



Universidade  
Estadual de Goiás

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE**

**DANIELLE FLÁVIA DA SILVA RIBEIRO**

---

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas  
poliméricas inaláveis para vetorização de macrófagos e  
tratamento da tuberculose**

---

**Anápolis  
2019**

---

**DANIELLE FLÁVIA DA SILVA RIBEIRO**

---

---

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas  
poliméricas inaláveis para vetorização de macrófagos e  
tratamento da tuberculose**

---

---

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Aplicadas a  
Produtos para Saúde da  
Universidade Estadual de Goiás  
para defesa de Mestrado em  
Ciências Aplicadas a Produtos para  
Saúde.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Thais Leite Nascimento

**Anápolis  
2019**

---

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno(a):** Danielle Flávia da Silva Ribeiro

---

**Orientador(a):** Thais Leite Nascimento

**Membros:**

**1. Wesley de Almeida Brito**

**2. Luís Antônio Dantas Silva**

**3. Thais Leite Nascimento**

**OU**

**4. Marco Junio Peres Filho**

**5. Lucas Henrique Ferreira Sampaio**

**Data: 25/02/2019**

***Dedico este trabalho à minha família que me apoiou e foi meu suporte nos momentos difíceis. Sem vocês não conseguiria concretizar esse sonho!***

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço, primeiramente, à Deus por me capacitar, me dar forças e cuidar de mim dia após dia.

Ao meu esposo, **João Paulo**, que sempre me incentivou na busca deste sonho, foi paciente, companheiro, me apoiou e foi meu suporte nos momentos difíceis, possibilitando a concretização deste sonho!

Aos meus pais, **Regina e Tarcísio**, minha irmã **Ana Clara** por me apoiarem e se alegrarem com minhas conquistas.

À minha orientadora prof. Dr<sup>a</sup> **Thais Leite Nascimento** por confiar a mim o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência, sabedoria e dedicação na orientação. Cada orientação e ensinamento ao longo deste período foram essenciais para meu crescimento pessoal, minha formação acadêmica e a conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. **Wesley de Almeida Brito** pela oportunidade de ter sido orientada no estágio em docência, por ter compartilhado sua experiência mostrando os primeiros passos para ser docente e a importância de compartilhar o conhecimento.

Aos **professores** do programa de pós-graduação que cada um de sua forma de transmitir seu conhecimento contribuiu da minha formação acadêmica ao longo deste período

A toda equipe do **Farmatec** e em especial à prof. Dr<sup>a</sup> **Eliana Martins Lima**, por ter me acolhido e pela oportunidade de ter aprendido e trocado experiência com os colegas no dia a dia na rotina do laboratório.

Enfim, **a todos** que de alguma forma colaboraram para a realização desse trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

***“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é  
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria  
menor se lhe faltasse uma gota.”  
Madre Teresa de Calcutá***

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	3
2.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
3.1	TUBERCULOSE, TRATAMENTO E CLOFAZIMINA.....	4
3.2	ADMINISTRAÇÃO PULMONAR.....	9
3.3	NANOPARTICULAS PARA ADMINISTRAÇÃO PULMONAR.....	12
3.4	NANOPARTICULAS POLIMERICAS E PEC.....	13
3.5	ESTUDOS DE COMPATIBILIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMERICOS NANOESTRUTURADOS.....	15
4.	AVALIAÇÃO DE COMPATIBILIDADE ENTRE CLOFAZIMINA E EXCIPIENTES UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	17
4.1.	INTRODUÇÃO.....	17
4.2.	MATERIAL E METODOS.....	19
4.2.1.	MATERIAIS.....	19
4.2.2.	PREPARO DAS MISTURAS FISICAS.....	20
4.2.3.	CALORIMETRIA EXPLORATORIA DIFERENCIAL (DSC).....	20
4.2.4.	ANALISE TERMOGRAVIMETRICA (TG/DTG).....	20
4.2.5.	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	21
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.3.1.	CALORIMETRIA EXPLORATORIA DIFERENCIAL (DSC).....	22
4.3.2.	ANALISE TERMOGRAVIMETRICA (TG).....	28
4.3.3.	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	35
4.4.	CONCLUSÃO.....	37
4.5.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	38
5.	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ETILENO CARBONATO) CONTENDO CLOFAZIMINA PARA ADMINISTRAÇÃO PULMONAR E TRATAMENTO LOCAL DA TUBERCULOSE RESISTENTE À MÚLTIPLOS FÁRMACOS.....	44
5.1.	INTRODUÇÃO.....	44
5.2.	MATERIAIS E METODOS.....	46
5.2.1.	PREPARO DAS FORMULAÇÕES DE NANOPARTICULAS.....	46
5.2.2.	AVALIAÇÃO DO DIAMETRO MEDIO E PDI POR <i>DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)</i> .....	47
5.2.3.	EFICIENCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) POR HPLC ( <i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</i> ).....	48
5.2.4.	SECAGEM DAS NANOPARTICULAS POR LIOFILIZAÇÃO.....	49
5.2.5.	ANALISE TERMICA DAS FORMULAÇÕES POR CALORIMETRIA EXPLORATORIA DIFERENCIAL (DSC).....	49
5.2.6.	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS PARTICULAS EM MEIOS BIOLOGICOS SIMULADOS.....	50
5.2.7.	ANALISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTICULAS ( <i>NTA, NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS</i> ) EM MEIOS BIOLOGICOS SIMULADOS.....	51
5.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.3.1.	AVALIAÇÃO DO DIAMETRO MEDIO E PDI POR DLS.....	52
5.3.2.	EFICIENCIA DE ENCAPSULAÇÃO POR HPLC.....	53
5.3.3.	SECAGEM DAS NANOPARTICULAS POR LIOFILIZAÇÃO.....	55
5.3.4.	ANALISE TERMICA DAS FORMULAÇÕES POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATORIA (DSC).....	58
5.3.5.	ESTABILIDADE DAS PARTICULAS EM MEIOS BIOLOGICOS SIMULADOS.....	60
5.3.6.	ANALISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTICULAS ( <i>NTA, NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS</i> ) EM MEIOS BIOLOGICOS SIMULADOS.....	62
5.4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	63

5.5.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	64
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	68
	REFERÊNCIAS .....	70
	ANEXOS .....	79

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1 – Representação da estrutura química da clofazimina e marcação dos principais grupos que compõe o fármaco, sendo eles: núcleo fenazina, substituintes fenil e grupamento R-imina. .... 8
- Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsula e nanoesfera poliméricas. Nanocápsulas composta por parede polimérica e fármaco dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido na parede polimérica. Nanoesferas composta por matriz polimérica e fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica..... 14
- Figura 3 – Representação da estrutura química da clofazimina. .... 17
- Figura 4 - Curvas de DSC de clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes polímeros: **a)** CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, e CFZ-PLGA85:15 e com diferentes excipientes: **b)** CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico, e CFZ-Lecitina. CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli-ε-caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25, PLGA85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic®F68, PLX407 = Pluronic®F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja ..... 22
- Figura 5 - Curvas DTG da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes polímeros: CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, e CFZ-PLGA85:15. CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli-ε-caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25, PLGA85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15. .... 28
- Figura 6 - Curva comparativa de percentual (%) de perda de massa (TG) das misturas binárias (1:1 m/m) de clofazimina com diferentes polímeros, **a)** CFZ-PEC; **b)** CFZ-PCL; **c)** CFZ-PLA; **d)** CFZ-PLGA50:50; **e)** CFZ-PLGA75:25; **f)** CFZ-PLGA85:15. CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli-ε-caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25, PLGA85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15. .... 29
- Figura 7 - Curvas DTG da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes excipientes: CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico e CFZ-Lecitina. CFZ = clofazimina, Span60 = monoestearato de sorbitano,

Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic®F68, PLX407 = Pluronic®F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja. .... 30

Figura 8 - Curva comparativa de percentual (%) de perda de massa (TG) das misturas binárias (1:1 m/m) de clofazimina com diferentes excipientes: **a)** CFZ-Span60; **b)** CFZ-Span80; **c)** CFZ-Span85; **d)** CFZ-PLX188; **e)** CFZ-PLX407; **f)** CFZ-PVA; **g)** CFZ-Tween80; **h)** CFZ-Ác.Oleico; **i)** CFZ-Lecitina. CFZ = clofazimina, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic®F68, PLX407 = Pluronic®F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja. .... 31

Figura 9 - Espectro de FTIR da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes polímeros: CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, e CFZ-PLGA85:15. CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli-ε-caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25, PLGA85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15. .... 35

Figura 10 - Espectro de FTIR da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes excipientes: CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico, e CFZ-Lecitina. CFZ = clofazimina, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic®F68, PLX407 = Pluronic®F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja. .... 36

Figura 11 – Representação da linearidade do método pela curva de calibração de clofazimina (CFZ) obtida na faixa de 1 a 90 µg/mL, médias das áreas dos picos (mAU) e desvio padrão relativo nas concentrações avaliadas. Separação cromatográfica foi obtida utilizando coluna C8 de 250 x 4,6 mm, 5 µm a 25 °C. Fase móvel composta por metanol, acetonitrila e tampão acetato de amônio 100 mM pH 6,4 (60:25:15), com fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL. O comprimento de onda usado para detecção foi de 282 nm. .... 53

Figura 12 – Diâmetro médio (a,b,c) e Pdl (d,e,f) de nanocápsulas de poli(etileno carbonato) (PEC) contendo clofazimina (CFZ) liofilizadas na presença de diferentes concentrações de crioprotetores sendo eles sacarose (a/d), trealose (b/e) e manitol (c/f). NC-CFZ = análise inicial do diâmetro médio e Pdl de nanocápsulas contendo clofazimina; NC\*\* = nanocápsulas liofilizadas sem crioprotetor. \*p<0,001 vs NC-CFZ; #p<0,05 vs NC-CFZ..... 57

Figura 13 - Distribuição do tamanho das nanocápsulas de clofazimina antes da liofilização e após a liofilização com manitol 10 % (m/v). NC-CFZ = análise inicial do diâmetro médio e Pdl de nanocápsulas contendo

clofazimina; Manitol 10% (m/v) = análise do diâmetro médio das partículas após liofilização na presença do crioprotetor manitol na concentração de 10% (m/v)..... 57

Figura 14 – Curvas DSC de clofazimina (CFZ), poli(etileno carbonato) (PEC), mistura binária (PEC-CFZ) na proporção 1:1 m/m, nanocápsula branca (NC-branca), nanocápsula contendo o fármaco CFZ (NC-CFZ), manitol e formulação liofilizada de nanocápsula contendo o fármaco CFZ (NC-CFZ-liofilizada). ..... 58

Figura 15 - Diâmetro médio e índice de polidispersão (Pdl) de nanocápsulas de poli(etileno carbonato) (PEC) contendo clofazimina (CFZ), avaliados durante o estudo de estabilidade das nanocápsulas em meios biológicos simulados, sendo elas: solução de PBS pH 7,4, mucina 0,08% (m/v) e mucina 0,1% (m/v). **a/b)** solução PBS pH 7,4; **c/d)** solução de mucina 0,08% (m/v); **e/f)** solução de mucina 0,1% (m/v). \*p<0,05 vs NC-CFZ. .... 61

Figura 16 - Representação esquemática da trajetória percorrida em 5 segundos pelas nanopartículas na presença de: **A)** água, **B)** solução de mucina 0,08% (m/v) e **C)** solução de mucina 0,1% (m/v). ..... 62

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Valores da temperatura inicial ( $T_{onset}/^{\circ}C$ ), temperatura do pico ( $T_{pico}/^{\circ}C$ ) e energia de entalpia  $\Delta H$  (J/g) obtidas através de análises de DSC, da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m): CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA7525, CFZ-PLGA8515, CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico, CFZ-Lecitina. .... 24

Tabela 2 – Dados de temperatura inicial ( $T_{onset}$ ) e percentual de perda de massa da curva termogravimétrica (TG) e temperatura do pico ( $T_{pico}$ ) da derivada da curva termogravimétrica (DTG) da clofazimina e misturas binárias (1/1 m:m): CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA7525, CFZ-PLGA8515, CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico, CFZ-Lecitina..... 32

Tabela 3 - Componentes e suas respectivas quantidades utilizadas no desenvolvimento de formulações de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE) poliméricas pela técnica de nanoprecipitação..... 46

Tabela 4 - Diâmetro médio (nm) e Pdl das formulações de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE) brancas de poli(etileno carbonato) (PEC) preparadas pela técnica de nanoprecipitação. .... 52

Tabela 5 – Diâmetro médio (nm), índice de polidispersibilidade (Pdl) e eficiência de encapsulação das formulações de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE) contendo o fármaco clofazimina (CFZ). \* $p < 0,05$  vs nanopartícula branca; \*\* $p < 0,001$  vs nanopartícula branca. .... 54

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

ACI	<i>Andersen cascade impactor</i>
ACN	Acetonitrila
ALF	Artificial lysosomal fluid (fluido lisossomal artificial)
CFZ	Clofazimina
DAD	Detecção de arranjo de diodos
DPI	<i>Dry powder inhaler</i> (inalador de pó seco)
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (espalhamento dinâmico de luz)
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> (calorimetria exploratória diferencial)
DTG	Derivada termogravimétrica
EE	Eficiência de Encapsulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (instituição governamental americana responsável pelo controle de medicamentos e alimentos)
FTIR	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
HPMCAS	<i>Hypromellose acetate succinate</i> (acetato succinato de hipromelose)
HPMCP	<i>Hypromellose phthalate</i> (ftalato de hipromelose)
INH	Isoniazida
MDR-TB	Tuberculose multi-droga resistente
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMAD	<i>Mass median aerodynamic diameter</i> (diâmetro aerodinâmico médio de massa)
MS	Ministério da saúde
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
NPs	Nanopartículas
NTA	<i>Nanoparticles tracking analysis</i> (análise de rastreamento de partículas)
OMS	Organização mundial de saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (solução tampão fosfato-salino)
PdI	Índice de polidispersibilidade

PEC	Poli(etileno carbonato)
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
RR-TB	TB resistente à rifampicina
SLF	<i>Simulated lung fluid</i> (fluido pulmonar simulado)
TB	Tuberculose
TG	Análise termogravimétrica
UR	Umidade relativa do ar
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente a fármacos
ζ	Potencial zeta

## RESUMO

---

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, cujo tratamento pela via oral apresenta inconvenientes como efeitos colaterais sistêmicos e tratamento prolongado, diminuindo a adesão dos pacientes. O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para administração pela via pulmonar pode melhorar o tratamento da tuberculose, viabilizando o transporte do fármaco ao local de ação e o direcionamento aos macrófagos alveolares. O poli(etileno carbonato) (PEC) é um polímero biodegradável que possui degradação superficial, podendo ser utilizado para a liberação controlada de fármacos. Este polímero possui degradação específica pela enzima colesterol esterase e por macrófagos, sendo, portanto, interessante para a aplicação no tratamento da tuberculose. Os objetivos deste trabalho foram realizar um estudo de compatibilidade entre a clofazimina, fármaco utilizado no tratamento da tuberculose multi-droga resistente, e excipientes comumente utilizados para o preparo de nanossistemas poliméricos; e o desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas inaláveis de poli(etileno carbonato) contendo clofazimina. Através de análises de calorimetria diferencial exploratória, termogravimetria e espectroscopia de infravermelho, observou-se como principal interação a amorfização do fármaco na presença dos polímeros poli-ε-caprolactona (PCL), poli(D,L-lactídeo) (PLA), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal (75:25) (PLGA75:25) e poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal (85:15) (PLGA85:15), indicando que o fármaco interage com esses polímeros e altera sua característica cristalina. A solubilização do fármaco nos excipientes Span 60<sup>®</sup>, Span 80<sup>®</sup>, Span 85<sup>®</sup>, Poloxamer 188, Poloxamer 407, álcool polivinílico (PVA), Tween 80<sup>®</sup> e ácido oleico foi também observada. Essa característica é importante para o desenvolvimento das nanopartículas, já que aumenta a encapsulação do fármaco. Foram preparadas nanocápsulas e nanoesferas pela técnica de nanoprecipitação. As partículas foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio e índice de polidispersão (Pdl) pela técnica de espalhamento dinâmico de luz, eficiência de encapsulação (EE) por cromatografia líquida de alta eficiência, secagem por liofilização, análise térmica por calorimetria, estabilidade das nanopartículas em meios biológicos simulados e análise de rastreamento das partículas (NTA, *nanoparticle tracking analysis*). Foram desenvolvidas duas formulações de nanocápsulas com fármaco que apresentaram tamanho médio de 210 e 237 nm, Pdl 0,16 e eficiência de encapsulação (EE) de 65%. As nanoesferas com fármaco apresentaram tamanho médio de 196 e 438 nm, Pdl 0,43-0,30 e EE 46,85 e 53,95%. As formulações foram liofilizadas utilizando os crioprotetores sacarose, trealose e manitol, nas concentrações de 1,5%, 2,5%, 5%, 10% e 15% (m/v). Dentre os crioprotetores avaliados o manitol a 10% foi o que possibilitou melhor redispersibilidade das partículas após liofilização. Em estudo de estabilidade em solução tampão fosfato, mucina 0,08% e 0,1% (m/v), as partículas permaneceram estáveis sem apresentar agregação. A análise do rastreamento de mostrou que as nanopartículas apresentaram motilidade em mucina. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a viabilidade da produção de nanopartículas poliméricas para liberação local de clofazimina nos pulmões, e servirão como base para estudos mais aprofundados do sistema nanoparticulado desenvolvido, e avaliação da sua eficácia *in vitro*.

Palavras-chave: poli(etileno carbonato), clofazimina, *Mycobacterium tuberculosis*.

## ABSTRACT

---

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, whose oral treatment presents drawbacks such as systemic side effects and prolonged treatment, decreasing patient compliance. The development of polymeric nanoparticles for pulmonary administration can improve the treatment of tuberculosis, making it possible to transport the drug to the site of action and to target the alveolar macrophages. Poly(ethylene carbonate) is a biodegradable polymer with surface degradation which can be used for the controlled release of drugs. This polymer has specific degradation by the enzyme cholesterol esterase and by macrophages, being therefore interesting for the application in the treatment of tuberculosis. The aims of this work were to conduct a compatibility study between clofazimine, a drug used in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis, and excipients commonly used for the preparation of polymeric nanosystems; and the development and physico-chemical characterization of inhaled nanoparticles of poly(ethylene carbonate) containing clofazimine. Through the analysis of differential scanning calorimetry, thermogravimetry and infrared spectroscopy, the amorphization of the drug in the presence of the polymers, poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL), poly(D,L-lactide) (PLA), poly(D,L-lactide-co-glycolide)-alkyl ester (75:25) (PLGA75:25) and poly(D,L-lactide-co-glycolide)-ester (85:15) (PLGA85:15), indicating that the drug interacts with these polymers and alters its crystalline characteristic. The solubilization of the drug in the adjuvants Span 60<sup>®</sup>, Span 80<sup>®</sup>, Span 85<sup>®</sup>, Poloxamer 188, Poloxamer 407, polyvinyl alcohol (PVA), Tween 80<sup>®</sup> and oleic acid was also observed. This characteristic is important for the development of the nanoparticles, since it increases drug encapsulation. Nanocapsules and nanospheres were prepared by nanoprecipitation technique. The particles were characterized for their mean diameter and polydispersion index (PDI) by dynamic light scattering, encapsulation efficiency (EE) by high performance liquid chromatography, freeze-drying, thermal analysis by calorimetry, stability of nanoparticles in simulated biological fluids and nanoparticle tracking analysis (NTA). The two nanocapsules formulations showed average sizes of 210 and 237 nm, PDI 0.16 and EE of 65%. Nanospheres showed average size of 196 and 438 nm, PDI 0.43-0.30 and EE 46.85 and 53.95%. The formulations were freeze-dried using sucrose, trehalose and mannitol as cryoprotectants at 1.5%, 2.5%, 5%, 10% and 15% (w/v). Among the cryoprotectants evaluated, 10% mannitol allowed for the best particle redispersibility after freeze-drying. Particles remained stable without aggregation when incubated with PBS, 0.08% (w/v) mucin and 0.1% mucin (w/v). The nanoparticle tracking analysis showed that nanoparticles were able to move through the mucin. The results obtained in this work demonstrate the viability of producing polymeric nanoparticles for local release of clofazimine in the lungs, and will support further studies of the developed nanoparticulate system, and the in vitro evaluation of its activity.

**Key words:** poly(ethylene carbonate), nanotechnology, clofazimine, *Mycobacterium tuberculosis*.

# 1. INTRODUÇÃO

---

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta doença apresenta avanço progressivo, com incidência anual de 10 milhões de novos casos (WHO, 2018). Sua versão resistente a fármacos (MDR-TB, *multi-drug resistant tuberculosis*) é um grave problema de saúde pública que ameaça o controle mundial da doença (KURZ; FURIN; BARK, 2016). Como evidenciado pelo último levantamento sobre a tuberculose constatou um aumento do número de casos de MDR-TB em 2017, em comparação ao ano de 2016 (WHO, 2018).

O tratamento atualmente disponível para MDR-TB e tuberculose extensivamente resistente a fármacos (XDR-TB, *extensive resistant tuberculosis*) requer longo período e a utilização de medicamentos que apresentam efeitos tóxicos além dos terapêuticos. Este último fator provoca efeitos colaterais que levam a considerável taxa de abandono do tratamento pelos pacientes, com consequente aumento na taxa de mortalidade (DHEDA *et al.*, 2017).

Novas estratégias terapêuticas têm sido buscadas na tentativa de aumentar o sucesso do tratamento desta doença. Com o aumento de casos de MDR-TB e XDR-TB, tem-se investigado novos esquemas terapêuticos que sejam acessíveis, seguros e eficazes (PARUMASIVAM *et al.*, 2016). Adicionalmente, o desenvolvimento de novas formulações que visam um tratamento mais eficiente pode auxiliar na redução do número de casos da doença, assim como na adesão do paciente ao tratamento e na redução da seleção de novas cepas resistentes a múltiplos fármacos (BORGES *et al.*, 2017; PAI *et al.*, 2016).

O presente trabalho objetivou a obtenção de uma formulação otimizada para o tratamento da tuberculose. A hipótese testada no desenvolvimento deste trabalho foi a viabilidade de desenvolvimento de um pó seco inalável contendo nanopartículas poliméricas de poli(etileno carbonato) (PEC) encapsulando o fármaco clofazimina (CFZ), utilizado na terapia da MDR-TB. Esta hipótese foi motivada pela possível administração do pó diretamente nos pulmões, para proporcionar melhora na eficácia

terapêutica e redução da dose e frequência de administração. A razão para tal é que o polímero de escolha para o desenvolvimento da formulação, PEC, é degradado por erosão superficial pela ação de macrófagos e da enzima colesterol esterase (BOHR *et al.*, 2017; BOHR *et al.*, 2016). Sabendo-se que o *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular que infecta macrófagos alveolares (NASIRUDDIN; NEYAZ; DAS, 2017), o uso de um polímero com degradação específica por estas células é de grande interesse no tratamento desta doença.

Esta dissertação está organizada na forma de artigos científicos que serão submetidos individualmente para publicação. Após a apresentação do referencial teórico, que contém as informações necessárias para a compreensão dos elementos motivadores deste projeto, o primeiro artigo apresenta um estudo de compatibilidade da CFZ com diferentes polímeros e excipientes. Neste artigo, descrevemos as análises de compatibilidade entre a clofazimina e componentes que podem ser utilizados na obtenção de nanopartículas poliméricas, realizada a partir de técnicas de análise térmica e espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho. O segundo artigo apresenta os resultados obtidos durante o desenvolvimento e a caracterização físico-química da formulação, incluindo tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, secagem por liofilização e estabilidade e avaliação da motilidade das partículas em meios biológicos simulados.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente pó inalável contendo nanopartículas poliméricas encapsulando clofazimina para administração pulmonar.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a compatibilidade da clofazimina com excipientes que podem ser utilizados como componentes em formulações de partículas poliméricas, através das técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e espectroscopia de infravermelho (FTIR);
- Desenvolver e otimizar formulações de nanopartículas de PEC contendo o fármaco clofazimina;
- Caracterizar físico-quimicamente as nanopartículas por meio da avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersibilidade (PDI) e eficiência de encapsulação (EE);
- Preparar pós inaláveis, contendo as nanopartículas, pela técnica de liofilização e avaliar sua redispersibilidade após a liofilização;
- Avaliar as nanopartículas em estudo de estabilidade e análise de rastreamento de partículas (NTA, *nanoparticle tracking analysis*) em meios biológicos simulados.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

---

#### 3.1 Tuberculose, tratamento e clofazimina

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (WHO, 2018). O patógeno foi identificado e descrito em 1882 por Robert Koch, e por este motivo é também conhecido como Bacilo de Koch (PAI *et al.*, 2016).

A TB encontra-se entre as 10 principais causas de morte no mundo, sendo a primeira causa de mortalidade causada por agente infeccioso, acima até mesmo do HIV/AIDS. Segundo o último relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 1,7 bilhão de pessoas no mundo, ou seja, 23% da população mundial possui infecção latente por TB e pode desenvolver a forma ativa da doença durante a vida. O órgão estima que, mundialmente em 2017, 10 milhões de pessoas desenvolveram TB, e houve aproximadamente 1,3 milhão de mortes entre pessoas HIV-negativas e 300.000 mortes entre pessoas HIV-positivas (WHO, 2018).

O Brasil encontra-se entre os 20 países com maior incidência anual de TB e co-infecção entre TB/HIV (WHO, 2018). Em 2017, foram notificados no Brasil 69.569 novos casos de TB e em 2016 registrados 4.426 óbitos (BRASIL, 2018). Sendo assim, acredita-se que se faz necessária, após a avaliação da situação epidemiológica, a tomada de decisões para redução dos casos de TB no Brasil, por meio de estratégias focadas na prevenção e otimização do tratamento de pacientes infectados.

A transmissão do *M. tuberculosis* ocorre principalmente por via aérea, sendo o pulmão o principal órgão acometido pela doença (SOUZA; VASCONCELOS, 2005). Aproximadamente 80% dos pacientes com TB apresentam a forma pulmonar da doença (PANDEY; KHULLER, 2005). Devido ao seu reduzido tamanho, os bacilos da TB que alcançam os alvéolos são fagocitados por macrófagos (COSTA *et al.*, 2016), e por isso estas são as células alvo para tratamento da TB pulmonar (PAI *et al.*, 2016; SUKHITHASRI *et al.*, 2014).

Após a fagocitose do patógeno pelos macrófagos alveolares, o *M. tuberculosis* será exposto a mecanismos bactericidas sendo eles: intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, pH ácido, enzimas lisossomais e peptídeos tóxicos. Os macrófagos produzem enzimas proteolíticas e citocinas para a degradação do microrganismo patogênico. A liberação de citocinas atrai linfócitos T para o local e os granulomas são formados a fim de conter a infecção (PARUMASIVAM *et al.*, 2016).

Em casos em que o sistema imunológico do hospedeiro está debilitado, pode haver falha na formação do granuloma (PARUMASIVAM *et al.*, 2016). Os bacilos da TB podem impedir a formação do fagolisossoma, que é o mecanismo bactericida dos macrófagos. Eles então se multiplicam e podem alcançar o sistema circulatório e linfático, podendo acometer outros órgãos, causando a TB extrapulmonar (COSTA *et al.*, 2016). Os rins podem ser afetados, assim como o sistema linfático, sistema geniturinário, articulações e ossos, o sistema nervoso central, causando a meningite, e sistema circulatório, caracterizando a tuberculose miliar (NASIRUDDIN; NEYAZ; DAS, 2017).

O tratamento farmacológico é visto como a principal estratégia para a redução da morbimortalidade da TB no Brasil. A OMS preconiza que para alcançar redução significativa dos casos de TB, o índice de cura deve ser >90% e o de abandono <5%. Sabe-se, porém, que existem desafios relacionados à adesão ao tratamento pelos pacientes (BRASIL, 2017). Isso porque o tratamento da TB requer a combinação de mais de um fármaco por longo tempo (WHO, 2018). Atualmente, o principal esquema terapêutico consiste em associação de fármacos considerados de primeira escolha no tratamento. Isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA) são utilizadas durante dois meses, seguidas por quatro meses de tratamento com INH e RMP (ROSSETTI *et al.*, 2002; WHO, 2018). Os dois primeiros meses de tratamento, considerados como fase intensiva, irão prevenir a seleção de cepas resistentes, e os quatro meses seguintes, ou fase de continuação, irão garantir a manutenção do tratamento para evitar reativação da doença (esterilização) (COLE; ALZARI, 2007).

A resistência do bacilo aos medicamentos utilizados no tratamento da TB pode apresentar-se de diversas formas. A TB resistente à rifampicina

(RR-TB) não responde ao tratamento com a RMP, medicamento de primeira linha no tratamento da TB. A tuberculose multi-droga resistente (MDR-TB) é definida como resistência à INH e RMP, que são considerados os dois medicamentos anti-TB mais potentes (WHO, 2018). A TB extensivamente resistente a medicamentos, XDR-TB, define-se pela resistência às fluoroquinolonas (moxifloxacino, gatifloxacino, levofloxacino, ofloxacino) e a pelo menos um medicamento de segunda linha (amicacina, capreomicina ou canamicina) utilizado no esquema terapêutico de MDR-TB (JONES, 2013; WHO, 2018).

Estima-se que, em 2017, 558.000 pessoas desenvolveram RR-TB e MDR-TB mundialmente. Dentre os casos de MDR-TB, estima-se que 8,5% apresentaram XDR-TB e 18% dos casos de RR-TB ou MDR-TB foram originários de casos já previamente tratados (WHO, 2018).

Entre os pacientes diagnosticados com TB em 2016, a taxa de sucesso do tratamento foi de 82% (WHO, 2018). Já o tratamento da MDR-TB apresentou baixa taxa de sucesso, de aproximadamente 55%. O esquema terapêutico utilizado para o tratamento de MDR-TB é mais longo que o tratamento convencional, e apresenta toxicidade elevada (JONES, 2013). Sendo assim é necessária a avaliação da segurança desta farmacoterapia, principalmente relacionada à interação medicamentosa e em grupos de pacientes específicos, como crianças, idosos e gestantes (VJECHA; TIBERI; ZUMLA, 2018). Em casos de cepas RR-TB/MDR-TB ou abandono do tratamento, fármacos de segunda ou terceira linha podem ser introduzidos ao tratamento (WHO, 2018). Segundo o esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde (MS), o tratamento da MDR-TB pode se prolongar por 18 a 24 meses (BRASIL, 2011).

O regime terapêutico prolongado apresenta desafios relacionados à toxicidade do fármaco, eventos adversos graves e a adesão do paciente ao tratamento completo (COSTA *et al.*, 2016; HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015). Aproximadamente 16 a 49% dos pacientes acometidos pela doença não concluem o tratamento, sendo os principais motivos as reações adversas e o longo período de tratamento (HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015). Por isso, além do desenvolvimento de formulações que otimizem a terapia farmacológica, estratégias devem ser utilizadas para que

o tratamento seja corretamente finalizado, pois o abandono do tratamento pode levar à seleção de cepas resistentes aos fármacos e aumento da patogenicidade do *M. tuberculosis* (BORGES *et al.*, 2017; COLE; ALZARI, 2007; PAI *et al.*, 2016).

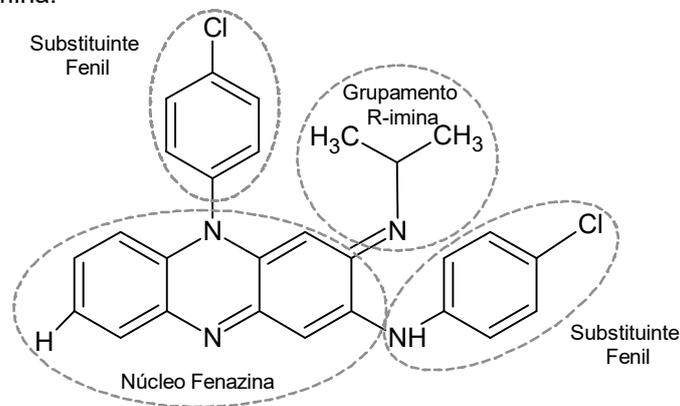
O tratamento convencional da TB é realizado, principalmente, pela via oral. Esta via possui limitações relacionadas à chegada do fármaco no pulmão, devido à baixa disponibilidade do fármaco no local da infecção. A terapia oral também apresenta como inconvenientes efeitos colaterais sistêmicos e reduzida absorção dos fármacos (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). Esta menor absorção pode ocasionar reduzida concentração plasmática no local da infecção, podendo levar à baixa eficácia terapêutica (HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015; PANDEY; KHULLER, 2005).

Na tentativa de melhorar a terapia da MDR-TB, novo regime terapêutico foi testado em 500 pacientes visando o aproveitamento dos medicamentos já disponíveis (AUNG *et al.*, 2014). O esquema terapêutico, que ficou conhecido como “Regime Bangladesh”, apresenta fase intensiva incluindo os medicamentos canamicina, clofazimina, gatifloxacina, etambutol, e alta dose de isoniazida, pirazinamida e protionamida administrada por 4 meses, ou até a negatificação da cultura micobacteriológica, seguida de uma fase de continuação por 5 meses com os fármacos clofazimina, gatifloxacina, etambutol e pirazinamida. Este regime terapêutico apresentou taxa de cura entre 82,5% e 84,5%, em estudos com 206 e 500 pacientes respectivamente (AUNG *et al.*, 2014; VAN DEUN *et al.*, 2010). A CFZ é um fármaco fundamental para o esquema terapêutico “Bangladesh”. Foi observado que o esquema contendo CFZ apresentou taxa de sucesso de 73,6% no tratamento, maior do que grupos que não utilizaram esse fármaco, com taxa de sucesso de 53,8% (KURZ; FURIN; BARK, 2016; TANG *et al.*, 2015).

A CFZ é um antibiótico derivado de riminofenazina, sintetizado pela primeira vez em 1957 para o tratamento de tuberculose (BARRY *et al.*, 1957), e que possui atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória (CHOLO *et al.*, 2012). Sua estrutura molecular principal é o núcleo de fenazina (Figura 1) e substituintes fenil e grupamento R-imina. O

grupamento R-imina é a estrutura fundamental para a atividade antimicobacteriana da CFZ (MIRNEJAD *et al.*, 2018).

Figura 1 – Representação da estrutura química da clofazimina e marcação dos principais grupos que compõe o fármaco, sendo eles: núcleo fenazina, substituintes fenil e grupamento R-imina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O mecanismo de ação da CFZ ainda não foi totalmente esclarecido, mas seu principal local de ação parece ser a membrana externa do patógeno (MIRNEJAD *et al.*, 2018). A CFZ causa desestabilização e disfunção da membrana da célula bacteriana, através do acúmulo de lisofosfolídeos que têm esse efeito devido a suas propriedades detergentes. Além disso, a CFZ e a presença dos lisofosfolídeos causam inibição da captação de K<sup>+</sup>, ocasionando posteriormente redução nos níveis de ATP (CHOLO *et al.*, 2012).

A CFZ atua também inibindo a cadeia respiratória e o transporte de íons do *Mycobacterium tuberculosis* (MIRNEJAD *et al.*, 2018). A cadeia respiratória da micobactéria oxida a CFZ no lugar do NADH e, conseqüentemente, há redução na produção e disponibilidade de ATP para a célula. Esta atividade antimicobacteriana baseada na oxidação da CFZ produz intermediários reativos de oxigênio (CHOLO *et al.*, 2012; MIRNEJAD *et al.*, 2018). Outro mecanismo que sustenta o efeito antimicobacteriano da CFZ é o aumento da fosfolipase A2 bacteriana e a liberação de lisofosfolídeos, produtos da hidrólise enzimática causada pelo fármaco, e que possuem toxicidade contra o *Mycobacterium tuberculosis*. (ARBISER; MOSCHELLA, 1995; MIRNEJAD *et al.*, 2018). A CFZ tem

comprovada atividade bactericida contra cepas de MDR-TB *in vitro* e *in vivo* (TANG *et al.*, 2015). Contudo, por ser altamente lipofílica (log P>7), sua biodisponibilidade por via oral é limitada a aproximadamente 40% (CHAVES *et al.*, 2018a; ZHANG *et al.*, 2017).

Devido à baixa taxa de eliminação, este fármaco apresenta meia vida prolongada, de 70 dias (CHAVES *et al.*, 2018a; LI *et al.*, 2016). Devido à lipofilicidade, apresenta bioacumulação no tecido adiposo, sistema mononuclear fagocitário, baço, vesícula biliar, rim, pâncreas, pele, fígado, baço, nódulos linfáticos e pulmão (CHAVES *et al.*, 2018a; CHOLO *et al.*, 2012). Sua administração por longo período pode causar eventos adversos como pigmentação marrom-avermelhada na pele, dor abdominal e cardiotoxicidade (LI *et al.*, 2016). O efeito colateral relacionado à pele é observado em 94,3% dos casos, e a icterícia em 47,2%. Estima-se que a pigmentação da pele que ocorre durante o tratamento é reversível (KURZ; FURIN; BARK, 2016), mas são necessários aproximadamente 2 anos após a finalização do tratamento para que a pigmentação normal seja reestabelecida (LI *et al.*, 2016). Outros efeitos como lesão hepática e eventos adversos gastrointestinais também têm sido associados ao fármaco (TANG *et al.*, 2015).

A dosagem diária de CFZ para o tratamento de MDR-TB por via oral varia de 50 a 100 mg/dia (CHOLO *et al.*, 2012; MIRNEJAD *et al.*, 2018), sendo de 50 mg/dia para crianças de até 35 kg e 100 mg/dia em adultos.

### **3.2 Administração pulmonar**

Diante das limitações relacionadas ao tratamento da TB por via oral, a utilização de vias de administração alternativas pode ser uma estratégia para otimizar o desempenho de medicamentos já existentes (COSTA *et al.*, 2016). A via de administração pulmonar apresenta-se como uma alternativa interessante para aumentar a concentração de fármaco no pulmão, sendo possível a redução da dose e frequência de administração, duração do tratamento, dos efeitos colaterais sistêmicos e prevenção da seleção de cepas MDR-TB (KUZMOV; MINKO, 2015; PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015).

Adicionalmente, a via pulmonar protege o fármaco de uma possível degradação pelo meio ácido estomacal e evita o metabolismo de primeira passagem (PARUMASIVAM *et al.*, 2016). Além disso, trata-se de uma via de administração não invasiva e que permite o direcionamento do fármaco aos macrófagos alveolares (COSTA *et al.*, 2016; PARUMASIVAM *et al.*, 2016).

Atualmente não há no mercado medicamentos inaláveis para tratamento da TB. Algumas hipóteses são discutidas em relação às dificuldades encontradas no tratamento por essa via de administração. Apesar de possuir benefícios em relação à via oral, o perfil de segurança da via pulmonar precisa ser considerado. É preciso avaliar a toxicidade local do medicamento quando em contato com os pulmões e os possíveis efeitos adversos dessa via de administração (COSTA *et al.*, 2016; PARUMASIVAM *et al.*, 2016). Ainda existem dúvidas em relação à estimativa de dose e frequência de administração, bem como a reprodutibilidade da dosagem e a variação de parâmetros que podem influenciar na deposição pulmonar, tais como: padrão respiratório, umidade relativa do ar (UR), morfologia e diâmetro da partícula, superfície, densidade e dispositivo inalatório escolhido (PARUMASIVAM *et al.*, 2016). Para que a inalação das formulações seja possível, um dispositivo preciso em relação à dose e de fácil manuseio é necessário (ANDRADE *et al.*, 2013). Os inaladores de pó seco (ou DPI, *dry-powder inhaler*) são dispositivos que são ativados pelo fluxo respiratório gerando o aerossol. Este dispositivo é capaz de administrar grandes doses e, em geral, apresenta baixo custo, podendo, portanto, ser considerado como um dispositivo adequado para utilização no tratamento da TB (PARUMASIVAM *et al.*, 2016).

O pó seco é a forma mais estável de formulações para administração pulmonar, sendo também menos susceptível à contaminação microbiana em relação às formulações líquidas (PARUMASIVAM *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2015). Os pós podem ser armazenados por longo prazo se acondicionados livre de umidade e protegidos da luz. Complementarmente, os inaladores de pó seco são de fácil manuseio e apropriados para a administração pulmonar de formulações contendo altas doses de fármaco (PARUMASIVAM *et al.*, 2016).

O pó para inalação deve possuir características que permitam deposição na região mais profunda do pulmão, a alveolar. Para isso as partículas do pó devem apresentar diâmetro aerodinâmico médio de massa (MMAD, *mass median aerodynamic diameter*) de 1 a 5  $\mu\text{m}$  (AZARMI; ROA; LOBENBERG, 2008; COSTA *et al.*, 2016; PARUMASIVAM *et al.*, 2016). O MMAD é a principal característica a ser considerada na caracterização do pó para administração pulmonar, já que indica a deposição pulmonar profunda (COSTA *et al.*, 2016). O tamanho de partícula nesta faixa irá permitir menor deposição orofaríngea, maior deposição pulmonar e consequentemente direcionamento aos macrófagos alveolares (BRUNAUGH *et al.*, 2017).

Após a administração do pó, as partículas serão transportadas com o ar inalado até que sejam depositadas ao longo do trato respiratório. Partículas maiores que 5  $\mu\text{m}$ , que são muito densas, ficam depositadas ao longo do trato respiratório superior e são posteriormente deglutidas ou eliminadas pelo *clearance* mucociliar. Já partículas menores que 1  $\mu\text{m}$  são exaladas durante a expiração logo após a administração (ANDRADE *et al.*, 2013; PANDEY; KHULLER, 2005).

A coerência do uso da via pulmonar para administração de CFZ está em que, devido à sua hidrofobicidade, ela apresenta meia vida longa e pode ficar acumulada nos tecidos e apresentar alto grau de toxicidade quando administrada pela via oral. A via pulmonar pode diminuir os principais efeitos colaterais relacionados com sua administração, tais como desconfortos gastrointestinais e dermatológicos (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013). A utilização de micropartículas de CFZ inaladas já foi relatada como eficaz para tratamento *in vivo* de TB (VERMA *et al.*, 2013). Formulações de micropartículas de pó seco inalável contendo CFZ (CFZ-DPI) e CFZ livre administrada pela via oral foram comparadas, avaliando a atividade da CFZ contra *M. tuberculosis* em culturas de macrófagos e em camundongos infectados com bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando aerossol. *In vitro* houve morte de 99% das bactérias na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de fármaco. *In vivo*, em camundongos tratados com CFZ-DPI nas concentrações de 480 e 720  $\mu\text{g}$  por animal, duas vezes por semana durante 4 semanas, o tratamento reduziu o número de colônias bacterianas nos pulmões. A partir desses estudos concluiu-se que CFZ administrada pela via

pulmonar demonstrou eficácia *in vivo*, mas que a dose ideal e duração do tratamento deveriam ser melhor investigados (VERMA *et al.*, 2013; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

Em um estudo comparativo de administração da CFZ pelas vias pulmonar e oral, observou-se que o fármaco apresentou alta susceptibilidade para a fagocitose por macrófagos, pois partículas insolúveis que são depositadas na região alveolar são fagocitadas por estas células. Partículas de pó seco contendo CFZ, quando administradas pela via pulmonar, são absorvidas quase totalmente. O direcionamento do fármaco pela via pulmonar possibilita alcançar mais rapidamente doses bactericidas dentro dos macrófagos e conseqüentemente diminuir o tempo de terapia (BRUNAUGH *et al.*, 2017).

### **3.3 Nanopartículas para administração pulmonar**

Nanopartículas podem ser usadas como sistemas de transporte de fármacos em escala nanométrica, ou seja, de 1 a 1000 nm (COSTA *et al.*, 2016). A nanotecnologia é capaz de modular e melhorar o desempenho dos fármacos de forma que não é possível alcançar com formulações convencionais (ANDRADE *et al.*, 2013).

Para tal, nanopartículas formuladas para administração pulmonar devem possuir características específicas de composição da formulação, forma e tamanho de partícula (YHEE; IM; NHO, 2016). Avanços no desenvolvimento de novas formas de administração de fármacos e formulações contendo sistema nanoestruturados têm sido descritos para o direcionamento de fármacos aos macrófagos alveolares (SUKHITHASRI *et al.*, 2014). O direcionamento específico de nanopartículas a estas células aumenta a capacidade bactericida do fármaco contra patógenos intracelulares, como é o caso do *M. tuberculosis* (ANDRADE *et al.*, 2013).

Formulações contendo fármacos nanoencapsulados são consideradas como candidatas para tratamento da TB, pois podem aumentar a eficácia terapêutica e minimizar a possibilidade de seleção de cepas resistentes (LI *et al.*, 2016; SUKHITHASRI *et al.*, 2014). A utilização

de nanotecnologia pela via pulmonar possibilita o aumento da concentração do fármaco nos pulmões e mais especificamente nos macrófagos alveolares, redução dos efeitos colaterais sistêmicos, menor frequência de administração e conseqüentemente melhor adesão do paciente ao tratamento, aumento da eficácia terapêutica e redução da seleção de cepas MDR-TB (COSTA *et al.*, 2016; SUKHITHASRI *et al.*, 2014).

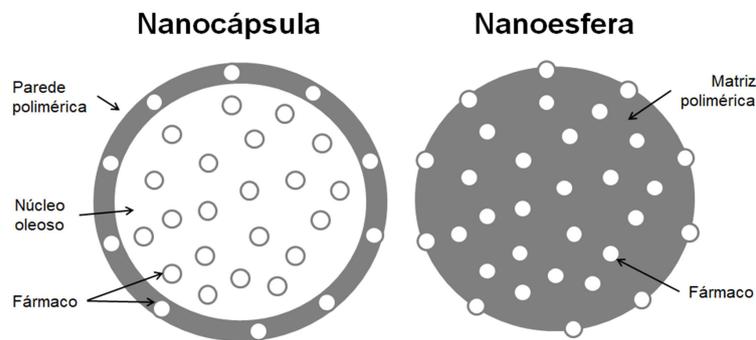
Formulações contendo nanopartículas, comparadas ao fármaco em formulações/sistemas convencionais, podem aumentar a solubilidade de fármacos lipofílicos, além de promover proteção do fármaco contra degradação. A encapsulação em nanopartículas pode ainda promover liberação controlada e/ou prolongada do ativo encapsulado, com direcionamento específico para células ou órgãos alvo, melhorar a biodisponibilidade do fármaco, ou aumentar sua concentração no local da infecção, reduzir efeitos colaterais sistêmicos e diminuir a frequência de administração (ANDRADE *et al.*, 2013; AZARMI; ROA; LOBENBERG, 2008; SUKHITHASRI *et al.*, 2014).

### **3.4 Nanopartículas poliméricas e PEC**

Nanopartículas poliméricas têm sido utilizadas para o encapsulamento de fármacos lipossolúveis e com baixa biodisponibilidade por via oral (CHAVES *et al.*, 2018a). Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis são ótimos candidatos para o desenvolvimento de formulações para inalação (PARUMASIVAM *et al.*, 2016).

As principais estruturas poliméricas de nanopartículas são conhecidas como nanoesferas (NE) e nanocápsulas (NC) (Figura 2). As NE são partículas esféricas formadas por uma matriz polimérica, em que o fármaco fica disperso na matriz (SINGH; GARG; SHARMA, 2010). As NC são sistemas compostos por involucro polimérico formando uma membrana, e o fármaco pode ser encapsulado em núcleo oleoso e pode também estar adsorvido à membrana polimérica (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsula e nanoesfera poliméricas. Nanocápsulas composta por parede polimérica e fármaco dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido na parede polimérica. Nanoesferas composta por matriz polimérica e fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Sistemas de liberação poliméricos oferecem potencial direcionamento do fármaco, podendo apresentar liberação controlada do agente terapêutico devido à degradação polimérica controlada. O poli(etileno carbonato) (PEC) é um polímero biodegradável, que tem sido recentemente utilizado em formulações de liberação controlada e no direcionamento a macrófagos infectados (BOHR *et al.*, 2016; STOLL *et al.*, 2001). O PEC apresenta degradação na presença de ânions superóxidos, substância produzida em quantidade expressiva por macrófagos (LOHMANN-MATTHES; STEINMULLER; FRANKE-ULLMANN, 1994; STOLL *et al.*, 2001). Este polímero apresenta degradação superficial, diferente de outros cuja degradação ocorre por erosão em massa. A degradação superficial libera de forma gradativa o fármaco incorporado na matriz polimérica. Polímeros que apresentam degradação superficial têm demonstrado cinética de liberação mais previsível e controlada se comparados com degradação por erosão em massa (BOHR *et al.*, 2017).

O PEC apresenta também degradação desencadeada pela enzima colesterol esterase e por macrófagos/polimorfonucleares. A utilização do PEC em nanopartículas contendo os fármacos utilizados na terapêutica da TB permite direcionar o fármaco aos macrófagos. O polímero é degradado localmente, liberando de forma gradativa o fármaco incorporado na matriz polimérica, levando à eliminação do patógeno das células infectadas (BOHR *et al et al.*, 2017).

### 3.5 Estudos de compatibilidade no desenvolvimento de sistemas poliméricos nanoestruturados

Os estudos de pré-formulação são essenciais durante a etapa de desenvolvimento de uma formulação. Avaliar a interação fármaco-excipientes torna possível o desenvolvimento racional e auxilia na seleção dos excipientes adequados. Esta avaliação de compatibilidade pode esclarecer possíveis interações físicas e químicas entre fármaco-excipiente (GAO *et al.*, 2015; KAUR; GOINDI; KATARE, 2016; SILVA *et al.*, 2016; VERMA; GARG, 2005). A incompatibilidade do fármaco com algum dos excipientes da formulação pode levar a problemas relacionados à estabilidade e biodisponibilidade da formulação, segurança e eficácia do medicamento (GAO *et al.*, 2015; KAUR; GOINDI; KATARE, 2016; TIJA *et al.*, 2011; VERMA; GARG, 2005). Os principais tipos de incompatibilidade química são hidrólise ou oxidação do fármaco promovida por excipientes e reação covalente fármaco-excipiente (CUNHA-FILHO; MARTÍNEZ-PACHECO; LANDÍN, 2007; GAO *et al.*, 2015).

Essas interações químicas e/ou físicas entre fármaco-excipiente, estudadas durante o desenvolvimento, podem levar à degradação do fármaco. Sendo assim, análises termoanalíticas, como pelas técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG), podem ser utilizadas para avaliar as interações entre esses componentes, antecipando problemas de estabilidade que podem ser causados por incompatibilidades (CHADHA; BHANDARI, 2014; ROSASCO *et al.*, 2018).

As técnicas de TG e DSC têm sido muito usadas para análise de compatibilidade em estudos farmacêuticos, apresentando a vantagem de utilização de pequena quantidade de amostra (MATOS *et al.*, 2017). A análise de compatibilidade entre fármaco-excipiente pode ser feita pela escolha de indicadores específicos de interação (CHADHA; BHANDARI, 2014; GAO *et al.*, 2015). A DSC é uma técnica usada para determinar características como entalpia, calor de fusão e calor específico. Estudos utilizando DSC apresentam resultados indicativos de interações e compatibilidade do fármaco com possíveis componentes de uma formulação de nanopartículas poliméricas (SUN *et al.*, 2018). A análise de TG/DTG

avalia quantitativamente a perda de massa das amostras, relacionada à decomposição, evaporação ou fusão em função da temperatura (MATOS *et al.*, 2017; ZAYED; FAHMEY; HAWASH, 2005). Também utilizada em estudos de compatibilidade, a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) pode ser utilizada para avaliação da interação entre fármaco-excipiente. Esta técnica permite a detecção de interações em mistura binárias, que podem ser observadas quando há redução na intensidade, desaparecimento ou surgimento de novos picos (LILTROP *et al.*, 2011; ROSASCO *et al.*, 2018).

Por meio do estudo de compatibilidade da CFZ com os excipientes e desenvolvimento de formulação de sistema polimérico para administração pulmonar, espera-se que seja possível otimizar o tratamento da TB com consequente redução dos efeitos colaterais, número de dose e tempo de tratamento, uma vez que o fármaco será administrado diretamente no órgão alvo. Espera-se que o desenvolvimento de um novo sistema de liberação seja eficaz na adesão ao tratamento por pacientes, aumento o índice de cura da doença e diminuindo a seleção de cepas de MDR-TB.

#### 4. Avaliação de compatibilidade entre clofazimina e excipientes utilizados no desenvolvimento de partículas poliméricas de liberação controlada

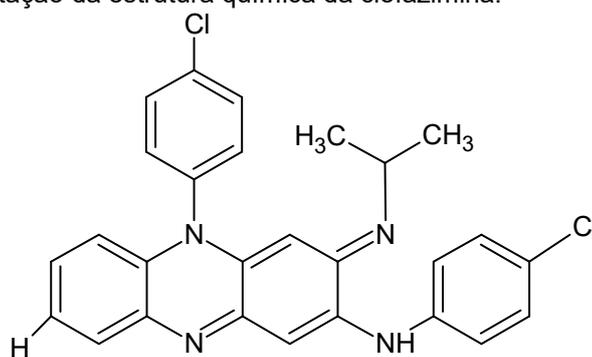
*Esta seção está organizada na forma de artigo para submissão à revista Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.*

*Autores: Danielle Flávia da Silva Ribeiro, Luís Antônio Dantas Silva, Marco Júnio Peres-Filho, Eliana Martins Lima, Thais Leite Nascimento*

##### 4.1. Introdução

A clofazimina (CFZ), quimicamente conhecida como 3-(p-chloroanilino-10-(p-chlorophenyl))-2,10-dihydro-2-(isopropylimino)-phenazine (Figura 3), é um derivado de iminofenazina que foi originalmente descrita em 1957 (BARRY *et al.*, 1957). Este fármaco é utilizado como antimicobacteriano e anti-inflamatório, e possui atividade contra cepas de tuberculose multidroga resistente (MDR-TB, *multi-drug resistant tuberculosis*) (CHOLO *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2015). A CFZ é altamente hidrofóbica, praticamente insolúvel em água, solúvel na proporção de 1 parte em 700 de etanol, 1 em 15 de clorofórmio e 1 em 1000 de éter, e solúvel também em ácido acético diluído e dimetilformamida (O'DRISCOLL; CORRIGAN, 1992). Sua partição orgânico/aquosa em 1-octanol:água (logP) é de aproximadamente 7,48 e seu pKa 8,35 (O'CONNOR; O'SULLIVAN; O'KENNEDY, 1995).

Figura 3 – Representação da estrutura química da clofazimina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Essas características físico-químicas da CFZ influenciam em sua biodisponibilidade oral, de aproximadamente 40% (CHAVES *et al.*, 2018a; ZHANG *et al.*, 2017). Efeitos colaterais relacionados ao tratamento com CFZ, como pigmentação marrom-avermelhada na pele, lesão hepática, dor abdominal e cardiotoxicidade, levam ao abandono do tratamento (LI *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2015). Por esta razão, novas tecnologias para o transporte de fármacos lipofílicos, como a CFZ, têm sido estudadas (CHOLO *et al.*, 2012), como sistemas poliméricos, incluindo nanoestruturas (BAILLY *et al.*, 2012; CHAVES *et al.*, 2018a; FENG *et al.*, 2018; HERNANDEZ-VALDEPEÑA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2017) e dispersões sólidas (NARANG; SRIVASTAVA, 2002; NIE *et al.*, 2016); lipossomas (BORNER *et al.*, 1999; PATEL; MISRA, 1999) e nanossuspensões (PETERS *et al.*, 2000). Uma variedade de polímeros está incluída nestes diferentes sistemas de liberação de fármacos: acetato succinato de hipramelose (HPMCAS, *hypromellose acetate succinate*) (FENG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017), ftalato de hipromelose (HPMCP, *hypromellose phthalate*) (NIE *et al.*, 2016), polietilenoglicol (PEG) (NARANG; SRIVASTAVA, 2002), polivinilpirrolidona (PVP) (NARANG; SRIVASTAVA, 2002), poloxamer 188 (PETERS *et al.*, 2000) e copolímero de bloco polivinilpirrolidona-acetato de polivinila (BAILLY *et al.*, 2012). Outros componentes também utilizados nos sistemas mencionados foram lecitina (FENG *et al.*, 2018; PATEL; MISRA, 1999; PETERS *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2017) e colesterol (PATEL; MISRA, 1999; PETERS *et al.*, 2000).

Os polímeros utilizados para o preparo de nanopartículas devem ser biodegradáveis. Os mais comumente utilizados em formulações são poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), poli (ácido láctico) (PLA), e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). O polímero poli(etileno carbonato) (PEC), tem sido recentemente explorado para o desenvolvimento de formulações terapêuticas (BOHR *et al.*, 2016).

Incompatibilidades entre fármacos e excipientes podem gerar problemas relacionados à estabilidade, biodisponibilidade, segurança e eficácia da formulação (GAO *et al.*, 2015; KAUR; GOINDI; KATARE, 2016; TIJA *et al.*, 2011; VERMA; GARG, 2005). Por isso, durante a etapa inicial

de desenvolvimento de uma formulação é importante que sejam realizados estudos de interação entre o fármaco e os candidatos a excipientes da formulação. A avaliação de compatibilidade da CFZ é importante na escolha dos componentes que podem ser utilizados em formulações de nanopartículas poliméricas possibilitando a escolha racional dos componentes de uma formulação. Para avaliar esse tipo de interação diferentes técnicas têm sido utilizadas. Dentre elas, as análises térmicas (DSC/TG-DTG) e espectroscópicas (FTIR) são bastante exploradas com intuito de verificar e antecipar possíveis interações que podem levar a problemas de estabilidade da forma farmacêutica final (CHADHA; BHANDARI, 2014; ROSASCO *et al.*, 2018).

Neste estudo foram avaliadas interações da CFZ com os polímeros PEC, PCL, PLA e PLGA, os adjuvantes Span60<sup>®</sup>, Span80<sup>®</sup>, Span85<sup>®</sup>, Poloxamer 188, Poloxamer 407, álcool polivinílico (PVA), Tween80<sup>®</sup>, fosfatidilcolina de soja e ácido oleico, utilizados para o preparo de sistemas de liberação poliméricos. Além da DSC, as técnicas de análise termogravimétrica (TG) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram usadas como ferramentas complementares para auxiliar na interpretação dos resultados.

## **4.2. Material e métodos**

### **4.2.1. Materiais**

CFZ (#SLBL8945V), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) (#07327ME), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo (50:50) (PLGA 50:50) (1088k1369), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal (75:25) (PLGA 75:25) (#STBC3237V), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal (85:15) (PLGA 85:15) (47697LJ), poli(D,L-lactídeo) (PLA) (029K1150), Pluronic<sup>®</sup>F127 (PLX407) (#027K0034), Pluronic<sup>®</sup>F68 (PLX188) (#129K0055), Span<sup>®</sup>60 (monoestearato de sorbitano) (#120M0013V), Span<sup>®</sup>80 (monooleato de sorbitano) (#MKBJ8089V) e Span<sup>®</sup>85 (trioleato de sorbitano) (#MKBW2058V) foram adquiridos da Sigma-Aldrich LTDA (Brasil). Álcool polivinílico P.S (PVA) (1207553) e Tween<sup>®</sup>80 (polissorbato 80) (1201802)

foram adquiridos da Vetec Química Fina LTDA (Brasil). Poli(etileno carbonato) QPAC<sup>®</sup>25 (PEC) (15083-01) foi adquirido da Empower material (Estados Unidos). Lipoid<sup>®</sup>S100 (fosfatidilcolina da soja) (579001160709-01/023) foi adquirida da Lipoid GMBR (Estados Unidos). Ácido oleico (IQA0283-11) foi adquirido da Indústria Química Anastácio (Brasil).

#### **4.2.2. Preparo das misturas físicas**

As misturas binárias foram preparadas na proporção de 1:1 (m/m) de CFZ com os polímeros PEC, PCL, PLA, PLGA 50:50, PLGA 75:25 e PLGA 85:15 e os adjuvantes Span<sup>®</sup>60, Span<sup>®</sup>80, Span<sup>®</sup>85, PLX188, PLX407, PVA, Tween<sup>®</sup>80, ácido oleico e lecitina. As substâncias foram pesadas individualmente e transferidas para microtubos de 1,5 mL, em que foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto. A CFZ, os excipientes isolados e as misturas binárias foram submetidos às análises por DSC, TG e FTIR.

#### **4.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As curvas de DSC da CFZ, dos excipientes isolados e das misturas binárias fármaco-excipiente (1:1 m/m) foram obtidas no equipamento DSC-60A (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão). Cerca de 2-3 mg de cada amostra foram colocados em cadinho de alumínio selado, e a análise foi realizada na faixa de temperatura de 25 a 400 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de 50 mL/min em atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>). As curvas DSC foram plotadas utilizando o software TA-60Ws Collection Monitor.

#### **4.2.4. Análise Termogravimétrica (TG/DTG)**

As curvas termogravimétricas (TG) e as derivadas termogravimétricas (DTG) da CFZ, dos excipientes isolados e das misturas binárias fármaco-excipiente (1:1 m/m) foram realizadas utilizando o equipamento DTG-60 Simultaneous DTA-TG Apparatus (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão). Cerca de 4-5 mg das amostras foram colocados em cadinho de platina e as análises foram

realizadas na faixa de temperatura de 25 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. As análises foram realizadas sob fluxo de 50 mL/min em atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>). As curvas TG/DTG foram plotadas utilizando o software TA-60Ws Collection Monitor.

#### **4.2.5. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de FTIR da CFZ, dos excipientes isolados e das misturas binárias fármaco-excipiente (1:1 m/m) foram avaliados para estudo de possíveis interações químicas entre o fármaco e materiais que podem ser utilizadas na formulação de nanopartículas poliméricas. Os espectros de infravermelho foram obtidos usando o equipamento Bruker Vertex 70<sup>®</sup>. As amostras foram analisadas usando o acessório ATR-FTIR e o resultado obtido pela combinação de 64 scans, em número de onda de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup> e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.

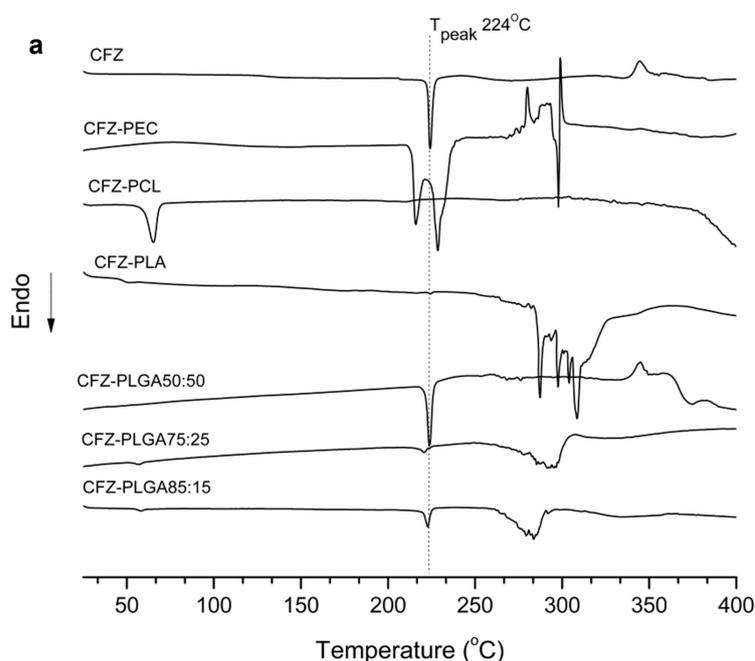
Foi realizada uma análise comparativa entre o espectro teórico e o experimental das misturas binárias, a fim de avaliar a diferença entre os espectros através da correlação de Pearson (*r*). O espectro teórico foi construído através de combinação linear dos espectros experimentais do fármaco e dos excipientes, e foi posteriormente comparado com o espectro experimental da mistura fármaco-excipiente na proporção 1:1 (m/m). A alta correlação entre os espectros, entre 0,8 e 1,0, indica uma mistura física simples dos componentes, ou seja, sobreposição dos eventos encontrados com os espectros das substâncias isoladas. Correlações moderadas, entre 0,5 e 0,8, indicam possíveis alterações comparadas aos espectros das substâncias isoladas, sugerindo a ocorrência de interações, e valores abaixo de 0,5 indicam baixa similaridade entre os espectros das substâncias avaliadas, ou seja, uma forte interação entre elas (BEZERRA *et al.*, 2017; DEVORE, 1995; SILVA *et al.*, 2016a).

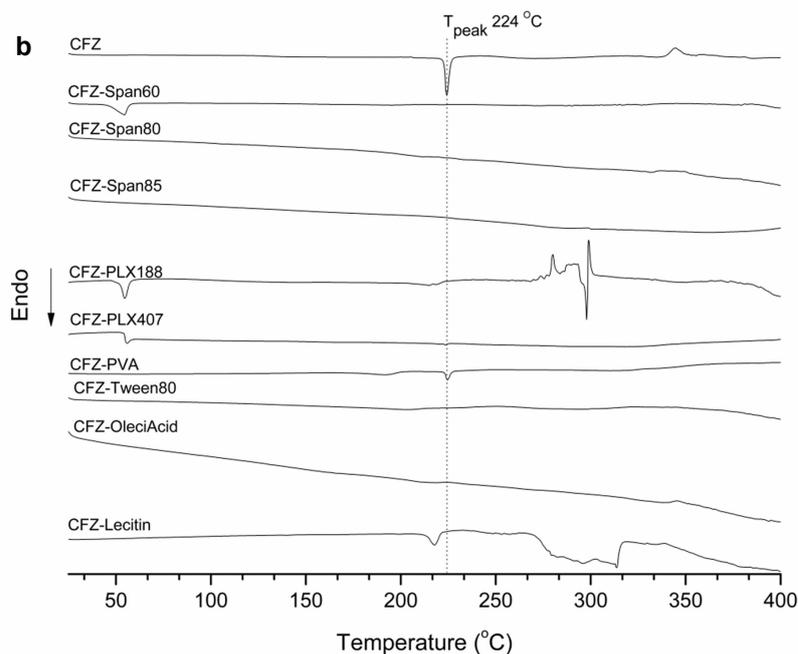
### 4.3. Resultados e discussão

#### 4.3.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os estudos de DSC foram conduzidos neste trabalho para avaliar a interação da CFZ com excipientes comumente utilizados no preparo de diferentes formulações farmacêuticas, incluindo dispersões sólidas, sistemas poliméricas e nanoestruturados. As curvas de DSC da CFZ e das misturas binárias fármaco-excipiente (1:1 m/m) podem ser observadas nas Figuras 4a e 4b.

Figura 4 - Curvas de DSC de clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes polímeros: **a)** CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, e CFZ-PLGA85:15 e com diferentes excipientes: **b)** CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico, e CFZ-Lecitina. CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli-ε-caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA 50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA 75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25, PLGA 85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic®F68, PLX407 = Pluronic®F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja





A temperatura inicial de fusão ( $T_{\text{onset}}/^{\circ}\text{C}$ ), temperatura máxima do evento de fusão ( $T_{\text{pico}}/^{\circ}\text{C}$ ) e a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) do fármaco clofazimina (CFZ) e das misturas binárias com os polímeros poli(etileno carbonato) (PEC), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), poli(D,L-lactídeo) (PLA), poli(D,L-lactídeo-co-glicolideo)-lactídeo:glicolídeo 50:50 (PLGA 50:50), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25 (PLGA 75:25), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15 (PLGA 85:15) e adjuvantes monoestearato de sorbitano (Span<sup>®</sup>60), monooleato de sorbitano (Span<sup>®</sup>80), trioleato de sorbitano (Span<sup>®</sup>85), Pluronic<sup>®</sup>F68 (PLX188), Pluronic<sup>®</sup>F127 (PLX407), álcool polivinílico (PVA), polissorbato 80 (Tween<sup>®</sup>80), ácido oleico e lecitina (fosfatidilcolina da soja), estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores da temperatura inicial ( $T_{onset}/^{\circ}\text{C}$ ), temperatura do pico ( $T_{pico}/^{\circ}\text{C}$ ) e energia de entalpia  $\Delta H$  (J/g) obtidas através de análises de DSC, da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m): CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, CFZ-PLGA85:15, CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico, CFZ-Lecitina.

Amostra	DSC		
	$T_{onset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{pico}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H$ (J/g)
CFZ	223	224	-71
CFZ-PEC	214/ 226	216/ 229	-66/-159
CFZ-PCL	-	-	-
CFZ-PLA	222	224	-0,54
CFZ-PLGA 50:50	222	224	-55
CFZ-PLGA 75:25	218	221	-9
CFZ-PLGA 85:15	221	223	-23
CFZ-Span60	-	-	-
CFZ-Span80	-	-	-
CFZ-Span85	-	-	-
CFZ-PLX188	-	-	-
CFZ-PLX407	-	-	-
CFZ-PVA	223	225	-18
CFZ-Tween80	-	-	-
CFZ-Ác Oleico	-	-	-
CFZ-Lecitina	214	218	-51

CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli- $\epsilon$ -caprolactona, PLA= poli(D,L-lactídeo), PLGA 50:50= poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA 75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25, PLGA 85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85= trioleato de sorbitano, PLX188= Pluronic<sup>®</sup>F68, PLX407 = Pluronic<sup>®</sup>F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, e Lecitina= fosfatidilcolina da soja.

A CFZ apresentou pico endotérmico estreito e bem definido em 224  $^{\circ}\text{C}$  (Figura 4) e energia de entalpia ( $\Delta H$ ) de -71 J/g (Tabela 1). O evento endotérmico de fusão do fármaco começa em 223  $^{\circ}\text{C}$  ( $T_{onset}$ ) e finaliza em 226  $^{\circ}\text{C}$  ( $T_{endset}$ ). Curva endotérmica de fusão com pico agudo geralmente é indicativo de fase sólida pura (BOLLA; NANGIA, 2012). Relatos da literatura descrevem picos de fusão da CFZ a 219,5  $^{\circ}\text{C}$  (BOLLA; NANGIA, 2012), 220  $^{\circ}\text{C}$  (BRUNAUGH *et al.*, 2017), 224  $^{\circ}\text{C}$  (CHAVES *et al.*, 2018b) e 228  $^{\circ}\text{C}$  (CHAVES *et al.*, 2018c). Estas variações na resposta térmica dependem das condições de avaliação, como por exemplo, a taxa de aquecimento e volume de amostra utilizada na análise (KAWAKAMI, 2018). A análise da CFZ que obteve mesma temperatura de fusão deste trabalho (224  $^{\circ}\text{C}$ ) foi conduzida

nas mesmas condições, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e peso da amostra de 1-2 mg (CHAVES *et al.*, 2018b).

O perfil de DSC da mistura binária CFZ-PEC apresentou dois eventos endotérmicos consecutivos, com  $T_{\text{pico}}$  em 216 °C e 229 °C. O primeiro pico endotérmico apresentou  $T_{\text{onset}}$  em 214 °C e  $\Delta H = -66$  J/g, já o segundo pico apresentou  $T_{\text{onset}}$  em 226 °C e  $\Delta H = -159$  J/g. Tendo em vista o pico das substâncias avaliadas separadamente, bem como o valor de  $\Delta H$  da mistura binária, pode-se observar deslocamento e sobreposição dos picos do PEC e do fármaco.

O polímero PCL apresentou pico endotérmico em 65 °C (curva apresentada no material suplementar), valor próximo aos descritos na literatura (DORATI *et al.*, 2018). Não foi possível identificar o pico referente à CFZ na mistura binária CFZ-PCL, possivelmente devido à amorfização da CFZ quando na presença de PCL. Esta amorfização do fármaco na presença do polímero pode influenciar na taxa de dissolução do fármaco e melhorar a sua solubilidade (CHOLO *et al.*, 2012). Uma dispersão sólida polimérica amorfa de ftalado de HPMC e CFZ já foi relatada, e neste caso a carga de fármaco foi melhorada (NIE *et al.*, 2016).

O PLA apresentou pico endotérmico em 54 °C (curva apresentada no material suplementar). O pico do PLA como substância simples é confirmado por dados já relatados anteriormente (DORATI *et al.*, 2018). Na mistura binária CFZ-PLA foi possível observar quase que completo desaparecimento do evento referente ao pico de fusão do fármaco, mostrando  $\Delta H$  de  $-0,54$  J/g. Este resultado também pode sugerir a conversão do fármaco para a forma amorfa na presença do polímero (DORATI *et al.*, 2018). Esse tipo de conversão já foi relatada (BAILLY *et al.*; NIE *et al.*, 2016).

O perfil de DSC de PLGA 50:50 apresentou pico endotérmico a 43 °C (curva apresentada no material suplementar). O evento térmico da CFZ na mistura binária (1:1 m/m) com o PLGA 50:50 não apresentou mudanças no formato, intensidade e temperatura de fusão ( $T_{\text{onset}}$  e  $T_{\text{pico}}$ ). Geralmente, ao analisar misturas binárias pode haver diminuição ou aumento de  $\Delta H$ , porém estas variações podem ocorrer em misturas binárias devido a heterogeneidade nas amostras (ROSASCO *et al.*, 2018; VERMA; GARG, 2005). Comparando a curva da mistura binária com o pico de fusão

da CFZ analisada individualmente ( $T_{\text{pico}}$  224 °C), sugere-se que não há interação entre este polímero e o fármaco. Conforme observado por dados anteriormente descritos na literatura, em uma mistura física entre CFZ-PLGA50:50-PVA foi possível observar o pico de fusão do fármaco a 224 °C, sugerindo que não houve variação da forma cristalina do fármaco na mistura (CHAVES *et al.*, 2018a). A análise da mistura binária CFZ-PLGA85:15 mostrou pico de fusão de CFZ a 223 °C e uma entalpia corresponde de -23 J/g (Tabela 1). Por esta razão, não houve evidencia de interação entre a CFZ e PLGA50:50 e PLGA85:15.

O perfil de DSC de PLGA 75:25 apresentou pico endotérmico a 57 °C (curva apresentada no material suplementar). Quando em mistura binária com este polímero, a CFZ apresentou pico de fusão a 221 °C, com  $\Delta H = -9$  J/g, sugerindo interação com este polímero.

É importante observar que em formulações de micro/nanopartículas de polímero, a quantidade de fármaco é menor do que a quantidade de polímero usado para o seu encapsulamento. Possivelmente a cristalinidade reduzida da CFZ observada em mistura binárias 1:1 (m/m), CFZ:PLGA75:25, ocorrerá completamente em sistemas de liberação de fármacos com menor razão fármaco:polímero. Um estudo termoanalítico com nanopartículas de PLGA mostrou uma capacidade de amorfização ou desordem da fase cristalina do fármaco presente na matriz polimérica (MAINARDES *et al.*, 2006). Neste trabalho, apesar da alteração da estrutura cristalina do fármaco, é possível verificar através dos dados obtidos pelo FTIR que a CFZ manteve sua estrutura molecular.

O pico de fusão da CFZ nas misturas binárias CFZ-PEC, CFZ-PLGA50:50 e CFZ-PLGA85:15 é nítido e aparece na temperatura esperada. Particularmente, as curvas de DSC das misturas binárias contendo PLGA 50:50 e PLGA 85:15 combinam as características das curvas de DSC de cada componente avaliado separadamente. Sendo assim, estes polímeros parecem ser compatíveis com a CFZ. Por outro lado, os picos endotérmicos de fusão das misturas binárias CFZ-PLA e CFZ-PLGA75:25 exibem menores valores de  $\Delta H$ , confirmando a menor cristalinidade do fármaco nessas misturas. A amorfização de CFZ na presença desses

polímeros, indicada por DSC, pode ser confirmada pela técnica de difração de raio-X.

As curvas das misturas binárias CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407 e CFZ-Tween80 não apresentaram o pico referente à CFZ (Figura 4b), sugerindo a dissolução do fármaco pelos tensoativos (CHAVES *et al.*, 2018b; KAWAKAMI, 2018). Essa interação está relacionada à solubilidade do fármaco na formulação.

A análise da mistura binária CFZ-PVA mostrou o pico característico da CFZ em 225 °C (Figura 4b). A entalpia observada no pico do fármaco foi de  $\Delta H = -18$  J/g (Tabela 1). O PVA apresentou capacidade de solubilização da CFZ, mas sua quantidade na mistura binária não foi suficiente para solubilizar toda a quantidade de fármaco presente na amostra. Polímeros hidrofílicos, como o PVA, contêm grupos funcionais reativos que podem dar origem a transformações químicas e físicas, mas não necessariamente incompatibilidades com outros componentes da formulação (SALEHI *et al.*, 2013; VUEBA *et al.*, 2005). Em nanopartículas de PLGA contendo CFZ, por exemplo, o PVA presente na fase aquosa não apresentou incompatibilidade com a CFZ, como evidenciado por DSC (CHAVES *et al.*, 2018a).

A curva de DSC da mistura binária CFZ-Ác.Oleico (1:1 m/m) não apresentou pico característico dos constituintes individuais (Figura 4b), sugerindo a completa dissolução do fármaco no ácido oleico. O ácido oleico é um componente essencial em nanossistemas poliméricos, tais como as nanocápsulas, já que permite a encapsulação de fármacos lipofílicos em seu núcleo oleoso (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Na curva de DSC da mistura binária CFZ-Lecitina (1:1 m/m) foi possível observar o maior deslocamento do pico de fusão da CFZ (Figura 4b), de 224 °C para 218 °C (Tabela 1). Mudanças na forma (alargamento) e diminuição na amplitude do pico de fusão foram observadas (Figura 4b). Essas características sugerem interação entre o fármaco e a lecitina.

A natureza das interações observadas por DSC é melhor elucidada com a associação de outras técnicas (CHADHA; BHANDARI, 2014; ROSASCO *et al.*, 2018).

No presente trabalho, a análise termogravimétrica (TG/DTG) e a espectroscopia no infravermelho (FTIR) foram utilizadas como métodos complementares para auxiliar na interpretação das interações observadas nas curvas das misturas binárias obtidas por DSC.

#### 4.3.2. Análise termogravimétrica (TG)

As interações entre CFZ e polímeros/excipientes observadas nas curvas DSC foram investigadas pela análise da curva de DTG e também pelo percentual de perda de massa das amostras, calculado a partir dos dados de TG da análise. A DTG foi obtida pela primeira derivada da TG. As curvas DTG e TG da CFZ e das misturas binárias (1:1 m/m) com os diferentes polímeros estão representadas nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

As curvas DTG e TG da CFZ e das misturas binárias (1:1 m/m) com os diferentes tensoativos e lipídeos estão apresentadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Figura 5 - Curvas DTG da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes polímeros: CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, e CFZ-PLGA85:15. CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli- $\epsilon$ -caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA 50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA 75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil éster terminal 75:25, PLGA 85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15.

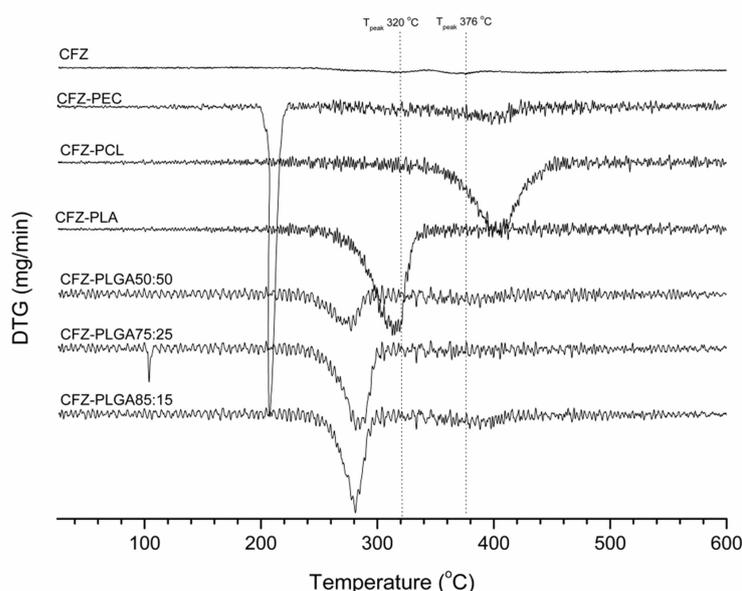


Figura 6 - Curva comparativa de percentual (%) de perda de massa (TG) das misturas binárias (1:1 m/m) de clofazimina com diferentes polímeros, **a**) CFZ-PEC; **b**) CFZ-PCL; **c**) CFZ-PLA; **d**) CFZ-PLGA50:50; **e**) CFZ-PLGA75:25; **f**) CFZ-PLGA85:15. CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli-ε-caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA 50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA 75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil éster terminal 75:25, PLGA 85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15.

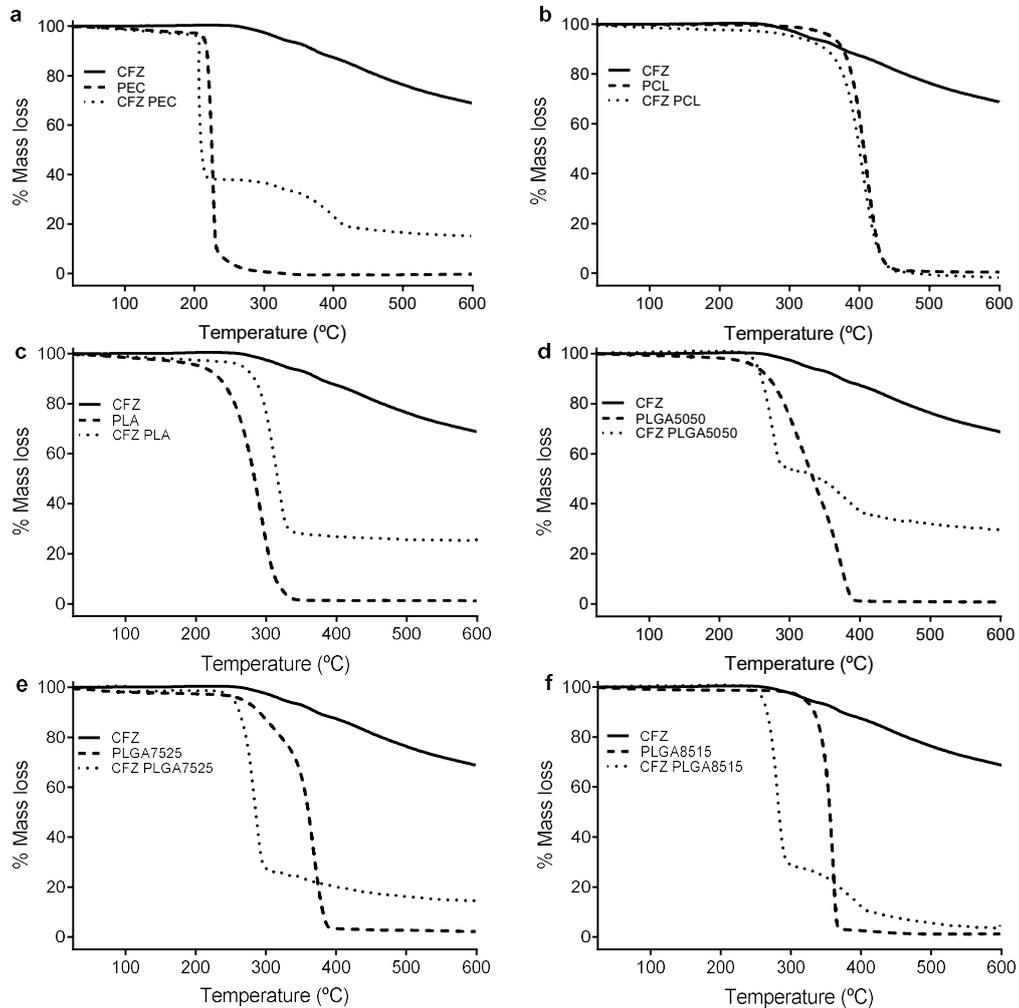


Figura 7 - Curvas DTG da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes excipientes: CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico e CFZ-Lecitina. CFZ = clofazimina, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic®F68, PLX407 = Pluronic®F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja.

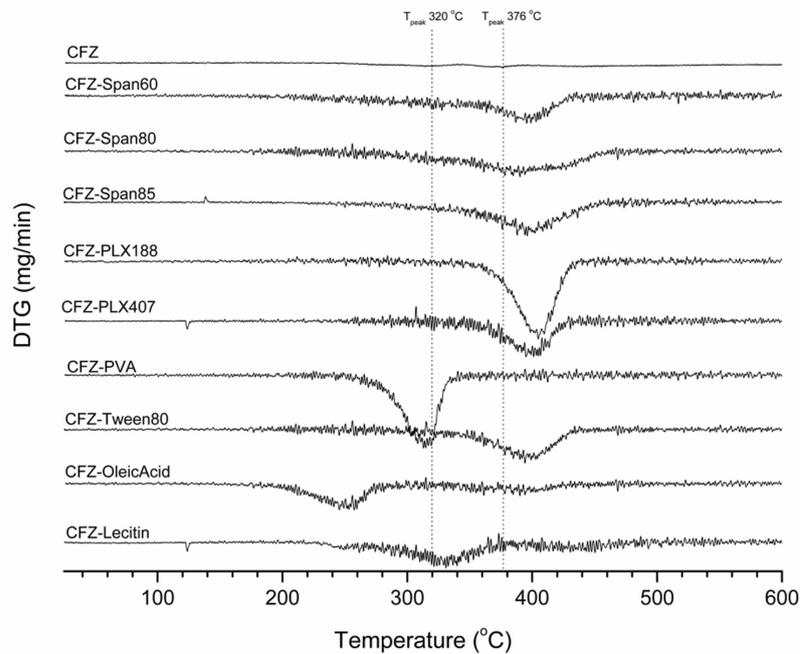
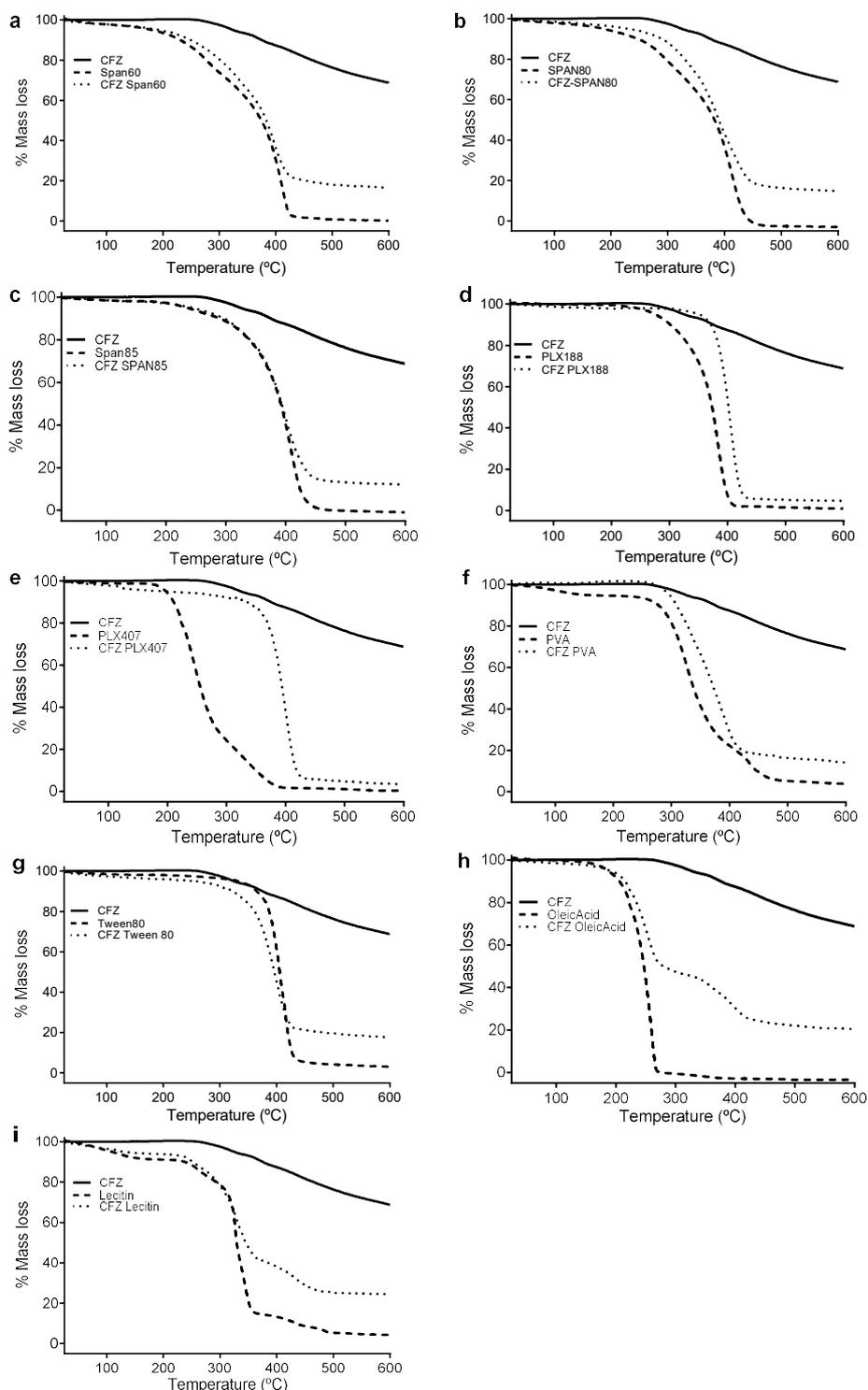


Figura 8 - Curva comparativa de percentual (%) de perda de massa (TG) das misturas binárias (1:1 m/m) de clofazimina com diferentes excipientes: **a)** CFZ-Span60; **b)** CFZ-Span80; **c)** CFZ-Span85; **d)** CFZ-PLX188; **e)** CFZ-PLX407; **f)** CFZ-PVA; **g)** CFZ-Tween80; **h)** CFZ-Ác.Oleico; **i)** CFZ-Lecitina. CFZ = clofazimina, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic®F68, PLX407 = Pluronic®F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja.



A temperatura do início da decomposição ( $T_{onset}$ ) foi determinada a partir da curva de TG. Os valores de  $T_{onset}$ , percentuais de perda de massa, referentes às curvas TG, e os picos de temperatura ( $T_{pico}$ ), das curvas DTG da CFZ e das misturas binárias (1:1 m/m), encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados de temperatura inicial ( $T_{onset}$ ) e percentual de perda de massa da curva termogravimétrica (TG) e temperatura do pico ( $T_{pico}$ ) da derivada da curva termogravimétrica (DTG) da clofazimina e misturas binárias (1/1 m:m): CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, CFZ-PLGA85:15, CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico, CFZ-Lecitina.

Amostra	TG		DTG
	$T_{onset}/^{\circ}\text{C}$	% perda de massa	$T_{pico}/^{\circ}\text{C}$
CFZ	325	30	320/376
CFZ-PEC	205	79	207
CFZ-PCL	380	94	406
CFZ-PLA	294	70	313
CFZ-PLGA 50:50	264	68	277
CFZ-PLGA 75:25	268	83	281
CFZ-PLGA 85:15	269	96	281
CFZ-Span60	352	74	396
CFZ-Span80	350	80	390
CFZ-Span85	363	82	396
CFZ-PLX188	383	93	405
CFZ-PLX407	379	87	395
CFZ-PVA	316	87	335
CFZ-Tween80	373	74	394
CFZ-Ác.Oleico	225	74	257
CFZ-Lecitina	302	69	331

CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli- $\epsilon$ -caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA 50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA 75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil éster terminal 75:25, PLGA 85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic<sup>®</sup>F68, PLX407 = Pluronic<sup>®</sup>F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja.

A decomposição da CFZ ocorreu em duas etapas, de acordo com a análise de DTG, a 320 °C e 376 °C ( $T_{pico}$ ) (Figura 5). Até 600 °C, apenas parte da CFZ foi degradada (aproximadamente 30%), como pode ser visto na Figura 6 e na Tabela 2.

pode estar relacionada, principalmente, ao núcleo fenazina da molécula. O aumento da estabilidade térmica foi relatado quando um derivado tetramínico de fenazina foi sintetizado (GAJIWALA;ZAND, 2000). Devido à lenta degradação da CFZ, a DTG não evidenciou pico de degradação pronunciado, e, portanto, dificultou a interpretação e elucidação das alterações do perfil de degradação do fármaco nas misturas binárias (1:1 m/m). Para uma maior precisão nesta avaliação, as curvas TG dos excipientes isolados também foram levadas em consideração.

Todas as amostras das misturas binárias avaliadas apresentaram apenas um pico de degradação, relacionado ao evento dos excipientes (curva apresentada no material suplementar). O percentual de perda de massa foi inicialmente realizado comparando as curvas termogravimétricas do fármaco e dos polímeros isolados com as curvas das misturas binárias (1:1 m/m), conforme demonstrado na Figura 6.

Houve alteração do pico de decomposição observado na DTG<sub>pico</sub> do PEC de 220 °C (tabela apresentada como material suplementar) para 207 °C (Tabela 2) na mistura binária CFZ-PEC. A perda de massa total calculada através da curva TG da mistura binária foi de 79% (Tabela 2), com diminuição mais significativa em 213 °C (56,9%), característico da perda de massa do PEC.

A DTG da mistura binária CFZ-PCL mostrou apenas um evento de degradação (Figura 5) em 406 °C (Tabela 2). O perfil de perda de massa (curva TG) da mistura binária foi semelhante ao do PCL analisado individualmente (curva DTG apresentada no material suplementar). De acordo com os dados observados, possivelmente houve sobreposição dos eventos de perda de massa, e não houve indicação de incompatibilidade entre CFZ e PCL.

Na análise da curva DTG da mistura binária CFZ-PLA (Figura 5), a amostra permaneceu termicamente estável até 294 °C, como mostrado na curva de DTG (Figura 5 e Tabela 2), e isso está associado ao único evento de perda de massa observado na curva de TG (Figura 6). O PLA sofre degradação térmica acima de 200 °C por hidrólise, cisão oxidativa da cadeia principal e reações de transesterificação inter/intra molecular (GARLOTTA, 2001). Esta degradação do PLA depende principalmente do tempo,

temperatura, impurezas de baixo peso molecular e concentração de catalisadores (GARLOTTA, 2001).

A análise termogravimétrica das misturas do fármaco com diferentes polímeros de PLGA (PLGA 50:50, PLGA 75:25 e PLGA 85:15) mostrou um evento principal na curva de DTG (Figura 5), com  $T_{onset}$  acima de 260 °C e  $T_{pico}$  próximo a 280 °C (Tabela 2) para todas as três combinações fármaco-polímero. A curva de TG dessas misturas mostra que a perda de massa começa mais cedo quando comparada com o polímero isolado, indicando que, combinada ao fármaco, a estabilidade térmica do polímero pode ser diminuída. No entanto, a mistura binária CFZ-PLGA50:50 apresentou a menor porcentagem de perda de massa (Figura 6d, Tabela 2), comparado com as misturas binárias do fármaco com os polímeros PLGA 75:25 e PLGA 85:15, sugerindo que, entre os três polímeros de PLGA usados, PLGA 50:50 é o mais compatível com CFZ, conforme confirmado pela técnica de DSC.

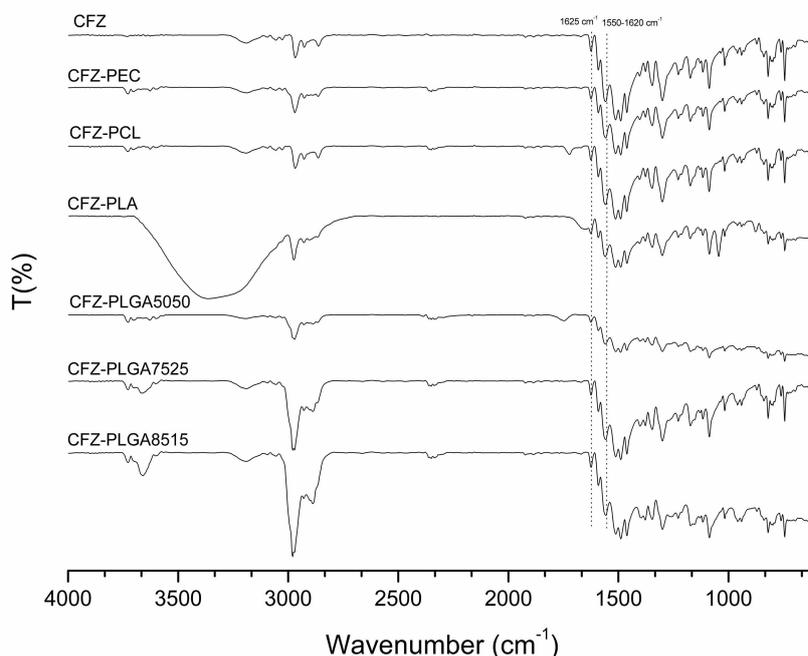
As misturas binárias CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA e CFZ-Tween80 apresentaram um pico único de degradação conforme observado pelas curvas de DTG (Figura 7). Além disso, as misturas binárias acima citadas apresentaram perfil de perda de massa semelhante à dos componentes avaliados separadamente (curva apresentada no material suplementar). Isso sugere que a presença da CFZ não diminuiu a estabilidade térmica destes materiais.

As curvas de TG das misturas binárias do fármaco com os fosfolídeos, ácido oleico e lecitina (Figura 8h e 8i) apresentaram dois estágios de perda de massa, sugerindo que a CFZ e o óleo se decompuseram individualmente. No entanto, de acordo com os dados da Tabela 2, o  $T_{onset}$  foi de 225 °C na mistura CFZ-Ác.Oleico, e 302 °C na mistura CFZ-Lecitina, sugerindo que a combinação CFZ-Lecitina é mais estável. A análise termogravimétrica mostrou que a decomposição da mistura CFZ-Ác.Oleico foi antecipada ( $T_{onset}$  225 °C) em comparação com a CFZ avaliada individualmente ( $T_{onset}$  325 °C), indicando diminuição da estabilidade térmica.

### 4.3.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR complementa a investigação de possíveis interações químicas entre as misturas binárias (BEZERRA *et al.*, 2017). Neste trabalho, a técnica foi utilizada para avaliar as misturas quanto à presença de bandas de frequência de flexão de N-H a 1550-1620  $\text{cm}^{-1}$  e alongamento de C=N a 1625  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes à CFZ (BOLLA; NANGIA, 2012). Os espectros da CFZ e das misturas binárias (1:1 m/m) desta com os diferentes polímeros encontram-se representados na Figura 9.

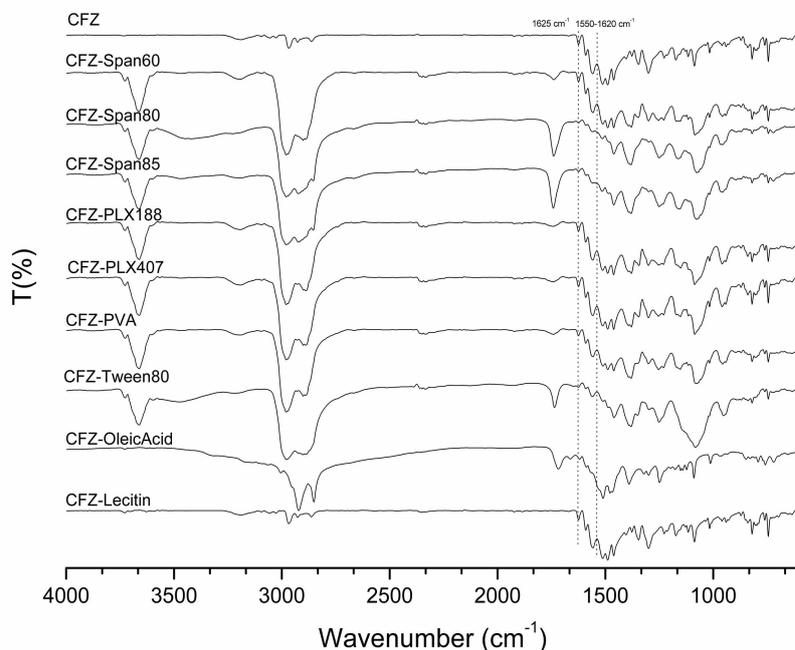
Figura 9 - Espectro de FTIR da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes polímeros: CFZ-PEC, CFZ-PCL, CFZ-PLA, CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, e CFZ-PLGA85:15. CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli- $\epsilon$ -caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA 50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA 75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil éster terminal 75:25, PLGA 85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15.



O espectro de infravermelho da CFZ apresentou estiramento em 1624  $\text{cm}^{-1}$ , referente às ligações C=N da molécula, e bandas de frequência de flexão entre 1558-1592  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes às ligações N-H.

Os espectros da CFZ e da sua mistura binária (1:1 m/m) com os diferentes lipídeos e tensoativos estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Espectro de FTIR da clofazimina e misturas binárias (1:1 m/m) com diferentes excipientes: CFZ-Span60, CFZ-Span80, CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407, CFZ-PVA, CFZ-Tween80, CFZ-Ác.Oleico, e CFZ-Lecitina. CFZ = clofazimina, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic®F68, PLX407 = Pluronic®F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, Lecitina = fosfatidilcolina da soja.



A fim de verificar o nível de interação entre as misturas, foi avaliada também a correlação de Pearson entre espectros teóricos e experimentais. Os espectros teóricos das misturas binárias foram obtidos pela sobreposição dos espectros obtidos para as substâncias puras, avaliadas separadamente (PEREIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016a).

As misturas binárias CFZ-PCL ( $r=0,9$ ), CFZ-PLGA5050 ( $r=0,9$ ), CFZ-PLGA7525 ( $r=0,9$ ), CFZ-PLGA8515 ( $r=0,8$ ), CFZ-Span60 ( $r=0,8$ ), CFZ-PLX188 ( $r=0,8$ ) e CFZ-Lecitina ( $r=0,9$ ) apresentaram índice de correlação de Pearson entre 0,8 e 1,0. Estas misturas mantiveram o alongamento de C=N em  $1624\text{ cm}^{-1}$  e bandas de frequência de flexão entre  $1558\text{-}1592\text{ cm}^{-1}$ , referentes às ligações N-H. Sendo assim, não há sugestão de incompatibilidade entre a CFZ e esses componentes.

As misturas binárias CFZ-PEC ( $r=0,7$ ), CFZ-PVA ( $r=0,6$ ) e CFZ-PLX407 ( $r=0,7$ ) apresentaram correlação moderada entre a curva teórica e experimental. Isso indica que os componentes podem ter interações, porém não necessariamente incompatibilidade, uma vez que não foram observadas

bandas (ou estiramento) adicionais na mistura binária (BEZERRA *et al.*, 2017). Contudo, foi possível observar nestas misturas as bandas características da CFZ, confirmando que não houve alteração estrutural que seja sugestiva de incompatibilidade (BOLLA; NANGIA, 2012).

Outras misturas binárias também obtiveram índice de correlação moderada, sendo elas CFZ-Span80 ( $r=0,6$ ), CFZ-Span85 ( $r=0,6$ ), CFZ-Tween80 ( $r=0,6$ ) e CFZ-Ác.Oleico ( $r=0,8$ ). Os espectros de infravermelho das misturas binárias não apresentaram os picos característicos da CFZ, que representam as ligações N-H e C=N. Isso indica, portanto, interação da CFZ com estes tensoativos e com o ácido oleico. Esta interação confirma as observações feitas através dos estudos de análise térmica, em que foi possível observar que os tensoativos e o óleo são capazes de solubilizar e dissolver, respetivamente, a CFZ. Em casos de interação entre o fármaco e excipiente, pode haver diminuição ou sobreposição da intensidade das bandas de FTIR do fármaco (CHAVES *et al.*, 2018a), como observado para as misturas acima descritas.

A mistura binária CFZ-PLA apresentou correlação de Pearson de 0,186, que pode ser indicativo de degradação química. O espectro de infravermelho da amostra apresenta banda larga entre 3701 e 2997  $\text{cm}^{-1}$ . O PLA pode sofrer degradação por hidrólise, na presença de impurezas ou na concentração de catalisadores (GARLOTTA, 2001). O espectro de infravermelho da mistura binária CFZ-PLA, apesar de apresentar as bandas características do fármaco, apresentou uma banda larga que pode ser indicativo da degradação do polímero, que ocorre através de cisão das cadeias poliméricas, podendo ser induzida por ativação térmica (MULLER, 2008). Essa possível interação entre PLA e CFZ foi confirmada não apenas pela técnica de FTIR, mas também pela curva de DSC (Figura 4).

#### **4.4. Conclusão**

Utilizando as técnicas de DSC, TG/DTG e FTIR, foi possível observar que polímeros comumente utilizados em formulações de micro/nanopartículas interagem de diferentes formas com a CFZ. O PCL foi

o polímero que apresentou maior capacidade de amorfização, enquanto o PEC e o PLGA apresentaram menor interação. O PLGA 50:50 e PLGA 85:15 não apresentaram evidência de interação com a CFZ, enquanto o PLGA 75:25 interagiu com o fármaco de modo que o fármaco foi amorfizado parcialmente. Considerando que em formulações de à base de polímeros a quantidade de polímero é superior à quantidade de fármaco, espera-se que na formulação o fármaco seja completamente amorfizado. Esta amorfização do fármaco na formulação permite aumentar sua solubilidade. Em fármacos muito lipofílicos, como a CFZ, a melhora da solubilidade pode contribuir para a redução da toxicidade e melhora da biodisponibilidade após administração.

De acordo com as análises de DSC e TG, o PLA apresentou interação com o fármaco, e os dados de FTIR demonstram a presença de banda não característica, sugerindo incompatibilidade na mistura binária CFZ-PLA. Apesar das bandas características do fármaco ainda estarem presentes no espectro da mistura binária, o polímero pode ter sido degradado, uma vez que este possui susceptibilidade a degradação por hidrólise. De acordo com esses achados, os polímeros PCL, PEC e PLGA seriam as melhores escolhas para o desenvolvimento de sistemas poliméricos de liberação de fármaco ou dispersões sólidas com CFZ.

Outros excipientes importantes na formulação de sistemas poliméricos de liberação de fármaco, tais como os tensoativos de fase aquosa (PLX 188, PLX407, Tween80 e PVA), tensoativos de fase oleosa e óleos (Span60, Span80, Span85, lecitina e ácido oleico), foram compatíveis com o fármaco.

Este estudo de compatibilidade entre a CFZ e excipientes evidencia sua importância na etapa de desenvolvimento da formulação, permitindo a escolha racional dos seus componentes e prevenindo problemas relacionados à estabilidade, biodisponibilidade, segurança e eficácia.

#### **4.5. Referências Bibliográficas**

BAILLY, N.; THOMAS, M.; KLUMPERMAN, B. Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(vinyl acetate) as a Drug Delivery Vehicle for Hydrophobic Drugs. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 12, p. 4109-4117, 2012.

BARRY, V. C.; BELTON, J. G.; CONALTY, M. L.; DENNENY, J. M.; EDWARD, D. W.; O'SULLIVAN, J. F.; TWOMEY, D.; WINDER, F. A New Series of Phenazines (Rimino-Compounds) With High Antituberculosis Activity. **Nature**, v. 179, p. 1013, 1957.

BEZERRA, G. S. N.; PEREIRA, M. A. V.; OSTROSKY, E. A.; BARBOSA, E. G.; DE MOURA, M. D. F. V.; FERRARI, M.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1683-1691, 2017.

BOHR, A.; WATER, J. J.; WANG, Y.; ARNFAST, L.; BECK-BROICHSITTER, M. Potential of surface-eroding poly(ethylene carbonate) for drug delivery to macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 2, p. 814-820, 2016.

BOLLA, G.; NANGIA, A. Clofazimine Mesylate: A High Solubility Stable Salt. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 12, p. 6250-6259, 2012.

BORNER, K.; HARTWIG, H.; LEITZKE, S.; HAHN, H.; MÜLLER, R. H.; EHLERS, S. HPLC determination of clofazimine in tissues and serum of mice after intravenous administration of nanocrystalline or liposomal formulations. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, n. 1, p. 75-79, 1999.

BRUNAUGH, A. D.; JAN, S. U.; FERRATI, S.; SMYTH, H. D. C. Excipient-Free Pulmonary Delivery and Macrophage Targeting of Clofazimine via Air Jet Micronization. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 4019-4031, 2017.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82-97, 2014.

CHAVES, L. L.; COSTA-LIMA, S. A.; VIEIRA, A. C. C.; BARREIROS, L.; SEGUNDO, M. A.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Development of PLGA nanoparticles loaded with clofazimine for oral delivery: Assessment of formulation variables and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 28-37, 2018a.

CHAVES, L. L.; LIMA, S.; VIEIRA, A. C. C.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Overcoming clofazimine intrinsic toxicity: statistical modelling and characterization of solid lipid nanoparticles. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 15, n. 139, 2018b.

CHOLO, M. C.; STEEL, H. C.; FOURIE, P. B.; GERMISHUIZEN, W. A.; ANDERSON, R. Clofazimine: current status and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 290-298, 2012.

DEVORE, J. L. **Probability and Statistics for Engineering and the Sciences**. 4. Belmont, CA: 1995.

DORATI, R.; CONTI, B.; COLZANI, B.; DONDI, D.; LAZZARONI, S.; MODENA, T.; GENTA, I. Ivermectin controlled release implants based on poly-D,L-lactide and poly-epsilon-caprolactone. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 101-110, 2018.

FENG, J.; ZHANG, Y.; MCMANUS, S. A.; RISTROPH, K. D.; LU, H. D.; GONG, K.; WHITE, C. E.; PRUD'HOMME, R. K. Rapid Recovery of Clofazimine-Loaded Nanoparticles with Long-Term Storage Stability as Anti-Cryptosporidium Therapy. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 5, p. 2184-2194, 2018.

GAO, R.; JIN, Y.; YANG, Q.-Y.; SUN, B.-W.; LIN, J. Study of stability and drug-excipient compatibility of estradiol and pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 839-845, 2015.

GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63-84, 2001.

GAJIWALA, H. M.; ZAND, R. Synthesis and characterization of thermally stable polymers containing phenazine. **Polymer**, v. 41, n. 6, p. 2009-2015, 2000.

HERNANDEZ-VALDEPEÑA, I.; DOMURADO, M.; COUDANE, J.; BRAUD, C.; BAUSSARD, J.-F.; VERT, M.; DOMURADO, D. Nanoaggregates of a random amphiphilic polyanion to carry water-insoluble clofazimine in neutral aqueous media. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, p. 345-351, 2009.

KAUR, A.; GOINDI, S.; KATARE, O. P. Thermal analysis and quantitative characterization of compatibility between diflunisal and lipid excipients as raw materials for development of solid lipid nanoparticles. **Thermochimica Acta**, v. 643, p. 23-32, 2016.

KAWAKAMI, K. Chapter 15 - Pharmaceutical Applications of Thermal Analysis. In: VYAZOVKIN, S.; KOGA, N., *et al* (Ed.). **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry**: Elsevier Science B.V., v.6, 2018. p.613-641. ISBN 1573-4374.

LI, S.; CHAN, J. Y.; LI, Y.; BARDELANG, D.; ZHENG, J.; YEW, W. W.; CHAN, D. P.; LEE, S. M.; WANG, R. Complexation of clofazimine by macrocyclic cucurbit[7]uril reduced its cardiotoxicity without affecting the antimycobacterial efficacy. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 31, p. 7563-7569, 2016.

MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8493-8501, 2010.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 523-530, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MULLER, R. H. Biodegradability of polymers: Regulations and methods of testing. In: STEINBÜCHEL, A. E. (Ed.). **Biopolymers, General Aspects and Special Applications**: Wiley Publishers v.10, 2008. cap. Chapter 12, p.366–388.

NIE, H.; SU, Y.; ZHANG, M.; SONG, Y.; LEONE, A.; TAYLOR, L. S.; MARSAC, P. J.; LI, T.; BYRN, S. R. Solid-State Spectroscopic Investigation of Molecular Interactions between Clofazimine and Hypromellose Phthalate in Amorphous Solid Dispersions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 3964-3975, 2016.

NARANG, A. S.; SRIVASTAVA, A. K. Evaluation of Solid Dispersions of Clofazimine. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 8, p. 1001-1013, 2002.

O'CONNOR, R.; O'SULLIVAN, J. F.; O'KENNEDY, R. The pharmacology, metabolism, and chemistry of Clofazimine. **Drug Metabolism Reviews**, v. 27, n. 4, p. 591-614, 1995.

O'DRISCOLL, C. M.; CORRIGAN, O. I. Clofazimine. In: (Ed.). **Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients**. Ireland: University of Dublin, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Trinity College Dublin, Ireland., v.21, p.75-108, 1992.

PATEL, V. B.; MISRA, A. N. Encapsulation and stability of clofazimine liposomes. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 3, p. 357-367, 1999.

PETERS, K.; LEITZKE, S.; DIEDERICHS, J. E.; BORNER, K.; HAHN, H.; MÜLLER, R. H.; S., E. Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine *Mycobacterium avium* infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 77–83, 2000.

PEREIRA, M. A. V.; FONSECA, G. D.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; DE F. V. DE MOURA, M.; BARBOSA, E. G.; GOMES, A. P. B.; DOS SANTOS, K. S. C. R. Compatibility study between chitosan and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 116, n. 2, p. 1091-1100, 2014.

ROSASCO, M. A.; BONAFEDE, S. L.; FAUDONE, S. N.; SEGALL, A. I. Compatibility study of tobramycin and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, FTIR, DRX, and HPLC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2018.

SALEHI, E.; MADAENI, S. S.; RAJABI, L.; DERAKHSHAN, A. A.; DARAEI, S.; VATANPOUR, V. Static and dynamic adsorption of copper ions on chitosan/polyvinyl alcohol thin adsorptive membranes: Combined effect of polyethylene glycol and aminated multi-walled carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**, v. 215-216, p. 791-801, 2013.

SILVA, E. P.; PEREIRA, M. A. V.; DE BARROS LIMA, I. P.; LIMA, N. G. P. B.; BARBOSA, E. G.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Compatibility study between atorvastatin and excipients using DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 2, p. 933-939, 2016a.

SILVA, L. A. D.; TEIXEIRA, F. V.; SERPA, R. C.; ESTEVES, N. L.; DOS SANTOS, R. R.; LIMA, E. M.; DA CUNHA-FILHO, M. S. S.; ARAUJO, A. A. D.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Evaluation of carvedilol compatibility with lipid excipients for the development of lipid-based drug delivery systems. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2337-2344, 2016b.

STOLL, G. H.; NIMMERFALL, F.; ACEMOGLU, M.; BODMER, D.; BANTLE, S.; MULLER, I.; MAHL, A.; KOLOPP, M.; TULLBERG, K. Poly(ethylene carbonate)s, part II: degradation mechanisms and parenteral delivery of bioactive agents. **Journal of Controlled Release**, v. 76, n. 3, p. 209-225, 2001.

SUKHITHASRI, V.; VINOD, V.; VARMA, S.; BISWAS, R. Mycobacterium tuberculosis treatment modalities and recent insights. **Current Drug Delivery**, v. 11, n. 6, p. 744-52, 2014.

SUN, X. Q.; LEE, K. O.; MEDINA, M. A.; CHU, Y. H.; LI, C. C. Melting temperature and enthalpy variations of phase change materials (PCMs): a differential scanning calorimetry (DSC) analysis. **Phase Transitions**, v. 91, n. 6, p. 667-680, 2018.

SUNG, J. C.; PULLIAM, B. L.; EDWARDS, D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 563-70, 2007.

TANG, S.; YAO, L.; HAO, X.; LIU, Y.; ZENG, L.; LIU, G.; LI, M.; LI, F.; WU, M.; ZHU, Y.; SUN, H.; GU, J.; WANG, X.; ZHANG, Z. Clofazimine for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: prospective, multicenter, randomized controlled study in China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1361-1367, 2015.

TIȚA, B.; FULIAȘ, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TIȚA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 221-227, 2011.

VERMA, R. K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug–excipient compatibility testing. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 4, p. 633-644, 2005.

VUEBA, M. L.; VEIGA, F.; SOUSA, J. J.; PINA, M. E. Compatibility Studies Between Ibuprofen or Ketoprofen with Cellulose Ether Polymer Mixtures Using Thermal Analysis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 10, p. 943-949, 2005.

ZHANG, Y.; FENG, J.; MCMANUS, S. A.; LU, H. D.; RISTROPH, K. D.; CHO, E. J.; DOBRIJEVIC, E. L.; CHAN, H. K.; PRUD'HOMME, R. K. Design and Solidification of Fast-Releasing Clofazimine Nanoparticles for Treatment of Cryptosporidiosis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 3480-3488, 2017.

## 5. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli(etileno carbonato) contendo clofazimina para administração pulmonar e tratamento local da tuberculose resistente à múltiplos fármacos

---

*Esta seção será organizada, quando finalizada, na forma de artigo para submissão à revista Langmuir.*

*Autores: Danielle Flávia da Silva Ribeiro, Kamila Bohne Japiassu, Eliana Martins Lima, Adam Bohr, Thais Leite Nascimento*

### 5.1. Introdução

O *Mycobacterium tuberculosis* é um patógeno intracelular que infecta principalmente macrófagos alveolares, e é responsável pelo desenvolvimento da TB. Esta doença é a principal causa de mortalidade por agente infeccioso, com incidência anual de 10 milhões de novos casos (WHO, 2018). O número de casos de MDR-TB tem aumentado e o surgimento de novas cepas resistente aos fármacos já existentes ameaça o controle da doença (KURZ; FURIN; BARK, 2016; WHO, 2018).

A CFZ é um derivado de riminofenazina, que possui atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória (CHOLO *et al.*, 2012). Este fármaco tem mostrado atividade *in vitro* e *in vivo* contra cepas de MDR-TB (DALCOLMO *et al.*, 2017; VERMA *et al.*, 2013). Trata-se de um fármaco altamente lipofílico, que quando administrado pela via oral apresenta baixa biodisponibilidade, de ~40%, e meia vida prolongada, de 70 dias (CHAVES *et al.*, 2018a; LI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

A administração da CFZ pela via oral está relacionada a efeitos colaterais graves como pigmentação marrom-avermelhada na pele, lesão hepática, dor abdominal e cardiotoxicidade (LI *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2015). A combinação dos efeitos colaterais e do esquema terapêutico prolongado dificulta a adesão ao tratamento, ocasionando o abandono completo do tratamento de 16 a 49% dos pacientes

(COSTA *et al.*, 2016; HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015). Sendo assim, novas alternativas utilizando fármacos existentes no mercado têm sido investigadas com o intuito de aprimorar os esquemas terapêuticos, visando a redução do percentual de abandono de tratamento e aumento do índice de cura da doença (COSTA *et al.*, 2016).

A administração de nanopartículas poliméricas pela via pulmonar tem sido investigada como estratégia para otimizar o desempenho terapêutico de medicamentos (COSTA *et al.*, 2016). Nanopartículas poliméricas podem ser utilizadas para o encapsulamento e transporte de fármacos lipossolúveis, e podem permitir seu direcionamento aos macrófagos alveolares (CHAVES *et al.*, 2018a; COSTA *et al.*, 2016; PARUMASIVAM *et al.*, 2016). A administração de nanopartículas pela via pulmonar pode aumentar a concentração de fármacos no pulmão, reduzir os efeitos colaterais sistêmicos, reduzir a dose e frequência de administração e conseqüentemente, melhorar a adesão do paciente ao tratamento, a eficácia terapêutica e auxiliar na redução da seleção de cepas bacilos MDR (COSTA *et al.*, 2016; SUKHITHASRI *et al.*, 2014).

As nanopartículas poliméricas para inalação devem ser desenvolvidas com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis (PARUMASIVAM *et al.*, 2016). O poli(etileno carbonato) (PEC) é um polímero biodegradável, que apresenta perfil de liberação por degradação superficial, com liberação gradativa do fármaco presente na nanopartícula. Por este motivo apresenta cinética de liberação mais previsível e controlada se comparado a polímeros com degradação por erosão em massa (BOHR *et al.*, 2017). Este polímero permite o direcionamento a macrófagos infectados, uma vez que possui degradação específica pela enzima colesterol esterase e ânions superóxidos, amplamente produzidos por macrófagos (BOHR *et al.*, 2016; BOHR *et al.*, 2017; LOHMANN-MATTHES; STEINMULLER; FRANKE-ULLMANN, 1994; STOLL *et al.*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* de nanopartículas inaláveis de PEC contendo o fármaco CFZ. Através da avaliação das partículas será possível verificar se possuem características adequadas para administração pulmonar da CFZ,

visando o direcionamento aos macrófagos alveolares infectados com o patógeno.

## 5.2. Materiais e métodos

### 5.2.1. Preparo das formulações de nanopartículas

Para a otimização da formulação de nanopartículas de PEC contendo CFZ (Sigma-Aldrich LTDA, Brasil, lote #SLBL8945V), foram preparadas inicialmente nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE) sem a presença do fármaco, variando as concentrações de tensoativos de fase orgânica e fase aquosa, e variando o tipo de tensoativos da fase aquosa. As composições das formulações avaliadas encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Componentes e suas respectivas quantidades utilizadas no desenvolvimento de formulações de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE) poliméricas pela técnica de nanoprecipitação.

Formulação	Fase Orgânica			Fase Aquosa				
	PEC (mg)	Span80® (mg)	Óleo de soja (mg)	ACN (mL)	Acetona (mL)	Tween80® (mg)	Pluronic F127® (mg)	Água (mL)
NC1	100	38	180	17	10	77	-	54
NC2	100	77	180	17	10	77	-	54
NC3	100	38	180	17	10	-	77	54
NC4	100	77	180	17	10	-	77	54
NE1	100	38	-	27	-	77	-	54
NE2	100	77	-	27	-	77	-	54
NE3	100	38	-	27	-	-	77	54
NE4	100	77	-	27	-	-	77	54

PEC = poli(etileno) carbonato; ACN = acetonitrila.

A fase orgânica das nanocápsulas foi constituída pelo polímero PEC (QPAC®25, Empower material, Estados Unidos, lote 15083-01), acetonitrila (ACN) (HPLC, J.T. Baker, México) e acetona (ACT) (Quemis, Brasil) como solventes orgânicos, óleo de soja e tensoativo Span80® (monooleato de sorbitano, Sigma-Aldrich LTDA, Brasil, lote #MKBJ8089V). A fase aquosa foi constituída de água e tensoativos Tween80® (polissorbato 80, Vetec Química Fina LTDA, Brasil, lote 1201802) ou Pluronic-F127® (Sigma-Aldrich

LTDA, Brasil, lote #027K0034). Para o preparo de nanoesferas foram mantidas as proporções dos componentes utilizados para as formulações de nanocápsulas. Os dois tipos de formulação se diferem apenas pelo solvente utilizado, sendo ACN e acetona para NC e ACN para NE, devido a ausência de óleo de soja nas NE.

Para a fase orgânica, uma solução de PEC em ACN foi preparada e deixada *overnight*, em repouso à temperatura ambiente, para que o polímero se dissolvesse completamente no solvente. Os demais componentes da fase orgânica foram então pesados e adicionados à solução de PEC previamente preparada. A fase aquosa foi preparada imediatamente antes do preparo da formulação. Os tensoativos foram solubilizados em água à temperatura ambiente e sob agitação magnética rápida. O volume de 27 mL da fase orgânica foi então lentamente vertido em 54 mL da fase aquosa sob agitação magnética rápida. O solvente orgânico e o excesso de água foram removidos sob pressão reduzida utilizando rotaevaporador, até a obtenção do volume final de 10 mL.

As formulações sem o fármaco que apresentaram menor diâmetro médio e Pdl menor que 0,2 foram selecionadas para o preparo da formulação com o fármaco. Sendo assim, as nanopartículas foram preparadas adicionando 5 mg de CFZ à fase orgânica da formulação.

### **5.2.2. Avaliação do diâmetro médio e Pdl por *Dynamic Light Scattering (DLS)***

A análise do diâmetro médio e do índice de polidispersibilidade (Pdl) das partículas foi realizada a 25 °C no equipamento Zetasizer Nano S (Malvern). A amostra foi preparada para análise, diluindo 10 µL de formulação em 2.990 µL de água ultrapurificada. As nanopartículas foram caracterizadas após o preparo, antes da liofilização, após a redispersão dos pós liofilizados e no estudo de estabilidade das nanopartículas em meios biológicos simulados.

### **5.2.3. Eficiência de encapsulação (EE) por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)**

Para a quantificação do fármaco total nas formulações de NC e NE, 100 µL de formulação foram dissolvidos em 1900 µL de acetonitrila. As soluções foram agitadas em vórtex por 1 minuto, centrifugadas a 14.000 x g por 30 minutos e então analisadas por HPLC quanto à quantidade total de CFZ nas nanopartículas.

A quantificação da CFZ foi realizada utilizando método de cromatografia líquida de alta eficiência e detecção de arranjo de diodos (HPLC-DAD). A linearidade do método para a CFZ foi encontrada na faixa de 1 a 90 µg/mL, e os limites de detecção e quantificação foram calculados como 0,05 µg/mL e 0,15 µg/mL, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em cromatógrafo 1260 Infinity (Agilent Technologies, EUA) com detector DAD. Utilizou-se metanol, acetonitrila e tampão acetato de amônio 100 mM pH 6,4 (60:25:15) como fase móvel a 1,0 mL/min e 25 °C. Os picos foram obtidos em comprimento de onda de 282 nm após a injeção de 10 µL de amostras. A separação foi realizada utilizando coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 250 x 4,6 mm x 5 µm PN 990967-906 SN-USP008697 (Agilent Technologies, EUA). As amostras foram diluídas em acetonitrila para análise.

A separação do fármaco livre e encapsulado foi realizada através da técnica de ultrafiltração, utilizando filtros Amicon® (Merck Millipore, Alemanha) com cutoff de 100 kDa. Foram adicionados 500 µL da formulação aos filtros, que foram centrifugados a 14.000 x g por 10 minutos. Posteriormente, em outro microtubo, o dispositivo foi centrifugado na posição invertida a 1.000 x g por 10 minutos para a recuperação das nanopartículas contendo o fármaco encapsulado. As nanopartículas foram ressuspensas em 500 µL de água, e alíquotas de 100 µL das partículas ressuspensas foram diluídas em 1900 µL de acetonitrila para quantificação da CFZ encapsulada, por HPLC.

A porcentagem de eficiência de encapsulação (EE) foi calculada pela razão entre a quantidade de fármaco encapsulado e a quantidade total de fármaco quantificado x100.

#### **5.2.4. Secagem das nanopartículas por liofilização**

Após o preparo, as dispersões de nanopartículas de PEC contendo CFZ foram secas por liofilização. Para manutenção da integridade e diâmetro das partículas, diferentes crioprotetores foram adicionados às formulações imediatamente antes da secagem.

Soluções de manitol (manitol PA, Vetec Química Fina LTDA, Brasil, lote 0707386), sacarose (sucrose, Sigma-Aldrich LTDA, Brasil, lote #011M00421V) e trealose (D-(+)-Trehalose dihydrate, Sigma-Aldrich LTDA, Brasil, lote #BCBH2408V) foram preparadas em água ultrapurificada nas concentrações de 3%, 5%, 10%, 20% e 30% (m/v). Aos frascos de liofilização foram adicionados 0,5 mL de formulação e 0,5 mL da solução de crioprotetor, sendo as concentrações finais de crioprotetor avaliadas 1,5%, 2,5%, 5%, 10% e 15% (m/v). As amostras foram então congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas e posteriormente liofilizadas por 24 horas. Ao final da liofilização as formulações foram passadas em tamis de  $45\text{ }\mu\text{m}$  para obtenção do pó, e sua redispersibilidade foi avaliada através da medida de diâmetro médio e Pdl, pela técnica de DLS.

A análise estatística foi realizada para as amostras avaliadas após a redispersão em água comparadas com a condição inicial antes da liofilização utilizando o teste  $t$ , considerando estatisticamente significativo valor de  $p < 0,05$ .

#### **5.2.5. Análise térmica das formulações por calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Foram avaliadas pela técnica de DSC o fármaco (CFZ), o polímero (PEC), a mistura binária (1:1 m/m) entre fármaco e polímero (PEC+CFZ), formulação sem o fármaco (NC-branca), formulação com o fármaco (NC-CFZ), crioprotetor (manitol) e nanopartículas liofilizadas (NC-CFZ-liofilizada).

As curvas de DSC foram obtidas pelo equipamento DSC-60A – *Differential Scanning Calorimeter* (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão). Cerca de 2-3 mg de cada amostra foram colocados em cadinho de alumínio selado e analisados

na faixa de temperatura de 25 a 400 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e sob fluxo de 50 mL/min em atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>).

#### **5.2.6. Estudo de estabilidade das partículas em meios biológicos simulados**

O estudo de estabilidade das NC de PEC contendo CFZ foi realizado incubando as formulações em solução tampão de fosfato-salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) pH 7,4 e soluções de mucina a 0,1% e 0,08% (m/v). O PBS pH 7,4 foi preparado dissolvendo 800 mg de cloreto de sódio (NaCl, Qhemis Indústria Brasileira, Brasil, lote Q0015), 20 mg de cloreto de potássio (KCl, Quemis, Indústria Brasileira, Brasil, lote Q0013), 144 mg de fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Labsynth Produtos para Laboratório LTDA, Brasil, lote 109915) e 24 mg de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil, lote 81885) em 100 mL de água ultrapurificada. Ao final do preparo o pH da solução foi ajustado para 7,4. As soluções de mucina (mucina de estômago de porco tipo II, Sigma Life Science, EUA, lote #SLBL3184V) foram preparadas em água ultrapurificada nas concentrações de 0,1 e 0,08% (m/v). Após o preparo, estas soluções foram centrifugadas a 5.500 x g por 20 min para a eliminação dos sólidos insolúveis presentes na solução. O sobrenadante foi coletado para a utilização no teste de estabilidade. A concentração real de mucina nas soluções 0,1% e 0,08% m/v foram determinadas utilizando a técnica de liofilização. Os frascos de liofilização foram pesados vazios e com tampa, e então 4 mL de solução de mucina foram liofilizados por 24 horas. Ao final da liofilização os frascos foram novamente pesados para determinação da concentração real de mucina nas soluções.

Para avaliação da estabilidade da dispersão de NC nos meios simulados, foram adicionados 3 mL de cada meio simulado e 1 mL de formulação em balão de fundo redondo. As amostras foram incubadas em Shaker a 100 rpm e 37 °C. Alíquotas das amostras foram retiradas nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos para avaliação do diâmetro médio das partículas e Pdl por DLS. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A análise estatística foi realizada para as amostras avaliadas nos tempos definidos (0, 30, 60 e 120 minutos) e foram comparadas com a condição inicial, pelo teste *t*, considerando estatisticamente significativo valor de  $p < 0,05$ .

### **5.2.7. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, *nanoparticle tracking analysis*) em meios biológicos simulados**

As nanopartículas foram preparadas com o marcador fluorescente Rodamina PE (Egg Liss Rhod PE ammonium salt, Avanti Polar Lipids, Alabama, EUA, lote FELRPE65). A fase orgânica foi composta por 50 mg de PEC, 9 mL de ACN, 19 mg de Span 80, 90 mg de óleo de soja, 5 mL de acetona e 2 mL de solução 1 mg/mL de Rodamina PE. A fase aquosa foi preparada com 39 mg de Pluronic-F127<sup>®</sup> e 27 mL de água. A fase orgânica foi vertida na fase aquosa sob agitação magnética. O solvente orgânico e o excesso de água foi removido sob pressão reduzida utilizando rotaevaporador até a obtenção do volume final de 5 mL.

As análises foram realizadas utilizando o equipamento Nanosight NS500 (Malvern, Reino Unido). As amostras foram diluídas em água deionizada e injetadas na câmera equipada com laser verde a 532 nm. O software Nanosight NTA 3.2 foi utilizado para capturar vídeos de 30 segundos. As leituras das partículas foram realizadas em água, solução de mucina 0,08% (m/v) e mucina 0,1% (m/v). A água foi utilizada como controle para comparação da mobilidade das partículas na mucina.

O vídeo capturado pelo equipamento foi utilizado para análise da trajetória das nanopartículas em cada um dos meios. Foi avaliada trajetória de 5 segundos em cada um dos meios, utilizando o código Appititude 1.3 no software Matlab.

### 5.3. Resultados e discussão

#### 5.3.1. Avaliação do diâmetro médio e Pdl por DLS

A partir de testes com diferentes concentrações de tensoativos, nanocápsulas e nanoesferas de PEC foram preparadas e avaliadas quanto ao diâmetro médio e Pdl. NC são compostas por revestimento polimérico e núcleo oleoso e NE possuem estrutura formada por matriz polimérica (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Neste trabalho, a diferença entre as formulações baseou-se na presença do óleo de soja, responsável pelo núcleo oleoso das NC, e na utilização da acetona como solvente orgânico para solubilizar este excipiente. Os resultados de diâmetro médio e Pdl das formulações estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Diâmetro médio (nm) e Pdl das formulações de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE) brancas de poli(etileno carbonato) (PEC) preparadas pela técnica de nanoprecipitação.

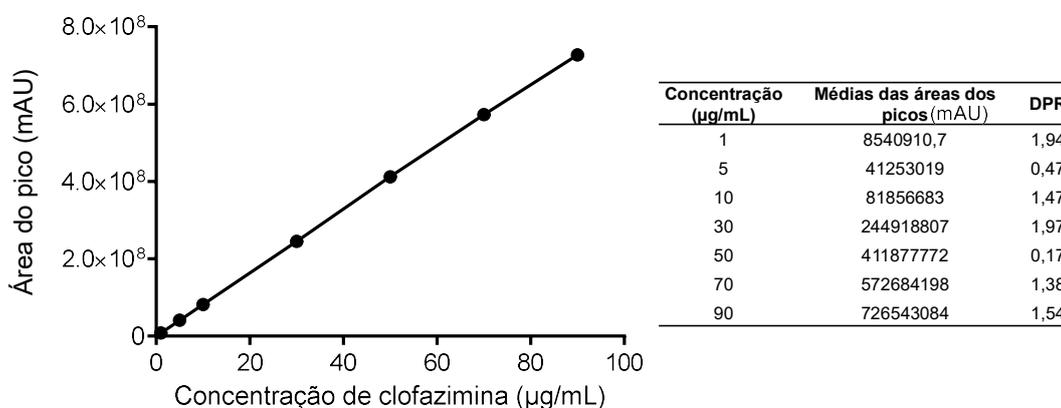
<b>Formulações</b>	<b>Diâmetro médio (nm)</b>	<b>Pdl</b>
NC1	380,3 ± 3,5	0,16 ± 0,04
NC2	256,5 ± 7,7	0,21 ± 0,02
NC3	188,6 ± 4,1	0,16 ± 0,07
NC4	184,2 ± 5,3	0,14 ± 0,13
NE1	202,6 ± 6,2	0,58 ± 0,03
NE2	295,9 ± 0,5	0,89 ± 0,01
NE3	164,3 ± 3,8	0,05 ± 0,03
NE4	164,9 ± 5,7	0,10 ± 0,03

As formulações apresentaram aumento do diâmetro médio de partícula devido à presença do fármaco na formulação. Após o preparo das nanopartículas brancas, as que apresentaram tamanho menor que 300 nm e Pdl menor que 0,2 foram selecionadas para o preparo da formulação contendo o fármaco. As formulações de NC selecionadas foram NC3 e NC4 e de NE foram NE3 e NE4.

### 5.3.2. Eficiência de encapsulação por HPLC

A curva de calibração do método de HPLC para quantificação da CFZ, obtida pela plotagem da área do pico *versus* a concentração de CFZ em acetonitrila, está representada na Figura 11, assim como os valores das áreas médias dos picos e o desvio padrão relativo (DPR). O DPR foi menor que 2% para todas as concentrações avaliadas. A equação da reta obtida foi  $y = 8109475,992x + 1709196,687$  e o coeficiente de correlação obtido foi de  $r^2 = 0,9996$ . Portanto o método mostrou-se linear na faixa de concentração analisada (1-90  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo o coeficiente de correlação maior que 0,99, conforme preconizado pela resolução da Anvisa RDC nº 166 de 2017.

Figura 11 – Representação da linearidade do método pela curva de calibração de clofazimina (CFZ) obtida na faixa de 1 a 90  $\mu\text{g/mL}$ , médias das áreas dos picos (mAU) e desvio padrão relativo nas concentrações avaliadas. Separação cromatográfica foi obtida utilizando coluna C8 de 250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  a 25 °C. Fase móvel composta por metanol, acetonitrila e tampão acetato de amônio 100 mM pH 6,4 (60:25:15), com fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$ . O comprimento de onda usado para detecção foi de 282 nm.



Os resultados de diâmetro médio, Pdl e EE após a inclusão da CFZ nas formulações estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Diâmetro médio (nm), índice de polidispersibilidade (Pdl) e eficiência de encapsulação das formulações de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE) contendo o fármaco clofazimina (CFZ).  $p < 0,05$  vs nanopartícula branca;  $p < 0,001$  vs nanopartícula branca.

Formulações	Diâmetro médio (nm)	Pdl	EE (%)
NC3-CFZ	237,0 ± 12,3*	0,16 ± 0,06	65,13 ± 1,7
NC4-CFZ	210,2 ± 3,0*	0,16 ± 0,02	65,70 ± 6,0
NE3-CFZ	438,3 ± 8,4**	0,43 ± 0,06*	53,95 ± 2,5
NE4-CFZ	196,1 ± 10,9*	0,30 ± 0,03*	46,85 ± 8,0

O método de nanoprecipitação foi escolhido para o preparo das partículas por favorecer a encapsulação de fármacos lipofílicos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). A CFZ é um fármaco extremamente lipossolúvel (ARBISER; MOSCHELLA, 1995), e por isso possui afinidade pelo óleo da fase orgânica utilizada no preparo da nanocápsula. Por essa razão foi observada maior EE para nanocápsulas quando comparadas às nanoesferas. A formulação NC3-CFZ ( $p=0,01$ ) e NC4-CFZ ( $p=0,03$ ) apresentaram aumento significativo do diâmetro médio em relação às NC brancas. O Pdl das formulações com o fármaco e branca não apresentou variação significativa. A formulação NC4-CFZ, apesar de apresentar boa EE, não apresentou estabilidade, o que foi observado pela separação de fases 24 horas após o preparo.

As nanoesferas com CFZ, NE3-CFZ e NE4-CFZ apresentaram aumento significativo no diâmetro médio ( $p < 0,001$  e  $p = 0,01$ , respectivamente) e Pdl ( $p = 0,005$  e  $p = 0,002$ , respectivamente) em relação às nanoesferas brancas. Nesse tipo de partícula o fármaco pode estar disperso na matriz polimérica ou adsorvido à superfície da partícula (PAL *et al.*, 2011). Por ser uma estrutura polimérica apresenta menor capacidade de adsorção do fármaco do que o núcleo oleoso das NC, a EE da CFZ foi menor nas NE.

A formulação NC3-CFZ apresentou melhores resultados relacionados ao diâmetro médio, Pdl e EE. Esta formulação foi utilizada para os testes de liofilização com o objetivo de obter um pó para administração pulmonar.

### 5.3.3. Secagem das nanopartículas por liofilização

A técnica de liofilização permite a formação de pós, porém devido ao estresse de congelamento gerado na amostra, pode causar agregação irreversível das nanopartículas (ABDELWAHED *et al.*, 2006). A utilização de crioprotetores nas concentrações adequadas evita a agregação e permite a redispersão das partículas após o processo de liofilização (VARSHOSAZ; ESKANDARI; TABBAKHIAN, 2012). Neste trabalho os crioprotetores manitol, sacarose e trealose nas concentrações de 1,5%, 2,5%, 5,0%, 10% e 15% (m/v) foram testados para a secagem de NC (Figura 12).

Não foi possível ressuspender, após a liofilização, as nanopartículas secas sem crioprotetores, devido à agregação irreversível causada pelo estresse do processo de congelamento da amostra. Nanocápsulas são mais sensíveis à liofilização do que outros sistemas nanométricos, pois o involucro polimérico é fino e o estresse do congelamento pode desestabilizar esta membrana. A concentração de crioprotetor, temperatura de congelamento do óleo e a taxa de congelamento são fundamentais para a manutenção da estabilidade das nanocápsulas após a liofilização (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

O diâmetro médio das partículas antes da liofilização foi de  $215,9 \pm 8,2$  nm e Pdl  $0,23 \pm 0,02$ . Apesar de 15% (m/v) de sacarose ter sido a concentração capaz de proteger a formulação da liofilização (Figura 12, a/d), diâmetro médio  $259,5 \pm 3,6$  nm ( $p=0,12$ ) e Pdl  $0,30 \pm 0,03$  ( $p=0,77$ ), não foi possível passar o liofilizado pelo tamis para a obtenção do pó seco, uma vez que o liofilizado apresentou-se cristalizado. As demais concentrações testadas de sacarose não permitiram redispersão das partículas após liofilização, com alteração significativa de diâmetro médio e Pdl em relação à condição inicial.

A trealose (Figura 12, b/e) na concentração de 15% (m/v) permitiu obtenção de pó por tamisação e redispersão das partículas. Nessa concentração não houve alteração significativa no tamanho e Pdl das partículas, que apresentaram-se com  $256,7 \pm 3,0$  nm ( $p=0,09$ ) e Pdl  $0,35 \pm 0,04$  ( $p=0,36$ ). Não foi possível obter o pó através da tamisação dos liofilizados preparados com as demais concentrações de trealose.

Não foi possível passar pelo tamis os pós formados utilizando as demais concentrações de manitol, e por isso a avaliação da redispersão dessas nanopartículas foi realizada diretamente no frasco de liofilização. Sendo assim, o manitol na concentração de 10% (m/v) foi o crioprotetor que permitiu melhor redispersibilidade das nanopartículas após a passagem pelo tamis (Figura 12, c/f). Após reconstituição em água, as NC liofilizadas com manitol 10% (m/v) não apresentaram alteração significativa do diâmetro médio ( $233,8 \pm 2,5$  nm,  $p=0,06$ ) e Pdl ( $0,35 \pm 0,01$ ,  $p=0,23$ ). A distribuição de tamanho das partículas antes da liofilização e após reconstituição em manitol a 10% (m/v) pode ser observada na Figura 13. De maneira geral, o manitol foi o crioprotetor que apresentou melhores características de ressuspensão para todas as concentrações avaliadas, quando comparado com os outros crioprotetores.

O manitol é um excipiente aprovado pelo FDA para formulações inaláveis (MEHTA, 2018), sendo utilizado para deposição pulmonar de partículas (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015). É um açúcar não redutor, que possui baixa higroscopicidade, capacidade de formar liofilizados facilmente redispersíveis (ZHANG *et al.*, 2017), inerte e que, além de promover a secagem eficiente de partículas, auxilia na manutenção da estabilidade do pó liofilizado (KAIALY; NOKHODCHI, 2013). Como é hidrofílico, espera-se que ao chegar nos pulmões seja dissolvido e libere então as nanopartículas (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015).

Figura 12 – Diâmetro médio (a,b,c) e Pdl (d,e,f) de nanocápsulas de poli(etileno carbonato) (PEC) contendo clofazimina (CFZ) liofilizadas na presença de diferentes concentrações de crioprotetores sendo eles sacarose (a/d), trealose (b/e) e manitol (c/f). NC-CFZ = análise inicial do diâmetro médio e Pdl de nanocápsulas contendo clofazimina; NC\*\* = nanocápsulas liofilizadas sem crioprotetor. \* $p < 0,001$  vs NC-CFZ; # $p < 0,05$  vs NC-CFZ

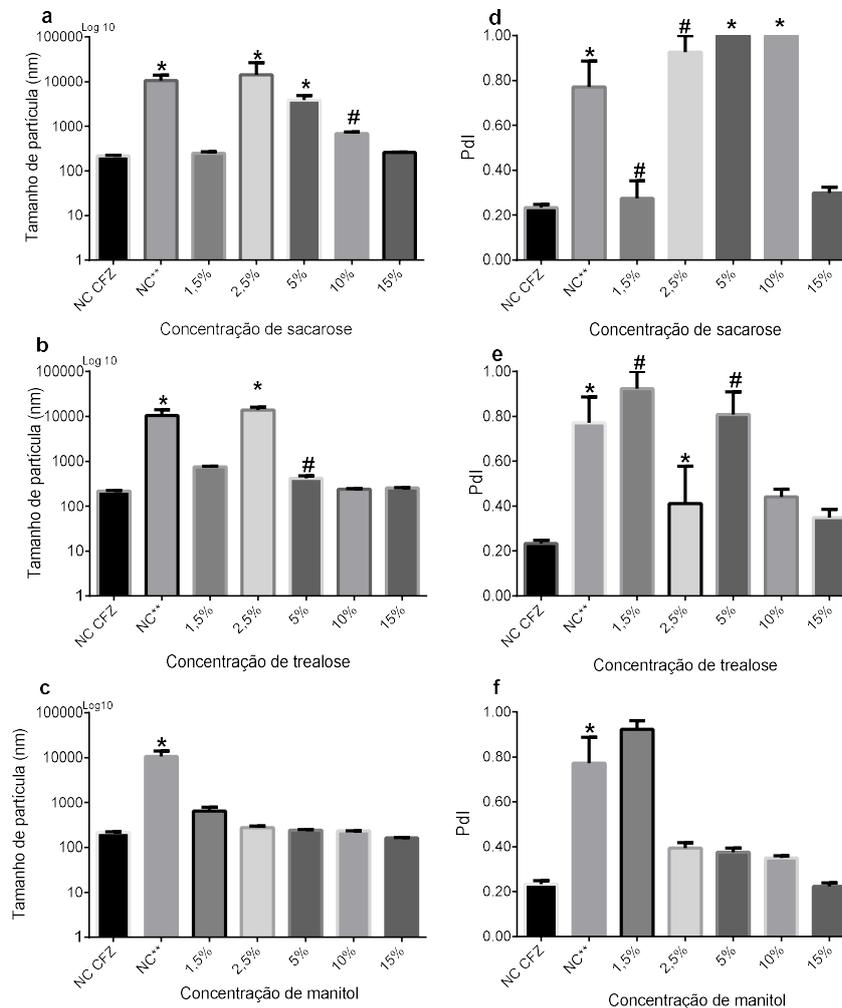
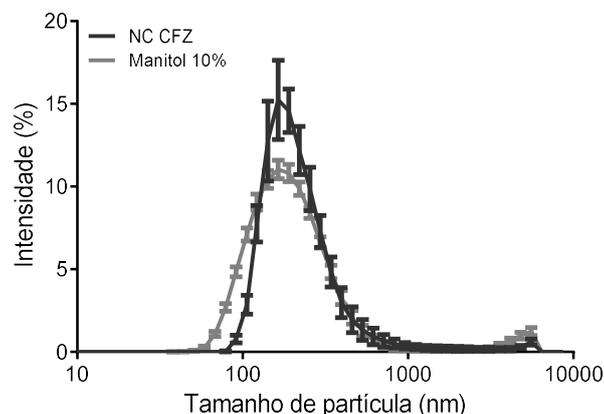


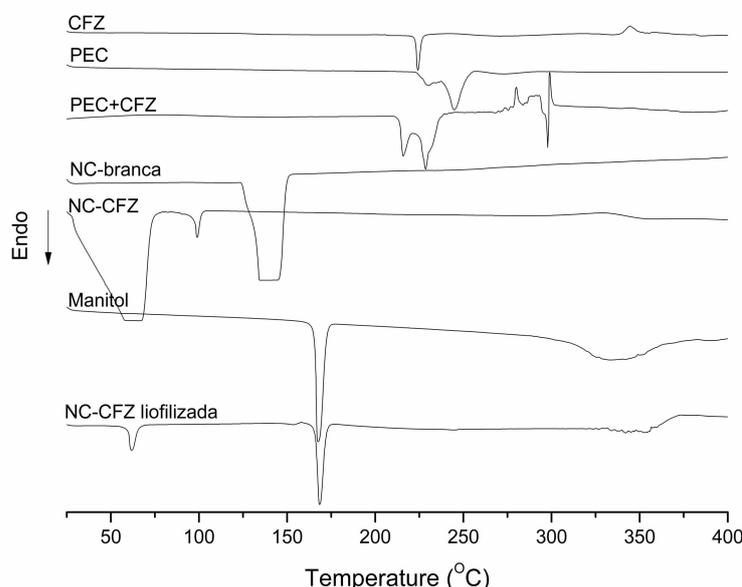
Figura 13 - Distribuição do tamanho das nanocápsulas de clofazimina antes da liofilização e após a liofilização com manitol 10 % (m/v). NC-CFZ = análise inicial do diâmetro médio e Pdl de nanocápsulas contendo clofazimina; Manitol 10% (m/v) = análise do diâmetro médio das partículas após liofilização na presença do crioprotetor manitol na concentração de 10% (m/v).



### 5.3.4. Análise térmica das formulações por calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As curvas de DSC do polímero (PEC), CFZ, mistura binária 1:1 (m/m) entre PEC e CFZ, nanocápsulas sem o fármaco (NC-branca), nanocápsulas com o fármaco (NC-CFZ), crioprotetor (manitol) e a formulação liofilizada (NC-CFZ-liofilizada) estão representados na Figura 14.

Figura 14 – Curvas DSC de clofazimina (CFZ), poli(etileno carbonato) (PEC), mistura binária (PEC-CFZ) na proporção 1:1 m/m, nanocápsula branca (NC-branca), nanocápsula contendo o fármaco CFZ (NC-CFZ), manitol e formulação liofilizada de nanocápsula contendo o fármaco CFZ (NC-CFZ-liofilizada).



O PEC apresentou três eventos endotérmicos consecutivos com picos em 231, 245 e 274 °C e energias de entalpia ( $\Delta H$ ) de -55, -206 e -35 J/g, respectivamente. A presença destes picos está relacionada à composição do polímero. O PEC possui em sua composição menos de 5% de etileno carbonato, menos de 1% de cloreto de metileno, além de 94% do principal componente, o poli(etileno carbonato). A presença de outros compostos na mistura explica os picos observados na curva DSC, uma vez que não se trata de uma substância pura. Substâncias puras são caracterizadas por um único pico agudo na curva de DSC, diferente do observado no polímero avaliado (BOLLA; NANGIA, 2012).

A CFZ apresentou um pico agudo endotérmico com  $T_{\text{pico}}$  em 224 °C e energia de entalpia ( $\Delta H$ ) de -71 J/g. A curva endotérmica de CFZ mostra um único pico agudo, indicativo de substância pura (BOLLA; NANGIA, 2012). O valor de  $T_{\text{pico}}$  encontrado neste trabalho confirma relatos da literatura descritos como picos de fusão da CFZ a 219,5 (BOLLA; NANGIA, 2012), 220 (BRUNAUGH *et al.*, 2017), 224 (CHAVES *et al.*, 2018b) e 228 °C (CHAVES *et al.*, 2018a). A análise da CFZ que obteve mesma temperatura de fusão deste trabalho (224 °C) foi analisada nas mesmas condições, com taxa de aquecimento de 10 °C/min (CHAVES *et al.*, 2018b).

A mistura binária PEC-CFZ apresentou dois eventos endotérmicos em 216 e 229 °C e variação de energia -66 e -159 J/g, respectivamente. Comparando os picos das substâncias avaliadas separadamente, bem como os valores de  $\Delta H$ , pode-se observar deslocamento e sobreposição dos picos do PEC e do fármaco. Deslocamento dos picos e variações de  $\Delta H$ , como observados para essa mistura, podem ocorrer devido à heterogeneidade da amostra, ou reduzida pureza devido ao próprio efeito da mistura binária (ROSASCO *et al.*, 2018; VERMA; GARG, 2005).

As curvas DSC referentes às análises das NC-branca e com fármaco (NC-CFZ) apresentaram picos nas temperaturas de 134 e 67 °C, respectivamente. As energias de entalpia dos picos foram de -1 kJ/g para a NC-branca e -2 kJ/g para a NC-CFZ. Não foi observado pico coincidente na temperatura de fusão da CFZ e do PEC, comparando o resultado da mistura com as curvas das substâncias avaliadas individualmente. Na amostra de NC-CFZ houve ainda a presença de um segundo pico em 99 °C, com entalpia de -58 J/g. A presença de pico irregular próximo à temperatura de 100 °C está relacionado à presença de água nas dispersões de nanocápsulas. Não foi observado pico endotérmico, característico do fármaco, próximo a 224 °C nas formulações avaliadas. A ausência do pico do fármaco sugere modificação do estado cristalino para o amorfo, podendo assim contribuir para o aumento da solubilidade da CFZ (CHAVES *et al.*, 2015; CHAVES *et al.*, 2018a).

A curva DSC do manitol apresentou pico endotérmico de fusão em 168 °C e entalpia de -303 J/g. A amostra de NC-CFZ liofilizada apresentou dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro com pico em 62 °C e o

segundo em 168 °C. A presença do manitol nas amostras liofilizadas pôde ser observada pela presença desse segundo pico, característico do crioprotetor. Já o primeiro pico, em 62 °C, não pôde ser relacionado ao fármaco, polímero ou crioprotetor. O tensoativo de fase aquosa utilizado na formulação, Poloxamer 407, possui pico de fusão em 57 °C (dados não apresentados). É possível que o pico observado na amostra liofilizada esteja relacionado à sua recristalização durante a etapa de congelamento, por se tratar de um tensoativo de fase aquosa. O deslocamento de 5 °C do pico comparado à substância pura pode ter ocorrido por influência dos outros componentes da formulação.

### 5.3.5. Estabilidade das partículas em meios biológicos simulados

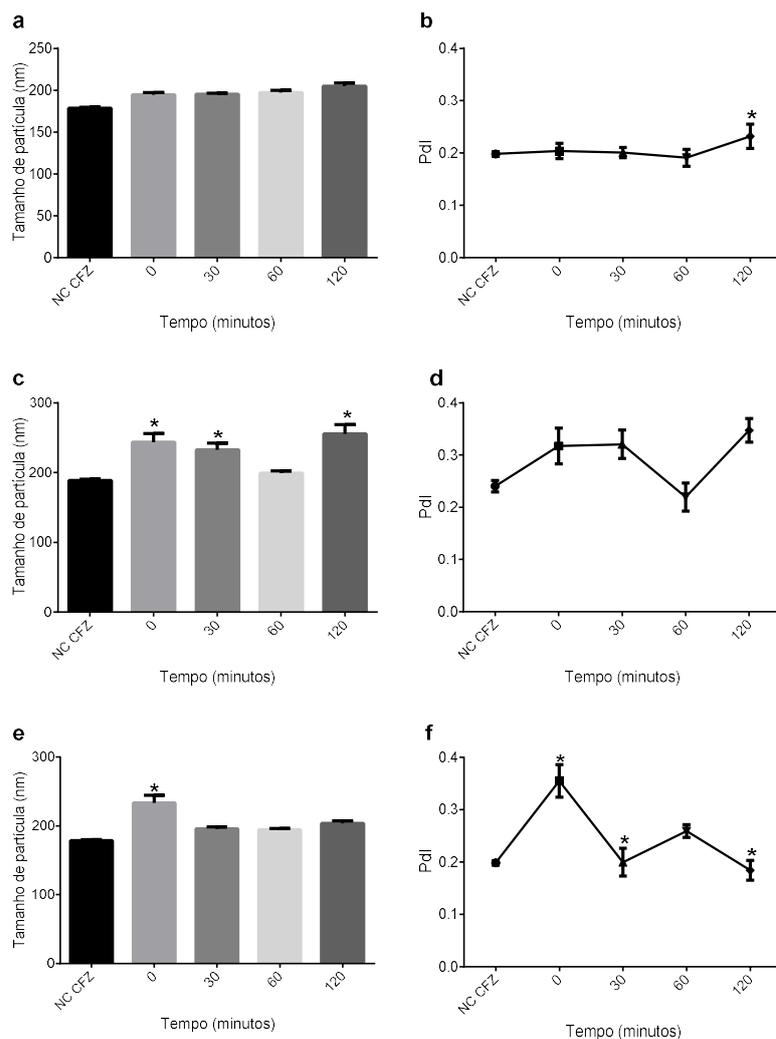
O estudo de estabilidade das nanopartículas foi realizado em solução de PBS e em soluções de mucina preparadas a 0,08 e 0,1% (m/v). As concentrações reais de mucina foram determinadas após liofilização como 0,05% e  $0,07 \pm 0,01\%$ , respectivamente. A avaliação da estabilidade de nanopartículas em meios biológicos permite prever possível agregação das partículas. Este estudo é importante para verificação da segurança e eficácia de nanomedicamentos, já que sua agregação influenciará diretamente na biodistribuição, farmacocinética e toxicidade *in vivo* da formulação (MOORE *et al.*, 2015).

As nanopartículas permaneceram estáveis na presença de PBS pH 7,4 (Figura 15, a/b). Se comparado com a condição inicial, o diâmetro médio das partículas não apresentou variação significativa durante o tempo avaliado. O Pdl teve variação significativa no tempo de 120 minutos ( $0,23 \pm 0,02$ ,  $p=0,02$ ), porém não foi observada a presença de aglomerados que pudessem afetar sua estabilidade (Figura 15, a/b).

A avaliação da estabilidade em mucina é importante, pois trata-se da proteína mais abundante no muco pulmonar. A avaliação da estabilidade das nanopartículas em mucina pode ser utilizada como indicativo do seu comportamento ao atingir o tecido pulmonar após administração por inalação (PELLOSI *et al.*, 2018). A análise de estabilidade foi realizada comparando o diâmetro médio e Pdl obtidos inicialmente e nos tempos avaliados. Foi

observado aumento significativo no diâmetro médio das nanopartículas nas concentrações de mucina avaliadas. Em solução de mucina 0,08% (m/v) em 120 minutos o diâmetro médio foi de  $255,5 \pm 13,7$  nm ( $p=0,01$ ), enquanto em solução de mucina 0,1% (m/v) foi de  $233,3 \pm 11,1$  nm ( $p=0,01$ ) no tempo 0. O Pdl em solução de mucina 0,08% (m/v) (Figura 15, c/d) não apresentou variação significativa se comparado com a condição inicial, enquanto a solução de mucina 0,1% (m/v) houve aumento do Pdl. Apesar das variações, não foi observada agregação das partículas em nenhuma das concentrações avaliadas, indicando que a estabilidade nos meios avaliados foi mantida até 120 minutos.

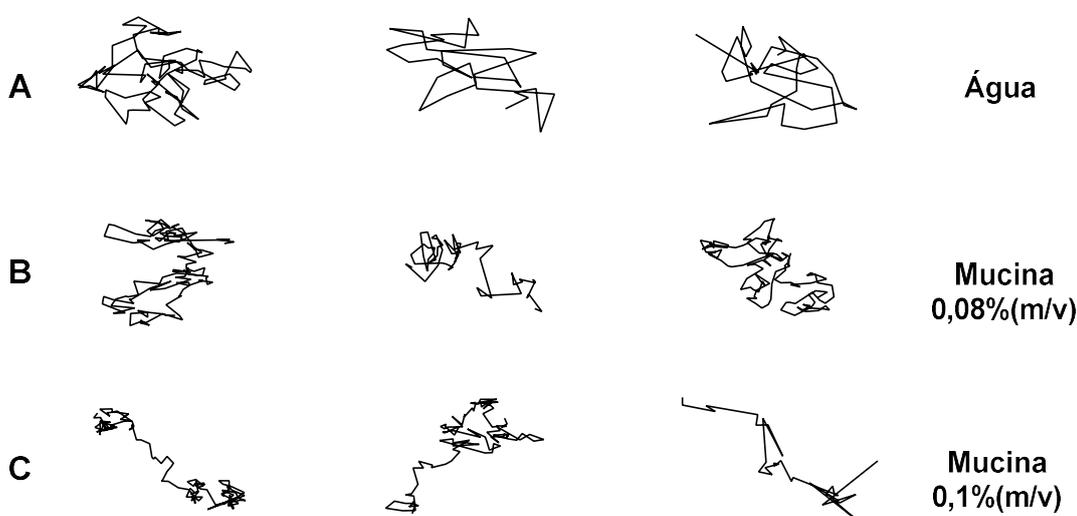
Figura 15 - Diâmetro médio e índice de polidispersão (Pdl) de nanocápsulas de poli(etileno carbonato) (PEC) contendo clofazimina (CFZ), avaliados durante o estudo de estabilidade das nanocápsulas em meios biológicos simulados, sendo elas: solução de PBS pH 7,4, mucina 0,08% (m/v) e mucina 0,1% (m/v). **a/b)** solução PBS pH 7,4; **c/d)** solução de mucina 0,08% (m/v); **e/f)** solução de mucina 0,1% (m/v). \* $p<0,05$  vs NC-CFZ.



### 5.3.6. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, *nanoparticle tracking analysis*) em meios biológicos simulados

A análise das trajetórias das partículas na água, solução de mucina 0,08% (m/v) e mucina 0,1% (m/v) podem ser observadas na Figura 16.

Figura 16 - Representação esquemática da trajetória percorrida em 5 segundos pelas nanopartículas na presença de: **A**) água, **B**) solução de mucina 0,08% (m/v) e **C**) solução de mucina 0,1% (m/v).



Como esperado, as nanopartículas tiveram maior motilidade em água, comparado às partículas em solução de mucina 0,08% e 0,1% (m/v) (Figura 16b e 16c). A mucina é a principal proteína encontrada no muco pulmonar (PELLOSI *et al.*, 2018). Sendo assim, por meio da análise da motilidade das partículas neste meio é possível sugerir o comportamento das partículas que atingirem o trato respiratório inferior após a administração da formulação pela via pulmonar.

Apesar das partículas apresentarem motilidade menor em mucina do que em água, essa redução é esperada devido à composição deste meio biológico. Apesar da presença de emaranhados de proteínas, as partículas possuem tamanho pequeno o suficiente para serem capazes de se movimentar na mucina. Este movimento é importante para que elas sejam capazes de penetrar na camada de muco com velocidade suficiente para

reduzir sua eliminação pelo *clearance* mucociliar (SCHUSTER *et al.*, 2013). Essa motilidade possibilita ainda que as partículas se difundam pelo muco e cheguem até os alvéolos pulmonares, local alvo para o tratamento da tuberculose.

Partículas que penetram o muco das vias aéreas podem reduzir o *clearance*, melhorar a distribuição, a retenção e o perfil farmacocinético das partículas nas vias aéreas (SCHUSTER *et al.*, 2013).

#### **5.4. Conclusões e Perspectivas**

Devido à presença de um núcleo oleoso nas NC, a CFZ, que também possui característica lipofílica, apresentou maior EE neste tipo de formulação. Apesar das NC possuírem maior eficiência de encapsulação, o perfil de liberação do fármaco será avaliado para os dois tipos de partículas. Esta comparação permitirá observar diferenças no perfil de liberação e confirmação da liberação sustentada esperada para partículas preparadas com PEC.

A obtenção de um pó para administração pulmonar foi possível por meio da liofilização das nanopartículas na presença de manitol 10% (m/v). O estudo de estabilidade da formulação após a liofilização deve ser realizado, a fim de verificar se a formulação é capaz de manter as características iniciais durante o armazenamento.

As partículas apresentaram-se estáveis nos meios biológicos simulados, com aumento de tamanho na presença de mucina 0,08% e 0,1% (m/v). A avaliação da estabilidade nos meios biológicos fluido pulmonar simulado (ou SLF, *simulated lung fluid*) e fluido lisossomal artificial (ou ALF *artificial lysosomal fluid*) será complementarmente estudada.

Na análise de NTA foi possível observar que as nanopartículas foram capazes de se movimentar na presença das soluções de mucina 0,08 e 0,1 % (m/v), e espera-se que poderão então se difundir pelo muco e chegar até o local de interesse no tratamento da TB, os alvéolos pulmonares.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) será realizada para avaliação da morfologia das nanopartículas e também do pó liofilizado. Esta análise será essencial para a elucidação do formato das partículas, bem

como a organização destas após o processo de liofilização. A combinação desses resultados de caracterização físico-química permitirá avaliar a viabilidade de produção de uma formulação seca para administração pulmonar de CFZ para tratamento da tuberculose.

## 5.5. Referências bibliográficas

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-713, 2006.

ARBISER, J. L.; MOSCHELLA, S. L. Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 2 Pt 1, p. 241-247, 1995.

BOHR, A.; WANG, Y.; HARMANKAYA, N.; WATER, J. J.; BALDURSDOTTIR, S.; ALMDAL, K.; BECK-BROICHSITTER, M. Molecular weight-dependent degradation and drug release of surface-eroding poly(ethylene carbonate). **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics**, v. 115, p. 140-148, 2017.

BOHR, A.; WATER, J. J.; WANG, Y.; ARNFAST, L.; BECK-BROICHSITTER, M. Potential of surface-eroding poly(ethylene carbonate) for drug delivery to macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 2, p. 814-820, 2016.

BOLLA, G.; NANGIA, A. Clofazimine Mesylate: A High Solubility Stable Salt. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 12, p. 6250-6259, 2012.

BRUNAUGH, A. D.; JAN, S. U.; FERRATI, S.; SMYTH, H. D. C. Excipient-Free Pulmonary Delivery and Macrophage Targeting of Clofazimine via Air Jet Micronization. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 4019-4031, 2017.

CHAVES, L.L.; VIEIRA, A.C.C.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Rational and precise development of amorphous polymeric systems with dapsona by response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 662-871, 2015.

CHAVES, L. L.; COSTA-LIMA, S. A.; VIEIRA, A. C. C.; BARREIROS, L.; SEGUNDO, M. A.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Development of PLGA nanoparticles loaded with clofazimine for oral delivery: Assessment of formulation variables and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 28-37, 2018a.

CHAVES, L. L.; LIMA, S.; VIEIRA, A. C. C.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Overcoming clofazimine intrinsic toxicity: statistical modelling and characterization of solid lipid nanoparticles. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 15, n. 139, 2018b.

CHOLO, M. C.; STEEL, H. C.; FOURIE, P. B.; GERMISHUIZEN, W. A.; ANDERSON, R. Clofazimine: current status and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 290-298, 2012.

COSTA, A.; PINHEIRO, M.; MAGALHAES, J.; RIBEIRO, R.; SEABRA, V.; REIS, S.; SARMENTO, B. The formulation of nanomedicines for treating tuberculosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 102, p. 102-115, 2016.

DALCOLMO, M.; GAYOSO, R.; SOTGIU, G.; D'AMBROSIO, L.; ROCHA, J. L.; BORGA, L.; FANDINHO, F.; BRAGA, J. U.; GALES, V. M.; BARREIRA, D.; SANCHEZ, D. A.; DOCKHORN, F.; CENTIS, R.; CAMINERO, J. A.; MIGLIORI, G. B. Effectiveness and safety of clofazimine in multidrug-resistant tuberculosis: a nationwide report from Brazil. **European Respiratory Journal**, v. 49, n. 3, 2017.

HORSBURGH, C. R., JR.; BARRY, C. E., 3RD; LANGE, C. Treatment of Tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 22, p. 2149-2160, 2015.

KAIALY, W.; NOKHODCHI, A. Freeze-dried mannitol for superior pulmonary drug delivery via dry powder inhaler. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 2, p. 458-477, 2013.

KURZ, S. G.; FURIN, J. J.; BARK, C. M. Drug-Resistant Tuberculosis: Challenges and Progress. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 30, n. 2, p. 509-522, 2016.

LI, S.; CHAN, J. Y.; LI, Y.; BARDELANG, D.; ZHENG, J.; YEW, W. W.; CHAN, D. P.; LEE, S. M.; WANG, R. Complexation of clofazimine by macrocyclic cucurbit[7]uril reduced its cardiotoxicity without affecting the antimycobacterial efficacy. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 31, p. 7563-7569, 2016.

LOHMANN-MATTHES, M. L.; STEINMULLER, C.; FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 7, n. 9, p. 1678-1689, 1994.

MEHTA, P. Imagine the Superiority of Dry Powder Inhalers from Carrier Engineering. **Journal of Drug Delivery**, v. 2018, p. 5635010, 2018.

MOORE, T. L.; RODRIGUEZ-LORENZO, L.; HIRSCH, V.; BALOG, S.; URBAN, D.; JUD, C.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; LATTUADA, M.; PETRI-FINK, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 17, p. 6287-305, 2015.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

PAL, S.L; JANA, U.; MANNA, P.K; MOHANTA, G.P.; MANAVALAN, R. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, p. 228-234, 2011.

PARUMASIVAM, T.; CHANG, R. Y.; ABDELGHANY, S.; YE, T. T.; BRITTON, W. J.; CHAN, H. K. Dry powder inhalable formulations for anti-tubercular therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 102, p. 83-101, 2016.

PELLOSI, D. S.; D'ANGELO, I.; MAIOLINO, S.; MITIDIERI, E.; D'EMMANUELE DI VILLA BIANCA, R.; SORRENTINO, R.; QUAGLIA, F.; UNGARO, F. In vitro/in vivo investigation on the potential of Pluronic(R) mixed micelles for pulmonary drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics**, v. 130, p. 30-38, 2018.

PHAM, D. D.; FATTAL, E.; TSAPIS, N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 517-529, 2015.

ROSASCO, M. A.; BONAFEDE, S. L.; FAUDONE, S. N.; SEGALL, A. I. Compatibility study of tobramycin and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, FTIR, DRX, and HPLC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2018.

SCHUSTER, B.S.; SUK, J.S.; WOODWORTH, G.F.; HANES, J. Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. **Biomaterials**, v. 34, p. 3439-3446, 2013.

STOLL, G. H.; NIMMERFALL, F.; ACEMOGLU, M.; BODMER, D.; BANTLE, S.; MULLER, I.; MAHL, A.; KOLOPP, M.; TULLBERG, K. Poly(ethylene carbonate)s, part II: degradation mechanisms and parenteral delivery of bioactive agents. **Journal of Controlled Release**, v. 76, n. 3, p. 209-225, 2001.

SUKHITHASRI, V.; VINOD, V.; VARMA, S.; BISWAS, R. Mycobacterium tuberculosis treatment modalities and recent insights. **Curr Drug Deliv**, v. 11, n. 6, p. 744-52, 2014.

TANG, S.; YAO, L.; HAO, X.; LIU, Y.; ZENG, L.; LIU, G.; LI, M.; LI, F.; WU, M.; ZHU, Y.; SUN, H.; GU, J.; WANG, X.; ZHANG, Z. Clofazimine for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: prospective, multicenter, randomized controlled study in China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1361-1367, 2015.

VARSHOSAZ, J.; ESKANDARI, S.; TABBAKHIAN, M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1157-1163, 2012.

VERMA, R. K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug–excipient compatibility testing. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 4, p. 633-644, 2005.

VERMA, R. K.; GERMISHUIZEN, W. A.; MOTHEO, M. P.; AGRAWAL, A. K.; SINGH, A. K.; MOHAN, M.; GUPTA, P.; GUPTA, U. D.; CHOLO, M.; ANDERSON, R.; FOURIE, P. B.; MISRA, A. Inhaled microparticles containing clofazimine are efficacious in treatment of experimental tuberculosis in mice. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 1050-1052, 2013.

WHO. **Global tuberculosis report 2018**. World Health Organization. Geneva 2018.

ZHANG, Y.; FENG, J.; MCMANUS, S. A.; LU, H. D.; RISTROPH, K. D.; CHO, E. J.; DOBRIJEVIC, E. L.; CHAN, H. K.; PRUD'HOMME, R. K. Design and Solidification of Fast-Releasing Clofazimine Nanoparticles for Treatment of Cryptosporidiosis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 3480-3488, 2017.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

A interação da CFZ com excipientes que podem ser utilizados no desenvolvimento de formulações de nanopartículas poliméricas foi avaliada. Foi possível verificar que os polímeros PCL e PLA são capazes de amorfizar a CFZ totalmente ou parcialmente quando em mistura binária, porém o PLA apresenta indicativo de incompatibilidade com o fármaco. Outros polímeros como PEC e PLGA apresentaram menor interação com o fármaco, não apresentando completa amorfização da CFZ. Considerando que no preparo da formulação a proporção de polímero é maior, espera-se que o fármaco seja completamente amorfizado por estes polímeros. Esses resultados sugerem que os polímeros PCL, PEC e PLGA seriam mais adequados que PLA para o preparo de nanopartículas para liberação prolongada de CFZ. Os tensoativos foram capazes de solubilizar a CFZ, característica importante para otimizar a encapsulação do fármaco em nanopartículas poliméricas.

Nanopartículas inaláveis de PEC contendo CFZ foram otimizadas e caracterizadas quanto ao diâmetro médio, Pdl e EE. As nanocápsulas apresentaram maior eficiência de encapsulação e distribuição de tamanho monomodal. Pós-respiráveis foram obtidos após a liofilização das formulações e o manitol 10% (m/v) apresentou-se como melhor crioprotetor, possibilitando a redispersão das nanopartículas em água, após a liofilização. As partículas de PEC foram capazes de permanecer estáveis em meio biológico simulado, sem agregação. Foram capazes de se mover através da solução de simulação do muco pulmonar, indicando que poderão alcançar as células alvo no tratamento da tuberculose após administração local nos pulmões.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a viabilidade da produção de nanopartículas poliméricas para liberação local de clofazimina nos pulmões, e servirão como base para estudos mais aprofundados do sistema nanoparticulado desenvolvido, e avaliação da sua eficácia *in vitro*. Algumas perspectivas são vislumbradas para a continuação destes estudos. A avaliação da estabilidade das formulações liofilizadas poderá ser realizada a fim de avaliar se, após o armazenamento, a formulação será capaz de

manter as características iniciais de tamanho. Ainda, a avaliação do MMAD e do perfil de liberação *in vitro* em meio pulmonar simulado permitirão prever se as partículas serão capazes de chegar até os alvéolos pulmonares e quanto de fármaco será liberado localmente, e em quanto tempo.

## REFERÊNCIAS

---

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-713, 2006.

ANDRADE, F.; RAFAEL, D.; VIDEIRA, M.; FERREIRA, D.; SOSNIK, A.; SARMENTO, B. Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1816-27, 2013.

ARBISER, J. L.; MOSCHELLA, S. L. Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 2 Pt 1, p. 241-247, 1995.

AUNG, K. J. M.; VAN DEUN, A.; DECLERCQ, E.; SARKER, M. R.; DAS, P. K.; HOSSAIN, M. A.; RIEDER, H. L. Successful '9-month Bangladesh regimen' for multidrug-resistant tuberculosis among over 500 consecutive patients. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 10, p. 1180-1187 (8), 2014.

AZARMI, S.; ROA, W. H.; LOBENBERG, R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 8, p. 863-875, 2008.

BALESTRIERI, F.; MAGRI, A. D.; MAGRI, A. L.; MARINI, D.; SACCHINI, A. Application of differential scanning calorimetry to the study of drug-excipient compatibility. **Thermochemica Acta**, v. 285, p. 337-345, 1996.

BARRY, V. C.; BELTON, J. G.; CONALTY, M. L.; DENNENY, J. M.; EDWARD, D. W.; O'SULLIVAN, J. F.; TWOMEY, D.; WINDER, F. A New Series of Phenazines (Rimino-Compounds) With High Antituberculosis Activity. **Nature**, v. 179, p. 1013, 1957.

BEZERRA, G. S. N.; PEREIRA, M. A. V.; OSTROSKY, E. A.; BARBOSA, E. G.; DE MOURA, M. D. F. V.; FERRARI, M.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1683-1691, 2017.

BOHR, A.; WANG, Y.; HARMANKAYA, N.; WATER, J. J.; BALDURSDOTTIR, S.; ALMDAL, K.; BECK-BROICHSITTER, M. Molecular weight-dependent degradation and drug release of surface-eroding poly(ethylene carbonate). **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics**, v. 115, p. 140-148, 2017.

BOHR, A.; WATER, J. J.; WANG, Y.; ARNFAST, L.; BECK-BROICHSITTER, M. Potential of surface-eroding poly(ethylene carbonate) for drug delivery to macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 2, p. 814-820, 2016.

BOLLA, G.; NANGIA, A. Clofazimine Mesylate: A High Solubility Stable Salt. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 12, p. 6250-6259, 2012.

BORGES, J. Q.; SANTOS, B. A. D.; CANGUSSU, L. G. M. S. D.; MAGALHÃES, L. C. S.; COSTA, M. A. A.; SANTOS, R. M. C. D.; FONSECA, A. A.; CRESPO, T. S.; ROCHA, J. S. B. Atual cenário da tuberculose no Brasil: medidas de identificação, tratamento e prevenção da doença. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. Sup. 7, p. S341-S346, 2017.

BRASIL. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde: 284 p. 2011.

\_\_\_\_\_. **Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas**. Boletim Epidemiológico. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde, 2018.

BRUNAUGH, A. D.; JAN, S. U.; FERRATI, S.; SMYTH, H. D. C. Excipient-Free Pulmonary Delivery and Macrophage Targeting of Clofazimine via Air Jet Micronization. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 4019-4031, 2017.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82-97, 2014.

CHAVES, L.L.; VIEIRA, A.C.C.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Rational and precise development of amorphous polymeric systems with dapsona by response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 662-871, 2015.

CHAVES, L. L.; COSTA-LIMA, S. A.; VIEIRA, A. C. C.; BARREIROS, L.; SEGUNDO, M. A.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Development of PLGA nanoparticles loaded with clofazimine for oral delivery: Assessment of formulation variables and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 28-37, 2018a.

CHAVES, L. L.; LIMA, S.; VIEIRA, A. C. C.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Overcoming clofazimine intrinsic toxicity: statistical modelling and characterization of solid lipid nanoparticles. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 15, n. 139, 2018b.

CHOLO, M. C.; STEEL, H. C.; FOURIE, P. B.; GERMISHUIZEN, W. A.; ANDERSON, R. Clofazimine: current status and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 290-298, 2012.

COLE, S. T.; ALZARI, P. M. Towards new tuberculosis drugs. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. Pt 5, p. 1321-1324, 2007.

COSTA, A.; PINHEIRO, M.; MAGALHAES, J.; RIBEIRO, R.; SEABRA, V.; REIS, S.; SARMENTO, B. The formulation of nanomedicines for treating tuberculosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 102, p. 102-115, 2016.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Compatibility of the antitumoral  $\beta$ -lapachone with different solid dosage forms excipients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 4, p. 590-598, 2007.

DALCOLMO, M.; GAYOSO, R.; SOTGIU, G.; D'AMBROSIO, L.; ROCHA, J. L.; BORGA, L.; FANDINHO, F.; BRAGA, J. U.; GALES, V. M.; BARREIRA, D.; SANCHEZ, D. A.; DOCKHORN, F.; CENTIS, R.; CAMINERO, J. A.; MIGLIORI, G. B. Effectiveness and safety of clofazimine in multidrug-resistant tuberculosis: a nationwide report from Brazil. **European Respiratory Journal**, v. 49, n. 3, 2017.

DEVORE, J. L. **Probability and Statistics for Engineering and the Sciences**. 4. Belmont, CA: 1995.

DORATI, R.; CONTI, B.; COLZANI, B.; DONDI, D.; LAZZARONI, S.; MODENA, T.; GENTA, I. Ivermectin controlled release implants based on poly-D,L-lactide and poly-epsilon-caprolactone. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 101-110, 2018.

DHEDA, K.; GUMBO, T.; MAARTENS, G.; DOOLEY, K.E.; MCNERNEY, R.; MURRAY, M.; FURIN, J.; NARDELL, E. A.; LONDON, L.; LESSEM, E.; THERON, G.; HELDEN, P.V.; NIEMANN, S. ; MERKER, M.; DOWDY, D.; RIE, A.V.; SIU, G.K.H; PASIPANODYA, J.G.; RODRIGUES, C.; CLARK, T.G.; SIRGEL, F.A.; ESMAIL, A.; LIN, H.; ATRE, S.R.; SCHAAF, H.S.; CHANG, K.C.; LANGE, C.; NAHID, P.; UDWADIA, Z.F.; HORSBURGH JR, C.R.; CHURCHYARD, G.; MENZIES, D.; HESSELING, A.C.; NUERMBERGER, E.; MCLLERON, H.; FENNELLY, K.P.; GOEMAERE, E.; JARAMILLO, E.; LOW, M.; JARA, C.M.; PADAYATCHI, N.; WARREN, R.M. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistance, and incurable tuberculosis. **The Lancet Respiratory Medicine Commission**, v. 5, p. 291-360, 2017.

GAO, R.; JIN, Y.; YANG, Q.-Y.; SUN, B.-W.; LIN, J. Study of stability and drug-excipient compatibility of estradiol and pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 839-845, 2015.

GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63-84, 2001.

HORSBURGH, C. R., JR.; BARRY, C. E., 3RD; LANGE, C. Treatment of Tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 22, p. 2149-2160, 2015.

JONES, D. Tuberculosis success. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 3, p. 175-176, 2013.

KAIALLY, W.; NOKHODCHI, A. Freeze-dried mannitol for superior pulmonary drug delivery via dry powder inhaler. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 2, p. 458-477, 2013.

KAUR, A.; GOINDI, S.; KATARE, O. P. Thermal analysis and quantitative characterization of compatibility between diflunisal and lipid excipients as raw materials for development of solid lipid nanoparticles. **Thermochimica Acta**, v. 643, p. 23-32, 2016.

KAWAKAMI, K. Chapter 15 - Pharmaceutical Applications of Thermal Analysis. In: VYAZOVKIN, S.;KOGA, N., *et al* (Ed.). **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry**: Elsevier Science B.V., v.6, 2018. p.613-641. ISBN 1573-4374.

KURZ, S. G.; FURIN, J. J.; BARK, C. M. Drug-Resistant Tuberculosis: Challenges and Progress. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 30, n. 2, p. 509-522, 2016.

KUZMOV, A.; MINKO, T. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 500-518, 2015.

LI, S.; CHAN, J. Y.; LI, Y.; BARDELANG, D.; ZHENG, J.; YEW, W. W.; CHAN, D. P.; LEE, S. M.; WANG, R. Complexation of clofazimine by macrocyclic cucurbit[7]uril reduced its cardiotoxicity without affecting the antimycobacterial efficacy. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 31, p. 7563-7569, 2016.

LILTORP, K.; LARSEN, T. G.; WILLUMSEN, B.; HOLM, R. Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 3, p. 424-428, 2011.

LOHMANN-MATTHES, M. L.; STEINMULLER, C.; FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 7, n. 9, p. 1678-1689, 1994.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 523-530, 2006.

MATOS, A. P. S.; COSTA, J. S.; BONIATTI, J.; SEICEIRA, R. C.; PITALUGA, A.; OLIVEIRA, D. L.; VIÇOSA, A. L.; HOLANDINO, C. Compatibility study between diazepam and tablet excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1675-1682, 2017.

MEHTA, P. Imagine the Superiority of Dry Powder Inhalers from Carrier Engineering. **Journal of Drug Delivery**, v. 2018, p. 5635010, 2018.

MIRNEJAD, R.; ASADI, A.; KHOSHNOOD, S.; MIRZAEI, H.; HEIDARY, M.; FATTORINI, L.; GHODOUSI, A.; DARBAN-SAROKHALIL, D. Clofazimine: A useful antibiotic for drug-resistant tuberculosis. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1353-1359, 2018.

MOORE, T. L.; RODRIGUEZ-LORENZO, L.; HIRSCH, V.; BALOG, S.; URBAN, D.; JUD, C.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; LATTUADA, M.; PETRI-FINK, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 17, p. 6287-305, 2015.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

NASIRUDDIN, M.; NEYAZ, M. K.; DAS, S. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2017, p. 4920209, 2017.

PAI, M.; BEHR, M. A.; DOWDY, D.; DHEDA, K.; DIVANGAHI, M.; BOEHME, C. C.; GINSBERG, A.; SWAMINATHAN, S.; SPIGELMAN, M.; GETAHUN, H.; MENZIES, D.; RAVIGLIONE, M. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16076, 2016.

PAL, S.L; JANA, U.; MANNA, P.K; MOHANTA, G.P.; MANAVALAN, R. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, p. 228-234, 2011.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 430-435, 2005.

PARUMASIVAM, T.; CHANG, R. Y.; ABDELGHANY, S.; YE, T. T.; BRITTON, W. J.; CHAN, H. K. Dry powder inhalable formulations for anti-tubercular therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 102, p. 83-101, 2016.

PELLOSI, D. S.; D'ANGELO, I.; MAIOLINO, S.; MITIDIERI, E.; D'EMMANUELE DI VILLA BIANCA, R.; SORRENTINO, R.; QUAGLIA, F.; UNGARO, F. In vitro/in vivo investigation on the potential of Pluronic(R) mixed micelles for pulmonary drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics**, v. 130, p. 30-38, 2018.

PHAM, D. D.; FATTAL, E.; TSAPIS, N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 517-529, 2015.

ROSASCO, M. A.; BONAFEDE, S. L.; FAUDONE, S. N.; SEGALL, A. I. Compatibility study of tobramycin and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, FTIR, DRX, and HPLC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2018.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. D. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 525-532, 2002.

BRASIL. **Brasil Livre da Tuberculose - Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como problema de saúde pública**. Ministério da Saúde. Brasília, 2017.

SCHUSTER, B.S.; SUK, J.S.; WOODWORTH, G.F.; HANES, J. Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. **Biomaterials**, v. 34, p. 3439-3446, 2013.

SILVA, L. A. D.; TEIXEIRA, F. V.; SERPA, R. C.; ESTEVES, N. L.; DOS SANTOS, R. R.; LIMA, E. M.; DA CUNHA-FILHO, M. S. S.; ARAUJO, A. A. D.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Evaluation of carvedilol compatibility with lipid excipients for the development of lipid-based drug delivery systems. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2337-2344, 2016.

SINGH, A.; GARG, G.; SHARMA, P.K. Nanospheres: a novel approach for targeted drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 5, n. 3, p. 84-88, 2010.

SOUZA, M. V. N. D.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, p. 678-682, 2005.

STOLL, G. H.; NIMMERFALL, F.; ACEMOGLU, M.; BODMER, D.; BANTLE, S.; MULLER, I.; MAHL, A.; KOLOPP, M.; TULLBERG, K. Poly(ethylene carbonate)s, part II: degradation mechanisms and parenteral delivery of bioactive agents. **Journal of Controlled Release**, v. 76, n. 3, p. 209-225, 2001.

SUKHITHASRI, V.; VINOD, V.; VARMA, S.; BISWAS, R. Mycobacterium tuberculosis treatment modalities and recent insights. **Curr Drug Deliv**, v. 11, n. 6, p. 744-52, 2014.

SUN, X. Q.; LEE, K. O.; MEDINA, M. A.; CHU, Y. H.; LI, C. C. Melting temperature and enthalpy variations of phase change materials (PCMs): a differential scanning calorimetry (DSC) analysis. **Phase Transitions**, v. 91, n. 6, p. 667-680, 2018.

TANG, S.; YAO, L.; HAO, X.; LIU, Y.; ZENG, L.; LIU, G.; LI, M.; LI, F.; WU, M.; ZHU, Y.; SUN, H.; GU, J.; WANG, X.; ZHANG, Z. Clofazimine for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: prospective, multicenter, randomized controlled study in China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1361-1367, 2015.

TIȚA, B.; FULIAȘ, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TIȚA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 221-227, 2011.

VAN DEUN, A.; MAUG, A. K.; SALIM, M. A.; DAS, P. K.; SARKER, M. R.; DARU, P.; RIEDER, H. L. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 5, p. 684-692, 2010.

VARSHOSAZ, J.; ESKANDARI, S.; TABBAKHIAN, M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1157-1163, 2012.

VERMA, R. K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug–excipient compatibility testing. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 4, p. 633-644, 2005.

VERMA, R. K.; GERMISHUIZEN, W. A.; MOTHEO, M. P.; AGRAWAL, A. K.; SINGH, A. K.; MOHAN, M.; GUPTA, P.; GUPTA, U. D.; CHOLO, M.; ANDERSON, R.; FOURIE, P. B.; MISRA, A. Inhaled microparticles containing clofazimine are efficacious in treatment of experimental tuberculosis in mice. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 1050-1052, 2013.

VJECHA, M. J.; TIBERI, S.; ZUMLA, A. Accelerating the development of therapeutic strategies for drug-resistant tuberculosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 9, p. 607-608, 2018.

WHO. **Global tuberculosis report 2018**. World Health Organization. Geneva, 2018.

YHEE, J. Y.; IM, J.; NHO, R. S. Advanced Therapeutic Strategies for Chronic Lung Disease Using Nanoparticle-Based Drug Delivery. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 9, 2016.

ZAYED, M. A.; FAHMEY, M. A.; HAWASH, M. F. Investigation of diazepam drug using thermal analyses, mass spectrometry and semi-empirical MO calculation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 799-805, 2005.

ZHANG, J.; WU, L.; CHAN, H. K.; WATANABE, W. Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 441-455, 2011.

ZHANG, Y.; FENG, J.; MCMANUS, S. A.; LU, H. D.; RISTROPH, K. D.; CHO, E. J.; DOBRIJEVIC, E. L.; CHAN, H. K.; PRUD'HOMME, R. K. Design and Solidification of Fast-Releasing Clofazimine Nanoparticles for Treatment of Cryptosporidiosis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 3480-3488, 2017.

ZHOU, Q. T.; LEUNG, S. S.; TANG, P.; PARUMASIVAM, T.; LOH, Z. H.; CHAN, H. K. Inhaled formulations and pulmonary drug delivery systems for respiratory infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 85, p. 83-99, 2015.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 388-404, 2013.

## **Compatibility evaluation between clofazimine and excipients used in the development of polymeric nanoparticles for controlled release**

Danielle Flávia da Silva Ribeiro<sup>1</sup>, Luís Antônio Dantas Silva<sup>2</sup>, Eliana Martins Lima<sup>2</sup>, Marco Júnio Peres-Filho<sup>3</sup>, Thais Leite Nascimento<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, Goiás, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Goiás, Itumbiara, Goiás, Brasil.

\*Correspondence: Thais Leite Nascimento

Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, FarmaTec – 5ª Avenida c/Rua 240 s/n, Praça Universitária, Goiânia, GO 74605-170, Brazil.

Tel +55 62 3209 6039

Fax +55 62 3209 6039

Email thais.leite.nascimento@ufg.br

### **Authors ORCID:**

Eliana Martins Lima 0000-0003-1231-5803

Thais Leite Nascimento 0000-0002-2656-7609

### **Acknowledgments**

This work was supported by the following Brazilian research funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Pesquisas (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (FUNAPE) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

***Artigo submetido ao periódico Journal of Thermal Analysis and Calorimetry em 21 de fevereiro de 2019.***

## Abstract

Clofazimine (CFZ) is a derivate of iminophenazine used as an antimycobacterial and anti-inflammatory agent. It is active against strains of multidrug resistant tuberculosis, a disease for which the treatment by the oral route is related to low CFZ bioavailability and several side effects. For this reasons, new technologies for improving efficiency of the treatment with CFZ have been explored. Compatibility studies are important to guide the rational choice of polymer and adjuvants to be used in formulations and prevent stability issues. Here, thermoanalytical analysis combined with infrared spectroscopy were used to evaluate the compatibility between CFZ and polymers/excipients used in drug delivery systems for controlled release. Possible amorphization of CFZ was observed in the presence of the polymers poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL), poly(lactic acid) (PLA) and poly(D,L-lactide-co-glycolide)-alkyl ester 75:25 (PLGA75:25), while the adjuvants Span60<sup>®</sup>, Span80<sup>®</sup>, Span85<sup>®</sup>, Poloxamer188, Poloxamer407, polyvynil alcohol (PVA) and Tween80<sup>®</sup> promoted the solubilization of the drug, according to DSC curves. Poly(ethylene carbonate) (PEC), PLGA (50:50, 75:25 and 85:15) were compatible with CFZ as shown by the combination of thermal analysis and FTIR results. PLA showed interaction with the drug, and FTIR data demonstrated a non-characteristic band, suggesting incompatibility in the binary mixture CFZ-PLA. This compatibility study demonstrates that all adjuvants evaluated and the polymers PCL, PEC and PLGA are compatible with CFZ, providing important and useful information for the design of polymeric drug delivery systems containing this drug.

**Keywords :** drug-excipient compatibility study, thermal analysis, DSC, TG/DTG, Pearson's correlation.

Figura suplementar 1 – Representação esquemática da estrutura química do polímero poli(etileno carbonato) (PEC).

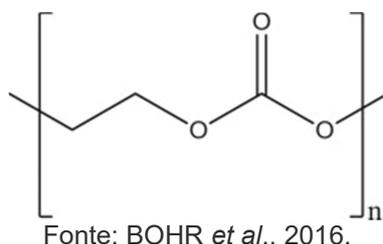


Figura suplementar 2 – Representação esquemática da estrutura química do polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL).

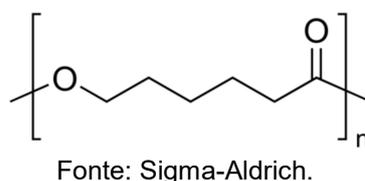


Figura suplementar 3 – Representação esquemática da estrutura química do polímero poli(D,L-lactídeo) (PLA).

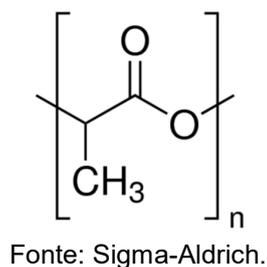
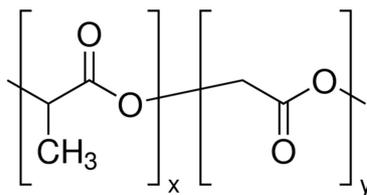
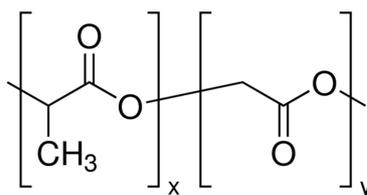


Figura suplementar 4 – Representação esquemática da estrutura química do polímero poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo (50:50) (PLGA50:50).



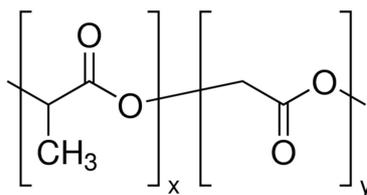
Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura suplementar 5 – Representação esquemática da estrutura química do polímero poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal (75:25) (PLGA75:25).



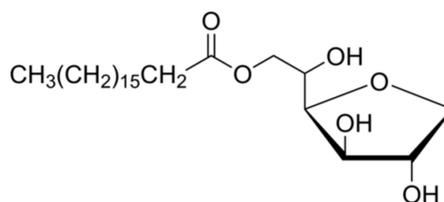
Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura suplementar 6 – Representação esquemática da estrutura química do polímero poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal (85:15) (PLGA85:15).



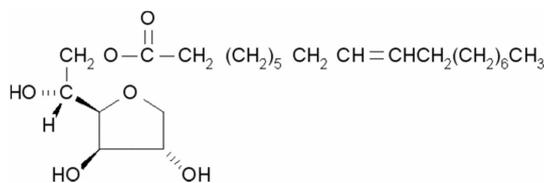
Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura suplementar 7 – Representação esquemática da estrutura química do Span®60 (monoestearato de sorbitano).



Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura suplementar 8 – Representação esquemática da estrutura química do Span®80 (monooleato de sorbitano).



Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura suplementar 9 – Representação esquemática da estrutura química do Span<sup>®</sup>85 (trioleato de sorbitano).

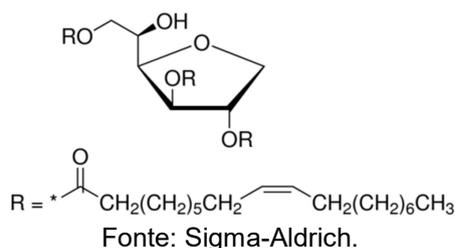


Figura suplementar 10 – Representação esquemática da estrutura química do Pluronic<sup>®</sup>F68 (PLX188).

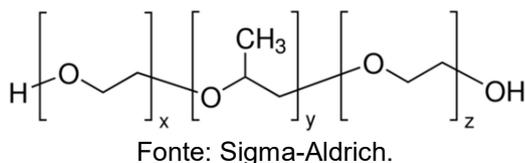


Figura suplementar 11 – Representação esquemática da estrutura química do Pluronic<sup>®</sup>F127 (PLX407).

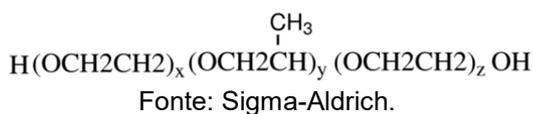


Figura suplementar 12 – Representação esquemática da estrutura química do álcool polivinílico P.S (PVA).

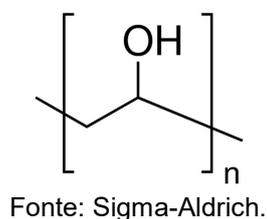


Figura suplementar 13 – Representação esquemática da estrutura química do Tween<sup>®</sup>80 (polissorbato 80).

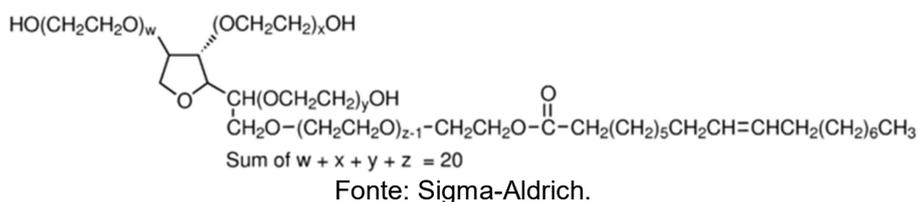


Figura suplementar 14 – Representação esquemática da estrutura química do ácido oleico.

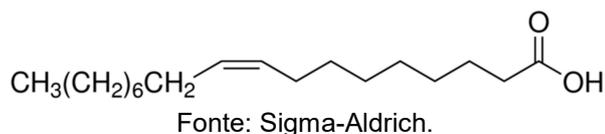
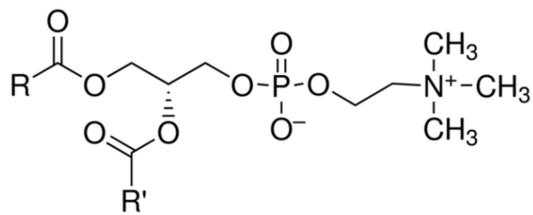


Figura suplementar 15 – Representação esquemática da estrutura química do Lipoid® S100 (fosfatidilcolina da soja).



R, R' = fatty acid residues

Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura suplementar 16 – Curvas de DSC da CFZ (clofazimina) e polímeros PEC (poli(etileno carbonato)), PCL (poli-ε-caprolactona), PLA (poli(D,L-lactídeo)), PLGA50:50 (poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50), PLGA75:25(poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil éster terminal 75:25) e PLGA85:15 (poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15).

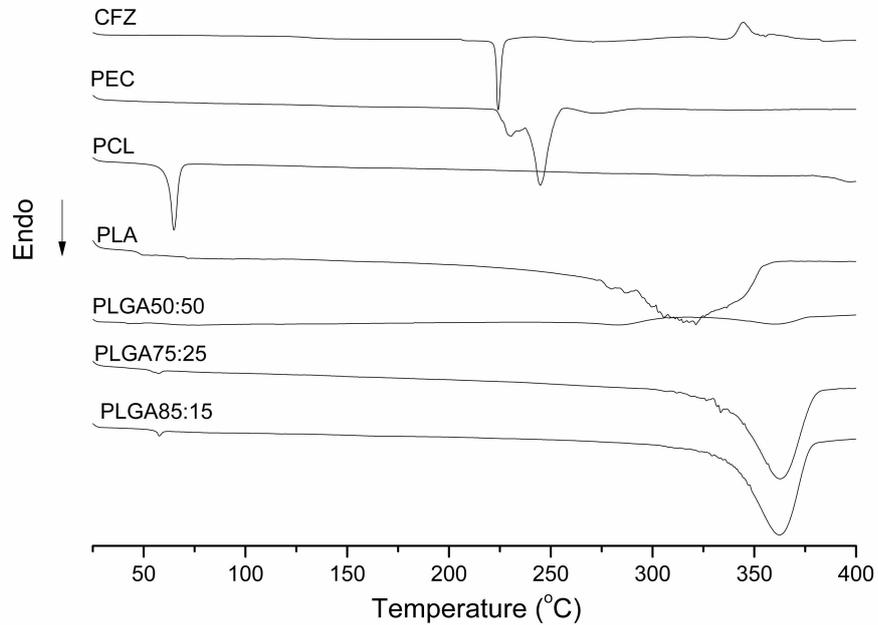


Figura suplementar 17 – Curvas de DSC da CFZ (clofazimina) e dos excipientes Span60 (monoestearato de sorbitano), Span80 (monooleato de sorbitano), Span85 (trioleato de sorbitano), PLX188 (Pluronic®F68), PLX407 (Pluronic®F127), PVA (álcool polivinílico), Tween80 (polissorbato 80), Ác.Oleico (ácido oleico), e Lecitina (fosfatidilcolina da soja).

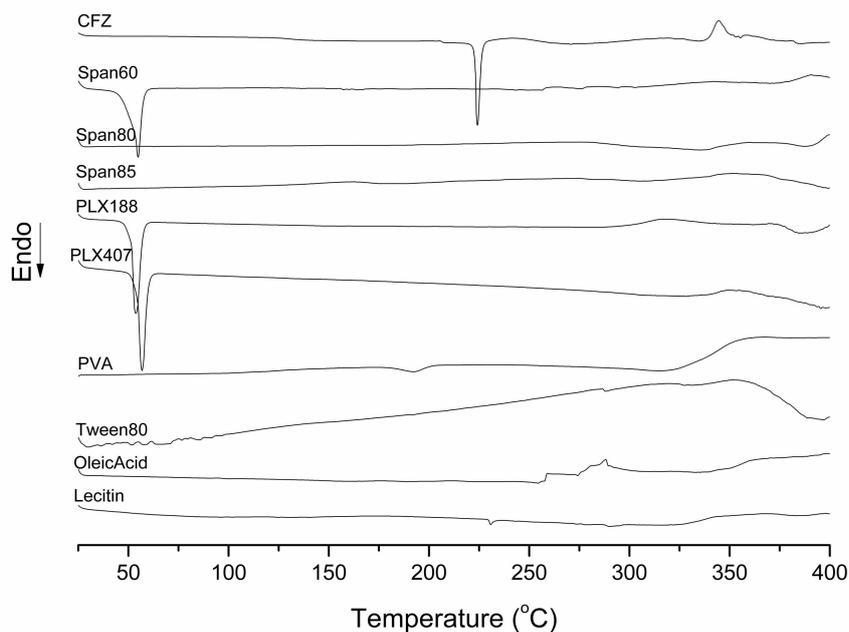


Tabela suplementar 1 – Valores de temperatura inicial ( $T_{onset}/^{\circ}\text{C}$ ), temperatura máxima ( $T_{pico}/^{\circ}\text{C}$ ) e variação de entalpia  $\Delta H$  (J/g) obtidas através de análises de DSC.

Amostra	DSC		
	$T_{onset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{pico}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H$ (J/g)
CFZ	223	224	-71
PEC	225/240/261	231/245/274	-55/-206/-35
PCL	62	65	-130
PLA	46	54	-7
PLGA50:50	40/288/334	43/ 283/360	-3/ -43/-86
PLGA75:25	52/343	57/363	-7/-817
PLGA85:15	55/345	58/362	-7/-973
Span60	52	55	-141
Span80	-	-	-
Span85	-	-	-
PLX188	51	54	-151
PLX407	55	57	-151
PVA	182	192	-24
Tween80	-	-	-
Ác Oleico	-	-	-
Lecitina	-	-	-

CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli- $\epsilon$ -caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA 50:50 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA 75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25, PLGA 85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic<sup>®</sup>F68, PLX407 = Pluronic<sup>®</sup>F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, e Lecitina = fosfatidilcolina da soja.

Figura suplementar 18 - DTG da CFZ (clofazimina) e os polímeros PEC (poli(etileno carbonato)), PCL(poli-ε-caprolactona), PLA (poli(D,L-lactídeo)), PLGA50:50 (poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50), PLGA75:25 (poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil éster terminal 75:25) e PLGA85:15 (poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15).

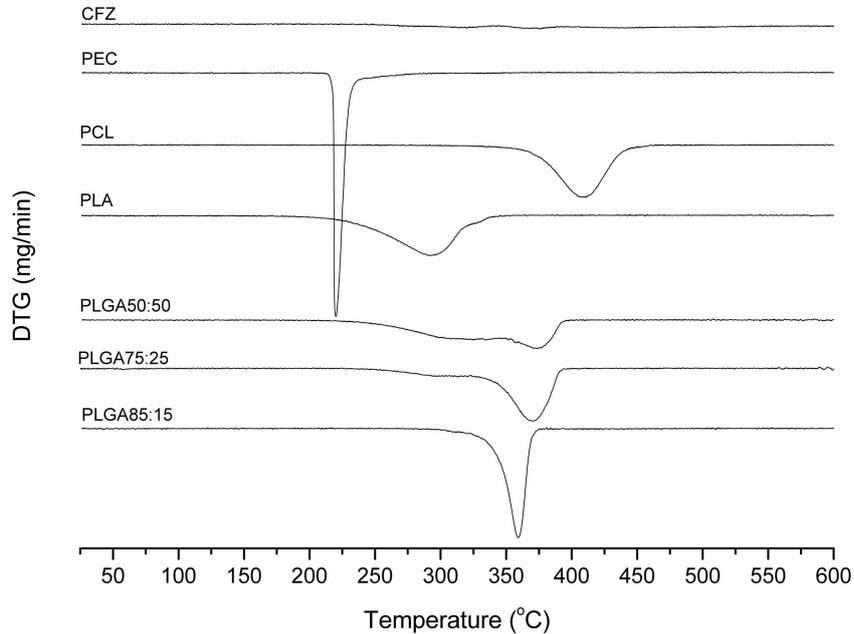


Figura suplementar 19 – DTG da CFZ (clofazimina) e os excipientes Span60 (monoestearato de sorbitano), Span80 (monooleato de sorbitano), Span85 (trioleato de sorbitano), PLX188 (Pluronic®F68), PLX407 (Pluronic®F127), PVA (álcool polivinílico) , Tween80 (polissorbato 80), Ác.Oleico (ácido oleico), e CFZ-Lecitina (fosfatidilcolina da soja).

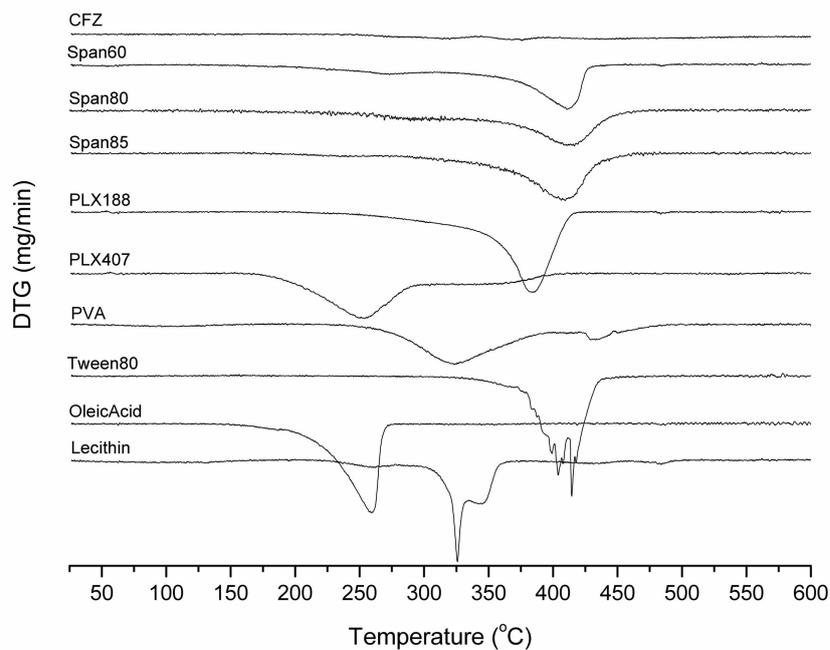


Tabela suplementar 2 – Dados de temperatura inicial ( $T_{onset}$ ) e percentual de perda de massa da curva de termogravimétrica (TG) e temperatura do pico ( $T_{pico}$ ) da derivada da curva termogravimétrica (DTG) da clofazimina, polímeros e excipientes.

Amostra	TG	DTG	
	$T_{onset}/^{\circ}C$	% perda de massa	$T_{pico}/^{\circ}C$
CFZ	325	30	320
PEC	218	98	220
PCL	386	98	410
PLA	261	91	293
PLGA50:50	306	97	374
PLGA75:25	341	94	370
PLGA85:15	347	97	341
Span60	368	91	411
Span80	358	99	416
Span85	375	95	409
PLX188	356	98	384
PLX407	223	98	254
PVA	292	90	323
Tween80	395	94	414
Ác.Oleico	232	102	259
Lecitina	319	85	326

CFZ = clofazimina, PEC = poli(etileno carbonato), PCL = poli- $\epsilon$ -caprolactona, PLA = poli(D,L-lactídeo), PLGA 50:50= poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50, PLGA 75:25 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil ester terminal 75:25, PLGA 85:15 = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15, Span60 = monoestearato de sorbitano, Span80 = monooleato de sorbitano, Span85 = trioleato de sorbitano, PLX188 = Pluronic<sup>®</sup>F68, PLX407 = Pluronic<sup>®</sup>F127, PVA = álcool polivinílico, Tween80 = polissorbato 80, Ác.Oleico = ácido oleico, e Lecitina = fosfatidilcolina da soja.

Figura suplementar 20 - Espectro de FTIR da clofazimina (CFZ) e os polímeros PEC (poli(etileno carbonato)), PCL (poli-ε-caprolactona), PLA (poli(D,L-lactídeo)), PLGA50:50 (poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-lactídeo:glicolídeo 50:50), PLGA75:25(poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-alquil éster terminal 75:25) e PLGA85:15 (poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)-éster terminal 85:15).

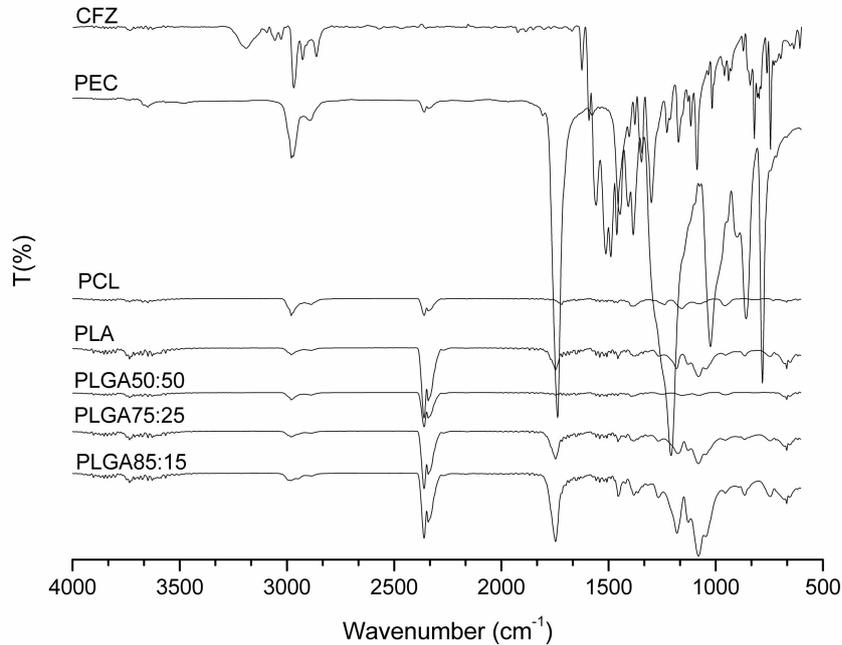


Figura suplementar 21 - Espectro de FTIR da clofazimina (CFZ) e os excipientes: Span60 (monoestearato de sorbitano), Span80 (monooleato de sorbitano), Span85 (trioleato de sorbitano), PLX188 (Pluronic®F68), PLX407 (Pluronic®F127), PVA (álcool polivinílico), Tween80 (polissorbato 80), Ác.Oleico (ácido oleico) e Lecitina (fosfatidilcolina da soja).

