distribuição do Tamanho de Partícula .....	44
4.2.1.1.2 Determinação do Teor de NYS MP pelo Método de Difusão em Ágar .....	44
4.2.1.1.3 Determinação do Teor de NYS MP pelo Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	44
4.2.1.2 Obtenção de Dispersões Sólidas de Nistatina (NYS DS) .....	45
4.2.1.2.1 Obtenção de NYS DS pelo Método de Eliminação do Solvente com Uso de Evaporador Rotativo .....	46
4.2.1.2.3 Preparo das Misturas Físicas de NYS e Carreadores .....	49
4.2.1.3 Caracterização das NYS DS.....	50
4.2.1.3.1 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	51
4.2.1.3.2 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG) .....	51

4.2.1.3.3 Avaliação da Solubilidade das NYS DS.....	52
4.2.1.4.3 Teor da NYS DS .....	55
4.2.1.4.4 Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) .....	55
4.2.2 Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos Oraís de NYS DS....	58
4.2.2.1 Seleção da Base para os Géis Mucoadesivos Oraís de NYS DS .....	58
4.2.2.2 Caracterização dos Géis Bases.....	60
4.2.2.2.1 Ensaio Sensoriais .....	60
4.2.2.2.2 pH .....	60
4.2.2.2.3 Caracterização Reológica .....	60
4.2.2.3 Obtenção dos Géis Mucoadesivos contendo NYS DS G2 (49) e NYS MP .....	61
4.2.2.4 Caracterização dos Géis Mucoadesivos Oraís .....	63
4.2.2.5 Avaliação da Liberação de NYS a partir dos Géis Mucoadesivos .....	63
4.2.2.6 Teor de NYS contida nos Géis Mucoadesivos.....	64
4.2.2.7 Avaliação da Mucoadesão dos Géis Mucoadesivos por meio de Ensaio <i>ex vivo</i> .....	64
4.2.2.7.1 Preparo da Mucosa Oral Porcina.....	64
4.2.2.7.2 Ensaio de Mucoadesão <i>ex vivo</i> .....	65
4.2.3 Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos.....	66
4.2.3.1 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por CLAE para Quantificação de NYS MP .....	67
4.2.3.1.1 Linearidade .....	67
4.2.3.1.2 Precisão .....	68
4.2.3.1.3 Exatidão .....	68
4.2.3.1.4 Especificidade.....	68
4.2.3.1.5 Determinação de Teor de NYS MP pelo Método de CLAE.....	69
4.2.3.2 Desenvolvimento e Validação do Método por Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta para Quantificação da NYS nas DS.....	69

4.2.3.2.1 Linearidade .....	69
4.2.3.2.2 Precisão .....	70
4.2.3.2.3 Exatidão .....	70
4.2.3.3 Desenvolvimento e Validação de Método por CLAE para Quantificação de NYS contida nos Géis Mucoadesivos .....	71
4.2.3.3.1 Linearidade .....	71
4.2.3.3.2 Precisão .....	72
4.2.3.3.3 Exatidão .....	72
4.2.3.3.4 Especificidade .....	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
5.1 Obtenção e Caracterização de Dispersões Sólidas de Nistatina (NYS DS) ....	74
5.1.1 Avaliação da Qualidade da Nistatina Matéria-prima (NYS MP) .....	74
5.1.1.2 Determinação do Teor de NYS MP pelos Métodos de Difusão em Ágar e CLAE .....	75
5.1.2 Obtenção de dispersões sólidas de NYS (NYS DS) .....	76
5.1.3 Caracterização das NYS DS Obtidas .....	81
5.1.3.1 Análise Térmica .....	82
5.1.3.1.1 Análise Térmica de NYS e Carreadores .....	83
5.1.3.1.2 Análise Térmica das NYS DS Obtidas .....	97
5.1.3.2 Avaliação da Solubilidade .....	124
.....	132
5.1.3.3. Caracterização Complementar de NYS DS .....	133
5.1.3.3.1 Difração de Raio-X.....	133
5.1.3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier .....	135
5.1.3.3.3 Permeabilidade em Membrana Paralela.....	136
5.1.3.3.4 Teor da NYS DS .....	139
5.1.3.4 Conclusão Parcial da Obtenção e Caracterização de Dispersão Sólida de NYS .....	139

5.2 Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos Orais de NYS DS.....	142
5.2.1 Seleção da Base para os Géis Mucoadesivos Orais de NYS DS.....	142
5.2.2 Caracterização dos Géis Bases.....	143
5.2.2.1 Ensaio Sensoriais e pH.....	143
5.2.2.2 Caracterização Reológica dos Géis Base.....	145
5.2.3 Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos NYS DS e NYS MP .....	156
5.2.3.1 Obtenção dos Géis Mucoadesivos NYS DS e NYS MP .....	156
5.2.3.2 Caracterização dos Géis Mucoadesivos NYS DS G2 (49) e NYS MP ..	158
5.2.3.2.1 Ensaio Sensoriais e pH.....	158
5.2.3.2.2 Caracterização Reológica.....	160
5.2.3.2.3 Avaliação da Liberação de NYS contida nos Géis Mucoadesivos .....	163
5.2.3.2.4 Teor de NYS contida nos Géis Mucoadesivos.....	165
5.2.3.2.5 Avaliação da Mucoadesão dos Géis.....	166
5.2.3.2.6 Conclusão Parcial da Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos NYS DS e NYS MP.....	167
5.3 Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos.....	169
5.3.1 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por CLAE para a Quantificação de NYS MP .....	169
5.3.1.1 Linearidade .....	173
5.3.1.2 Precisão e Exatidão .....	175
5.3.1.3 Especificidade.....	176
5.3.2 Desenvolvimento e Validação do Método por Espectrometria de Absorção no Ultravioleta para Quantificação de NYS nas DS.....	178
5.3.2.1 Linearidade .....	179
5.3.2.2 Precisão e Exatidão .....	181
5.3.2.3 Especificidade.....	182

5.3.3. Desenvolvimento e Validação de Método de CLAE para Quantificação de NYS contida do Géis Mucoadesivos.....	183
5.3.3.1 Linearidade .....	183
5.3.3.2 Precisão e Exatidão .....	183
5.3.3.3 Especificidade.....	184
6. CONCLUSÕES .....	185
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	188

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Formas clínicas de candidíases (adaptado de COLOMBO et al., 2013).	09
Quadro 2	Fatores predisponentes para a candidíase oral (COLOMBO et al., 2013; GIANNINI, SHETTY, 2011; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010; MARX, STERN, 2003; NETO, DANESI, UNFER, 2005; RAUTEMAA, RAMAGE, 2011; STOOPLER, SOLLECITO, 2014).	10
Quadro 3	Manifestações clínicas da candidíase oral (adaptado de NEVILLE et al., 2009).	12
Quadro 4	Formas farmacêuticas contendo NYS para o tratamento de infecções fúngicas e tipo e local de administração (DrugBank, 2015; LAW et al., 2014; GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003; NEVILLE et al., 2009; STEFANOVIC et al., 2012; THOMPSON, 2002).	21
Quadro 5	Medicamentos disponíveis no mercado que apresentam dispersões sólidas (MOOTER, 2012; TIWARI et al., 2009).	25
Quadro 6	Quadro 6 – Tipos de dispersões sólidas conforme tipo de partícula (adaptado de DHIRENDRA et al. 2009).	28
Quadro 7	Exemplos de carreadores usados em dispersões sólidas (ALVES et al., 2012; LEUNER, DRESSMAN, 2000; SAKEER et al., 2010; VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).	30
Quadro 8	Composição das soluções tampão usadas no ensaio de solubilidade (USP, 2011).	53
Quadro 9	Composição da solução tampão fosfato pH 7,4 usadas no ensaio de PAMPA (USP, 2011).	57
Quadro 10	Composição da saliva artificial usada no ensaio de mucoadesão <i>ex vivo</i> (CUBAYACHI et al., 2015).	66
Quadro 11	Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (52) e da NYS DS G2 (52), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	125

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da NYS (F. Bras., 2010).	18
Figura 2	Classificação das dispersões sólidas (adaptado de VANSCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007; VO, PARK, LEE, 2013).	26
Figura 3	Esquema das fases de contato e consolidação no processo de mucoadesão.	35
Figura 4	Seção transversal da montagem de um sanduiche de PAMPA. (A) Placa receptora de 96 poços contendo o filtro de PVDF impregnado com solução de colesterol e fosfatidil colina e placa doadora de 96 poços. (B) Compartimento receptor composto pela solução tampão de pH 7,4 e compartimento doador contendo uma solução de pH variável com o fármaco dissolvido. (C) Montagem do sanduíche de PAMPA (adaptado de CHEN et al., 2007).	56
Figura 5	Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH CORPORATION, 2004).	64
Figura 6	Fotografia da formulação NYS DS G2 (49), contendo NYS e Polo 188 na proporção de 1:1, durante a etapa de pulverização em gral de porcelana.	79
Figura 7	Fluxograma das técnicas empregas para caracterização das NYS DS, e a sequência usada, de acordo com os resultados obtidos.	82
Figura 8	Curva DSC da NYS obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.	85
Figura 9	Curva TG/DTG da NYS obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	85
Figura 10	Estruturas das NYS A1, A2 e A3 (adaptado de BRESCANSIN, 2006).	86
Figura 11	Curva DSC da lactose obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.	87
Figura 12	Curva TG/DTG da lactose obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	88
Figura 13	Curva DSC do HPMC obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.	89
Figura 14	Curva DSC do methocel K4M, obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (50mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.	90
Figura 15	Curva TG/DTG do HPMC, obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	90

Figura 16	Curva TG/DTG do methocel K4M, obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	91
Figura 17	Curva DSC do Polo 188 obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (50mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.	92
Figura 18	Curva TG/DTG do Polo 188 obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	93
Figura 19	Curva DSC do Polo 407 obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (50mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.	94
Figura 20	Curva TG/DTG do Polo 407 obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	94
Figura 21	Curvas DSC da NYS, da lactose, da NYS MF (4) e da NYS DS G1 (4), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.	98
Figura 22	Curvas TG/DTG da NYS, da lactose, da NYS MF (4) e da NYS DS G1 (4), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	99
Figura 23	Curvas TG/DTG da NYS, da lactose, da NYS MF (4) e da NYS DS G1 (4), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	100
Figura 24	Curvas TG/DTG da NYS, do HPMC, NYS MF (6), e da NYS DS G1 (6), obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	101
Figura 25	Curvas TG/DTG da NYS, do HPMC, NYS MF (6), e da NYS DS G1 (6), obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	102
Figura 26	Curvas TG/DTG da NYS, do methocel, da NYS MF (7), e da NYS DS G1 (7), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	103
Figura 27	Curvas DSC da NYS, do methocel, NYS MF (14), NYS DS G1 (14), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.	104
Figura 28	Curvas TG/DTG da NYS, do methocel, NYS MF (14) e NYS DS G1 (14), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min),	105

- razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.
- Figura 29 Curvas TG/DTG da NYS, do methocel, NYS MF (14) e NYS DS G1 (14), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 106
- Figura 30 Curvas TG/DTG da NYS, do methocel, NYS MF (14) e NYS DS G1 (14), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 107
- Figura 31 Curvas TG/DTG da NYS, do methocel, NYS MF (14) e NYS DS G1 (14), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 108
- Figura 32 Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (46), e da NYS DS G2 (46), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 109
- Figura 33 Curvas DSC da NYS, do Polo 407, da NYS MF (47) e da NYS DS G2 (47), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min. 110
- Figura 34 Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (47), e NYS DS G2 (47), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 111
- Figura 35 Curvas DSC da NYS, do Polo 407, da NYS MF (48) e da NYS DS G2 (48), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min. 112
- Figura 36 Curvas TG/ da NYS, do Polo 407, da NYS MF (48) e da NYS DS G2 (48), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 113
- Figura 37 Curvas DSC da NYS, do Polo 407, da NYS MF (A) e da NYS DS (A), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min. 114
- Figura 38 Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (A) e da NYS DS (A), obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 115
- Figura 39 Curvas DSC da NYS, do Polo 188, da NYS MF (49), e da NYS DS G2 (49), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min. 116

- Figura 40 Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (49), e da NYS DS G2 (49), obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 117
- Figura 41 Curvas DSC da NYS, do Polo 188, NYS MF (50) e NYS DS G2 (50), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min. 118
- Figura 42 Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, NYS MF (50) e NYS DS G2 (50), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 119
- Figura 43 Curvas DSC da NYS, do Polo 188, da NYS MF (51), e da NYS DS G2 (51), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min. 120
- Figura 44 Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (51), e da NYS DS G2 (51), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 121
- Figura 45 Curvas DSC da NYS, do Polo 188, da NYS MF (52) e da NYS DS G2 (52), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min 122
- Figura 46 Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (52) e da NYS DS G2 (52), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente. 123
- Figura 47 Solubilidade da NYS MP, NYS DS (A), NYS MF (A), NYS DS G2 (47), NYS MF (47), NYS DS G2 (48), NYS MF (48), NYS DS G2 (49) e NYS MF (49) em diferentes meios (água; tampão acetato pH 5,5; tampão fosfato pH 7,0), sob temperatura de 37°C, após 72 h com uso da técnica de *shake-flask*. Os valores representam média de 3 determinações. 131
- Figura 48 Difrátogramas de NYS MP, Polo 188, NYS MF (49) e NYS DS G2 (49). 138
- Figura 49 Espectro de absorção de infravermelho com transformada de Fourier de NYS MP, Polo 188, NYS MF (49) e NYS DS G2 (49), entre 4100 e 100 cm<sup>-1</sup> 135
- Figura 50 Permeabilidade efetiva (\*10<sup>-6</sup> cm/s) de NYS MP, NYS DS G2 (49), NYS MF (49), ranitidina e metoprolol, com uso dos pH 5,5 e 7,0 no compartimento doador. Os resultados referem-se à média de 4 determinações. 137
- Figura 51 Fotografia de uma porção, retirada com a espátula, dos géis base de carbopol<sup>®</sup> (na primeira fileira), de noveon<sup>®</sup> (na segunda fileira) e de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup> (nas terceiras e quarta fileiras). 142

Figura 52	Curvas de viscosidades de géis base de carbopol <sup>®</sup> (C1, C2, C3 e C4): (A) a 25 °C entre 0 e 1400 Pa.s; (B) 25 °C entre 0 a 500 Pa.s; (C) 37 °C entre 0 e 8000 Pa.s; (D) 37 °C entre 0 e 500 Pa.s	150
Figura 53	Reogramas dos géis base de carbopol <sup>®</sup> (C1, C2, C3 e C4): (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.	151
Figura 54	Curvas de viscosidades de géis base de noveon <sup>®</sup> (N1, N2, N3 e N4): (A) 25 °C entre 0 e 5000 Pa.s; (B) 25 °C entre 0 e 500 Pa.s; (C) 37 °C entre 0 e 6000 Pa.s; (D) 37 °C entre 0 e 500 Pa.s.	152
Figura 55	Reogramas dos géis base de noveon <sup>®</sup> (N1, N2, N3 e N4): (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.	153
Figura 56	Curvas de viscosidades de géis base de carbopol <sup>®</sup> e noveon <sup>®</sup> (CN1, CN2, CN3, CN4, CN5, CN6): (A) a 25 °C entre 0 e 3500 Pa.s; (B) a 25 °C entre 0 e 500 Pa.s; (C) a 37 °C entre 0 e 5000 Pa.s; (D) a 37 °C entre 0 e 500 Pa.s.	154
Figura 57	Reogramas dos géis base de carbopol <sup>®</sup> e noveon <sup>®</sup> (CN1, CN2, CN3, CN4, CN5 e CN6): (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.	155
Figura 58	Reogramas dos géis base de carbopol <sup>®</sup> e noveon <sup>®</sup> (CN1, CN2, CN3, CN4, CN5 e CN6): (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.	157
Figura 59	Curvas de viscosidades de géis OO, A, B, C e D: (A) 25 °C entre 0 e 14000 Pa.s; (B) 25 °C entre 0 e 500 Pa.s. (C) 37 °C entre 0 e 14000 Pa.s; (D) 37 °C entre 0 e 500 Pa.s.	161
Figura 60	Reogramas dos géis base de géis OO, A, B, C e D: (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.	162
Figura 61	Perfis de liberação de NYS a partir de géis mucoadesivos.	165
Figura 62	Cromatograma de uma solução de NYS MP a 0,05 mg/mL (solvente fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Pico principal em 7,33 min e área de 2 239 485 mAU.min (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); volume de injeção: 20 µL).	172
Figura 63	Curva analítica obtida a partir das análises das soluções de NYS em diferentes concentrações por CLAE com detecção espectrofotométrica em 305 nm, nas condições descritas na Tabela 13. Cada ponto representa a média de 3 determinações.	174
Figura 64	Cromatograma (A): de uma solução de NYS padrão a 0,10 mg/mL (solvente fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Pico principal em 6,79 min e área de 5 621 991 mAU.min (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); Volume de injeção: 20 µL). (B) Cromatograma de uma solução de NYS MP a 0,05 mg/mL (solvente fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Pico principal em 7,33 min e área de 2 239 485 mAU.min (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel	175

- metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); Volume de injeção: 20  $\mu$ L).
- Figura 65 Cromatogramas (A): de uma solução NYS MP a 0,75 mg/mL 177 (solvente fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m. Pico principal em 6,797 min e área de 5 621 991 mAU.min (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); Volume de injeção: 20  $\mu$ L). (B): fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); Volume de injeção: 20  $\mu$ L).
- Figura 66 Curvas analíticas obtidas a partir das soluções de NYS padrão, 180 em concentrações entre 10,0 a 80,0  $\mu$ g/mL, com uso de espectrofotometria de absorção no UV (279 nm). Cada ponto refere-se à média de 3 determinações. (A) Solvente: água, (B) Solvente: tampão fosfato pH 7,0, (C) Solvente: tampão acetato pH 5,5.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das NYS DS com carreadores do Grupo 1, indicando as quantidades de fármaco e carreadores.	47
Tabela 2	Composição das NYS DS com carreadores do Grupo 2, indicando as quantidades de fármaco e carreadores.	48
Tabela 3	Composição da NYS DS (A), indicando as quantidades de fármaco e carreador.	49
Tabela 4	Composição das NYS MF, indicando as quantidades de fármaco e de carreadores.	50
Tabela 5	Descrição das preparações farmacêuticas que foram analisadas no ensaio de solubilidade (entre parênteses são apresentados os números das formulações desenvolvidas e descritas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4).	52
Tabela 6	Descrição das formulações base de apenas de carbopol 934 PNF <sup>®</sup> ou noveon AA1 <sup>®</sup> .	59
Tabela 7	Descrição das formulações base de carbopol 934 PNF <sup>®</sup> e noveon AA1 <sup>®</sup> .	60
Tabela 8	Descrição da composição dos géis de NYS DS G2 (49) e NYS MP.	62
Tabela 9	Parâmetros cromatográficos empregados na validação do método analítico.	67
Tabela 10	Distribuição do tamanho de partícula da NYS MP.	74
Tabela 11	Resultados de teor/doseamento de NYS MP, com emprego dos métodos de difusão em ágar e CLAE.	76
Tabela 12	Resultados de obtenção das dispersões sólidas de NYS com os diversos carreadores e equipamentos diferentes.	80
Tabela 13	Eventos encontrados nas curvas DSC e TG/DTG da NYS, lactose, HPMC, methocel, Polo 188 e Polo 407.	96
Tabela 14	Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (52) e da NYS DS G2 (52), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.	130
Tabela 15	Valores médios de permeabilidade efetiva em função do pH e valores de desvio padrão. Os valores de permeabilidade foram expressos em *10 <sup>-6</sup> cm/s (n=3).	137
Tabela 16	Características sensoriais dos géis de carbopol <sup>®</sup> , noveon <sup>®</sup> e a mistura de carbopol <sup>®</sup> e noveon	144
Tabela 17	Valores de pH dos géis de carbopol <sup>®</sup> , noveon <sup>®</sup> e a mistura de carbopol <sup>®</sup> e noveon <sup>®</sup> .	144
Tabela 18	Valores de pH dos géis de carbopol <sup>®</sup> , noveon <sup>®</sup> e a mistura de carbopol <sup>®</sup> e noveon <sup>®</sup> .	149
Tabela 19	Características sensoriais dos géis OO, A, B, C e D.	159

Tabela 20	Valores de pH dos géis OO, A, B, C e D.	
Tabela 21	Teor de NYS contida nos géis mucoadesivos orais OO, A, B, C e D.	165
Tabela 22	Força de mucoadesão e trabalho de mucoadesão dos géis OO, A, B, C e D.	167
Tabela 23	Condições cromatográficas testadas de fluxo e fase móvel para o desenvolvimento do método analítico por CLAE.	171
Tabela 24	Tempo de retenção (minutos) e área de pico obtidos após as análises por CLAE. Os valores representam a média de 3 determinações.	172
Tabela 25	Condições cromatográficas usadas no ensaio de doseamento de NYS MP por CLAE.	173
Tabela 26	Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico por CLAE com detecção por espectrofotometria de absorção no UV (305 nm), concentração de 0,05 a 0,75 mg/mL.	174
Tabela 27	Precisão intra-corrída e inter-corrída e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de NYS por CLAE com detecção por UV. Cada valor representa uma média de três determinações (n=3).	176
Tabela 28	Condições do ensaio por espectrofotometria para o desenvolvimento do método analítico para quantificação de NYS nas DS.	179
Tabela 29	Parâmetros relativos às curvas analíticas do método analítico por espectrofotometria de absorção no UV, concentrações de 10,0 a 70,0 µg/mL.	179
Tabela 30	Precisão e exatidão referentes ao método analítico por espectrofotometria de absorção no UV para quantificação de NYS em água; tampão fosfato pH 7,0; e tampão acetato pH 5,5. Cada valor corresponde a uma média de 3 determinações.	182
Tabela 31	Precisão intra-corrída e inter-ensaio e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de NYS por CLAE com detecção por UV. Cada valor representa uma média de três determinações.	184

---

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

---

---

- a – Coeficiente angular
- AIDS – *Acquired immunodeficiency syndrome* / Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- b – Coeficiente linear
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- DMF – N,N-dimetilformamida
- DMSO – Dimetilsufóxido
- DP – Desvio padrão
- DRX – Difração de raio-X
- DS – Dispersão sólida
- DSC – Calorimetria diferencial exploratória
- DTG – Termogravimetria derivada
- FDA – *Food Drug Administration*
- FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- FURP – Fundação para o Remédio Popular
- Gel C1 – gel base de carbopol<sup>®</sup> a 0,5 %p/v
- Gel C2 – gel base de carbopol<sup>®</sup> a 1,0 %p/v
- Gel C3 – gel base de carbopol<sup>®</sup> a 1,5 %p/v
- Gel C4 – gel base de carbopol<sup>®</sup> a 2,0 %p/v
- Gel CN1 – gel base de carbopol<sup>®</sup> 0,25 %p/v e noveon<sup>®</sup> 0,25 %p/v
- Gel CN2 – gel base de carbopol<sup>®</sup> 0,50 %p/v e noveon<sup>®</sup> 0,50 %p/v
- Gel CN3 – gel base de carbopol<sup>®</sup> 0,25 %p/v e noveon<sup>®</sup> 0,50 %p/v
- Gel CN4 – gel base de carbopol<sup>®</sup> 0,50 %p/v e noveon<sup>®</sup> 0,25 %p/v
- Gel CN5 – gel base de carbopol<sup>®</sup> 0,25 %p/v e noveon<sup>®</sup> 0,75 %p/v
- Gel CN6 – gel base de carbopol<sup>®</sup> 0,75 %p/v e noveon<sup>®</sup> 0,25 %p/v
- Gel N1 – gel base de noveon<sup>®</sup> a 0,5 %p/v
- Gel N2 – gel base de noveon<sup>®</sup> a 1,0 %p/v
- Gel N3 – gel base de noveon<sup>®</sup> a 1,5 %p/v
- Gel N4 – gel base de noveon<sup>®</sup> a 2,0 %p/v
- Gel O – gel de NYS MP e carbopol<sup>®</sup> a 0,5 %p/p

Gel OO – gel de NYS MP e carbopol<sup>®</sup> a 1,0 %p/p

Gel A – gel de NYS DS G2 (49) e carbopol<sup>®</sup> a 0,5 %p/p

Gel B – gel de NYS DS G2 (49) e carbopol<sup>®</sup> a 1,0 %p/p

Gel C – gel de NYS DS G2 (49) e carbopol<sup>®</sup> a 1,5 %p/p

Gel D – gel de NYS DS G2 (49) e carbopol<sup>®</sup> a 2,0 %p/p

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

ISP – *International Speciality Product*

log P – logaritmo do coeficiente de partição

MF – Mistura física

NYS – Nistatina

NYS DS – Dispersão (ões) sólida (s) de nistatina

NYS DS G1 – Dispersão (ões) sólida (s) de nistatina do Grupo 1

NYS DS G2 – Dispersão (ões) sólida (s) de nistatina do Grupo 2

NYS DS G1 (2) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 2

NYS DS G1 (3) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 3

NYS DS G1 (4) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 4

NYS DS G1 (6) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 6

NYS DS G1 (7) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 7

NYS DS G1 (14) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 14

NYS DS G1 (15) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 15

NYS DS G1 (16) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 16

NYS DS G1 (17) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 17

NYS DS G1 (18) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 18

NYS DS G1 (19) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 19

NYS DS G1 (20) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 20

NYS DS G1 (21) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 21

NYS DS G1 (22) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 22

NYS DS G2 (45) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 45

NYS DS G2 (46) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 46

NYS DS G2 (47) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 47

NYS DS G2 (48) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 48

NYS DS G2 (49) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 49

NYS DS G2 (50) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 50

NYS DS G2 (51) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 51  
NYS DS G2 (52) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 52  
NYS DS (A) – Formulação de dispersão sólida de nistatina obtida por liofilização  
NYS MF – Mistura física de nistatina com um determinado carreador  
NYS MF (4) – Mistura física de nistatina com lactose, na proporção 1:25  
NYS MF (6) – Mistura física de nistatina com HPMC, na proporção 1:25  
NYS MF (7) – Mistura física de nistatina com methocel, na proporção 1:25  
NYS MF (14) – Mistura física de nistatina com methocel, na proporção 1:10  
NYS MF (45) ou (A) – Mistura física de nistatina com Polo 407, na proporção 1:1  
NYS MF (46) – Mistura física de nistatina com Polo 407, na proporção 1:2  
NYS MF (47) – Mistura física de nistatina com Polo 407, na proporção 1:3  
NYS MF (48) – Mistura física de nistatina com Polo 407, na proporção 1:4  
NYS MF (49) – Mistura física de nistatina com Polo 188, na proporção 1:1  
NYS MF (50) – Mistura física de nistatina com Polo 188, na proporção 1:2  
NYS MF (51) – Mistura física de nistatina com Polo 188, na proporção 1:3  
NYS MF (52) – Mistura física de nistatina com Polo 188, na proporção 1:4  
NYS MP – Nistatina matéria-prima  
PAMPA – Permeabilidade em membrana artificial paralela  
pH – Potencial de hidrogênio  
pKa – logaritmo negativo da constante de dissociação  
PLA – Plasdone<sup>®</sup>  
Polo 188 – Poloxamer P 188  
Polo 407 – Poloxamer P 407  
PVDF – fluoreto de polivinilideno  
PVPK 29-32 – Polivinilpirrolidona K 29-32  
q.s.p. – Quantidade suficiente para  
R<sup>2</sup> – Coeficiente de correlação  
TG – Termogravimetria  
U.S. – *United States Pharmacopeia*  
UV – Detector ultravioleta

**Lista de Símbolos e Unidades**

°C – grau Celsius  
°C/min – grau Celsius/minuto  
cm/s – centímetro/segundo  
% p/p – porcentagem peso/peso  
μL – microlitro  
μm – micrômetro  
μg – micrograma  
g – grama  
h – hora  
M – molar  
mg – miligramas  
min – minutos  
mL – mililitros  
mm – milímetros  
nm – nanômetros  
mg/mL – miligramas por mililitros  
mL/min – mililitros por minuto  
N – Newton  
Pa.s – Pascal segundo  
rpm – rotação por minutos  
s – segundos  
UI – unidades internacionais

## RESUMO

AGUIAR, Michelle Maria Gonçalves Barão de. **Obtenção de Gel Mucoadesivo de Nistatina para o Tratamento da Candidíase Oral. Desenvolvimento e Caracterização de Dispersões Sólidas de Nistatina.** 2015. 230p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A nistatina (NYS) é o fármaco de primeira escolha no tratamento da candidíase oral, que frequentemente acomete mais os indivíduos imunocomprometidos e pacientes com outras desordens (diabetes não tratada, neoplasias, imunodeficiências). No mercado brasileiro, a NYS é encontrada na forma de suspensão oral aquosa, onde o procedimento para sua administração consiste em bochechar o medicamento. Apesar de haver a indicação de que se mantenha o contato direto entre fármaco e a mucosa oral, na qual se encontra a *Candida* spp., o que aumentaria expressivamente o sucesso terapêutico, a suspensão não apresenta tal propriedade. Assim, a NYS que é fármaco com ação efetiva contra a candidíase oral, é considerada pertencente à Classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, apresenta baixa solubilidade e baixa permeabilidade. A baixa solubilidade pode comprometer sua disponibilidade na cavidade oral, e conseqüentemente, sua ação farmacológica. Diante desse quadro, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de dispersões sólidas de NYS para o tratamento da candidíase oral, e sua posterior incorporação em gel mucoadesivo oral, favorecendo a formulação no local de ação. As dispersões sólidas são sistemas farmacêuticos, onde um fármaco pouco solúvel em água encontra-se dispersado em um carreador, no estado sólido. Os carreadores normalmente são hidrofílicos, o que permite que esses sistemas sejam empregados para aumentar a solubilidade aquosa do fármaco. Assim, foram desenvolvidas as dispersões sólidas de NYS, pelo método de eliminação do solvente, empregando como carreadores, lactose, HPMC, poloxamer 407 e poloxamer 188. Essas foram submetidas à caracterização por análise térmica, usando os ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG). Dentre essas dispersões sólidas, aquelas que se mostraram com comportamento térmico sugerindo a formação de um novo “sistema”, foram analisadas por meio de ensaio de solubilidade. Dessa forma, a formulação NYS DS G2 (49) se destacou, pois apresentou maior solubilidade em água (4,484 mg/mL); em pH 5,5 (4,249 mg/mL) e em pH 7,0 (4,293 mg/mL), ou seja, houve um aumento de 1,426 vezes em água; 4,227 vezes em pH 5,5; e 2,743 vezes em pH 7,0. Essa formulação foi, por fim avaliada por difração de raio-X e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, técnicas que corroboraram com a análise térmica quanto à indicação de formação da dispersão sólida. Por sua vez, essa dispersão sólida foi incorporada em 4 bases de géis mucoadesivos de carbopol<sup>®</sup> 934 PNF, alterando apenas a concentração do polímero (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 %p/p). Foi observado que a liberação de NYS DS G2 (49) foi superior, quando comparada à liberação de NYS MP a partir do gel, e através do ensaio de mucoadesão, percebeu-se que os géis desenvolvidos apresentaram propriedades mucoadesivas compatíveis com relatos na literatura, independentemente da quantidade de carbopol<sup>®</sup> empregada. As características reológicas foram distintas, e foi observado que as formulações Gel A e Gel B, que possuem menor quantidade de polímero, tiveram um

indicativo de comportamento de fluido newtoniano, diferente dos demais, o que pode não ser desejado para esse tipo de forma farmacêutica tópica e semi-sólida. Ao final desse trabalho, pode-se concluir que foi possível desenvolver um sistema farmacêutico na forma de dispersão sólida com maior solubilidade que a NYS pura, e sua incorporação em uma forma farmacêutica mucoadesiva, e que a liberação da NYS na forma DS foi muito superior que o fármaco na forma “convencional”, o que permite que a NYS esteja mais disponível na cavidade oral, e também junto à mucosa bucal, o que levaria a efeito farmacológico mais efetivo do antifúngico.

**Palavras-chave:** nistatina, dispersão sólida, gel mucoadesivo, candidíase oral, solubilidade, liberação de fármacos.

## ABSTRACT

AGUIAR, Michelle Maria Gonçalves Barão de. **Obtenção de Gel Mucoadesivo de Nistatina para o Tratamento da Candidíase Oral. Desenvolvimento e Caracterização de Dispersões Sólidas de Nistatina.** 2015. 230p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Nystatin (NYS) is the drug of first choice in the treatment of oral candidiasis that most often affect immunocompromised individuals, and patients with other disorders. In the Brazilian market, NYS is found in the form of aqueous oral suspension, a medication used in the form of mouthwash. Although there is an indication to maintain direct contact between the drug and the oral mucosa, where *Candida* spp. is found, as well as where therapeutic success would significantly be increased, the suspension has no such property. Thus, the NYS is an effective drug against oral candidiasis, and belongs to Class IV of the Biopharmaceutical Classification System, it has low solubility and low permeability. The low solubility can compromise its availability in the oral cavity, and consequently, its pharmacological action. Given this situation, the objective of this work was the development of solid dispersions of NYS for the treatment of oral candidiasis, and its subsequent incorporation into oral mucoadhesive gel, in order to facilitate its action. Solid dispersions are pharmaceutical systems, in which a solid drug poorly soluble in water is dispersed in a carrier. These carriers are usually hydrophilic, and this allows the systems to be employed in order to increase the aqueous solubility of the drug. Thus, the solid NYS dispersions were developed by the solvent evaporation method, employing lactose, HPMC, poloxamer 407 and poloxamer 188 as carrier. These samples were subjected to characterization by thermal analysis, using differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry / derivative thermogravimetry (TG / DTG). Among these solid dispersions, those samples which showed a specific thermal behavior suggesting the formation of new "system" were analyzed by solubility test. Thus, the NYS DS G2 formulation (49) stood out, once it showed greater solubility in water (4.484 mg/mL); at pH 5.5 (4.249 mg/mL) and pH 7.0 (4.293 mg/mL), in other words, an increase of 1,426 times in water; 4,227 times at pH 5.5; and 2,743 times at pH 7.0. This formulation was finally evaluated by X-ray diffraction, infrared spectroscopy with Fourier transform, techniques that corroborate the thermal analysis, indicating the formation of the solid dispersion. On the other hand, this solid dispersion was incorporated into 4 Carbopol® 934 PNF mucoadhesive gels, with a variation of the polymer concentration. It was observed that NYS is improved of delivery from the gels, employing mucoadhesion test, and was also observed that the gels have mucoadhesive properties consistent with reports in the literature. However, the rheological characteristics are different, and it was observed that the Gel A and Gel B formulations, which has a lower amount of polymer behaved as a Newtonian fluid, which may not be desired for this type of topical gel. As conclusion, it was possible to develop a pharmaceutical system in the form of solid dispersion with greater solubility than the pure NYS, and their incorporation in a mucoadhesive dosage form and the release of NYS as DS was far superior wherein the drug in the "conventional" manner, which allows the NYS is longer available in the oral cavity, and also adjacent to the

buccal mucosa, leading to more effective pharmacological effect of the antifungal agent.

**Keywords:** nystatin, solid dispersion, mucoadhesive gel, oral candidiasis, solubility, drug delivery.

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

A candidíase oral é uma infecção oportunista e normalmente está relacionada aos fatores predisponentes, como doenças sistêmicas (que comprometem as defesas imunológicas), ambiente local da cavidade oral, uso de medicamentos, em grupos de pacientes (neonatos e idosos) e em casos de desnutrição (COLOMBO et al., 2013; NETO, DANESI, UNFER, 2005; GIANNINI, SHETTY, 2011). Não é uma patologia grave, porém se não tratada, pode evoluir para um quadro de candidemia, podendo ser fatal (NETO, DANESI, UNFER, 2005).

Tradicionalmente, a nistatina (NYS) é disponibilizada para o tratamento da candidíase oral na forma de suspensão oral aquosa. Esta suspensão contém a dose de 100.000 UI/mL, que deve ser administrada 3 a 4 vezes ao dia, sendo que o paciente deve bochechar o medicamento por alguns minutos e em seguida degluti-lo (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003). Devido ao sabor extremamente desagradável da NYS, o paciente pode expelir o medicamento, caso não seja devidamente instruído para não fazê-lo, comprometendo o tratamento (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003).

A NYS é praticamente insolúvel em água, sendo classificada na Classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, apresenta baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Em função de sua baixa solubilidade aquosa, a NYS oferece dificuldades no preparo de medicamentos, como suspensão, já que essa forma farmacêutica pode apresentar certa instabilidade, levando à formação de precipitado não redispersível. Além disso, a NYS pode estar menos disponível para exercer sua ação, sobretudo no tratamento da candidíase oral (LINDENBERG, KOPP, DRESSMAN, 2004; SAKEER et al., 2010).

Também é conhecido que o agente causador da candidíase oral, *Candida* spp., coloniza a mucosa oral, formando um biofilme e altera sua morfologia para uma mais invasiva (hifas). Nesse contexto, o tratamento torna-se mais eficaz quando ocorre um contato mais íntimo entre a NYS e a mucosa oral (CATE et al., 2010).

Assim, com objetivo de melhorar a solubilidade aquosa da NYS, e de outros fármacos, tem sido empregado o desenvolvimento de dispersões sólidas. Estes são sistemas farmacêuticos, onde um fármaco pouco solúvel em água encontra-se disperso em um carreador ou matriz (inerte), no estado sólido. Ao considerar os aspectos supracitados relacionados à NYS, este trabalho teve como objetivo inicial a obtenção de dispersões sólidas de NYS, buscando o aumento de sua solubilidade aquosa, para posterior incorporação em gel mucoadesivo oral, de forma a permitir um

contato mais íntimo entre o fármaco e a mucosa oral, elevando a eficácia da NYS no tratamento da candidíase oral (CARVALHO, 2010; NEVILLE et al. 2009; VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2010).

Todavia, há poucos trabalhos científicos que trazem a NYS na forma de dispersões sólidas. De fato, foi encontrado o trabalho de Sakeer e colaboradores (2010), no qual os autores desenvolveram uma formulação contendo o antifúngico com lactose monohidratada, na proporção 1:3, obtida pelo método de eliminação do solvente usando evaporador rotativo. Esta foi incorporada a comprimidos mucoadesivos.

É válido ressaltar que a falta de trabalhos contendo o desenvolvimento de dispersões sólidas de NYS, sua caracterização e seu desempenho frente ao ensaio de solubilidade, faz com que o presente trabalho possa contribuir com a literatura científica e assim, auxiliar no desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes para o tratamento da candidíase oral. Por fim, a forma farmacêutica de gel mucoadesivo apresenta grande importância, pois permite que a NYS nele contida permaneça junto à mucosa oral, onde é encontrado o agente causador da candidíase oral.

## 2. OBJETIVOS

---

---

## 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi a obtenção de dispersões sólidas de NYS e sua posterior incorporação em gel mucoadesivo oral, destinado ao tratamento da candidíase oral.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar as dispersões sólidas de NYS, para sua posterior incorporação em gel mucoadesivo oral;
- Avaliar a solubilidade das dispersões sólidas de NYS;
- Avaliar e eleger o polímero mucoadesivo de uso oral e estabelecer sua concentração para o desenvolvimento do gel, considerando suas propriedades reológicas;
- Desenvolver e caracterizar o gel mucoadesivo, contendo as dispersões sólidas de NYS;
- Avaliar a liberação da NYS na forma de dispersão sólida, contida no gel mucoadesivo oral.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

---

---

### 3.1 Candidíase Oral

As candidíases são infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida*, também podendo ser conhecidas como candidoses. Já o termo monilíase é mais antigo e considerado impróprio, pois se refere à denominação arcaica *Monilia albicans* (GIANNINI, SHETTY, 2011; NEVILLE et al., 2009). Seu espectro é bem extenso, desde a colonização de mucosas a quadros sistêmicos invasivos (GIANNINI, SHETTY, 2011). Em indivíduos saudáveis, o gênero *Candida* é encontrado na cavidade oral, pertencente à microbiota bucal. A infecção por *Candida* spp. apenas surge quando ocorre uma oportunidade, sendo assim conhecidas como infecções oportunistas (RAUTEMAA, RAMAGE, 2011). No Quadro 1, estão demonstradas as várias formas clínicas de candidíases.

Dentre as diversas formas de candidíases, encontra-se a candidíase oral, a infecção bucal fúngica mais comum no trato orofaríngeo, que se manifesta quando relacionada a fatores predisponentes. Em geral, ocorrem mecanismos de defesa específicos e não-específicos, presentes na saliva e na mucosa oral, além da presença da própria microbiota oral competitiva, formada por outros microrganismos que restringem o crescimento da *Candida* spp. (NEVILLE et al., 2009; RAUTEMAA, RAMAGE, 2011). Diversos são os fatores que podem causar candidíase oral e essa patologia está intimamente ligada a outras desordens ou quadros que são considerados fatores de risco para o seu surgimento (RAUTEMAA, RAMAGE, 2011; STOOPLER, SOLLECITO, 2014), retratados no Quadro 2.

Portanto, a candidíase oral pode ser um indicativo de problemas que afetam os mecanismos de defesa, seja local ou sistêmico, alteração da microbiota oral ou, ainda, uma higiene oral negligenciada (NEVILLE et al., 2009; RAUTEMAA, RAMAGE, 2011).

Para causar a infecção, as espécies de *Candida* possuem uma habilidade excepcional para aderir a superfícies, tais como mucosa, dentes, obturações dentárias, próteses dentárias, implantes ortodônticos, *piercing* de línguas e mesmo tubos endotraqueais presentes na cavidade oral que não são devidamente higienizados e não foram trocados (RAUTEMAA, RAMAGE, 2011; STOOPLER, SOLLECITO, 2014).

A candidíase oral não é uma doença letal, porém, se não for devidamente tratada, podendo evoluir para quadros clínicos crônicos, invadir outros tecidos e até mesmo causar uma infecção sistêmica (CAMPOS et al., 2012).

Dentre as espécies, *Candida albicans* é a principal causadora de candidíase oral. Outras espécies também podem ser patogênicas, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondi* e *C. tropicalis*. Todavia, todas as espécies de *Candida* podem causar uma mucosite similar a essa infecção (CATE et al., 2009; NETO, DANESI, UNFER, 2005; RAUTEMAA, RAMAGE, 2011; STOOPLER, SOLLECITO, 2014). Para que o microrganismo provoque a infecção, alguns fatores de virulência lhe são atribuídos, como a adesão a superfícies do hospedeiro, uma transformação morfológica, para formas mais invasivas (hifas) e uma produção de enzimas no meio extracelular são propriedades fundamentais para a formação do biofilme, por parte desses fungos (RAUTEMAA, RAMAGE, 2011; STOOPLER, SOLLECITO, 2014).

<b>Formas Clínicas de Candidíases</b>	<b>Sítios / Tecidos</b>	<b>Comentários</b>
Candidíase oral	Cavidade oral, mucosa oral	Candidíase superficial que afeta pacientes com alterações locais e sistêmicas
Candidíase esofagiana	Mucosa esofagiana	Considerada um tipo semi-invasivo de candidíase
Candidíase vulvovaginal	Vulva e vagina	Alta incidência em mulheres durante no período fértil
Candidíase urinária	Trato urinário	Frequente candidúria, porém nem sempre seguida de sintomas
Candidíase peritoneal relacionada à diálise	Região peritoneal	Relacionada à diálise peritoneal
Candidíase peritoneal pós-operatória	Região peritoneal	Ocorre com frequência em pacientes hospitalizados, e relacionada com casos de peritonite secundária ou terciária
Candidíase do trato respiratório	Trato respiratório	Manifestação clínica pouco frequente e pouco documentada, com maior incidência em pacientes neutropênicos com malignância hematológica ou submetido a transplante de pulmão
Candidíase hematogênica / Candidemia	Sangue	Amplo espectro de episódios, incluindo casos isolados de <i>Candida</i> spp. ou em conjunto com outros fungos na corrente sanguínea que se espalha em mais órgãos

Quadro 1 – Formas clínicas de candidíases (adaptado de COLOMBO et al., 2013).

Mecanismos locais de defesa prejudicados	Baixa produção de saliva / xerostomia
	Tabagismo
	Doenças da mucosa oral
	Uso tópico de corticóides
	Radioterapia
Mecanismos sistêmicos de defesa prejudicados	Diabetes mal controlada
	Imunodeficiências
	Uso de imunossupressores
	Desnutrição
	Neoplasias
	Sarcoidose
	Cirroose
	Síndrome de Sjögren
Alteração na microbiota oral	Hipoparatiroidismo
	Hipoadrenalismo
	Uso de antibióticos de largo espectro
	Uso de enxaguatórios bucais de alto espectro e com ação bacteriana
	Alto consumo de álcool
	Refluxo, baixo pH
Higiene oral	Dieta rica em carboidratos
	Próteses dentárias
Higiene oral	Biofilmes mistos sobre superfícies não renováveis
	Higiene oral negligenciada
Grupos	Crianças (devido à imaturidade do sistema imune)
	Prematuros neonatos
	Lactantes
	Idosos

Quadro 2 – Fatores predisponentes para a candidíase oral (COLOMBO et al., 2013; GIANNINI, SHETTY, 2011; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010; MARX, STERN, 2003; NETO, DANESI, UNFER, 2005; RAUTEMAA, RAMAGE, 2011; STOOPLER, SOLLECITO, 2014).

### 3.1.1 Formas Clínicas da Candidíase Oral

A candidíase oral pode se apresentar em diversos quadros clínicos e essas manifestações podem diferenciar em sua gravidade, podendo ser agudas ou crônicas, o que dificulta seu diagnóstico. Dentre elas, podem ser citadas a candidíase pseudomembranosa, a candidíase eritematosa atrófica, a candidíase hiperplástica crônica, a quelite angular, a atrofia papilar central, entre outras (NETO, DANESI, UNFER, 2005; NEVILEE et al., 2009; STOOPLER, SOLLECITO, 2014).

Os pacientes com candidíase oral podem ser assintomáticos ou manifestar vários sintomas, a depender da sua forma clínica (destacadas no Quadro 3). Em geral, são relatadas as sensações de queimação, presença de gosto metálico, dor e disfagia (NEVILLE et al., 2009; NETO, DANESI, UNFER, 2005).

<b>Manifestação Clínica</b>	<b>Apresentação</b>	<b>Sintomatologia</b>	<b>Localização</b>	<b>Observações</b>
Pseudomembranosa	Placas brancas, cremosas, e destacáveis	Sensação de queimação	Palato, língua e mucosa jugal	Relacionada à terapia com antibióticos e imunossupressão
Eritematosa	Manchas vermelhas	Sensação de queimação	Mucosa jugal, língua e palato duro (região posterior)	Relacionada à terapia com antibióticos, xerostomia e imunossupressão
Atrofia papilar central	Regiões vermelhas e atróficas na mucosa	Assintomática	Dorso da língua (linha medida na região posterior)	Relacionada à imunossupressão
Multifocal crônica	Regiões vermelhas com placas brancas destacáveis	Sensação de queimação ou assintomática	Palato (região posterior), dorso da língua e comissura labial	Relacionada à imunossupressão
Quelite angular	Lesões fissuradas avermelhadas	Sensação de ferida local	Comissura labial	Relacionada à imunossupressão
Estomatite protética (candidíase atrófica crônica)	Regiões vermelhas	Assintomática	Limitada à região do palato que suporta a prótese	Prótese positiva para cultura, porém a mucosa não apresenta
Hiperplástica (leucoplasia por <i>Candida</i> )	Placas brancas não destacáveis	Assintomática	Mucosa jugal	Relacionada à imunossupressão
Mucocutânea	Placas brancas e áreas vermelhas	Assintomática	Mucosa jugal, palato e língua	Rara, hereditária
Síndromes endócrina-candidíase	Placas brancas (maioria não destacáveis)	Assintomática	Mucosa jugal, palato e língua	Rara, relacionada à distúrbio endócrino

Quadro 3 – Manifestações clínicas da candidíase oral (adaptado de NEVILLE et al., 2009).

### 3.1.1.1 Candidíase Pseudomembranosa

A forma de candidíase oral pseudomembranosa é reconhecida popularmente como “sapinho” e geralmente, se apresenta na forma de placas amarelas ou brancas aderentes à mucosa oral, com base inflamatória. As placas são facilmente removíveis pela raspagem com abaixador de língua ou compressa de gaze e se caracterizam por um conjunto de desordenado de hifas, leveduras, células epiteliais e fragmentos de tecido necrótico, distribuídas na mucosa jugal (região das bochechas), palato, dorso da língua, as gengivas e o assoalho bucal (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; GIANNINI, SHETTY, 2011; NETO, DANESI, UNFER, 2005; NEVILLE et al., 2009; STOOPLER, SOLLECITO, 2014). Após a remoção das placas, a região é uma superfície eritematosa, ulcerada e sensível (NETO, DANESI, UNFER, 2005).

A forma pseudomembranosa pode se manifestar em pacientes que fazem uso de antibióticos de amplo espectro, o que leva à diminuição das bactérias competidoras presentes na cavidade oral. Também pode acometer pacientes imunossuprimidos, seja por doenças, como nos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e leucemias ou por uso de medicamentos imunossupressores (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; GIANNINI, SHETTY, 2011; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010; NEVILLE et al., 2009; STOOPLER, SOLLECITO, 2014). Já as crianças pequenas de até 2 anos podem ser afetadas, devido a seu sistema imune pouco desenvolvido (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; GIANNINI, SHETTY, 2011; NETO, DANESI, UNFER, 2005; NEVILLE et al., 2009).

Como sintomas, podem ser citados: sensação de queimação e ardência, prurido, alteração do paladar, descrito como amargo ou salgado e até disfagia (dificuldade de deglutir) (GIANNINI, SHETTY, 2011; NETO, DANESI, UNFER, 2005; NEVILLE et al., 2005; STOOPLER, SOLLECITO, 2014).

### 3.1.1.2 Candidíase Eritematosa

Essa forma está relacionada ao uso de medicamentos (corticóides e antibióticos de amplo espectro), uso prolongado de próteses removíveis e xerostomia (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; GIANNINI, SHETTY, 2011; NEVILLE et

al., 2009; STOOPLER, SOLLECITO, 2014). Aparece comumente como manchas vermelhas e com ausência de placas brancas, afetando o dorso da língua, palato ou qualquer parte superficial da mucosa oral (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; GIANNINI, SHETTY, 2011; STOOPLER, SOLLECITO, 2014).

A candidíase eritematosa é a candidíase oral mais comum, no entanto, em muitos casos é clinicamente negligenciada. Ela pode ser encontrada em várias formas diferentes, a depender da causa ou do local (GIANNINI, SHETTY, 2011; NEVILLE et al., 2009). Segundo Gianni e Shetty (2011), a candidíase eritematosa é categorizada como alguns subtipos, como atrófica aguda, atrófica crônica, quelite angular, glossite rombóide mediana (também conhecida como atrofia papilar central) e multifocal crônica.

A atrofia papilar central é clinicamente apresentada com uma região eritematosa bem delimitada, na linha média da região posterior do dorso lingual, que se deve à perda das papilas filiformes. É apresentada na forma de uma mancha vermelha ou vermelha-esbranquiçada e ser plana ou elevada (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; GIANNINI, SHETTY, 2011; LEITE et al., 2002; NEVILLE et al., 2009). Alguns portadores também podem apresentar a infecção em outras partes da cavidade oral e, assim, esse tipo de candidíase é chamada de multifocal crônica. Nesse caso, além do dorso da língua, podem surgir na junção entre o palato duro e o palato mole e as comissuras labiais (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; GIANNINI, SHETTY, 2011; NEVILLE et al., 2009). A lesão nas comissuras labiais, reconhecida como quelite angular, é caracterizada por eritema, dor, fissuras e descamação, que pode estar associada à candidíase multifocal crônica ou surgir isoladamente. Nesses casos de quelite, a saliva costuma a acumular nas comissuras, o que leva a uma região úmida que favorece o crescimento fúngico. Isso ocorre em pacientes que têm diminuição da dimensão vertical de oclusão e sulcos acentuados, que também fazem uso de próteses dentárias (GIANNINI, SHETTY, 2011; NEVILLE et al., 2009). Em condições incomuns, hábitos como lambe os lábios ou chupar os dedos podem criar um padrão de umedecimento da pele perioral, provocando à queilocandidíase (NEVILLE et al., 2009).

Já a candidíase atrófica aguda, também conhecida como “boca ferida por antibióticos”, claramente é causada por uso de antibióticos e em casos de diabetes não controlada. Sua apresentação clínica ocorre na forma de eritema, envolvendo

atrofia das papilas do dorso da língua. Os pacientes queixam-se de sensação de queimação na boca, devido à perda difusa das papilas filiformes da região dorsal da língua. Também são relatados prurido, xerostomia e alteração de sabor (GIANNINI, SHETTY, 2011; NEVILLE et al., 2009; STOOPLER, SOLLECITO, 2014).

Por fim a candidíase atrófica crônica é comumente designada como estomatite protética e relaciona-se ao uso prolongado de próteses removíveis ou nos casos que estão mal encaixadas ou de desenho inadequado. Normalmente, os pacientes são assintomáticos e clinicamente apresentam eritema e petéquias hemorrágicas. Esse quadro clínico ocorre no palato próximo à prótese, onde o fluxo salivar é restrito (GIANNINI, SHETTY, 2011; NEVILLE et al., 2009).

### **3.1.1.3 Candidíase Hiperplásica**

A candidíase hiperplásica é conhecida como candidíase crônica hiperplásica ou leucoplasia por *Candida* e apresenta-se como placas brancas ou vermelhas não removíveis, com lesões elevadas que variam em pequenas, nodulares e palpáveis (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; GIANNINI, SHETTY, 2011; NETO, DANESI, UNFER, 2005; NEVILLE et al., 2009). A localização frequente é na superfície do dorso da língua, palato e na mucosa jugal (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000; NEVILLE et al., 2009). Esse é o tipo mais raro de candidíase oral (NEVILLE et al., 2009).

### **3.1.1.4 Candidíase Mucocutânea**

A candidíase mucocutânea é uma forma crônica, persistente e é considerada a forma mais grave da doença. Nesse quadro, é vista uma distribuição sistêmica e o grau mais extenso de comprometimento do sistema imune do hospedeiro (GIANNINI, SHETTY, 2011; MARX, STERN, 2003). Ela inicialmente se apresenta na forma pseudomembranosa ou hiperplásica mas, em seguida, envolve a pele, mucosa esofagiana e unhas (MARX, STERN, 2003; NETO, DANESI, UNFER, 2005; NEVILLE et al., 2009). Também está associada a várias endocrinopatias, como a síndrome de Addison, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo e diabetes mellitus (GIANNINI,

SHETTY, 2011; NEVILLE et al., 2009). Frequentemente, o distúrbio endócrino ocorre meses ou anos após a infecção por *Candida* spp. (GIANNINI, SHETTY, 2011).

Em alguns pacientes com essa manifestação, a candidíase tem sido relacionada a mutações no gene regulador da autoimunidade, com a formação de anticorpos contra tecidos do próprio hospedeiro. Normalmente, o distúrbio imunológico fica evidente no início da vida dos pacientes, que apresentam candidíase oral, nas unhas, na pele e em outras mucosas (GIANNINI, SHETTY, 2011; MARX, STERN, 2003; NEVILLE et al., 2009). Os pacientes ainda podem desenvolver as anormalidades endócrinas, tais como a síndrome endócrina-candidíase e a síndrome da distrofia poliendocrinopatia-candidíase autoimune (APECED) (GIANNINI, SHETTY, 2011; NEVILLE et al., 2009).

### 3.1.2 O Gênero *Candida*

Dos fungos de interesse médico, o gênero *Candida* é o que possui maior importância, devido à sua alta frequência de colonização e infectar o hospedeiro humano (CATE et al., 2009; COLOMBO et al., 2013). A prevalência oral desse fungo é variável mas, segundo Colombo e colaboradores (2013), encontra-se entre 20 e 40 % no trato gastrointestinal de adultos saudáveis e aproximadamente de 20 a 30% das mulheres tem colonização por *Candida* spp. no trato vaginal. Já em pacientes imunocomprometidos, o gênero pode chegar a 60% dos casos (STOOPLER, SOLLECITO, 2014). Esses microrganismos são considerados comensais e se tornam patogênicos quando ocorrem mudanças no mecanismo de defesa do hospedeiro, quando barreiras anatômicas secundárias são comprometidas ou processos médicos invasivos são feitos. Daí o interesse clínico pela infecção por *Candida* spp., mais especificamente a candidíase oral, devido ao número significativo de complicações, que interpassam as diversas especialidades médicas (CATE et al., 2009; COLOMBO et al., 2013).

O gênero *Candida* tem como morfologia a forma autóctone de leveduras que colonizam a cavidade oral até o trato gastrointestinal, pertencendo à microbiota. Dentre aproximadamente as 20 espécies de *Candida* de interesse médico, *Candida albicans* apresenta maior prevalência na cavidade oral. Se ocorre uma ruptura dos mecanismos de defesa locais, disfunção metabólica ou ainda, na presença de

doenças associadas à imunossupressão, a colonização pode levar à infecção e à patologia (COLOMBO et al., 2013). Dessa maneira, a candidíase oral é a mais comum infecção oportunista encontrada em pacientes com a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS/SIDA) e é considerada um marcador da progressão da deteriorização imunológica desses pacientes (RAUTEMA, RAMAGE, 2011).

O gênero *Candida* pode ser também visto na forma de pseudohifas e hifas, além da forma de leveduras. Essa característica é reconhecida como dimorfismo e está associada à virulência desse microrganismo pois, nessa forma, ele se torna invasivo, penetrando no tecido, o que leva a um quadro infeccioso. No local, ocorre um estado de hipersensibilidade e a produção de toxinas (CATE et al., 2009; RAUTEMA, RAMAGE, 2011).

A *Candida albicans* exibe diferentes formas de crescimento e pode se reproduzir por brotamento multilateral na forma de levedura (CATE et al., 2009, COLOMBO et al., 2013). Todavia, também podem ser encontradas nas formas alongadas e filamentosas, chamadas de pseudohifas e hifas (CATE et al., 2009).

### 3.2 Nistatina (NYS)

A NYS foi descoberta na década de 1950 pelos pesquisadores norte-americanos Hazen e Brown (GROESCHKE et al., 2006; HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006). Na terapêutica, a NYS tem sido empregada por muitos anos, demonstrando sua eficácia e segurança, assim como poucos efeitos adversos relevantes e boa ação farmacológica. Mais recentemente, a NYS tem sido usada com mais frequência, devido ao aumento número de casos de candidíases em pacientes com neoplasias, SIDA e outras desordens sistêmicas (CASIGLIA & WOO, 2004; DOROCKA-BOBKOWSKA et al., 2003; SHIP et al., 2007). Na Figura 1, encontra-se a estrutura química da NYS.

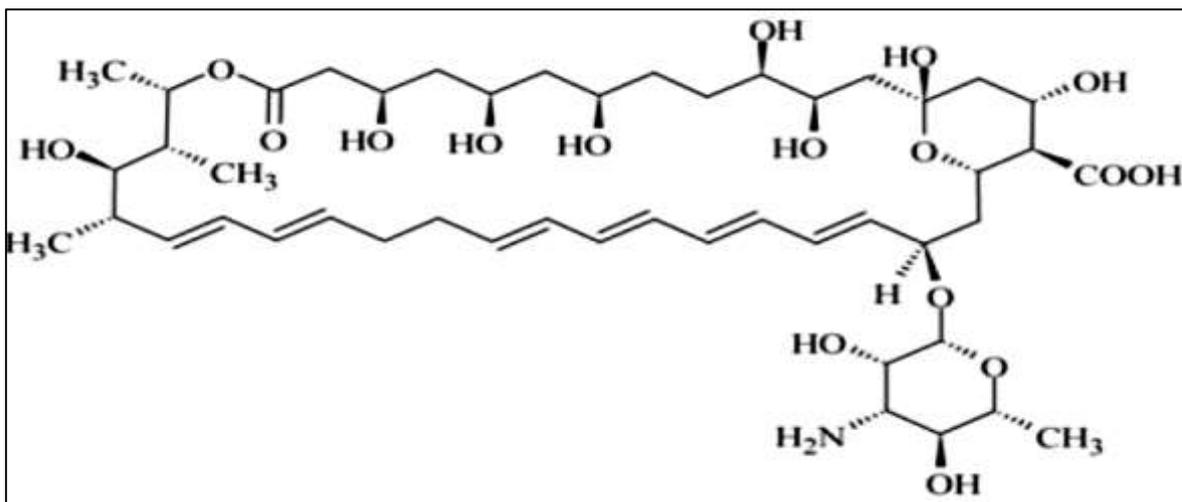


Figura 1 – Estrutura química da NYS (F. Bras., 2010).

Do ponto de vista químico, a NYS é considerada um polieno, ou seja, pertencente ao grupo de substâncias formadas por átomos de carbono com várias ligações dupla. De fato, a NYS é um tetraeno, que de forma mais específica, são polienos, os quais apresentam quatro duplas ligações não-saturadas em sequência (HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006; STEFANOVIC et al., 2012). É ainda considerada um macrolídeo, ou seja, apresenta uma grande cadeia cíclica. Essas características químicas geralmente são associadas à sua baixa permeabilidade, que a impede atravessar as células intestinais, quando administrada por via oral. Por fim, essa molécula possui grupamentos carboxílicos e aminos, o que a leva a possuir dos pKa: 3,62 (de caráter ácido) e 9,11 (de caráter básico) (CROY & KNOW, 2004; DrugBank, 2015; LAW et al., 2014).

A NYS é considerada praticamente insolúvel em água, clorofórmio, éter etílico e etanol e saliva, pouco solúvel em metanol, e facilmente solúvel em dimetilformamida e dimetilsufóxido (MARTINDALE, 1999; F. Bras., 2010; TALLURY et al., 2007). Esse fármaco apresenta-se como um pó higroscópico, amarelo, fino e deve possuir potência mínima de 4.400 UI/mg (F. Bras., 2010), e tem um odor característico, muitas vezes relatado como semelhante a cereais (MARTINDALE, 1999) e com sabor extremamente desagradável (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003). Além disso, a NYS apresenta sensibilidade ao calor, luz e presença de oxigênio (STEFANOVIC et al., 2012).

Este antifúngico é classificado como Classe IV, do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Devido à sua baixa permeabilidade, é fracamente absorvida pela pele, mucosas ou trato gastrointestinal, sendo seu uso terapêutico restrito ao tratamento de infecções fúngicas de modo tópico. Quando administrada por via oral, a maior parte é encontrada nas fezes de forma inalterada (NEVILLE et al., 2009; SAKEER et al., 2010; SHIP et al., 2006; SPULBER, et al., 2011). Em função de sua baixa solubilidade aquosa, a NYS oferece dificuldades no preparo de medicamentos, além de estar menos disponível para exercer sua ação topicamente, sobretudo no tratamento da candidíase oral, já que a mucosa oral é banhada por saliva (SAKEER et al., 2010; SPULBER, et al., 2011)

A NYS é extremamente semelhante à anfotericina B, outro antifúngico polieno, e ambos possuem o mesmo mecanismo de ação. Todavia, a anfotericina B é usada para tratamento de infecções sistêmicas e locais, e a NYS é restrita ao uso tópico, empregada na profilaxia e tratamento de candidíases superficiais de pele e mucosas, por ser efetiva contra a maioria das infecções causadas pelas espécies de *Candida* spp. (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003; CROY & KNOW, 2004; SHIP et al., 2007).

O mecanismo de ação antifúngica da NYS ocorre por meio de sua interação com ergosterol, esterol presente na membrana plasmática das células fúngicas, ocasionando uma desorganização na membrana plástica do fungo, já que canais são formados, o que leva à perda da permeabilidade seletiva (HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006; SILVA et al., 2006). Por esses canais ocorre a saída de água e íons essenciais para a sobrevivência celular, o que culmina em danos celulares e em seguida, na morte celular (DOROCCA-BOBKOWSKA et al., 2003; CROY & KNOW, 2004; GROESCHKE et al., 2006; SILVA et al., 2006; STEFANOVIC et al., 2012). Alguns autores propõem uma sequência de três eventos para a ação da NYS: (A) a ligação de um monômero do antifúngico com a membrana plasmática do fungo; (B) a formação de um oligomonômero e (C) a inserção deste na bicamada lipídica, gerando um poro por onde ocorre o fluxo passivo de moléculas através da membrana. Embora, essa explicação ainda seja controversa (SILVA et al., 2006; STEFANOVIC et al., 2012).

A NYS, ainda, se liga mais fracamente ao colesterol, esterol presente na membrana plasmática das células de mamíferos. É essa ligação que explica seus efeitos adversos e tóxicos e por isso a NYS não deve ser administrada por via parenteral (CROY & KNOW, 2004; HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006;

NEVILLE et al., 2009; SHIP et al., 2006). Quando administrada por essa via, ela é capaz de provocar hemólise, necrose e abscessos frios nos locais da injeção, devido à sua ligação imediata com as membranas plasmáticas das hemácias, causando sua destruição (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003). Assim, quando a NYS é administrada por via oral, o desejado é um efeito superficial sobre a mucosa que reveste o trato gastrointestinal (SHIP et al., 2006).

Nos mercados americano e canadense, é encontrado o medicamento Nyoram®, preparado com NYS na forma de lipossomas para tratamento de infecções endovenosas invasivas, e logo sua administração é parenteral. Nesse caso, a NYS não se restringe ao tratamento de candidíases, mas também pode ser empregada para combater infecções por *Aspergillus* sp. Essa forma lipossômica da NYS pode ser usada por via endovenosa por não apresentar os efeitos adversos da NYS na forma convencional. Isso é explicado pela presença dos lipídios na composição dos lipossomas, que têm maior afinidade pela NYS do que o colesterol, porém a afinidade da NYS pelo ergosterol ainda continua maior (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003; HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006; THOMPSON, 2002; STEFANOVIC et al., 2012).

Quando administrada na forma tópica, os efeitos adversos da NYS são pouco frequentes, podendo ocorrer episódios de náuseas, vômitos e diarreias, assim como as reações alérgicas (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003). Em muitos casos, as náuseas são causadas pelo sabor extremamente desagradável do fármaco, o que pode limitar o uso pelos pacientes, diminuindo a adesão ao tratamento (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003; NEVILLE et al., 2009).

### **3.2.1. Apresentações Farmacêuticas contendo NYS**

A NYS pode ser encontrada em diversas formas farmacêuticas, destinadas à administração cutânea, vaginal e oral e são encontradas no mercado nacional e internacional, para o tratamento de candidíases vaginal, oral, esofagiana, intestinal e cutânea (COLOMBO et al., 2013; GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003). Sendo assim, a NYS pode ser encontrada nas seguintes formas farmacêuticas: pó, pastilhas, comprimidos, cremes, pomadas, suspensões. O tipo de forma farmacêutica usada dependerá do tipo de candidíase a ser tratada (DrugBank, 2015; LAW et al., 2014;

STEFANOVIC et al., 2012). No Quadro 4 estão demonstradas as formas farmacêuticas de NYS.

<b>Formas Farmacêuticas de NYS</b>	<b>Tipo / Local de Administração</b>	<b>Tipo de Candidíase</b>
Pó	Tópica / pele	Cutânea
Creme	Tópica / trato vaginal	Vaginal
Suspensão	Tópica / oral	Oral, orofaríngea e esofagiana
Comprimidos	Tópica / oral	Oral e orofaríngea
Pastilhas	Tópica / oral	Oral e orofaríngea
Pomadas	Tópica / pele	Cutânea
Lipossomal	Sistêmica / parenteral	Infecções fúngicas endovenosas

Quadro 4 – Formas farmacêuticas contendo NYS para o tratamento de infecções fúngicas e tipo e local de administração (DrugBank, 2015; LAW et al., 2014; GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003; NEVILLE et al., 2009; STEFANOVIC et al., 2012; THOMPSON, 2002).

A suspensão oral aquosa de NYS é empregada no tratamento da candidíase oral, cuja a concentração é de 100.000 UI/mL. O paciente é orientado a aplicar 5 mL do medicamento, de 3 a 4 vezes ao dia, realizando bochecho por 5 minutos, com posterior deglutição do produto. O tratamento tem duração de 7 a 14 dias (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003; NEVILLE et al., 2009). No mercado brasileiro, apenas é encontrada essa forma farmacêutica de NYS para o tratamento da candidíase oral e orofaríngea. No entanto, em outros países, a NYS está disponível nas formas farmacêuticas de pastilhas medicamentosas e comprimidos bucais. Cada pastilha contém 200.000 UI de NYS e deve ser administrar de 1 a 2 unidades, por 4 a 5 vezes ao dia, por 10 a 14 dias. Já cada comprimido possui 500.000 UI, que deve ser aplicado 3 vezes ao dia, por 7 a 14 dias (AGUIAR et al., 2010; NEVILLE et al., 2009).

Aguiar e colaboradores (2010) descrevem um estudo clínico preliminar com 14 pacientes que foram diagnosticados com candidíase oral. Os voluntários foram divididos em 2 grupos, onde o primeiro recebeu o tratamento com uso de 1 comprimido bucal de NYS contendo 500.000 UI, por 4 vezes ao dia, durante 7 dias. O segundo

grupo foi tratado com 5 mL de suspensão oral de NYS (dose total de 500.000 UI), aplicada 4 vezes ao dia, também por 7 dias. O tratamento realizado com os comprimidos bucais demonstrou-se mais eficaz, erradicando a infecção mais rapidamente. Esse dado sugere que o aumento do contato entre o fármaco e a mucosa oral levou a um efeito terapêutico mais pronunciado. Assim, o uso de formas farmacêuticas que permitem o contato íntimo com a mucosa, e com poder residual mais elevado, podem proporcionar uma ação farmacológica mais proeminente.

### 3.3 Dispersões Sólidas

As dispersões sólidas são sistemas farmacêuticos, onde um fármaco pouco solúvel em água encontra-se disperso em um carreador ou matriz (inerte), no estado sólido. Os carreadores normalmente são hidrofílicos, o que permite que esses sistemas sejam empregados para aumentar a solubilidade aquosa do fármaco e sua velocidade de dissolução (ALVES et al., 2012; DHIRENDRA et al. 2009; TIWARI et al., 2009). Assim, em diversos trabalhos é relatado o uso de dispersões sólidas para a melhoria da solubilidade aquosa de fármacos (DHIRENDRA et al. 2009; BIKIARIS et al., 2005; GURUNATH, NANJWADE, PATILA, 2013; KOGERMANN et al., 2013; MAULVI et al., 2009, WU et al., 2011).

É importante ressaltar que esses sistemas não são apenas uma mistura física, entre fármaco e carreador, promovida por um processo simples de mistura mecânica. Quando as dispersões sólidas são formadas, o fármaco deve tornar-se disperso no carreador, onde é estabelecido uma interação íntima entre eles (LIU, 2000). Dessa forma, as dispersões sólidas são sistemas normalmente empregados quando os fármacos apresentam baixa biodisponibilidade, devido à baixa dissolução, consequência de sua solubilidade aquosa reduzida (LIU, 2000).

Esses sistemas podem produzir uma redução significativa no tamanho de partícula do fármaco, aumentando a superfície de contato, o que leva a uma dissolução mais rápida das substâncias a eles associados (ALVES et al., 2012; BIKIARIS et al., 2005; FRIZON et al., 2013; LEUNER, DRESSMAN, 2005). Além disso, em alguns estudos é notada que a redução do tamanho de partículas promovida pelas dispersões sólidas é mais acentuada, quando comparado a outros processos, como a micronização por exemplo. É relato que as partículas das dispersões podem assumir

tamanho igual ou menor que 1  $\mu\text{m}$ , após o processo de desintegração, diferentemente do tamanho encontrado das partículas após a desintegração a partir de comprimidos e cápsulas comuns (entre 5 a 10  $\mu\text{m}$ ) (ALVES et al., 2012, BIKIARIS et al., 2005; TIWARI et al. 2009).

Além da redução do tamanho de partícula, as dispersões sólidas também apresentam como mecanismo para melhoria da solubilidade, o aumento da molhabilidade do fármaco, o que é favorecida pelo contato direto com o carreador. As dispersões sólidas também podem proporcionar a conversão do estado cristalino para estado amorfo, que é mais solúvel em água (FRIZON et al., 2013).

Para a obtenção das dispersões empregam-se técnicas simples, de baixo custo para as indústrias farmacêuticas. Porém, existem também limitações relacionadas ao método de preparação ou às dificuldades no processo de fabricação em grande escala e em relação à reprodutibilidade das propriedades físico-químicas e à instabilidade física, que em muitos casos, limitam a obtenção de produtos farmacêuticos (ALVES et al., 2012; LIU, 2000; TIWARI et al. 2009). O Quadro 5 apresenta alguns exemplos de medicamentos disponíveis no mercado encontrados na forma de dispersões sólidas (ALVES et al., 2012; MOOTER, 2009).

Nome comercial	Indústria farmacêutica	Fármaco	Carreador
Gris-PEG <sup>®</sup>	PedinolPharmaceutical INC	Griseofulvina	PEG 6000
Isoptin <sup>®</sup> SR-E	Abbott	Verapamil	HPC/HPMC
Kaletra <sup>®</sup>		Lopinavir, Ritonavir	PVPVA
Sporanox <sup>®</sup>	Janssen Pharmaceutica	Itraconazol	HPMC
Intelence <sup>®</sup>	Tibotec	Etravirina	
Certicam <sup>®</sup>	Novartis	Everolimus	
Nivadil <sup>®</sup>	FujisawaPharmaceutical Co, LTDA	Nivaldipino	
Progarf <sup>®</sup>		Tacrolimus	
Rezulin <sup>®</sup>	Desenvolvido por Sankyo, produzido por Parke- Davis	Troglitazona	PVP
Cesamet <sup>®</sup>	Valeant Pharmaceuticals	Nabilone	

Quadro 5 – Medicamentos disponíveis no mercado que apresentam dispersões sólidas (MOOTER, 2012; TIWARI et al., 2009).

Legenda: PEG: polipropilenoglicol, HPC: hidroxipropilcelulose, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose, PVP: polivinilpirrolidona, PVPVA: copolímero vinilpirrolidona-vinil acetato.

As dispersões sólidas podem ser divididas em 4 tipos, de acordo com seu surgimento, conforme demonstrado na Figura 2. Na década de 1960, a primeira geração de dispersões sólidas usava como carreadores, substâncias com caráter cristalino, como uréia e açúcares, podendo formar dispersões cristalinas, por serem mais estáveis. Porém, essas poderiam não liberar o fármaco na velocidade adequada, comprometendo sua biodisponibilidade (ALVES et al., 2012; VANSCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007; VO, PARK, LEE, 2013).

Ao final dessa década, as dispersões sólidas que se apresentavam mais solúveis em água, encontravam-se no estado amorfo. Isso deu início à segunda geração, onde o fármaco estava disperso de modo irregular em um carreador amorfo (ALVES et al., 2012; VANSCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007). Os carreadores aqui empregados seriam polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

(ALVES et al., 2012; DOHERTY, YORK, 1987; FAWAZ et al., 1996; OHARA et al., 2005; SATO et al., 2012; VANSCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).

Com o avanço dos estudos sobre esses sistemas, foi percebido que, apesar do fármaco no estado amorfo apresentar uma dissolução mais rápida, pode ocorrer sua volta à estrutura cristalina, devido sua estabilidade termodinâmica maior. Desse modo, surgiram as dispersões sólidas de terceira geração, que empregam tensoativos, agentes com propriedades emulsionantes, ou misturas de carreadores, com o objetivo de aperfeiçoar a biodisponibilidade de fármacos poucos solúveis e de obter sistemas mais estáveis (ALVES et al., 2012). Assim, as dispersões sólidas de terceira geração podem proporcionar a redução do tamanho de partícula do fármaco, favorecendo a sua molhabilidade e a sua dispersabilidade (ALVES et al., 2012).

Já a quarta geração de dispersões sólidas é um tipo de sistema controle de liberação de fármacos, que têm baixa solubilidade em água e tempo de meia-vida curto (VO, PARK, LEE, 2013). Então, a forma de dispersão sólida oferece duas vantagens: a melhora da solubilidade e a liberação estendida numa forma farmacêutica de controle de liberação, onde se emprega como carreadores polímeros insolúveis ou que entumecem para retardar a liberação de fármacos no meio de dissolução (VO, PARK, LEE, 2013). Dentre os polímeros, podem ser citados etilcelulose, hidroxipropilcelulose, eudragit<sup>®</sup> (copolímeros de metacrilatos) e o carbopol<sup>®</sup> (policarbofil) (VO, PARK, LEE, 2013).

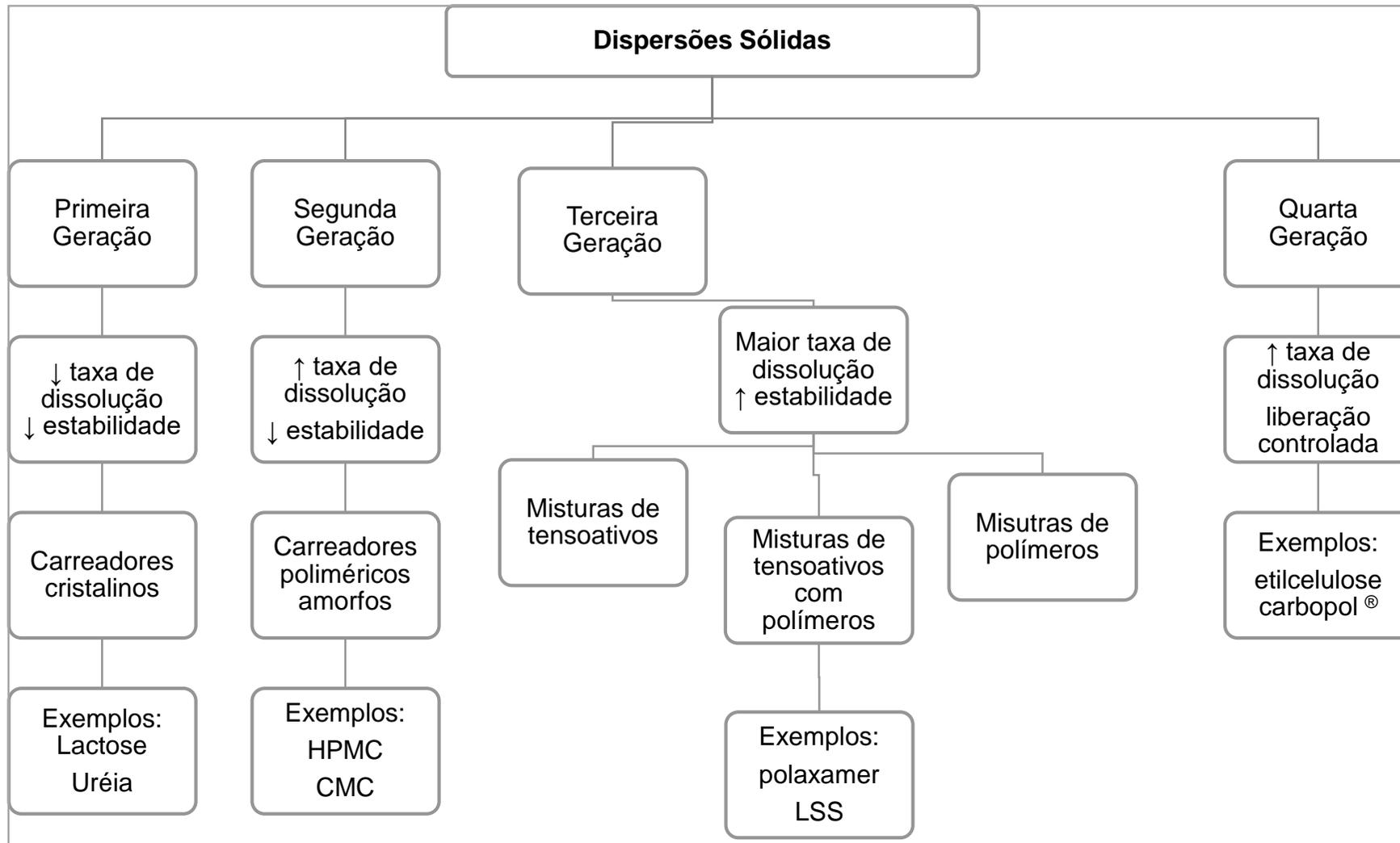


Figura 2 – Classificação das dispersões sólidas (adaptado de VANSCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007; VO, PARK, LEE, 2013).

Legenda: HPMC: hidroxipropilmetilcelulose, CMC: carboximetilcelulose, LSS: lauril sulfato de sódio, ↑: alta, ↓ baixa.

### 3.3.1 Classificação das Dispersões Sólidas conforme às Características de Partícula

As dispersões sólidas podem ser categorizadas de acordo com a características da partícula do fármaco e do carreador (DHIRENDRA et al. 2009; SETHIA, SQUILLANTE, 2003), conforme demonstrado no Quadro 6. Os fármacos podem estar no estado cristalino ou amorfo, ou disperso no nível molecular, enquanto os carreadores estão no estado cristalino ou amorfo (DHIRENDRA et al. 2009).

Quando o fármaco está disperso em um carreador no nível molecular, essa dispersão sólida é chamada de solução sólida (LEUNER, DRESSMAN, 2000; LIU, 2000). Comparadas às soluções líquidas, as soluções sólidas apresentam apenas uma fase, independentemente do número de componentes. Nelas, os fármacos pouco solúveis em água estão dissolvidos nos carreadores, que possui boa solubilidade. Nesse caso, o tamanho de partícula do fármaco pode ser bem reduzido, chegando ao nível molecular. Assim, é o carreador responsável pela velocidade de dissolução do sistema (LEUNER, DRESSMAN, 2000). As soluções sólidas podem ainda ser divididas em contínuas e descontínuas. As primeiras têm os componentes miscíveis em todas as proporções, o que, hipoteticamente, significa que as interações entre o fármaco e carreadores seriam mais “fortes”, que as interações das substâncias individuais (LEUNER, DRESSMAN, 2000; LIU, 2000). No entanto, esse tipo de dispersão sólida nunca foi relato na literatura científica (DHIRENDRA et al. 2009; LEUNER, DRESSMAN, 2000).

Da mesma forma, quando os fármacos estão dispersos num carreador no nível não molecular, as dispersões sólidas podem ser divididas em (LIU, 2000):

- fármaco e carreador encontram-se no estado cristalino;
- fármaco amorfo e carreador cristalino;
- fármaco amorfo e carreador amorfo.

<b>Tipo de partícula</b>	<b>Tipo de dispersão sólida</b>	<b>Carreador</b>	<b>Fármaco</b>
Fármaco disperso no nível molecular	Solução sólida descontínua	C	M
	Solução sólida contínua	C	M
Fármaco disperso no nível não molecular	Fármaco e carreadores no estado cristalino	C	C
	Fármaco amorfo em um carreador cristalino	C	A
	Fármaco amorfo em um carreador amorfo	A	A

Quadro 6 – Tipos de dispersões sólidas conforme tipo de partícula (adaptado de DHIRENDRA et al. 2009).

Legenda: C - estado cristalino, M - no nível molecular, A - amorfo.

### 3.3.2 Métodos de Preparo das Dispersões Sólidas

Vários métodos destinados à preparação das dispersões sólidas são descritos na literatura científica. Dentre esses, destacam-se: métodos de fusão, de eliminação do solvente, malaxagem, fluido supercrítico, *spray drying* e extrusão. Em função da forma de obtenção, as dispersões sólidas poderão apresentar diferentes propriedades físico-químicas (ALVES et al., 2012; DHIRENDRA et al., 2009; GIRI et al., 2012; LEUNER, DRESSMAN, 2000; LIU, 2000; SETHIA, SQUILLANTE, 2003).

No método de fusão, o carreador é aquecido até sua temperatura de fusão e em seguida o fármaco é adicionado nesse componente, sob agitação constante até seu resfriamento. Por fim, espera-se a solidificação do sistema (ALVES et al., 2012; LIU, 2000; GIRI et al., 2012). A temperatura de fusão de um carreador pode ser alta e nessa situação o fármaco não deveria ser termossensível. Ainda, temperatura alta pode levar à evaporação ou sublimação de material, acarretando a sua perda (LIU, 2000). Esse processo tem como vantagem a dispensa de solventes orgânicos, que podem levar a problemas de toxicidade e também sendo prejudicial ao meio ambiente (ALVES et al., 2012).

Já o método de eliminação do solvente ou eliminação do solvente emprega solventes orgânicos, que devem ser misturados ao fármaco e carreador, sob agitação contínua, seguida da retirada desses por evaporação ou sublimação, resultando em um produto seco e sólido. A retirada do solvente pode ser realizada com evaporador

rotativo ou liofilizador (ALVES et al., 2012; LIU, 2000). A possível decomposição de fármacos pode ser minimizada, pois muitos solventes são evaporados em temperaturas mais baixas (no caso do uso de evaporador rotativo), além de ser uma técnica de baixo custo e muito usado em escala laboratorial (ALVES et al., 2012; LIU, 2000; SETHIA, SQUILLANTE, 2003). Todavia, tem como inconveniente o uso de solventes orgânicos e a formação de resíduos (ALVES et al., 2012).

Já na técnica da malaxagem, o carreador e o fármaco são misturados por diluição geométrica. A mistura é malaxada com o acréscimo de solvente numa quantidade mínima, obtendo-se uma massa úmida. Essa é levada ao malaxador, onde a secagem pode ser feita no próprio equipamento ou estufa (ALVES et al., 2012).

Por fim, há uma variedade de trabalhos científicos que empregam outros métodos, a depender das características do fármaco, dos equipamentos disponíveis (LIU, 2000).

### **3.3.3 Carreadores Empregados nas Dispersões Sólidas**

Apesar da grande variedade de excipientes farmacêuticos disponíveis e de muitos trabalhos empregarem uma diversidade de carreadores para a obtenção das dispersões sólidas, a escolha do carreador mais adequado deve atender alguns critérios (LIU, 2000; SETHIA, SQUILLANTE, 2003). São eles:

- Solubilidade aquosa adequada para uma rápida dissolução;
- Estabilidade física na dispersão sólida;
- Estrutura química compatível com o fármaco;
- Ser inativo (sem atividade farmacológica);
- Apresentar baixa toxicidade;
- Reconhecido como seguro pelas agências reguladoras e com monografia farmacopéica.

De fato, a escolha do carreador deve ser baseada nas suas características químicas e essas devem complementar as características dos fármacos (LIU, 2000). Fármacos e carreadores devem apresentar um certo grau de interação molecular, o que pode contribuir para formação da dispersão sólida e sua estabilidade (LIU, 2000). No entanto, essa interação fármaco-carreador não pode ser extremamente forte, pois pode ocasionar em dificuldades de dissociação, limitando a dissolução e a

biodisponibilidade do fármaco. Além disso, a proporção entre fármaco e carreador pode influenciar na velocidade de dissolução do fármaco, mas isso dependerá de cada dispersão sólida (LIU, 2000; SETHIA, SQUILLANTE, 2003).

Também têm sido usadas associações de mais de um carreador ou adição de tensoativos (ALVES et al., 2012; LEUNER, DRESSMAN, 2000; LIU, 2000). Esses últimos atuam na melhoria da molhabilidade do fármaco pela água e sua solubilização (LEUNER, DRESSMAN, 2000). No Quadro 7, estão descritos alguns exemplos de carreadores utilizados em dispersões sólidas.

<b>Grupos</b>	<b>Carreadores</b>
Moléculas pequenas (ácidos orgânicos e açúcares)	Lactose
	Manitol
	Sorbitol
	Ácido cítrico
	Ureia
Polímeros	Polietilenoglicol
	Polivinilpirrolidona
	Crospovidona
	Hidroximetilpropilcelulose
	Hidroxipropilcelulose
	Carboximetilcelulose
Tensoativos	<i>Poloxamer 188</i>
	<i>Poloxamer 407</i>
	Gelucire <sup>®</sup> 44/14
Emulsificantes	Polisorbato 80
	Lauril sulfato de sódio
	Colesterol

Quadro 7 – Exemplos de carreadores usados em dispersões sólidas (ALVES et al., 2012; LEUNER, DRESSMAN, 2000; SAKEER et al., 2010; VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).

### 3.3.4 Caracterização das Dispersões Sólidas

Para a caracterização das dispersões sólidas são empregadas diversas técnicas, que permitem a compreensão de suas propriedades físico-químicas. Muitos esforços têm sido realizados na investigação do arranjo molecular das dispersões, ou seja, na caracterização do estado cristalino ou amorfo dos fármacos. Semelhantes questionamentos também são feitos a despeito dos carreadores. Ainda tem sido debatido se tanto os fármacos quanto os carreadores podem estar em um estado (cristalino ou amorfo) e passarem a outro, e como isso pode ocorrer ao longo do tempo (LIU, 2000; BIKIARIS et al., 2005; TIWAR et al., 2009).

Os métodos de caracterização podem analisar a morfologia, interações entre o carreador e o fármaco, o estado cristalino ou amorfo, a solubilidade. As técnicas comumente empregadas são (BIKIARIS et al., 2005; GURUNATH, NANJWADE, PATILA, 2013; LEUNER, DRESSMAN, 2000; LIMA, 2005; LIU, 2000; SAKEER, et al., 2010; STODGHILL, 2010):

- Calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG);
- Difração de raio-X;
- Espectroscopia de infravermelho;
- Microscopia eletrônica;
- Solubilidade
- Dissolução

### 3.4 Mucoadesão

O termo bioadesão pode ser definido como um estado de adesão entre dois materiais, onde um deles é uma superfície biológica, que podem permanecer juntos por longos períodos. Já a mucoadesão refere-se a adesão a uma membrana mucosa, ou muco, a uma forma farmacêutica (ANDREWS, LAVERTY, JONES, 2009; BAGAN et al., 2012; COOK, KHUTORYYANAKIY, 2015; SMART, 2005). Materiais mucoadesivos, são denominados, possuem uma afinidade grande pelas superfícies mucosas, aderindo à superfície desses tecidos. Assim, os fármacos podem ser unidos a esses mucoadesivos de forma física ou química, com o objetivo de aumentar seu

tempo de residência em um local específico e determinado. Essa permanência permite uma melhora da absorção de fármaco no local de liberação em casos de ação sistêmica. No caso de ação local, o fármaco estará na área onde deve atuar (ANDREWS, LAVERTY, JONES, 2009; COOK, KHUTORYANAKIY, 2015; SMART, 2005). Como formas farmacêuticas mucoadesivas podem ser citadas comprimidos para liberação oral (comprimidos bucais), filmes, géis e pomadas (AGUIAR et al., 2010; ANDREWS, LAVERTY, JONES, 2009; MORALES, McCONVILLE, 2011). Também há uma variedade de membranas mucosas que podem ser empregadas como locais de administração de fármaco, como a cavidade oral, a cavidade nasal, os olhos e os tratos gastrointestinal, respiratório e vaginal (SMART, 2005).

### **3.4.1 A Cavidade Oral**

A boca é a primeira porção do canal alimentar e comunica-se com exterior através de uma fenda, delimitada pelos lábios, rima bucal e parte bucal da laringe. A cavidade oral ou bucal esta delimitada pelas bochechas, palato e por músculos que compõe o assoalho da boca (BRUSH, TREISTER, 2010; BANGAN et al., 2012; DÂNGELO, FATTINI, 1998; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). Nela, são encontradas as gengivas, os dentes e a língua. É ainda dividida em vestíbulo da boca, a cavidade bucal propriamente dita e a orofaringe (BRUSH, TREISTER, 2010; DÂNGELO, FATTINI, 1998). O vestíbulo da boca compreende o espaço presente entre os lábios e as bochechas e a dentição. A cavidade oral propriamente dita encontra-se do lado interior da arca dentária e está delimitada pela arcada palatoglossal. E finalmente, a orofaringe está posteriormente à arcada palatoglossal, que inclui a terceira parte da língua, as amígdalas palatinas e parede posterior (BRUSH, TREISTER, 2010). As estruturas da cavidade oral são adaptadas para uma variedade de funções, tais como barreira protetora, iniciação da digestão, sensação de sabores, fala, deglutição, defesa imunológica e produção de saliva. E recobrimdo toda essa estrutura conhecida como cavidade oral, está a mucosa oral (BRUSH, TREISTER, 2010).

### 3.4.1.2 Mucosa Oral

As membranas mucosas são superfícies úmidas que revestem as paredes de várias cavidades do organismo e são uma camada de tecido conectivo alojada sobre uma camada de tecido epitelial. A umidade dessas superfícies se deve a presença de uma camada de muco, secretadas por células caliciformes sobre o tecido epitelial (COOK, KHUTORYANAKIY, 2015; SMART, 2005). O muco pode ser como uma camada de gel, aderido à mucosa, ou numa forma luminal solúvel ou do tipo suspensão. Quando o muco está na forma de gel, seus componentes são mucinas (um tipo de glicoproteína), lipídios, sais inorgânicos e água. De fato, as mucinas são responsáveis pelas características do muco, como sua forma de gel, adesividade, coesão, viscoelasticidade e pseudoplasticidade (COOK, KHUTORYANAKIY, 2015; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SMART, 2005). Assim, alguns autores propõem pesquisas com material do tipo “mucosa-mimética” para a avaliação da mucodesão, onde há o uso de mucinas (COOK, KHUTORYANAKIY, 2015).

Dentre as mucosas presentes nos organismos, há a mucosa oral. Esta apresenta diferenças, a depender do local da cavidade, como a mucosa mastigatória, recobrando as áreas envolvidas nos processos de mastigação e fala, que incluem as gengivas e o palato duro. Esse tipo de mucosa representa 25% da mucosa oral e é estratificada, com uma camada queratinizada. Já a mucosa oral que reveste a região das bochechas, também conhecida como mucosa jugal, o assoalho da boca e ainda a parte de baixo da língua, representa 60% (BAGAN et al., 2012; MORALES, McCONVILLE, 2011). A mucosa oral possui uma variedade de funções, que incluem proteção, sensação, secreção e é adaptada para o ambiente úmido da boca (BRUSH, TREISTER, 2010).

Histologicamente, a mucosa oral é composta por 2 camadas: a lâmina própria, de origem mesodérmica, e está conectada a uma camada composta de matriz de fibras extracelulares, conhecida como lâmina basal. A lâmina basal é formada por uma camada de tecidos epitelial e camada de tecido conectivo, que estão intimamente ligados entre si, e propicia um suporte mecânico para o epitélio sobrejacente e conexão com a lamina própria (BAGAN et al., 2012). A lâmina própria assegura muitas das propriedades mecânicas da mucosa oral, além do suporte de sangue, essencial

para o tropismo do epitélio. Isso permite a passagem de moléculas, como fármacos, para a circulação sistêmica (BAGAN et al., 2012; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005).

A mucosa bucal é um local apropriado para administração mucoadesiva de fármacos, porque possui uma superfície relativamente imóvel, lisa e acessível. Contudo apresenta limitações, como tempo de residência baixo, pequena área de absorção em barreiras da própria mucosa (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005).

### 3.4.1.3 Teorias da Mucoadesão

A grande maioria dos materiais mucoadesivos são macromoléculas poliméricas, que permitem altos níveis de retenção e que tipo de ligações mucoadesivas ocorrerão. As ligações são intermoleculares e se dão entre os polímeros e a superfície recoberta pelo muco. Essas, ainda, irão acontecer a depender da presença de grupamentos que promovem ligação do tipo hidrogênio, grupos com cargas (hidroxilas e carboxilas) e hidrofóbicos (ANDREWS, LAVERTY, JONES, 2009; SMART, 2005; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). Dessa maneira, na literatura científica sobre mucoadesão podem ser encontradas 5 teorias que explicam como ocorre esse fenômeno (BAGAN et al., 2012; SMART, 2005; VARUM et al., 2008). São elas: a teoria da adsorção, a teoria eletrônica, a teoria do umedecimento, a teoria da fratura e a teoria da difusão (BAGAN et al., 2012; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SMART, 2005; VARUM et al., 2008).

No entanto, a mucoadesão não pode ser explicada apenas por uma teoria, mas pelo conjunto das várias, para melhor elucidar como ocorre o fenômeno. Também dependerá do tipo de formulação farmacêutica e características fisiológicas onde acontecerá o processo de mucoadesão (VARUM et al., 2008). Em geral, ocorre em 2 etapas: a fase de contato e a fase de consolidação. Na fase de contato, como o nome sugere, é preciso que aconteça um contato íntimo entre o polímero mucoadesivo e a camada de muco. Nesse momento, ocorre a transferência de moléculas de água do muco para o polímero, levando ao intumescimento deste. Dessa maneira, o polímero adquire melhor molhabilidade, o que permite sua intercalação com as glicoproteínas

do muco. Na sequência, outras ligações químicas podem irromper. Essa fase, então, é de consolidação, onde a interação entre polímero e muco foi estabelecida (SMART et al., 2005; VARUM et al., 2008). Na Figura 3, estão demonstradas as fases da mucoadesão.

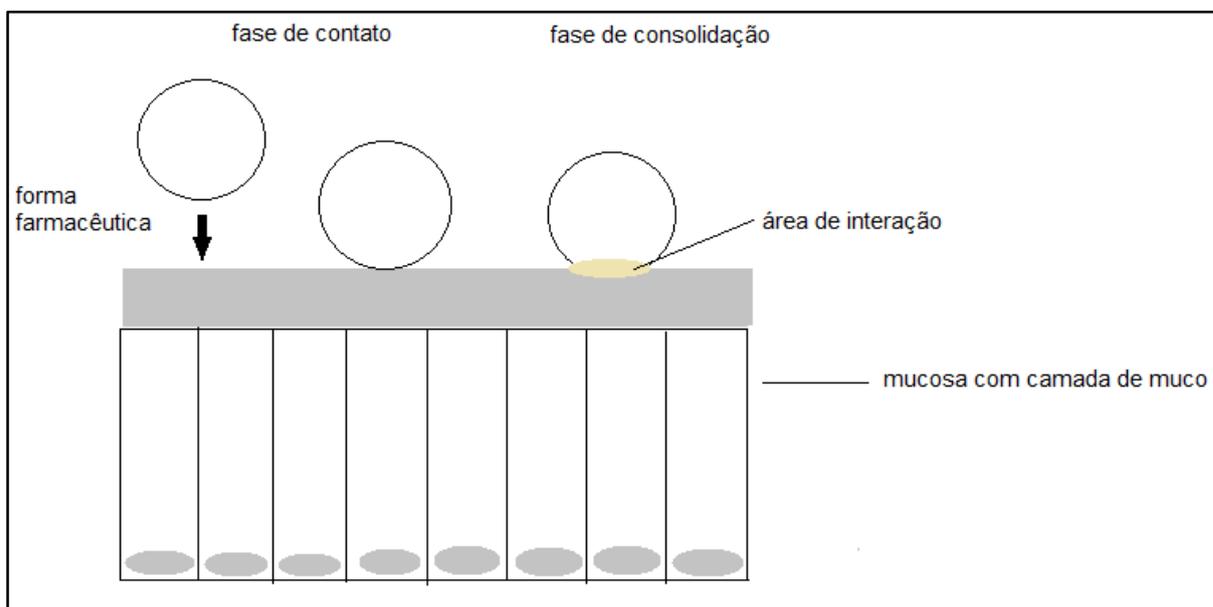


Figura 3 – Esquema das fases de contato e consolidação no processo de mucoadesão.

Inicialmente, a teoria de adsorção pode ser descrita pela interação dos sistemas mucoadesivos através de ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, e forças de Van der Waals. Essas ligações levam a um contato inicial entre o muco e o polímero mucoadesivo e num segundo estágio, a interação dependerá das propriedades do polímero. Também é proposto que essas forças são as principais responsáveis pela interação adesiva entre polímero e a camada de muco (BAGAN et al., 2012; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; VARUM et al., 2008).

A segunda teoria, a eletrônica, refere-se à formação de uma bicamada elétrica na interface, devido à diferença elétrica entre o muco e os polímeros mucoadesivos, levando à transferência de elétrons. Assim, assim ocorre a formação de uma dupla camada de cargas, com atração eletrostática (BAGAN et al., 2012; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; VARUM et al., 2008).

Já a teoria do umedecimento se aplica basicamente a sistemas mucoadesivos líquidos e semi-sólidos e sugere a capacidade deste em molhar a superfície mucosa.

Essa característica de molhabilidade, definida como a habilidade de um líquido viscoso manter contato com uma superfície sólida, resultaria em interações intermoleculares, quando o sistema mucoadesivo e a mucosa estão juntos. A adesão, então, depende da capacidade de molhabilidade do sistema e, conseqüentemente, na sua espalhabilidade sobre a superfície (BAGAN et al., 2012; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SMART, 2005; VARUM et al., 2008).

Ainda a teoria de fratura assume que a força necessária para romper a interação entre o muco e o polímero mucoadesivo é equivalente à força de mucoadesão. Ocorre que a energia para a quebra dessa ligação será maior quando as cadeias do polímero forem mais longas e menor número de ligações cruzadas o polímero possuir (BAGAN et al., 2012; VARUM et al., 2008).

Por fim, a teoria da difusão baseia-se na concentração e no tempo de penetração das cadeias do polímero mucoadesivo na rede macromolecular de glicoproteínas do muco (BAGAN et al., 2012; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SMART, 2005).

#### **3.4.1.4 Sistemas Mucoadesivos Orais**

Os sistemas farmacêuticos mucoadesivos de administração oral devem apresentar uma área de 1 a 3 cm<sup>2</sup>. A dose do fármaco tem de ser menor ou igual a 25 mg e o tempo máximo de duração deve ser de 4 a 6 horas (SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). Como qualquer forma farmacêutica, devem permitir a liberação do fármaco, evitar a irritação no local de administração e, por serem de administração oral, devem possuir características sensoriais compatíveis com a boca (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). Precisam, ainda, manter um contato íntimo entre a forma farmacêutica e superfície mucosa para que ocorra o efeito farmacológico do fármaco (SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006).

Os fármacos de ação sistêmica, ou seja, que irão permear a mucosa oral, podem ser veiculados em formas farmacêuticas mucoadesivas orais. Também são empregados fármacos de ação local, para o tratamento de patologias da própria cavidade oral, como na mucosa, gengivas, dentes e bolsa periodontal (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005). É válido destacar que fármacos com

baixa solubilidade na saliva podem retardar significativamente sua liberação e para melhorar esse processo podem ser usados sistemas que aumentam a solubilidade do fármaco, como as ciclodextrinas (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005).

Dentre os sistemas mucoadesivos orais são encontradas as formas farmacêuticas sólidas, semi-sólidas e líquidas. Os sistemas sólidos são formulações que levam à mucoadesão por meio da desidratação da superfície mucosa. São representadas por comprimidos, micropartículas e pastilhas (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). Em geral, os comprimidos mucoadesivos orais são usados para administração de fármacos de ação local e sistêmica. Estas formas farmacêuticas podem ser colocadas diretamente na mucosa oral e têm apresentado boas propriedades mucoadesivas (AGUIAR et al., 2010; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). No entanto, há limitações como tamanho dos comprimidos, já que é necessário um contato íntimo entre a forma e a mucosa (SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006).

Por outro lado, as formas farmacêuticas líquidas são viscosas e atuam como uma forma protetora, ao recobrir a mucosa bucal e para veicular fármacos. Os sistemas líquidos mucoadesivos são preparados com polímeros que elevam a viscosidade de produtos farmacêuticos, ajudando a retê-lo na cavidade oral (SMART, 2005; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). E por último, há os sistemas semi-sólidos mucoadesivos, os quais são representados pelos filmes, pomadas e géis (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). As formas semi-sólidas apresentam vantagens como mucoadesivos, pois possuem melhor espalhabilidade sobre a mucosa e, ainda, apresentam uma retenção extensa na cavidade oral. Todavia, no que diz respeito a dosagem do fármaco que veiculam, essas formas não são tão precisas, quando se trata de comprimidos (SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006).

Da mesma forma que são importantes os sistemas usados para o preparo de mucoadesivos, os polímeros que são empregados devem apresentar a capacidade de adesão à mucosa. Não só isso, esses adjuvantes precisam apresentar outras características, que culminam no bom desempenho da função de aderência. Dentre

elas, podem ser citadas: (A) o peso molecular alto, pois o aumento da força de adesão eleva-se com aumento do peso molecular; (B) a flexibilidade, que permite que as cadeias do polímero se difunda pela superfície mucosa; (C) a presença de grupamentos funcionais, já que as interações entre os mucoadesivos e a mucosa se faz por ligações químicas; (D) a densidade de ligações cruzadas que, junto com o peso molecular, permite a formação de formar uma malha, melhorando sua difusão; (E) a capacidade de hidratação dos polímeros, que permite seu intumescimento na presença de água, sua posterior expansão, levando a uma rede macromolecular com o muco, melhorando a interpenetração e difusão entre o polímero e a mucosa; (F) a concentração dos polímeros, que em geral quanto maior sua concentração, maior é a possibilidade da interpenetração dos polímeros na mucosa e assim, melhorar a mucoadesão, e (G) por fim, a capacidade de espalhabilidade, umedecimento e solubilidade (BAGAN et al., 2012; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006).

Diante dessas propriedades, os polímeros que apresentam aderência à mucosa e são normalmente usados em mucoadesivos são classificados como sintéticos e naturais, e com e sem carga. Os polímeros naturais têm propriedades similares aos polímeros sintéticos. Em geral são lineares, com alto peso molecular, capazes de formar redes tridimensionais e contêm grupamentos para realizar ligações hidrogênio e outros grupos funcionais. São exemplo a quitosana, carragenana e goma aguar (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005; SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006). Os polímeros sintéticos são derivados de celulose, de ácido poliacrilato e de polimetacrilato.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

---

## 4.1 Materiais

### 4.1.1 Matérias-primas

- Carbopol 934 PNF<sup>®</sup> Lubrizol<sup>®</sup> (polímero de ácido acrilato)
- Cloridrato de ranitidina matéria-prima: fornecedor Sigma-aldrich<sup>®</sup>, teor 98%
- Hidroxipropilmetilcelulose Henrifarma<sup>®</sup>
- Lactose M200 Henrifarma<sup>®</sup>
- Methocel<sup>™</sup> K 4M Colorcon<sup>®</sup> (hidroxipropilmetilcelulose)
- Mentol Farnos<sup>®</sup>
- Noveon AA1<sup>®</sup> Lubrizol<sup>®</sup> (policarbofil)
- Nistatina matéria-prima: Purifarma<sup>®</sup> (lote: 18720608), potência de 5.503,1 UI/mg
- Nistatina padrão farmacopeico secundário: fornecido gentilmente pela FURP, potência de 6.273,22 UI/mg, origem: padrão primário USP, lote: 2025971/0
- Poloxamer P 407 Basf<sup>®</sup> (copolímero de polietileno–propileno glicol), fórmula molecular  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ , onde a é igual 80 e b é igual a 27
- Poloxamer P188 Basf<sup>®</sup> (copolímero de polietileno–propileno glicol), fórmula molecular  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ , onde a é igual 101 e b é igual a 56
- Plasdone S360<sup>®</sup> *International Speciality Product (ISP)*<sup>®</sup> (poli (1-vinilpirrolidona-co-acetato de vinila)
- Polivinilpirrolidona (PVPK 29-32) *International Speciality Product (ISP)*<sup>®</sup>
- Metilparabeno Farnos<sup>®</sup>
- Sacarina sódica Farnos<sup>®</sup>
- Tartarato de metoprolol matéria-prima: fornecedor Sigma-aldrich<sup>®</sup>, teor 96,5%

### 4.1.2 Reagentes e Solventes

- Acetona P.A. Synth<sup>®</sup>
- Acetonitrila grau HPLC Merk<sup>®</sup>
- Ácido acético glacial P.A. Synth<sup>®</sup>
- Ácido clorídrico fumegante 37 %v/v Merk<sup>®</sup>
- Ágar Oxoid<sup>®</sup>

- Água ultrapura (obtida do equipamento Mili-Q, Milipore)
- Álcool etílico absoluto P.A. Synth<sup>®</sup>
- Cloreto de sódio P.A. Synth<sup>®</sup>
- Colesterol 95 %p/p Sigma-aldrich<sup>®</sup>
- Dextrose Merck<sup>®</sup>
- Dimetilsufóxido P.A. Sigma-aldrich<sup>®</sup>
- Dodecano reagentplus<sup>®</sup> Sigma-aldrich<sup>®</sup>
- Extrato de carne Merck<sup>®</sup>
- Extrato de levedura Merck<sup>®</sup>
- Fosfatidilcolina de soja 20 %p/p Avanti Polar Lipids<sup>®</sup>
- Fosfato de potássio monobásico Merk<sup>®</sup>
- Hidróxido de sódio P.A. Synth<sup>®</sup>
- Metanol grau HPLC Merk<sup>®</sup>
- N,N - Dimetilformamida P.A. Synth<sup>®</sup>
- N,N - Dimetilformamida grau HPLC Sigma-aldrich<sup>®</sup>
- Peptona Oxoid<sup>®</sup>
- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601
- Tetraborato de sódio Sigma-aldrich<sup>®</sup>

#### 4.1.3 Equipamentos

- Analisador de tamanho de partícula 1090 Líquido Cilas
- Analisador de textura TA-XT plus - Stable Micro Systems, UK
- Balança analítica AX200 Shimadzu
- Banho termostático TE-2005 Tecnal
- Banho ultrasson Unique
- Bomba de vácuo isenta de óleo R-TE-0582 Tecnal
- Calorímetro de varredura DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc, Japão)
- Célula de difusão vertical (58-001-455) adaptação, orifício de 5,0 mm, volume de 7,0 mL e área de exposição de 0,20 cm<sup>2</sup> Hanson Researc
- Coluna C18 de fase reversa; 4,6 x 150 mm; 5µm Phenomenex<sup>®</sup>

- Cromatógrafo líquido (CLAE) Shimadzu Scientific Instrumentation constituído de bomba LC-10ADvp, detector Diode Array SPD-M10ADpv, outros módulos
- Difractômetro XRD 3000 Shimadzu
- Espectrofotômetro UV/fluorescência para microplacas de 96 poços Tecan Infinite M200
- Espectrômetro Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10, Smart OMNI-Transmission.
- Estufa Fanem
- Evaporador rotativo TE-211 Tecnal
- Incubadora com plataforma de agitação orbital *shaker* TE 420 Tecnal
- Liofilizador marca ThermoElectron modelo Supermodulyo
- Microplacas de 96 poços receptoras de recepção de permeação contendo filtros de PVDF de tamanho de poro 0,45 µm Milipore<sup>®</sup>
- Potenciômetro medidor de pH Hanna Instruments modelo HI 221
- Reômetro MCR-300 Physica, com geometria cone-placa de 25 mm de diâmetro e ângulo de 1°
- Sistema de purificação de água Milipore<sup>®</sup>
- *Software Origin*<sup>®</sup> 9.0 64 bits
- Tamis de aço inox *Tyler* 20 Synth
- Termobalança TG/DTA 7200 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão)
- Ultrassom Unique

#### **4.1.4 Formulações de Dispersões Sólidas de Nistatina**

##### **4.1.4.1 Formulações de Dispersões Sólidas de Nistatina do Grupo 1**

- NYS DS G1 (2) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 2
- NYS DS G1 (3) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 3
- NYS DS G1 (4) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 4
- NYS DS G1 (6) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 6
- NYS DS G1 (7) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 7
- NYS DS G1 (14) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 14
- NYS DS G1 (15) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 15

- NYS DS G1 (16) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 16
- NYS DS G1 (17) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 17
- NYS DS G1 (18) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 18
- NYS DS G1 (19) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 19
- NYS DS G1 (20) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 20
- NYS DS G1 (21) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 21
- NYS DS G1 (22) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 1, nº 22

#### **4.1.4.2 Formulações de Dispersões Sólidas de Nistatina do Grupo 2**

- NYS DS G2 (45) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 45
- NYS DS G2 (46) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 46
- NYS DS G2 (47) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 47
- NYS DS G2 (48) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 48
- NYS DS G2 (49) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 49
- NYS DS G2 (50) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 50
- NYS DS G2 (51) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 51
- NYS DS G2 (52) – Formulação de dispersão sólida de nistatina do Grupo 2, nº 52
- NYS DS (A) – Formulação de dispersão sólida de nistatina obtida por liofilização

#### **4.1.5 Misturas Físicas de Nistatina**

- NYS MF (4) – Mistura física de nistatina com lactose, na proporção 1:25
- NYS MF (6) – Mistura física de nistatina com HPMC, na proporção 1:25
- NYS MF (7) – Mistura física de nistatina com methocel, na proporção 1:25
- NYS MF (14) – Mistura física de nistatina com methocel, na proporção 1:10
- NYS MF (45) ou (A) – Mistura física de nistatina com Polo 407, na proporção 1:1
- NYS MF (46) – Mistura física de nistatina com Polo 407, na proporção 1:2
- NYS MF (47) – Mistura física de nistatina com Polo 407, na proporção 1:3
- NYS MF (48) – Mistura física de nistatina com Polo 407, na proporção 1:4
- NYS MF (49) – Mistura física de nistatina com Polo 188, na proporção 1:1
- NYS MF (50) – Mistura física de nistatina com Polo 188, na proporção 1:2

- NYS MF (51) – Mistura física de nistatina com Polo 188, na proporção 1:3
- NYS MF (52) – Mistura física de nistatina com Polo 188, na proporção 1:4

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Obtenção e Caracterização de Dispersões Sólidas de Nistatina**

#### **4.2.1.1 Avaliação da Qualidade da Nistatina Matéria-prima**

##### **4.2.1.1.1 Distribuição do Tamanho de Partícula**

A distribuição do tamanho de partícula da nistatina matéria-prima (NYS MP) foi determinada por dispersão de raio laser, com emprego do equipamento analisador do tamanho de partícula 1090 Líquido Cilas, módulo líquido, tendo como meio de dispersão água, e como agente dispersante lauril sulfato de sódio.

##### **4.2.1.1.2 Determinação do Teor de NYS MP pelo Método de Difusão em Ágar**

Determinou-se o teor de NYS MP pelo ensaio microbiológico de difusão em ágar, seguindo a metodologia preconizada na Farmacopeia Brasileira (2010). O experimento consistiu em inocular, em placas de *Petri*, o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, sensível à NYS. Nas placas foram colocados papéis embebidos de soluções de NYS padrão e NYS MP. Os halos de inibição formados a partir da solução de NYS MP foram comparados aos halos formados a partir da solução de NYS padrão (AGUIAR, 2010). O ensaio foi realizado pela empresa BCQ Consultoria e Qualidade.

##### **4.2.1.1.3 Determinação do Teor de NYS MP pelo Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A determinação de teor de NYS MP foi efetuada por CLAE, com detecção por UV, método previamente desenvolvido e validado. O método e sua posterior validação estão descritas no item 4.2.3.1.

Uma solução-teste de concentração de 0,75 mg/mL foi obtida e posteriormente analisada em triplicata por CLAE, com detecção em UV, no comprimento de onda de 305 nm. As médias das áreas encontradas, por meio da equação da reta, obtidas a partir da curva analítica, foram usadas na determinação da concentração das soluções-teste de NYS MP.

#### **4.2.1.2 Obtenção de Dispersões Sólidas de Nistatina (NYS DS)**

A obtenção das NYS DS ocorreu através do uso de método de eliminação do solvente, com emprego de evaporador rotativo e liofilizador (LEUNER & DRESSMAN, 2000; VANSCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007). Esse método foi escolhido por ser reprodutível e de baixo custo, no caso do evaporador rotativo (ALVES et al., 2012; LIU, 2000; SETHIA, SQUILLANTE, 2003). Quanto ao uso dos equipamentos para a retirada dos solventes, foi usado o evaporador rotativo, muito empregado para remoção de solventes orgânicos voláteis, mas não tão indicado para retirada da água, ocorre por sublimação. Por outro lado, para avaliar a possibilidade do emprego de água como solvente, que não possui problemas de resíduos ambientais e toxicidade, como os solventes orgânicos. Dessa maneira, foi preparada uma formulação com uso de liofilizador.

Assim, foram preparadas 22 formulações de dispersões sólidas pelo método de eliminação do solvente com uso de evaporador rotativo. O desenvolvimento de formulações NYS DS foi baseado no emprego de carreadores hidrofílicos, que pudessem permitir o aumento da solubilidade aquosa do antifúngico (SAKEER, 2010). Assim, a lactose foi escolhida como carreador, após de revisão da literatura científica, onde foi encontrado apenas um trabalho de dispersão sólida de NYS com essa matriz (SAKEER, 2010). Também foi escolhido a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) sob 2 formas: HPMC e methocel<sup>TM</sup> K 4 M, por ser constante nas publicações científicas sobre o tema (ADIBKIA et al., 2013; KIM et al., 2006; RIEKES et al., 2014). E os carreadores plasdone S 360<sup>®</sup> (PLA), polivinilpirrolidona 29-32 (PVPK 29-32), poloxamer P 407 (Polo 407) e poloxamer P 188 (Polo 188) foram usados pelo conhecimento prévio de Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (GOUVEIA, 2011).

Além disso, a produção de dispersões sólidas também se baseou no tipo de classificação dos carreadores, quanto ao surgimento. Então os carreadores de 1ª e de 2ª geração – PLA, PVPK 29-32, lactose, HPMC, methocel™ K 4 M; e carreadores de 3ª geração – Polo 407 e Polo 188. Já, para o preparado das formulações com uso do liofilizador foi utilizado o carreador polo 407 (carreador de 2ª geração).

#### **4.2.1.2.1 Obtenção de NYS DS pelo Método de Eliminação do Solvente com Uso de Evaporador Rotativo**

As formulações de NYS DS foram reunidas em 2 grupos, denominados Grupo 1, no qual foram usados os carreadores de dispersão sólidas de 1ª e 2ª gerações (açúcares e polímeros hidrofílicos); e o Grupo 2, no qual foram utilizados os carreadores de 3ª geração (tensoativos) (ALVES et al., 2012; VANSCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007).

Inicialmente, a NYS foi pesada em balança analítica, transferida para béquer de vidro, onde foi vertido o solvente orgânico (dimetilformamida, para as formulações do Grupo 1 e acetona, para as formulações do Grupo 2), formando uma solução ou uma suspensão, a depender das características químicas do solvente e de sua afinidade pelo fármaco. Em seguida, o carreador foi pesado em balança analítica, transferido para béquer de vidro, onde foi vertido outro solvente orgânico, formando uma suspensão. A solução ou suspensão de NYS foi vertida sobre a suspensão do carreador, formando uma nova suspensão. Esta última foi levada ao ultrassom por 15 min, para homogeneização.

Posteriormente, a suspensão obtida foi transferida para balão de fundo redondo de 1 L e submetida ao evaporador rotativo, permanecendo por aproximadamente 1 h, até evaporação dos solventes orgânicos. O processo de evaporação dos solventes foi desenvolvido nas seguintes condições: pressão de 600 mmHg e temperatura de 50°C.

Após a evaporação dos solventes, as amostras foram levadas à estufa para completa secagem, sob 50°C por 8 h. Em seguida, os sólidos obtidos foram pulverizados em grau de porcelana e foram padronizados em tamis de aço inox Tyler 20, de abertura 0,85 mm.

Nas Tabelas 1 e 2, estão descritas as composições das formulações para a obtenção das dispersões sólidas dos Grupos 1 (NYS DS G1) e 2 (NYS DS G2). As formulações aqui obtidas foram designadas por números que estão entre parênteses.

<b>Dispersões Sólidas</b>	<b>Formulações (proporção)</b>	<b>Soluções de NYS</b>	<b>Suspensões de Carreadores</b>
NYS: PLA	<b>NYS DS G1 (2)</b> (1:25)	0,2 g + 10 mL de dimetilformamida	5,0 g + 50mL de etanol absoluto
NYS: PVPK 29-32	<b>NYS DS G1 (3)</b> (1:25)	0,2 g + 10 mL de dimetilformamida	5,0 g + 50mL de etanol absoluto
NYS:Lactose M 200	<b>NYS DS G1 (4)</b> (1:25)		5,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (20)</b> (1:10)	0,2 g + 10 mL de dimetilformamida	2,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (21)</b> (1:5)		1,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (22)</b> (1:1)		0,2 g + 100 mL de etanol absoluto
NYS:HPMC	<b>NYS DS G1 (6)</b> (1:25)		5,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (17)</b> (1:10)	0,2 g + 10 mL de dimetilformamida	2,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (18)</b> (1:5)		1,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (19)</b> (1:1)		0,2 g + 100 mL de etanol absoluto
NYS:Methocel™ K 4M	<b>NYS DS G1 (7)</b> (1:25)		5,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (14)</b> (1:10)	0,2 g + 10 mL de dimetilformamida	2,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (15)</b> (1:5)		1,0 g + 100 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G1 (16)</b> (1:1)		0,2 g + 100 mL de etanol absoluto

Tabela 1 – Composição das NYS DS com carreadores do Grupo 1, indicando as quantidades de fármaco e carreadores. Legenda: NYS: nistatina, PLA: pladone®, PVPK 29-32: polivinilpirrolidona, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose.

<b>Dispersões Sólidas</b>	<b>Formulações (proporção)</b>	<b>Suspensões de NYS</b>	<b>Suspensões de Carreadores</b>
NYS:Polo 407	<b>NYS DS G2 (45)</b> (1:1)		5,0 g + 35 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G2 (46)</b> (1:2)	5 g + 35 mL de acetona	10,0 g + 35 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G2 (47)</b> (1:3)		15,0 g + 35 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G2 (48)</b> (1:4)		20,0 g + 35 mL de etanol absoluto
NYS:Polo 188	<b>NYS DS G2 (49)</b> (1:1)		5,0 g + 35 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G2 (50)</b> (1:2)	5 g + 35 mL de acetona	10,0 g + 35 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G2 (51)</b> (1:3)		15,0 g + 35 mL de etanol absoluto
	<b>NYS DS G2 (52)</b> (1:4)		20,0 g + 35 mL de etanol absoluto

Tabela 2 – Composição das NYS DS com carreadores do Grupo 2, indicando as quantidades de fármaco e carreadores.

Legenda: NYS: nistatina, Polo 407: poloxamer P 407, Polo 188: poloxamer P 188.

#### **4.2.1.2.2 Obtenção de NYS DS pelo Método de Eliminação do Solvente com Uso de Liofilizador**

Quanto ao método empregado de eliminação do solvente, foi desenvolvida apenas uma formulação de NYS DS, por liofilização, onde foi utilizado como carreador o tensoativo polo 407, conforme descrito na Tabela 3. Essa formulação apresentou NYS e polo 407, na proporção de 1:1.

Inicialmente, a NYS foi pesada em balança analítica, transferida para bquer de vidro, onde foi vertida água, formando uma suspensão. Em seguida, o carreador Polo 407 foi pesado em balança analítica, transferido para bquer de vidro, no qual foi adicionada água, resultando em uma segunda suspensão. A suspensão de NYS foi vertida sobre a suspensão de Polo 407, formando uma terceira suspensão. Esta última

foi agitada com bastão de vidro, e congelada manualmente com gelo seco. A preparação congelada foi levada ao liofilizador, por aproximadamente 24 h, até sublimação completa da água.

Na Tabela 3, está descrita a composição da formulação de NYS:Polo 407. A formulação obtida foi designada por letras.

<b>Dispersões Sólidas</b>	<b>Formulação</b>	<b>Suspensão de NYS</b>	<b>Suspensão de Carreador</b>
NYS:Polo 407	<b>NYS DS (A)</b> (1:1)	1 g + 25 mL água miliQ	1 g + 25 mL água miliQ

Tabela 3 – Composição da NYS DS (A), indicando as quantidades de fármaco e carreador.

Legenda: Polo 407: poloxamer P 407.

#### 4.2.1.2.3 Preparo das Misturas Físicas de NYS e Carreadores

Para cada formulação de dispersão sólida, foram preparadas misturas físicas de NYS e carreadores (NYS MF), nas mesmas composições e proporções que as formulações de NYS DS. As NYS MF foram preparadas por meio da pesagem de NYS e dos respectivos carreadores e posterior mistura em gral de porcelana, por de diluição geométrica, até obtenção de uma mistura homogênea (FRIZON et al., 2013; RIEKES et al., 2014). Nesse caso, só foram preparadas as NYS MF das NYS DS correspondentes que foram avaliadas em relação à solubilidade, análise térmica, permeabilidade, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e difração de raio-X e serviram de comparação com as respectivas formulações de NYS DS. Na Tabela 4, estão descritas as quantidades de NYS e carreadores para o preparo das NYS MF.

O preparo e caracterização das NYS MF tiveram como objetivo avaliar se houve a formação de um novo sistema farmacêutico, ou seja, das dispersões sólidas. As NYS MF também tiveram como objetivo investigar a influência dos carreadores, por serem hidrofílicos, como aumentariam a solubilidade da NYS e/ou apresentariam comportamento térmico e nas outras técnicas, distinto das formulações de dispersões sólidas (FRIZON et al., 2013; RIEKES et al., 2014).

<b>Misturas Físicas</b>	<b>Denominação (proporção)</b>	<b>Quantidade de NYS e Carreador</b>
NYS:Lactose M 200	<b>NYS MF (4)</b> (1:25)	1 g NYS + 25 g lactose
NYS:HPMC	<b>NYS MF (6)</b> (1:25)	1 g NYS + 25 g HPMC
NYS:Methocel™ K 4M	<b>NYS MF (7)</b> (1:25)	1 g NYS + 25 g Methocel
	<b>NYS MF (14)</b> (1:10)	1 g NYS + 10 g Methocel
NYS:Polo 407	<b>NYS MF (45)</b> (1:1)	1 g NYS + 1 g Polo 407
	<b>NYS MF (46)</b> (1:2)	1 g NYS + 2 g Polo 407
	<b>NYS MF (47)</b> (1:3)	1 g NYS + 3 g Polo 407
	<b>NYS MF (48)</b> (1:4)	1 g NYS + 4 g Polo 407
NYS:Polo 188	<b>NYS MF (49)</b> (1:1)	1 g NYS + 1 g Polo 188
	<b>NYS MF (50)</b> (1:2)	1 g NYS + 2 g Polo 188
	<b>NYS MF (51)</b> (1:3)	1 g NYS + 3 g Polo 188
	<b>NYS MF (52)</b> (1:4)	1 g NYS + 4 g Polo 188

Tabela 4 – Composição das NYS MF, indicando as quantidades de fármaco e de carreadores.

Legenda: NYS: nistatina, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose, Polo 407: poloxamer P 407, Polo 188: poloxamer P 188.

#### 4.2.1.3 Caracterização das NYS DS

A caracterização parcial foi realizada por análise térmica, com ensaios de calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria / termogravimetria derivada (TG/DTG). Inicialmente, foram analisadas a NYS MP e os carreadores lactose, HPMC, methocel e Polo 407 e Polo 188.

Posteriormente, foram analisadas apenas as NYS DS que formaram um sólido após o processo de obtenção. Assim, as preparações analisadas foram NYS DS (A), NYS DS G1 (4), NYS DS G1 (6), NYS DS G1 (7), NYS DS G1 (14), NYS DS G2 (45), NYS DS G2 (46), NYS DS G2 (47), NYS DS G2 (48), NYS DS G2 (49), NYS DS G2

(50), NYS DS G2 (51) e NYS DS G2 (52). Por fim, também foram avaliadas as NYS MF correspondentes às NYS DS, que foram: NYS MF (4), NYS MF (6), NYS MF (7), NYS MF (14), NYS MF (A), NYS MF (46), NYS MF (47), NYS MF (48), NYS MF (49), NYS MF (50), NYS MF (51) e NYS MF (52).

#### **4.2.1.3.1 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)**

No ensaio de calorimetria exploratória diferencial de fluxo de calor, foram empregados cerca de 2,0 mg das amostras, as quais foram dispostas em cápsula de alumínio hermeticamente fechada e submetidas à análise no equipamento Calorímetro de Varredura DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc, Japão), sob atmosfera de nitrogênio de 50 mL/min, na razão de aquecimento de 10°C/min, e na faixa de temperatura de 25 a 300°C. O elemento químico índio foi usado como padrão, para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia (SAKEER, 2010).

As curvas foram obtidas com uso do programa *Origin*® 9.0 64 bit. As análises foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (DEINFAR), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

#### **4.2.1.3.2 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)**

No ensaio de termogravimetria dinâmica foram empregados cerca de 2 mg das amostras, acondicionadas em cadinho (aberto) de platina e submetidas à análise no equipamento Termobalança TG/DTA 7200 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão), sob atmosfera de nitrogênio de 100 mL/min, na razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 25 a 600°C. Previamente aos ensaios, a calibração do equipamento foi verificada empregando um padrão de oxalato de cálcio (STEFANOVIC, 2012).

As curvas foram obtidas com uso do programa *Origin*® 9.0 64 bits. As análises foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (DEINFAR), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

#### 4.2.1.3.3 Avaliação da Solubilidade das NYS DS

A solubilidade foi avaliada em relação à NYS, sob as diferentes formas: NYS MP, NYS DS e NYS MF. Nos ensaios, foi empregado o método do equilíbrio, com o uso da técnica *shake-flask* (agitação de frascos), na incubadora com plataforma de agitação orbital com controle de temperatura, conforme preconizado pelo guia da *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (U.S., 2000). As preparações testadas estão apresentadas na Tabela 5.

Através desse método, foram avaliadas apenas as NYS DS que apresentaram um resultado indicativo de formação desse sistema farmacêutico. Assim como as NYS MF também foram aquelas avaliadas as correspondentes às NYS DS.

<b>Fármaco</b>	<b>Dispersões Sólidas</b>	<b>Misturas Físicas</b>
NYS MP	NYS DS G1 (6)	NYS MF (6)
	NYS DS G1 (7)	NYS MF (7)
	NYS DS G1 (14)	NYS MF (14)
	NYS DS G2 (47)	NYS MF (47)
	NYS DS G2 48	NYS MF (48)
	NYS DS G2 49	NYS MF (49)
	NYS DS (A)	NYS MF (A)

Tabela 5 – Descrição das preparações farmacêuticas que foram analisadas no ensaio de solubilidade (entre parênteses são apresentados os números das formulações desenvolvidas e descritas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4).

Os ensaios foram executados em frascos plásticos com tampa e capacidade de 50 mL. Em cada frasco, foram adicionados 10 mL dos seguintes meios: água purificada; tampão fosfato pH 7,0 e tampão acetato pH 5,5 (LÁZARO, VALENÇA, CHIAPPINI, 1999; MADSEN et al., 2013; SATO, 2002; PASSOS, FREITAS, SAMPAIO, 2011). As soluções tampão foram preparadas conforme descrito na Farmacopeia Americana e no Quadro 8 (USP, 2011).

Em seguida, as amostras foram colocadas em quantidades para saturar o meio, caracterizado pelo depósito de material no fundo do recipiente (fração não solubilizada). Os frascos foram adaptados ao equipamento, o qual foi programado

para manter a temperatura em  $37,0 \pm 0,5$  °C e agitação de 150 rpm pelo período de 72 horas (DEZANI et al., 2013; STAVCHANSKY, PADE, 1998; U.S., 2000).

Após as 72 horas, as amostras foram retiradas do equipamento e imediatamente filtradas com auxílio de filtro Milipore<sup>®</sup> 0,45 µm e seringa. A partir do volume filtrado, foram realizadas as diluições necessárias com os meios correspondentes. A concentração de NYS dissolvida nos meios foi determinada pelo método espectrofotométrico em comprimento de onda de 279 nm. O método analítico empregado foi desenvolvido e validado conforme descrito no item 4.2.3.2.

Assim foi obtida a solubilidade do fármaco, expressa por unidade de massa (mg) / unidade de volume (mL).

Tipo de solução	Modo de preparo
Tampão fosfato pH 7,0	Foi transferido 27,22 g de fosfato de potássio monobásico para um balão volumétrico de 1000,0 mL, que foi avolumado com água purificada. Em seguida, uma alíquota de 50,0 mL desta solução previamente preparada foi transferida para um balão de 200,0 mL, e adicionaram-se 29,1 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 0,2 M; completou-se o volume com água purificada.
Tampão acetato pH 5,5	Foi transferido de 5,98 g de acetato de sódio para um balão volumétrico de 1000,0 mL. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 3,0 mL de uma solução de ácido acético glacial a 2 M a esta solução. Completou-se o volume com água purificada.

Quadro 8 – Composição das soluções tampão usadas no ensaio de solubilidade (USP, 2011).

Os resultados de solubilidade obtidos (média de três determinações) para NYS MP, NYS DS e NYS, foram submetidos à análise estatística. Os valores médios de concentração de NYS MP (mg/mL) foram comparados com os valores médios das concentrações (mg/mL) das formulações de NYS DS nos 3 meios diferentes: água purificada; tampão fosfato pH 7,0 e tampão acetato pH 5,5. Também foram comparados os valores médios das concentrações de NYS MP (mg/mL) com valores

médios das concentrações de NYS MF (mg/mL), e por fim as concentrações de NYS DS (mg/mL) foram comparadas com as concentrações de NYS MF (mg/mL). Para a comparação das medias foi empregado o teste t de Student para amostras independentes (WINTER, 2013). Já o teste F foi utilizado para comparar a variância entre os diferentes grupos e o teste t de Welch foi utilizado para comparar os valores médios no caso de heterocedasticidade. Foi considerado um nível de confiança de 95%, o que significa que o resultado estará dentro daquele intervalo em 95 de 100 estudos hipoteticamente realizados. Todos os cálculos foram feitos utilizando o ambiente estatístico R (R Core Team, 2014).

#### **4.2.1.4 Caracterização Complementar da NYS DS**

A caracterização complementar foi realizada apenas para formulação de NYS DS G2 (49) previamente selecionada em função dos resultados satisfatórios de solubilidade. As análises complementares realizadas foram: difração de raio X; espectroscopia do infravermelho com Transformada de Fourier; teor de NYS e avaliação da permeabilidade por meio de ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA).

##### **4.2.1.4.1 Difração de Raio-X (DRX)**

As análises de difração de raio-X foram realizadas em difratômetro Shimadzu XRD 3000, com radiação Cu K $\alpha$ . O anodo do tubo raio-x foi operado em 30 kV e 30 mA e a deflexão dos raios-x foi medido a partir da 2° a 90°. As amostras avaliadas foram: NYS MP, Polo 188, NYS MF (49) e NYS DS G2 (49). As curvas foram obtidas com uso de programa *Origin*® 9.0 64 bits. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas de Substâncias Ativas, na Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas.

##### **4.2.1.4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os ensaios foram realizados com pastilhas preparadas com cerca de 150 mg de KBr e 1,5 mg de amostra, produzidas por prensa hidráulica, em espectrômetro

Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10, Smart OMNI-Transmission. Os ensaios foram realizados entre 4100 e 100  $\text{cm}^{-1}$  e os espectros foram obtidas com uso de programa *Origin*® 9.0 64 bits. As amostras avaliadas foram: NYS MP, Polo 188, NYS MF (49) e NYS DS G2 (49). As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas de Substâncias Ativas, na Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas.

#### **4.2.1.4.3 Teor da NYS DS**

O ensaio de teor de NYS presente na dispersão sólida NYS DS G2 (49) foi realizado com objetivo de quantificar o fármaco na formulação desenvolvida no presente trabalho. Este constituiu no método previamente desenvolvido e validado, descrito no item 4.2.3.2 (BRASIL, 2003).

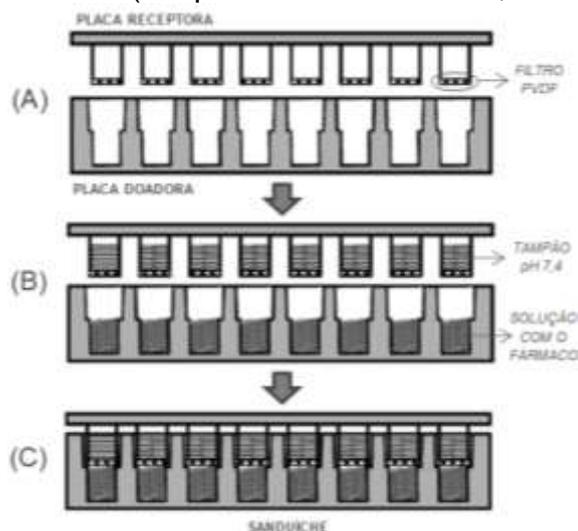
Primeiramente, foi preparada uma solução-estoque (1,0 mg/mL) a partir da transferência de 200,0 mg da NYS DS G2 (49) (equivaleria teoricamente a 100 mg) para um balão volumétrico de 100,0 mL, completou-se o volume com dimetilformamida. Em seguida, uma alíquota de 500,0  $\mu\text{L}$  da solução-estoque foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL, que foi avolumado com água miliQ. A solução-teste, de concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 279 nm, em triplicata.

#### **4.2.1.4.4 Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)**

A avaliação da permeabilidade por meio do ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) foi realizada para formulação de NYS DS G2(49) previamente selecionada em função dos resultados de solubilidade, que foi comparada à NYS MF (49) e também com os marcadores de baixa permeabilidade e de alta permeabilidade. Para este ensaio foram preparadas 5 soluções-estoque a 10 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) dos seguintes fármacos: cloridrato de ranitidina (fármaco marcador de baixa permeabilidade), tartarato de metoprolol (fármaco marcador de alta permeabilidade) e nistatina nas formas: NYS MP, NYS MF 49 e NYS DS G2 (49).

Em uma placa para diluição de soluções, as soluções-estoque foram diluídas com soluções de tampão de acetato pH 5,5 e tampão fosfato pH 7,0, para chegar à concentração de 250  $\mu\text{M}$ . Então, alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  as soluções diluídas foram transferidas para uma placada de 96 poços do compartimento doador (placa doadora, Figura 3). Em seguida, sobre a placa do compartimento doador foi acoplada a placa de 96 poços do compartimento receptor, que contém filtro de PVDF previamente impregnado com 5  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo uma mistura de colesterol (2 %p/v) e fosfatidilcolina (10 %p/v) em dodecano. Ainda na placa do compartimento receptor foram transferidas 300  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato pH 7,4 (composição descrita no Quadro 9). A montagem desse dispositivo é conhecida como “sanduíche”, ilustrado na Figura 4 (REIS et al., 2013).

Figura 4 – Seção transversal da montagem de um sanduíche de PAMPA. (A) Placa receptora de 96 poços contendo o filtro de PVDF impregnado com solução de colesterol e fosfatidil colina e placa doadora de 96 poços. (B) Compartimento receptor composto pela solução tampão de pH 7,4 e compartimento doador contendo uma solução de pH variável com o fármaco dissolvido. (C) Montagem do sanduíche de PAMPA (adaptado de CHEN et al., 2007).



Tipo de solução	Modo de preparo
Tampão fosfato pH 7,4	Foi pesado 27,2 g de fosfato de potássio monobásico num balão volumétrico de 1,0 L e foi completado com água purificada. Dessa solução, uma alíquota de 500,0 mL foi retirada e transferida para um balão de volumétrico 2,0 L. No balão, foi adicionada ainda 395 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 0,2 M, e completado com água purificada.

Quadro 9 – Composição da solução tampão fosfato pH 7,4 usadas no ensaio de PAMPA (USP, 2011).

A incubação das placas de PAMPA foi feita a 37°C, sob agitação de 100 rpm durante 8 horas e, ao final, 150 µL das soluções contidas nas placas, doadora e receptora, foram transferidos para uma microplaca de leitura no espectrofotômetro de absorção no UV e submetidos à leitura no espectrofotômetro em diversos comprimentos: 279 nm (NYS MP, NYS DS G2 (49) e NYS MF (49), 270 nm (tartarato de metoprolol) e 310 nm (cloridrato de ranitidina). A partir dos valores de absorbância, o cálculo da permeabilidade efetiva (Pe) foi feito segundo a Equação 1 (REIS et al., 2013).

Equação 1

$$Pe = - \frac{2,303 V_p}{A \cdot (t - T_{ss}) \cdot \epsilon_a} \cdot \left( \frac{1}{1 + r_v} \right) \cdot \log_{10} \left[ 1 - \left( \frac{1 + r_v^{-1}}{1 - R_M} \right) \cdot \frac{C_{A(t)}}{C_{D(0)}} \right]$$

Onde  $r_v$  = razão do volume dos compartimentos doador e receptor ( $V_D/V_A$ ), em mL;  $A$  = área da membrana (0,3 cm<sup>2</sup>);  $\epsilon_a$  = porosidade aparente do filtro de PVDF;  $C_D(0)$  e  $C_A(t)$  = concentrações (mol/L) das amostras no compartimento doador no tempo  $t = 0$  e no compartimento receptor  $t$ (s);  $T_{ss}$  = tempo de equilíbrio necessário para saturar a membrana com soluto, estimado em  $(54 R_M + 1) \cdot 60s$

A retenção dos fármacos na membrana ( $R_M$ ), que pode variar de 0 a 1, foi calculada de acordo com a Equação 2.  $R_M$  equivale à fração molar da amostra retida na membrana, definida em número de mols ( $m$ ) (REIS et al., 2013).

$$R_M = 1 - \left( \frac{m_D(t)}{m_D(0)} \right) - \left( \frac{m_A(t)}{m_D(0)} \right) \quad \text{Equação 2}$$

## 4.2.2 Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos Orais de NYS DS

### 4.2.2.1 Seleção da Base para os Géis Mucoadesivos Orais de NYS DS

Inicialmente, para o desenvolvimento do gel mucoadesivo, a formulação de dispersão sólida eleita foi NYS DS G2 (49). Em seguida, foi realizada a seleção da base para os géis mucoadesivos orais. A escolha foi baseada em um polímero (ou mais) que apresentasse funções gelificante, estabilizante e viscosidade elevada (JIMÉNEZ, FRESNO, RAMÍREZ, 2007). Foram preparadas formulações de géis base contendo carbopol<sup>®</sup> 934 PNF (Géis C1, C2, C3 e C4), noveon<sup>®</sup> AA1 (Géis N1, N2, N3 e N4), e mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup> (Géis CN1, CN2, CN3, CN4, CN5, CN6), como descrito nas Tabelas 6 e 7.

Dentre os diversos polímeros bioadesivos disponíveis, o carbopol<sup>®</sup> e o noveon<sup>®</sup> foram selecionados para a produção dos géis mucoadesivos orais por apresentarem propriedades mucoadesivas adequadas (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSSTON, 2005).

O carbopol<sup>®</sup>, ou polímero de ácido acrilato, apresenta propriedade mucoadesiva, para a cavidade oral. É de amplo conhecimento que há vários tipos de carbopol<sup>®</sup>, que se diferenciam devido a grau de ligações cruzadas, estrutura química e presença de resíduos (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009). O carbopol<sup>®</sup> 934 PNF é o que apresenta menor toxicidade por via oral. Além disso, a letra “P” indica que esse polímero é de grau farmacêutico e pode ser usado por via oral (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009).

O noveon<sup>®</sup>, de nome químico policarbofil, é um excelente bioadesivo bucal. Comprimidos mucoadesivos contendo esse componente demonstram alta força de mucoadesão, tempo de retenção prolongado e não causa irritação na mucosa, visto em ensaios clínicos em humanos. Além disso, os géis mucoadesivos de noveon<sup>®</sup>

têm sido empregados como formas farmacêuticas contendo fármacos de ação gengival, orofaríngea e periodontal (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSSTON, 2005).

Os géis foram preparados com a transferência do agente gelificante para um bécher contendo água purificada (em torno de 50 mL), com adição de 0,05 g de metilpropilparabeno em um q.s. de etanol. O sistema foi deixado em repouso por 4 horas para dispersão completa do polímero. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 2,0 M para aumento da viscosidade. Por fim, foi adicionada água purificada até o alcance da massa de 100 g de cada formulação.

Formulação	Concentração do Agente Gelificante (% p/p)	
	Carbopol 934 PNF <sup>®</sup>	Noveon AA1 <sup>®</sup>
C1	0,5	-
C2	1,0	-
C3	1,5	-
C4	2,0	-
N1	-	0,5
N2	-	1,0
N3	-	1,5
N4	-	2,0

Tabela 6 – Descrição das formulações base de apenas de carbopol 934 PNF<sup>®</sup> ou noveon AA1<sup>®</sup>.

Formulação	Concentração do Agente Gelificante (% p/p)	
	Carbopol 934 PNF <sup>®</sup>	Noveon AA1 <sup>®</sup>
CN1	0,25	0,25
CN2	0,50	0,50
CN3	0,25	0,50
CN4	0,50	0,25
CN5	0,25	0,75
CN6	0,75	0,25

Tabela 7 – Descrição das formulações base de carbopol 934 PNF<sup>®</sup> e noveon AA1<sup>®</sup>.

#### 4.2.2.2 Caracterização dos Géis Bases

A caracterização dos géis base foi realizada por meio da avaliação das características sensoriais, do pH e do comportamento reológico das preparações C1, C2, C3, C4, N1, N2, N3, N4, CN1, CN2, CN3, CN4, CN5 e CN6.

##### 4.2.2.2.1 Ensaio Sensoriais

Os ensaios sensoriais são usados para avaliar as características de um produto, detectáveis pelos órgãos dos sentidos. Foram realizados esses ensaios para todas as formulações de géis base (BRASIL, 2008).

##### 4.2.2.2.2 pH

O pH das formulações foi aferido com uso de eletrodo potenciométrico, imerso nos géis (BRASIL, 2008).

##### 4.2.2.2.3 Caracterização Reológica

Foram obtidas curvas de fluxo de amostras de géis mucoadesivos de carbopol 934 PNF<sup>®</sup>, de noveon AA1<sup>®</sup> e da mistura dos 2 agentes gelificantes citados (conforme descrito nas Tabelas 6 e 7). As medidas foram realizadas em um reômetro Physica-

Paar modelo MCR 300, empregando-se o *software* Rheoplus e utilizando-se de uma geometria de medição cone-placa, com 25 mm de diâmetro e ângulo de 1°. Para cada ensaio, foram coletados 100 pontos em rampa logarítmica, na faixa de 0,01 a 100 s<sup>-1</sup>, com duração de 10 s por ponto. As temperaturas de ensaio foram 25°C e 37°C, com um intervalo de variação de ± 0,05 °C (PRESTES et al., 2012).

#### 4.2.2.3 Obtenção dos Géis Mucoadesivos contendo NYS DS G2 (49) e NYS MP

Baseando-se nos resultados de caracterização dos géis base, o carbopol 934 PNF<sup>®</sup> foi selecionado como agente gelificante. Dessa forma, foram preparadas 6 formulações de géis mucoadesivos contendo NYS: 2 géis de NYS MP e 4 géis de NYS DS G2 (49). As formulações foram produzidas a partir da fórmula sugerida, descrita a seguir:

##### Fórmula Sugerida

NYS -----	50.000 ou 100.000 UI
Sacarina -----	5,0 mg (edulcorante)
Mentol -----	1,0 mg (flavorizante)
Solução aquosa de NaOH 2 M -----	1,0 mL (ajuste de pH)
Metilparabeno -----	15 mg (conservante)
Gel base de carbopol <sup>®</sup> 934 PNF -----	q.s.p. ----- 1,0 g (agente gelificante)

A produção dos géis foi realizada, inicialmente com a pesagem de todos os componentes em balança analítica. Em seguida, em gral de porcelana, o mentol e sacarina foram triturados, e foi adicionado o propilparabeno. Imediatamente após, foi adicionado a NYS DS G2 (49) ou NYS MP, com homogeneização até total incorporação do material sólido. Por fim, foi transferido o gel de carbopol 934 PNF<sup>®</sup>, previamente preparado, como descrito no item 4.2.2.1, em diversas concentrações, a depender da formulação. A mistura foi realizada até a incorporação completa de todos os componentes ao gel e obtenção de um produto homogêneo.

A descrição das composições das formulações dos géis mucoadesivos contendo NYS está na Tabela 8. As formulações foram designadas por letras.

Composição	Formulações					
	Gel O	Gel OO	Gel A	Gel B	Gel C	Gel D
Dose NYS (UI/g)	100.000	100.000	50.000	50.000	50.000	50.000
NYS MP (g)	1,881	1,881	-	-	-	-
NYS DS G2 (49) (g)	-	-	1,934	1,934	1,934	1,934
Sacarina (g)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Mentol (g)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Solução de aquosa de NaOH 2 M (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Metilparabeno (g)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Gel de carbopol 934 PNF® (g).....q.s.p. 100 g	95,37	95,37	96,32	96,32	96,32	96,32
Concentração carbopol 934 PNF® (% p/p)	0,5	1,0	0,5	1,0	1,5	2,0

Tabela 8 – Descrição da composição dos géis de NYS DS G2 (49) e NYS MP.

#### 4.2.2.4 Caracterização dos Géis Mucoadesivos Orais

A caracterização dos géis mucoadesivos foi realizada por meio de ensaios sensoriais (conforme descrito no item 4.2.2.2.1), pH (de acordo com item 4.2.2.2.2) e avaliação do comportamento reológico (descritos no item 4.2.2.2.3).

#### 4.2.2.5 Avaliação da Liberação de NYS a partir dos Géis Mucoadesivos

A avaliação da liberação de NYS a partir dos géis mucoadesivos (Géis OO, A, B, C e D, descritos no Quadro 16) foi realizada através o uso de célula de difusão vertical e a membrana empregada foi de acetato de celulose (BABY, 2007; DÍEZ-SALES et al., 2005). No ensaio foi avaliada a liberação de NYS a partir dos géis em pH 7,0.

As membranas foram dispostas sobre células de difusão vertical (03), ou câmaras de difusão com um compartimento receptor e outro doador, conforme demonstrado na Figura 5. O estudo foi conduzido em pH 7,0. Assim, o compartimento receptor foi primeiramente preenchido com solução de tampão fosfato pH 7,0 (preparado conforme descrito no Quadro 10). Os ensaios foram conduzidos sob temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C e agitação constante de 305 rpm. Após um período de estabilização de 20 minutos, amostras de cerca de 300 mg das formulações de géis mucoadesivos foram adicionadas sobre a membrana, no compartimento doador, com o adaptador para preparações semi-sólidas. A distribuição das formulações foi realizada com uso de espátulas de metal e de plástico, para a formação de uma camada plana. Alíquotas de 300 µL foram retiradas das fases receptoras nos intervalos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min, com a devida reposição após a retirada. Essas foram analisadas por CLAE, através do método analítico desenvolvido e validado, descrito no item 4.2.3.3 (BABY, 2007). O tempo total do ensaio escolhido foi de 60 min, já que o tratamento terapêutico preconizado com uso de suspensão aquosa de NYS é realizado com bochecho por 5 min (GILMAN, HARDMAN, LIMBIRD, 2003). Dessa forma, a avaliação da liberação foi feita em um tempo bem superior.

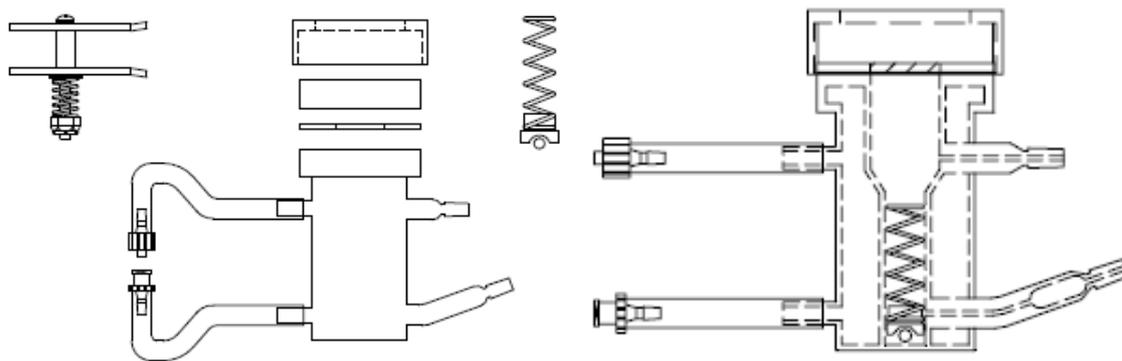


Figura 5 – Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON RESEARCH CORPORATION, 2004).

#### 4.2.2.6 Teor de NYS contida nos Géis Mucoadesivos

O teor de NYS contido nos géis foi realizado de acordo com o método desenvolvido e validado, descrito no item 4.2.3.3. Assim, foi pesada uma massa de gel correspondente a 10,0 mg de NYS (0,532 g de gel), e transferido para um balão volumétrico de 50,0 mL, e completou-se com dimetilformamida. Essa solução-padrão apresentou concentração final de 200 µg/mL de NYS. Em seguida, a solução-padrão foi filtrada (filtro milipore<sup>®</sup> 0,45 µm) e uma alíquota de 2,0 mL foi transferida para um outro balão de 10,0 mL e completou-se com tampão fosfato pH 7,0. Essa solução-teste apresentou concentração de 40 µg/mL, que foi quantificada por CLAE com absorção no UV (305 nm). O ensaio foi feito em triplicata.

#### 4.2.2.7 Avaliação da Mucoadesão dos Géis Mucoadesivos por meio de Ensaio *ex vivo*

##### 4.2.2.7.1 Preparo da Mucosa Oral Porcina

A mucosa oral porcina foi obtida no dia anterior ao ensaio, oriunda de porcos que foram abatidos em abatedouro com registro fornecido pela Secretaria Estadual de Agricultura do Estado de São Paulo. Os porcos foram abatidos no período vespertino, conforme os procedimentos indicados para abate de animais usados para consumo humano, regulamentado pela Secretaria Estadual de Agricultura do Estado de São Paulo e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de acordo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

(RIISPOA) (BRASIL, 1952). Em seguida, as cabeças foram seccionadas e colocadas imediatamente em saliva artificial, para o transporte até o laboratório (DU et al., 2014).

Posteriormente, as cabeças foram devidamente dispostas sobre uma bancada, e com auxílio de bisturi e tesoura, foram retiradas as mucosas orais da região jugal. Essas foram colocadas em saliva artificial (Quadro 10) para manutenção de hidratação do tecido. Nesse momento, as mucosas eram cortadas, para retirada de material desnecessário, como gordura, vasos sanguíneos e parte de tecido muscular (CUBAYACHI et al., 2015; DU et al., 2014).

Em seguida as mucosas foram colocadas sobre papéis de filtro umedecidos com saliva artificial e estes foram dispostos em placas de *Petri*. Sobre o papel foram colocadas as mucosas, que receberam saliva artificial para permanecerem hidratadas. O conjunto foi coberto com papel filme e deixado na geladeira até o dia seguinte, para realização do ensaio de mucoadesão (CUBAYACHI et al., 2015; DU et al., 2014).

Para o presente estudo não foi solicitada aprovação ao Comitê de Ética de Uso em Animais, já que as mucosas usadas foram provenientes de suínos abatidos em abatedouros, para consumo humano, de acordo com a Lei nº 11.793, de 08 de outubro de 2008, que regulamenta sobre os procedimentos para o uso científico de animais (BRASIL, 2008).

#### **4.2.2.7.2 Ensaio de Mucoadesão *ex vivo***

A força mucoadesiva mede a capacidade de adesão da formulação à mucosa onde é aplicada. A avaliação da força mucoadesiva foi avaliada em analisador de textura, em módulo de tensão. As formulações de Gel OO, A, B, C e D (corpo de prova) foram colocadas, individualmente, em um pistão móvel localizado na parte superior do equipamento e os cortes da mucosa de oral porcina, da região jugal, foram dispostos no acessório fixado na parte inferior do equipamento (base). Previamente, a mucosa foi umedecida com saliva artificial durante 5 minutos, a 37 °C e após esse procedimento, o pistão foi movimentado para baixo, até tocar a superfície da mucosa, mantendo contato com a mesma com força de compressão de 0,5 N, por 30 s. O ensaio ocorreu de forma não imersa na saliva artificial. Terminada a avaliação, o pistão foi deslocado para cima, em módulo de tensão, à velocidade constante de 1 mm/min

até que a formulação se destaque da mucosa. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (CUBAYACHI et al., 2015; JONES et al., 1997).

Foram determinados o trabalho de mucoadesão (a partir da área sob a curva de força *versus* distância) e a força de destacamento (força necessária para destacar a formulação da mucosa) (JONES et al., 1997). Os cálculos foram realizados por meio do software *Exponent* (Stable Micro Systems, UK). O ensaio foi realizado no Laboratório de Dor Orofacial e Inflamação, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

Saliva artificial	2,38 g de fosfato de sódio monobásico
	0,19 g de fosfato de potássio monobásico
	8 g de cloreto de sódio
	pH 7,0 (ajuste, se necessário, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1M)
	Solvente final: água miliQ para 1 L de solução

Quadro 10 – Composição da saliva artificial usada no ensaio de mucoadesão *ex vivo* (CUBAYACHI et al., 2015).

#### 4.2.3 Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos

Todos os métodos analíticos empregados foram previamente desenvolvidos e validados pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, especificidade/seletividade, precisão e exatidão. Estes parâmetros estão descritos na RE 899/2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para testes que pretendem quantificar princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

Os métodos analíticos foram desenvolvidos para determinação do teor de NYS nas diferentes condições: 1) na matéria-prima; 2) nas dispersões sólidas selecionadas e para os estudos de solubilidade; 3) nos géis mucoadesivos e nos estudos de liberação a partir destes, que estão descritos a seguir.

#### 4.2.3.1 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por CLAE para Quantificação de NYS MP

O método por CLAE com detecção por UV foi desenvolvido e validado, como preconizado pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003; WILSON, 2001).

As condições cromatográficas empregadas nas análises estão descritas na Tabela 9.

Parâmetros	Condições Cromatográficas
Detecção	UV ( $\lambda = 305 \text{ nm}$ )
Fase móvel	Metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v)
Coluna	C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ (Phenomenex)
Fluxo	0,9 mL/min
Volume de injeção	20 $\mu\text{L}$
Temperatura do forno	30°C
N	3

Tabela 9 – Parâmetros cromatográficos empregados na validação do método analítico.

##### 4.2.3.1.1 Linearidade

Uma solução-padrão foi previamente preparada com a transferência de 50,0 mg de padrão secundário de NYS (pureza 6273,22 UI/mg; gentilmente fornecido pela FURP) para balão volumétrico de 5,0 mL, o qual foi avolumado com N,N-dimetilformamida. A concentração final foi de 10,0 mg/mL.

A partir da solução-padrão, as soluções-teste, de concentrações 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 0,75 mg/mL, foram preparadas com a retirada das alíquotas de 50,0; 100,0; 250,0; 500,0 e 750,0  $\mu\text{L}$  da solução-padrão, respectivamente. As alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, que foram avolumados com fase móvel. Cada solução-teste foi analisada em triplicata por CLAE, com detecção por espectrofotometria de absorção no UV. Os dados obtidos (tempos de retenção e áreas) foram observados para permitir a avaliação do intervalo de linearidade.

#### 4.2.3.1.2 Precisão

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada em triplicata, para cada solução-teste, nas concentrações de: 0,1; 0,25 e 0,50 mg/mL. Essas soluções foram preparadas retirando-se alíquotas de 100,0; 250,0 e 500,0 µL da solução-padrão de 10,0 mg/mL, respectivamente. As alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, e foram avolumadas com fase móvel.

Já a determinação da precisão inter-ensaios também foi feita em triplicata, para cada solução-teste, nas concentrações de 0,1; 0,25 e 0,50 mg/mL, conforme o protocolo da precisão intra-ensaios descrito acima, porém as análises foram realizadas em dias diferentes.

As precisões intra-ensaio e inter-ensaios foram calculada usando a Equação 3:

$$\text{Precisão (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

#### 4.2.3.1.3 Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada em triplicata, para cada solução-teste, em concentrações de: 0,1; 0,25 e 0,50 mg/mL. O preparo dessas soluções foi realizado como descrito no item 4.2.3.1.1.

Esse parâmetro foi avaliado por meio de análises no mesmo dia (exatidão intradia) e em dias diferentes (exatidão interdias), e calculado empregando a Equação 4.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

#### 4.2.3.1.4 Especificidade

A especificidade foi avaliada a partir da análise de uma solução preparada da seguinte forma: em um balão volumétrico de 10,0 mL, foram transferidas alíquotas de 4,8 mL de metanol; 3,0 mL de água miliQ; e 2,2 mL de N,N-dimetilformamida. Essa solução-teste foi analisada por CLAE com detecção no UV em 305 nm, em triplicata.

Essa solução-teste tem a mesma composição da fase móvel empregada nas análises da quantificação de NYS na MP.

#### **4.2.3.1.5 Determinação de Teor de NYS MP pelo Método de CLAE**

A determinação de teor de NYS MP foi efetuada por CLAE, com detecção por UV, método previamente desenvolvido e validado.

Inicialmente, uma solução-teste de concentração de 0,75 mg/mL foi produzida de acordo com o método descrito no item 4.2.3.1.1.

A solução foi analisada em triplicata por CLAE, com detecção por espectrometria em UV, no comprimento de onda de 305 nm. As médias das áreas encontradas resultantes por meio da equação da reta, obtida a partir da curva analítica, descrita no item supracitado.

#### **4.2.3.2 Desenvolvimento e Validação do Método por Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta para Quantificação da NYS nas DS**

O desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi realizado com objetivo de quantificar a concentração de NYS dissolvida a partir do ensaio de avaliação de solubilidade, fundamentado na técnica previamente desenvolvida por Aguiar e colaboradores (2010). Foram empregados como meios, água purificada; tampão fosfato pH 7,0 e; tampão acetato pH 5,5, os mesmos usados no ensaio de solubilidade.

##### **4.2.3.2.1 Linearidade**

Para a avaliação da linearidade, inicialmente foi preparada uma solução-padrão a partir da transferência de 100,0 mg de padrão secundário de NYS (pureza 6273,22 UI/mg), para balão volumétrico de 100,0 mL, o qual foi avolumado com N,N-dimetilformamida. Essa solução apresentou a concentração de 1,0 mg/mL.

Seguidamente, 5 soluções-teste foram preparadas, com a retirada de alíquotas de 100,0 µL; 375,0 µL; 500,0 µL; 625,0 µL e 750,0 µL da solução-padrão, obtendo-se soluções de concentração de 10,0 µg/mL; 37,5 µg/mL; 50,0 µg/mL; 62,5 µg/mL e 75,0

$\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e avolumadas com água purificada.

O mesmo processo descrito acima foi realizado para o preparo de 10 soluções-teste de concentrações de 10,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 37,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 50,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 62,5  $\mu\text{g/mL}$  e 75,0  $\mu\text{g/mL}$ , em que o solvente final foi tampão fosfato pH 7,0 e tampão acetato pH 5,5.

Cada solução-teste foi analisada em triplicata, pela técnica de espectrometria no ultravioleta, em 279 nm. Assim, a partir dos dados, 3 curvas analíticas foram construídas (AGUIAR et al., 2010).

#### **4.2.3.2.2 Precisão**

A precisão intra-ensaio foi determinada em triplicata, através das análises de soluções-teste, nas de concentração de 10,0; 37,5 e 75,0  $\mu\text{g/mL}$ . Estas, foram preparadas com a transferência de 100,0  $\mu\text{L}$ ; 375,0  $\mu\text{L}$  e 750  $\mu\text{L}$ , da solução-padrão, respectivamente, para balões volumétricos de 10 ml, que foram avolumados com os seguintes solventes: água purificada; tampão fosfato pH 7,0 e tampão acetato pH 5,5, resultando, assim, no preparo de 9 soluções. Os parâmetros de precisão inter-ensaios e intra-ensaios foram obtidos conforme descrito no item anterior (4.2.3.1.2).

#### **4.2.3.2.3 Exatidão**

A exatidão foi avaliada em triplicata, através da análise de soluções-teste nas concentrações de 10,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 37,5  $\mu\text{g/mL}$  e 75,0  $\mu\text{g/mL}$ , com os solventes água purificada; tampão fosfato pH 7,0 e tampão acetato pH 5,5; totalizando o preparo de 9 soluções. As soluções foram produzidas a partir da solução padrão de NYS a 1,0 mg/mL, como descrito 4.2.3.2.2.

#### **4.2.3.2.4 Especificidade**

A especificidade foi determinada para verificar a presença dos carreadores como possíveis interferentes na quantificação de NYS, a partir das NYS DS.

Portanto, foi preparada solução-teste de cada carreador (lactose, HPMC, methocel™, Polo 407 e Polo 188) empregado na produção das NYS DS que formaram

um sólido, na concentração de 0,5 mg/mL. A escolha dessa concentração foi baseada nas proporções de carreadores em relação à NYS, considerando a mais alta, de 1:25.

Inicialmente, uma solução-padrão de cada carreador foi preparada por meio da transferência de 25,0 mg de cada carreador (lactose, HPMC, methocel™, Polo 407 e Polo 188) para um balão volumétrico de 50,0 mL e avolumado com N,N-dimetilformamida. Esse procedimento foi semelhante ao realizado no parâmetro de linearidade (item 4.2.3.2.1). Em seguida, foram preparadas 3 soluções-teste para cada carreador (lactose, HPMC, methocel™, Polo 407 e Polo 188), através da transferência de alíquotas de 3,75 mL para 3 balões de 25,0 mL, onde cada solução foi avolumada com os meios usados no ensaio de solubilidade, ou seja, água; tampão fosfato pH 7,0; e tampão acetato pH 5,5. Ao final, cada solução apresentou uma concentração de 75,0 µg/mL. Por fim, todas as soluções foram analisadas por espectrofotometria de absorção no UV, numa varredura entre 230 e 500 nm.

#### **4.2.3.3 Desenvolvimento e Validação de Método por CLAE para Quantificação de NYS contida nos Géis Mucoadesivos**

O método foi desenvolvido a partir do trabalho de Wilson e colaboradores (2003) e validado como preconiza a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). As condições cromatográficas usadas estão descritas na Tabela 9, e os parâmetros avaliados para a validação foram linearidade, precisão, exatidão e especificidade (BRASIL, 2003).

##### **4.2.3.3.1 Linearidade**

Para avaliar o parâmetro linearidade, foram preparadas 5 soluções-teste nas concentrações de 0,5; 3,0; 5,0; 8,0 e 10,0 µg/mL, a partir de uma solução-padrão. Esta solução foi feita a partir da transferência de 0,532g de gel, que 10,0 mg de NYS para o gel OO e 5 mg para os géis A, B, C e D, para um balão volumétrico de 100,0 mL, o qual foi avolumado com N,N-dimetilformamida (LAVRA et al., 2008; WILSON et al., 2001).

As soluções-teste de concentrações de µg/mL 0,5; 3,0; 5,0; 8,0 e 10,0 de NYS foram preparadas com a retiradas de alíquotas de 50,0; 300,0; 500,0; 800,0 e 1.000,0 µL da solução-padrão, respectivamente, e transferidas para balões volumétricos de

10,0 mL. Os balões foram avolumados com tampão fosfato pH 7,0 (LAVRA et al., 2008; WILSON et al., 2001). Cada solução-teste foi avaliada por CLAE com detecção por absorção no UV, em triplicada, e a curva analítica foi construída. Assim, coeficiente de correlação ( $R^2$ ), coeficiente angular (a) e a equação da reta foram determinados (BRASIL, 2003).

#### **4.2.3.3.2 Precisão**

O teste de precisão intra-ensaio foi realizado em triplicata, com as soluções-teste nas concentrações de 0,50; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$  a partir de géis OO, A, B, C e D. Essas soluções foram preparadas como descrito no item 4.2.3.3.1. O ensaio de precisão inter-ensaios foi realizado da mesma forma supracitado, em dias distintos.

A precisão foi calculada usando a Equação 3 (BRASIL, 2003).

#### **4.2.3.3.3 Exatidão**

O parâmetro de exatidão intra-dia e inter-dias foi realizado em triplicata, com soluções-teste nas concentrações de 0,50; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$  a partir de géis OO, A, B, C e D. Essas soluções foram preparadas como descrito no item 4.2.3.3.1.

A exatidão foi calculada com auxílio da Equação 4 (BRASIL, 2003).

#### **4.2.3.3.4 Especificidade**

A especificidade foi realizada com emprego de gel placebo, ou seja, contendo todos os excipientes, sem a presença de NYS ou NYS DS G2 (49). Foi transferida uma massa de gel de 0,532 g de gel e transferido para um balão volumétrico de 100,0 mL, e completou-se com dimetilformamida. Essa solução-padrão apresentou concentração final de 200  $\mu\text{g/mL}$  de NYS. Em seguida, a solução-padrão foi filtrada (filtro milipore<sup>®</sup> 0,45  $\mu\text{m}$ ) e uma alíquota de 2,0 mL foi transferida para um outro balão de 10,0 mL e completou-se com tampão fosfato pH 7,0. Essa solução-teste apresentou concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ , que foi quantificada por CLAE com absorção no UV (305 nm). O ensaio foi feito em triplicata.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

---

## 5.1 Obtenção e Caracterização de Dispersões Sólidas de Nistatina (NYS DS)

### 5.1.1 Avaliação da Qualidade da Nistatina Matéria-prima (NYS MP)

A NYS MP empregada para o desenvolvimento das dispersões sólidas foi previamente avaliada em relação à distribuição do tamanho de partícula e ao teor.

#### 5.1.1.1 Distribuição do Tamanho de Partícula

A distribuição do tamanho de partícula da NYS MP foi determinada, com o objetivo de avaliar as suas características físicas. Antes de propor o desenvolvimento de dispersões sólidas de NYS para melhorar a sua solubilidade em água, poderia ser sugerido o processo de micronização (HAN et al., 2011; LEUNER, DRESSMAN, 2005; TALLURY et al., 2007). O processo de micronização melhora a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis em água, como é o caso da NYS, em função do aumento da área superficial das partículas (HAN et al., 2011; LEUNER, DRESSMAN, 2005; TALLURY et al., 2007).

Na Tabela 10, pode-se observar que a distribuição de tamanho de partícula foi entre 1 e 10  $\mu\text{m}$ . As partículas foram agrupadas em 3 grupos: 10%, 50% e 90% da população de partículas. Esses resultados demonstram as partículas com tamanho abaixo de 10  $\mu\text{m}$ , indicando assim que a NYS MP já se apresentava com um tamanho de partícula reduzido, não sendo necessário o processo de micronização (HAN et al., 2011).

Distribuição populacional	Distribuição do tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ )
d0,1 (10%)	0,904 $\pm$ 0,138
d0,5 (50%)	3,44 $\pm$ 0,083
d0,9 (90%)	9,834 $\pm$ 0,068

Tabela 10 – Distribuição do tamanho de partícula da NYS MP.

### 5.1.1.2 Determinação do Teor de NYS MP pelos Métodos de Difusão em Ágar e CLAE

O teor de NYS foi determinado por meio de dois métodos distintos: os ensaios microbiológico e por CLAE, conforme descrito nos itens 4.2.1.1.2 e 4.2.1.1.3. Como apresentado na Tabela 11, os teores determinados foram de 96,60% e de 99,37%, obtidos por meio dos métodos microbiológico e CLAE, respectivamente. Para a determinação do teor, considerou-se o que a concentração teórica de 5.501 UI/mg, de acordo com o laudo de análise concedido pelo fornecedor (Purifarma). Já para a ensaio por CLAE, a concentração teórica foi de 0,75 mg/mL, que equivale a 4.127,3 UI/mL.

Em ambas as técnicas usadas para o doseamento de NYS, os valores encontrados são próximos, o que demonstra que a técnica por CLAE pode ser empregada de forma rotineira para quantificação de NYS. Todavia, a técnica por difusão em ágar verifica a potência do antifúngico, já que é realizada com emprego de microrganismo sensível à NYS. Dessa maneira, vale ressaltar que o ensaio microbiológico não poderia ser substituído por outro método analítico. Porém em ensaios de quantificação rotineiros, o método por CLAE é adequado por ser mais rápido, não depender do tempo de incubação de microrganismo e ser robusto (F. BRAS., 2010a; WILSON et al., 2001). Sendo assim, foi escolhido o método por CLAE por espectrofotometria de absorção no UV para a determinação do teor de NYS para o presente trabalho (WILSON et al., 2001).

	<b>Concentração Teórica</b>	<b>Concentração Encontrada</b>	<b>Teor (%)</b>
Doseamento por CLAE	0,75 mg/mL	0,7453 mg/mL	99,37
Doseamento por difusão em ágar	5503,1 UI/mg	5316 UI/mg	96,60

Tabela 11 – Resultados de teor/doseamento de NYS MP, com emprego dos métodos de difusão em ágar e CLAE.

### 5.1.2 Obtenção de dispersões sólidas de NYS (NYS DS)

A NYS é praticamente insolúvel em água e em função disto oferece dificuldades no preparo de medicamentos, como suspensão aquosa. Reconhecidamente uma forma farmacêutica heterogênea, que pode levar a uma separação de fases e ainda formação de um sedimento não redispersível (AULTON, 2005). Também encontra-se menos disponível na saliva, o que dificulta que exerça sua ação, sobretudo no tratamento da candidíase oral (LINDENBERG, KOPP, DRESSMAN, 2004; SAKEER et al., 2010).

Os problemas relacionados à baixa solubilidade de fármacos têm sido superados com o desenvolvimento de dispersões sólidas, que são sistemas farmacêuticos, onde um fármaco pouco solúvel em água encontra-se disperso em um carreador ou matriz (inerte), no estado sólido. Nesse contexto, considerando os aspectos supracitados relacionados à NYS, este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de dispersões sólidas de NYS, buscando o aumento de sua solubilidade aquosa, para posterior incorporação em gel mucoadesivo oral, de forma a permitir um contato mais íntimo entre o fármaco e a mucosa oral, aumentando a eficácia da NYS (CARVALHO, 2010; NEVILLE et al. 2009; VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2010). Destaca-se que há poucos relatos na literatura científica sobre o desenvolvimento de dispersões sólidas de NYS. Apenas um trabalho foi encontrado, o qual descreve o desenvolvimento de uma formulação contendo o antifúngico e a lactose monohidratada, como carreador (proporção 1:3), pelo método de eliminação do solvente usando evaporador rotativo (SAKEER et al., 2010).

As dispersões sólidas podem ser obtidas por diversos métodos de preparação, tais como os métodos de fusão, de eliminação, de fusão-solvente, de malaxagem, de atomização por *spraydrying*, de fluido supercrítico e extrusão por *hot melt* (ALVES, 2012; DHIRENDRA, 2009; MOOTER, 2012). Dentre os diversos métodos disponíveis, foi escolhido o método de eliminação do solvente. A escolha se deve à sua simplicidade, baixo custo e reprodutibilidade em escala laboratorial (ALVES, 2012).

Além disso, o método de eliminação do solvente apresenta como vantagens a incorporação de um fármaco termossensível. Aguiar e colaboradores (2010) empregaram temperatura de 50 °C na fabricação de comprimidos de NYS por

granulação via úmida, sem comprometer a dose do fármaco. Por fim, a eliminação do solvente com uso de evaporador rotativo se faz mais eficiente e rápida, por também empregar vácuo (F. BRAS., 2010; VO, PARK, LEE, 2013; WU et al., 2011).

Em adição à escolha do método, outro ponto relevante, foi a eleição dos carreadores no desenvolvimento das formulações de dispersões sólidas. Após revisão da literatura e em função da experiência adquirida no próprio laboratório, com o desenvolvimento de outros trabalhos, foram escolhidos os seguintes carreadores: lactose monohidratada, plasdone S360<sup>®</sup>, polivinilpirrolidona (PVPK 29-32), hidroxipropilmetilcelulose, methocel<sup>™</sup> K 4M, poloxamer 407, e poloxamer 188 (ALVES, 2012; GOUVEIA, 2011; LEUNER, DRESSMAN, 2000; SAKEER, 2010; VO, PARK, LEE, 2013).

Os carreadores empregados pertencem à primeira, segunda e terceira gerações. Os carreadores de primeira geração são substâncias cristalinas e levam à formação de dispersões cristalinas. Foi usado, então, lactose, como representante deste grupo. Os carreadores de segunda geração apresentam alta taxa de dissolução em água, porém baixa estabilidade e se encontram no estado amorfo. Em função de experiência prévia em nosso laboratório, foram selecionados polivinilpirrolidona K 29-32 e plasdone S 360<sup>®</sup>. E com base na revisão da literatura sobre dispersões sólidas, foram escolhidos 2 tipos de hidroxipropilmetilcelulose (GOUVEIA, 2011; FRIZON et al., 2013, HUANG, DAI, 2014; VASCONCELLOS, SARMENTO, COSTA, 2007; VO, PARK, LEE, 2013). Já os carreadores de terceira geração são compostos que podem melhorar o perfil de dissolução por diminuírem a tensão superficial. Eles carreadores são tensoativos e também se encontram no estado amorfo (VASCONCELLOS, SARMENTO, COSTA, 2007; VO, PARK, LEE, 2013). Então, foram escolhidos o poloxamer 188 e poloxamer 407 (GOUVEIA, 2011).

Por fim, foi desenvolvida também uma formulação de dispersão sólida (NYS DS (A) pelo método de eliminação de solvente com emprego do liofilizador. O objetivo dessa técnica foi utilizar a água como solvente, em substituição aos solventes orgânicos (acetona, dimetilformamida e etanol), já que podem apresentar problemas de toxicidade (VO, PARK, LEE, 2013).

A Tabela 12 apresenta todas as formulações de dispersões sólidas desenvolvidas e o resultado obtido em relação ao aspecto do produto. Nesta etapa

objetivou-se a obtenção de um material na forma sólida, que pudesse ser pulverizado, tamisado e incorporado a um gel mucoadesivo oral.

Inicialmente, as formulações de carreadores de 1ª e 2ª gerações (PLA, PVPK 29-32, lactose, HPMC, methocel™ K 4M), do Grupo 1 (Tabela 1), foram selecionados para compor formulações com proporção de 1:25 (NYS: carreador) inicialmente, visando a obtenção de produtos sólidos. Assim, constatando-se a formação de um produto sólido, a proporção de carreador foi reduzida na etapa seguinte para, 1:10, 1:5 e 1:1 (NYS:carreador).

As formulações NYS DS G1 (2) e NYS DS G1 (3), produzidas com os carreadores pladone e povinilpirrolidona, respectivamente, não resultaram em um material sólido, na forma de sólido. Ambas formulações, após o processo no evaporador rotativo, não houve formação de um sólido, o que levou à conclusão da não formação de dispersão (Tabela 12). Assim, descartou-se o uso de PLA e PVPK 29-32 como carreadores no preparo de futuras formulações de dispersões sólidas.

Por outro lado, as formulações NYS DS G1 (4), NYS DS G1 (6) e NYS DS G1 (7), após a retirada total dos solventes apresentaram-se como um material sólido e de cor amarela. No caso das preparações NYS DS G1 (6) e (7), os produtos obtidos apresentavam um aspecto volumoso e floculoso, mas que poderia ser incorporado à preparação semi-sólida. Essa característica foi atribuída ao HPMC, um excipiente farmacêutico polimérico, de alto peso molecular, que fornece alta viscosidade às preparações (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009).

Mediante a obtenção de material sólido das formulações contendo lactose, HPMC e methocel, foi proposto o preparo de outras, com os mesmos carreadores, porém em concentrações mais baixas. Assim, foram desenvolvidas as seguintes formulações de dispersões sólidas: NYS DS G1 (14), (15) e (16) (compostas de methocel, nas proporções de 1:10, 1:5 e 1:1, respectivamente); NYS DS G1 (17), (18) e (19) (compostas de HPMC, nas proporções de 1:10, 1:5 e 1:1, respectivamente); e NYS DS G1 (20), (21) e (22) (compostas de lactose, nas proporções de 1:10, 1:5 e 1:1, respectivamente). Porém, infelizmente, em todos os casos não ocorreu a formação de material sólido.

Por fim, foram avaliadas as formulações contendo os carreadores de 3ª geração: Polo 188 e Polo 407. As proporções destes carreadores foram selecionadas conforme estudos realizados por Gouveia (2011). Assim, foram propostas 4

formulações contendo NYS e carreador Polo 407, nas proporções de 1:1, 1:2, 1:3, e 1:4. E também foram propostas as formulações contendo NYS e Polo 188, nas mesmas proporções de 1:1, 1:2, 1:3, e 1:4. Todas as formulações do Grupo 2 levaram à formação de material sólido e de cor amarela. A Figura 6 ilustra uma formulação de dispersão sólida contendo NYS e Polo 188, NYS DS G2 (49).

Figura 6 – Fotografia da formulação NYS DS G2 (49), contendo NYS e Polo 188 na proporção de 1:1, durante a etapa de pulverização em gral de porcelana.



Foi desenvolvida também uma formulação de dispersão sólida com emprego de liofilizador para remoção do solvente. O carreador selecionado para esta formulação foi o Polo 407, em função dos bons resultados quanto à solubilidade, observados em estudos anteriores (GOUVEIA, 2011). Assim, a NYS DS (A), contendo NYS e Polo 407 na proporção 1:1, foi proposta com água como solvente, escolhida por ser um solvente sem toxicidade. Contudo sua remoção com uso do evaporador rotativo é mais difícil, devido ao seu ponto de ebulição mais alto (quando comparado aos os solventes orgânicos). Assim, a técnica por liofilização para eliminação da água levou à formação de um material sólido, na forma de pó e de cor amarela.

Formulação	Descrição	Aspecto	Equipamento
NYS DS G1 (2)	0,2 g NYS + 5,0 g PLA	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (3)	0,2 g NYS + 5,0 g PVPK 29-32	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (4)	0,2 g NYS + 5 g lactose	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G1 (20)	0,2 g NYS + 2,0 g lactose	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (21)	0,2 g NYS + 1,0 g lactose	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (22)	0,2 g NYS + 0,2 g lactose	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (6)	0,2 g NYS + 5 g HPMC	Material sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (17)	0,2 g NYS + 2,0 g HPMC	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (18)	0,2 g NYS + 1,0 g HPMC	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (19)	0,2 g NYS + 0,2 g HPMC	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (7)	0,2 g NYS + 5 g methocel	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G1 (14)	0,2 g NYS + 2,0 g methocel	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G1 (15)	0,2 g NYS + 1,0 g methocel	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G1 (16)	0,2 g NYS + 0,2 g methocel	Não formou sólido	Rotaevaporador
NYS DS G2 (45)	5,0 g NYS + 5,0 Polo 407	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G2 (46)	5,0 g NYS + 10,0 Polo 407	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G2 (47)	5,0 g NYS + 15,0 Polo 407	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G2 (48)	5,0 g NYS + 20,0 Polo 407	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G2 (49)	5,0 g NYS + 5,0 Polo 188	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G2 (50)	5,0 g NYS + 10,0 Polo 188	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G2 (51)	5,0 g NYS + 15,0 Polo 188	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS G2 (52)	5,0 g NYS + 20,0 Polo 188	<b>Material sólido</b>	Rotaevaporador
NYS DS (A)	1 g NYS + 1 g Polo 407	<b>Material sólido</b>	Liofilizador

Tabela 12 – Resultados de obtenção das dispersões sólidas de NYS com os diversos carreadores e equipamentos diferentes.

Legenda: NYS: nistatina, PLA: plasdone, PVPK 29-32: polivinilpirrolidona, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose, Polo 407: poloxamer 407, Polo 188: poloxamer 188.

### 5.1.3 Caracterização das NYS DS Obtidas

Após a obtenção das NYS DS que resultaram em um sólido, foi iniciada a sua caracterização, para avaliar a formação desses novos sistemas. Preliminarmente, foi escolhida para uma fase inicial a análise térmica, empregando as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG).

Num segundo momento, as NYS DS que demonstraram a formação do sistema, diferente de uma simples mistura física dos componentes de partida (NYS MF), foram avaliadas quanto à solubilidade em água e nas soluções de tampão acetato pH 5,5 e de tampão fosfato pH 7,0.

Por fim, dentre as NYS DS analisadas em relação à solubilidade, aquela que apresentou maior valor deste parâmetro, foi caracterizada por meio de análises complementares como, difração de raio-X (DRX), espectroscopia de infravermelho com transformada em Fourier (FTIR) e permeabilidade em membrana paralela (PAMPA). Na Figura 7 está indicada a sequência das técnicas usadas na caracterização da NYS DS.

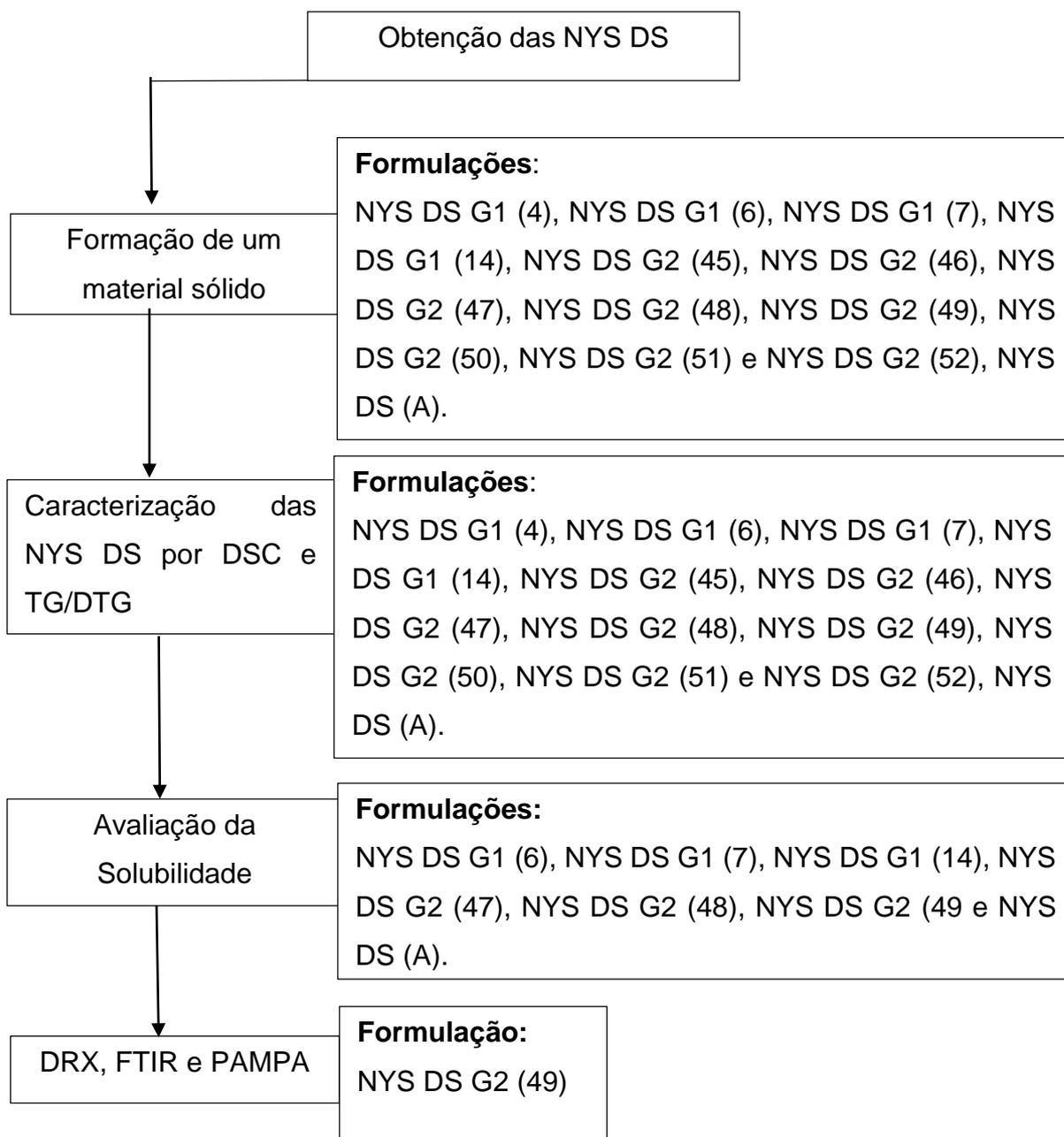


Figura 7 – Fluxograma das técnicas empregadas para caracterização das NYS DS, e a sequência usada, de acordo com os resultados obtidos.

### 5.1.3.1 Análise Térmica

A análise térmica abrange um grupo de técnicas, onde uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos é mensurada em função da temperatura ou do tempo, sendo essa substância submetida a aquecimento, sob uma programação de temperatura controlada (WENDLANT, 1986).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é a técnica na qual é medida a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura (GIOLITO; IONASHIRO, 1988).

Já a termogravimetria (TG) é a técnica de análise em que a variação de massa da amostra, perda de massa, é determinada em função da temperatura e/ou tempo, à medida que a amostra é submetida a uma programação controlada da temperatura. Essa técnica, portanto, permite avaliar a estabilidade térmica da amostra e acompanhar o andamento de reações de oxidação, desidratação, combustão e decomposição (GIOLITO; IONASHIRO, 1988).

O objetivo foi avaliar o comportamento térmico das formulações de dispersões sólida de NYS, da NYS MP, dos carreadores e das misturas físicas correspondentes.

#### **5.1.3.1.1 Análise Térmica de NYS e Carreadores**

Inicialmente, foi importante avaliar o comportamento térmico da NYS e dos carreadores de forma individual e, posteriormente, avaliar juntamente com as formulações e respectivas misturas físicas. Dessa forma, foram observados os comportamentos inerentes do fármaco e dos carreadores.

A Figura 8 ilustra a curva DSC da NYS. Nela pode-se observar 3 eventos endotérmicos (Tpico de 158,2; 166,4; 174,8°C) e um exotérmico (Tpico 262,6°C). A curva não demonstrou um pico definido, característico de fusão, como pode ser visto em outras substâncias. De fato, foram observados 3 pequenos picos endotérmicos entre 150 e 175°C. Esses eventos indicam que a NYS MP não está pura, provavelmente há presenças de impurezas. Como nas Farmacopeias Brasileira (2010) e Americana (2013), a NYS é descrita como uma substância ou mistura de 2 ou mais substâncias, como representada na Figura 10, esse resultado pode sugerir a presença de outros compostos. Essa complexidade se deve ao processo produtivo da NYS, por fermentação. Assim, 3 compostos biologicamente ativos são produzidos, denominados NYS A1, NYS A2 e NYS A3 (F. BRAS., 2010a; U.S., 2013; BRESCANSIN, 2006).

Na Figura 9 está representada a curva TG/DTG da NYS. Nela foram vistos 2 eventos na faixa de temperatura 25 a 100°C (Tpico de 25,9 e 91,8°C), com perdas de massa de 0,15 e 3,18%, respectivamente. Esses podem indicar a perda de água superficial da NYS. Ainda foram observados eventos em torno de 150, 200, 250 e 450°C (Tpico de 161,6; 194,8; 245,4; 431,7°C), com perdas de massa de 10,38; 16,90; 25,89; 71,71%, respectivamente. Por volta de 450°C, na curva TG/DTG foi observado mais uma perda de massa de 71,71%, que levou à sugestão de decomposição final do composto.

Segundo o trabalho de Konell (2014) que realizou a técnica de DSC para avaliar a NYS MP, foi visto um evento endotérmico, de pico único, Tpico 168,77°C. Segundo a autora, o pico único é decorrente do processo de fusão do fármaco. No entanto, o pico é mais largo do que quando se observa outras substâncias, o que é sugerido pela mistura de NYS A1, NYS A2 e NYS A3. Da mesma forma, Brescani (2006) discute em seu trabalho na curva DSC da NYS a presença de apenas um pico endotérmico (Tpico 179,75 °C), que também é largo, indicando a presença de mais de um composto de NYS.

Todavia, no presente estudo, não foi encontrado um pico único e largo, mas 3 pequenos picos na mesma faixa de temperatura dos trabalhos de Konell (2014) e Brescani (2006). Dessa maneira, é possível que a NYS MP desse estudo também tenha mais de um tipo de NYS.

Figura 8 – Curva DSC da NYS obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

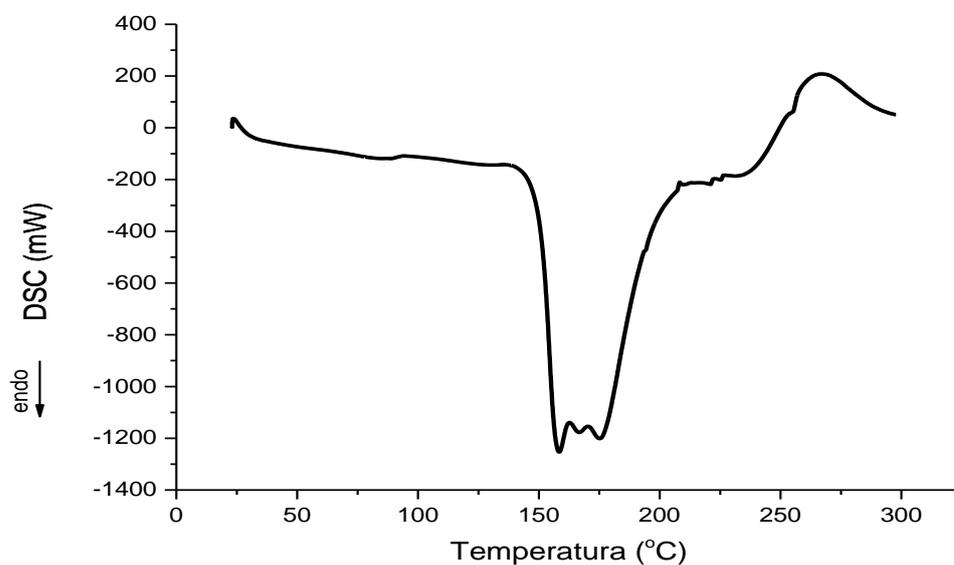


Figura 9 – Curva TG/DTG da NYS obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.

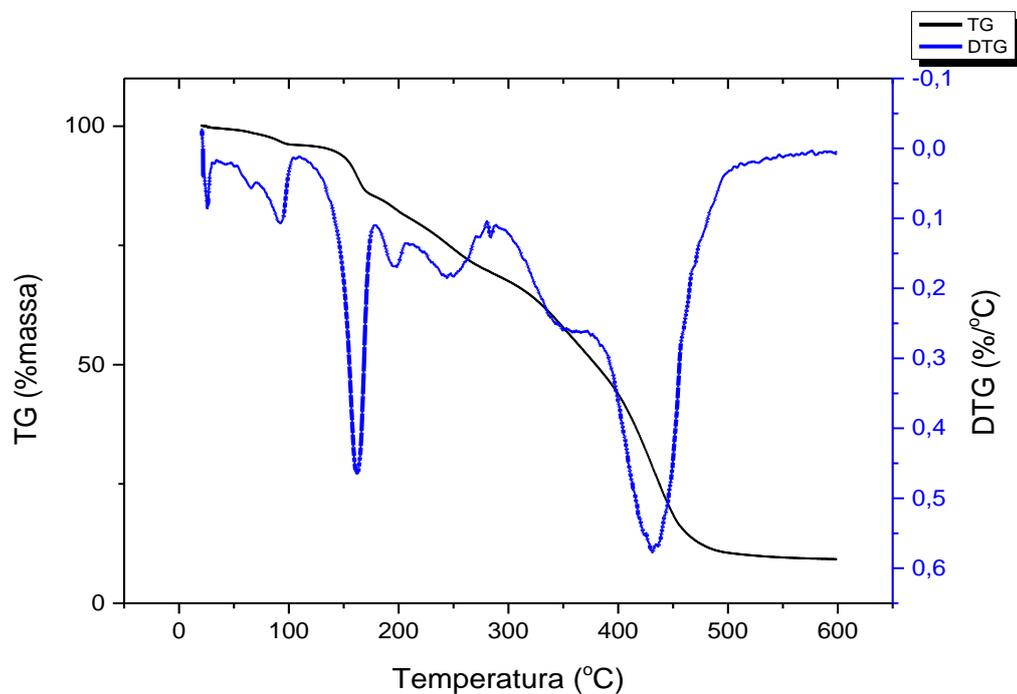
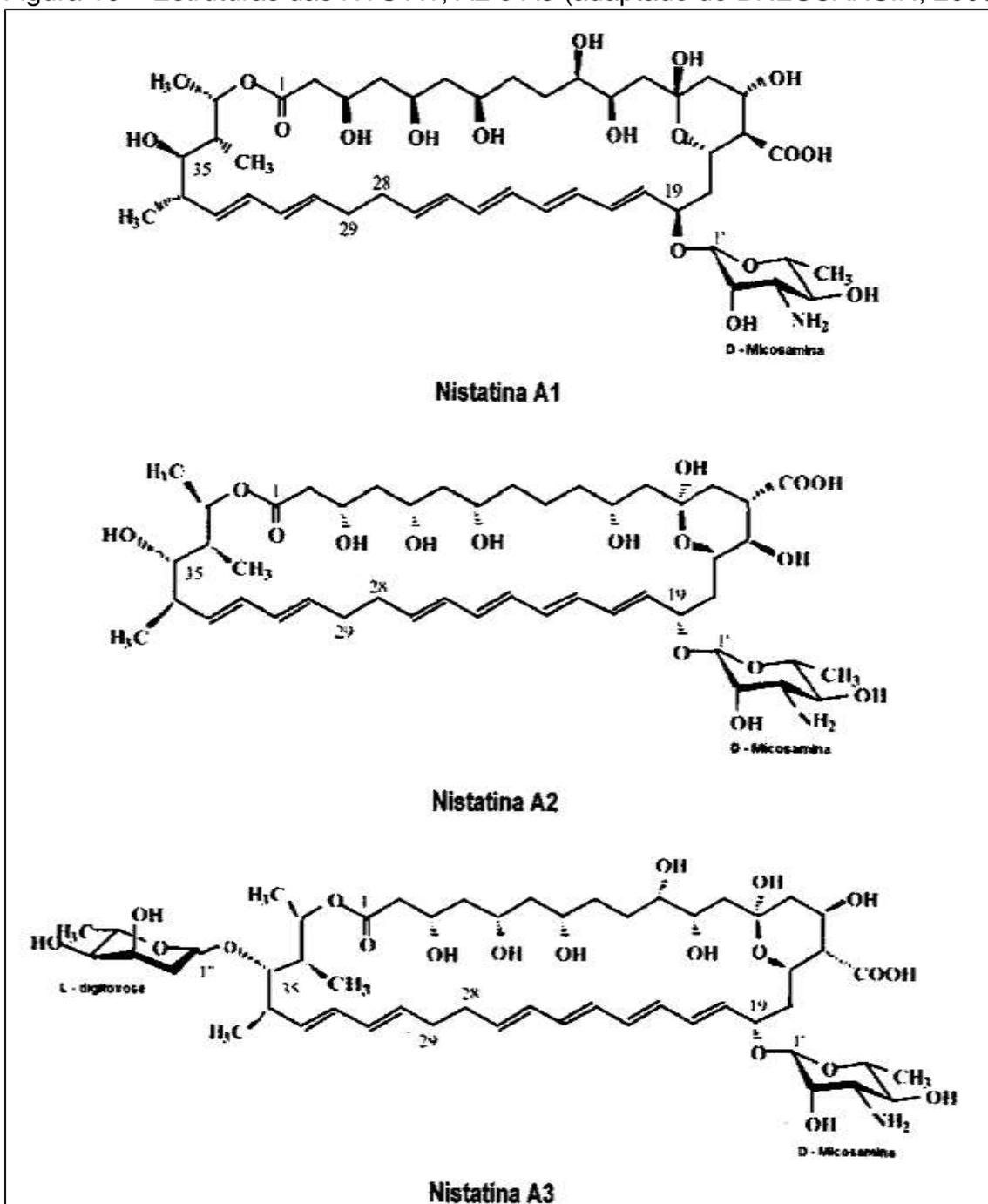


Figura 10 – Estruturas das NYS A1, A2 e A3 (adaptado de BRESCANSIN, 2006).



Em relação às dispersões sólidas desenvolvidas neste trabalho, a lactose foi o primeiro carreador analisado, pertencente à 1ª primeira geração. É normalmente empregada como excipiente farmacêutico, sobretudo como diluente na produção de comprimidos e cápsulas, e também como carreador de dispersões sólidas (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009, GIRI et al., 2012, SAKEER et al., 2010).

A curva DSC da lactose (Figura 11) apresenta um evento endotérmico com T<sub>pico</sub> em 149,6°C, que corresponde à desidratação e dois outros endotermas, com T<sub>pico</sub> de 220,8 e 238,1°C, respectivamente, que podem ser relacionados à decomposição da lactose. Por sua vez, a curva TG/DTG (Figura 12) demonstra perda de massa de 5,0%, na mesma faixa de temperatura em que se observa o primeiro pico da curva DSC (148°C), o que confirma a perda de água de cristalização. A partir de 150°C, inicia-se um gradativo decaimento da massa, que corresponde à decomposição da lactose. No entanto, segundo os pesquisadores Alves (2007) e Costa (2005), que descrevem um evento exotérmico sutil na curva DSC da lactose estudada por esses autores, que corresponderia à transição cristalina da lactose anidra, da forma  $\alpha$  a forma  $\beta$ . Esse evento, não é notado na curva DSC da lactose.

Figura 11 – Curva DSC da lactose obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

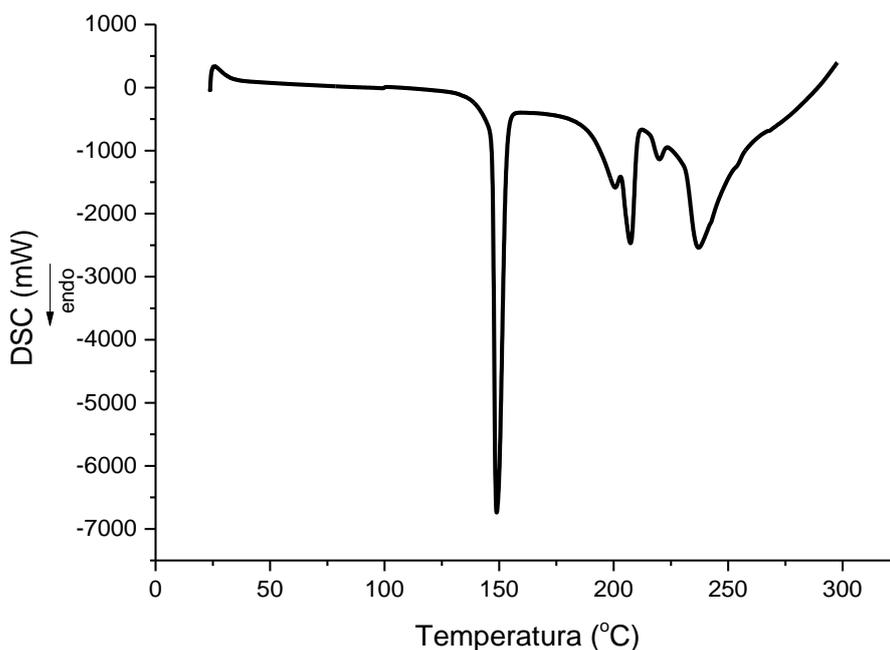
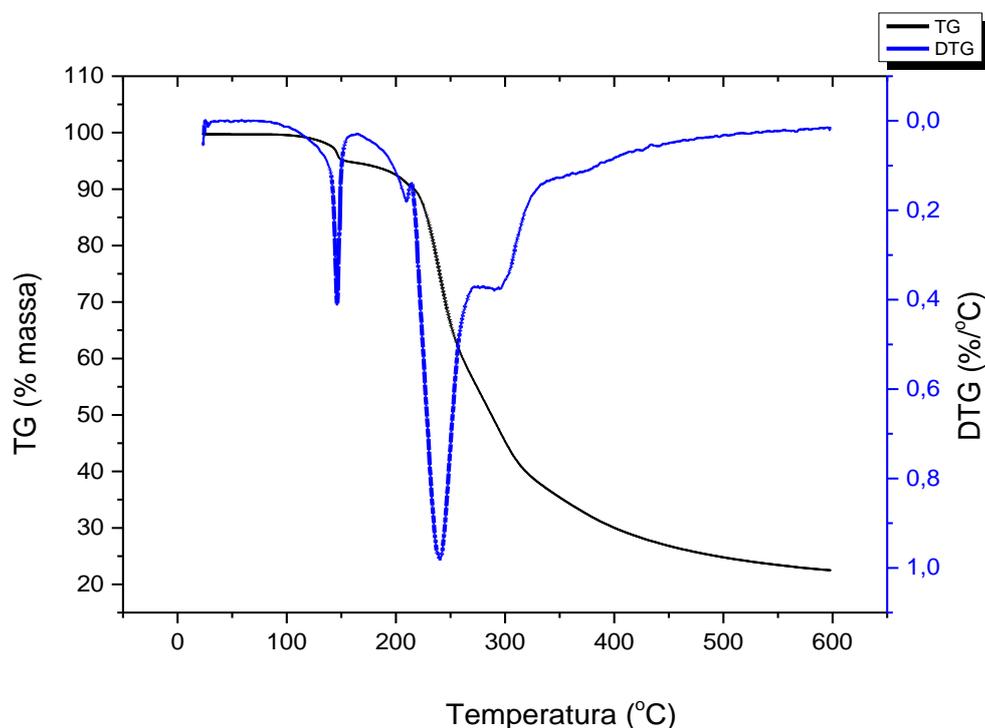


Figura 12 – Curva TG/DTG da lactose obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Outro carreador utilizado neste trabalho foi HPMC, classificado como de 2<sup>a</sup> geração (VANSCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007). No presente estudo, foi empregado HPMC de duas origens distintas, porém com mesma viscosidade (solução aquosa a 2%, com 4000 CP): HPMC da empresa Henrifarma e Methocel K4M, da empresa Colorcon (COLORCON, 2000). Esse, também um excipiente farmacêutico, é amplamente empregado pela indústria farmacêutica, como aglutinante, agente de revestimento, modificador de liberação e agente suspensor (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009).

Diversos foram os trabalhos encontrados na literatura científica, empregando o HPMC como carreador. Isso se deve à sua biocompatibilidade, por ser atóxico e biodegradável. Além disso, apresenta uma propriedade importante: sua capacidade de solubilizar fármacos de baixa solubilidade, quando comparado a outros polímeros também hidrofílicos (ALVES et al., 2012).

As curvas DSC do HPMC e do methocel K4M estão ilustradas nas Figuras 13 e 14, respectivamente. Em ambas as curvas foi observado um endoterma entre 175 e 200°C. No entanto, a curva DSC do HPMC apresentou um pico mais fino, pronunciado

e de maior intensidade ( $T_{\text{pico}} = 181,6^{\circ}\text{C}$ ), enquanto na curva DSC do methocel K4M o pico se mostrou mais largo e de menor intensidade ( $T_{\text{pico}} = 195,7^{\circ}\text{C}$ ).

Quando se comparou as curvas TG/DTG do HPMC e do methocel K4M, ilustradas nas Figuras 15 e 16, foi notada uma semelhança entre elas. Ambas apresentam apenas uma perda de massa de 93,7% (HPMC) e 95,37% (methocel K4M), por volta de  $350^{\circ}\text{C}$ . Isso indicou que esses carreadores sofreram decomposição, já que a perda de massa foi alta. No entanto, não foram observados eventos entre  $175$  a  $200^{\circ}\text{C}$ , como nas suas curvas DSC. Assim, voltando às curvas DSC, os eventos observados possivelmente podem estar relacionados à transição vítrea dos polímeros, passando de um estado mais rígido para um mais flexível (LOPES, LOBO, COSTA, 2005).

Figura 13 – Curva DSC do HPMC obtida sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  (50 mL/min) e razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

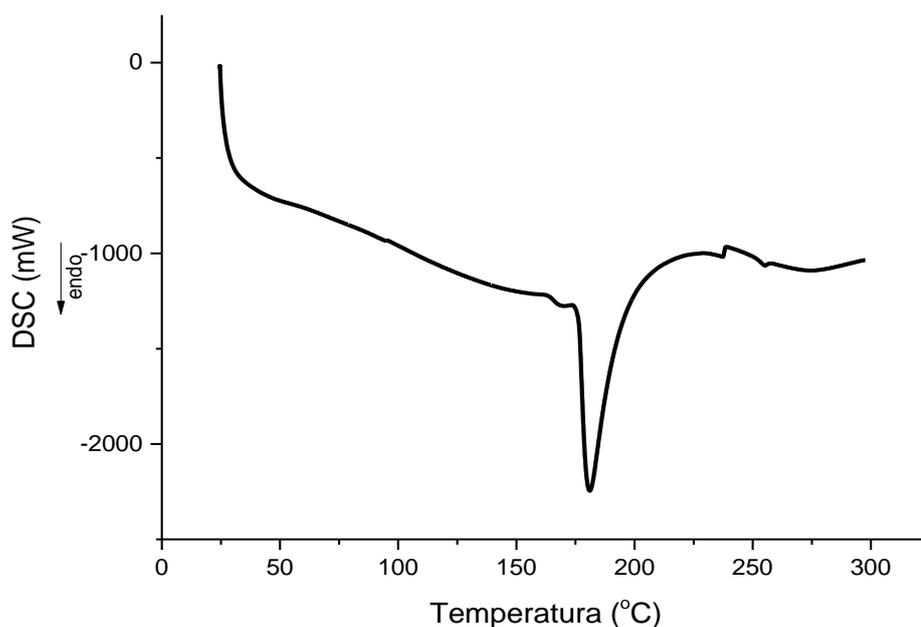


Figura 14 – Curva DSC do methocel K4M, obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

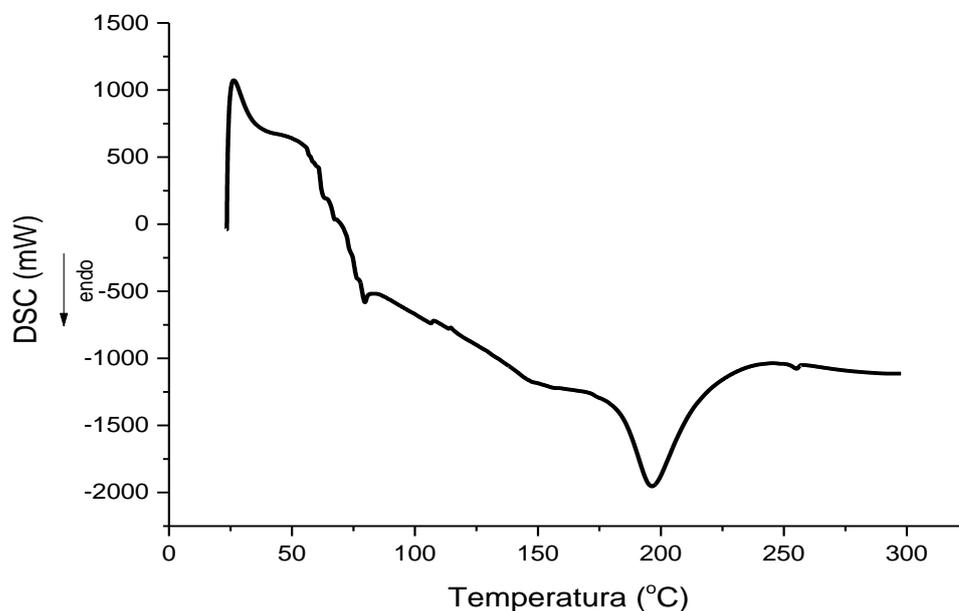


Figura 15 – Curva TG/DTG do HPMC, obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.

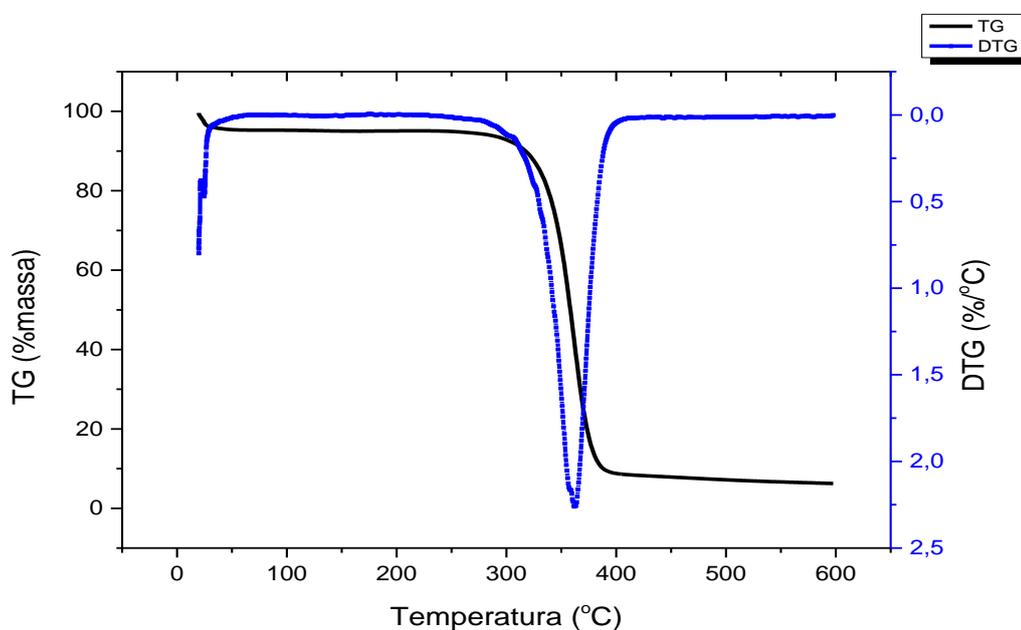
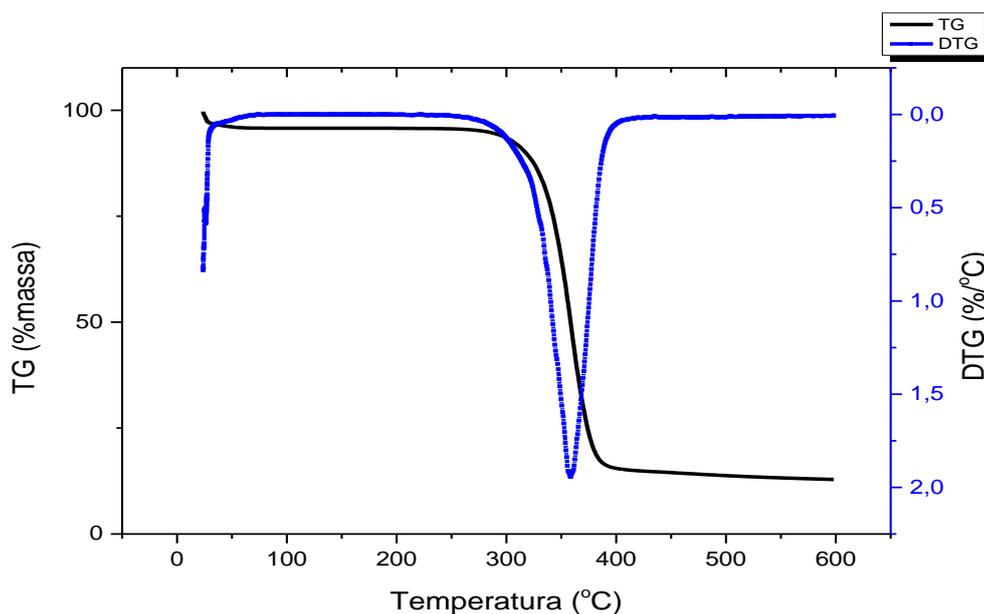


Figura 16 – Curva TG/DTG do methocel K4M, obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Por fim, também foram avaliados os carreadores da 3ª geração: Polo 188 e Polo 407 (ALVES et al., 2012; GOUVEIA, 2011). Esses adjuvantes são comumente empregados pela indústria farmacêutica como agente dispersante, emulsificante, solubilizante e, em comprimidos, como lubrificante e aglutinante. São copolímeros não iônicos de polioxietileno-polioxipropileno e são encontrados no estado sólido (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009). O segmento polioxietileno é hidrofílico, enquanto o segmento polioxipropileno é hidrofóbico e em razão dessa característica, são usados como agentes tensoativos (ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009).

O Polo 188 apresenta peso molecular de 7680 a 9510 g/mol, EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) igual a 29 e tem ponto de fusão entre 52 a 57°C (GOUVEIA, 2011; ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009). Na curva DSC (Figura 17) deste, observou-se 2 eventos: um endotérmico, bem definido, com pico fino e com alta intensidade, por volta de 50°C (Tpico= 48,6°C); e outro exotérmico, com pico mais largo, de menor intensidade, na faixa de 130 a 175°C (Tpico = 153,7°C). O primeiro evento refere-se à fusão, já que quando comparado, na mesma faixa de temperatura, à curva TG/DTG (Figura 18), não se percebe a variação de massa, o qual também é relatado na literatura. Estes resultados são semelhantes aos descritos nos trabalhos de Alves (2007) e Gouveia (2011). Entretanto, o segundo evento exotérmico observado no presente trabalho, em torno de 150°C, não foi relatado nos trabalhos de Alves (2007)

e Gouveia (2011), por outro lado, estes pesquisadores encontraram um evento exotérmico, por volta de 320°C, que corresponde à decomposição do material. No entanto, na curva DSC do Polo 188 aqui demonstrada não poderia ser encontrado tal evento, pois o ensaio foi realizado até 300°C.

Assim voltando à curva TG/DTG do Polo 188, foi visto que realmente não há variação de massa por volta de 300°C. Porém, em 392,6°C, ocorre com uma perda de massa quase total, igual a 98,85%, o que corrobora com os dados da literatura, e corresponde à decomposição do material (ALVES, 2009; GOUVEIA, 2011).

Apesar da revisão da literatura científica com Polo 188 e Polo 407, não foi encontrado o pico exotérmico a 153,7°C, ou aproximadamente, como observado na curva DSC (ALVES, 2009; GOUVEIA, 2011; KOLASINAC et al., 2012; Li et al., 2010; PASSERINI et al., 2002; SHARMA; JAIN, 2010). O pico exotérmico observado a 153,7°C, pode estar relacionado com método usado no ensaio, já que este foi realizado com cadinho hermeticamente fechado, o que pode levar ao aprisionamento dos voláteis.

Figura 17 – Curva DSC do Polo 188 obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

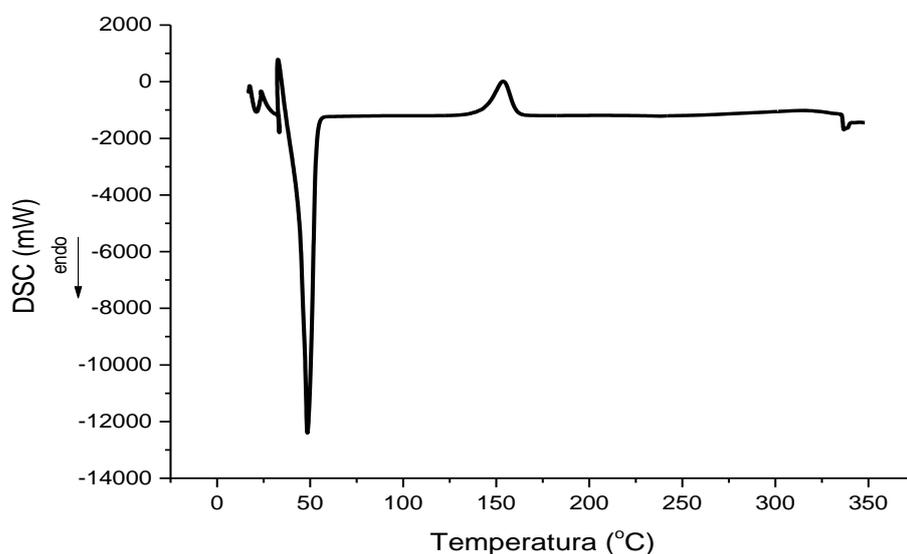
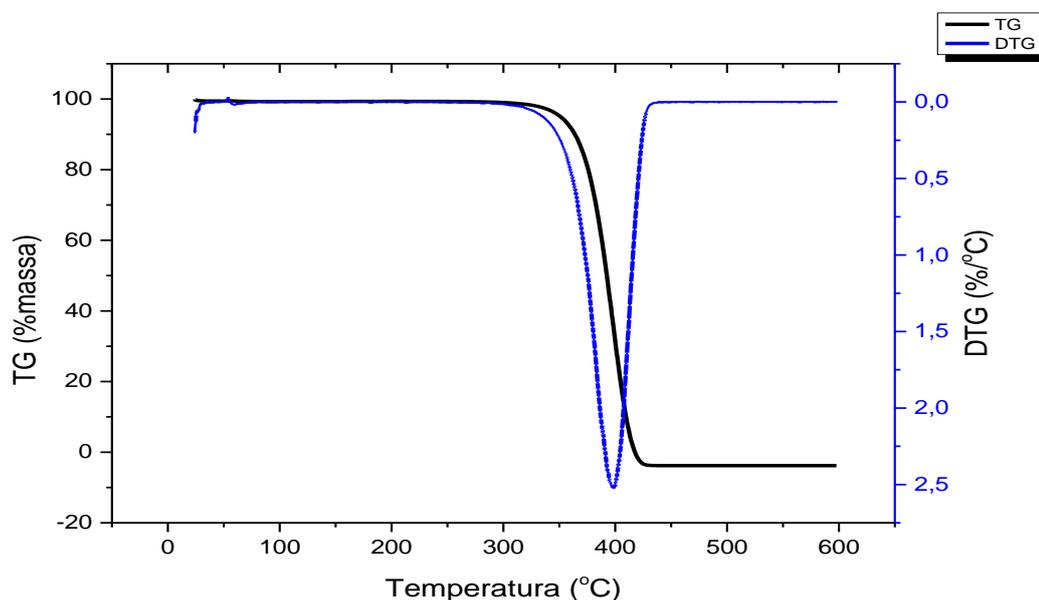


Figura 18 – Curva TG/DTG do Polo 188 obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Por sua vez, Polo 407 possui peso molecular de 9840-14600 g/mol, EHL de 18 a 23 e tem ponto de fusão entre 52 a 57°C (GOUVEIA, 2011; ROWE, SHIESKEY, QUINN, 2009). Na curva DSC deste, ilustrada na Figura 19, foram observados um endoterma, com T<sub>pico</sub> igual a 51,1°C; e um exoterma, com T<sub>pico</sub> igual a 151,9°C. Esses eventos são muito semelhantes aos encontrados nas curvas DSC do Polo 188. Dessa forma, sendo o Polo 407 quimicamente relacionada ao Polo 188, acredita-se que o primeiro pico também corresponde à fusão do composto (ALBERTINI et al., 2010; GOUVEIA, 2011; KOLASINAC et al., 2012; Li et al., 2010).

Já na curva TG/DTG do Polo 407 (Figura 20), é observado que esse carreador é termicamente estável até 302,3°C; com T<sub>pico</sub> igual a 398°C e perda de massa de 98,98%, que corrobora com sua curva DSC e os resultados encontrados por Gouveia (2011), correspondendo a decomposição do tensoativo.

Figura 19 – Curva DSC do Polo 407 obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

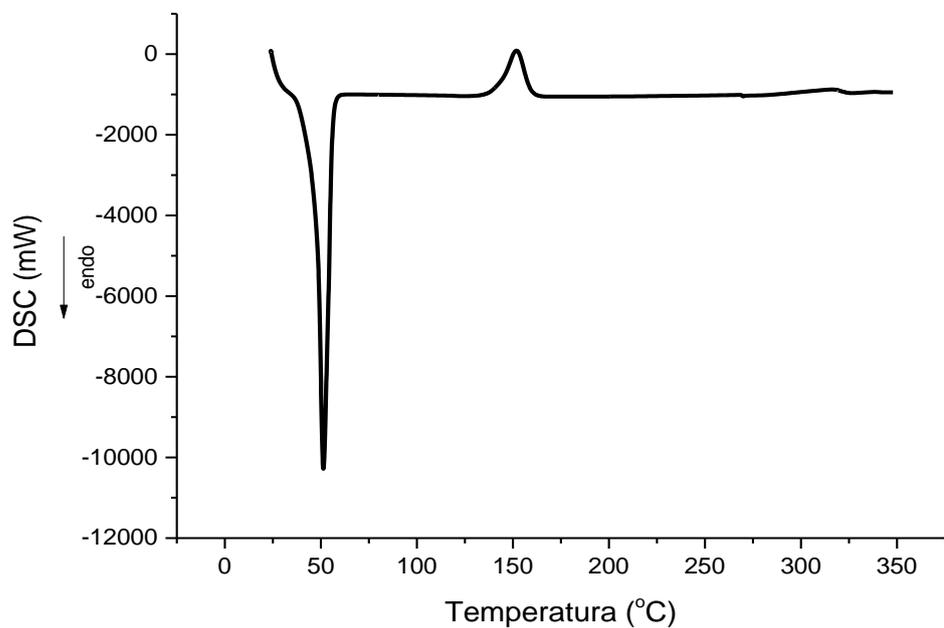
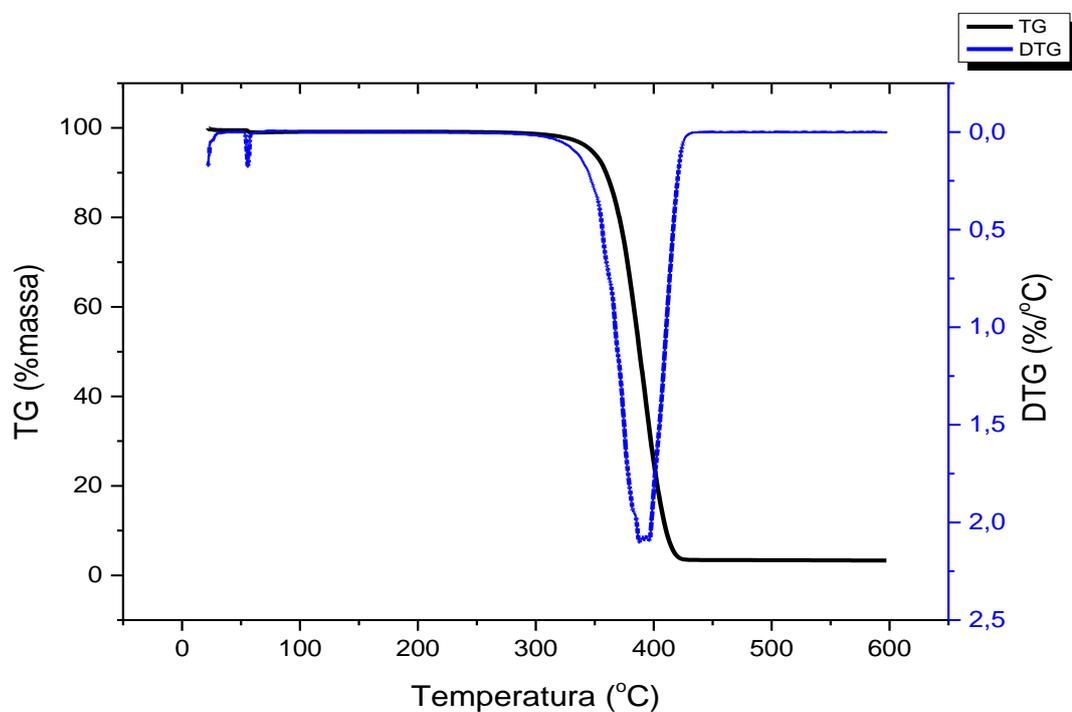


Figura 20 – Curva TG/DTG do Polo 407 obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Baseado nos resultados das técnicas de análise térmica, pode-se concluir que a NYS e os carreadores lactose, HPMC e methocel K4M não sofrem qualquer alteração por voltar da temperatura de 50°C (onde foi realizado a produção de NYS DS), demonstrado nas respectivas curvas DSC e TG/DTG. Já os carreadores Polo 188 e Polo P 407 sofrem fusão em torno dessa temperatura, como observado nas suas curvas DSC e TG/DTG. Sendo a fusão um processo de mudança de estado, ou seja, físico, poderia favorecer o processo de obtenção das dispersões sólidas, dissolvendo melhor a NYS. Na Tabela 13, foram reunidos os eventos encontrados nas curvas DSC e TG/DTG da NYS e dos carreadores.

Substâncias	Eventos observados nas curvas DSC		Eventos observados nas curvas TG/DTG	
	Endotermas - T pico (°C)	Exotermas - T pico (°C)	T pico (°C)	Perda de massa (%)
NYS MP	158,2	262,6	25,9	0,15
	166,4		91,8	3,18
	174,8		161,6	10,38
			194,8	16,90
			245,4	25,89
Lactose			431,7	71,71
	149,6		148	5,0
	220,8		248,5	
	238,1			
HPMC	181,6		351,1	93,70
Methocel	195,7		350,9	95,37
Polo 188	48,7	153,7	392,6	98,85
Polo 407	51,1	151,9	398,0	98,98

Tabela 13 – Eventos encontrados nas curvas DSC e TG/DTG da NYS, lactose, HPMC, methocel, Polo 188 e Polo 407.

Legenda: NYS MP: nistatina matéria-prima, HPMC: hidroximetilpropilcelulose, Polo 188: poloxamer P 188, Polo 407: poloxamer P 407.

### 5.1.3.1.2 Análise Térmica das NYS DS Obtidas

Após a avaliação da NYS e dos carreadores individualmente, foram analisadas NYS DS e NYS MF, com objetivo de verificar seu comportamento térmico e, assim, observar se ocorreu a formação de uma nova “espécie”, ou seja, de um novo sistema farmacêutico (NYS DS), o que levaria à observação de eventos distintos daqueles encontrados na simples mistura do fármaco com o carreador.

Inicialmente, foram avaliadas as formulações do Grupo 1: NYS DS G1 (4), (6), (7) e (14), contendo como carreadores lactose monohidratada, HPMC e methocel K4M, respectivamente.

Nas Figuras 21 e 22, foram apresentadas as curvas DSC e TG/DTG da NYS, lactose, NYS MF (4) e da NYS DS G1 (4). Na curva DSC da NYS MF (4), foram vistos 2 eventos endotérmicos, de intensidade semelhantes: o primeiro corresponde à NYS, e o segundo, à lactose, os quais foram observados nas curvas DSC dos compostos puros, sendo um somatório de eventos. Já, na curva DSC da NYS DS G1 (4) foram notados 2 endotermas, com intensidades distintas. Assim, ao comparar as curvas DSC da NYS DS G1 (4) e NYS MF (4), foram observados eventos distintos, onde na primeira se caracterizou pela presença de NYS e lactose, enquanto na segunda os eventos foram outros dos compostos de partida.

Por outro lado, quando se observou as curvas TG/DTG das espécies supracitadas, não se pode concluir que ocorreu formação da dispersão sólida. Isso porque as curvas da NYS MF (4) e da NYS DS G1 (4) são semelhantes. Portanto, sendo os eventos encontrados nas curvas DSC e TG/DTG inconclusivos, foi decidido que a NYS DS G1 (4) deveria ser abandonada e focar nas formulações NYS DS que podem ser mais promissoras.

Figura 21 – Curvas DSC da NYS, da lactose, da NYS MF (4) e da NYS DS G1 (4), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

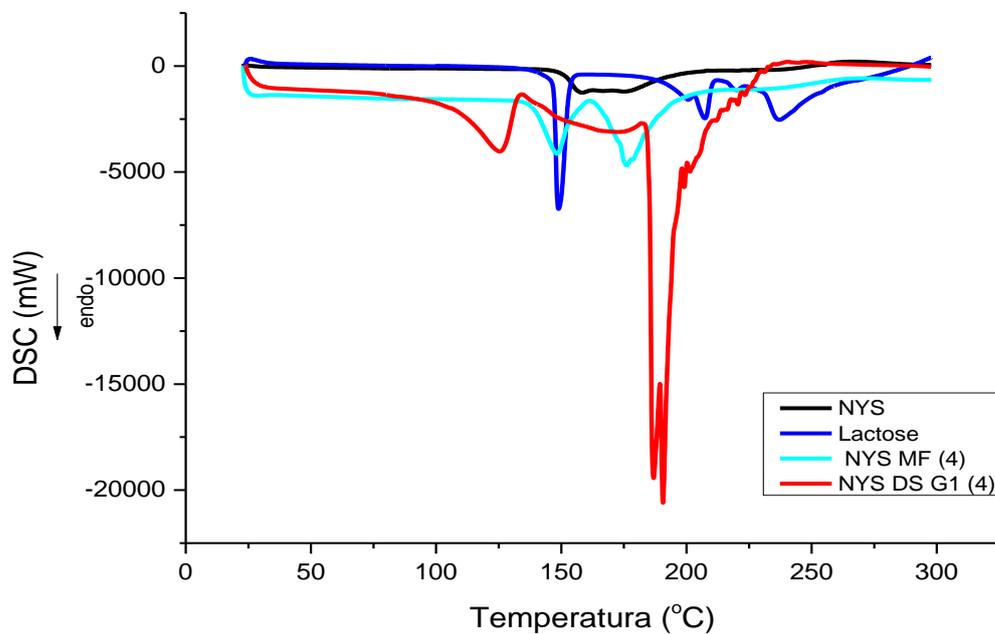
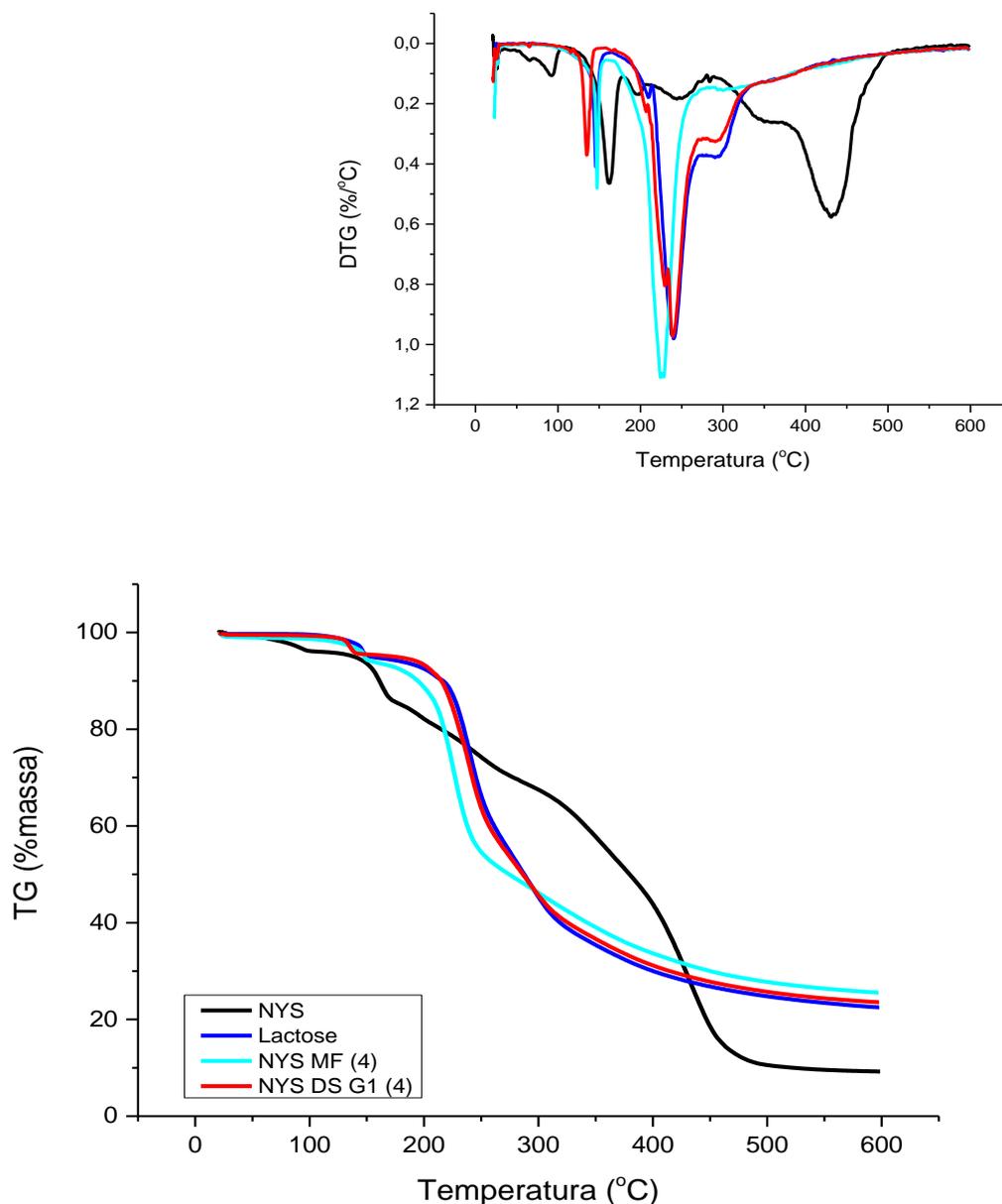


Figura 22 – Curvas TG/DTG da NYS, da lactose, da NYS MF (4) e da NYS DS G1 (4), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 23 e 24, foram demonstradas as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do HPMC, da NYS MF (4) e da NYS DS G1 (6). Na curva DSC da NYS MF (6) foram observados 2 endotermas, que correspondem à NYS e ao HPMC, respectivamente. Já na curva DSC da NYS DS G1 (6) foi visto apenas um endoterma. Ao confrontar as curvas DSC da NYS DS G1 (6) e da NYS MF (6), pode-se constatar que há uma grande distinção entre elas. Já as curvas TG/DTG do HPMC e da NYS MF (6)

apresentaram um perfil bem semelhantes com 2 perdas de massa. A curva TG/DTG da NYS DS G1 (6), por sua vez, expõe 3 perdas de massa e foi bem distinta das demais, principalmente da NYS MF (6), sugerindo que há uma nova espécie. Assim, esses resultados de análise térmico indicam a formação de um novo sistema e, então, foi decidido dar continuidade com estudos para NYS DS G1 (6).

Figura 23 – Curvas DSC da NYS, do HPMC, da NYS MF (6) e da NYS DS G1 (6), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

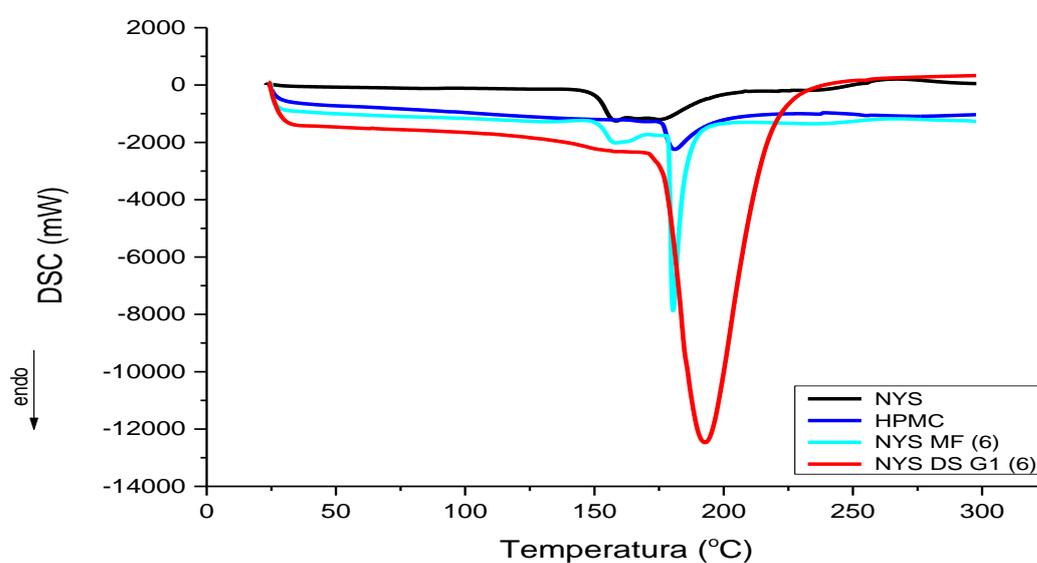
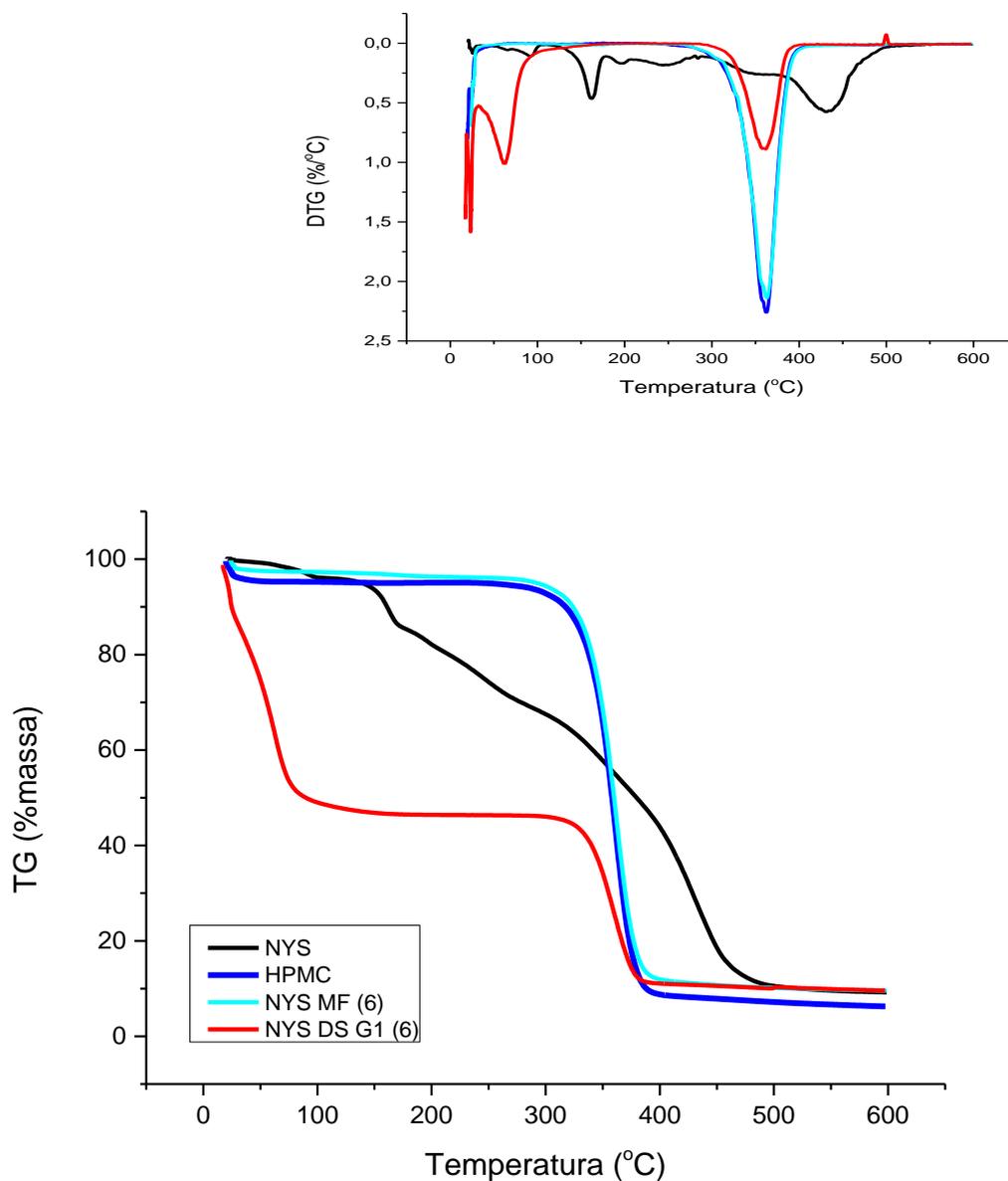


Figura 24 – Curvas TG/DTG da NYS, do HPMC, NYS MF (6), e da NYS DS G1 (6), obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 25 e 26, estão demonstradas as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do methocel K4M, da NYS MF (7), e da NYS DS G1 (7). A curva DSC da NYS MF (7) apresentou 2 picos endotérmicos, que corresponderiam à NYS e ao HPMC, sendo uma soma de eventos. Já a curva DSC da NYS DS G1 (7) exibiu um só pico endotérmico, intenso e largo. As diferenças também foram notadas, quando na análise comparativa das curvas TG/DTG. Esses resultados sugerem de um novo sistema. Baseado nesses resultados, a NYS DS G1 (6) foi estudado nos ensaios seguintes, como no fluxograma da Figura 7.

Figura 25 – Curvas DSC da NYS, do methocel, NYS MF (7), NYS DS G1 (7), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

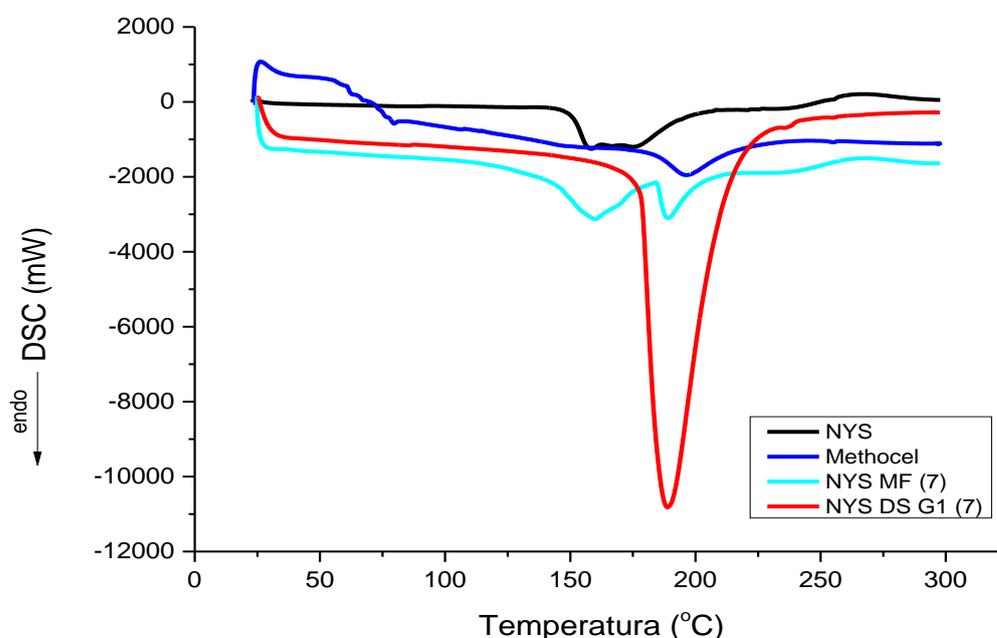
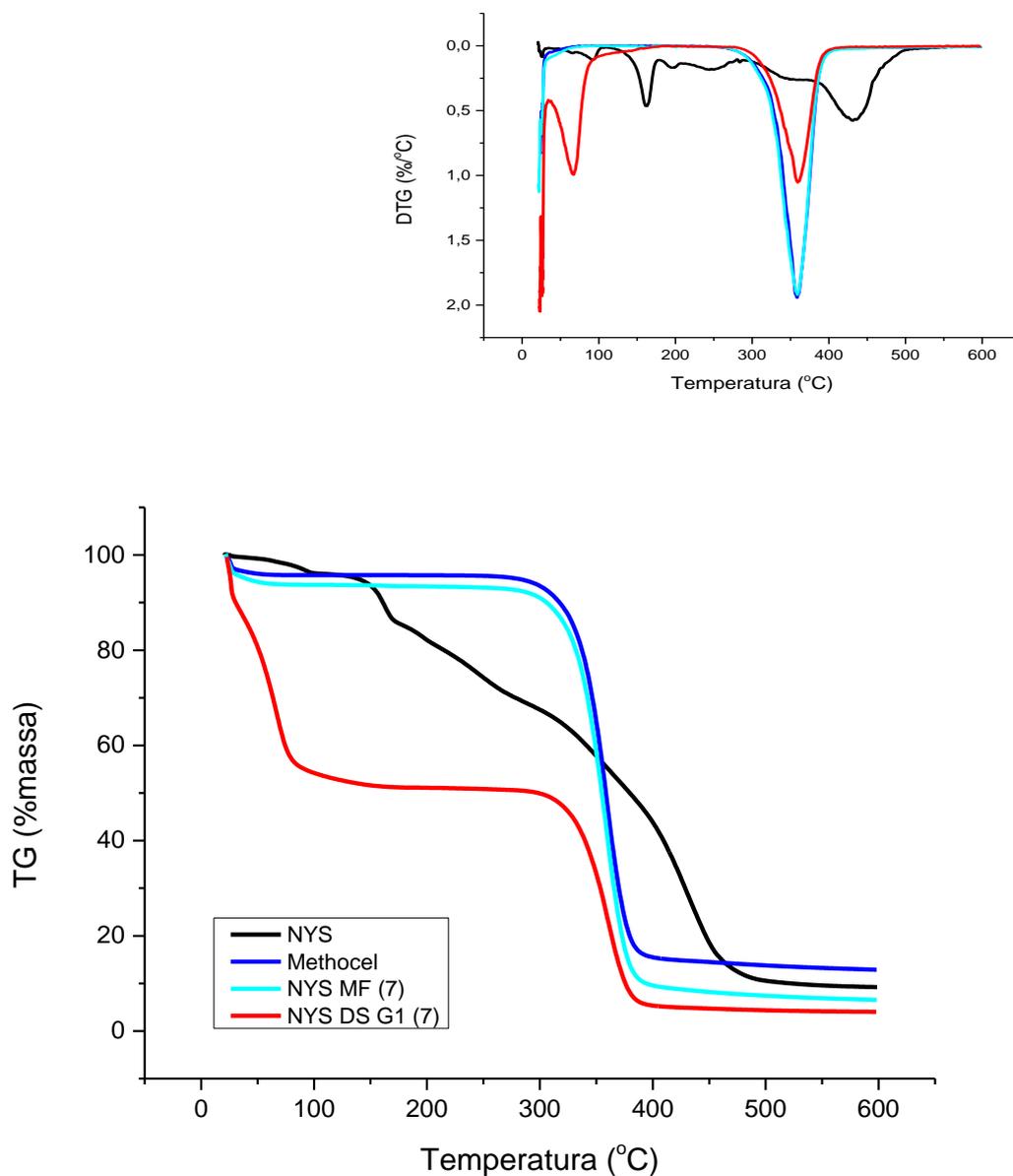


Figura 26 – Curvas TG/DTG da NYS, do methocel, da NYS MF (7), e da NYS DS G1 (7), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 27 e 28, estão apresentadas as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do methocel K4M, da NYS MF (14) e NYS DS G1 (14). As curvas DSC da NYS MF (14) e da NYS DS G1 (14) foram bem distintas. Na curva DSC da NYS MF (14) pode-se sugerir uma soma de eventos da NYS e do methocel K4M. E na curva DSC da NYS DS G1 (14), foi notado um pico endotérmico, que não é visto na curva DSC da NYS MF (14). Dessa forma, esse resultado indicou a formação de um novo sistema farmacêutico. Ainda, nas curvas TG/DTG da NYS MF (14) e NYS DS G1 (14), também foi notada a diferença do comportamento térmico. Portanto, os resultados de ambas as análises corroboram com a presença de nova espécie, dando prosseguimento ao estudo dessa formulação.

Figura 27– Curvas DSC da NYS, do methocel, NYS MF (14), NYS DS G1 (14), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

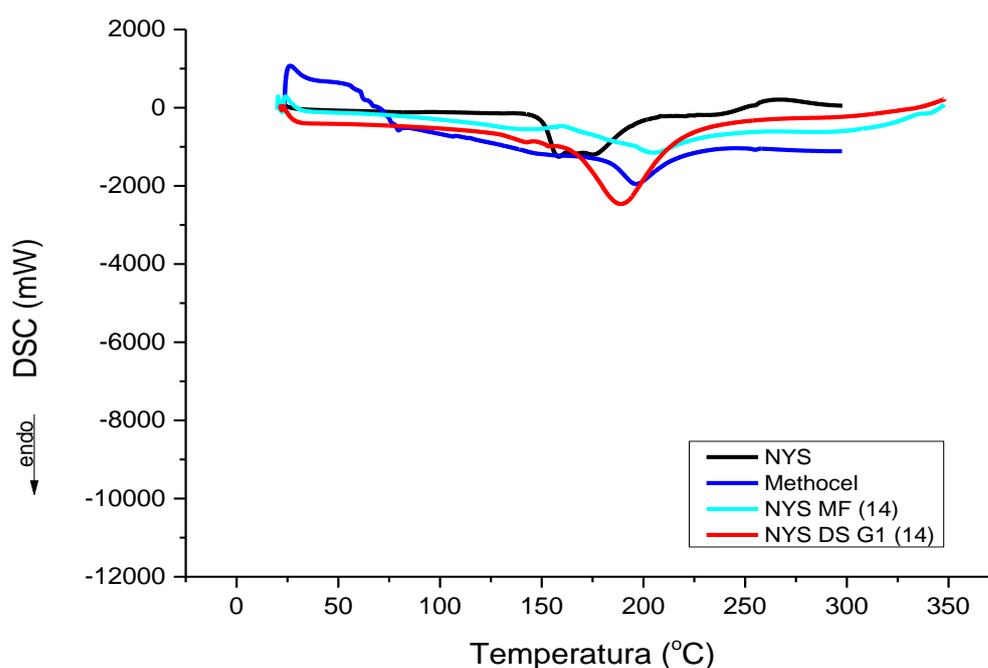
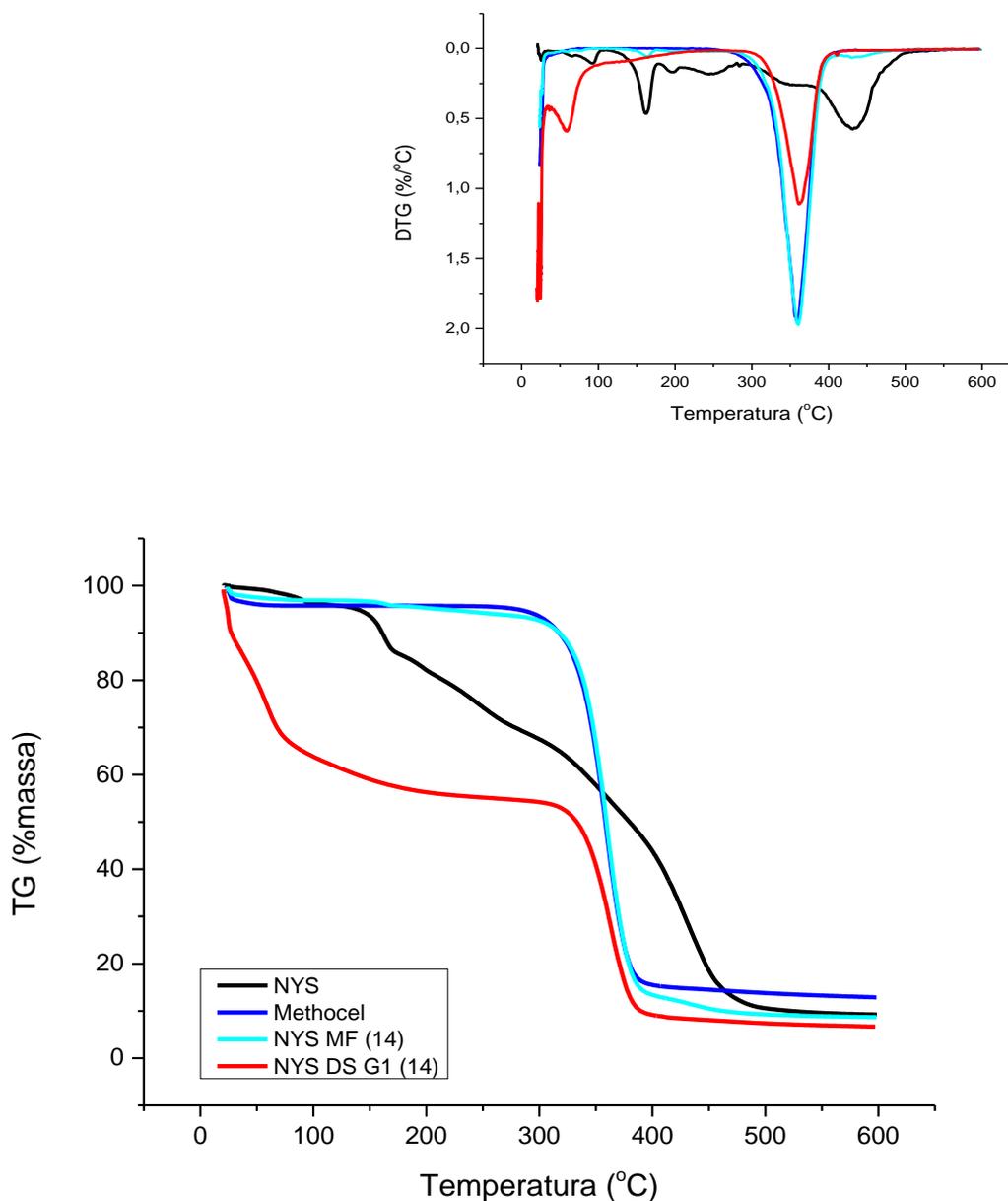


Figura 28 – Curvas TG/DTG da NYS, do methocel, NYS MF (14) e NYS DS G1 (14), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Dando continuidade as observações sobre comportamento térmico, foram analisadas as formulações de dispersão sólidas do Grupo 2.

Nas Figuras 29 e 30, encontram-se as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 407, NYS MF (45) e NYS DS G2 (45). Na curva DSC da NYS MF (45), foram vistos 3 endotermas, o que indica um somatório de eventos das curvas DSC da NYS e do Polo 407. E a curva DSC da NYS DS G2 (45) exibiu 3 endotermas nas mesmas

temperaturas. Todavia, os eventos, apesar na mesma faixa de temperatura se apresentam com intensidade diferente.

Já a curva TG/DTG da NYS MF (45) revelou eventos que correspondem às curvas da NYS e do Polo 407, o que reporta a uma soma de eventos. A curva TG/DTG da NYS DS G2 (45) apresentou bem semelhante à curva TG/DTG da NYS MF (45). Assim, diante dos resultados, não é possível sugerir que houve formação de um novo sistema. Então, foi decidido a não continuidade de ensaios com essa formulação.

Figura 29 – Curvas DSC da NYS, do Polo 407, da NYS MF (45) e da NYS DS G2 (45), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

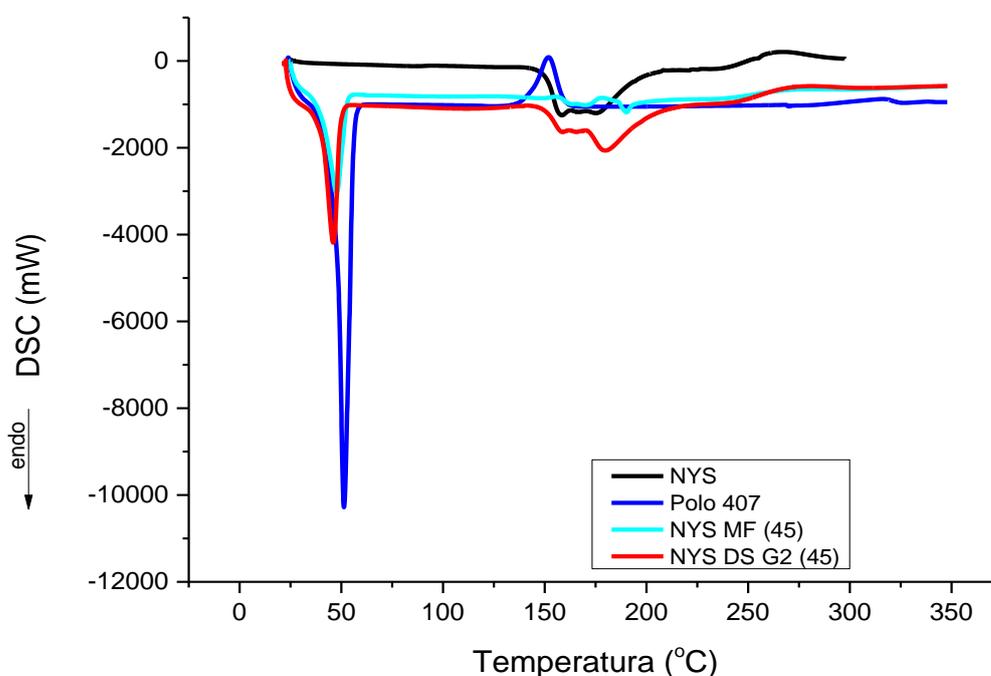
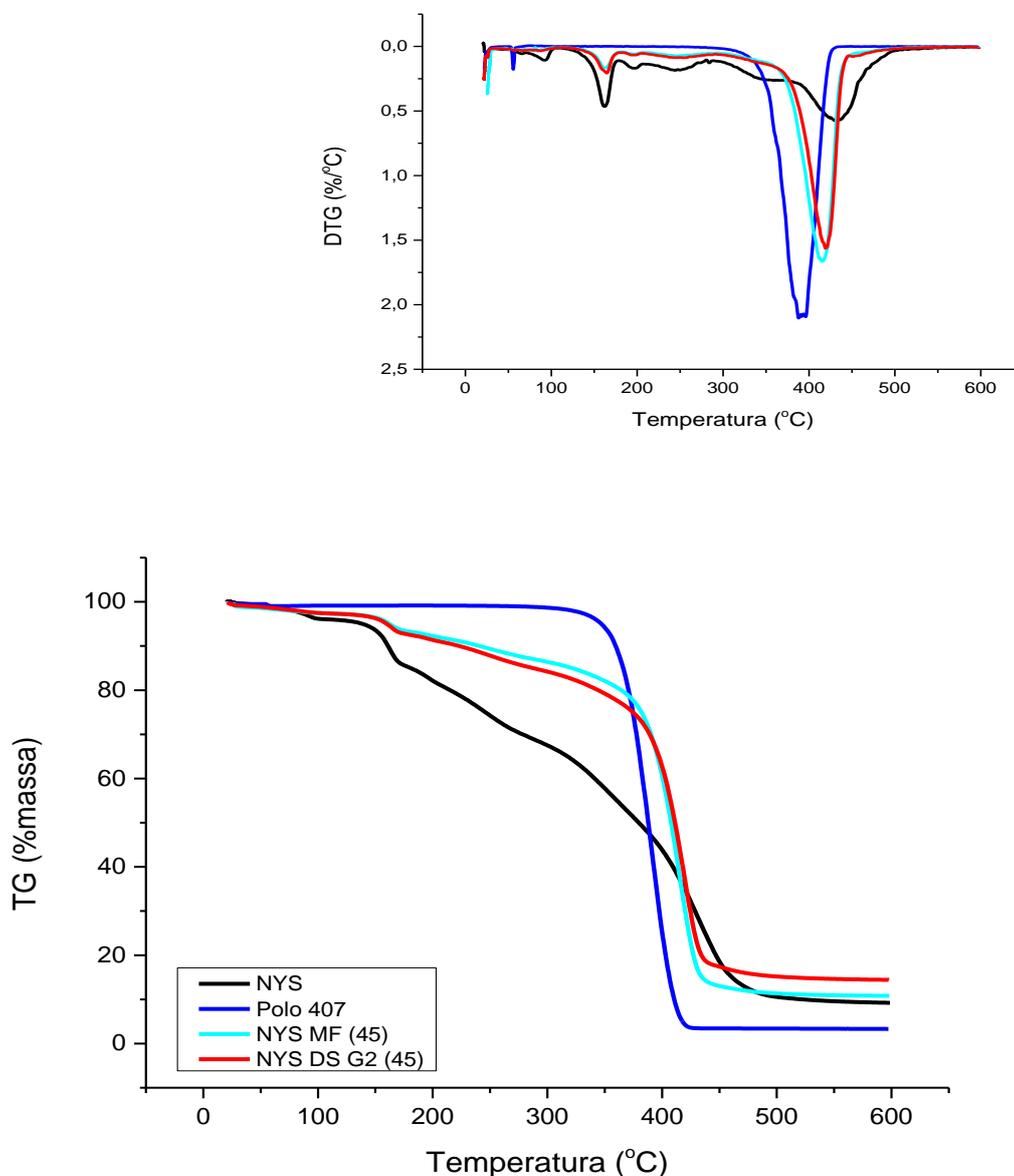


Figura 30 – Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (45) e da NYS DS G2 (45), obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 31 e 32, encontram-se as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (46) e da NYS DS G2 (46). Na curva DSC da NYS MF (46), foram observados 3 endotermas, que correspondem a uma soma de eventos da NYS e do Polo 407. Já na curva DSC da NYS DS G2 (46), foram notados 2 endotermas e um exoterma, o que indicaria a distinção entre essas espécies, ou seja, sugerindo a presença de espécie distintas. Já as curvas TG/DTG da NYS MF (46) e NYS DS G2 (46) apresentaram bem próximos, com quase a mesma perda e a partir desses perfis

não foi visto a possível formação de um sistema novo. Logo, foi decidido não prosseguir com estudos dessa formulação.

Figura 31 – Curvas DSC da NYS, do Polo 407, da NYS MF (46) e da NYS DS G2 (46), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

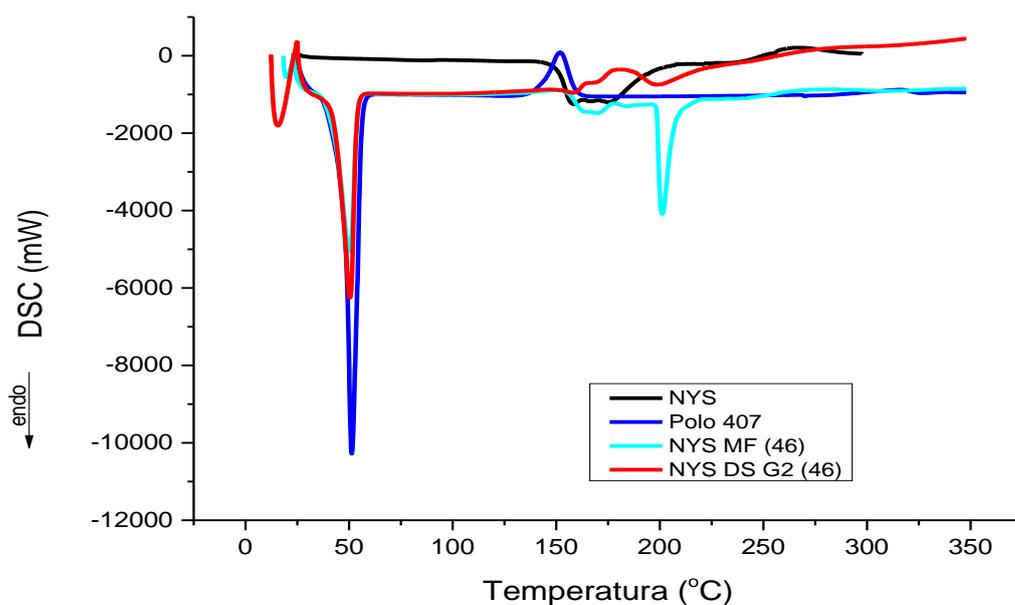
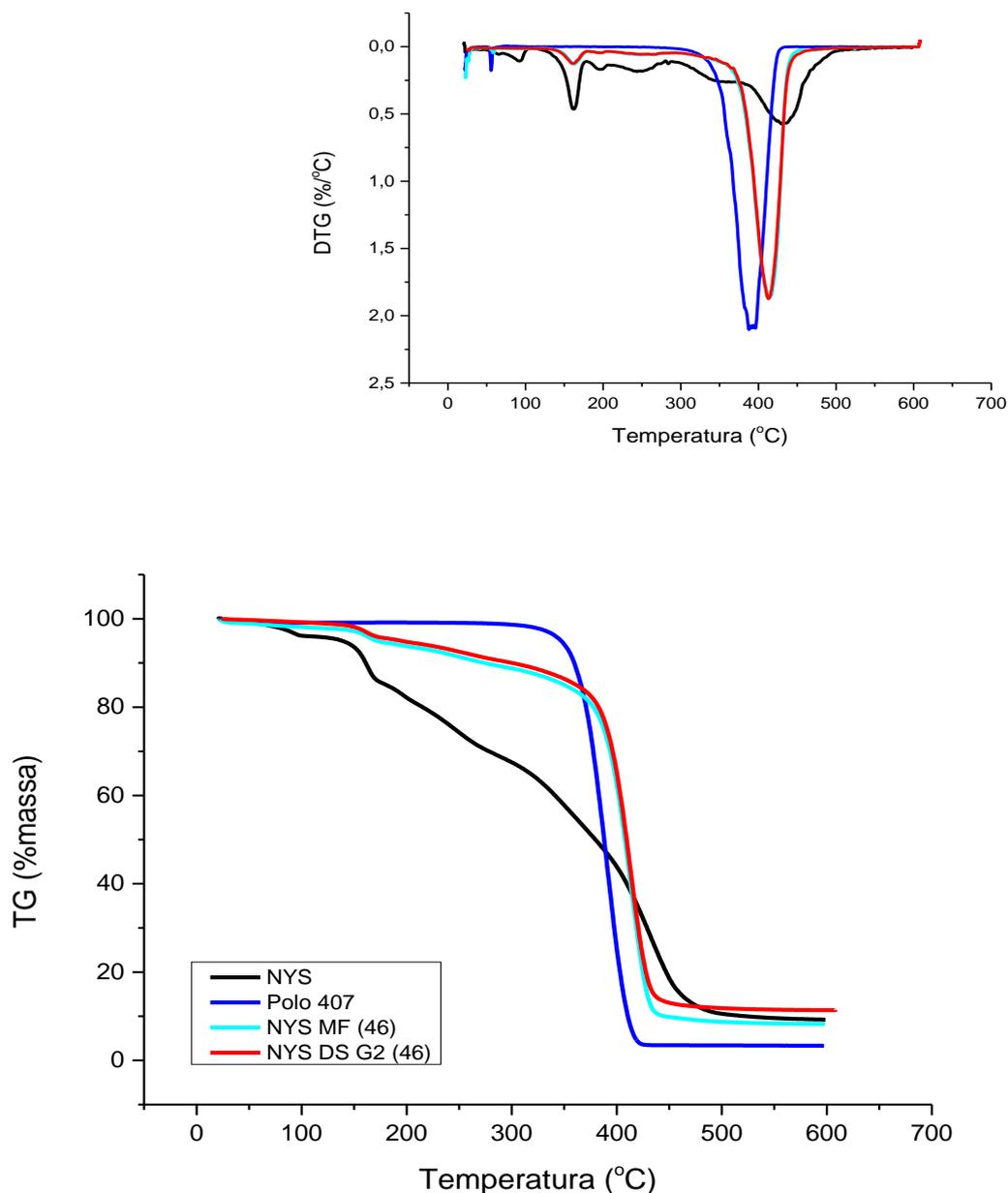


Figura 32 – Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (46), e da NYS DS G2 (46), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 33 e 34, encontram-se as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (47) e da NYS DS G2 (47). As curvas DSC da NYS MF (47) e da NYS DS G2 (47) apresentaram 2 picos endotérmicos (entre 25 e 200°C), porém de intensidade sutilmente diferente. E em torno de 300°C, somente na curva DSC da NYS DS G2 (47) ocorre o início de um possível evento endotérmico. Ao observar essas curvas, é possível perceber que elas são distintas, o que leva a indicar a presença de

um novo sistema. Ainda nas curvas TG/DTG NYS MF (47) e da NYS DS G2 (47), possuem perfis semelhantes até aproximadamente 400°C. A partir daí a NYS DS G2 (47) tem perda de massa menor, também indicando que uma nova “espécie” foi formada. Assim, a NYS DS G2 (47) teve estudos continuados.

Figura 33 – Curvas DSC da NYS, do Polo 407, da NYS MF (47) e da NYS DS G2 (47), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

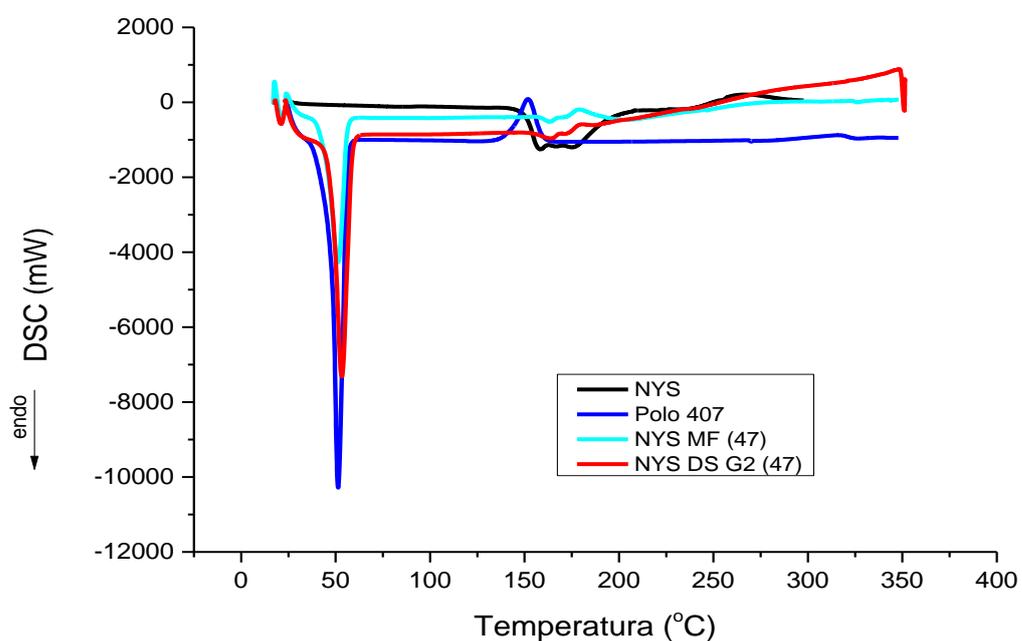
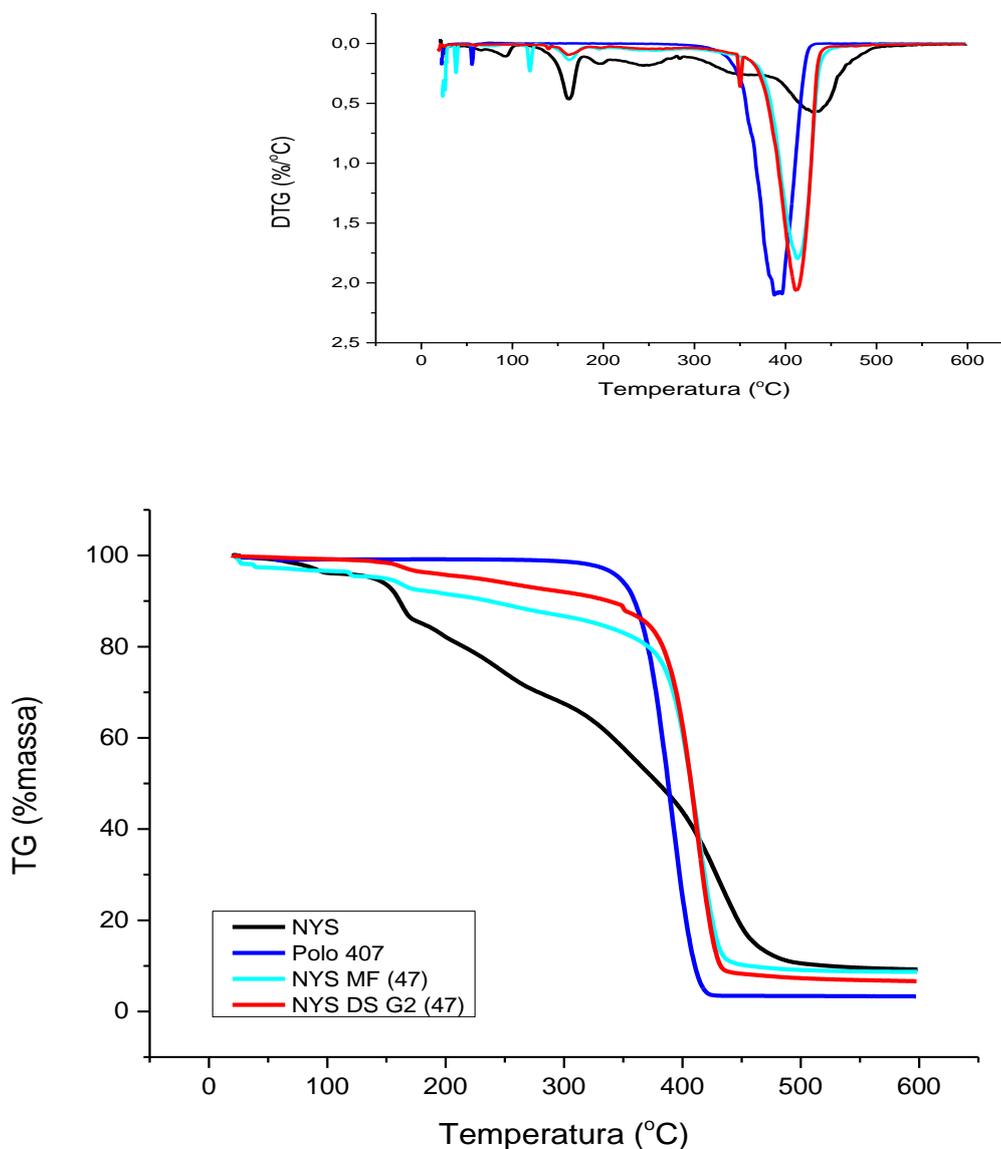


Figura 34 – Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (47), e NYS DS G2 (47), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 35 e 37, encontram-se as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (48) e NYS DS G2 (48). Na curva DSC da NYS DS G2 (48) foram notados 2 endotermas mais intensos, enquanto da curva DSC da NYS MF (48), foram vistos eventos semelhantes, porém de menor intensidade. E ainda apenas na curva DSC da NYS DS G2 (48) foi visto um pequeno endoterma, o que pode indicar a presença de uma nova espécie. Já as curvas TG/DTG da NYS MF (48) e NYS DS G2 (48) apresentaram apenas uma perda de massa, porém com uma discreta diferença entre elas. A NYS MF (48) apresentou-se mais instável termicamente, porque foi vista

uma perda de massa ligeiramente maior quando comparada à NYS DS G2 (48). Com base nesses resultados, acreditou-se que a formulação NYS DS G2 (48) pode ser um novo sistema e com isso, os estudos foram continuados.

Figura 35 – Curvas DSC da NYS, do Polo 407, da NYS MF (48) e da NYS DS G2 (48), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

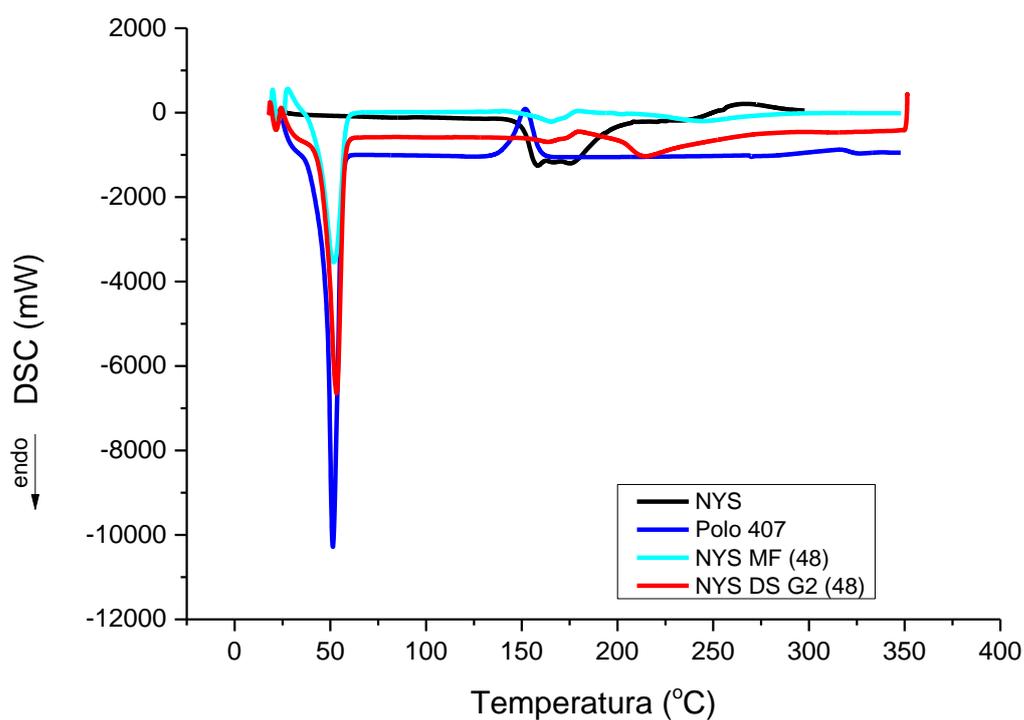
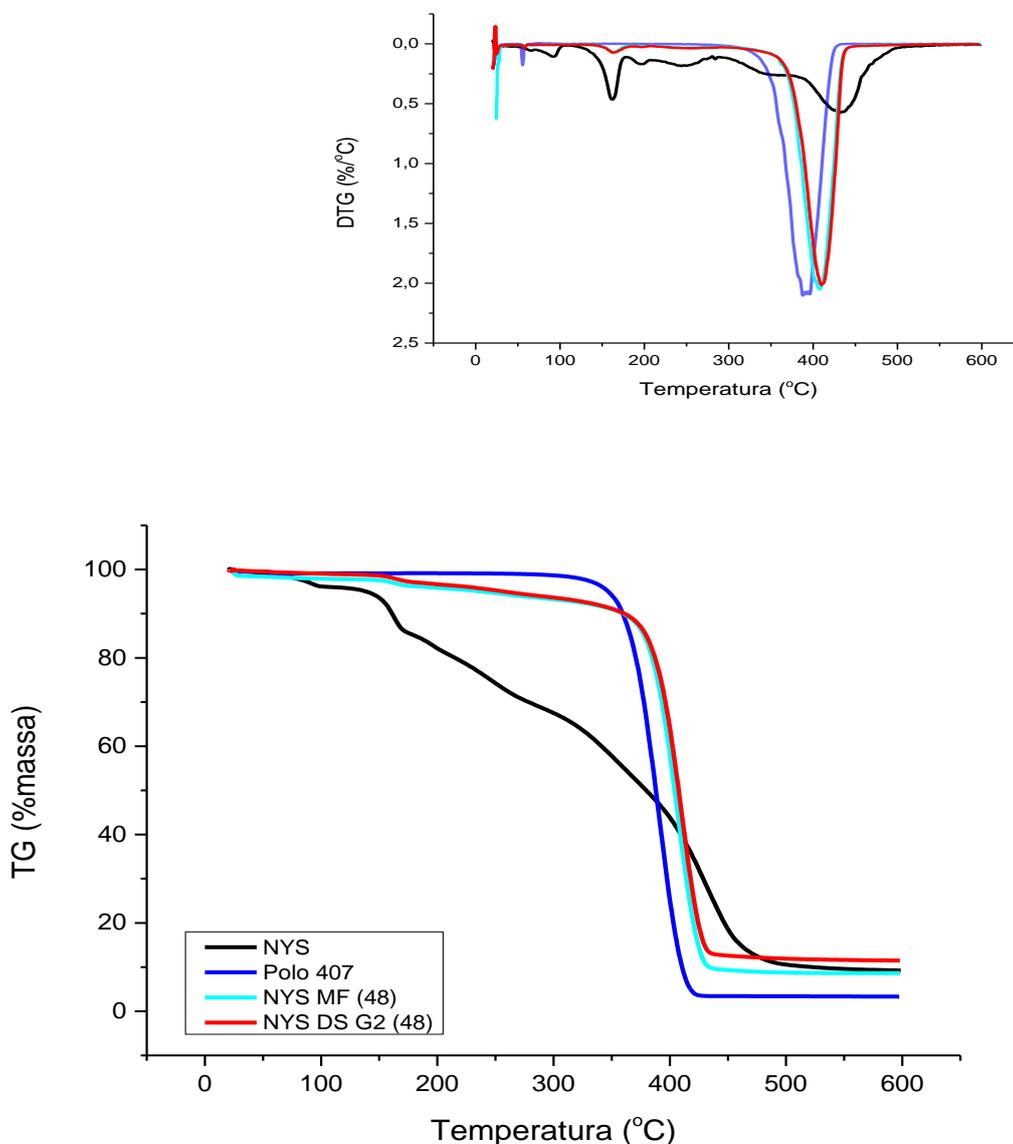


Figura 36 – Curvas TG/ da NYS, do Polo 407, da NYS MF (48) e da NYS DS G2 (48), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 37 e 38, encontram-se as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (A) e da NYS DS (A). Na curva DSC da NYS MF (A), foram observados 3 eventos endotérmicos que são semelhantes aos encontrados nas curvas de NYS e Polo 407, indicando uma soma de eventos do fármaco e do carreador. Também foram vistos 3 endotermas na curva DSC da NYS DS (A), nas faixas de temperaturas próximas dos eventos da mistura física. Todavia, os eventos em cada espécie foram de intensidades distintas, o que levou a acreditar que essa formulação é um sistema novo. Já nas curvas TG/DTG da NYS MF (A) e NYS DS (A), ambas

apresentaram perfis parecidos, com 2 perdas de massa, porém apenas a curva TG/DTG da NYS DS (A) pareceu um leve crescimento, indicando um ganho de massa (mais evidente na curva DTG). Esse evento último contribui para distinguir a NYS DS (A) da NYS MF (A) e, dessa forma, pode-se sugerir que pode ter ocorrido a formação de uma nova espécie.

Figura 37 – Curvas DSC da NYS, do Polo 407, da NYS MF (A) e da NYS DS (A), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

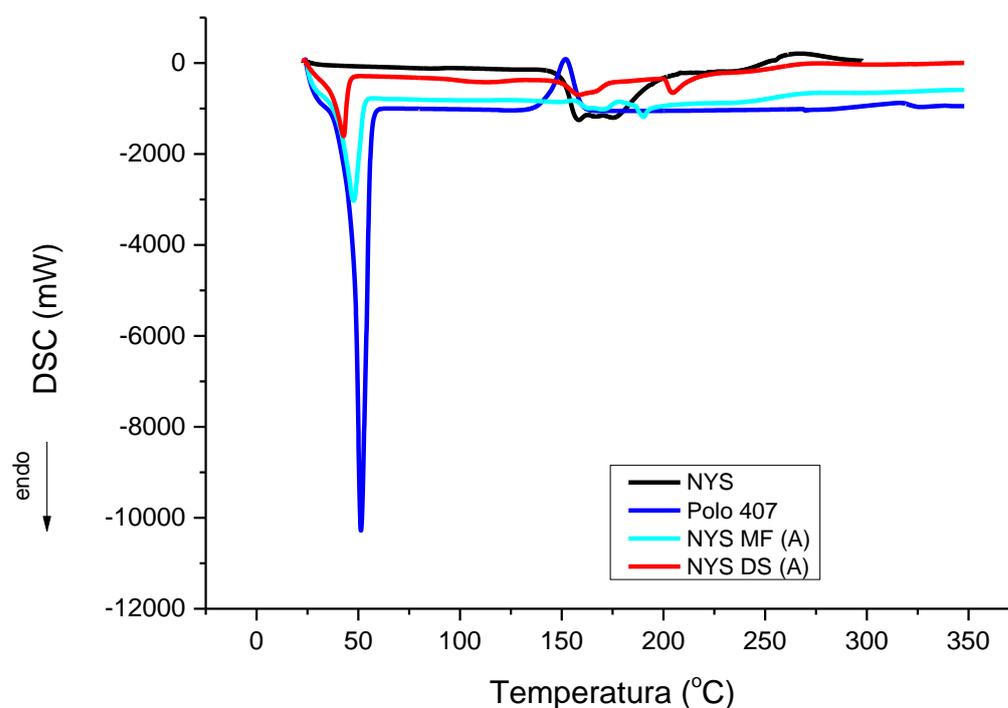
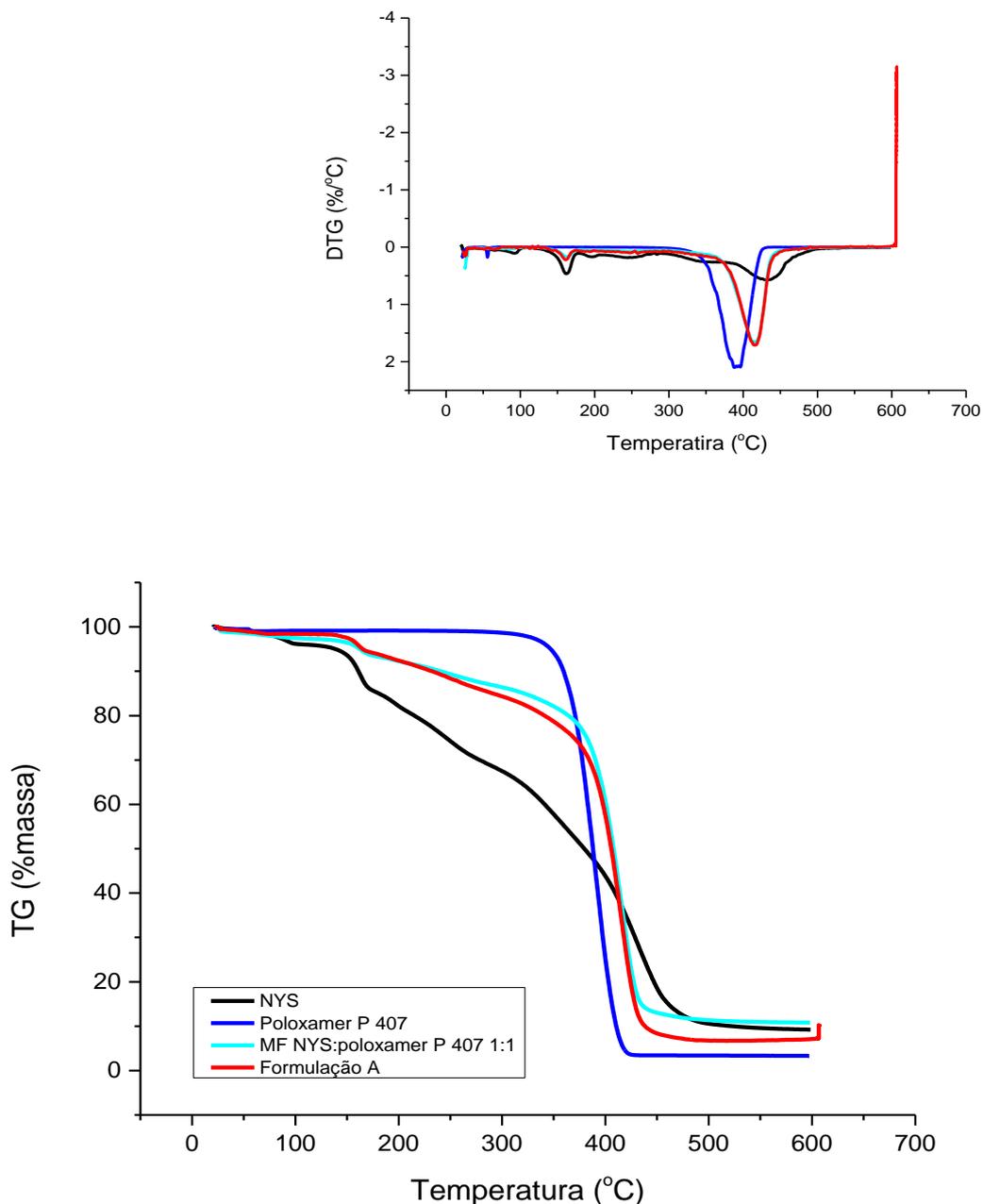


Figura 38 – Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 407, da NYS MF (A) e da NYS DS (A), obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 39 e 40 estão ilustradas as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (49) e da NYS DS G2 (49). Na curva DSC da NYS MF (49), foram notados 4 endotermas, que correspondem aos eventos observados nas curvas DSC da NYS e do Polo 188, individualmente. Já a curva DSC da NYS DS G2 (49) apresentou um perfil distinto da mistura física, com 3 endotermas. Desse modo, esse

resultado sugere que ocorreu a presença de nova espécie, pois a NYS DS G2 (49) apresentou um comportamento singular. E quando as curvas TG/DTG da NYS MF (49) e da NYS DS G2 (49) foram avaliadas, notou-se que elas apresentaram perfis mais parecidos. Contudo em torno de 400°C, onde ocorreu a decomposição final, percebeu-se que as perdas de massa são sutilmente diferentes. De fato, a curva TG/DTG da NYS MF (49) apresentou maior perda de massa que a da curva TG/DTG da NYS DS G2 (49), na mesma faixa de temperatura, indicando que é mais estável termicamente e que houve a formação de um novo sistema.

Figura 39 – Curvas DSC da NYS, do Polo 188, da NYS MF (49), e da NYS DS G2 (49), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

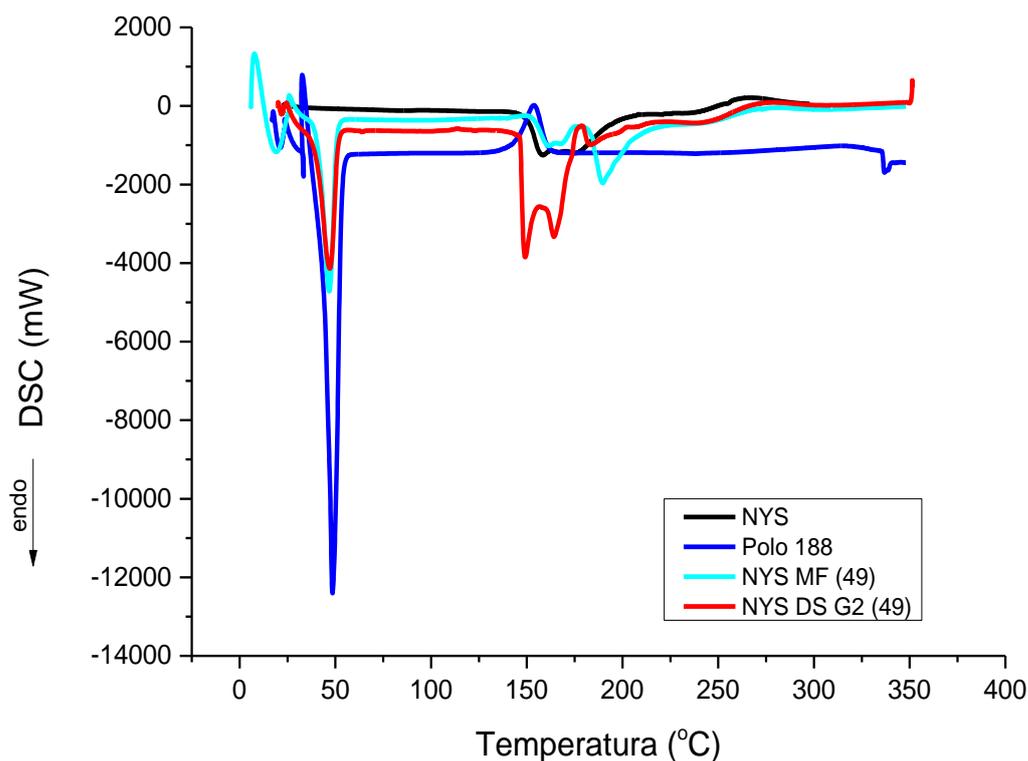
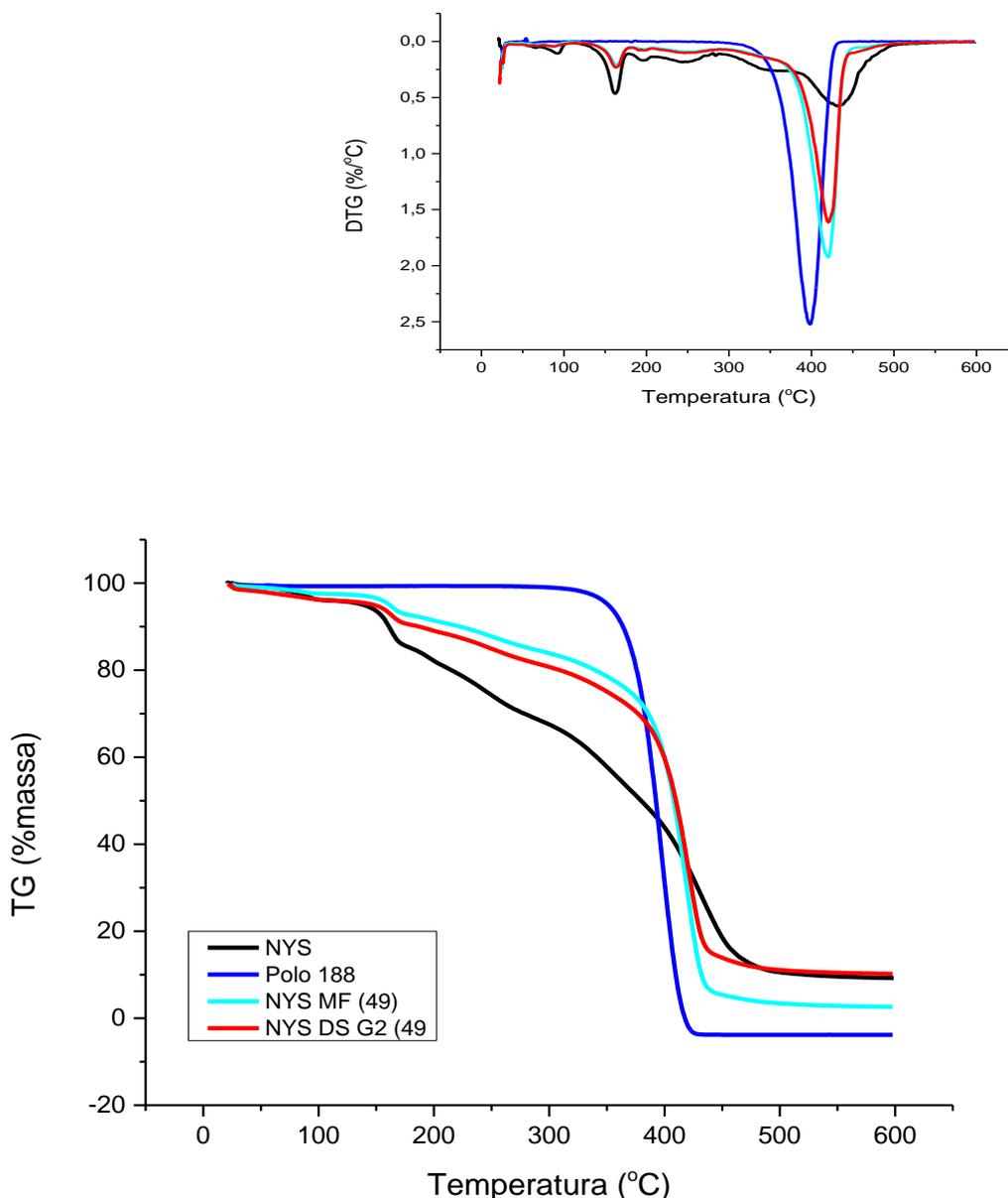


Figura 40 – Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (49), e da NYS DS G2 (49), obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 41 e 42 estão ilustradas as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (50) e da NYS DS G2 (50). Na curva DSC da NYS MF (50), foram observados 4 endotermas, que corresponderiam aos eventos de NYS e Polo 188. E na curva DSC da NYS DS G2 (50), eventos similares, na mesma faixa de temperatura, foram observados, embora de intensidade distinta. Esses resultados parecem ser inconclusivos para indicar a formação de um novo sistema. Quando as curvas TG/DTG da NYS MF (50) e da NYS DS G2 (50) foram observadas, foi notado

perfis bem parecidos (mais evidente nas curvas DTG). As curvas DTG da NYS MF (50) e da NYS DS G2 (50) são bem semelhantes, o indicaria que a formulação não é uma nova espécie e, diante desses resultados, foi decidido a descontinuidade dos estudos com a NYS DS G2 (50).

Figura 41 – Curvas DSC da NYS, do Polo 188, NYS MF (50) e NYS DS G2 (50), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

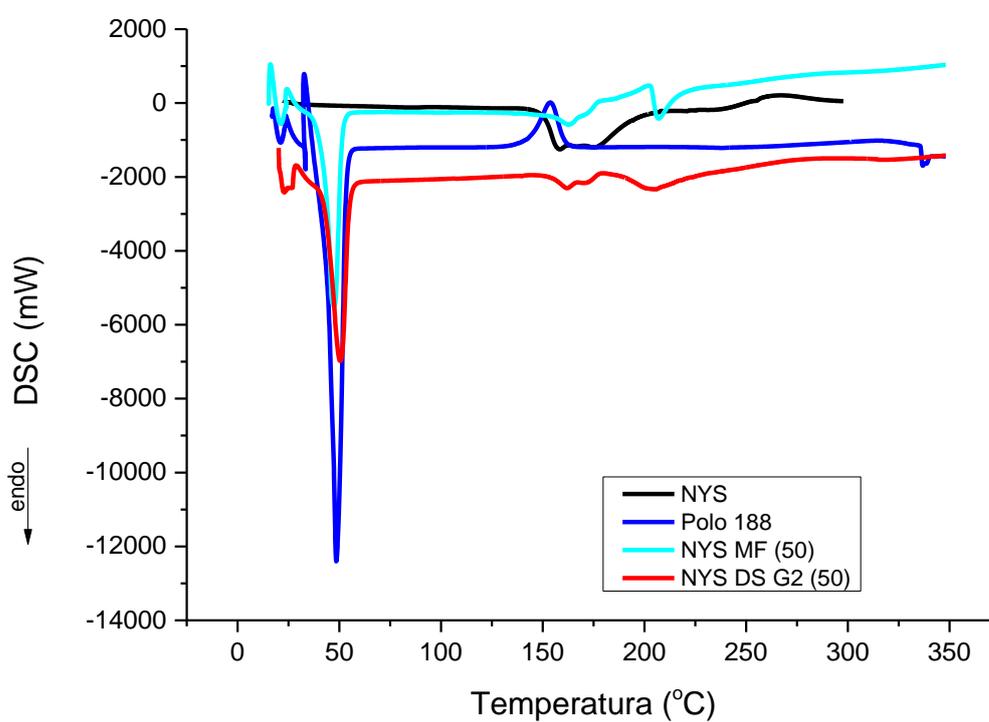
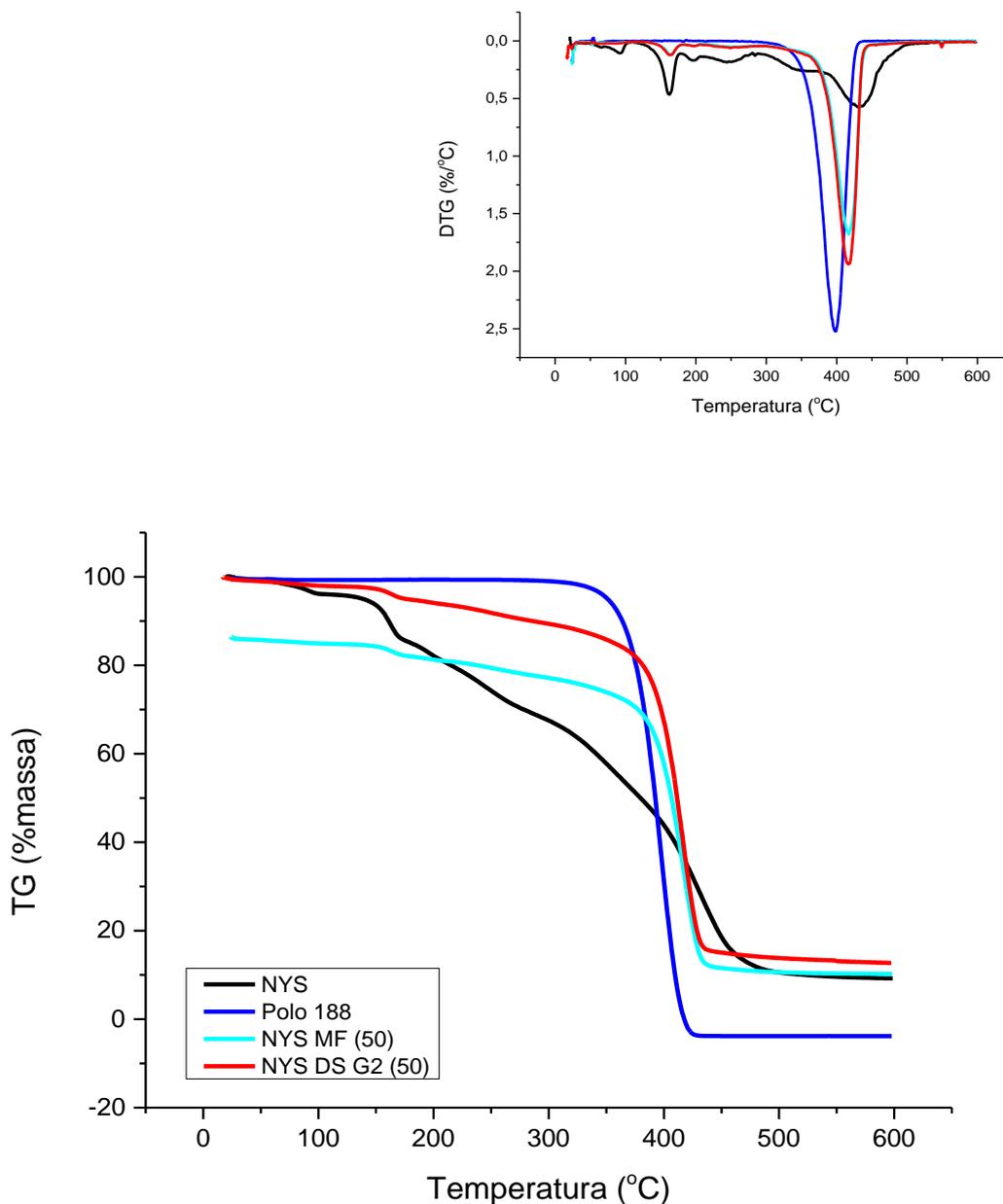


Figura 42 – Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, NYS MF (50) e NYS DS G2 (50), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Nas Figuras 44 e 45, estão ilustradas as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (51) e da NYS DS G2 (51). Na curva DSC da NYS MF (51), foram observados 3 endotermas, que correspondem à NYS e ao Polo 188, isoladamente, indicando uma soma dos eventos desses compostos. Também foram observados 3 endotermas na curva DSC da NYS DS G2 (51), na mesma faixa de temperatura. Logo, as curvas DSC da NYS MF (51) e da NYS DS G2 (51) exibiram

perfis muito semelhantes, indicando que não há diferença entre elas. Da mesma forma, ao avaliar as curvas TG/DTG da NYS MF (51) e da NYS DS G2 (51), observou-se grande semelhança entre as curvas TG/DTG, sendo quase uma sobreposição, com 2 perdas de massa. Isso levou a sugerir que a formulação não seria um novo sistema e este não teve os estudos continuados.

Figura 44 – Curvas DSC da NYS, do Polo 188, da NYS MF (51), e da NYS DS G2 (51), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

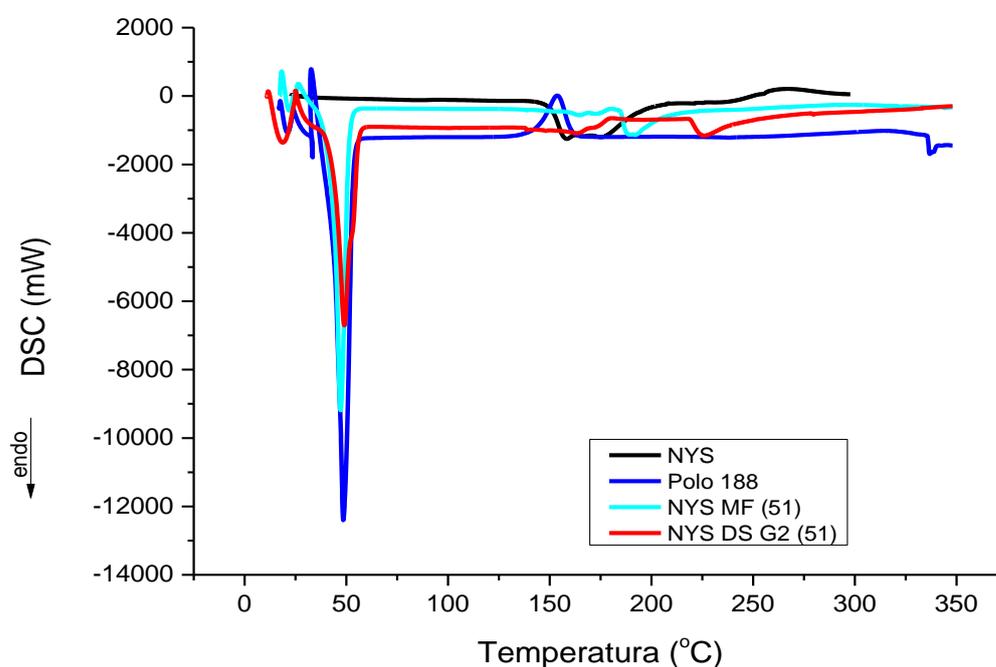
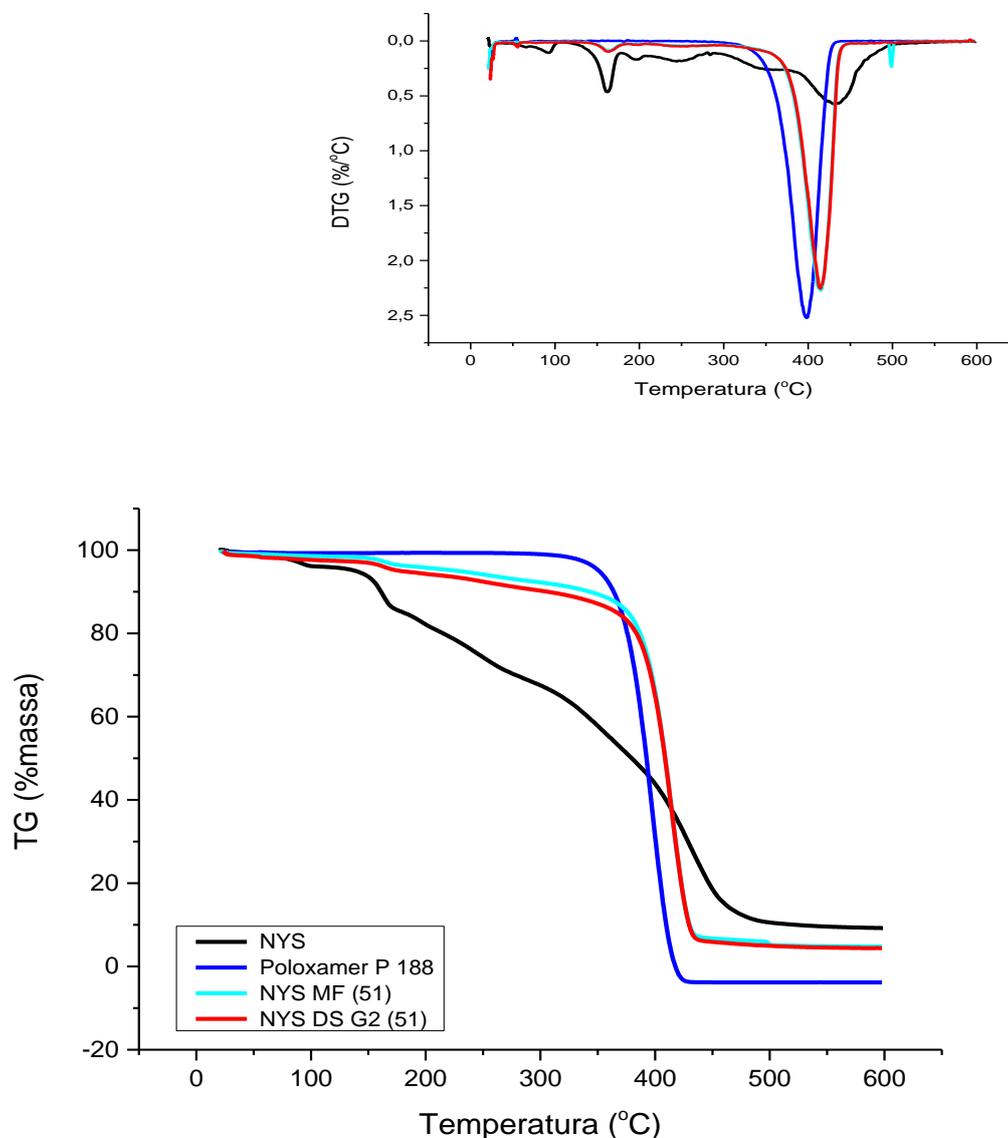


Figura 44 – Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (51), e da NYS DS G2 (51), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Por fim, nas Figuras 45 e 46 estão ilustradas as curvas DSC e TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (52) e da NYS DS G2 (52). A curva DSC da NYS MF (52) exibiu 2 endotermas, cerca de 50 e 250°C. O primeiro evento claramente corresponde ao Polo 188, porém o segundo pico se mostrou bem deslocado para direita, distante do da NYS. Possivelmente, esse evento se deve à quantidade do carreador, bem maior, quatro vezes, que de fármaco. Já a curva DSC da NYS DS G2 (52), foram observados 3 picos endotérmicos. Assim, esta apresentou um endoterma a mais que

a NYS MF (52), o que poderia indicar que houve a formação da dispersão sólida. Contudo, as curvas TG/DTG da NYS MF (52) e da NYS DS G2 (52) aparentam estar sobrepostas, com 1 perda de massa, isso não permite verificar que houve a formação de um novo sistema. Por essa razão, essa formulação foi descontinuada dos demais estudos.

Figura 45 – Curvas DSC da NYS, do Polo 188, da NYS MF (52) e da NYS DS G2 (52), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min.

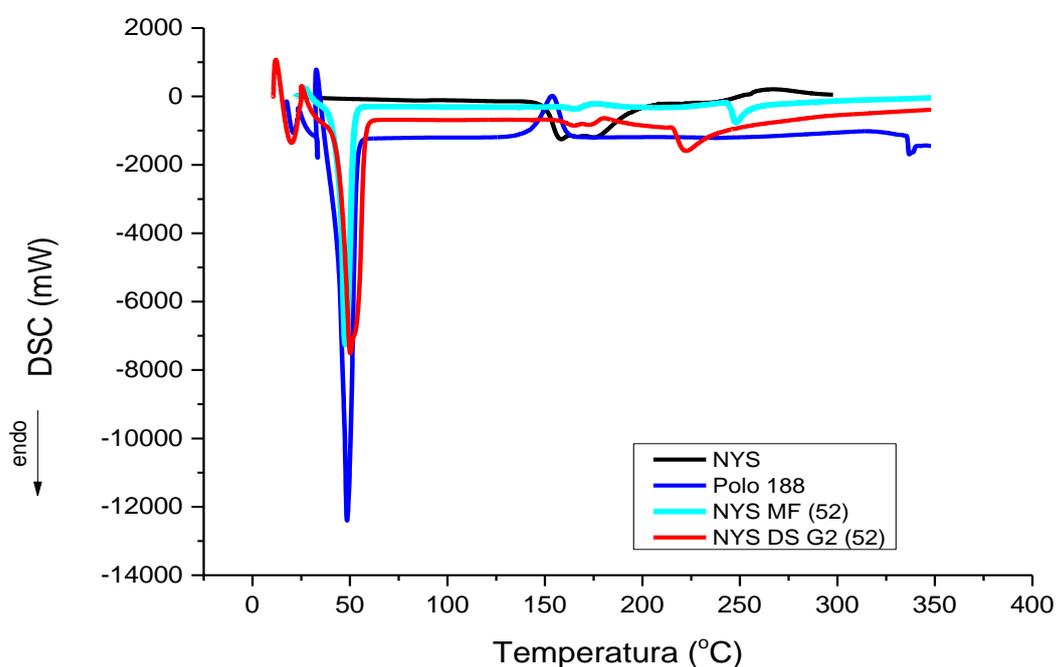
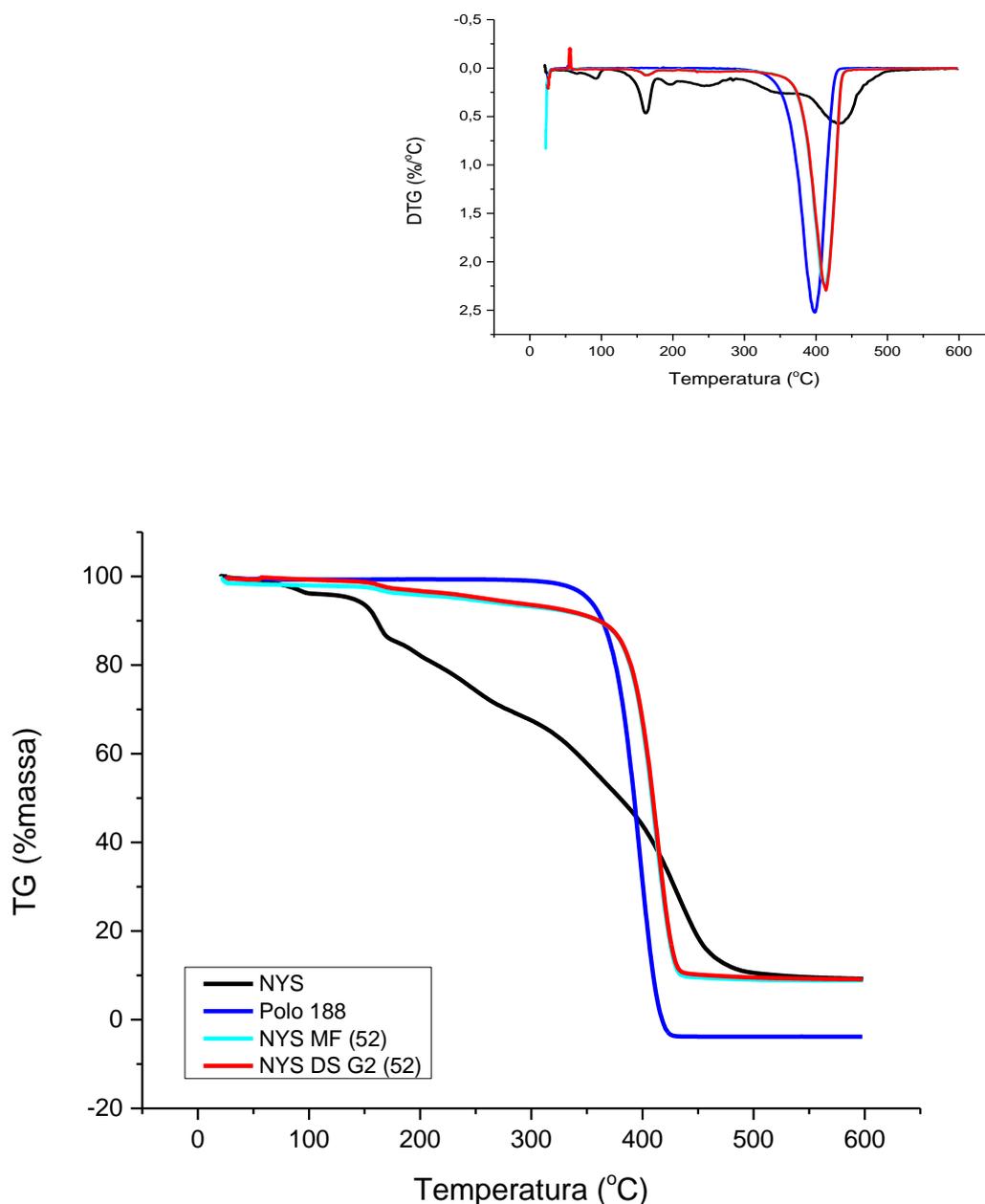


Figura 46 – Curvas TG/DTG da NYS, do Polo 188, da NYS MF (52) e da NYS DS G2 (52), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, com massa de amostra de 2 mg, aproximadamente.



Mediante aos resultados de análises das técnicas, as formulações que se mostraram diferentes das respectivas misturas físicas, que indica a possível presença de um novo sistema, também foram avaliadas no ensaio de solubilidade. As outras formulações foram descontinuadas. Portanto, as preparações NYS DS G1 (6), (7), (14), (47), (48), (49) e (A) foram pesquisadas.

### 5.1.3.2 Avaliação da Solubilidade

Do ponto de vista químico, o processo de solubilização de uma substância é resultado de suas interações entre o soluto e a substância que irá dissolvê-la, o solvente. A solubilidade, então, pode ser definida como uma determinada quantidade de soluto que se dissolve em uma determinada quantidade de solvente, alcançado as condições de equilíbrio. Assim, a solubilidade é um parâmetro quantitativo e é uma propriedade física (MARTINS, LOPES, ANDRADE, 2013).

A Farmacopeia Brasileira, assim como as demais farmacopeias, trata a solubilidade de uma substância descrita como a quantidade desta, em gramas, dissolvida em volume determinado, em mililitros (mL) e dessa forma, classifica os compostos em 7 níveis, descritos no Quadro 11 (F. BRAS., 2010; STORPIRTIS et al., 2011).

Por fim, a solubilidade, do ponto de vista da biofarmácia, é definida pela maior dose de um fármaco aceita numa formulação oral, em um volume definido de água. Esta definição, distinta daquela que considera a termodinâmica tradicional, foi proposta por Amidon e colaboradores, que elaborou o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON et al., 1995; DEZANI et al., 2013; STORPITIS et al., 2011; U.S., 2000).

Por esta razão a solubilidade tem grande importância para fármacos, assim como a permeabilidade. Ainda sobre o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, os fármacos podem ser classificados em 4 categorias, tais como Classe I, ou seja, fármacos que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade; Classe II, isto é, fármacos que apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade; Classe III, ou seja, fármacos que apresentam alta solubilidade e baixa permeabilidade e Classe IV, isto é, fármacos que apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade (AMIDON et al., 1995).

<b>Solvente</b>	<b>Termo descrito</b>
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10 000 partes

Quadro 11 – Termos descritos de solubilidade, encontrados na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, 2010 (adaptado F. BRAS., 2010).

Dessa forma, a NYS é considerada como pertencente à Classe IV e função disso, a produção de medicamentos onde o solvente é água, como as suspensões aquosas, torna-se um processo mais laborioso, além de estar menos disponível na cavidade oral (LINDEBERG, KOPP, DRESSMAN, 2004; SAKEER et al., 2010). De fato, o tratamento da candidíase oral pela NYS pode ser menos efetivo devido à diminuição progressiva de sua concentração na saliva, como consequência da produção constante de saliva e de sua baixa solubilidade em água (LLABOT et al., 2007).

Diante desse quadro, o desenvolvimento de dispersões sólidas foi realizado, buscando o aumento da solubilidade desse fármaco. Após o preparo das formulações de NYS DS e sua caracterização prévia por meio das técnicas de análise térmica, as preparações de NYS DS G1 (6), NYS DS G1 (7), NYS DS G1 (14), NYS DS G2 (47), NYS DS G2 (48), NYS DS G2 (49) e NYS DS (A) foram analisadas, bem como a NYS MP correspondentes. Os dados foram reunidos na Tabela 14 e na Figura 48.

Inicialmente, as formulações contendo HPMC e methocel não se mostraram adequadas para o estudo de solubilidade, empregando a técnica de *shake-flask*, já que estas preparações contêm HPMC em grande quantidade (dez e 25 vezes mais em relação à NYS. Foi visto, que após 72 h, a formação de um material de consistência gelatinosa, viscoso, que impossibilitou a retirada de um volume determinado e sua posterior quantificação da porção de NYS dissolvida.

Segundo Riekes e colaboradores (2014), que desenvolveram 3 formulações de dispersão sólida contendo nimesulida e HPMC, nas proporções de 1:9, 2:8 e 3:7, menores que as aqui usadas nesse estudo, foi possível a avaliação da solubilidade desses sistemas com uso de uma técnica semelhante à do presente estudo, diferindo da adição de lauril sulfato de sódio na concentração de 0,3 %p/v, o que poderia facilitar a dissolução das substâncias. Em relação ao emprego de methocel e HPMC como carreadores e comparando com outro estudo, pode-se concluir que a quantidade grande de HPMC e methocel usada no presente estudo inviabilizou a avaliação da solubilidade através da técnica de *shake-flask*.

Já no estudo promovido por Adibkia e colaboradores (2013), também foram desenvolvidas 3 formulações de dispersão sólida contendo naproxeno e HPMC, nas proporções de 1:0,5; 1:1 e 1:2, essas com quantidade bem menores do carreador. O estudo realizado por esse grupo avaliou a solubilidade do sistema por meio de ensaio de dissolução. Dessa maneira, em alguns trabalhos o uso de HPMC na produção de dispersões sólidas é recorrente, porém, em proporções menores das que aqui empregadas. Por essa razão, no início deste trabalho foi idealizado a obtenção de NYS DS contendo HPMC e methocel em proporções menores (1:1 e 1:5). Contudo, como descrito no item 5.1.2, não foi possível obter um material sólido.

Dessa maneira, do ponto de vista analítico, com a formação de material viscoso após o ensaio de solubilidade, não foi possível a quantificação de NYS dissolvida, nas formulações onde HPMC era o carreador. Somado isso, outras formulações de NYS DS foram obtidas com sucesso, com indicativo de sua formação pelas técnicas de análise térmica, e analisadas após o ensaio de solubilidade por *shake-flask*. Diante desse panorama, foi decidido a descontinuidade dos estudos com as NYS DS contendo HPMC – as formulações NYS DS G1 (6), (7) e (14).

Dando andamento, foram avaliadas quanto à solubilidade, sem problemas analíticos, as formulações NYS DS (A), NYS DS G2 (47), (48) e (49), todas contendo como carreador poloxamer. Na Tabela 14 e Figura 47 estão apresentados os resultados do ensaio de solubilidade.

A NYS MP apresentou as solubilidades, em mg/mL, de 1,087 em água; 1,005 em tampão acetato pH 5,5; e 1,565 em tampão fosfato pH 7,0. Esses valores foram os usados para estudo comparativo das solubilidades nas seguintes situações: NYS MP *versus* NYS DS e NYS MP *versus* NYS MF. É válido ressaltar que a NYS possui

características físico-químicas que se relacionam com sua solubilidade aquosa. Este antifúngico dispõe de um pKa ácido de 3,62 e outro básico de 9,11 (DrugBank, 2015; LAW et al., 2014). Mediante esses dados, pode-se inferir que a NYS, quando está na faixa de seus pKa, ou seja, entre 3,62 e 9,11, se apresenta totalmente ionizada, na forma zwitteriônica, ou seja, os 2 grupamentos, amina e ácido, estão ionizados. Por outro lado, quando está em um meio que pH é menor que 3,62, a NYS tem apenas um grupamento ionizada, nesse caso o grupamento amina. E quando a NYS está em pH maior que 9,11, também apenas um grupo está ionizado, o grupamento ácido. Sabidamente, os fármacos quando se encontram em suas formas não ionizadas apresentam menor solubilidade em água, enquanto nas suas formas ionizadas, possuem maior solubilidade aquosa. Assim, como a avaliação da solubilidade foi verificada nos pH de 5,5 e 7,0, ou seja, entre os pKa da NYS, pode-se concluir que o fármaco em ambos os meios estaria com os 2 grupos ionizados.

Analisando ainda as características físico-químicas da NYS, esta tem um log P (logaritmo do coeficiente de partição) igual a 0,5 (DrugBank, 2015; LAW et al., 2014), que é um parâmetro determinado como a razão entre as concentrações de dada substância, quando atingidas as condições de equilíbrio, dissolvida em um sistema formado de uma fase orgânica e uma fase aquosa (TAVARES, 2004). Considerando que  $\log P \leq 2$ , caracteriza substâncias hidrofílicas, e  $\log P \geq 4$  caracteriza compostos hidrofóbicos (SEBRÃO et al., 2007), seria de esperar que a NYS apresentasse boa solubilidade em água, o que não é observado (F. BRAS., 2010).

Todavia, a hidrofiliabilidade, e conseqüente solubilidade aquosa de uma substância não se restringe aos parâmetros de log P e pKa, e outras informações também devem ser consideradas (TAVARES, 2004). Desse modo, no caso da NYS, esses parâmetros demonstram não serem suficientes para concluir seu comportamento de solubilidade em água. Daí a importância também de avaliar a solubilidade da NYS, não só com objetivo de um estudo comparativo com as formulações preparadas, mais também de conhecer essa sua propriedade físico-química.

Além disso, apesar da NYS ser reconhecidamente um fármaco de baixa solubilidade em água, poucos trabalhos são encontrados com dados sobre sua solubilidade aquosa, à temperatura corporal. Ainda assim, em um trabalho realizado por Spulber e colaboradores (2011), a NYS em água, a 37 °C apresentou uma

solubilidade muito baixa, de  $4 \cdot 10^{-4}$  M, o que corresponde a 0,304 mg/mL. Esse valor é inferior em relação ao descrito aqui no presente trabalho: em água, a 37 °C, a solubilidade da NYS foi de 1,087 mg/mL. Porém, no estudo de Spulber o ensaio foi realizado em 24 h, enquanto neste foi de 72 h, como preconizado pelo FDA (U.S., 2000), o que poderia impactar no resultado final. Também não foi descrito em que tipo de equipamento foi realizado o ensaio, visto que a incubadora orbital aqui usada é um sistema fechado, capaz de manter a temperatura constante, o que também pode influenciar na solubilidade do fármaco.

Ainda, na avaliação da solubilidade das preparações de NYS DS e NYS MF, ficou evidente que a NYS apresenta maior solubilidade quando em sistemas de dispersões sólidas comparada às respectivas misturas físicas, com exceção da NYS DS (A) e NYS MF (A), onde essa evidência não foi observada. Essa formulação foi a única que foi preparada com uso de liofilizador, o que pode ter elevado a interação entre NYS e carreador. Nas técnicas de DSC e TG/DTG foi visto que houve a formação de um novo sistema, diferente dos compostos de partida e da mistura física correspondente. Esse sistema, então, poderia apresentar uma interação maior que as demais formulações, e isso poderia reter a liberação do fármaco, resultando em uma solubilidade mais baixa que a mistura física. Esse indicativo, para ser confirmado, necessitaria de mais estudos, com DRX e FTIR, para verificar essa possível interação. No entanto, dado que a solubilidade foi mais baixa e tendo outras formulações promissoras, além de não fazer parte do escopo do projeto, outros ensaios não foram realizados, e a NYS DS (A) foi descontinuada.

Nas formulações NYS DS G2 (47), (48) e (49), todas produzidas pelo método de eliminação do solvente com uso de evaporador rotativo, as solubilidades nos 3 meios foi superior que as respectivas NYS MF (47), (48) e (49). Esse fato, somado aos resultados da análise térmica, corroborou para a conclusão da formação desses sistemas de dispersões sólidas, distintas das misturas físicas. E mais, pode-se concluir que a presença apenas do carreador hidrofílico não é suficiente para melhorar a solubilidade em água, visto que para essas formulações a solubilidade foi maior quando comparada às misturas físicas.

Somado a isso, dentre as NYS DS G2 (47), (48) e (49) foi notório que somente a NYS DS G2 (49) apresentou aumento da solubilidade em todos os meios. A NYS DS G2 (49) demonstrou-se um aumento em todos os meios, com um incremento de

1,426; 2,743; e 4,227 vezes, em água; tampão acetato pH 5,5 e; tampão fosfato pH 7,0. Por fim, no pH 7,0 isso foi mais relevante, por esse ser o pH fisiológico da cavidade oral. Pode-se dizer que esses valores são expressivos, visto que a NYS apresenta uma solubilidade muito baixa, quando comparada a outros fármacos, e o incremento da solubilidade com uso de dispersão sólida, obtida pelo método de eliminação do solvente, consistiu numa boa estratégia farmacotécnica, de produção simples, reprodutibilidade e melhora da solubilidade de um fármaco de Classe IV, como a NYS.

Diante dos resultados de solubilidade apresentados, a NYS DS G2 (49) se mostrou a formulação mais adequada para ser usada na incorporação do gel mucoadesivo.

Por fim, a análise estatística foi realizada com objetivo de verificar diferença estatística entre os valores de solubilidade obtidos das diversas formas estudadas: NYS MP, NYS DS e NYS MF. No caso do presente estudo, as análises foram realizadas utilizando o teste t de Student para amostras independentes, segundo Winter (2013). Este pesquisador demonstrou mediante simulações computacionais, que é possível utilizar o teste t de Student em tamanhos de amostra extremamente pequenos. O teste F foi utilizado para comparar a variância entre os diferentes grupos e o teste t de Welch foi utilizado para comparar os valores médios no caso de heterocedasticidade. Foi considerado um nível de confiança de 95%. Todos os cálculos foram feitos utilizando o ambiente estatístico R (R Core Team, 2014).

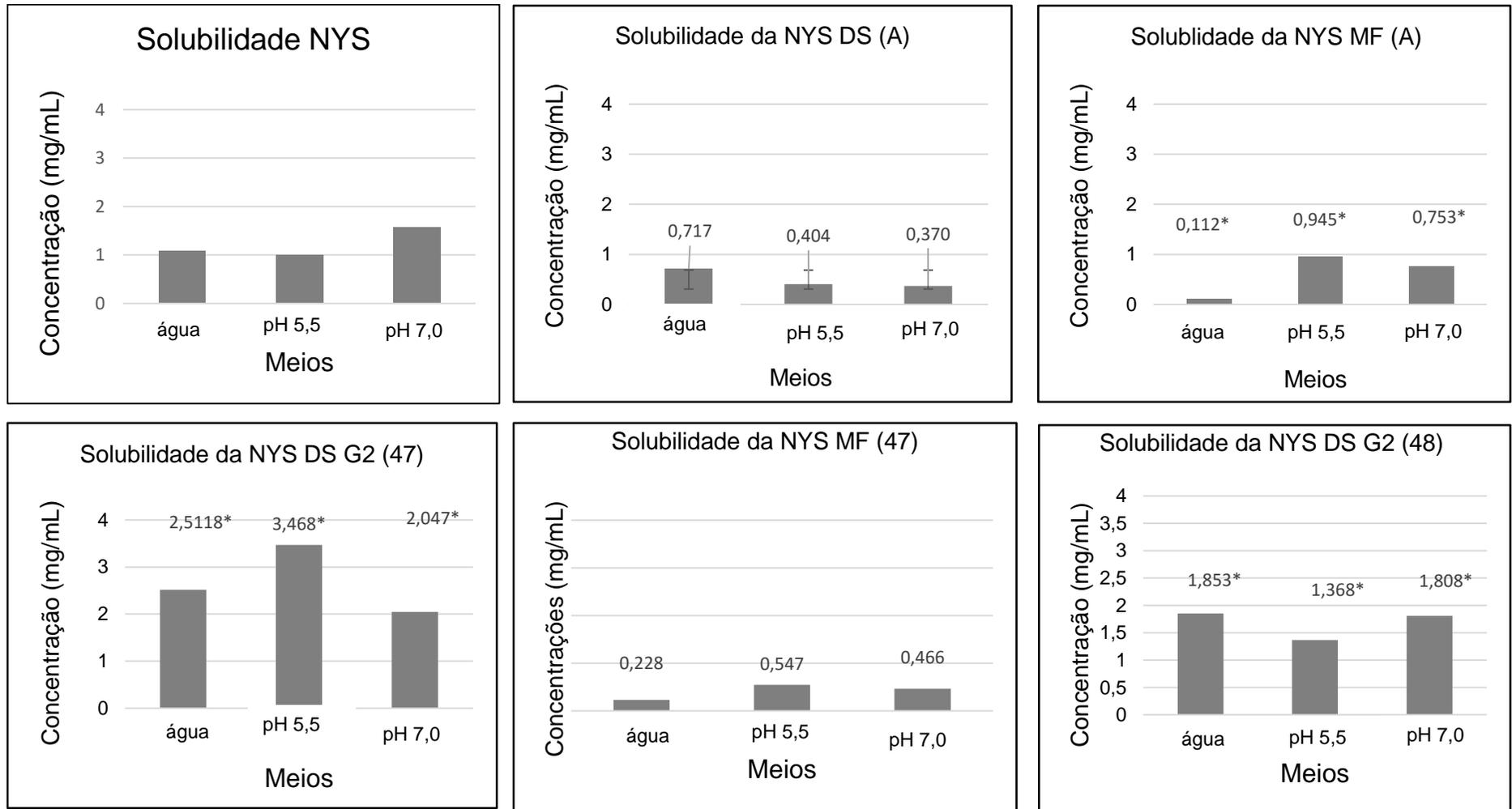
Os resultados demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de solubilidade nos 3 meios usados, dos grupos NYS MP *versus* NYS DS; NYS MF *versus* NYS DS; e NYS MP *versus* NYS MF. E o valor de p foi menor que 0,05.

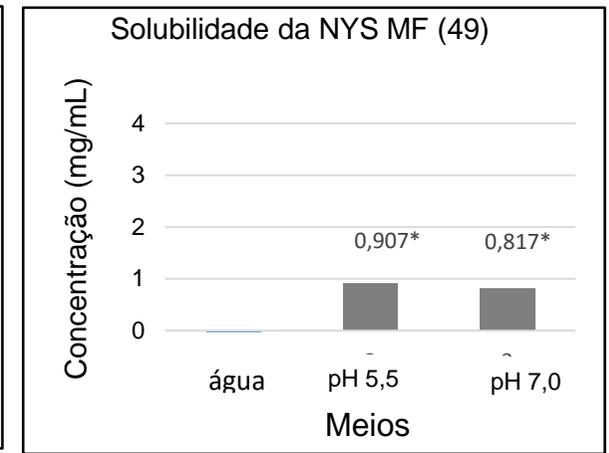
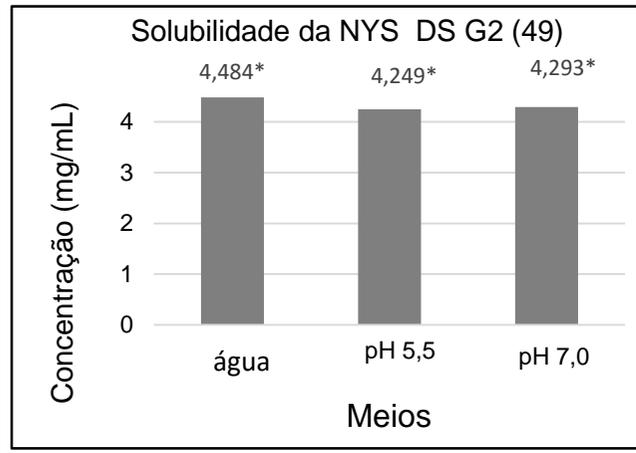
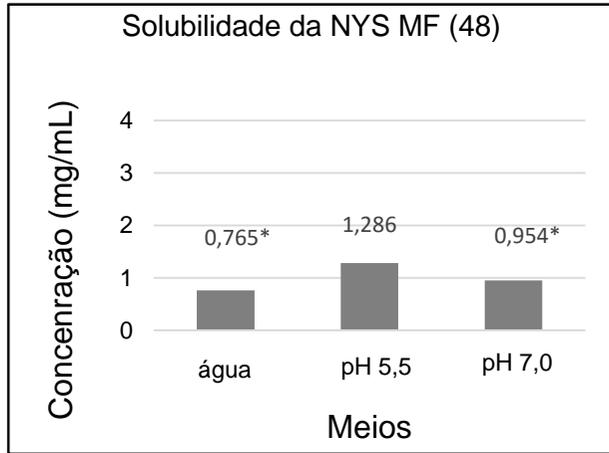
Formulações de NYS	Solubilidade (mg/mL)			Incremento da Solubilidade (aumento em vezes)		
	Água	Tampão acetato pH 5,5	Tampão fosfato pH 7,0	Água	Tampão fosfato pH 7,0	Tampão acetato pH 5,5
NYS MP	1,087	1,005	1,565	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica
NYS DS (A)	0,717	0,404	0,370	0,228	0,237	0,402
NYS MF (A)	0,112	0,945	0,753	0,0356	0,481	0,939
NYS DS G2 (47)	2,518	3,468	2,047	0,801	1,308	3,449
NYS MF (47)	0,228	0,547	0,466	0,0725	0,297	0,544
NYS DS G2 (48)	1,853	1,368	1,808	0,589	1,155	1,361
NYS MF (48)	0,765	1,286	0,954	0,243	0,609	1,279
NYS DS G2 (49)	<b>4,484</b>	<b>4,249</b>	<b>4,293</b>	<b>4,125</b>	<b>2,743</b>	<b>4,227</b>
NYS MF (49)	Não foi detectado	0,907	0,817	Não foi detectado	0,522	0,903

Tabela 14 – Valores de solubilidade de NYS MP, NYS DS (A), NYS MF (A), NYS DS G2 (47), NYS MF (47), NYS DS G2 (48), NYS MF (48), NYS DS G2 (49) e NYS MF (49), obtidos através da avaliação de solubilidade em nos meios água; tampão fosfato pH 7,0; e tampão acetato pH 5,5; sob a temperatura de 37,0 °C e após 72 h de agitação.

Legenda: Cada valor corresponde a uma média de 3 determinações (n =3), e calculado o desvio padrão, menor de 5%.

Figura 47 – Solubilidade da NYS MP, NYS DS (A), NYS MF (A), NYS DS G2 (47), NYS MF (47), NYS DS G2 (48), NYS MF (48), NYS DS G2 (49) e NYS MF (49) em diferentes meios (água; tampão acetato pH 5,5; tampão fosfato pH 7,0), sob temperatura de 37°C, após 72 h com uso da técnica de *shake-flask*. Os valores representam média de 3 determinações. \* Os dados apresentam diferença estatística





### 5.1.3.3. Caracterização Complementar de NYS DS

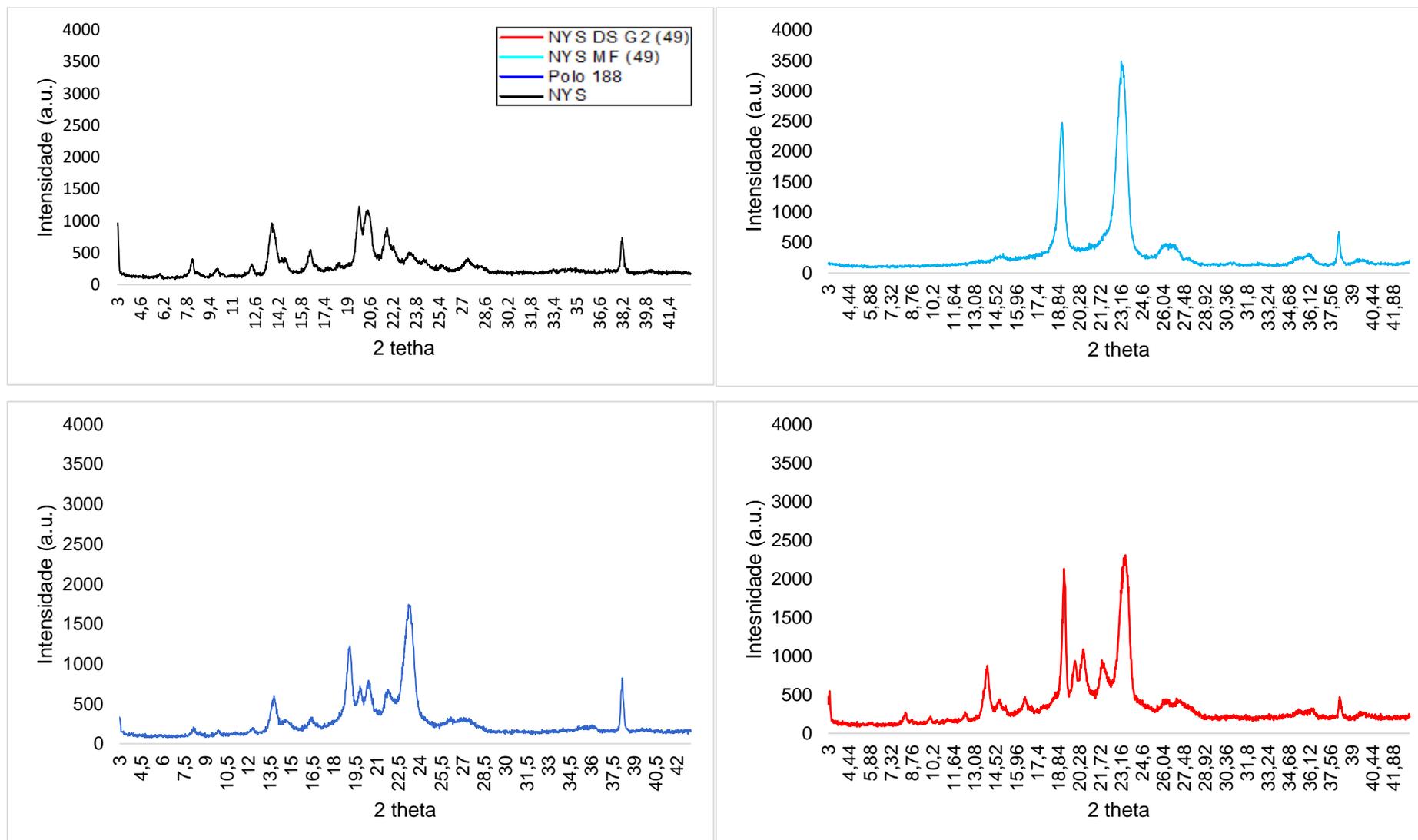
Conforme apresentado no Fluxograma da Figura 7, apenas a formulação NYS DS G2 (49) foi submetida às análises complementares, pois apresentou solubilidade consideravelmente maior que as outras e, portanto, mostrou-se interessante para a continuidade dos estudos: (A) difração de raio X; (B) Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e (C) PAMPA.

#### 5.1.3.3.1 Difração de Raio-X

A NYS MP apresenta natureza cristalino, como observado no difratograma, ilustrado na Figura 48. Já o carreador Polo 188, empregado na preparação da NYS DS G2 (49), apresentou 2 picos. Na NYS MF (49), foi notado os mesmos eventos observado no difratograma do Polo 188, já a NYS não apresenta eventos marcantes. Por fim, no difratograma da NYS DS G2 (49) foram vistos eventos semelhantes aos da NYS MF (49), no entanto levemente menos intensos.

Esses dados indicam que a formulação NYS DS G2 (49) e juntos com os demais resultados de análise térmica e de solubilidade, pode-se concluir que houve a formação de uma espécie distinta.

Figura 48 – Difratomogramas de NYS MP, Polo 188, NYS MF (49) e NYS DS G2 (49).

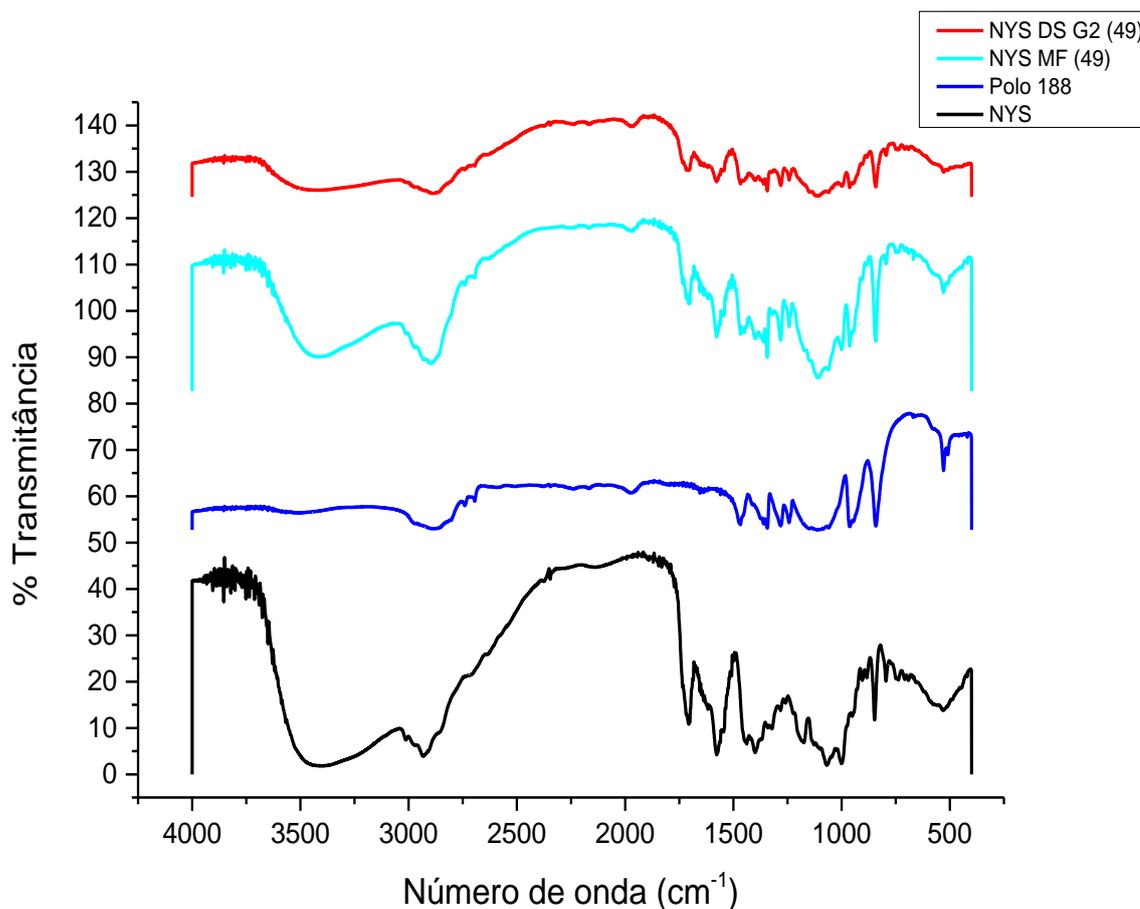


### 5.1.3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho das amostras NYS MP, Polo 188, NYS MF (49) e NYS DS G2 (49) estão representados na Figura 49. O espectro da NYS MP exibiu uma banda evidente e larga entre 3500 e 3250  $\text{cm}^{-1}$ , característica da vibração do estiramento das ligações H—O e H—N (MARTÍN-VILLENA et al., 2013). Ao comparar os espectros de Polo 188, NYS MF (49) e NYS DS G2 (49), foi possível observar que dentre essas amostras, apenas a NYS MF (49) continha a banda característica (na mesma região). Claramente, o Polo 188 não apresentou essa banda, já que se trata de um composto completamente distinto da NYS MP. Todavia, o espectro da NYS MF (49), mistura binária de NYS MP e Polo 188, demonstrou a banda nessa região supracitada. Por outro lado, no espectro de NYS DS G2 (49) não foi observada tal banda. Assim, esses resultados apontaram para diferenciar a NYS MF (49) da NYS DS G2 (49), o que indicou que esta última é uma espécie distinta de uma simples mistura dos produtos de partida.

Continuando, no espectro do Polo 188 foram observadas 2 bandas próprias, por volta de 3000 e 1100  $\text{cm}^{-1}$ , que são vibrações de estiramento atribuídas aos grupos O—H e C—O (KOLAŠINAC et al., 2012). Essas mesmas bandas puderam ser observadas na NYS MF (49) e, de forma bem mais sutil, na NYS DS G2 (49).

Figura 49 – Espectro de absorção de infravermelho com transformada de Fourier de NYS MP, Polo 188, NYS MF (49) e NYS DS G2 (49), entre 4100 e 100  $\text{cm}^{-1}$ .



### 5.1.3.3.3 Permeabilidade em Membrana Paralela

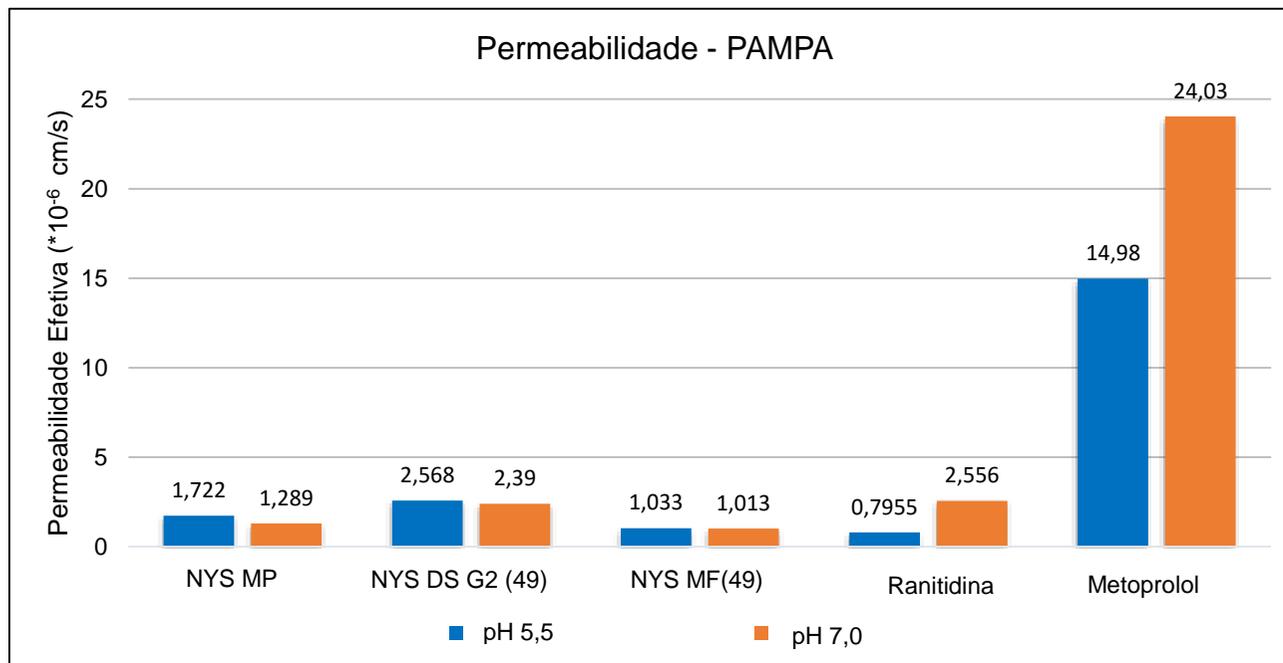
O PAMPA é um método rápido e reprodutível (REIS et al., 2013), e por essa razão foi empregado para avaliar a permeabilidade da NYS DS G2 (49), frente à NYS MP e a influência do carreador Polo 188, analisando, então, a NYS MF (49).

O ensaio de permeabilidade foi realizado como descrito no item 4.2.1.3.6. Nele, foram avaliados a NYS MP, NYS DS G2 (49), NYS MF (49) e ainda tartarato de metoprolol, como marcador de alta permeabilidade, e cloridrato de ranitidina, como marcador de baixa permeabilidade. Na Tabela 5 e na Figura 50 foram apresentados os resultados de permeabilidade efetiva obtidos.

Permeabilidade Efetiva (Pe) (*10 <sup>-6</sup> cm/s)					
Compartimento receptor (pH)	NYS MP	NYS DS G2 (49)	NYS MF (49)	Ranitidina	Metoprolol
5,5	1,722 ± 0,226	2,568 ± 1,75	1,033 ± 0,116	0,7955 ± 0,417	14,98 ± 1,68
7,0	1,289 ± 0,236	2,390 ± 0,387	1,013 ± 0,258	2,556 ± 3,73	24,03 ± 1,77

Tabela 15 – Valores médios de permeabilidade efetiva em função do pH e valores de desvio padrão. Os valores de permeabilidade foram expressos em \*10<sup>-6</sup> cm/s (n=3).

Figura 50 – Permeabilidade efetiva (\*10<sup>-6</sup> cm/s) de NYS MP, NYS DS G2 (49), NYS MF (49), ranitidina e metoprolol, com uso dos pH 5,5 e 7,0 no compartimento doador. Os resultados referem-se à média de 4 determinações.



Baseado nos resultados obtidos, a NYS MP, NYS DS G2 (49) e NYS MF (49) apresentaram baixa permeabilidade, assim como a ranitidina, fármaco marcador de baixa permeabilidade, nos meios pH 5,5 e pH 7,0. Em contrapartida, o metoprolol, marcador de alta permeabilidade, foi o que apresentou maior permeabilidade efetiva, em ambos os meios (pH 5,5 e pH 7,0). Portanto, a técnica por PAMPA sugeriu que a formulação de NYS DS não alterou a permeabilidade da NYS, nem a presença do carreador, como na NYS MF foi capaz também de alterá-la. Vale ressaltar, que o método PAMPA é indicado para fármacos que sofrem o transporte por difusão passiva, já que mimetiza a membrana plasmática das células. Se o transporte do fármaco ocorrer por outras formas, como mediado por transportadores, esse método pode subestimar a absorção.

No caso da NYS, ela é considerada um fármaco de baixa permeabilidade por não conseguir atravessar a membrana intestinal, mesmo quando administrada por via oral. Isso porque esse fármaco se apresenta como uma molécula grande, sendo assim reconhecidamente classificada como macrolídeo (TAVARES, 2001; GILMAN et al., 2003). Substâncias com essas características são incapazes de serem absorvidas. Como a NYS é normalmente usada para infecção de candidíase locais, essa propriedade não é relevante (TAVARES, 2001; GILMAN et al., 2003). Todavia, tratando-se de infecções sistêmicas por *Candida* spp., o uso da NYS não é recomendado, por ser muito tóxica. Isso porque ela causa hemólise, necrose e abscessos, ao ligar-se ao colesterol encontrado nas hemácias, levando à sua destruição (CROY, KNOW, 2004; TAVARES, 2001; GILMAN et al., 2003; KATZUNG, 2006).

Perante os resultados de PAMPA apresentados, pode-se concluir que a NYS na forma de dispersão sólida, NYS DS G2 (49), não apresentou alteração/aumento considerável de permeabilidade. Os valores de  $P_e$  da NYS DS G2 (49) foram levemente superiores aos da NYS MP e NYS MF (49), todavia continuaram próximos da ranitidina, marcador de baixa permeabilidade, o que foi interessante, considerando que a formulação de dispersão sólida deverá agir topicamente sobre a mucosa, sem que ocorra sua absorção, o que era pretendido.

#### 5.1.3.3.4 Teor da NYS DS

O teor de NYS foi realizado para a formulação NYS DS G2 (49), pois esta foi aquela que apresentou a valor maior de solubilidade, descrito na Tabela 14. O teor de NYS foi de 95,79 %  $\pm$  0,0057. O teor maior que 90% indicou que o processo de obtenção da dispersão, método de eliminação do solvente com uso de rotaevaporador, foi eficiente.

#### 5.1.3.4 Conclusão Parcial da Obtenção e Caracterização de Dispersão Sólida de NYS

Diante dos resultados apresentados neste item de Obtenção e Caracterização de Dispersões Sólidas de NYS, algumas considerações podem ser destacadas, conforme descrito a seguir.

O primeiro ponto a ser decidido foi a escolha da técnica de obtenção das dispersões sólidas. Dentre as diversas metodologias encontradas na literatura, foi selecionado o método de eliminação do solvente, com uso do evaporador rotativo. Isso porque esta é uma técnica rápida, reprodutível e simples, porém que faz uso de solventes orgânicos. Para avaliar a possibilidade do uso de solvente água, que obviamente não apresenta problemas quanto os solventes orgânicos, uma única formulação foi preparada com técnica de eliminação do solvente com uso de liofilizador.

Outro aspecto a ser considerado foi a escolha dos carreadores hidrofílicos que seriam utilizados na preparação das dispersões sólidas de NYS. Ao observar a literatura científica sobre o tema, foram elencados inúmeros excipientes farmacêuticos possíveis de serem empregados. No âmbito de realizar uma escolha mais apropriada, foram eleitos 5 carreadores, pertencentes às classes de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> gerações. Além disso, também foi considerada a experiência anterior de nosso grupo de pesquisa com esses sistemas. Sendo assim, foram idealizadas inúmeras formulações, com 7 carreadores diferentes e 2 técnicas de remoção de solventes, totalizando 23 preparações. A partir desse quadro, foram obtidas 13 formulações.

O próximo passo foi a caracterização prévia desses sistemas, e foi escolhida a análise térmica como procedimento de avaliação da formação das dispersões sólidas

de NYS, com emprego de 2 métodos: a calorimetria diferencial exploratória e termogravimetria / termogravimetria derivada. Esses métodos são normalmente usados para caracterização de dispersões sólidas, já que demonstram o comportamento térmico e podem, assim, caracterizar várias situações, como polimorfismo, interação entre fármaco e excipiente, e se tornam de grande valia para verificação de formação de novos sistemas. Portanto, todas as dispersões sólidas foram avaliadas por esses 2 processos, bem como as NYS MP, os carreadores empregados e as misturas físicas de NYS e carreador, correspondentes em proporção à dispersão sólida.

A partir dos resultados obtidos e interpretados, foi concluído que 7 formulações de dispersões sólidas foram formadas. Elas foram então avaliadas pelo ensaio de solubilidade. Este, pode-se dizer, que foi um dos objetivos centrais do presente projeto de pesquisa, já que foi idealizado que um sistema farmacêutico de NYS com maior solubilidade frente ao fármaco aumentaria os níveis desta na saliva, e isso levaria a uma resposta farmacológica mais efetiva para o tratamento da candidíase oral.

Proposto isso, as formulações foram analisadas quanto à sua solubilidade em 3 meios: água, tampão acetato pH 5,5 e tampão fosfato pH 7,0. Diferentemente dos ensaios de solubilidade que avaliam fármacos administrados por via oral e uso sistêmico, a NYS é um fármaco de administração oral e de uso tópico, e que eventualmente pode ser deglutida. Todavia, o objetivo é que ela permaneça o maior tempo possível na cavidade oral, em contato com a mucosa oral, onde se encontra o agente causador da infecção. Por essa razão, os meios para avaliação da solubilidade da NYS precisariam ser considerados quanto ao ambiente oral, cuja variação do pH é distinta da variação do pH do trato gastrointestinal. Dessa maneira, o pH 5,5 foi eleito por ser importante quanto ao ambiente propício à formação de cáries, e o pH 7,0, por ser o fisiológico.

A avaliação da solubilidade, então, foi realizada também como forma de caracterização das dispersões sólidas, e para isso, foi visto a necessidade de análise das respectivas misturas físicas. No que tange a formação das dispersões sólidas, é comum que seja questionado se houve formação de um sistema, ou que apenas a adição do carreador, que deve ser hidrofílico, não seria o suficiente para melhorar a solubilidade. Decerto, quando os resultados desse ensaio foram obtidos, foi possível

verificar que as misturas físicas apresentavam solubilidade inferior às dispersões sólidas, demonstrado também pela análise estatística.

E ainda, dentre as formulações obtidas, uma em especial apresentou maior solubilidade quando comparada ao fármaco puro e mistura correspondente: a NYS DS G2 (49), cujo carreador é conhecido como de 3ª geração, um tensoativo. Esta mostrou-se ser a preparação mais adequada para a próxima etapa, isto é, sua incorporação numa forma farmacêutica. No entanto, essa preparação ainda foi avaliada por outras técnicas de caracterização da dispersão sólida.

Foram usadas a difração de raio-X e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, para avaliação apenas da formulação NYS DS G2 (49). Os resultados obtidos por esses métodos corroboraram com aqueles dos ensaios realizados anteriormente. Isso confirmou que foi possível a obtenção de dispersão sólida de NYS com maior solubilidade que o próprio fármaco.

Por fim, foi ponderada a avaliação da permeabilidade da NYS nesse sistema, já que o aumento da solubilidade pode levar a um aumento consequente da permeabilidade. Esse ponto é relevante, pois a NYS deve permanecer na cavidade oral para exercer seu efeito terapêutico, além de conhecido efeitos adversos graves quando este antifúngico é absorvido. Para essa questão, foi escolhida a técnica de permeabilidade em membrana paralela, denominada como PAMPA. Este, por sua vez, é um método *in vitro* para avaliação da permeabilidade, o que não necessita de aprovação em comitês de ética de ensaios em animais, como em outras metodologias, e também é um ensaio rápido e robusto, de prévio conhecimento de nosso grupo de pesquisa. A NYS na forma de NYS DS G2 (49) apresentou permeabilidade semelhante ao fármaco puro, o que permitiu concluir que, apesar do aumento da solubilidade, não se observou o aumento da permeabilidade.

Desse modo, o objetivo de obtenção de uma dispersão sólida de NYS com maior solubilidade foi alcançado e demonstrado mediante aos resultados apresentadas.

## 5.2 Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos Orais de NYS DS

### 5.2.1 Seleção da Base para os Géis Mucoadesivos Orais de NYS DS

Inicialmente, foram idealizadas 14 formulações de géis base, contendo carbopol<sup>®</sup>, noveon<sup>®</sup> ou uma mistura dos 2 agentes gelificantes. Foram obtidos 14 géis base mucoadesivos, como descrito no item 4.2.2.2. Na Figura 51 estão ilustrados os géis base.

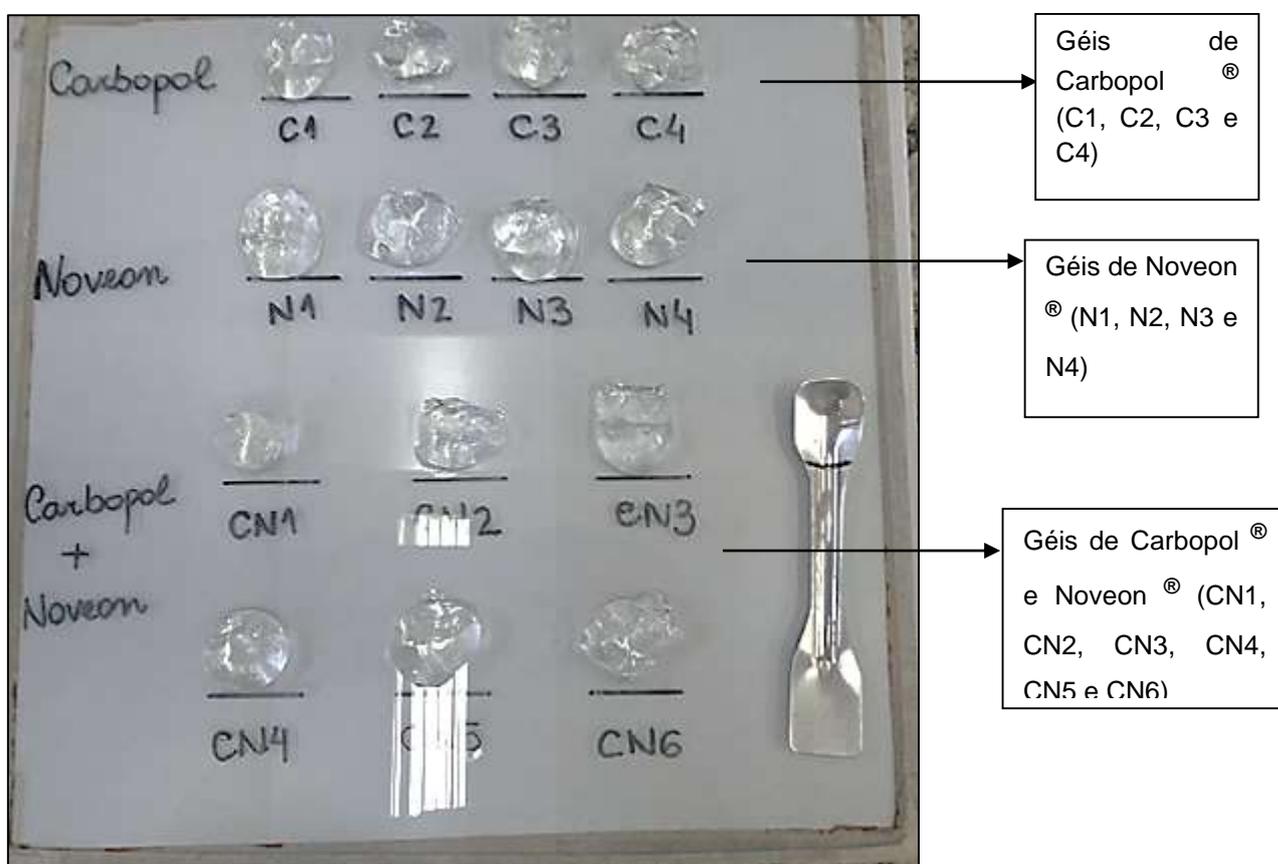


Figura 51 – Fotografia de uma porção, retirada com a espátula, dos géis base de carbopol<sup>®</sup> (na primeira fileira), de noveon<sup>®</sup> (na segunda fileira) e de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup> (nas terceiras e quarta fileiras).

Legenda: Cada gel foi colocado de acordo com a denominação recebida em ordem crescente (de acordo com a numeração).

## 5.2.2 Caracterização dos Géis Bases

### 5.2.2.1 Ensaio Sensoriais e pH

As Tabelas 16 e 17 reúnem os resultados obtidos na avaliação das propriedades sensoriais dos géis base de carbopol<sup>®</sup>, noveon<sup>®</sup> e a mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup> e a aferição do pH. É válido salientar que os dados obtidos das características sensoriais foram empíricos e comparativos entre os 3 grupos de géis, e a temperatura foi de aproximadamente 25 °C.

Características Sensoriais	Géis de Carbopol <sup>®</sup>				Géis de Noveon <sup>®</sup>				Géis de Carbopol <sup>®</sup> e Noveon <sup>®</sup>					
	C1	C2	C3	C4	N1	N2	N3	N4	CN1	CN2	CN3	CN4	CN5	CN6
Adesão alta à espátula	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■
Adesão baixa à espátula					■									
Alta consistência	■	■	■	■										
Baixa consistência					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lavável em água	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Coloração: incolor e translúcido	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tabela 16 – Características sensoriais dos géis de carbopol<sup>®</sup>, noveon<sup>®</sup> e a mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup>.

	Géis de Carbopol <sup>®</sup>				Géis de Noveon <sup>®</sup>				Géis de Carbopol <sup>®</sup> e Noveon <sup>®</sup>					
	C1	C2	C3	C4	N1	N2	N3	N4*	CN1	CN2	CN3	CN4	CN5	CN6
<b>Valores de pH</b>	6,10	6,15	6,70	6,50	6,80	6,00	6,50	---	6,20	6,31	5,8	5,9	6,12	7,00

Tabela 17 – Valores de pH dos géis de carbopol<sup>®</sup>, noveon<sup>®</sup> e a mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup>. \* Não foi possível medir o pH.

De acordo com os dados obtidos da avaliação das propriedades sensoriais, pode-se verificar que os géis base de carbopol<sup>®</sup>, as preparações C2, C3 e C4 apresentaram: alta adesão à espátula, alta consistência, laváveis em água, e incolores. Com exceção do Gel C1, que teve baixa aderência à mucosa oral, isso pode ser indicativo da concentração mais baixa de polímero.

Já os géis base de noveon<sup>®</sup> demonstraram: alta adesão à espátula baixa consistência, laváveis em água, e incolores. No entanto, o Gel N1 apresentou baixa aderência à espátula.

Por fim, os géis base de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup> (CN1, CN2, CN3, CN4, CN5 e CN6) apresentaram as seguintes características: alta adesão à espátula, baixa consistência, laváveis em água e incolores.

Em relação à aferição do pH, os valores variaram entre 5,80 e 7,00. Os valores de pH estão dentro da faixa de pKa da NYS; 3,62 e 9,11; o que é relevante em não influenciar à ionização do fármaco e também essa faixa é compatível com ambiente oral. Todavia, foi possível medir o pH do Gel N4. Quando o eletrodo foi colocado no gel, foi visualizada grande oscilação, impossibilitando uma aferição confiável. Provavelmente, essa situação ocorreu devido à alta viscosidade desse gel.

### 5.2.2.2 Caracterização Reológica dos Géis Base

A caracterização reológica dos géis base de carbopol<sup>®</sup> (C1, C2, C3 e C4), noveon<sup>®</sup> (N1, N2, N3 e N4) e da mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup> (CN1, CN2, CN3, CN4, CN5 e CN6) consistiu na avaliação da influência dos polímeros usados, suas concentrações e em função da temperatura, já que os ensaios foram realizados a 25°C (temperatura ambiente/armazenamento) e 37°C (temperatura corporal). Nas Figuras 52, 54 e 56 estão representadas as curvas de viscosidade aparente dos géis base e na Tabela 18 estão descritos os valores de viscosidade. Nas Figuras 53, 55 e 57 estão demonstrados os reogramas dos géis base.

A avaliação do comportamento reológico de uma forma farmacêutica semi-sólida, de uso local (na mucosa oral) e mucoadesiva se fez importante, pois sua característica poderia implicar na administração dos géis. Isso porque na cavidade oral ocorrem mecanismos fisiológicos de remoção e limpeza, como a capacidade de lavagem promovida pela saliva. Dessa maneira, as formas mucoadesivas podem ser

lavadas, o que resultaria em tempo de retenção de duração insuficiente e, conseqüentemente, uma diminuição das concentrações do fármaco, abaixo dos níveis terapêuticos (PADERNI et al., 2012).

Inicialmente, foram verificados os géis de carbopol<sup>®</sup>, que demonstraram uma faixa de viscosidade entre 13100 e 48,3 Pa.s, a 25 °C. A viscosidade do Gel C1 variou entre 3510 e 48,3 Pa.s, e a do Gel C2 ficou entre 7840 e 109 Pa.s. No caso do Gel 3, a viscosidade variou entre 12500 e 103 Pa.s e, por fim, o Gel 4 obteve viscosidade entre 13100 e 177 Pa.s. Em todos os casos, foi observado que uma relação direta entre a viscosidade e a concentração do agente gelificante, ou seja, com o aumento da quantidade de carbopol<sup>®</sup>, também ocorreu o aumento da viscosidade. Por outro lado, quando foram observados os mesmos géis a 37 °C, o Gel C1 apresentou viscosidade entre 1590 e 53,1 Pa.s, o Gel C2 entre 7440 e 108 Pa.s, o Gel C3 entre 4900 e 103 Pa.s e Gel C4 entre 5870 e 138 Pa.s. Sendo assim, o Gel C1, que possuía menor concentração de carbopol<sup>®</sup>, apresentou menor viscosidade, porém, o Gel C2 apresentou maior viscosidade dentre as 4 formulações, apesar possuir apenas a segunda menor concentração de polímero.

Vale ressaltar que os géis de carbopol<sup>®</sup> apresentaram viscosidade alta em ambas as temperaturas testadas e ainda mais relevante à temperatura corporal. Além do comportamento reológico, os resultados das características sensoriais corroboram com esses aqui descritos. Esse grupo de géis possuem alta consistência e alta aderência à espátula (com exceção do Gel C1). Logo, a alta consistência que foi percebida empiricamente, foi observada na avaliação das propriedades viscoelásticas.

Quanto à análise dos reogramas dos géis de carbopol<sup>®</sup>, pode-se verificar que esses são fluídos não-newtonianos, de comportamento pseudoplástico. O comportamento não-newtoniano implica na mudança da viscosidade, de acordo com a tensão de cisalhamento. Portanto, os fluidos não-newtonianos não possuem uma viscosidade constante, mesmo com alteração da tensão de cisalhamento (AULTON, 2005; PRESTES et al., 2012). Esse resultado já era esperado, já que geralmente sistemas coloidais, como os géis, têm tal propriedade (AULTON, 2005).

Ainda quanto à característica pseudoplástica indica que a viscosidade aparente do sistema diminui, com o aumento da tensão de cisalhamento (AULTON, 2005; PRESTES et al., 2012). Como os géis de carbopol<sup>®</sup> são de material polimérico,

apresentam moléculas de cadeias longas e alto peso molecular e ocorre o entrelaçamento de suas cadeias com a água (solvente empregado). À medida que a tensão de cisalhamento aumenta, o emaranhado torna-se mais frouxo e se alinha na direção do fluxo, oferecendo menos resistência e, assim, diminuindo a viscosidade (AULTON, 2005). Nesse caso, isso pode ser de interesse farmacêutico, pois seria aplicada uma “força” no momento da administração do gel, reduzindo sua viscosidade, facilitando sua administração e com a retirada da “força”, a viscosidade aumentaria.

Tratando dos géis de noveon<sup>®</sup> a 25 °C, a viscosidade variou entre 4820 e 28,4 Pa.s. O Gel N1 teve a viscosidade entre 923 e 28,4 Pa.s. Já o Gel N2 apresentou, entre 1960 e 54,7 Pa.s e o Gel N3 teve variação entre 3720 e 81 Pa.s. E o Gel N4 apresentou, entre 4820 e 108 Pa.s. Também foi verificado que os géis de noveon<sup>®</sup> apresentaram uma relação entre a concentração do polímero e viscosidade, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi a viscosidade observada nos géis. A 37 °C, a viscosidade dos géis de noveon<sup>®</sup> variou entre 6010 e 40,7 Pa.s. O Gel N1 apresentou uma viscosidade entre 1210 e 42 Pa.s, o Gel N2 obteve variação entre 924 e 40,7 Pa.s, o Gel N3 demonstrou viscosidade entre 3230 e 130 Pa.s, e o Gel N4 variou a viscosidade entre 6010 e 93,5 Pa.s.

Por conseguinte, quando se comparava os dados de viscosidade dos géis de noveon<sup>®</sup> a 25 e 37 °C, percebeu-se também que Gel N1 apresentou viscosidade maior que Gel N2 a 37 °C, apesar de N1 possuir menor concentração de polímero que N2. Já ao analisar o Gel N3 a 37 °C, este apresentou viscosidade menor que o Gel N4, e isso era esperado, pois N3 apresentava concentração de noveon<sup>®</sup> menor que N4.

Igualmente, foi importante confrontar os resultados do comportamento reológico com os de análises sensoriais dos géis de noveon<sup>®</sup>. Esses possuem alta adesão à espátula (salvo o Gel N1) e baixa consistência. A baixa consistência notada de forma empírica foi confirmada com a variação de viscosidade, que foi mais baixa que os dados de viscosidade para os géis de carbopol<sup>®</sup>. E quanto à análise dos reogramas, também foi observado que os géis de noveon<sup>®</sup> apresentaram comportamento de fluidos não-newtonianos e pseudoplástico.

E finalmente, nos géis da mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup>, foi observada uma variação de viscosidade entre 1250 e 48,2 Pa.s a 25 °C; e 1390 e 61,1 Pa.s a 37°C. Nesse caso, a análise da viscosidade dos géis foi mais complexa, por haver diferenças

nas concentrações dos polímeros e da própria natureza de cada um. A 25 °C, o Gel CN5 apresentou uma variação de viscosidade mais baixa, entre 1250 e 51,8 Pa.s, mesmo apresentando uma concentração de 0,25 %p/p de carbopol<sup>®</sup> e 0,75 %p/p de noveon<sup>®</sup>, uma das quantidades mais altas de polímeros. Entretanto, a 25 °C a variação de viscosidade mais alta foi de 3380 a 74,7 Pa.s, referente ao Gel CN6, também de grande quantidade de polímeros (0,75 %p/p de carbopol<sup>®</sup> e 0,25 %p/p de noveon<sup>®</sup>). Já a 37 °C, as variações de viscosidade foram ainda mais difusas, quando foi pretendido relacioná-las às concentrações de polímeros. Ainda foi constada uma correlação da baixa consistência, observada através das análises sensoriais, com a baixa viscosidade dos géis da mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup>. Todavia, estes apresentaram alta adesão à espátula.

Por fim, os géis da mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup> também foram avaliadas, com emprego dos reogramas, como fluidos não-newtonianos e apresentaram comportamento pseudoplástico.

Isto posto, com base nos dados de viscosidade e das características sensoriais dos géis base, foram escolhidas as formulações contendo carbopol<sup>®</sup>. Isso porque as preparações com este agente gelificante demonstraram maior viscosidade, tanto a 25 °C, quanto 37 °C. Essa propriedade também foi percebida de modo empírico e confirmada na avaliação reológica. Além disso, os valores mais altos de viscosidade sugerem a possibilidade uma capacidade de adesão à mucosa oral mais efetiva. Em alguns trabalhos, são vistos resultados onde viscosidade influencia a propriedade mucoadesiva, ou seja, um sistema mais viscoso tende a interagir melhor com a mucosa, através de sua difusão na superfície mucosa (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005).

<b>Formulações</b>	<b>Variação da viscosidade (Pa.s) a 25 °C</b>	<b>Variação da viscosidade (Pa.s) a 37 °C</b>
<b>C1</b>	3510 – 48,3	1590 – 53,1
<b>C2</b>	7840 – 109	7440 – 108
<b>C3</b>	12500 – 103	4900 – 103
<b>C4</b>	13100 – 177	5870 – 138
<b>N1</b>	923 -28,4	1210 – 42
<b>N2</b>	1960 – 54,7	924 – 40,7
<b>N3</b>	3720 – 81	3230 – 130
<b>N4</b>	4820 – 108	6010 – 93,5
<b>CN1</b>	1760 – 48,2	1990 – 132
<b>CN2</b>	2220 – 73,9	2730 – 172
<b>CN3</b>	1960 – 68	2110 – 135
<b>CN4</b>	1850 – 73,9	2450 – 148
<b>CN5</b>	1250 – 51,8	2320 – 143
<b>CN6</b>	3380 – 74,7	1390 – 61,1

Tabela 18 – Valores da variação da viscosidade a 25 e 37 °C dos géis de carbopol<sup>®</sup>, noveon<sup>®</sup> e mistura de carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup>.

Figura 52 – Curvas de viscosidades de géis base de carbopol<sup>®</sup> (C1, C2, C3 e C4): (A) a 25 °C entre 0 e 1400 Pa.s; (B) 25 °C entre 0 a 500 Pa.s; (C) 37 °C entre 0 e 8000 Pa.s; (D) 37 °C entre 0 e 500 Pa.s.

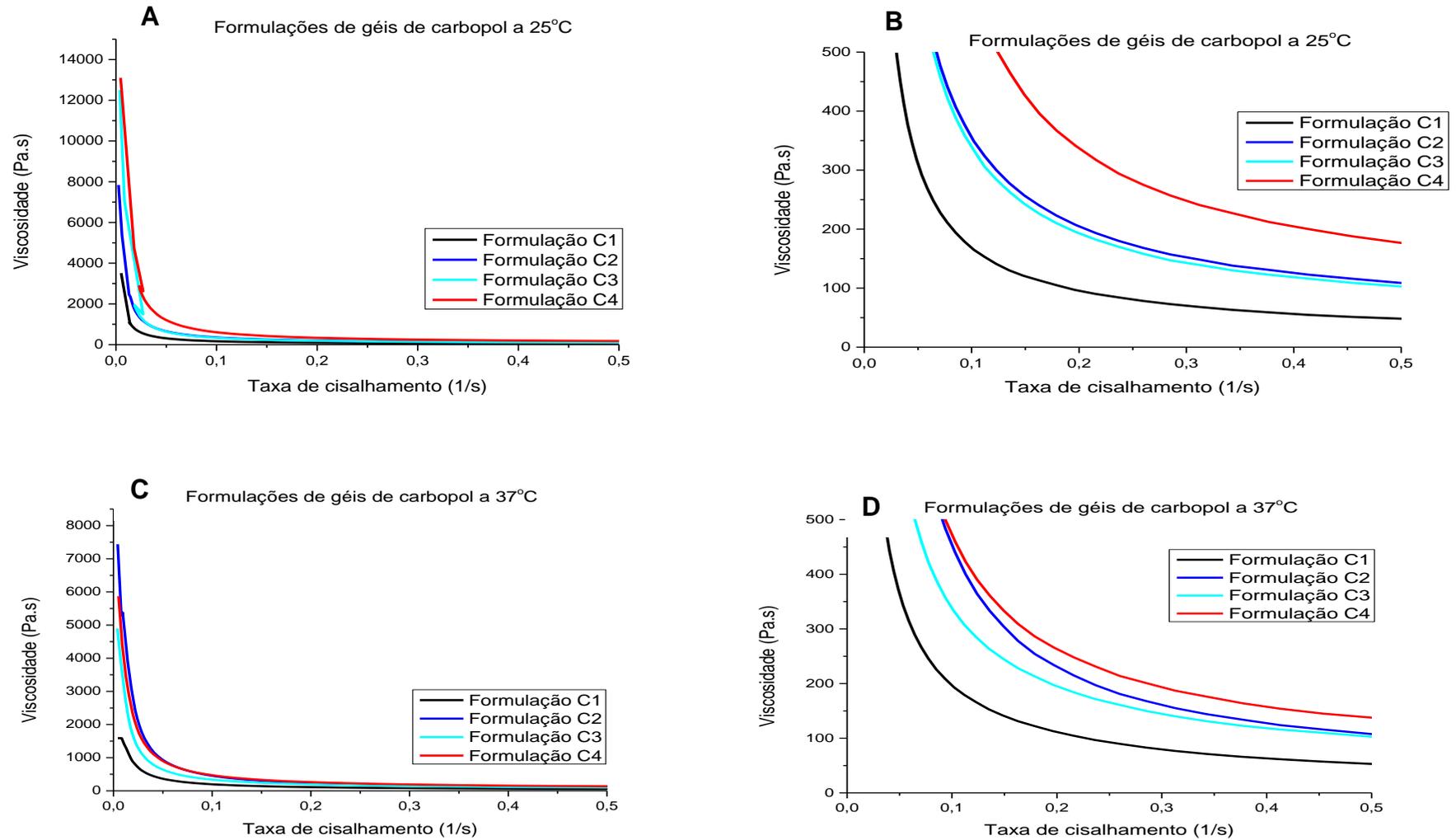


Figura 53 – Reogramas dos géis base de carbopol® (C1, C2, C3 e C4): (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.

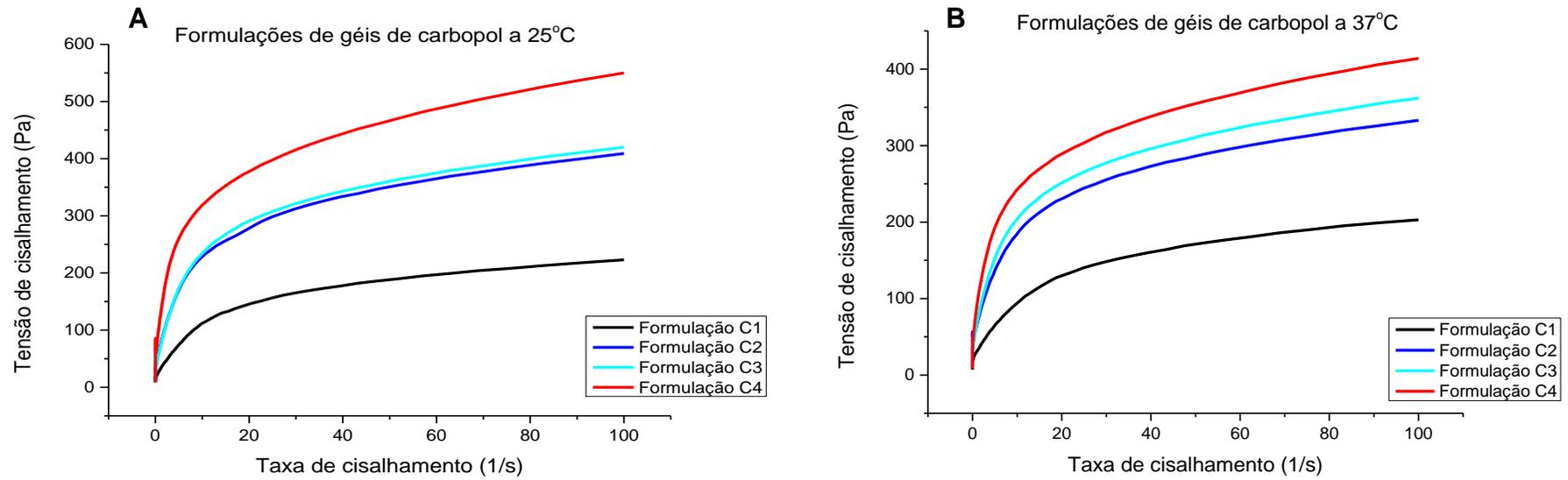


Figura 54 – Curvas de viscosidades de géis base de noveon<sup>®</sup> (N1, N2, N3 e N4): (A) 25 °C entre 0 e 5000 Pa.s; (B) 25 °C entre 0 e 500 Pa.s; (C) 37 °C entre 0 e 6000 Pa.s; (D) 37 °C entre 0 e 500 Pa.s.

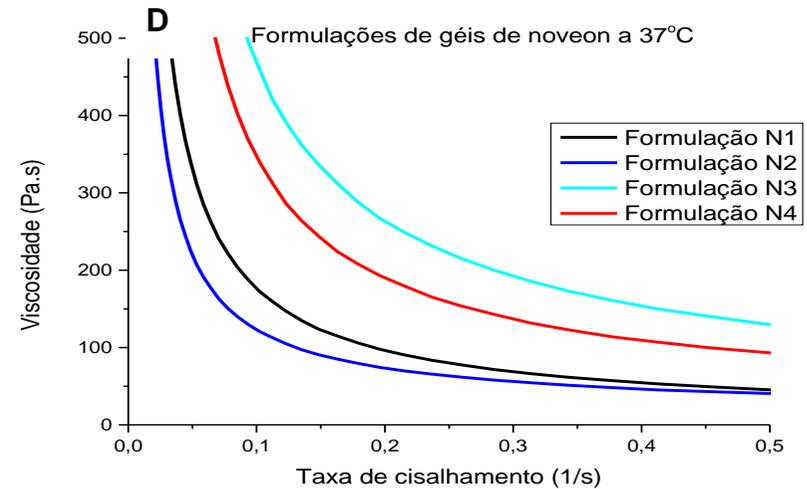
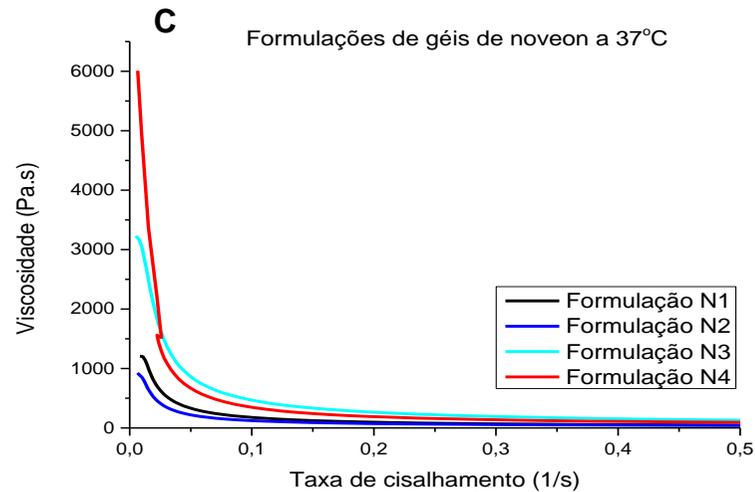
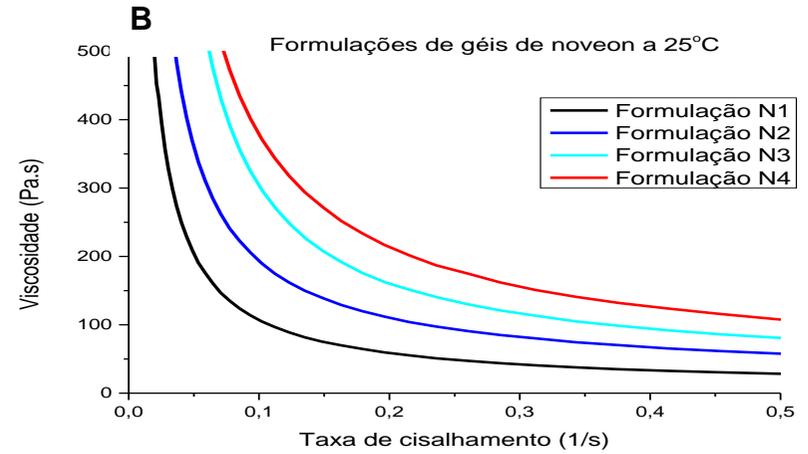
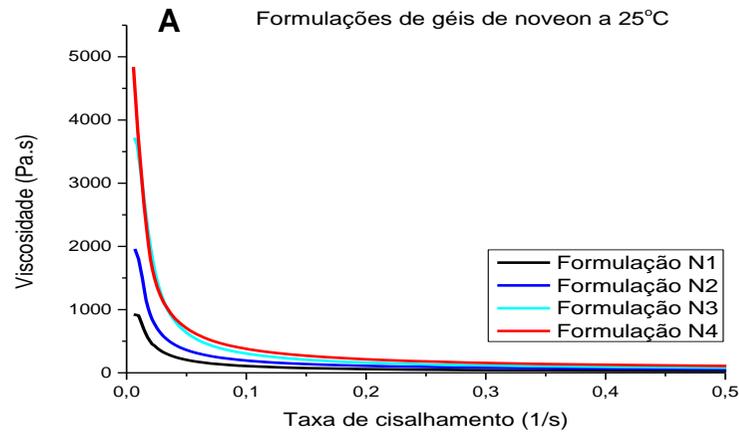


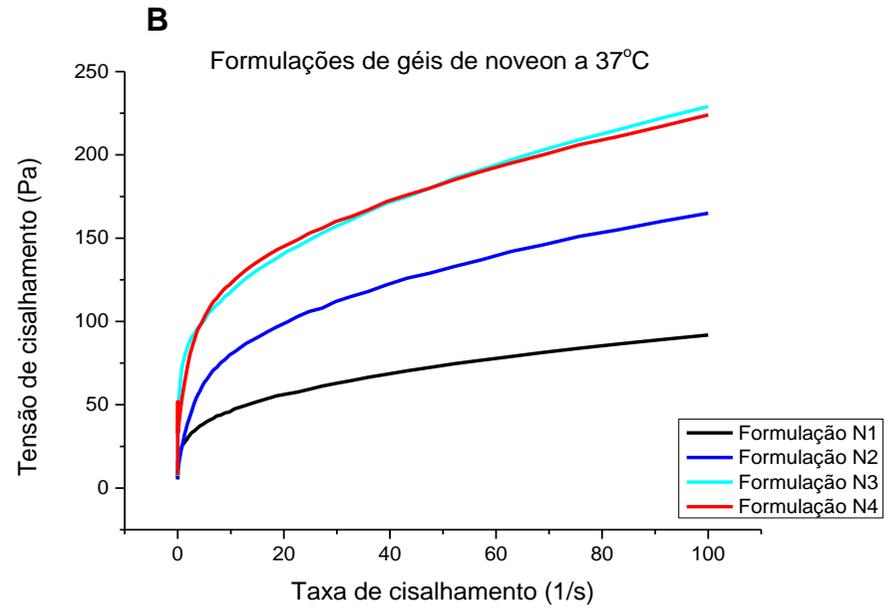
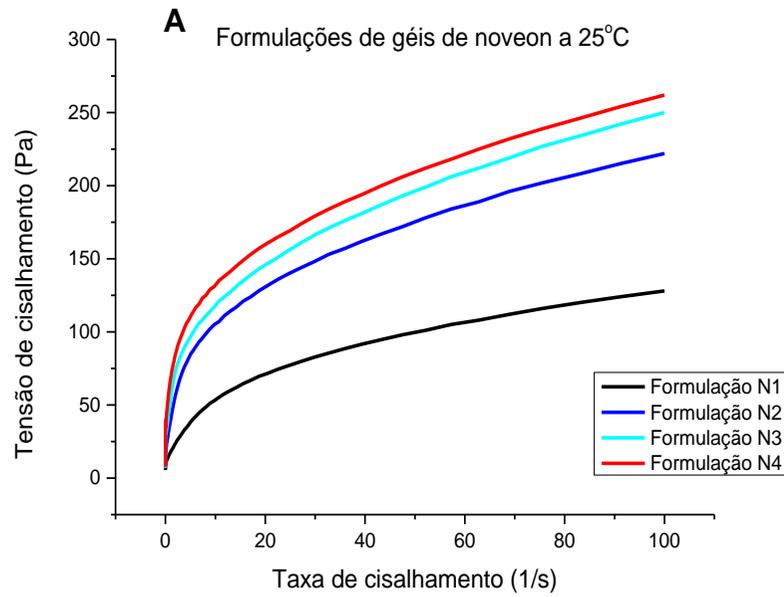
Figura 55 – Reogramas dos géis base de noveon<sup>®</sup> (N1, N2, N3 e N4): (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.

Figura 56 – Curvas de viscosidades de géis base de carbopol ® e noveon ® (CN1, CN2, CN3, CN4, CN5, CN6): (A) a 25 °C entre 0 e 3500 Pa.s; (B) a 25 °C entre 0 e 500 Pa.s; (C) a 37 °C entre 0 e 5000 Pa.s; (D) a 37 °C entre 0 e 500 Pa.s.

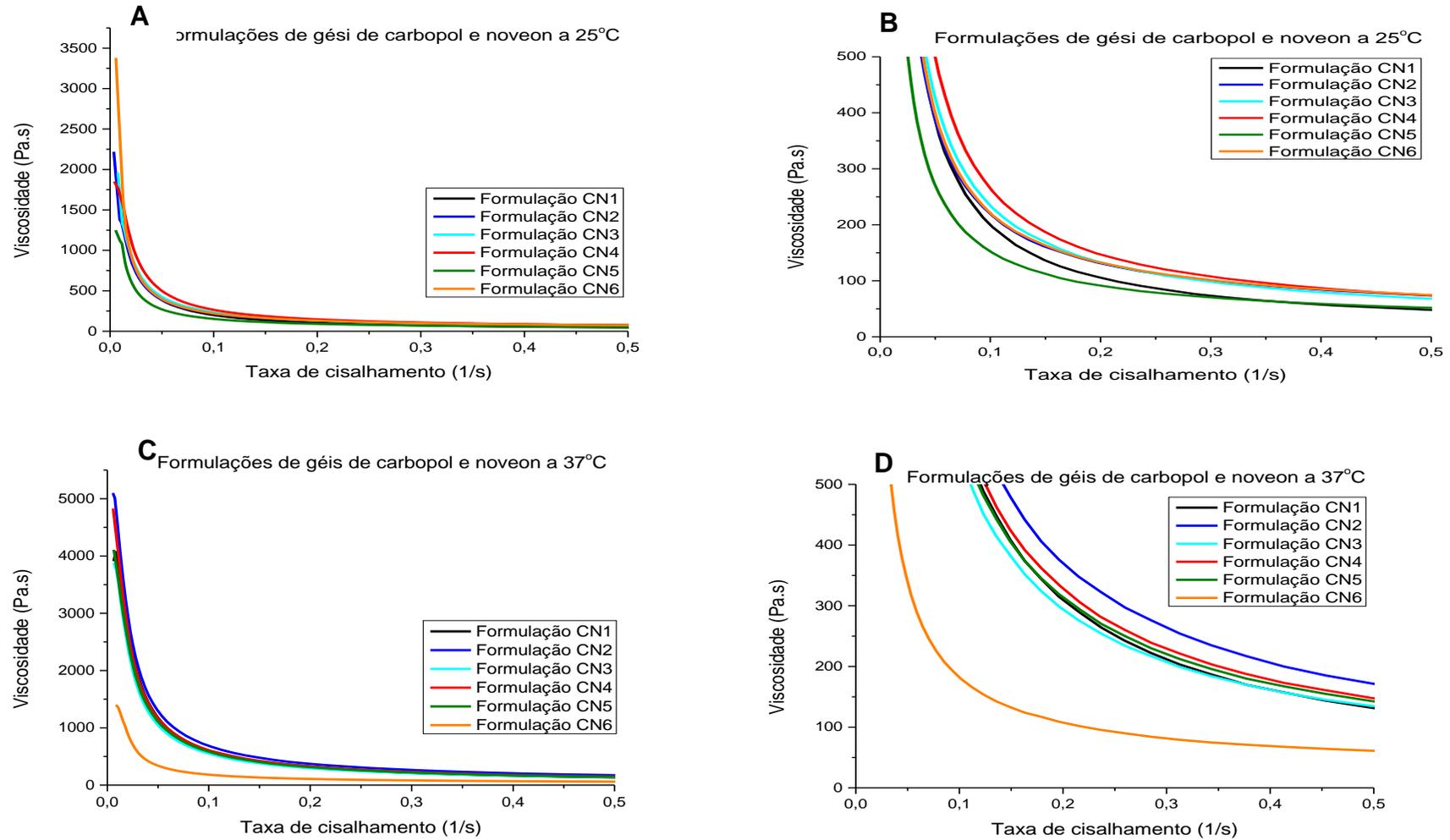
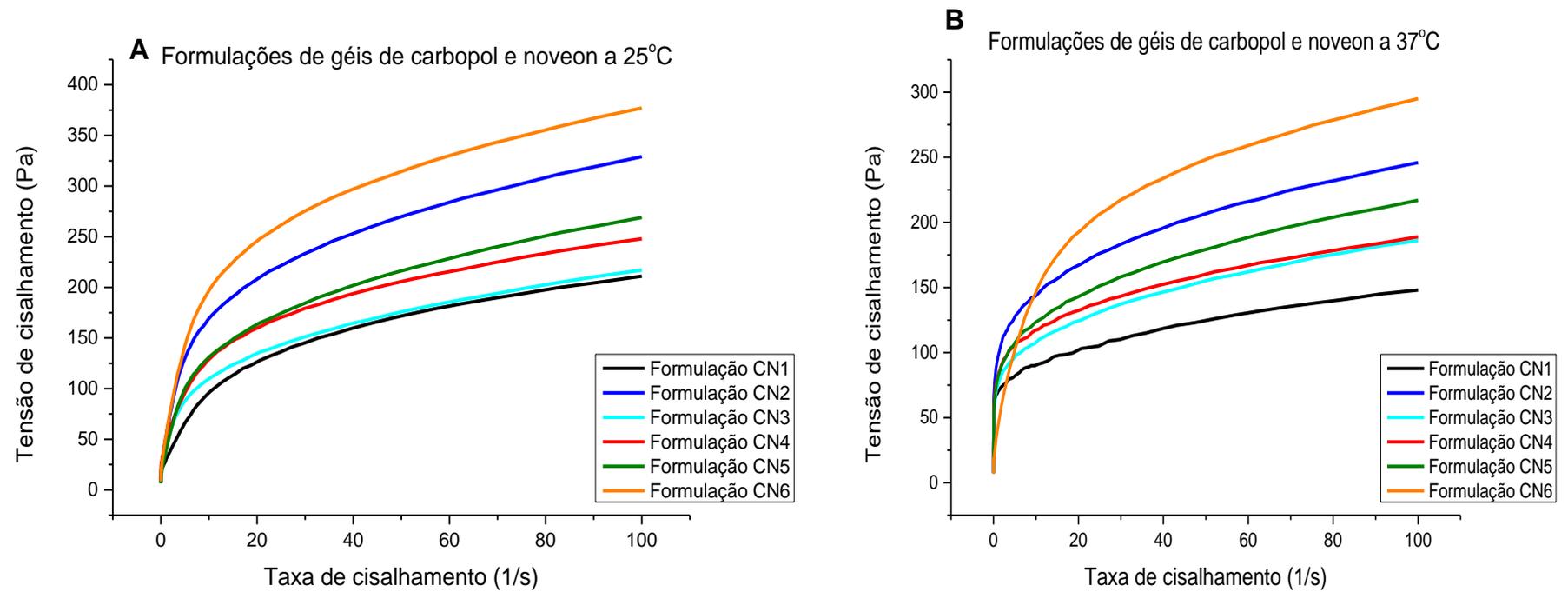


Figura 57 – Reogramas dos géis base de carbopol® e noveon® (CN1, CN2, CN3, CN4, CN5 e CN6): (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.



### 5.2.3 Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos NYS DS e NYS MP

#### 5.2.3.1 Obtenção dos Géis Mucoadesivos NYS DS e NYS MP

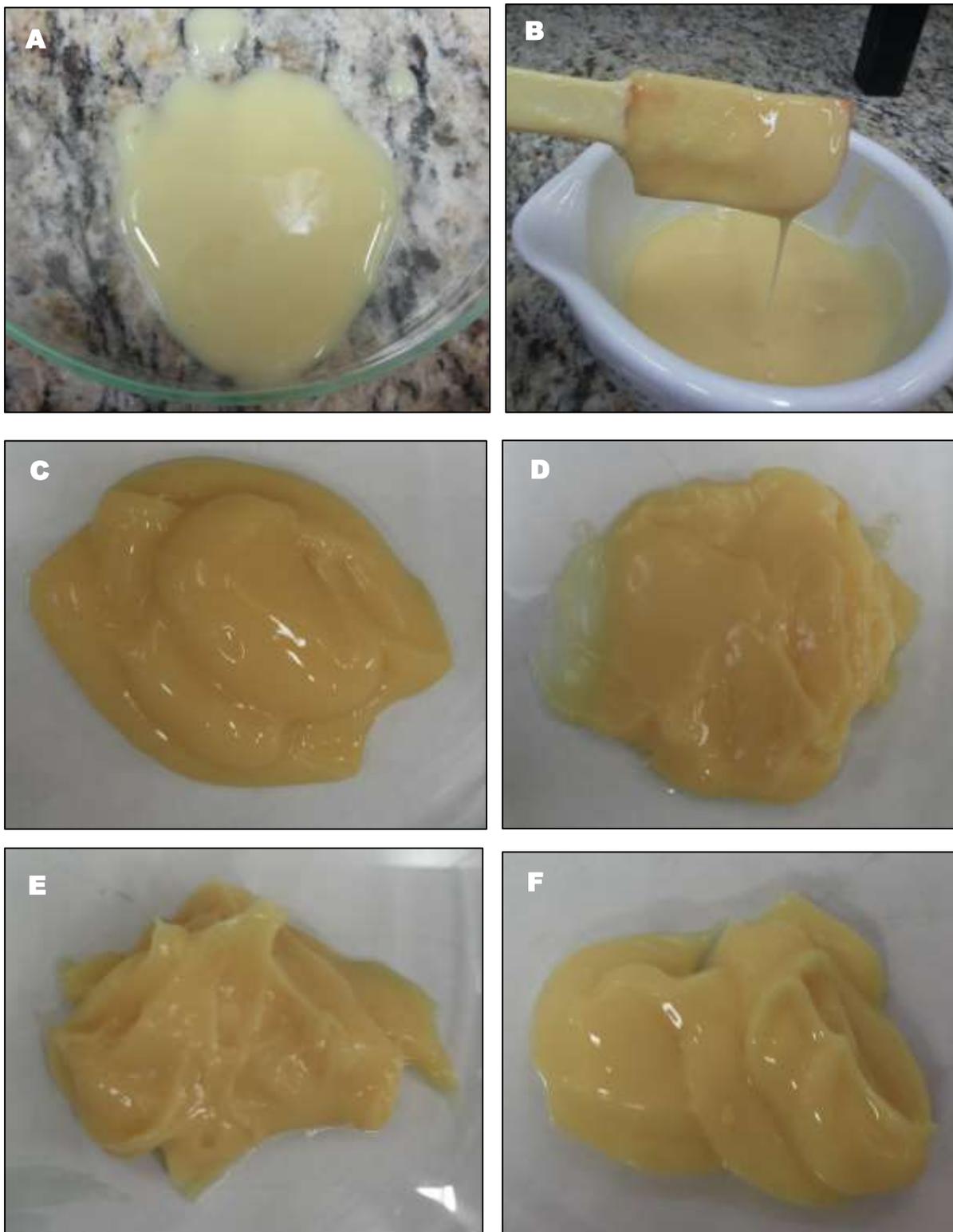
A partir dos resultados de caracterização dos géis base, foram eleitos os géis de carbopol<sup>®</sup> para a etapa seguinte: a preparação dos géis mucoadesivos orais contendo NYS DS G2 (49) e um gel contendo a NYS MP, a fim de comparação.

Portanto, foram preparadas as formulações Gel O e OO, referentes à NYS MP, e as formulações Gel A, B, C e D, referentes a NYS DS G2 (49). Além do fármaco e da base, foram empregados outros excipientes: sacarina (edulcorante), mentol (flavorizante) (GIL, BRANDÃO, 2007). Os géis foram preparados conforme descrito no item 4.2.3.2. Na Figura 58 são apresentadas fotografias desses géis.

Inicialmente, foram preparados o Gel O e Gel A. O primeiro continha NYS MP e gel base de carbopol<sup>®</sup> a 0,5 %p/p. O segundo foi preparada com NYS DS G2 (49) e também gel base de carbopol<sup>®</sup> a 0,5 %p/p. Em ambos os casos, após a adição da NYS, seja na forma de MP (Gel O) ou na forma de DS (Gel A), as formulações tornaram-se muito fluida, perdendo a característica de alta consistência que o gel base de carbopol<sup>®</sup> possuía. Faz-se necessário lembrar que o gel base de carbopol<sup>®</sup> a 0,5 %p/p foi o que apresentou menor viscosidade e baixa consistência nos ensaios sensoriais. Possivelmente esse gel não foi capaz de suportar a adição do fármaco e dos excipientes. Sendo assim, o Gel O foi descontinuado em nosso estudo. Por consequência, uma nova formulação foi preparada contendo NYS MP e gel base de carbopol<sup>®</sup> a 1,0 %p/p, produzindo, assim, o Gel OO.

Em seguida, foram preparados o Gel B, contendo NYS DS G2 (49) e gel de carbopol<sup>®</sup> a 1,0 % p/p; o Gel C, com NYS DS G2 (49) e gel de carbopol<sup>®</sup> a 1,5 % p/p; e Gel D, com NYS DS G2 (49) e gel de carbopol<sup>®</sup> a 2,0 % p/p. Essas formulações foram obtidas com sucesso, apresentando alta consistência.

Figura 58 – Fotografias dos géis OO, A, B, C e D. (A) Gel A, em placa de vidro. (B) Gel A em gral de porcelana, com uso de espátula flexível, que destacou a sua forma fluida. (C) Gel B. (D) Gel C. (E) Gel D (F) Gel OO.



### **5.2.3.2 Caracterização dos Géis Mucoadesivos NYS DS G2 (49) e NYS MP**

#### **5.2.3.2.1 Ensaio Sensoriais e pH**

Nas Tabelas 19 e 20 estão os resultados obtidos na avaliação das propriedades sensoriais dos géis mucoadesivos orais OO, A, B, C e D e os valores de pH. Os géis apresentaram adesão à espátula, alta consistência, laváveis em água e coloração amarela. Com exceção do Gel A, que apresentou baixa adesão à espátula e baixa consistência. Os valores de pH das formulações variam entre 5,99 e 6,70, compatível com a mucosa oral, na faixa de pKa da NYS.

<b>Características Sensoriais</b>	<b>Gel OO</b>	<b>Gel A</b>	<b>Gel B</b>	<b>Gel C</b>	<b>Gel D</b>
Adesão alta à espátula					
Adesão baixa à espátula					
Alta consistência					
Baixa consistência					
Lavável em água					
Coloração: amarelo e opaco					

Tabela 19 – Características sensoriais dos géis OO, A, B, C e D.

	<b>Gel OO</b>	<b>Gel A</b>	<b>Gel B</b>	<b>Gel C</b>	<b>Gel D</b>
<b>Valores de pH</b>	6,17	6,70	5,54	7,43	5,99

Tabela 20 – Valores de pH dos géis OO, A, B, C e D.

### 5.2.3.2.2 Caracterização Reológica

A caracterização reológica dos géis de NYS MP (gel OO) e de NYS DS G2 (49) (géis A, B, C e D) consistiu em avaliar o impacto da concentração de carbopol<sup>®</sup> no comportamento reológico dos géis mucoadesivos orais e em função da temperatura. Anteriormente, foi avaliado o comportamento reológico dos géis de carbopol<sup>®</sup> nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0. Todavia, nesse ensaio foi verificar se a presença de NYS poderia alterar ou não a viscosidade dos géis. Na Figura 59 estão representadas as curvas de viscosidade aparente dos géis base e na Figura 60 estão demonstrados os reogramas dos géis base.

Inicialmente, foram verificados os géis mucoadesivos a 25 °C, que demonstraram uma faixa de viscosidade entre 13.500 e 0,42 Pa.s. Foi observado que todos os géis apresentaram uma proporcionalidade entre a concentração de carbopol<sup>®</sup> e a viscosidade, ou seja, quanto maior a concentração de carbopol<sup>®</sup> nos géis, maior sua viscosidade. Paralelamente, o mesmo comportamento foi visto para os géis mucoadesivos a 37 °C, onde foi observado uma variação de viscosidade entre 10.900 e 0,39 Pa.s, Esse resultado é interessante e pertinente, pois mesmo com a variação da temperatura não houve diminuição da viscosidade.

Na análise dos reogramas dos géis mucoadesivos, foi verificado que os Géis A e B, que possuem menores concentrações de carbopol<sup>®</sup>, apresentaram um comportamento indicativo de fluido newtoniano: com o aumento da taxa de cisalhamento não interfere na viscosidade do fluido. O mesmo ocorre com a água, reconhecidamente um fluido newtoniano (AULTON, 2005). No entanto, os demais géis (OO, C e D) com concentrações de carbopol<sup>®</sup> entre 1,0 e 2,0%, se mostraram de comportamento pseudoplástico, o que favorece sua espalhabilidade sobre o local de administração e ainda sua retirada da embalagem primaria, pois quando o paciente aplica uma “força”, isto é, aumento da taxa de cisalhamento, ocorre uma diminuição da viscosidade, o que facilita esses processos (AULTON, 2005).

Sendo assim, os Géis C e D demonstraram mais adequados como preparações semi-sólidas mucoadesivas orais, quando observado o comportamento reológico.

Figura 59 – Curvas de viscosidades de géis OO, A, B, C e D: (A) 25 °C entre 0 e 14000 Pa.s; (B) 25 °C entre 0 e 500 Pa.s. (C) 37 °C entre 0 e 14000 Pa.s; (D) 37 °C entre 0 e 500 Pa.s.

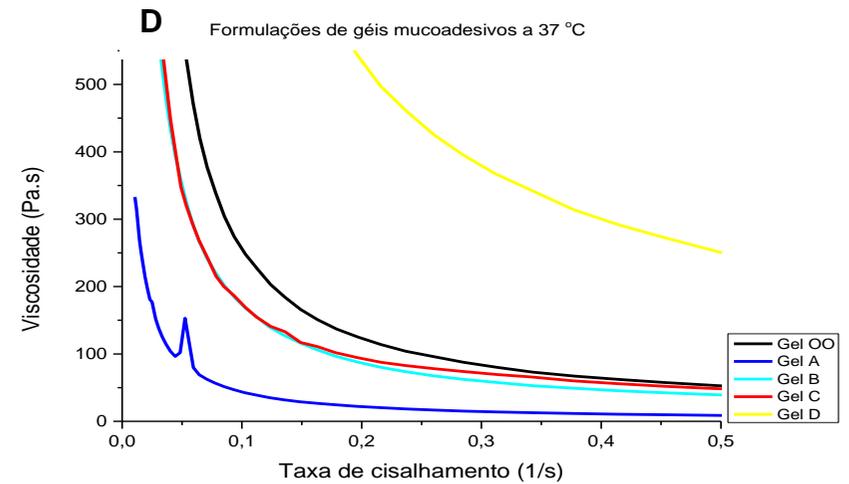
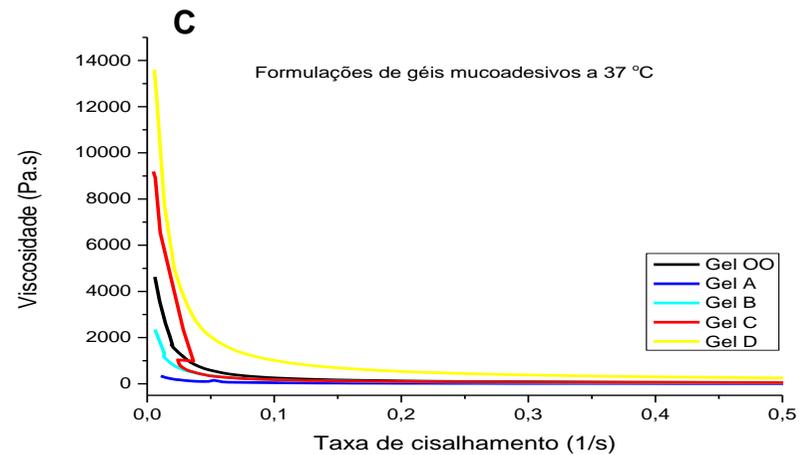
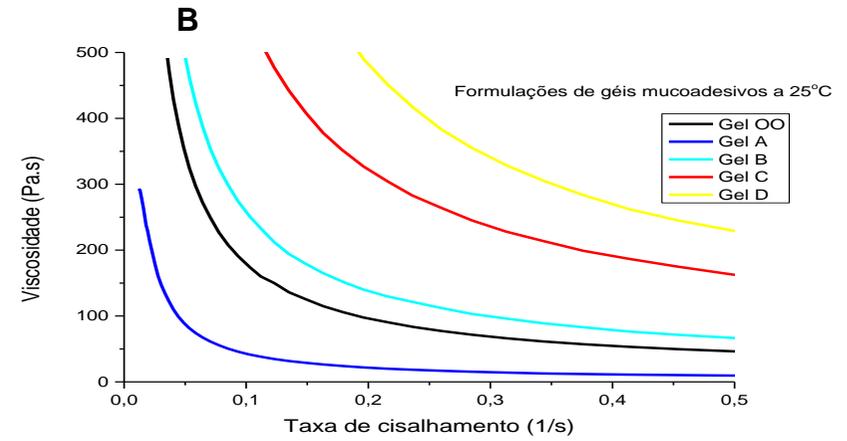
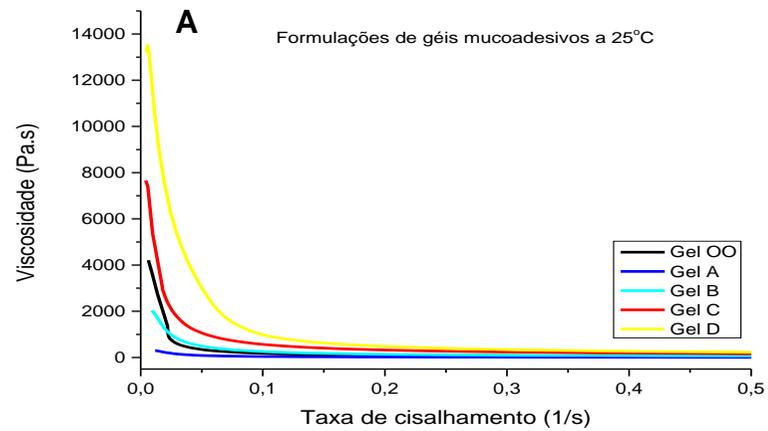
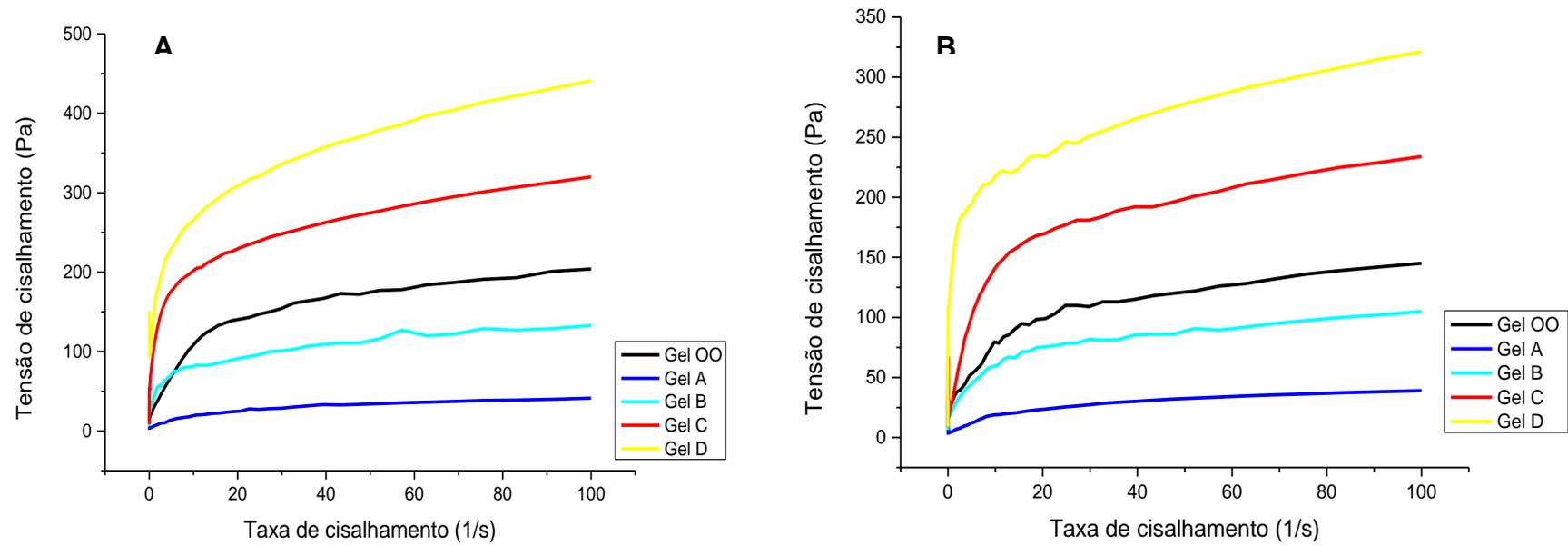


Figura 60 – Reogramas dos géis base de géis OO, A, B, C e D: (A) a 25 °C e (B) a 37 °C.



### 5.2.3.2.3 Avaliação da Liberação de NYS contida nos Géis Mucoadesivos

Os resultados do ensaio de liberação estão apresentados na Figura 61. Esse ensaio foi realizado de forma preliminar, para verificar a influência da viscosidade sobre a liberação de NYS, a partir dos géis mucoadesivos, já que foram preparadas cinco 5 formulações de géis. Por essa razão, foi realizado um ensaio relativamente curto, de 60 min, em pH 7,0 (pH normal da cavidade oral), assim como no trabalho de Ricci e colaboradores (2005), que também realizou um ensaio de liberação curto, de cerca de 20 min, a partir de géis de poloxamer 407 para liberação controlada. Todavia, em outros trabalhos, a avaliação de liberação de fármacos a partir de formulações semi-sólidas com emprego de célula de difusão tem sido realizada por 4 a 6 horas, mesmo para preparações orais (BABY, 2007; DJEKIC et al., 2015).

Quando se observa a Figura 62, pode-se inferir que a liberação de NYS nos quatro géis contendo NYS DS G2 (49) não apresentou diferença entre elas, já que os perfis de liberação estão bem próximos uns dos outros. Embora, no intervalo entre 50 e 60 min, foi notado um leve declínio na liberação de NYS para o Gel D, e no caso do Gel C foi visto uma constância na liberação. Esses resultados podem ser indicativos que no Gel D, a NYS pode ter uma diminuição de sua liberação com passar do tempo, mas seria mais apropriado que o esse ensaio fosse realizado em um intervalo de tempo maior, para ratificar esse comportamento. Dessa forma, não é prudente afirmar que a liberação do fármaco nesse gel tende a diminuir.

Entretanto, quando se observa o Gel OO, que contém NYS MP, e os Géis A, B, C e D, que contêm NYS DS G2 (49), fica evidente que os géis com a NYS na forma de dispersão sólida apresentam a liberação do fármaco muito superior quando confrontada à liberação a partir do gel com NYS na forma de matéria-prima. Isso pode ser que o aumento da solubilidade de NYS na forma de dispersão sólida, proporciona o aumento da dissolução da NYS na cavidade oral, e conseqüentemente, aumenta sua liberação. Dessa maneira, os resultados de liberação de NYS a partir dos géis mucoadesivos corroboram com a hipótese de que o aumento da solubilidade levaria ao aumento da disponibilidade da NYS na cavidade bucal, e o que foi confirmado pela avaliação de sua liberação.

Essa relação de aumento da solubilidade e aumento da liberação de fármaco também foi observada em um trabalho realizado por Madsen e colaboradores (2015),

onde foram preparadas matrizes de poli(ácido-lático-co-ácido-glicólico) (PLGA) contendo albumina bovina. Eles observaram que a albumina quando solubilizada em determinados solventes, onde sua solubilidade era maior, e depois incorporada às matrizes, sua liberação era maior.

Quanto à viscosidade, alguns autores relatam uma relação inversamente proporcional entre a viscosidade e a liberação de fármacos, ou seja, o aumento da viscosidade acarretaria na diminuição da liberação de fármacos e por essa razão foram preparadas os Géis A, B, C e D do presente estudo, contendo concentrações diferentes de carbopol<sup>®</sup>, com objetivo de verificar essa evidência (BETTINI et al., 1994; RICCI et al., 2005). Esse é o caso do estudo promovido por Ricci e colaboradores (2005), no qual foram preparados 3 géis de lidocaína e poloxamer 407, nas concentrações de 20, 25 e 30 % p/p de agente gelificante. Foi observado por esses pesquisadores que o aumento da viscosidade, teve o menor perfil de liberação de lidocaína, como observado na liberação a partir da formulação contendo 30 %p/p do polímero.

No entanto, quando se observa os resultados de liberação de NYS a partir dos Géis A, B, C e D, todos contendo NYS DS G2 (49) e gel base de carbopol<sup>®</sup> em diferentes concentrações, onde o Gel A contém a concentração mais baixa, e o Gel D, a mais alta, não ficou evidente diferença da liberação de NYS. Em todos os géis, os perfis de liberação do fármaco estão muito próximos, apesar do comportamento reológico dos mesmos géis terem sido distintos. O gel A foi o que se mostrou com menor viscosidade, enquanto o gel D apresentou maior viscosidade. Porém o aumento da viscosidade não impactou na liberação de NYS. Então, no caso do presente estudo, a viscosidade dos géis preparados com carbopol<sup>®</sup> não influenciou na liberação de NYS. Esse resultado corrobora com os de outros autores, que também não demonstraram essa relação entre viscosidade e liberação de fármacos (REPPAS et al., 1998).

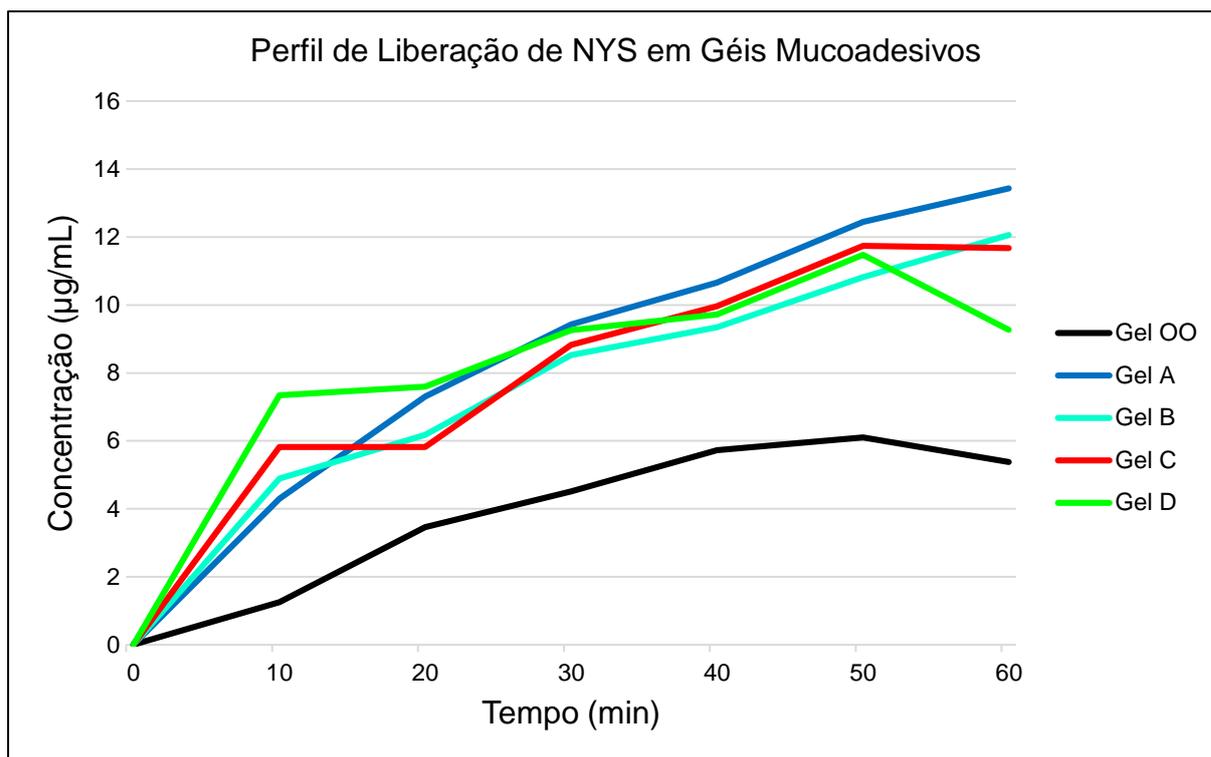


Figura 61 – Perfis de liberação de NYS a partir de géis mucoadesivos.

#### 5.2.3.2.4 Teor de NYS contida nos Géis Mucoadesivos

O teor de NYS foi mensurado para as formulações de Gel OO, A, B, C e D, descrito na Tabela 21. Os valores variam entre  $80,81 \pm 1,11$  a  $95,11 \pm 0,125$ . Os resultados demonstraram que a concentração de NYS presente nos géis foi relativamente alta. Todavia os valores de teor são mais baixos àqueles preconizados nos ensaios de teor encontrados na Farmacopeia Brasileira (2010).

Formulação	Teor de NYS (%)
Gel OO	$95,11 \pm 0,125$
Gel A	$86,23 \pm 0,245$
Gel B	$80,81 \pm 1,11$
Gel C	$82,03 \pm 0,318$
Gel D	$81,95 \pm 0,118$

Tabela 21 – Teor de NYS contida nos géis mucoadesivos orais OO, A, B, C e D.

### 5.2.3.2.5 Avaliação da Mucoadesão dos Géis

A força de destacamento é aquela necessária para romper a ligação entre a formulação e a mucosa, num determinado período de tempo (JONES et al., 1997). O trabalho de mucoadesão é aquele necessário para o rompimento entre a interação do sistema mucoadesivo e a mucosa (SUDHAKAR, KUOTSU, BANDYOPADHYAY, 2006).

Na Tabela 22, estão demonstrados os resultados da força de deslocamento (N) e do trabalho de mucoadesão (N.mm) dos géis OO, A, B, C e D. Os géis apresentaram força de destacamento entre 0,0533 e 0,086 N; e trabalho de mucoadesão entre 0,031 e 0,138 N.mm. Ao observar os resultados de ambos os parâmetros, foi visto que há não diferença entre eles, apesar dos géis terem sido produzidos com quantidades diferentes de carbopol<sup>®</sup>. Após a análise estatística desses dados, ratifica-se que não houve diferença significativa entre eles. No entanto, os géis apresentaram a capacidade de aderir à mucosa oral, já que apresentaram resultados compatíveis aos encontrados por Nunes (2012), que avaliou formulações contendo de monolinoleato de glicerila e cremophor<sup>®</sup>, e os considerou com propriedades mucoadesivas. Todavia, quando se observa o trabalho de Jones e colaboradores (1997), que preparou géis de carbopol<sup>®</sup> e policabofril, formulações mais semelhantes às desenvolvidas no presente estudo, observa-se que os resultados de força de destacamento e trabalho de mucoadesão foram bem maiores, variando entre 0,17 e 0,31 N; e 44,3 e 89,5 N.mm, quando comparados ao presente trabalho.

Diante dos resultados de mucoadesão, pode-se concluir que a força de destacamento e o trabalho de mucoadesão não foram diferentes entre os géis mucoadesivos orais contendo NYS (seja na forma NYS MP ou NYS DS). Com isso pode-se concluir que os géis apresentaram a propriedade de mucoadesão, porém não houve diferença desse parâmetro entre as formulações. Sabendo que os géis apresentavam concentrações variadas de carbopol<sup>®</sup>, ou seja, o Gel OO possuía 1,0 % p/p, enquanto o Gel A, 0,5; o Gel B 1,0; o Gel C, 1,5; e Gel D 2,0% p/p; e baseado na literatura científica que em geral sugere, em alguns casos, o aumento da concentração do polímero de propriedade mucoadesiva, pode levar ao aumento da mucoadesão, por haver maior possibilidade de interpenetração do polímero na mucosa (BAGAN et al., 2012; SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG, JOHNSTON, 2005). Assim,

uma outra relação que deveria ser avaliada seria o impacto da concentração de carbopol<sup>®</sup> frente à mucoadesão. No entanto, no presente estudo não foi vista esta relação entre a concentração do polímero e a propriedade de mucoadesão.

Formulações	Concentração de Carbopol <sup>®</sup> 934 P (% p/p)	Força de destacamento (N)	Trabalho de mucoadesão (N.mm)
Gel OO	1,0	0,076 ± 0,025	0,138 ± 0,052
Gel A	0,5	0,086 ± 0,019	0,0922 ± 0,028
Gel B	1,0	0,066 ± 0,021	0,123 ± 0,040
Gel C	1,5	0,068 ± 0,0044	0,125 ± 0,066
Gel D	2,0	0,0533 ± 0,015	0,031 ± 0,14

Tabela 22 – Força de mucoadesão e trabalho de mucoadesão dos géis OO, A, B, C e D.

Legenda: Cada valor corresponde à média (± desvio padrão), com n=5.

#### 5.2.3.2.6 Conclusão Parcial da Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos NYS DS e NYS MP

Perante os resultados apresentados neste item Obtenção e Caracterização dos Géis Mucoadesivos NYS DS e NYS MP, algumas observações podem ser realizadas.

Inicialmente, escolha do gel base que seria usado para preparo dos géis mucoadesivos contendo NYS MP e NYS DS foi de grande relevância. Dentre as bases disponíveis que eram compatíveis com a mucosa oral, pode-se citar o noveon<sup>®</sup> e carbopol<sup>®</sup>. Assim, um total de 14 formulações foram desenvolvidas com esses polímeros, empregando apenas noveon<sup>®</sup>, ou apenas carbopol<sup>®</sup>, ou misturas dos dois polímeros. A preparação dos géis foi realizada com a dispersão dos polímeros em água, e posterior ajuste o pH entre 6 e 7. Em seguida, a caracterização dos géis base foi realizada através do comportamento reológico, das características sensoriais e pH. Dentre as formulações agrupadas em três tipos: géis de noveon<sup>®</sup>, géis de carbopol<sup>®</sup> e géis de mistura de noveon<sup>®</sup> e carbopol<sup>®</sup>, os géis de carbopol<sup>®</sup> apresentaram propriedades sensoriais adequadas. Quanto ao comportamento reológico, esses também se mostram mais apropriados, já que foram os que apresentaram maior variação de viscosidade, tanto a 25°C, quanto a 37°C. E dessa maneira, os géis de carbopol<sup>®</sup> foram escolhidos para formarem a base dos géis mucoadesivos de NYS.

O desenvolvimento dos géis mucoadesivos de NYS foi realizado por meio da incorporação da NYS MP (no caso dos Géis O e OO) e NYS DS G2 (49) (no caso dos Géis A, B, C e D) nos géis base de carbopol<sup>®</sup>, além dos demais excipientes (sacarina, mentol e metilparabeno). Foram obtidos cinco géis, sendo o Gel O com característica muito fluída, semelhante a uma emulsão, o que não o caracterizava como uma forma farmacêutica semi-sólida, com finalidade comparativa.

A caracterização desses géis mucoadesivos foi realizada pela avaliação das características sensoriais, do comportamento reológico, da liberação de NYS a partir dos géis e da propriedade de mucoadesão. Em relação às características sensoriais, todas as formulações se mostram bem semelhantes.

Quanto ao comportamento reológico, o Gel A apresentou uma variação de viscosidade muito baixa em ambas as temperaturas, de aspecto fluído, o que poderia comprometer a mucoadesão. No entanto, quando avaliada essa propriedade, não houve diferença do Gel A, confrontado aos demais géis, assim como a liberação de NYS também se apresentou parecida aos outros géis. Ainda sobre o Gel A, quando se observou seu reograma, foi percebido um comportamento indicativo de fluxo newtoniano, ou seja, a variação da taxa de cisalhamento não interferiu na sua viscosidade. Esse resultado demonstrou-se inadequado para um gel mucoadesivo, porque espera-se que um comportamento pseudoplástico de formulações semi-sólidas.

Ao avaliar o Gel B, este apresentou uma variação de viscosidade maior que o Gel A, porém ainda mais baixa quanto aos Géis C e D, embora esse resultado também não tenha comprometido sua mucoadesão e a liberação de NYS foi semelhante aos outros géis. Somado a isso, seu reograma apresenta também um comportamento indicativo de fluído newtoniano, apresentando, então, as mesmas características inadequadas do Gel A.

Por outro lado, os Géis C e D se mostram com alta viscosidade, sendo o Gel D com viscosidade ainda maior que C, devido à concentração mais elevada de carbopol<sup>®</sup>. Ao avaliar seus reogramas, esses géis apresentaram comportamento pseudoplástico, o que é desejado para esse tipo de produto farmacêutico. Como relatado anteriormente, o aumento da viscosidade e da concentração do polímero não influenciaram na mucoadesão e na liberação de NYS, dos Géis C e D.

Em relação à avaliação da liberação de NYS a partir dos géis mucoadesivos, foi evidente que a os géis contendo a NYS DS G2 (49) apresentaram uma liberação bem maior, quando comparado ao gel que continha NYS MP. Isso pode ser explicado pelo aumento da solubilidade da NYS na forma de dispersão sólida, que possivelmente, aumentou sua dissolução e por fim, sua disponibilidade na cavidade oral. Dessa maneira, o desenvolvimento de NYS DS incorporada num sistema mucoadesivo se mostrou adequada, e resultou numa melhora da liberação de NYS, assim como a solubilidade NYS.

### **5.3 Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos**

#### **5.3.1 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por CLAE para a Quantificação de NYS MP**

A Farmacopeia Brasileira (2010) propõe o ensaio microbiológico para análise de teor da NYS. No entanto, esse ensaio dispense tempo: para o preparo adequado das placas de *Petri*, que devem conter 2 tipos de camadas (base e superior), para o crescimento do microrganismo, e para a medição dos halos de inibição e sua quantificação (AGUIAR et al., 2010. F. BRAS., 2010a). Além disso, é um método que pode apresentar baixa precisão, por conter diversas etapas e ser mais custoso (AGUIAR et al., 2010). Assim, considerando, o tempo maior de análise e o custo mais elevando da técnica microbiológica, foi escolhido o método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrofotometria de absorção no UV para a determinação do teor de NYS (WILSON et al., 2001).

De fato, o emprego do método por CLAE para a quantificação de NYS, em substituição ao método microbiológico é possível, de acordo com doseamento de NYS realizado com a primeira técnica. No item 5.1.1.2 deste trabalho, o teor de NYS por CLAE foi de 99,37%, enquanto o doseamento microbiológico foi de 95,04%. Esses são próximos, e corrobora com o uso da CLAE.

Inicialmente, as análises de NYS foram conduzidas nas condições descritas por Wilson e colaboradores (2001), uma vez que este estudo apresenta análises de NYS matéria-prima e em grande variedade de formas farmacêuticas (creme, pomada, pó, suspensão e comprimidos), indicando a robustez do método, além do mesmo ter sido validado (WILSON et al., 2001).

De acordo com trabalho de Wilson (2001), o tempo de corrida foi de aproximadamente 30 min, com uso de coluna de 250 mm de comprimento. Com esse tempo extenso, e uma coluna mais longa, que aumenta o tempo de corrida, foi adotada a fase estacionária de mesma composição, mas com comprimento de 150 mm. Tal mudança poderia levar a um tempo de corrida menor, o que resultaria em um método mais rápido, e com menor gasto de solventes orgânicos. Além disso, o trabalho relata o uso de uma coluna de 150 mm, porém os resultados não são apresentados, mas há indicação do uso da mesma (WILSON et al., 2001). Dessa forma, no presente trabalho, foi desenvolvido o método cromatográfico semelhante ao proposto por Wilson e colaboradores (2001), porém com modificações em relação a: fluxo, proporção de solventes da fase móvel, e tamanho da coluna.

As alterações foram feitas até que os cromatogramas encontrados fossem reprodutíveis, com tempos de retenção e áreas semelhantes. O método desenvolvido foi devidamente validado, como preconizado pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Assim, as demais condições cromatográficas foram mantidas, e os ensaios iniciais foram realizados, com uma solução de NYS na de concentração de 0,05 mg/mL (solvente: fase móvel), obtida a partir de uma solução-mãe, com concentração de 1,0 mg/mL (solvente: dimetilformamida). As condições do ensaio foram:

- Fluxo: 1,0 mL/min;
- Temperatura de forno: 30°C;
- Fase móvel: metanol:água:dimetilformamida (50+30+25, v/v/v)
- Detecção: espectrofotometria de absorção no ultravioleta (comprimento de onda de 305 nm);
- Coluna: C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm;
- Volume de injeção: 20 µL.

Primeiramente, nessas condições, foi obtido um tempo de corrida de aproximadamente 10 min, porém o pico principal encontrava-se com baixa resolução (largo), além do surgimento de 2 picos secundários menores, também relatados por Wilson e colaboradores (2001), que aumentaram o tempo de análise. Apesar da diminuição acentuada do tempo, ainda foram necessários ajustes de alguns pontos, como melhora da resolução do pico, por exemplo.

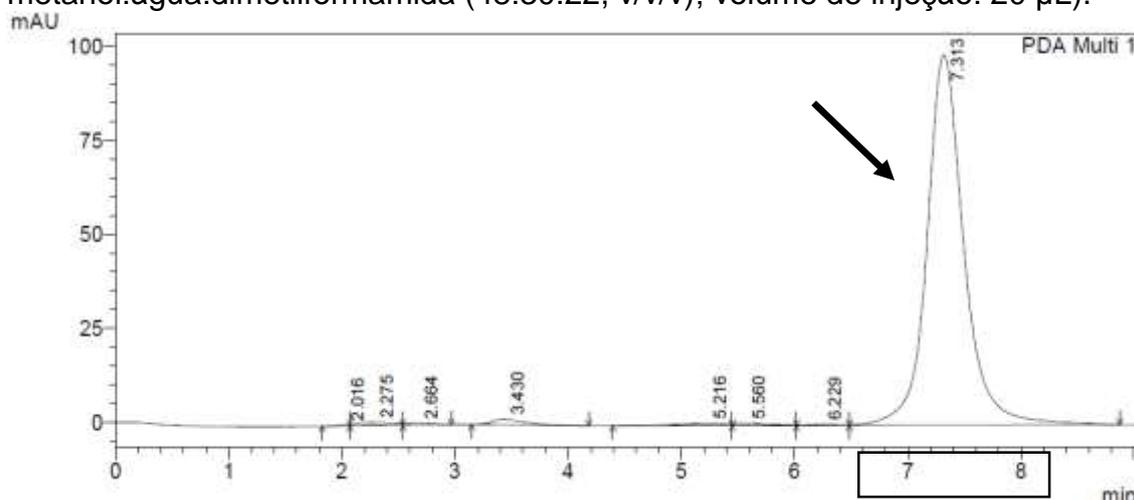
Assim, sucessivas modificações no fluxo e na composição da fase móvel (Tabela 23) foram propostas até que os cromatogramas encontrados fossem reprodutíveis, com tempos de retenção e áreas semelhantes.

<b>Ensaio</b>	<b>Fluxo (mL/min)</b>	<b>Fase móvel (metanol:água: dimetilformamida)</b>
1	0,8	55:30:15
2	1,0	65:20:15
3	1,0	60:25:15
4	1,0	55:30:15
5	0,9	55:30:15
6	0,9	53:30:17
7	0,9	51:30:19
8	0,9	48:30:22

Tabela 23 – Condições cromatográficas testadas de fluxo e fase móvel para o desenvolvimento do método analítico por CLAE.

O tempo de retenção do pico principal ficou entre 7 e 8 min e o tempo de corrida total foi de 9 min. Os picos secundários, observados anteriormente no presente trabalho e também citados por Wilson e colaboradores (2001), estavam presentes, porém com áreas bem menores, conforme ilustrado na Figura 62.

Figura 62 – Cromatograma de uma solução de NYS MP a 0,05 mg/mL (solvente fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Pico principal em 7,33 min e área de 2 239 485 mAU.min (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); volume de injeção: 20 µL).



A partir desse resultado, as condições cromatográficas foram mantidas e novas análises com soluções de concentrações de 0,10; 0,25; 0,50 e 0,75 mg/mL de NYS (padrão farmacopeico) foram realizadas, como ilustrado na Tabela 24. As condições que foram usadas e padronizadas estão descritas na Tabela 25. Então, a próxima etapa foi a validação deste método.

<b>Soluções de NYS MP (mg/mL)</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Área do pico principal (mAU.min)</b>
0,05	7,65	2 3642 99
0,10	7,38	14 289 487
0,25	6,85	23 16 1806
0,50	6,81	37 939 033
0,75	6,78	44 437 523

Tabela 24 – Tempo de retenção (minutos) e área de pico obtidos após as análises por CLAE. Os valores representam a média de 3 determinações.

Legenda: min: minutos.

<b>Condições Cromatográficas</b>	
Fluxo	0,9mL/min
Temperatura de forno	30°C
Fase móvel	metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v)
Deteção	espectrofotometria de absorção no ultravioleta (comprimento de onda de 305 nm)
Fase estacionária	Coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm
Volume de injeção	20 µL

Tabela 25 – Condições cromatográficas usadas no ensaio de doseamento de NYS MP por CLAE.

Os parâmetros cromatográficos foram estabelecidos mediante os resultados encontrados, semelhanças dos tempos e observância da proporcionalidade das áreas de acordo com concentração das soluções testadas.

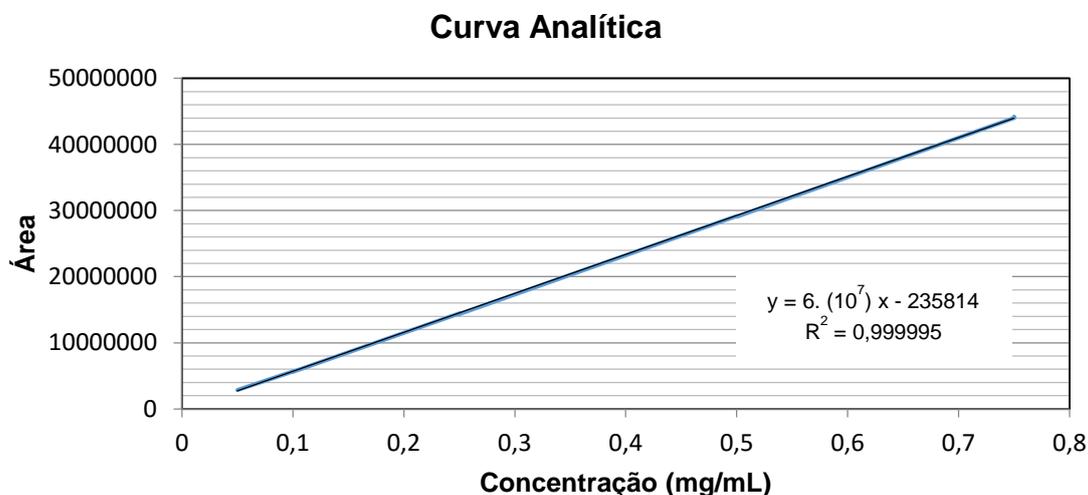
Portanto, a próxima etapa foi a validação do referente método, de acordo com a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 de 2003, avaliando os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e especificidade (BRASIL, 2003), descrita a seguir.

### 5.3.1.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

A análise da linearidade foi realizada empregando soluções padrão de NYS nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 0,75 mg/mL, preparadas conforme o item 4.2.3.1.1. A partir dos resultados das análises cromatográficas, em triplicata, a curva analítica foi obtida e partir desta foram determinados a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ). A Figura 63 apresenta a curva analítica e a Tabela 26 resume os resultados obtidos.

Figura 63 – Curva analítica obtida a partir das análises das soluções de NYS em diferentes concentrações por CLAE com detecção espectrofotométrica em 305 nm, nas condições descritas na Tabela 13. Cada ponto representa a média de 3 determinações.



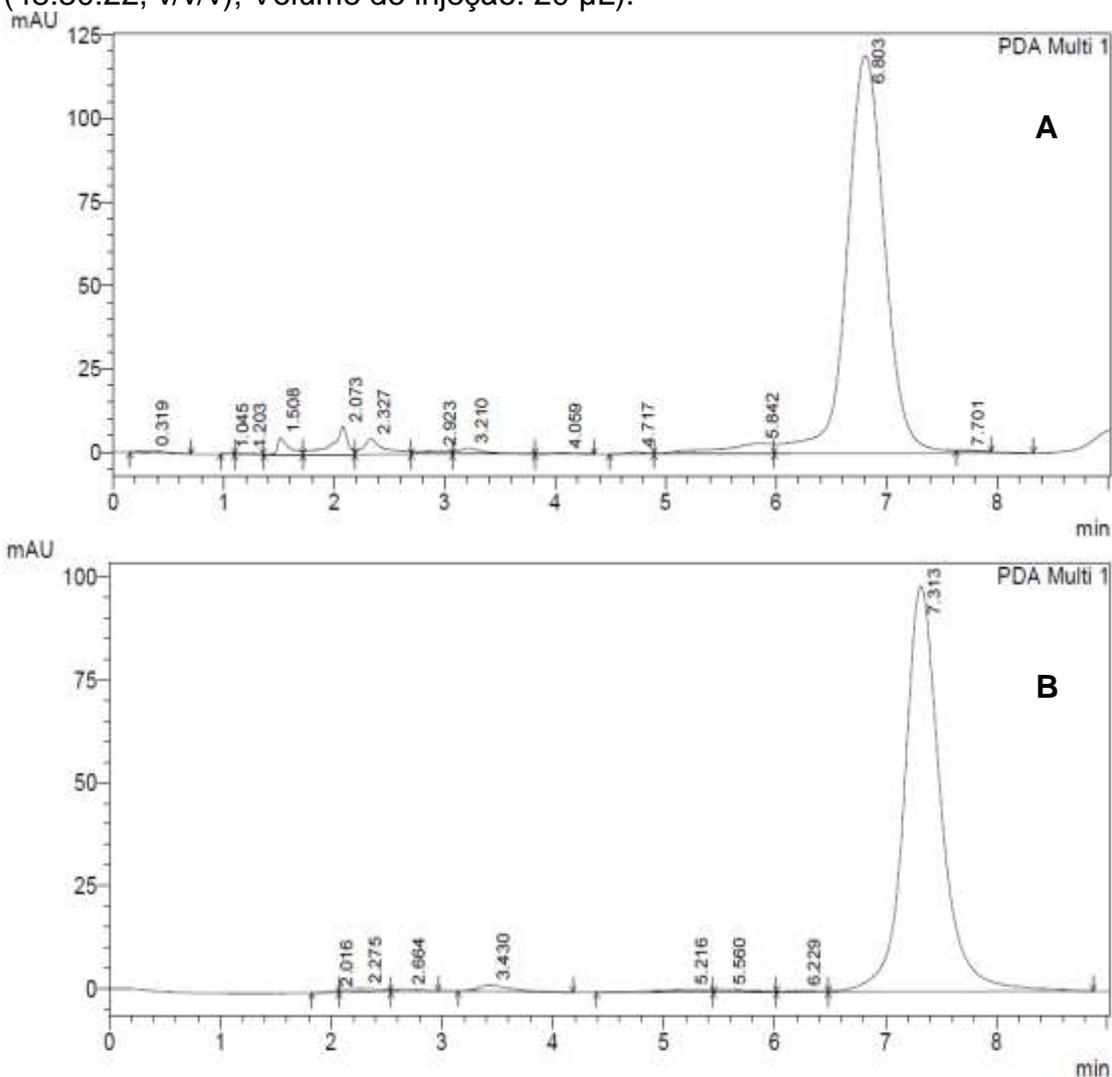
Parâmetro	Valores
Coeficiente de correlação ( $R^2$ )	0,99999
Coeficiente angular (a)	$6 \cdot 10^7$
Coeficiente linear (b)	235814

Tabela 26 – Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico por CLAE com detecção por espectrofotometria de absorção no UV (305 nm), concentração de 0,05 a 0,75 mg/mL.

Como a Resolução RE nº 899, de 2003 preconiza um coeficiente de correlação mínimo de 0,99, o método proposto demonstrou-se linear na faixa de concentração entre 0,05 e 0,75 mg/mL (BRASIL, 2003). Essa faixa de concentração é adequada para as análises de teor de NYS nas amostras de NYS MP.

Na Figura 64, encontra-se um cromatograma obtido pela análise das soluções de NYS em concentração de 0,1 mg/mL. Conforme exposto, o cromatograma A refere-se à análise da solução de NYS preparadas com padrão (pureza 6273,22 UI/mg) e o cromatograma B, refere-se à análise da solução de NYS preparada com matéria-prima (NYS MP). Como demonstrado, ambos apresentam semelhanças em relação ao tempo de retenção e à área do pico.

Figura 64 – Cromatograma (A): de uma solução de NYS padrão a 0,10 mg/mL (solvente fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Pico principal em 6,79 min e área de 5 621 991 mAU.min (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); Volume de injeção: 20 µL). (B) Cromatograma de uma solução de NYS MP a 0,05 mg/mL (solvente fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Pico principal em 7,33 min e área de 2 239 485 mAU.min (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); Volume de injeção: 20 µL).



### 5.3.1.2 Precisão e Exatidão

A precisão refere-se à forma de avaliar quão próximos são os resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostra. Já a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003), descritos nos itens 4.2.3.1.2 e 4.2.3.1.3.

Para avaliar a precisão e a exatidão, foram analisadas soluções de NYS padrão, de concentrações baixa, média e alta, ou seja, 0,10; 0,25 e 0,50 mg/mL (concentrações teóricas).

A precisão do método analítico foi calculada com uso da Equação 3 (item 4.2.3.1.2). A precisão variou de 0,099 a 0,61%, para as amostras analisadas no mesmo dia (precisão intra-corrída), e entre 0,11 e 0,29 % para as amostras analisadas em dias diferentes (precisão inter-corrídas). Os resultados estão apresentados na Tabela 27. Assim, de acordo com a Resolução RE nº 899, de 2003, o valor máximo aceitável para o ensaio de precisão não deve ultrapassar 5%. Dessa forma, pode-se afirmar que o método se demonstrou adequado (BRASIL, 2003).

Já a exatidão do mesmo método analítico, calculada através da Equação 4 (item 4.2.3.1.3) variou de 95,32 a 96,72% para as amostras analisadas no mesmo dia (exatidão intradia) e entre 98,36 e 104,5 % para as amostras analisadas em dias diferentes (exatidão interdias). Os resultados também estão apresentados na Tabela 27. Dessa forma, os valores devem variar em 5%, como preconiza a legislação sanitária vigente, e como esses estão dentro do limite aceitável, pode-se dizer que o método se demonstrou adequado, quanto à exatidão (BRASIL, 2003).

Concentração de NYS (mg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intra-corrída	Inter-corrída	Intradia	Interdia
0,10	0,099	0,15	96,44	99,41
0,25	0,12	0,29	95,32	98,36
0,50	0,61	0,11	96,72	104,5

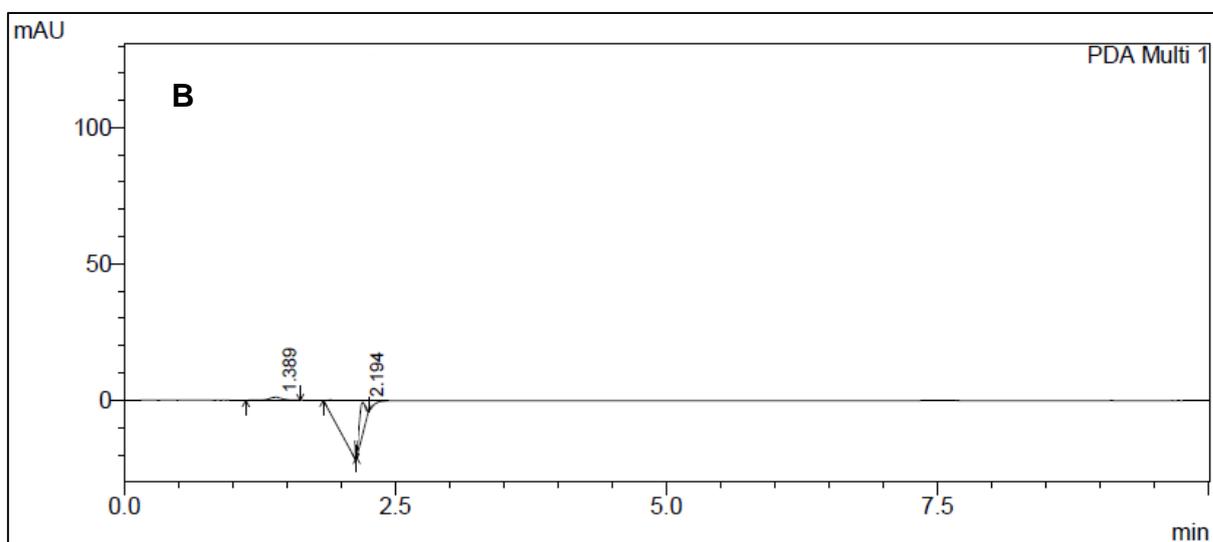
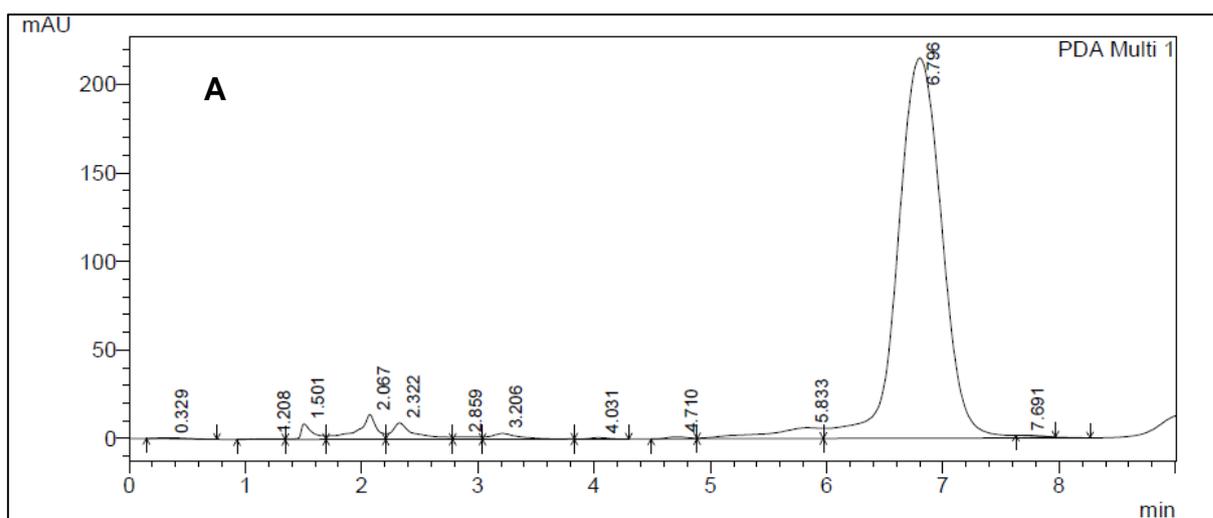
Tabela 27 – Precisão intra-corrída e inter-corrída e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de NYS por CLAE com detecção por UV. Cada valor representa uma média de três determinações (n=3).

### 5.3.1.3 Especificidade

A especificidade refere-se à capacidade que o método apresenta em medir exatamente um dado composto na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e constituintes da matriz (BRASIL, 2003).

Tratando-se de um método analítico por CLAE, é esperado que este seja capaz de quantificar a NYS MP, mesmo na presença de outras substâncias. Assim, foi realizado um ensaio cromatográfico apenas com a fase móvel (metanol, água miliQ e dimetilformamida, na proporção de 48:30:22, v/v/v), para verificar se os solventes usados não poderiam interferir. Na avaliação da especificidade, empregando os mesmos parâmetros cromatográficos, não foi visto a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção do fármaco, conforme demonstrado nas Figuras 65, o que comprova a especificidade do método.

Figura 65 – Cromatogramas (A): de uma solução NYS MP a 0,75 mg/mL (solvente fase móvel), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Pico principal em 6,797 min e área de 5 621 991 mAU.min (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); Volume de injeção: 20 µL). (B): fase móvel ), com coluna C18 de fase reversa, 4,6 x 150 mm, 5 µm (fluxo: 0,9 mL/min; fase móvel metanol:água:dimetilformamida (48:30:22, v/v/v); Volume de injeção: 20 µL).



### 5.3.2 Desenvolvimento e Validação do Método por Espectrometria de Absorção no Ultravioleta para Quantificação de NYS nas DS

Para a quantificação de NYS a partir das dispersões sólidas, foi eleito o método por espectrometria de absorção no ultravioleta. Além disso, foram eleitos os meios, nos quais a NYS MP e NYS DS foi analisada, para a avaliação da solubilidade.

A escolha dos meios, ou seja, o tampão fosfato pH 7,0 e o tampão acetato pH 5,5 ocorreu, diferentemente dos meios normalmente usados para ensaios de avaliação de solubilidade, devido ao microambiente da cavidade oral. Nela, as variações de pH são menores, quando comparadas às do trato gastrintestinal, e o pH 5,5 e pH 7,0 são críticos no ambiente oral (BONAMICI, 2009; LÁZARO, VALENÇA, CHIAPPINI, 1999; MADSEN et al., 2013; PASSOS, FREITAS, SAMPAIO, 2011; U.S., 2000; SATO, 2002). Assim, a cavidade oral normalmente encontra-se em pH 7,0, e esse é reconhecido como seu pH fisiológico (BONAMICI, 2009; MADSEN et al., 2013; SATO, 2002; PASSOS, FREITAS, SAMPAIO, 2011).

Por outro lado, o pH 5,5 é o resultado da produção de ácidos orgânicos, a partir de açúcares que foram ingeridos e permaneceram na cavidade bucal. Quando o pH está em 5,5, ocorre a desmineralização dos dentes e, conseqüentemente, a formação de cáries. Sabendo que a cárie é uma doença multifatorial, que relaciona interação entre hospedeiro, microbiota oral e dieta, o pH 5,5 foi escolhido também para ser avaliada a solubilidade da NYS (LÁZARO, VALENÇA, CHIAPPINI, 1999).

Após a definição dos meios empregados como solvente final nas soluções que foram analisadas no ensaio de solubilidade, alguns parâmetros foram estabelecidos no desenvolvimento do método, e posteriormente o método foi validado de acordo com a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, de 2003. As condições usadas no ensaio foram determinadas mediante a uma série de testes com soluções de NYS MP em diversas concentrações, até alcançar a faixa de 10,0 a 70 µg/mL, onde foi visto linearidade. Na Tabela 28 foram reunidas as condições do ensaio.

<b>Condições do ensaio por espectrofotometria</b>	
Método	Espectrofotometria de absorção no UV
Comprimento de onda	279 nm
Solventes	Água; tampão fosfato pH 7,0; e tampão acetato pH 5,5
Volume da alíquota	150 µL
Número de amostras	3

Tabela 28 – Condições do ensaio por espectrofotometria para o desenvolvimento do método analítico para quantificação de NYS nas DS.

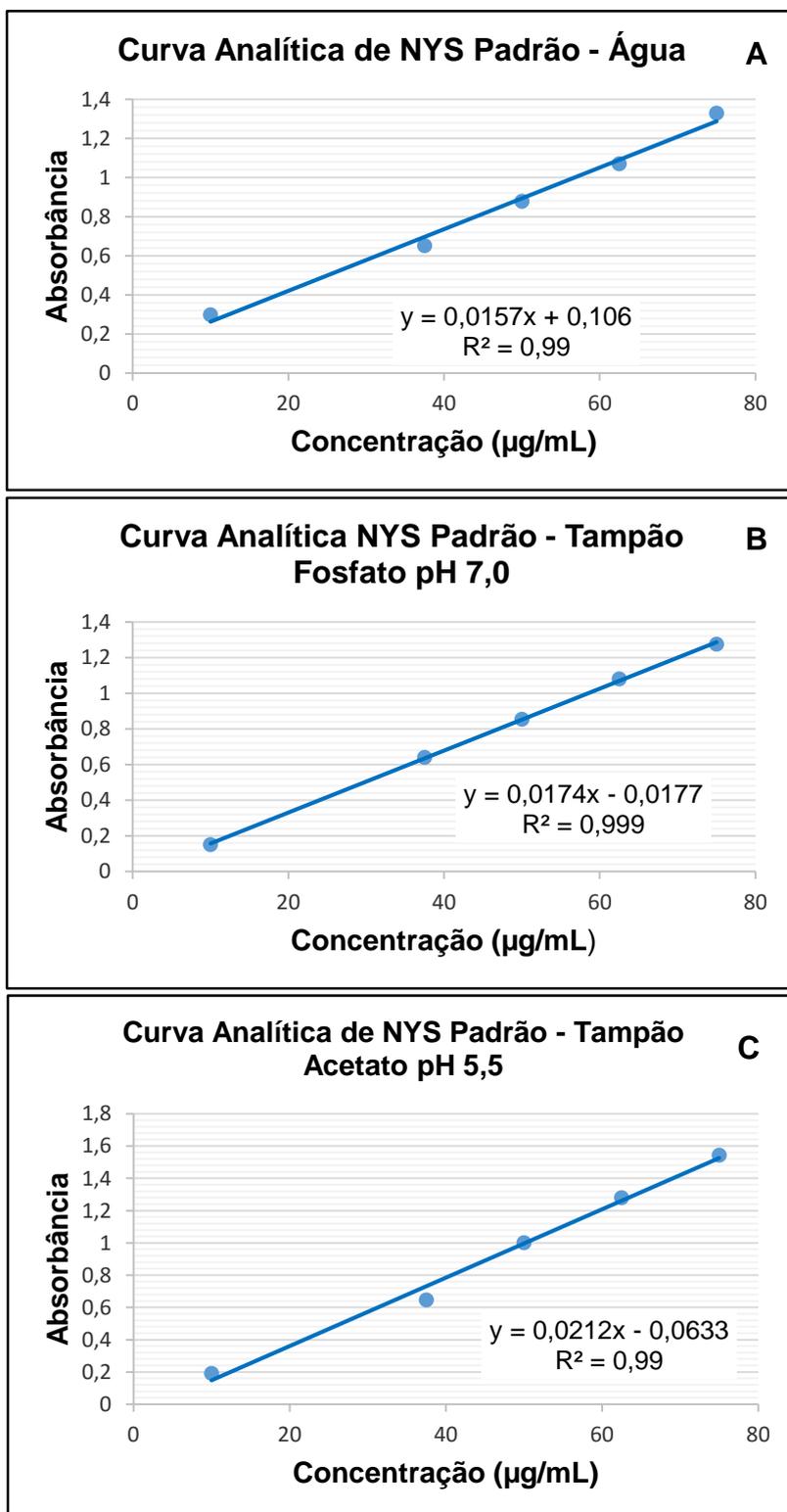
### 5.3.2.1 Linearidade

Conforme descrito no item 4.2.3.2.1, a análise da linearidade do referido método foi feita com emprego das soluções-teste de NYS padrão, nas concentrações de 10,0; 37,5; 50,0; 62,5 e 80,0 µg/mL, onde os solventes usados foram os mesmos empregados como meio do ensaio de solubilidade: água; tampão fosfato pH 7,0; e tampão acetato pH 5,5. Com base nos resultados, foram construídas 3 curvas analíticas (para cada meio usado), assim determinadas as equações da reta e os coeficientes de correlação ( $R^2$ ). Esses valores encontram-se na Tabela 29 e nas Figura 66 foram apresentadas as curvas analíticas.

Parâmetros	Valores		
	Água	Tampão fosfato pH 7,0	Tampão acetato pH 5,5
<b>Coeficiente de correlação (<math>R^2</math>)</b>	0,990	0,999	0,990
<b>Coeficiente angular (a)</b>	0,0157	0,0174	0,0212
<b>Coeficiente linear (b)</b>	0,106	0,0177	0,0633

Tabela 29 – Parâmetros relativos às curvas analíticas do método analítico por espectrofotometria de absorção no UV, concentrações de 10,0 a 70,0 µg/mL.

Figura 66 – Curvas analíticas obtidas a partir das soluções de NYS padrão, em concentrações entre 10,0 a 75,0 µg/mL, com uso de espectrofotometria de absorção no UV (279 nm). Cada ponto refere-se à média de 3 determinações. (A) Solvente: água, (B) Solvente: tampão fosfato pH 7,0, (C) Solvente: tampão acetato pH 5,5.



As 3 curvas analíticas obtidas apresentaram os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,99, como preconizado pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 demonstrando que o método é linear na faixa de concentração entre 10,0 e 70,0  $\mu\text{g/mL}$ .

### 5.3.2.2 Precisão e Exatidão

A precisão do método analítico para a quantificação da NYS, considerando todos os meios usados no ensaio de solubilidade variou entre 0,90 e 4,41% para as amostras analisadas no mesmo dia (intra-ensaio) e entre 0,12 e 4,06% para aquelas analisadas em dias diferentes (inter-ensaio).

Já a exatidão do presente método para a quantificação de NYS, em todos os meios empregados, variou entre 95,01 e 104,8% para as amostras avaliadas no mesmo dia (intradia), e entre 95,23 e 103,9% (interdia). Os dados estão demonstrados na Tabela 30.

Dessa forma, a exatidão e a precisão não ultrapassaram 5%, nos diferentes meios (água; tampão fosfato pH 7,0; e tampão acetato pH5,5), conforme preconizado a Resolução RE nº 899, de 2003, e o método foi considerado preciso e exatidão.

Solventes	Concentração NYS ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão (%)		Exatidão (%)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio	Intradia	Interdia
Água	10	1,85	2,43	104,11	95,23
	37,5	2,89	1,83	100,7	97,76
	75	2,35	4,06	100,9	96,24
Tampão fosfato pH 7,0	10	4,41	2,54	95,01	103,9
	37,5	0,90	0,86	96,35	99,51
	75	1,15	1,19	97,41	96,63
Tampão acetato pH 5,0	10	3,67	0,12	104,8	103,7
	37,5	0,39	0,36	95,39	96,99
	75	2,80	1,69	97,21	98,01

Tabela 30 – Precisão e exatidão referentes ao método analítico por espectrofotometria de absorção no UV para quantificação de NYS em água; tampão fosfato pH 7,0; e tampão acetato pH 5,5. Cada valor corresponde a uma média de 3 determinações.

### 5.3.2.3 Especificidade

O método analítico por espectrofotometria de absorção no UV é uma metodologia rápida e parte de princípio que a grande maioria das substâncias absorvem na faixa do ultravioleta. No entanto, para que este seja usada de forma seletiva para a quantificação do analito, no caso NYS, espera-se que os carreadores não sejam interferentes, ou seja, não apresentem absorbância em 279 nm.

Dessa forma, para avaliação da especificidade foram empregadas as mesmas condições do ensaio, e as soluções contendo os carreadores (lactose, HPMC, methocel, Polo 407 e Polo 188), e varreduras foram realizadas, que comprovou que não ocorreu absorbância de nenhuma matriz em 279 nm, demonstrando que o método se apresentou especificidade.

### 5.3.3. Desenvolvimento e Validação de Método de CLAE para Quantificação de NYS contida do Géis Mucoadesivos

Para a quantificação de NYS a partir dos géis mucoadesivos, foi desenvolvido e posteriormente validado o método analítico por CLAE, com detecção no UV. O método seguiu inicialmente, o método previamente desenvolvido para quantificação de NYS MP (item 5.3.1), com adequação às particularidades da forma farmacêutica e a presença de excipientes.

#### 5.3.3.1 Linearidade

A análise da linearidade foi realizada empregando soluções padrão de NYS nas concentrações de 0,5; 3,0; 5,0; 8,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , preparadas conforme o item 4.2.3.3.1. A partir dos resultados das análises cromatográficas, em triplicata, a curva analítica foi obtida e partir desta foram determinados a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Assim após a construção da curva analítica, os resultados encontrados foram:  $R^2$  igual a 0,9929, o coeficiente angular igual a 55250 e o coeficiente linear igual a 682134.

#### 5.3.3.2 Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e a exatidão, foram analisadas soluções de NYS padrão, de concentrações baixa, média e alta, ou seja, 0,50; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$  (concentrações teóricas).

A precisão do método analítico foi calculada com uso da Equação 1 (item 4.2.1.3.1). A precisão variou de 0,211 e 0,891 %, para as amostras analisadas no mesmo dia (precisão intra-corrída), e entre 0,098 e 0,512 % para as amostras analisadas em dias diferentes (precisão inter-corrídas). Os resultados estão apresentados na Tabela 32. Os resultados estão de acordo com a Resolução RE nº 899, de 2003, o valor máximo aceitável para o ensaio de precisão não deve ultrapassar 5%.

A exatidão do mesmo método analítico, calculada através da Equação 2 (item 4.2.1.3.3) variou de 95,12 e 98,91% para as amostras analisadas no mesmo dia

(exatidão intradia) e entre 97,91 e 103,41 % para as amostras analisadas em dias diferentes (exatidão interdias). Os resultados também estão apresentados na Tabela 30. Dessa forma, os valores devem variar em 5%, como preconiza a legislação sanitária vigente.

Concentração de NYS (mg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intra- ensaio	Inter- ensaio	Intradia	Interdia
0,10	0,079	0,098	95,66	99,09
0,25	0,891	0,512	95,12	97,91
0,50	0,761	0,211	97,87	103,41

Tabela 31 – Precisão intra-ensaio e inter-ensaio e exatidão intradia e interdia referentes ao método analítico para quantificação de NYS por CLAE com detecção por UV. Cada valor representa uma média de três determinações.

### 5.3.3.3 Especificidade

No caso de um método analítico por CLAE, é esperado que este seja capaz de quantificar a NYS a partir dos géis mucoadesivos, mesmo na presença dos excipientes usados (carbopol<sup>®</sup>, sacarina, mentol e propilaparabeno). Desse modo, foi realizado um ensaio cromatográfico com gel placebo, ou seja, contendo todos os excipientes, exceto a NYS, nas mesmas condições, para verificar se esses poderiam interferir na quantificação de NYS. Na avaliação da especificidade, não foi visto a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção do fármaco, o que comprova a especificidade do método.

## 6. CONCLUSÕES

---

---

- Através do método de eliminação do solvente, com emprego de evaporador rotativo e liofilizador, foram desenvolvidas e obtidas 13 formulações de dispersões sólidas de NYS: Formulações A, 4, 6, 7, 14, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 e 52. Estas formulações foram obtidas na forma de sólido.
- A partir dos ensaios de análise térmica (DSC e TG/DTG), foram investigadas e observadas as diferenças do comportamento térmico das amostras (NYS, carreadores, misturas físicas da NYS com carreador, e formulações), indicando quais formulações apresentaram características de formação das dispersões sólidas de NYS. Segundo os resultados, há indícios de que as NYS DS (A), NYS DS G1 (6), NYS DS G1 (7), NYS DS G1 (14), NYS DS G2 (47), NYS DS G2 (48) e NYS DS G2 (49) tenham resultado na formação de uma nova “espécie”, ou seja, das dispersões sólidas. Porém outras análises serão empregadas com a finalidade de confirmar tal observação.
- O ensaio de solubilidade, por meio do método do equilíbrio, demonstrou que a formulação de dispersão sólida NYS DS G2 (49), onde há o uso de poloxamer 188 como carreador, na proporção de 1:1, foi a que apresentou maior resultado frente à NYS MP, e NYS MF (49), nos meios água; tampão fosfato pH 7,0; e tampão acetato pH 5,5.
- A caracterização complementar, para ratificar a indicação de formação de dispersão sólida apresentada pela análise térmica, através das técnicas de DRX, FTIR e PAMPA confirmaram a formação do sistema. No ensaio de PAMPA, que avaliou a permeabilidade efetiva, foi observado que a NYS na forma de DS não apresentou aumento da permeabilidade, apesar do aumento da solubilidade.
- O desenvolvimento de géis base contendo carbopol<sup>®</sup>, noveon<sup>®</sup> e a mistura destes polímeros (carbopol<sup>®</sup> e noveon<sup>®</sup>) foi possível, resultando no preparo de 14 bases mucoadesivas. Estas foram avaliadas por meio das suas propriedades sensoriais e comportamento reológico, nas temperaturas de 25 e 37 °C, o que levou a escolha do carbopol<sup>®</sup> como gel base para posterior incorporação da NYS DS G2 (49).
- Os géis mucoadesivos orais de NYS MP e NYS DS G2 (49) foram desenvolvidos e preparados, com emprego dos géis base de carbopol<sup>®</sup> nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0% p/p; e ainda, com uso de propilparabeno, sacarina, mentol. E foram

avaliados quanto as propriedades sensoriais, o comportamento reológico, a liberação de NYS, e a avaliação da mucoadesão em ensaio *ex vivo*.

- Quanto ao comportamento reológico dos géis, os Géis C e D mantiveram a propriedade de fluido pseudoplástico, enquanto os Géis A e B, apresentaram uma curva semelhante de fluido newtoniano, ou seja, que não sofre influência na viscosidade, independente da taxa de cisalhamento aplicada.
- A avaliação da mucoadesão demonstrou que todos os géis mucoadesivos orais apresentaram a propriedade de adesão à mucosa, compatível com literatura e de forma semelhante, apesar das concentrações de carbopol<sup>®</sup> serem distintas entre os géis. Os resultados desta análise indicam que, nesse caso, a quantidade de polímero ser distinta, esse fato não influenciou na adesão à mucosa.
- A avaliação de liberação de NYS a partir dos géis mucoadesivos orais demonstrou que a liberação da NYS na forma de dispersão sólida – NYS DS G2 (49) – foi bem maior, quando comparado à NYS na forma “convencional”. Esses resultados indicam que o aumento da solubilidade levou a um aumento da liberação, e assim, a NYS se encontra mais disponível na cavidade oral.
- A avaliação de liberação de NYS a partir dos géis mucoadesivos orais semelhante, durante o ensaio de 60 min, embora a concentração de carbopol<sup>®</sup> e, conseqüentemente, a viscosidade dos géis foi proporcional com aumento da quantidade de polímero.
- Todos os métodos analíticos empregados: quantificação de NYS na MP por CLAE, quantificação de NYS nas DS por espectrofotometria de absorção no UV, quantificação de NYS contida nos géis mucoadesivos por CLAE demonstraram-se adequados para respectivas análises em função da especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ADIBKIA, K. et al. Physicochemical characterization of naprox solid dispersions prepared via spray dry technology. **Power Technology**, v. 246, p. 448-455, 2013.

AGUIAR, M. M. G. B. et al. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 5, p. 594-600, 2010.

ALVES, L. D. S. et al. Avanços, propriedades e aplicações de dispersões sólidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n. 1, p. 17-25, 2012.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n.3, p. 413-429, 1995.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505-518, 2009.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 64, 65, 344, 345, 346.

BABY, A. R. Avaliação in vitro da Permeabilidade Cutânea da Rutina em Emulsões Cosméticas. 144 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BAGAN, J. et al. Mucoadhesive polymers for oral transmucosal drug delivery: a review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 34, p. 5497-5514, 2012.

BETTINI, R. et al. Swelling and drug release in hydrogel matrices: polymer viscosity and matrix porosity effects. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 213-219, 1994.

BIKIARIS, D. et al. Physicochemical studies on solid dispersions of poorly water-soluble drugs. Evaluation of capabilities and limitations of thermal analysis techniques. **Thermochimica Acta**, v. 439, n. 1-2, p. 58-67, 2005.

BONAMICI, D. Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisemções. São Paulo. 171 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta os procedimentos para uso científico de animais de laboratório.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. 2 ed. Brasília: ANVISA, 2008, p. 27-33.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Aprova o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Publicado em Diário Oficial da União em 02 de junho de 2003.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o “Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal”.

BRESCANSIN, E. G. Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais contendo o fármaco nistatina. 169 f. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BRUCH, J. M.; TREISTER, N. S. **Clinical Oral Medicine and Pathology**. New York: Human Press, 2010, p. 1, 3.

CAMPOS, F. F. et al. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3739-3752, 2012.

CATE, J. M. et al. Molecular and cellular mechanism that lead to Candida biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 88, n.2, p. 105-115, 2009.

CHEN, X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C.L.; BALIMANE, P.V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**, v.25, p.1511-1520, 2007.

COLOMBO, A. L. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia e Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

COOK, M. T.; KHUTORYANAKIY, V. V. Mucohesion and mucosa-mimetic materials – A mini-review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, p. 991-998, 2015.

CUBAYACHI, C. et al. Needle-free buccal anesthesia using iontophoresis and amino acid salts combined in a mucoadhesive formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2015.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998, p. 121.

DEZANI, A.B. et al. Equilibrium solubility *versus* intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 853-863, 2013.

DHIRENDRA, K. et al. Solid dispersion: a review. **Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences**, v.22, n. 2, p. 234-246, 2009.

DÍEZ-SALES, O. *In Vitro* percutaneous penetration of acyclovir from solvent systems and Carbopol<sup>®</sup> 971-P hydrogels: influence of propylene glycol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 5, p. 1039-1047, 2005.

DOHERTY, C; YORK, P. Mechanism of dissolution of furosemide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 34, n. 3, p. 197-205, 1987.

DrugBank 4.3, 2015. Disponível em <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00646>>. Acesso em 11 de agosto de 2015.

DU, J. D. et al. A novel approach to enhance the mucoadhesion of lipid drug carriers for improved drug delivery to the buccal mucosa. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n.1-2, p. 358-365, 2014.

DJEKIC, L. et al. Characterization of gelation process and drug release profile of thermosensitive liquid lecithin/poloxamer 407 based gels as carriers for percutaneous delivery of ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, 180-189, 2015.

FARAH, C.; ASHMAN, R.; CHALLACOMBE, S. J. Oral Candidosis. **Clinics in Dermatology**, v. 18, p. 553-562, 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5. ed. Brasília: Agência de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz, 2010, volume 1, p. 267, 268.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5. ed. Brasília: Agência de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz, 2010, volume 2, p. 1160, 1161.

FAWAZ, F. et al. Bioavailability of norfloxacin from PEG 6000 solid dispersion and cyclodextrin inclusion complexes in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 132, n. 1-2, p. 271-275, 1996.

FRIZON, F. et al. Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersion by solvent methods. **Powder Technology**, v. 235, p. 532-539, 2013.

GIL, E.; BRANDÃO, A. L. **Excipientes: Suas Aplicações e Controle Físico-químico**, 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007, p. 103, 104, 256, 257, 262, 263.

GIRI, T. K. et al. A novel and alternative approach to controlled release drug delivery system based on solid dispersion technique. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 50, p. 147-159, 2012.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M.A Nomenclatura em análise térmica – parte II. **Cerâmica**, v. 34, n. 225, p. 163-164, 1988.

GUIMARÃES, G. G. et al. Avaliação da pectina-HPMC no processo de revestimento por compressão. I - Estudo da propriedade de intumescimento em núcleos revestidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 133-148, 2008.

GIANNINI, P. J.; SHETTY, K. V. Diagnosis and management of oral candidiasis. **Otolaryngologic Clinics of North American**, v. 44, n. 1, p. 231-240, 2011.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003, p.413, 867, 971, 972, 982.

GROLL, A. H. et al. High-performance liquid chromatographic determination of liposomal nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. **Journal of Chromatography B**, v. 743, 1999.

GURUNATH, S.; NANJWADE, B. K.; PATILA, P. A. Enhanced solubility and intestinal absorption of candesartan cilexetil solid. **Saudi Pharmaceutical Journal** (2013). Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.03.006>>. Acesso em 01 de abril de 2013.

HAC-WYDRO, K. & DYNAROWICZ-LATKA, P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Lagmuir monolayers – the role of a phospholipids in the mechanism of polyenes mode of action. **Biophysical Chemistry**, v. 123, p. 154-161, 2006.

HAN, X. et al. Simultaneous micronization and surface modification for improvement of flow and dissolution of drug particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 185-195, 2011.

HANSON RESEARCH CORPORATION: Manual Diffusion cell: operation manual. Chatsworth: Hanson Research, 2004, 36 p.

JIMÉNEZ, M. M.; FRESNO, M. J.; RAMÍREZ, A. Rheological study of binary gels with carbopol<sup>®</sup> ultrez<sup>™</sup> e hyaluronic acid. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 8, p. 1157-1163, 2007.

JONES, D. S. et al. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. **Journal of Controlled Release**, v. 49, n. 1, p. 71-79, 1997.

KIM, E. J. et al. Preparation of a solid dispersion of fenodipine using a solvent wetting method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 200-205, 2006.

KOGERMANN, K. et al. Dissolution testing of amorphous solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, n. 1-2, p. 40-46, 2013.

KOLAŠINAC, N. et al. Solubility enhancement of desloratadine by solid dispersion in poloxamers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 161-170, 2012.

KONELL, C. F. Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de cloridrato de quitosana contendo nistatina visando a liberação tópica. 114 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

LÁZARO, C. P.; VALENÇA, A. M. G.; CHIAPPINI, C. C. J. Estudo preliminar do potencial cariogênico de preparações de doces de merenda escolar através do pH da saliva. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 3, p. 273-287, 1999.

LAVRA, Z. M. M. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para nistatina creme vaginal por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, 637-643, 2008.

LAW, V. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolismo. **Nucleic Acid Research**, v. 42, D1091–D1097, 2014.

LEITE, R. M. S. Glossite romboide mediana associada à candidíase esofagiana. Uma possível relação etiológica com a *Candida albicans*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 579-583, 2002.

LESCANO, G. M.; PETTIGROSSO, R. S.; LLABOT, J. M. Determinación das propiedades físico-químicas de nistatina comercial empleando técnicas de caracterización de materiales. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**, v. 45, n. 2, p. 31-36, 2014.

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

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

LIU, R. **Water-insoluble drug formulation**. Florida: CRC Press, 2000, p. 97, 493, 494, 495, 496, 497, 499, 502, 503, 504, 505, 506 507, 508, 509, 510.

LLABOT, J. M. et al. HPLC method for the determination of nystatin in saliva for application in clinical studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 526-530, 2007.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 178-184, 2010.

MADSEN, K. D. et al. Development of an *ex vivo* retention model simulating bioadhesion in the oral cavity using human saliva and physiologically relevant irrigation media. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 2, p. 373-381, 2013.

MADSEN, C. G. et al. Simple measurements for prediction of drug release from polymer matrices – Solubility parameters and intrinsic viscosity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 92, p. 1-7, 2015.

MAULVI, F. A. et al. Improvement of dissolution rate of aceclofenac by solid dispersion technique. **Power Technology**, v. 207, n. 1-3, p. 47-54, 2011.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013.

MARTÍN-VILLENA, M. J. et al. Novel microparticulate system for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. **Carbohydrate Polymer**, v. 94, p. 1-11, 2013.

MARX, R. E.; STERN, D. **Oral and Maxillofacial Pathology. A Rationale for Diagnosis and Treatment**. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc, 2003, p. 90, 91, 92, 93.

MOOTER, G. V. The use of amorphous solid dispersions: a formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 2, p. e79-e85, 2012.

MORALES, J. O.; McCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 187-199, 2011.

NETO, M. M.; DANESI, C. C.; UNFER, D. T. Candidíase bucal. **Saúde**, v. 31, n. 1-2, p. 12-26, 2005.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, p. 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219.

OHARA, T. et al. Dissolution mechanism of poorly water-soluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, n. 1-2, p. 95-102, 2005.

PADERNI, C. et al. Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 114, n.3, e25-e34, 2012.

PASSOS, I. A.; FREITAS, C. H. M.; SAMPAIO, F. C. Fluoride concentration and pH of pediatric medicines regulary and long-term used by children. **Medicine Oral Pathology Cirurgy Bucal**, v. 16, n. 3, e459-e462, 2011.

PRESTES, P. S. et al. Rheological measurements and thermal characterization of lamellar gel phase emulsions developed with cetearyl alcohol/nonionic ethoxylated surfactant. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 33, n. 11, p. 1621-1628, 2012.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p.781-789, 2013.

REPPAS, C. el al. Effect of elevated viscosity in the upper gastrointestinal tract on drugs absorption in dogs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 131-139, 1998.

RICCI, E. J. et al. Sustained release of lidocaine from poloxamer 407 gel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 235-244, 2005.

RIEKES, M. K. et al. HPMC as a potencial enhancer of nimodipine biopharmaceutical properties via ball-milled solid dispersions. **Cabohydrate Polymers**, v. 99, p. 474-482, 2014.

ROWE, R. C.; SHIESKEY, P. J.; QUINN, M; E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6 th. ed. London/Grayslake: Pharmaceutical Press, 2009, p. 198, 326, 364, 507.

SAKEER, K. et. al. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 11, p. 1771-1779, 2010.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M. J.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1666-1691, 2005.

SATO, T. P. A pH curve of human resting saliva sampled with a small paper slip and its medical application. **Pathophysiology**, v. 8, n. 4, p. 283-290, 2002.

SEBRÃO, D. et al. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid dispersions: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. **Drug Reviews in Therapeutic Carriers Systems**, v. 20, n. 2-3, p. 215-247, 2003.

SILVA, M. F. Correlação *in vitro* de comprimidos matriciais de furosemida complexada à hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: métodos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. 239 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1556-1568, 2005.

STAVCHANSKY, S.; PADE, V. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 87, n. 12, p. 1604-1607, 1998.

STEFANOVIC, J. et al. Syntesis, characterization, and antifungal activity of nystatin-gum Arabic conjugates. **Journal Applied Polymer Science**, v. 127, p. 4736-4746, 2012.

STOOPLER, E. T.; SOLLECITO, T. P. Oral mucosal diseases. Evaluation and management. **Medical Clinics of North American**, v. 898, p. 1323-1352, 2014.

STODGHILL, S. P. Thermal analysis – a review of techniques and applications in pharmaceutical sciences. **American Pharmaceutical Review**, v. 13, n. 2, 2010. Disponível em <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/36776-Thermal-Analysis-A-Review-of-Techniques-and-Applications-in-the-Pharmaceutical-Sciences/>. Acesso em 23 set 2013.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p. 188, 193, 195.

SPULBER, M. et al. Nystatin–polyethylene oxide conjugates with enhanced solubility in water. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 71, p. 87-93, 2011.

SUDHAKAR, Y. KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 15-40, 2006.

SUN, D. D.; LEE, P. I. Crosslinked hydrogels – a promising class of insoluble solid molecular dispersion carriers for enhancing the delivery of poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 26-36, 2014.

TALLURY, P. et al. Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial and antifungal on their release rates from ethylene vinyl acetate copolymer. **Dental Material**, v. 23, p. 977-982, 2007.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TIWARI, T. et al. Solid dispersions: an overview to modify bioavailability of poorly water soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 4, p. 1338-1349, 2009.

THOMPSON, L. M. Nuevas alternativas en el armamento anti infeccioso que el clínico debe conocer. Antifúngicos. **Revista Chilena de Infectología**, v. 19, s. 1, 2002.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. 2000. 16p. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm07246.pdf>. Acesso em: 25 agosto de 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 34 th. Rockville: The United States Pharmacopeial Forum, 2011, v. 1, p. 967-968.

VANSCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23/24, p. 1068-1075, 2007.

VARUM, F. O. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 535-548, 2008.

VO, C. L. N.; PARK, C.; LEE, B. J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 799-813, 2013.

WENDLANT, W.W. **Thermal Analysis**, 3 ed. New York: Willey, 1986, 814p.

WILSON, P. et al. Liquid chromatographic determination of nystatin in pharmaceutical preparations. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 4, p. 1050-1056, 2001.

WINTER, J.C.F. Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. **Practical Assessment Research & Evaluation**, v. 18, n. 10, p. 1-12, 2013.

WU, J. X. et al. Influence of solvent evaporation rate and formulation factors on solid dispersion physical stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 5, p. 610-620, 2011.